

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵՆՆՈՒՈՒԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

ՆԱՏԱԼՅԱ ԱՐԱՄԻ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ՊՐՈՔԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՄ
ՀԻՎԱՆԴԵՐԻ ԱՂԻՔԱՅԻՆ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻ ՎՐԱ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա» մասնագիտությամբ
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

НИЦ “АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ” НАН РА ГНКО

АРУТЮНЯН НАТАЛЬЯ АРАМОВНА

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА КИШЕЧНУЮ МИКРОФЛОРУ БОЛЬНЫХ
ПЕРИОДИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 – “Микробиология”

ЕРЕВАН – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝

Կ.գ.դ. Ա.Ջ.Փեփոյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան

ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ, Կ.գ.դ.,
պրոֆեսոր Ա.Հ. Թռչունյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվ. կենսաքիմիայի
ինստիտուտ

Պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. նոյեմբերի 25-ին, ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ. հոկտեմբերի 25-ին:

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, Կ. գ. թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Научный руководитель:

д.б.н. А.З. Пепоян

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян

член-корр. НАН РА, д.б.н.,
профессор А.А. Трчунян

Ведущая организация:

Институт биохимии им. Г. Бунятына НАН РА

Защита диссертации состоится 25 ноября 2014 г. в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна, 14, тел/факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Автореферат разослан 25 октября 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета,

к.б.н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Кишечная микробиота является важным фактором при определенных патологических расстройствах, включая воспалительные заболевания, к числу которых относится семейная средиземноморская лихорадка или периодическая болезнь (ПБ).

Периодическая болезнь - это наследственное аутовоспалительное заболевание, характеризующееся приступообразными воспалениями брюшины и плевры, сопровождающиеся повышением температуры, поражением суставов, болями в животе и в грудной клетке. ПБ наследуется по аутосомно-рецессивному типу и связана с мутациями в гене MEFV (MEDITERRANEAN FEVER), который локализован на коротком плече хромосомы 16 (16p13.3) [French FMF Consortium, 1997; International FMF Consortium, 1997; Chae J. et al, 2006; Tomiyama N. et al, 2008; Akar N. et al, 2011]. Она является древним и распространенным аутовоспалительным синдромом, которым в мире страдает более 100000 человек [Auvazyan A. et al., 2005; Yepiskoposyan L. et al, 2007; Yamazaki K. et al., 2009]. ПБ поражает преимущественно национальности, проживающие в зоне средиземноморского бассейна: евреи-сефарды, армяне, турки, арабы, северные африканцы и др. [Brik R. et al, 1999]. Однако, в результате миграции населения и межнациональных браков болезнь распространилась по всему миру [Ben-Chetrit E., 2009].

Считаясь исторически эндемическим заболеванием, ПБ является одной из наиболее важных социальных проблем Армении. В гетерозиготном состоянии носителем мутации гена MEFV является каждый седьмой представитель армянской нации [Papadopoulos V. et. al., 2008; Touitou I. et. al, 2012]. Изучение ПБ в Республике Армения особенно актуально из-за роста популяционной частоты этого заболевания. Для любого жителя Армении относительный риск иметь больного ребёнка выше его собственного в 2 раза, а больного внука - в 4 раза.

Согласно литературным данным, традиционно, на протяжении длительного времени наиболее эффективное лечение ПБ осуществляется с помощью колхицина, который также является эффективным средством при профилактике и лечении амилоидоза [Kalinich T., 2007; Picken M., 2010; Pinney J. et al, 2012; Both T. et al, 2012; Kolaczowska E. et al, 2013]. Колхицин является сильным антимиототиком и может привести к развитию ряда отрицательных эффектов, одним из которых считаются частые проявления диареи и запора, приводящие к структурному и функциональному дисбалансу кишечной микробиоты [Fradkin A. et al, 1995; Chassany O. et al, 2000].

