

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ  
ԱԿԱԴԵՄԻԱ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՄԻԻԹԱՐ ՍԱՄՎԵԼԻ Ի ՄԿՐՏԶՅԱՆ

ՄԵԹԱԲՈԼԻԿ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ և ԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ  
ՓՈԽԿԱՊԱԿՑՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՏԱՐԲԵՐ ՇՃԱՏԵՍԱԿՆԵՐՈՎ ՀԱՐՈՒՑՎԱԾ  
ՍԱԼ ՄՈՆԵԼՈՅԻ ԴԵՊԵՈՒՄ

Գ.00.03 - «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն»  
մասնագիտությունը կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայ ցման ատենախոսություն

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

МХИТАР САМВЕЛОВИЧ МКРТЧЯН

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО  
ОТВЕТА ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЕ ВЫЗВАННЫМ РАЗЛИЧНЫМИ СЕРОТИПАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности  
03.00.03 – “Молекулярная и клеточная биология”

ЕРЕВАН – 2016

Ատենախոսու թյան թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. թեկնածու Ժ.Ա. Կճոյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Տ.Կ. Դավթյան

կենս. գիտ. թեկնածու Հ.Հ. Փանոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ "Հայ կենսաբանական գիտությունների ակադեմիա" գիտաարտադրական կենտրոն

Ատենախոսու թյան պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. հունիսի 10-ին, ժամը 15:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդում (0014, Երևան, Յարաթյան 7):

Ատենախոսու թյանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2016թ. մայիսի 10-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար կենս. գիտ. թեկնածու՝ Գ.Ս. Մկրտչյան



Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА.

Научный руководителъ: кандидат биол. наук Кцоян Ж.А.  
Официальные оппоненты: доктор биол. наук Давтян Т.К.  
кандидат биол. наук Паносян О.А.  
Ведущая организация: Научно-производственный центр «Армбиотехнология» НАН РА

Защита диссертации состоится 10 июня 2016г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).  
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 10 мая 2016г.

Ученый секретарь специализированного совета 042, кандидат биол. наук Мкртчян Г.М.



## ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒ Բ ԲՆՈՒ ԹԱԳԻՐԸ

**Աշխատանքի արդիականությունը:** Ոչ տիֆոիդ սալմոնելան սենդային ծագման վարակիչ հիվանդությունների հարուցման ամենատարածված պատճառն է: Սալմոնելոզ հիվանդության խնդիրը պահպանում է իր արդիականությունը՝ կապված հիվանդացության բարձր մակարդակի հետ՝ կազմելով տարեկան 98.3 մլն դեպք, որոնցից 155000-ը՝ մահվան ելքով [Rabsch et al., 2001, Majowicz et al., 2010]: Հիվանդության կլինիկական արտահայտման և անախտանիշ ձևերի բազմազանությունը և հարուցչի փոխանցման բազմատեսակությունը բարդացնում են խնդրի լուծումը: Ամբողջ աշխարհում, այդ թվում և Հայաստանում, երկու ամենատարածված շճատեսակներն են հանդիսանում *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) և *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), որոնք առաջացնում են սուր գաստրոէնտերիտներ, ինչը մակահասակ, տարեց և թույլ իմունետեղով հիվանդների մոտ բերում է հետագա լուրջ հետևանքների [Hendriksen et al., 2011]: Հիվանդության կլինիկական պատկերը կախված է սալմոնելայի շճատեսակից, վիրուլենտությունից և ախտածնությունից, ախտանիշ հանդես տիրող օրգանիզմի զգայունությունից՝ կապված իմունային կարգավիճակի, տարիքի և այլ գործոնների հետ [Coburn et al., 2007]: Չնայած սալմոնելայի տեսակները գենետիկորեն մոտ են, անընդհատ փոփոխվող շարժուն գենետիկական տարբերով պայմանավորված՝ տարբեր եկոլոգիական խորշերում հարուցիչը դրսևորում է վիրուլենտության, ախտածնության և հիվանդության արտահայտման բազմազանություն [Thomson et al., 2008; Jacobsen et al., 2011]: Սալմոնելոզի հետևանքով առաջացած միկրոբիոտայի խախտումները հանգեցնում են տեր-մանրէ ոչ նորմալ փոխազդեցությունների, ինչը հանդիսանում է քրոնիկ իմունային հիվանդությունների (ալերգիկ և աուտոիմունային) առաջացման լուրջ ռիսկի գործոն [Hawrelak et al., 2004; Licciardi et al., 2010; Cremon et al., 2014; Lerner et al., 2016]:

Տիրոջ օրգանիզմի հոմեոստազի կարգավորման գործում վճռական դեր են խաղում աղիների միկրոբիոտայի մեթաբոլիտները, մասնավորապես՝ կարճ շղթայով ճարպաթթուները (ԿԾճԹ): Վերջիններս օգտագործվում են ինչպես տիրոջ օրգանիզմի, այնպես էլ ախտածինների կողմից [Winter et al., 2010; Ahmer et al., 2011]:

Չնայած սալմոնելոզին նվիրված մեծաքանակ ուսումնասիրությունների և անհրաժեշտ են նոր հետազոտություններ, որպեսզի բացահայտվեն տեր-մանրէ բարդ փոխարարությունների մեխանիզմները և տարբեր իմունային պատասխաններ առաջացնող գենետիկ շարքը, որոնք հանգեցնում են հիվանդության տարբեր կլինիկական դրսևորումների:

Մինչ այժմ հետազոտությանը ունենե՞րի մեծ մասն իրականացվել է *in vitro* և մկնային մոդելների վրա, մինչդեռ *in vivo* ուսումնասիրությանը ունենե՞րը, ուղղված սալմոնելոզի ժամանակ միկրոբիոտա-տերո-ախտածին փոխկապվածության և պարզաբանմանը, եզակի են:

**Նպատակը և խնդիրները:** Աշխատանքի նպատակն է Յայաստանում շրջանառվող սալմոնելա շճատեսակների մոլեկուլազենետիկական բնութագրումը, սալմոնելոզի ժամանակ տերո-ախտածին փոխարարներուն ունենե՞րի, մասնավորապես՝ մարդու օրգանիզմում (*in vivo*) շճատեսակ-կախյալ բորբոքային պատասխանի ազդեցությանը ունենե՞րի և յուրահատկությանը ունենե՞րի պարզաբանումը:

Աշխատանքի իրականացման համար դրվել են հետևյալ խնդիրները՝

- I. Որոշել աղիքային միկրոբիոտայի շեղումները և գնահատել դիսբիոզի աստիճանը:
- II. Բացահայտել շճատեսակ-յուրատիպ բորբոքման ուղիների առաջացրած հետևանքները տիրոջ օրգանիզմում, մասնավորապես սալերգիաների հանդեպիակվածությանը ունը:
- III. Ուսումնասիրել բորբոքային պատասխանի ազդեցությանը տիրոջ օրգանիզմի մեթաբոլիզմի վրա:
- IV. Բնութագրել հետազոտվող շճատեսակների գենետիկական առանձնահատկությանը ունենե՞րը:

**Գիտական նորույթը և կիրառական նշանակությանը ունը:** Ներկա աշխատանքը բացահայտում է ոչ տիֆոիդ սալմոնելայով վարակման դեպքում օրգանիզմի բորբոքային պատասխանի զարգացման ժամանակ ախտածնի շճատեսակի առանցքային դերը: Օգտագործելով *in vivo* կլինիկական նյութ՝ աշխատանքում ուսումնասիրվել է Յայաստանում շրջանառվող երկու ամենատարածված շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի դեպքում օրգանիզմի բորբոքային պատասխանը, նկարագրվել են վերջինիս յուրահատկությանը ունենե՞րը և առաջացրած հետևանքները:

Մասնավորապես, մերկողմից ցույց է տրվել, որ.