С другой стороны, по результатам многочисленных исследований микробиома человека установлено, что бактерии населяют все открытые эпителиальные поверхности [Tlaskalova-Hogenova H. et al, 2011], но основное их сообщество локализуется в кишечнике и, общее число бактерий в микробиоме в 10-100 раз превышает число клеток самого человека, а количество генов микробиоты кишечника в 150 раз превосходит число генов человека [Morowitz M. et al, 2011]. В организме здорового человека представлены около 1000 видов микробов, 70% из которых не поддается микробиологическому культивированию, то есть не могут быть выделены в чистой культуре и изучены.

Микробиота является достаточно устойчивой генетически детерминированной системой по отношению к различным экзо- и эндогенным факторам и считается индикатором физиологического состояния человека [Tremaroli V., 2012; Gerber G.,

2014; Бухарин О. и др., 2005]. В 2011-ом году Арумугам и др. в журнале "Nature" предложили новую классификацию бактерий, согласно которой кишечная микробиота подразделяется на 3 основных энтеротипа, и кишечнику каждого человека соответствует свой определенный энтеротип [Arumugam M. et al, 2011]. Парадокс заключается в том, что с углублением наших знаний о микробиоме осложняется планирование исследований в этой области.

Нормальная микробиота, обладая огромным метаболическим потенциалом, участвует в сохранении гомеостаза макроорганизма и относительно устойчива к влиянию различных факторов внешней среды, но ее компенсаторные возможности небеспредельны.

Длительное воздействие различных неблагоприятных этиологических факторов приводит к нарушению нормобиоценоза [Purchiaroni F. et al, 2013; Gerber G., 2014]. Это нарушение, кажущееся невинным на первый взгляд, может возбудить тяжелые последствия, поэтому врачи разных специальностей рассматривают сегодня дисбиотические изменения как патогенетическое звено формирования многих патологических процессов в организме [Tjellstram B. et al., 2005; Sartor R., 2008; Schwiertz A. et al, 2010; Воробьев А. и др., 2004; Ильина Н., 2006; Белобородова Н., 2012].

В последнее десятилетие заметно возрос интерес к проблеме поддержания и восстановления микрoэкологического статуса человека. Для этих целей все шире используют бактериотерапевтические препараты - пробиотики - живые комменсальные микроорганизмы, положительное воздействие которых было описано и при хронических воспалительных заболеваниях [Manvelyan A. et al, 2006; Mirzoyan N. et al, 2006; Pepoyan A. et al, 2008; Sahu U. et al, 2012; Matuskova Z. et al., 2014; Степанян К. и др., 2007].

Учитывая роль и значение кишечного микробиоценоза в поддержании и регуляции метаболического гомеостаза организма, а также особенности применяемых во врачебной практике пробиотиков, увеличивается возможность разработки новых стратегий для эффективного комплексного лечения ряда воспалительных заболеваний, в том числе и ПБ.

Пробиотические бактерии "Наринэ" (*Lactobacillus acidophilus* INMIA Eг 317/402) и "Колибактерон" (*Escherichia coli* М-17) (Витамакс-Е, Армения) являются часто назначаемыми препаратами больным ПБ в Армении. Считается, что *Lactobacillus acidophilus* Eг 317/402 нормализует микробиоту кишечника, способствует всасыванию витаминов и снижению уровня холестерина в сыворотке крови, а также увеличивает выработку интерферона [Bondarenko V. et al, 2009; Geuking M., 2011; Шендеров Б. и др., 2009].

Учитывая вышеприведенное, исследование воздействия пробиотиков на состав кишечных микроорганизмов на фоне колхицинотерапии больных ПБ определяет актуальность темы исследования.

Цель и задачи исследования. Главной целью представленной работы явилось изучение влияния пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" (Витамакс-Е, Армения) на состав кишечных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с использованием клинического бактериологического и PhylochipTM анализа.

Выдвигаемые задачи:

- i. Сравнить результаты исследований, полученных с применением метода Phylochip™ и методов культивирования, применяемых для оценки кишечной микробиоты.
- ii. Оценить влияние пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" (Витамакс-Е, Армения) на состав кишечных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* на основе влияния этих пробиотиков на характеристики крови у больных ПБ.
- iii. Изучить качественные и количественные изменения кишечных *Escherichia* и выявить особенности антибиотикорезистентности комменсальных *E. coli* кишечной микробиоты больных ПБ.

Научная новизна работы. В процессе исследования было выявлено, что у преобладающей части больных общие мутации гена MEFV были представлены в виде M694V/V726A. У большинства из них первые приступы заболевания были зафиксированы в возрасте до 20 лет. Симптомы плеврита, перитонита и их смешанные симптомы наблюдались у больных как с мутациями M694V/V726A, так и с другими типами мутаций MEFV.

В результате исследований впервые были выявлены отклонения в параметрах СОЭ и С-РБ у больных ПБ в стадии ремиссии, главным образом, связанных с полом больных. Была зарегистрирована нормализация показателей С-РБ на фоне применения пробиотиков. В противоположность литературным данным, было показано, что больные ПБ Армении, в отличие от больных ПБ других наций, не страдают лактазной недостаточностью в связи с длительным применением колхицина, согласно которым применение колхицина вызывает непереносимость лактозы.

Было установлено, что методы Phylochip™ и культурального анализа можно успешно применять для количественной оценки *Escherichia* и *Lactobacillus spp.*, в то время как при количественной оценке бифидобактерий отсутствовало соответствие между результатами обоих используемых методов.

В ходе исследований было выявлено, что 35% больных ПБ Армении являются носителями *C. albicans*. В результате оценки операционных таксономических единиц (ОТЕ) кишечных *Enterobacteriaceae* было показано, что у больных ПБ наблюдается увеличение количества ОТЕ бактерий рода *Escherichia*. Были выявлены различия в составе кишечной микробиоты у больных ПБ, в зависимости от пола. В частности было обнаружено, что у больных ПБ женщин количество ОТЕ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* значительно больше, чем у мужчин, которое подвергается изменению в результате пробиотикотерапии.

Также была выявлена высокая антибиотикоустойчивость комменсальных кишечных бактерий *E. coli* у больных ПБ по отношению к широко применяемым антибиотикам в Армении. Установлено, что применение пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" у больных ПБ приводит к убыванию количества антибиотикоустойчивых комменсальных изолятов *E. coli*.

Теоретическое значение и практическая ценность. Представленная работа освещает современное понимание влияния пробиотиков на кишечную микробиоту больных ПБ.

- Диссертационная работа, имея здравоохранительное, микробиологическое, молекулярно-генетическое, биохимическое и биотехнологическое значение определено поможет усовершенствовать методы лабораторной и клинической диагностики.

- Диссертационная работа выдвигает разработку новых рациональных стратегий для коррекции кишечной микробиоты больных ПБ.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Выявление соответствий и различий результатов при сравнительном анализе культурального и Phylotip™ методов изучения кишечной микробиоты.
- Определение изменений характеристик крови у больных ПБ после пробиотикотерапии.
- Отсутствие подавления лактозотолерантности у больных ПБ Армении.
- Определение носительства *C. albicans* у больных ПБ Армении.
- Распространенность ОТЕ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в кишечной микробиоте у больных ПБ.
- Изменение количества ОТЕ кишечных *Escherichia* и распространенности антибиотикорезистентных изолятов *E. coli* у больных ПБ в результате пробиотикотерапии.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена в рамках проектов ИСТС: А-732, А-1227 и А-1980.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены на международных конференциях: "Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики" (Ереван-Аштарак, апрель 2-4, 2007), "International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics" (11th - 13th June 2013, Kosice, Slovakia), 2nd International Scientific Conference "Contribution of Young Generation in the Development of Biotechnology" (October 1-4, 2013, Yerevan, Armenia), "1st Taiwan-Armenian Medical Conference" (May 24, 2013, Yerevan, Armenia).