1. Սալմոնելայով հարուցված բորբոքային պատասխանը և դրա հետագա ազդեցությանը ունը մարդու օրգանիզմի վրա շճատեսակ-յուրատիպ է:
2. Յայաստանում տարածված *S. Enteritidis* շճատեսակը հանգեցնում է օրգանիզմի սենսիբիլիզացմանը:
3. *S. Enteritidis*-ով հարուցված վարակի ժամանակ IL-17-ը հանդիսանում է օրգանիզմի սենսիբիլիզացման խթանող գործոն:
4. Սալմոնելայով հարուցված դիսբիոտիկ պայմաններում համակարգային ԿԾՃԹ-ների մակարդակը անկանխատեսելիորեն բարձր է:

Աշխատանքում իրականացվել է ԿՇՃԹ-ների համակարգային կոնցենտրացիաների գուգահեռ համեմատությունն այնպիսի ախտաբանական պայմաններում, ինչպիսիք են՝ ստամոքսաղիքային վարակները և աուտոբորբոքային հիվանդությունները: Առաջ է քաշվել վարկած, համաձայն որի՝ բորբոքումը ճնշում է օրգանիզմում միկրոբային մեթաբոլիտների մեթաբոլիզմը, որի հետևանքով բնույթով տարբեր այս երկու ախտաբանական վիճակներում բարձրանում է համակարգային ԿՇՃԹ-ների մակարդակը:

Ստացված տվյալները կարող են զգալի ներդրում ունենալ բորբոքման տարբեր մեխանիզմների դեպքում հիվանդության ելքի կանխատեսման, ինչպես նաև վարակների ժամանակալի երգիաների նկատմամբ հակվածության պարզաբանման գործում: Աշխատանքը նախադրյալներ է ստեղծում Յայաստանում շրջանաձև սալմոնելաների մոլեկուլախամաձարակաբանական քարտեզի նախագծման համար, ինչը կնպաստի սալմոնելոզների կանխարգելման և բուժման այլընտրանքային մազմավարության մշակմանը՝ կախված շճատեսակային յուրատիպուսից:

**Ատենափոսուլային փորձարկումը:** Աշխատանքի հիմնական դրույթները ներկայացվել են գիտաժողովներում և գեկուցվել 33 ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում՝ 2016թ.-ի ապրիլի 18-ին:

**Յրառարակած գիտական աշխատանքները:** Ատենափոսուլային աշխատանքի թեմայով հրատարակվել է 3 գիտական հոդված և երկու թեզիս:

**Ատենափոսուլային ծավալը և կառուցվածքը:** Աշխատանքը շարադրված է 115 էջի վրա, պարունակում է 5 աղյուսակ, 14 նկար: Գրականության ցանկը ներառում է անգլերեն և ռուսերեն լեզուներով 176 անվանում: Ատենափոսուլայինը բաղկացած է հապավումների ցանկից, ներածությունից, գրական ակնարկից, փորձարարական մասից, հետազոտության արդյունքներից, ամփոփումից, եզրակացություններից և գրականության ցանկից:

## **ՅԵՏԱՉՈՏՈՒ ԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈՂՆԵՐԸ**

**Սուբյեկտ** Յետազոտության սուբյեկտներ են հանդիսացել 2013-2015թթ. «Նորք» ինֆեկցիոն կլինիկական հիվանդանոցի կողմից տրամադրված 89 սալմոնելոզով հիվանդներ, ինչպես նաև 20 առողջ անձիք: Յետազոտության համար ընտրվել են Յայաստանում գերակշռող *S. Typhimurium* և *S. Enteritidis* շճատեսակներով վարակված անձինք՝ հիվանդության սուր փուլում: Յետազոտված անձինք բաժանվել են հետևյալ խմբերի՝ *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալմոնելոզով հիվանդ անձինք (ընդհանուր՝  $n=57$ , 4 տարեկանից փոքր՝  $n=23$  (միջին տարիք՝  $M=2,6$ , ստանդարտ շեղում՝  $SD=1,1$ ), 4 տարեկանից մեծ՝  $n=34$  ( $M=23,9$ ,  $SD=19,4$ )),

S. Typhimurium-ով հարուցված սալ մոնելոգով հիվանդ անձինք (ընդհանուր՝ n=32, 4 տարեկանից փոքր՝ n=21 (M=2,15, SD=0,9), 4 տարեկանից մեծ՝ n=11 (M=20,03, SD=19,4)) և առողջ անձանց ստուգիչ խումբ (ընդհանուր՝ n=20, 4 տարեկանից փոքր՝ n=10 (M=2,6, SD=0,9), 4 տարեկանից մեծ՝ n=10 (M=26,2, SD=12,4)): Տարիքի գործոնի ազդեցության ուսումնասիրության համար հետազոտվածները բաժանվել են երկու խմբի՝ սահմանագիծ ընտրելով 4 տարեկանը՝ հաշվի առնելով նորմալ աղիքային միկրոբիոտայի և իմունային կարգավիճակի ձևավորումը: Հետազոտության նկատմամբ համար ընտրված անձինք միևնույն հոսպիտալացումը որևէ դեղամիջոց չեն ընդունել, ներառյալ՝ հակաբիոտիկներ:

**Օբյեկտ** Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել արյան և կղանքի նմուշները: Հետազոտված անձինք տվել են նմուշներ տրամադրելու իրենց համաձայնությանը: Նմուշները վերցվել են հոսպիտալացման առաջին կամ երկրորդ օրը:

**Կլինիկական բնութագրում:** Սալ մոնելոգ ախտորոշումը դրվել է կլինիկական պատկերի հիման վրա և հաստատվել մանրէաբանական, կենսաքիմիական և շճաբանական (Կառլ Ֆրանկ-Ուայթի սխեմա) թեստերով: Ստեղծվել է սալ մոնելոգով հիվանդների տվյալների հավաքածու (*anamnesis vitae* և *anamnesis morbi*):

**Միկրոբային համակեցությունների հետազոտություն** իրականացվել է կղանքի նմուշներում դասական մանրէաբանական մեթոդներով, տարբեր սելեկտիվ միջավայրերի վրա: Հաշվի են առնվել կլինիկայում ընդունված նորմերը: Դիսբիոզի նկարագրության համար օգտագործվել է Միտրոխինի կողմից առաջարկված սանդղակը [Митрохин, 1998]:

**Միկրոբիոտայի մեթաբոլիկ ակտիվության որոշում:** Արյան շիճուկում ԿՇՃԹ-ների սկրինինգը կատարվել է գազահեղուկային քրոմատոգրաֆիայի մեթոդով: ԿՇՃԹ-ների նույնականացումն ավտոմատ կերպով իրականացվում է Galaxie Workstation ծրագրային փաթեթի միջոցով:

**Ալերգիայի կենսացուցիչ իմունոգլոբուլին E-ի (IgE) որոշում:** Արյան շիճուկում IgE-ի մակարդակը որոշվել է էլեկտրաբեմիլյունմիներեսցենցիայի մեթոդով, “Սենդվիչ”-ի սկզբունքով՝ համաձայն արտադրողի ցուցումների:

**Ինտերլեյկինների կոնցենտրացիայի որոշում:** Ինտերլեյկինների կոնցենտրացիաները արյան շիճուկում որոշվել են պիկո-ֆազային իմունոսֆերմենտային անալիզի՝ ELISA-ի միջոցով:

**Գենոտիպավորում:** Պլազմիդային ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է GenElute Five-Minute Plasmid Miniprep նյութերի հավաքածուի միջոցով՝ համաձայն արտադրողի ցուցումների: Հետազոտված 36 շտամերում (S. Typhimurium n=12, S. Enteritidis n=24)

ստուգվել է *spvRABC*, *pefA*, *spiC*, *pegD* գեների առկայությունը  
արևիմերազային շղթայական ռեակցիայի (PCR) մեթոդով:

**Վիճակագրական վերլուծությունն** իրականացվել է Mann-Whitney  
և Fisher's exact թեստերի միջոցով (GraphPad Software Inc., ԱՄՆ):  
Դիսկրիմինանտ ֆունկցիոնալ անալիզը կատարվել է SPSS Statistics  
19 (SPSS Inc., ԱՄՆ) ծրագրի օգտագործմամբ: Վիճակագրորեն  
հավաստի ընդունվել են  $p < 0.05$  և Ուիլկոքսոնի  $p < 0.1$ :