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 115 страницах и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов и обсуждений, заключения, выводов, списка использованной литературы, приложения. Диссертация представлена 5 схемами, 5 таблицами и 21 рисунком. Список литературы состоит из 241 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава посвящена обзору литературы, в котором приводятся общие характеристики нормальной кишечной микробиоты человека, основные функции, возможные дисбиотические изменения и способы ее коррекции. Рассматривается значение и применение пробиотиков. Описываются генетические основы, мутации, распространенность, проявления периодической болезни, ее лечение колхицином и проявления побочных эффектов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях принимали участие 52 больных ПБ (16 женщин и 36 мужчин, средний возраст больных составлял $30,5 \pm 12,6$ лет) из клинической больницы № 8 города Ереван РА и 30 здоровых добровольцев (23 женщины и 7 мужчин, средний возраст $35,2 \pm 11,4$ лет). Участники исследования не принимали антибиотиков, гормонов и химиотерапевтических препаратов, по крайней мере, в течение 2-3 месяцев до начала исследования. Больные ПБ продолжали принимать колхицин во время исследования в тех же дозах, что и до исследования.

Имелись три группы больных и две - здоровых. Первой группе был назначен пробиотик "Наринэ" (Vitamax-Е, Армения), второй – "Колибактерон" (Vitamax-Е,

Армения), третьей - плацебо. Все больные первой группы имели дисбактериоз кишечника по лактобациллам, больные второй группы - дисбактериоз кишечника по комменсальным *E. coli*. Участники исследования принимали препараты по одной капсуле дважды в день в течение 30 дней.

Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) осуществлялось на автоматических анализаторах (СОЭ-метрах), измеряющих СОЭ с помощью системы инфракрасных лучей.

Ревмофактор, С-реактивный белок (С-РБ) и глюкоза определялись с помощью биохимического анализатора Stat Fax 3300, основанного на измерении оптической плотности.

Культуральный анализ осуществлялся с использованием селективных и идентификационных тестовых сред на основе физиолого-биохимических признаков микроорганизмов [Murray P. et al, 1995].

Для выделения фекальной ДНК использовали ZR Fecal DNA MiniPrep (ZYMO research corp.) и Ultra Clean Fecal DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.). С помощью Phylochip™ бактериальные сообщества определялись на основе выделения операционных таксономических единиц (ОТЕ) [Hofle M. et al, 2008].

Об изменениях количественного состава бактерий в случае культурального анализа судили по изменению соотношения бактериальных титров в образцах, а при Phylochip™ анализе учитывались соотношения интенсивностей гибридизции.

Фекальный материал собирался трижды: в первый раз - до назначения препаратов и плацебо, во второй раз - сразу после прекращения приема препаратов и плацебо, и в третий раз - через 1,5 месяца после прекращения приема препаратов и плацебо.

Антибиотикорезистентность бактерий определялась диск-диффузным методом Кирби-Бауера, методом микроразведений и с помощью VITEK® 2 Compact (bioMérieux, France) системы. Для определения антибиотикочувствительности бактерий использовались следующие антибиотики: тетрациклин 15 мкг/мл (Oxoid), доксициклин 15 мкг/мл (Biomerieux), амоксициллин 25 мкг/мл (Biomerieux), левомецетин 30 мкг/мл (Oxoid), ципринол 20 мкг/мл (HiMedia) и цефазолин 15 мкг/мл (Biomerieux).

Штаммы *E. coli* ATCC 25922 и ATCC 35218, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 были использованы в качестве контрольных.

Candida albicans была идентифицирована из фекальных образцов с помощью Brilliance™ Candida agar (Thermo scientific) и VITEK® 2 compact (bioMerieux) системы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Excel (Student t-test), а также вариабельного скрининга программы Multibase 2013, вероятность $P < 0,05$ считалась статистически значимой.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. СРАВНЕНИЕ МЕТОДА PHYLOCHIP™ И МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

Традиционно, во время клинических бактериологических исследований для выделения специфических бактериальных популяций применялись методы культуральных анализов, основываясь на их метаболических потребностях и биохимических свойствах. Выявление бактерий этим методом общедоступно,

сравнительно не дорого, возможно физиологическое и биохимическое исследование [Furrie E., 2006]. Тем не менее, при использовании культуральных методов исследования существует ограничение возможности дифференциации различных филогенетических групп бактерий и высокая зависимость от продолжительности времени с момента сбора материала [Zhao X. et. al, 2004; Mortimer D. et al, 2005].

Кроме этого, исследование систем микробных сообществ кишечника особенно затрудняется, поскольку большая часть кишечных бактерий строго анаэробны и не культивируемы в стандартных лабораторных условиях [Eckburg P. et. al, 2005].

С другой стороны, активно прогрессируют современные молекулярно-генетические методы анализа, на ряду с которыми ставится под сомнение применение известных классических методов. Ряд авторов указывают на расхождение данных, полученных с помощью культуральных методов, и результатами исследований с применением молекулярных методов диагностики микробиоты [Espy M. et. al, 2006; Fratamico P. et. al, 2009]. Это объясняется, во-первых, несовершенством принятых в классической микробиологии способов видовой идентификации бактерий, а, во-вторых, наличием в клинических образцах некультивируемых микроорганизмов [Rhoads D. et. al, 2012; Sizova M. et. al, 2012].

Технология биомикрочипов позволяет быстро идентифицировать микроорганизмы в микробном сообществе, определить их фенотипические и генотипические свойства [Nocker A. et. al, 2007; Schneider T. et al, 2010]. Это принципиально новый уровень лабораторных исследований с возможностью одновременного изучения и анализа большого набора биомолекул в исследуемом биоматериале, высокой чувствительностью, простотой процедуры выполнения, специфичностью и воспроизводимостью. В основе анализа с помощью ДНК-чипа лежит метод гибридизации. Результат гибридизации оценивается по уровню флюоресцентного сигнала, определяемого с помощью специальных сканеров.

Из 52 больных ПБ приступы в грудной клетке (симптомы плеврита) наблюдались у 5,8%, приступы в брюшной полости (симптомы перитонита) – у 11,5% и смешанные приступы - у 82,7%. У этих больных были выявлены различные мутации: один или два в гетерозиготном или компаунд гетерозиготном состояниях, но все являлись носителями M694V мутаций. Амилоидоз был зарегистрирован у 11,5% больных ПБ, причем среди представителей как женского, так и мужского полов (50% на 50%). Следует отметить, что согласно литературным данным, частота встречаемости периодической болезни среди мужчин почти дважды выше, чем среди женщин [Samuels J. et al, 1998; Sarkisian T. et al, 2008; Ben-Chetrit E. et al, 2009; Doğan, H. et al, 2012].

Для сравнительной оценки результатов метода Phylochip™ и культивирования с каждого участника брались каловые образцы в различные этапы времени (на рис. "3.1": а и б), и оценивались бактериальные сообщества методами культурального и Phylochip™ анализов.

Сравнительный анализ результатов по культуральному и Phylochip™ методам для родов *Escherichia* и *Lactobacillus* по отдельным образцам отображен на рис. 3.1.1 и 3.1.2. На этих рисунках сравниваются соотношения данных этапов а и б, полученных в результате исследований с помощью двух методов. В случае культурального анализа учитывались соотношения бактериальных титров, а в случае Phylochip™ анализа - соотношения интенсивностей гибридизации.

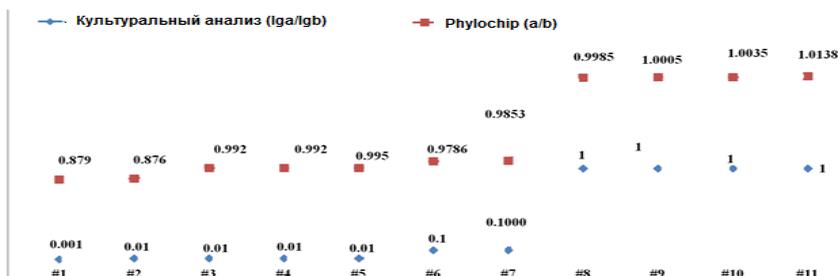


Рисунок 3.1.1. Сравнение количеств *Escherichia* в каловых образцах больных ПБ. Примечание: анализы проводились культуральным и Phylochip™ методами.