## **ՀԵՏԱՉՈՏՈՒ ԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄ**

### **Աղիքային միկրոբիոտայի շեղումները տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալ մոնելոզի ժամանակ**

Ներկայումս սալ մոնելոզների սուր փուլում միասնաբար են քննարկվում աղիների միկրոբիոտայի խախտումները, իմունային կարգավիճակը և հիվանդության դրսևորումները [Grassi et al., 2008]: Սույն հետազոտության տվյալները վկայում են, որ *S. Typhimurium* շճատեսակով հարուցված սալ մոնելոզով հիվանդների 66%-ը կազմում են մինչև 4 տարեկան երեխաները, իսկ *S. Enteritidis*-ով հարուցված դեպքերը նույն տարիքային խմբում՝ 40% են: Բարձր տարիքային խմբերում նկատվում է հակառակ տոկոսային հարաբերությունը:

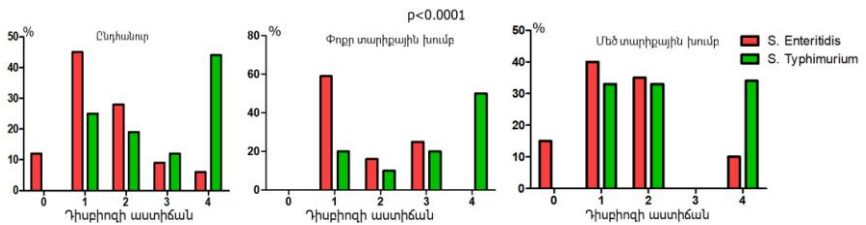
Կլինիկական մանրէաբանական հետազոտության տվյալների հիման վրա բնութագրվել է մակրոօրգանիզմի դիսբիոզը և դրա աստիճանը: Սալ մոնելոզով հարուցված դիսբիոզը նկարագրվում է բիֆիդոբակտերիաների, լակտոբացիլների և աղիքային ցուպիկի քանակի կտրուկ նվազմամբ: Միաժամանակ տեղի է ունենում լակտոզբացասական բակտերիաների, *E. coli* տրոպիկների, կանդիդա ցեղի սնկերի և պրոտեոցիալ ախտածին *E. coli* տերիկ բակտերիաների քանակի ավելացում՝ համեմատած առողջ ստուգիչների հետ: Այսպիսով, օրգանիզմի համար օգտակար մանրէների քանակը գերճնշված է ի դեմս պայմանական ախտածին մանրէների աճի: Ցածր β գալակտոզիդազային ակտիվությամբ աղիքային ցուպիկ հայտնաբերվել է միայն *S. Enteritidis*-ով հիվանդների մոտ, մինչդեռ *S. Typhimurium* վարակի դեպքում, ի համեմատ *S. Enteritidis*-ի, դիտվում է լակտոզբացասական մանրէների քանակի ավելացում ավելի քան 3 անգամ: Ախտածին *E. coli* տերիկ բակտերիաներն առկա են *S. Typhimurium*-ով վարակված 80% հիվանդների կղանքում, մինչդեռ *S. Enteritidis*-ի դեպքում հայտնաբերվում են 37.5%-ի մոտ:

Դիսբիոզի աստիճանն առավել բարձր մակարդակի է հասնում *S. Typhimurium*-ով հարուցված սալ մոնելոզով հիվանդների մոտ, հատկապես՝ փոքր տարիքային խմբում (նկ. 1), ինչն օրինաչափ է, քանի որ այդ տարիքում գաղութային ռեզիստենտություն մեխանիզմները դեռևս չի արժեք չեն գործում [Lawley et al., 2013]:

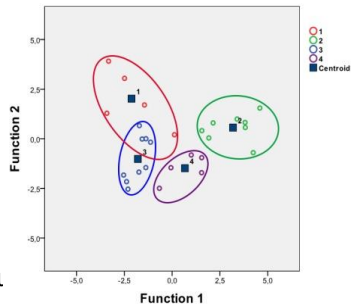
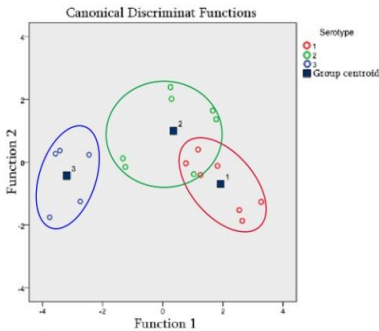
Դասական մանրէաբանական մեթոդներով ստացված տվյալները ենթարկվել են բազմաֆունկցիոնալ անալիզի:

Փոքր տարիքային խմբում դիսկրիմինանտ անալիզը (ԴԱ) ցույց է տվել դիսբիոզի զգալի կախվածությունն սալ մոնելոզի շճատեսակից (նկ. 2 ա): Մինչդեռ ներխմբային վերլուծությունը ցույց է տվել, որ *S. Typhimurium* վարակի ժամանակ առկա է դիսբիոզի զգալի կախվածությունն տարիքից (նկ. 2 բ):





**Նկար 1.** Դիսբիոզի աստիճանը *S. Typhimurium* և *S. Enteritidis* սալ մոնետել ոգնետրով հիվանդների մոտ:



գեներա  
Ի ո ն ե լ ա, չ. Ե. Շ Օ Մ, 5. Լ ա վ ս ո լ վ բ ա ջ ա ս ա վ ա ն  
4. բ ի Ֆ ի դ ռ բ ա կ տ ր ի ա ն եր, 5. ր շ ի չ

Է ն տ ր ը ռ օ բ ա կ տ ր ի ա ն եր,

**Ա** Փոքր տարիքային խմբի միջ շ ճ առ տ ս ա կ ա յ ի ն ԴԱ՝ 1-Տ. Enteritidis՝ <4, 2-Տ. Typhimurium՝ <4, 3-Առ ո ղ ջ ս տ ու լ գ ի չ ն եր՝ <4: 84.2% ճ շ գ ռ ի տ դ ա ա ա կ ար գ ու մ, Ու ի լ կ ս ի  $\lambda=0.1$

**Բ.** *S. Typhimurium*-ի դեպքում ներխմբային ԴԱ՝ 1-Տ. Typhimurium՝ >4, 2-Տ. Typhimurium՝ <4, 3-Առ ո ղ ջ ս տ ու լ գ ի չ ն եր՝ >4, 4-Առ ո ղ ջ ս տ ու լ գ ի չ ն եր՝ <4: 89.3% ճ շ գ ռ ի տ դ ա ա ա կ ար գ ու մ, Ու ի լ կ ս ի  $\lambda=0.031$

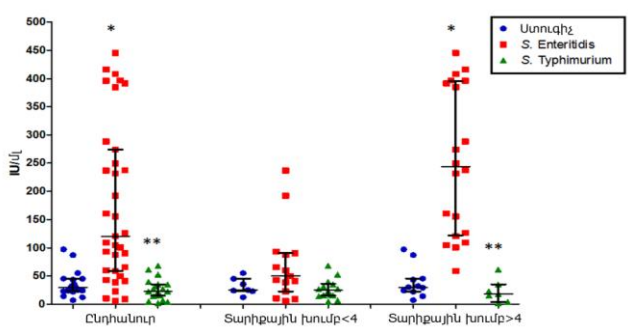
Լ ա կ տ ռ օ բ ա յ ի լ ն եր, 6. Է ն տ ր ը ռ կ ո կ եր, 7. կ ա ն դ ի դ ա ս ն կ եր, ի ն չ ա փ ս ն ա ն 8. դ ի ս բ ի ղ զ ի աս տ ի ճ ա ն և 9. հ ե տ ա զ ո տ վ ա ծ ս ու լ բ յ ե կ տ ն եր ի տ ար ի ք:

Ա յ ս ա փ ս ո վ, ս ա կ մ ո ն ե լ ո գ ն ու ղ ե կ զ վ ու մ Է խ ո ռ ը դ ի ս բ ի ղ զ ո վ, ը ն դ ո ռ ու մ հ ար ու ճ ջ ի կ ո ղ մ ի ց ա ա շ ա ց ռ ա ծ ա ղ ի ք ա յ ի ն մ ի կ ռ ը բ ի ո տ ա յ ի խ փ խ տ ու մ ն եր ը տ ար բ եր ա կ վ ու մ Է ն ը ս տ տ ար ի ք ի և շ ճ առ տ ս ա կ կ ա փ ա յ ա լ Է ն:

**Օրգանիզմի բորբոքային պատասխանը և սենսիբիլիզացումը տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալ մոնելիոզի ժամանակ**

Աշխատանքում կատարվել են հետազոտություններ ալերգիաների նկատմամբ հակվածության ձեռքբերման գործում երկու շճատեսակներով հարուցված սալ մոնելիոզի հնարավոր ազդեցությունը պարզելու ուղղությամբ՝ սահմանելով շճատեսակ-կախյալ բորբոքային պատասխանի ռիսկի խմբեր, որը կարող է հանգեցնել ալերգիկ ռեակցիաների: Հետազոտվել է համակարգային IgE-ի կոնցենտրացիան, որը հանդիսանում է ալերգիկ հիվանդությունների մարկեր և կարող է վկայել օրգանիզմի սենսիբիլիզացման մասին նույնիսկ ալերգիա չունեցող սուբյեկտների մոտ [Kerkhof et al., 2003]:

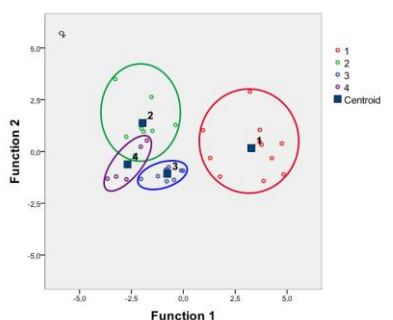
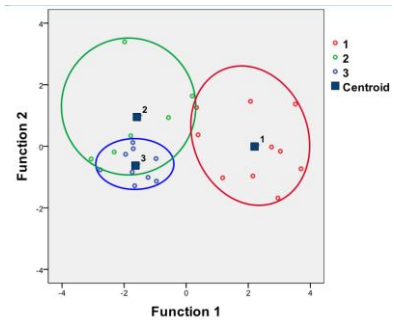
**Համակարգային IgE-ն S. Enteritidis և S. Typhimurium վարակների ժամանակ:** Հայտնաբերվել է, որ ընդհանուր IgE-ի մակարդակը 3-5 անգամ ( $p < 0.0001$ ) բարձրացած է S. Enteritidis-ով հարուցված սալ մոնելիոզով հիվանդների երկու տարիքային խմբերի մոտ՝ համեմատած առողջ ստուգիչների հետ, մինչդեռ S. Typhimurium-ով հարուցված սալ մոնելիոզի դեպքում IgE-ի մակարդակը մոտ է ստուգիչների IgE-ի արժեքներին ( $p = 0.12$ ): S. Enteritidis-ով հարուցված սալ մոնելիոզով բոլոր տարիքային խմբերի հիվանդների արյան շիճուկում IgE-ի մակարդակը մոտ վեց անգամ գերազանցում է S. Typhimurium-ով հիվանդների համապատասխան ցուցանիշը ( $p < 0.0001$ ):



**Նկար 3.** Սալ մոնելիայի շճատեսակներով հարուցված՝ տարիքային խմբերում համակարգային IgE-ի կոնցենտրացիան: Ընդհանուր՝ ստուգիչներ, S. Enteritidis և S. Typhimurium՝ անկախ տարիքից: Երկրորդ և երրորդ սյունակները՝ բաժանված ըստ տարիքի և շճատեսակի: \*հավաստի տարբերություն են առողջ ստուգիչների համեմատ ( $p \leq 0.0002$ ): \*\*հավաստի տարբերություն են S. Enteritidis-ով և S. Typhimurium-ով հարուցված սալ մոնելիոզով հիվանդների միջև ( $p \leq 0.0002$ ) (Mann-Whitney U-test):

Համեմատած առողջների խմբի հետ՝ *S. Enteritidis*-ով վարակվածների չորսից բարձր տարիքային խմբում IgE-ի մակարդակը գերազանցում է ութ անգամ ( $p < 0.0001$ ): Փոքր տարիքային խմբում դիտվում են IgE-ի մակարդակի մեծ տատանումներ, որոնք, հավանաբար, պայմանավորված են չձևավորված իմունային համակարգով (նկ. 3): *S. Typhimurium*-ով վարակված հիվանդների մոտ IgE-ի ցածր մակարդակը համապատասխանում է առկա մի շարք ախտանշանների մեկնաբանմանը, որտեղ նշվում է, որ *S. Typhimurium*-ը կարող է հանդես գալ որպես ալերգիաների կանխարգելիչ գործոն [Herz et al., 2000; Pelosi et al., 2005]:

Ալերգիկ վիճակները հիմնականում համարվել են շրջակա միջավայրի մանրէների և իմունային համակարգի ոչ բավարար փոխադրեցում հետևանք [Strachan, 1989]: Առկա են մի շարք ախտանշաններ, որոնք մատնանշում են աղիքային միկրոբիոտայի դիսբիոտիկ փոփոխությունների և ալերգիաների միջև կապը [Penders et al., 2007a; Penders et al., 2007b; Prakash et al., 2011]: Տվյալ ախտանշաններում փորձ է կատարվել պարզաբանելու սալմոնելոզի ընթացքում դիսբիոտիկ ազդեցությունն ընդհանուր IgE-ի կոնցենտրացիայի վրա: Այդ նպատակով դիսբիոտիկ ԴԱ մոդելի կանխորոշիչների շարքին ավելացվել է IgE-ն՝ որպես փոփոխական կանխորոշիչ (նկ. 4):



**Ա.** Մեծ տարիքային խմբի ԴԱ. 1-*S. Enteritidis*՝  $>4$ , 2-*S. Typhimurium*՝  $>4$ , 3-Առողջ ստուգիչներ՝  $>4$ : 84.6% ճշգրիտ դասակարգում,  $\lambda = 0.091$

**Բ.** *S. Enteritidis*-ի դեպքում ներխմային ԴԱ. 1-*S. Enteritidis*՝  $>4$ , 2-*S. Enteritidis*՝  $<4$ , 3-Առողջ ստուգիչներ՝  $>4$ , 4-Առողջ ստուգիչներ՝  $<4$ : 93.9% ճշգրիտ դասակարգում,  $\lambda = 0.048$

**Նկար 4.** Մոդելներ գեներացված դիսբիոտիկ ԴԱ-ի կանխորոշիչ փոփոխականներով և IgE-ի կոնցենտրացիայով:

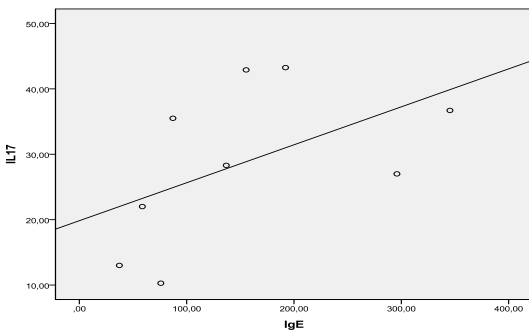
Արդյունքները վկայում են, որ սալ մոնելայի շճատեսակը կարևոր դեր է խաղում ոչ միայն յուրատեսակ հարբորբոքային արոցեսներում [Ktsoyan et al., 2013], այլև ներգրավված է ձեռքբերովի իմուննիտետի իմուննազլոբուլինային պատասխանի ձևավորման մեջ, որը ներառում է IgE-ի արտադրությունը B բջիջների կողմից [Milovanovich, 2010; Nakajima et al., 2014]: Արդյունքների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ, ընդհանուր առմամբ, IgE-ի կոնցենտրացիայի և դիսբիոզի աստիճանի միջև առկա է հակադարձ փոխկապակցվածություն: IgE-ի կոնցենտրացիան բարձր է *S. Enteritidis*-ով վարակվածների մոտ՝ ի համեմատ *S. Typhimurium*-ի, մինչդեռ դիսբիոտիկ շեղումներն առավել խորն են արտահայտված *S. Typhimurium*-ով հարուցված սալ մոնելոզով հիվանդների մոտ, հետևաբար, տվյալ դեպքում դիսբիոզը չի կարող դիտվել որպես *S. Enteritidis*-ով վարակվածների մոտ IgE-ի արտադրման հիմնական գործոն (նկ. 1, նկ. 4ա, բ):