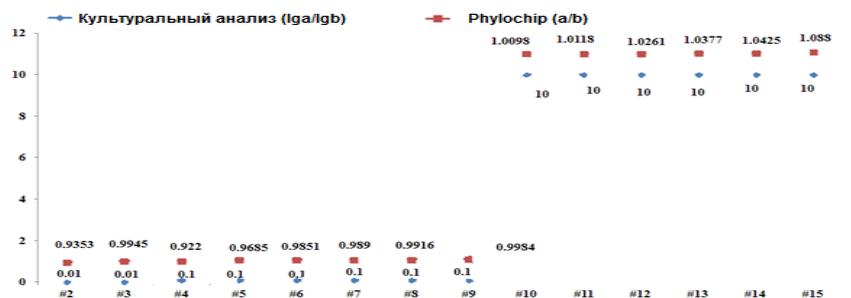


Рисунок 3.1.2. Сравнение количеств *Lactobacillus* spp. в каловых образцах больных ПБ. Примечание: анализы проводились культуральным и Phylochip™ методами.

Несмотря на различия между результатами культурального и Phylochip™ анализов для некоторых образцов (рис. 3.1.1-3.1.2), данные экспериментов показывают, что имеются соответствия между результатами обоих методов анализа для родов *Escherichia* и *Lactobacillus*.

Известно, что еда и диета могут повлиять на состав кишечной микробиоты [Albenberg L. et al, 2012]. Различия между результатами культурального и Phylochip™ анализов, описанных для некоторых фекальных образцов данных исследований, могут также быть объяснены воздействием фактора еды на состав кишечной микробиоты (изменением соотношения культивируемых бактерий к общему числу бактерий). С другой стороны, во время культурального анализа учитывалось только количество *E. coli*, что также могло повлиять на различия между результатами культурального и Phylochip™ анализов.

В проведенных исследованиях на бифидобактериях соответствие при сопоставлении данных культурального и Phylochip™ анализов для больных ПБ отсутствовало (результаты не приведены).

Таким образом, анализы результатов по культуральному и Phylochip™ исследованиям показали соответствие между результатами обоих используемых

методов для бактерий *Escherichia* и *Lactobacillus* spp.. Эти данные имеют прикладное значение для оценки кишечного дисбактериоза при клиническом бактериологическом анализе и важны в назначениях пробиотиков на основе клинического анализа.

3.2. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИКОВ "НАРИНЭ" И "КОЛИБАКТЕРОН" НА СОСТАВ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *Enterobacteriaceae* НА ОСНОВЕ ВЛИЯНИЯ ЭТИХ ПРОБИОТИКОВ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПБ

Исследование влияния пробиотиков на характеристики крови у больных ПБ. Положительные и отрицательные изменения в организме отражаются на его физиологическом статусе путем изменения определенных параметров крови, поэтому было целесообразно оценить влияние пробиотиков на кишечную микробиоту с учетом изучения влияния этих же пробиотиков на характеристики крови у больных.

Были проведены исследования некоторых воспалительных факторов крови (СОЭ, ревмофактора, С-реактивного белка) у больных ПБ в период ремиссии до и после применения пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерона". Также проверялся уровень глюкозы до и после применения этих же пробиотиков, а для выяснения влияния колхицинотерапии на лактозотолерантность исследовалась динамика изменения глюкозы в крови больных ПБ до и после применения молока.