**IL-17-ի և IgE-ի կորելյացիան *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալ մոնելոզով հիվանդների մոտ**

Նախկինում բացահայտվել է, որ IL-17-ի մակարդակը *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալ մոնելոզի ժամանակ կտրուկ բարձրացած է ստուգիչ խմբի համեմատ [Ktsoyan et al., 2013]:

Մի շարք հետազոտություններ մատնանշում են IL-17-ի ներգրավվածությունն այնպես, որպես գործընթացներում, ներառյալ՝ ալերգիան և աուտոիմունային հիվանդությունները [Oboki et al., 2008; Cosmi et al., 2011; Newcomb et al., 2013; Zhao et al., 2013; Manni et al., 2014; Naji et al., 2014]:

Ելնելով վերը նշվածից՝ IL-17-ի բարձր մակարդակը կարող է նպաստել IgE-ի մակարդակի բարձրացմանը, որը պարզապես ունի նպաստով իրականացվել է կոռելյացիոն անալիզ (նկ. 5):



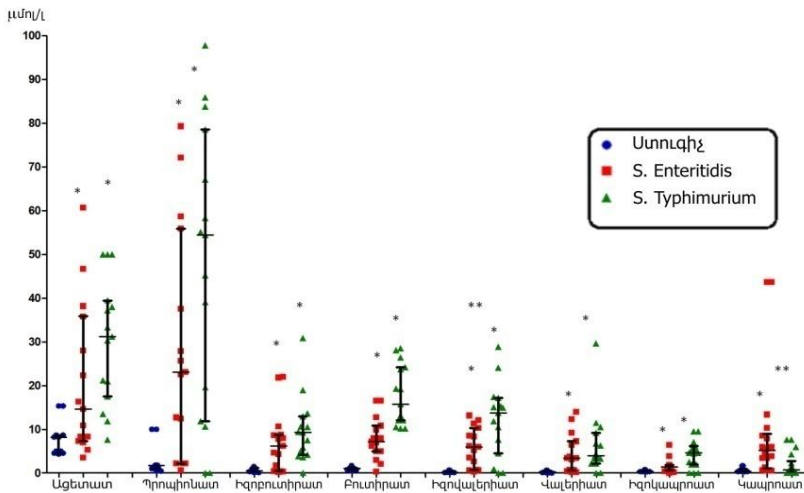
**Նկար 5.** Սպիրմանի կորելյացիա IL-17-ի և IgE-ի միջև, *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալ մոնելոզով հիվանդների մոտ: Սպիրմանի  $\rho=0.683$

Ուսումնասիրելով ալերգիկ սենսիբիլիզացմանը նպաստող տարբեր գործոններ՝ ցույց է տրվել դրական կորելյացիա IgE-ի և IL-17-ի միջև, մինչդեռ

աղիքային շեղված միկրոբիոտայի դերն ուսումնասիրելիս ստացվել է բացասական կապ դիսբիոզի աստիճանի և IgE-ի կոնցենտրացիայի միջև: Յաստատվել է, որ որոշակի բակտերիալ վարակներ կարող են նպաստել օրգանիզմի սենսիբիլիզացմանը՝ խթանելով IgE-ի արտադրությունը: Յատկանշակա՞ն է, որ նույնիսկ միևնույն տեսակի բակտերիաները մակա՞ծում են IgE-ի տարբեր մակարդակներ: Յետևաբար, բակտերիալ վարակի արտահայտումը կարող է տարբերել քու՞նենալ ալերգիկ խանգարումների գործընթացում [Herz et al., 2000]:

**Միկրոբիոտայի կենսագործունեության հիմնական մեթաբոլիտների՝ ԿԾՃԹ-ների համակարգային կոնցենտրացիան սալմոնելոզի ժամանակ**

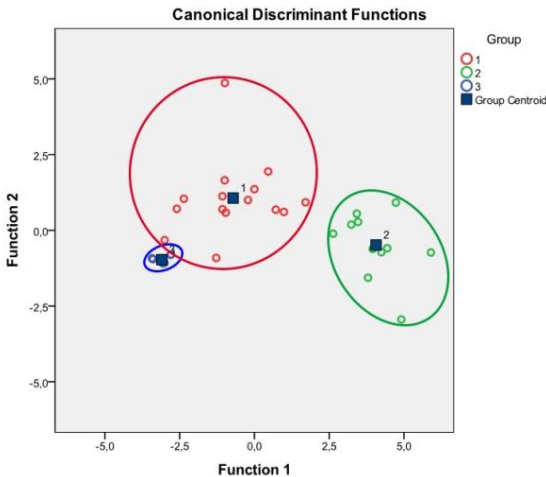
Առողջ անձանց ծայրամասային արյան մեջ ԿԾՃԹ-ներ, որպես կանոն, գրեթե չեն հայտնաբերվում կամ լինում են աննշան քանակությամբ, քանի որ այս միկրոբային մեթաբոլիտներն ակտիվորեն ենթարկվում են մեթաբոլիզմի աղեստամոքսային տրակտի, լյարդի, մկանների և այլ օրգանների կողմից: Մինչդեռ *S. Typhimurium*-ով և *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալմոնելոզի սուր փուլում, ճշված միկրոբիոտայի պայմաններում, հիվանդների ծայրամասային արյան մեջ ԿԾՃԹ-ների կոնցենտրացիան անկանխատեսելիորեն բարձրացած է (5-20 անգամ՝ համեմատած առողջների հետ,  $p < 0.05$ ) (նկ. 6):



**Նկար 6.** ԿԾՃԹ-ի համակարգային կոնցենտրացիան տարբեր շճատեսակներով հարուցված սալմոնելոզի ժամանակ (median + IQR): \*հավաստի տարբերությունն սալմոնելոզով հիվանդների և առողջ

ստուգիչ ներքին միջև ( $p < 0.05$ ): \*\*հավաստի տարբերությունն *S. Enteritidis*-ով և *S. Typhimurium*-ով վարակվածների միջև ( $p < 0.05$ ):

ԿՇՃԹ-ների կոնցենտրացիաների շճատեսակից կախված յուրատեսակությունը որոշելու նպատակով տվյալները ենթարկվել են դիսկրիմինատ ֆունկցիոնալ անալիզի (նկ. 7): Ստացված արդյունքը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ *S. enterica* ենթատեսակի երկու շճատեսակների դեպքում էլ ԿՇՃԹ-ների կոնցենտրացիաների կտրուկ բարձրացման ժամանակ առկա է մեթաբոլիտների պրոֆիլի հարուցիչ-կախյալ որոշակի յուրատիպություն:



**Նկար 7.** ԴԱ մոդել, գեներացված սալմոնելոզով հիվանդների և առողջների ԿՇՃԹ-ների համակարգային կոնցենտրացիաների հիման վրա: Խմբեր՝ 1-*S. Enteritidis*, 2-*S. Typhimurium*, 3-Առողջ ստուգիչներ: 94.6% ճշգրիտ դասակարգում,  $\lambda = 0.055$ :

### Հիմնական ԿՇՃԹ-ների հարաբերությունները

Ստացված արդյունքների հիման վրա որոշվել են ԿՇՃԹ-ների հիմնական ներկայացուցիչների՝ ացետատի, պրոպիոնատի և բուտիրատի մոլային հարաբերությունները (աղ. 1): Առողջ անձանց մոտ այս երեք ԿՇՃԹ-ները միասին կազմում են բոլոր ԿՇՃԹ-ների մոտ 95%-ը [Cook et al., 1998]:

Առողջ անձանց ծայրամասային արյան մեջ պրոպիոնատի և բուտիրատի կոնցենտրացիաների՝ մեր կողմից ստացված արդյունքները համընկնում են առկա աշխատանքների տվյալների հետ [Cummings et al., 1987]: Միևնույն ժամանակ ացետատ:պրոպիոնատ:բուտիրատ մոլային հարաբերությունը զգալիորեն փոխված է՝ ացետատի բաժնեմասի կտրուկ նվազմամբ, միաժամանակ պրոպիոնատի և բուտիրատի բարձրացումով (աղ. 1):

Աղյուսակ 1.

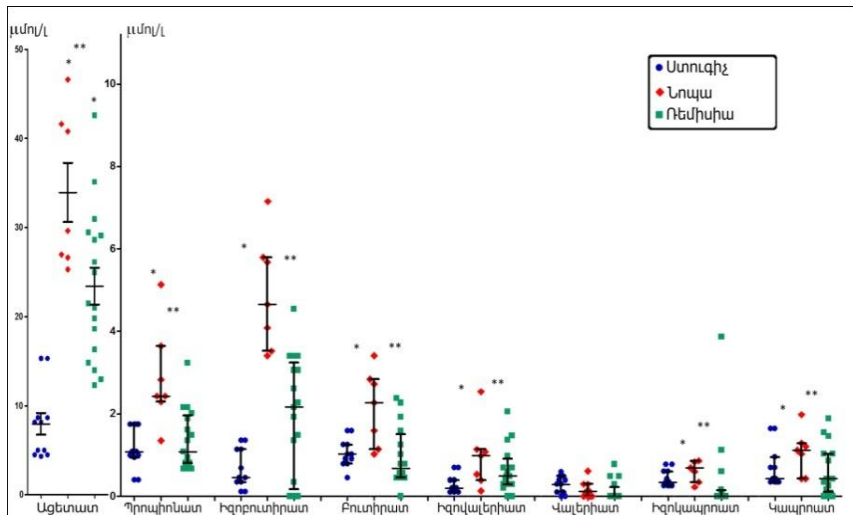
Սալ մոնեթլ ոգով հիվանդների և ստուգիչների ծայրամասային աղյան մեջ ԿՇՃԹ-ների կոնցենտրացիան և մոլային հարաբերությունը:

	Ացետառ		Պրոպիոնառ		Բուտիրառ	
	%	M±SD (μմոլ /լ )	%	M±SD (μմոլ /լ )	%	M±SD (μմոլ /լ )
<b>Սումգիչ</b>	78.19	7.96 ± 3.86	11.49	1.17±0.49	10.32	1.05±0.32
<b>S.Enteritidis</b>	35.62	20.37±17.22	50.63	28.97±25.35	13.75	7.87±4.63
<b>S.Typhimurium</b>	31.72	30.11±13.73	49.64	47.14±31.48	18.64	17.7±6.65

Նման պատկերը կարող է պայմանավորված լինել բորբոքային պայմաններում կոլոնոցիտների կողմից ԿՇՃԹ-ների, հատկապես՝ պրոպիոնատի և բուտիրատի խախտված մեթաբոլիզմով [Velázquez et al., 1997]՝ հանգեցնելով վերջիններիս բարձր կոնցենտրացիայի ծայրամասային աղյան մեջ:

Շնորհիվ սալ մոնեթլայի պաթոգենության կղզի-2-ում (SPI-2) կողավորված III տիպի սեկրեցիայի համակարգի սալ մոնեթլան կարող է անցնել աղիք-անոթային պատնեշը, մտնել համակարգային շրջանառության և ազդել օրգանների, մասնավորապես՝ լյարդի վրա, դրանով իսկ խաթարելով հիմնական ԿՇՃԹ-ների, գլխավորապես՝ ացետատի կլանումը [Spadoni et al., 2015; van der Beek et al., 2015]:

Ճնշված միկրոբիոտայի պատճառով տրամաբանական էր ենթադրել, որ սալ մոնեթլ ոգով հիվանդների համակարգային ԿՇՃԹ-ների կոնցենտրացիան պետք է ցածր լիներ, սակայն փաստացի առկա է հակառակ պատկերը, որը, հավանաբար, կարող է լինել ակտիվ բորբոքման հետևանք: Ծայրամասային աղյան մեջ ԿՇՃԹ-ների կոնցենտրացիայի վրա բորբոքային պրոցեսների ազդեցությունը պարզելու համար իրականացվել է ոչ վարակիչ, աուտոբորբոքային պարբերական հիվանդության (ՊՅ) ժամանակ ծայրամասային աղյան մեջ ԿՇՃԹ-ների պրոֆիլի համեմատական վերլուծություն: Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ ՊՅ սուր փուլում՝ խիստ ճնշված միկրոբիոտայի պայմաններում, համակարգային ԿՇՃԹ-ների մեծամասնության կոնցենտրացիան զգալիորեն բարձր է՝ համեմատած առողջների և ռեմիսիայի փուլի հետ (սկ. 8):



**Նկար 8.** ԿՇՃԹ-ների համակարգային կոնցենտրացիան ՊՅ-ի տարբեր փուլերի ժամանակ (median + IQR): \*հավաստի տարբերությունն է ՊՅ հիվանդների և առողջ ստուգիչների միջև ( $p < 0.05$ ), \*\*հավաստի տարբերությունն է ՊՅ սուր և ռեմիսիայի փուլերի միջև ( $p < 0.05$ ): Ացետատը ներկայացված է այլ սանդղակով:

Այս երկու տարաբնույթ հիվանդությունների (սալմոնելոզ և ՊՅ) ժամանակ առկա է ընդհանուր բաղադրիչ՝ ակտիվ բորբոքում: Ստացված արդյունքների և դիտարկումների հիման վրա առաջ է քաջվել վարկած, ըստ որի՝ բորբոքումը հանգեցնում է երկու հետևանքների. առաջին, խախտվում է աղիների պատեշային ֆունկցիան, որը բերում է ԿՇՃԹ-ների ներթափանցման համակարգային շրջանառություն, և երկրորդ՝ բորբոքումն ազդում է աղիքային էպիթելիալ այլ օրգանների վրա (հատկապես՝ լյարդի), որոնք ներգրավված են միկրոբային մեթաբոլիտների մեթաբոլիզմի և մաքրման գործում:

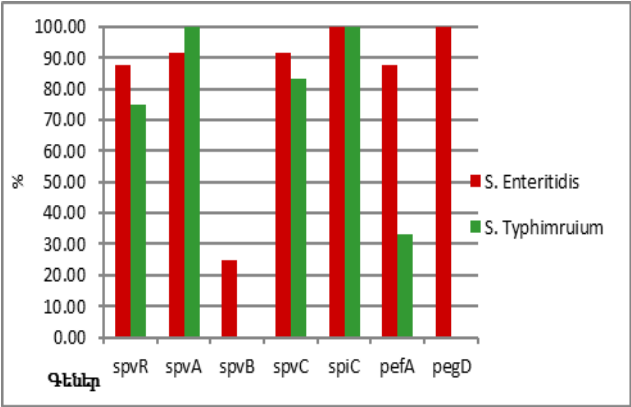
### Վիրուլ էնտուրթյան գեների սկրինինգ

Վերը նշված բորբոքային պատասխանի յուրաքանչյուր փուլում *S. Enteritidis*-ով և *S. Typhimurium*-ով հարուցված սալմոնելոզի ժամանակ կարող է բացատրվել այս շճատեսակների տարբեր գենոմային համատեքստով: Ուսումնասիրության համար ընտրվել են այն շճատեսակները, որոնցով հարուցված սալմոնելոզը բնութագրվում է յուրաքանչյուր իմունային պատասխանով:

Համեմատական վերլուծությունը (նկ. 9) բացահայտել է, որ *S. Enteritidis* իզոլատների 25%-ը (24-ից 6-ը) պարունակում է հետազոտված բոլոր գեները, մինչդեռ *S. Typhimurium* 12