По результатам исследований из общего числа больных СОЭ оказалось выше нормы у 37% больных, причем женщин с высоким СОЭ в 2 раза больше (56%), чем мужчин (27%) (рис. 3.2.1). Измерение СОЭ необходимо рассматривать как скрининговый тест, который не имеет специфичности для какого-то определённого заболевания.

Показатели С-реактивного белка - самого быстрого индикатора повреждения тканей, оказались выше нормы лишь у 27% исследованных больных (рис. 3.2.1). По сравнению с СОЭ здесь наблюдается обратная картина проявления у мужчин и у женщин (рис. 3.2.1). Число женщин со смещенными показателями С-РБ было в 2,5 раза меньше числа мужчин: 13% и 33% соответственно.

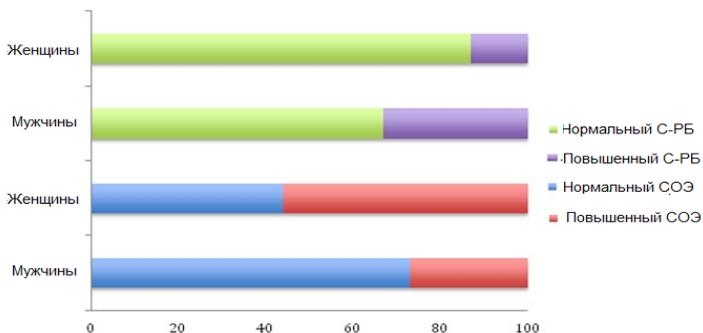


Рисунок 3.2.1. Лабораторные показатели активности воспаления у больных ПБ в период ремиссии. Примечание: СОЭ, С-РБ определялись с помощью биохимического анализатора Stat Fax 3300, основанного на измерении оптической плотности.

C-реактивный белок чаще всего сравнивают с СОЭ. Оба показателя резко возрастают в начале воспалительного процесса, но С-РБ появляется и исчезает раньше, чем изменяется СОЭ. Преимуществом определения С-РБ в отличие от СОЭ является то, что его показатели не зависят от уровня лейкоцитов в крови [Black S., 2004].

Интересно отметить, что, хотя большинство больных жаловались на наличие боли в суставах, но почти у всех, за исключением одного пациента-мужчины, показатель ревматоидного фактора был отрицательным.

В основном ревматоидный фактор определяется у больных ревматоидным артритом, а также у больных с другой воспалительной патологией [Scott D., 2010; Насонов Е., 2002].

После применения пробиотиков статистически достоверные изменения в показателях СОЭ отсутствуют. Интересным является тот факт, что показатель С-реактивного белка у всех больных в стадии ремиссии после применения пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" понизился до нормы.

По литературным данным [Айвазян А., 1982; Шахгелдян Р., 1989] у больных ПБ наблюдаются нормальные (иногда гипогликемические) показатели уровня глюкозы в крови в период ремиссии, а в период приступов, когда организм впадает в состояние стресса, возможно повышение уровня глюкозы в крови.

Было выявлено, что применение обоих пробиотиков отразилось и на показателях глюкозы. У всех больных наблюдалась незначительная тенденция к повышению ее уровня, но в пределах нормы (табл. 3.2.1). Это, вероятно, обусловлено тем, что применяемые пробиотики с одной стороны обладали лактазной активностью, а с другой стороны - пробиотические метаболиты способствовали всасыванию глюкозы с помощью регуляции SGLT1 (sodium-glucose linked transporter) транспортеров [Elli M. et al, 2000; Gilman J. et al, 2006; Arun K., 2010; Grefner N. et al, 2010].

Таблица 3.2.1. Изменение количества глюкозы в крови больных ПБ.

Этапы исследований	Количество глюкозы; ммоль/л
До пробиотиков	4,74 ± 0,37
После пробиотиков	4,94 ± 0,26 (P < 0,05)
Примечание: глюкоза определялась с помощью биохимического анализатора Stat Fax 3300.	