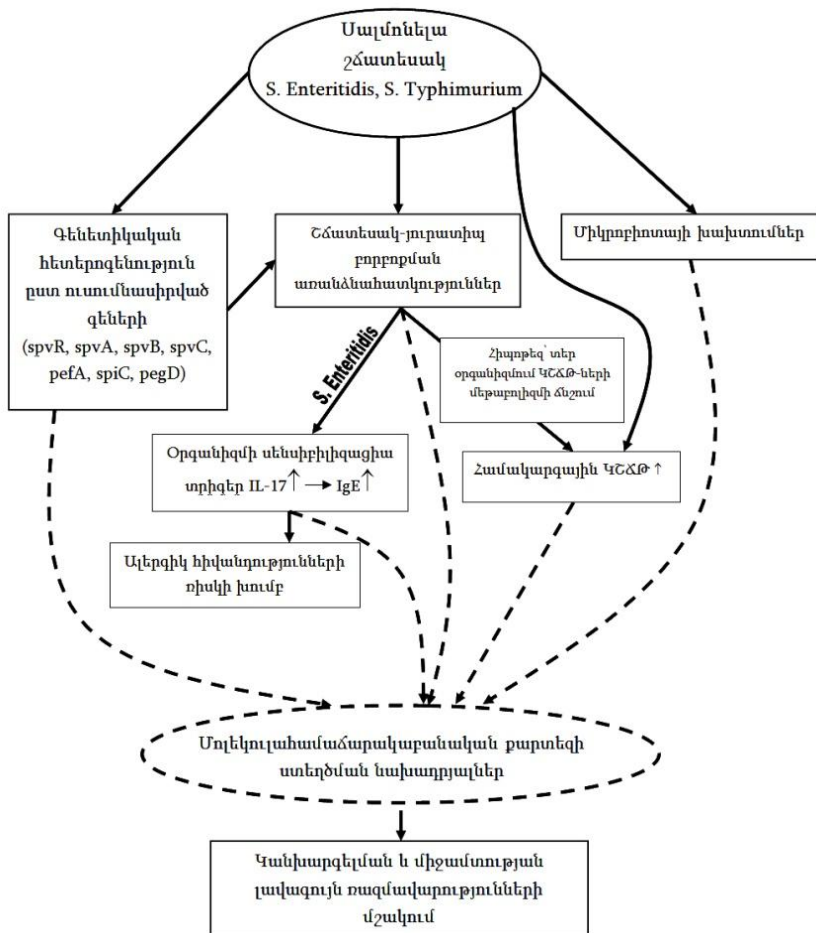
իզոլատներից և ոչ մեկում բոլոր գեների առկայությունը միասին չի հայտնաբերվել: Բացի այդ, *S. Typhimurium* իզոլատներում բացակայում են *svpB* և *pegD* գեները, իսկ *spvC* գենը առկա է 83.3%-ում: *S. Enteritidis*-ի իզոլատներում *svpB* գենը չի հայտնաբերվում 75% դեպքերում (24-ից 18-ը), որոնցից 16-ում առկա է *spvC* գենը: *S. Enteritidis*-ի երկու իզոլատներում (8.3%) ընդհանրապես բացակայում է *spv* և նկուսը: *S. Enteritidis*-ի իզոլատների 100%-ում առկա է *pegD* գենը: Ստուգվել է նաև *spvA*-ի առկայությունը, որն ասոցացվում է մանրէների հակաբիոտիկայունություն հետ:



**Նկար 9.** Գեների բաշխումը (%) հետազոտված *S. Typhimurium* (n=12) և *S. Enteritidis* (n=24) իզոլատներում:

Չնայած հետազոտված սալմոնելա շտամերի մեծամասնության մոտայս գենի առկայությանը (*S. Enteritidis* - 91.7%, *S. Typhimurium* - 100%)՝ դրանք դրսևորել են հակաբիոտիկայունություն տարբեր ֆենոտիպեր (չհրատարակված տվյալներ): SPI-2-ում տեղակայված *spiC* գենը, որը պատասխանատու է ադիեզիայի և բջջային ինվազիայի համար, հայտնաբերվել է բոլոր իզոլատներում: *pefA* գենը առավել ասպես հայտնաբերվել է *S. Enteritidis* շճատեսակներում (87.5%), մինչդեռ *S. Typhimurium* շճատեսակների 67%-ում այն բացակայել է: Այսպիսով, հետազոտված շտամերը հետերոգեն են՝ ըստ վիրուլենտության գեների: Այսպիսի միջշճատեսակային հետերոգենությունը, հավանաբար, դեր ունի հիվանդության կլինիկական դրսևորման, ինչպես նաև բորբոքային պատասխանի յուրատեսակության գործում: Մինչդեռ բացահայտված ներշճատեսակային հետերոգենության ազդեցություն տարբեր կլինիկական արտահայտումների վրա տվյալ հետազոտության շրջանակներում չի հայտնաբերվել:

Նկար 10-ում ամփոփված է աշխատանքի արդյունքները:



Նկար 10. Աշխատանքի ամփոփիչ սխեմա:

### ԵՆՐԱԿԱՏՈՒ ՌՅՈՒՆՆԵՐ

- Ցույց է տրվել, որ սալմոնելոզի ժամանակ տեր-ախտածին յուրատեսակ փոխարարբոլոններում առանցքային դերը պատկանում է ախտածնի շճատեսակին:
- Սալմոնելոզի ժամանակ առկա դիսբիոտիկ շեղումները շճատեսակ-կախյալ են, որոնք առավել արտահայտված են փոքր տարիքում:

3. Տարաբնույթ բորբոքային հիվանդությունները (վարակային և առտոբորբոքային) ուղեկցվում են օրգանիզմում միկրոբիոտայի մեթաբոլիտների (ԿԾՃԹ-ների) մեթաբոլիզմի ճնշմամբ, ինչը պայմանավորված է ակտիվ բորբոքման գործոնով՝ հանգեցնելով համակարգային ԿԾՃԹ-ների մակարդակի զգալի բարձրացման:
4. *S. Enteritidis*-ով հարուցված սալմոնելոզի բորբոքային պատասխանի ժամանակ IL-17-ը խթանում է IgE-ի արտադրությունը՝ հանգեցնելով օրգանիզմի սենսիբիլիզացման: Ընդ որում, տվյալ գործընթացում բացառվել է դիսբիոզի հնարավոր դերը:
5. *S. Enteritidis* և *S. Typhimurium* շճատեսակները հետերոգեն են՝ ըստ իրենց պլազմիդի վիրուլենտության և ֆիմբրիալ գեների, ինչով կարող են պայմանավորված լինել կլինիկական դրսևորումների տարբերությունները:

### **ՀՐԱՏԱՐԱԿՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱԿ**

#### **Յոդվածներ**

1. Mkrтчyan M., Zakharyan M., Arakelova K., Sedrakyan A., Gevorgyan Z., Ktsoyan Zh. Molecular determinants of virulence genes of *Salmonella enteritidis* prevailing in Armenia. // Proceedings of the YSU, Chemistry and biology. 2016; 1:55-60.
2. Ktsoyan Zh., Mkrтчyan M., Zakharyan M., Mnatsakanyan A., Arakelova K., Gevorgyan Z., Ktsoyan L., Sedrakyan A., Hovhannisyan A., Ghazaryan K., Boyajyan A., Aminov R. Differential induction of total IgE by two *Salmonella enterica* serotypes. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2015; 5:43(11 pages). doi: 10.3389/fcimb.2015.00043
3. Մկրտչյան Մ. Սալմոնելոզի ժամանակ միկրոֆլորայի խախտումները շճատեսակ սպեցիֆիկ են: // Հայաստանի կենսաբանական հանդես. 2014; 66(1):62-66.

#### **Թեզիսներ**

4. Mkrтчyan M., Arakelova K., Sedrakyan A., Zakaryan M., Gevorgyan Z., Mnatsakanyan A., Asoyan A. Specificity of metabolic activity of gut microbiota during salmonellosis caused by two different serotypes. // Proceedings of the International Scientific Workshop "Trends in microbiology and microbial biotechnology". Yerevan, RA, 5-8 Oct 2014, p. 25.
5. Mkrтчyan M., Ktsoyan Zh., Arakelova K., Sedrakyan A., Zakaryan M., Gevorgyan Z., Mnatsakanyan A., Asoyan A. The difference of allergic reactions in various serotypes of *Salmonella*. // Proceedings of the International young scientists conference "Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology-4". 21 - 22 Oct, 2013, p. 105-106.

### **МХИТАР МКРТЧЯН**

# ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗЕ, ВЫЗВАННЫМ РАЗЛИЧНЫМИ СЕРОТИПАМИ

## Резюме

**Ключевые слова:** сальмонеллез, сенсibilизация, ЛЖК, IgE, дисбиоз, серотип-специфичность, генетическая гетерогенность

Проблема сальмонеллеза сохраняет свою актуальность в связи с устойчиво высоким уровнем заболеваемости. Сложность решения проблемы связана с большим разнообразием клинического проявления и распространением бессимптомных форм этой инфекции, а также многообразием путей и факторов передачи возбудителей болезни. Несмотря на генетическую близость, серотипы сальмонелл значительно различаются по специфичности к хозяину, вирулентности и проявлению болезни. Особенности патогенности сероваров сальмонелл и индуцируемого ими иммунного ответа в зависимости от хозяина, серотипа и специфичности взаимодействия серотип–хозяин недостаточно хорошо изучены. Большинство исследований были проведены на моделях мышей и *in vitro*. Настоящая работа осуществлена, используя клинический материал больных сальмонеллезом (острая стадия), вызванный наиболее распространенными в Армении серотипами *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*. Материал предоставлен инфекционной клинической больницей “Норк” в течение 2013-2015 гг.

В работе изучены особенности специфического воспалительного ответа, индуцированного сальмонеллой, и его молекулярные основы.

При исследовании выявлен глубокий серотип-зависимый дисбиоз, наиболее выраженный в младшем возрасте при инфицировании возбудителем *S. Typhimurium*. В работе была предпринята попытка выявить влияние серотип-специфического воспаления на возможные иммунные нарушения, в частности, аллергическую сенсibilизацию организма. С этой целью была определена системная концентрация маркера аллергии IgE, указывающая на сенсibilизацию организма даже у субъектов без проявления аллергии. Выяснилось, что воспаление вызванное *S. Typhimurium* не влияет на уровень IgE, в то время, как при заражении *S. Enteritidis* концентрация IgE значительно превышает норму. Статистический анализ показал, что между степенью дисбиоза и уровнем IgE имеет место обратная зависимость, то есть, дисбиоз исключается как фактор способствующий сенсibilизации организма при инфицировании *S. Enteritidis*. Ранее было установлено, что при воспалении индуцированном этим серотипом, наблюдается выраженное повышение уровня IL-17, который в настоящее время рассматривается как фактор способствующий продукции IgE В клетками. Была обнаружена положительная корреляция между

уровнями IL-17 и IgE, что указывает на важную роль IL-17 в продукции IgE при инфицировании *S. Enteritidis*.

В крови больных сальмонеллезом, при подавленной микробиоте, обнаружен повышенный уровень микробных метаболитов – летучих жирных кислот (ЛЖК). Повышение системной концентрации ЛЖК наблюдалось также при заболевании аутовоспалительной природы, при подавленной микробиоте (периодическая болезнь - ПБ). В обоих случаях, как при инфекции, так и при ПБ, имеет место общий компонент – активное воспаление. Повышенный уровень основных ЛЖК в крови может быть результатом воспаления кишечника, а следовательно, изменения метаболизма в тканях, а также органов, в частности печени. На основе полученных результатов выдвинута гипотеза: воспаление приводит к двум последствиям – нарушается целостность кишечного барьера, способствуя проницаемости содержимого просвета кишечника в системную циркуляцию, и второе – воспаление влияет на кишечный эпителий и органы, которые вовлечены в метаболизм и очистку микробных метаболитов. Различные клинические выражения сальмонеллезов вызванных разными серотипами, а также специфические микроб-хозяин взаимодействия, вероятно вызваны генетической гетерогенностью. При скрининге плазмидных генов вирулентности *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*, выявлена гетерогенность между двумя серотипами. Выявлена также гетерогенность внутри серотипа, которая не приводит к различным клиническим проявлениям.

Результаты исследований дают информацию о взаимосвязи хозяин-микробиота-патоген, которые создают предпосылки для последующего, всецелого описания нетифоидных сальмонелл в Армении, что поможет разработке альтернативной стратегии, профилактики и лечения сальмонеллезов.

**INTERRELATION OF METABOLIC ACTIVITY AND INFLAMMATORY RESPONSE  
IN SALMONELLOSIS CAUSED BY DIFFERENT SEROTYPES**

**Summary**

**Keywords:** salmonellosis, sensitization, SCFA, IgE, dysbiosis, serotype specificity, genetic heterogeneity

Salmonella infections remain one of the leading causes of gastrointestinal disorders in the world resulting in significant morbidity and mortality rates. The complexity of problem solution is linked to a wide variety of clinical presentation and spread of asymptomatic forms of the infection, as well as diversity of ways and agents of disease transmission. Despite of genetic affinity, the *Salmonella* serotypes significantly differ by its host specificity, virulence and disease manifestation. Properties of pathogenicity of *Salmonella* serovars and induced host-dependent immune response, serotype and specific host-microbe interaction are not well studied. The majority of investigations was carried out on murine model or *in vitro*. The present work is implemented with the use of clinical material of subjects with salmonellosis (acute stage), caused by most prevalent serotypes in Armenia. The samples are provided by the "Nork" Republican Infectious Clinical Hospital during the period of 2013-2015.

In this work the characteristics of specific *Salmonella* induced inflammatory response, and its molecular bases were studied.

In the acute stage of salmonellosis microbiota alterations, immune status and clinical presentation are considered in combination. Pathogen, dysbiosis and immune status, each separately can be trigger of the disease onset.

Deep, serotype specific dysbiosis has been revealed, which is more pronounced in younger age, especially in patients infected with *S. Typhimurium*. In this work an attempt was made to identify the influence of serotype specific inflammation on possible immune disturbances, namely, allergic sensitization of the organism. For this purpose, the systemic concentration of total IgE, the biomarker of allergy, was measured, which may indicate the likelihood of sensitization even in patients with negative specific allergy tests. Our investigations revealed that inflammation caused by *S. Typhimurium* does not affect on system concentration of total IgE, whereas in *S. Enteritidis* infections the concentration of IgE exceeds the normal value. Statistical analysis indicated a negative association between the degree of dysbiosis and IgE concentration, i.e. the dysbiosis may be excluded as a factor contributing the sensitization of organism during *S. Enteritidis* infection. Previously it was established, that during inflammation caused by this serotype, a sharp increase of IL-17 takes place, which nowadays is regarded as a factor promoting the production of IgE in

human B cells. In the current study a significant correlation was found between the concentrations of IL-17 and IgE suggesting a possible role of this cytokine in triggering the production of IgE in response to *S. Enteritidis* infection.

In the blood of patients with salmonellosis, despite of dysbiotic conditions, elevated concentration of gut metabolites, namely short chain fatty acids (SCFA) was detected. The increase in the concentration of SCFAs was observed also in disease with autoinflammatory nature (familial Mediterranean fever, FMF), with suppressed microbiota. Both these diseases, however, share a common component, i.e. active inflammation. The elevation of concentration of main SCFAs can be the result of gut inflammation, which affects on metabolism in tissues, as well as in the organs, especially liver. Based on the results obtained we hypothesized, that the inflammation leads to two major consequences: first, to the compromised gut barrier function, which then results in excessive translation of the luminal content, including SCFAs, into systemic circulation; and second, inflammation affects the intestinal epithelium and the organs beyond the gastrointestinal tract such as the liver that are involved in metabolism and clearance of microbial metabolites and compounds. Different clinical presentation during salmonellosis caused by two different serotypes, as well as specific host-microbe interaction can be caused by genetic diversity of these serotypes. During the screening of plasmid encoded virulence genes of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, heterogeneity between these two serotypes was detected. Moreover, we revealed heterogeneity within the serotype, which does not lead to a variety of clinical manifestations.

Our results provide information on the relationship of host-pathogen-microflora, which creates a background for further overall description of non-typhoid *Salmonella* in Armenia, which will help to the development of strategies for the prevention and treatment of salmonellosis.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, fluid loops and strokes, positioned in the lower right quadrant of the page.