С целью исследования влияния колхицинотерапии на активность лактазы у 13 больных-добровольцев был проведен тест на лактозную переносимость, путем определения количества глюкозы в крови до и после (через час) применения 150 мл молока (рис. 3.2.2).

У всех исследуемых больных были выявлены изменения в количестве глюкозы, свидетельствующие о нормальной лактазной активности энтероцитов кишечника или бактерий толстой кишки, утилизирующих лактозу. О нормальной лактазной активности свидетельствовал также нормальный рН кала, минимальное значение которого у исследованных больных составило 6,5.

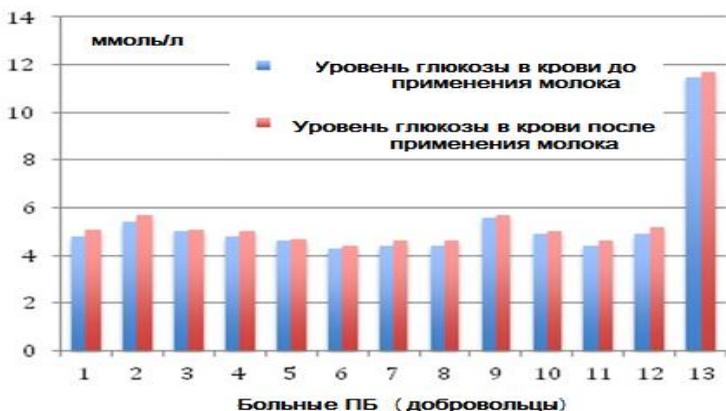


Рисунок 3.2.2. Изменение концентрации глюкозы в крови больных ПБ после принятия молока.

Хотя в литературе отмечается о побочном воздействии колхицина на лактозотолерантность, путем ее подавления [Fradkin A. et al, 1995; Chassany O. et al, 2000], однако в наших исследованиях наблюдалось абсолютно обратное. По всей вероятности, это обуславливается демографическими особенностями кишечной микробиоты больных ПБ Армении [Nam Y. et al, 2011].

Влияние пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" на состав бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Из-за возникших количественных и качественных сдвигов в различных нишах микроорганизмов, повышается вероятность колонизации пищеварительного тракта условно-патогенными представителями [Duncan S. et al, 2007; Jernberg C. et al, 2010; Tremaroli V., 2012; Gerber G., 2014].

Результаты культурального бактериологического анализа показали, что носительство *C. albicans* является проблемой для больных ПБ Армении, что может повлиять на спектр кишечных бактерий. 35,5% исследованных больных являлись носителями *C. albicans*, несмотря на то, что ни один из них во время и за 2-3 месяца до исследования не принимал антибиотики - основную причину развития кандидоза. Большинство больных ПБ являлись также носителями бактерий родов *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter* в концентрации больше, чем 10^2 КОЕ/г в фекальном материале (данные не приведены). Показано также, что после приема обоих пробиотиков число больных-носителей *C. albicans* резко снизилось.

Согласно результатам Phylochip™ анализа существует высокое отклонение в бактериальных сообществах во всех исследованных группах больных (рис. 3.2.3).

Различия в разнообразии родов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в кишечной микробиоте больных ПБ мужчин и женщин, являющихся носителями *C. albicans*, отображены на рис. 3.2.4. Результаты свидетельствуют о том, что состав кишечной микробиоты больных ПБ мужчин-носителей *C. albicans* отличается от состава больных ПБ женщин-носителей *C. albicans* (рис. 3.2.4). Женщины по сравнению с больными

мужчинами обладали широким разнообразием родов *Salmonella*, *Escherichia*, *Averyella*, *Cronobacter*, *Klebsiella* and *Serratia* ($P < 0,00021$) с высокой специфичностью (рис. 3.2.5).

Сравнение ОТЕ энтеробактерий у больных женщин-носителей и неносителей *C. albicans* показало статистически достоверное повышенное количество ОТЕ родов *Klebsiella* и *Erwinia* у носителей *C. albicans* по сравнению с неносителями ($P = 0,011$). С другой стороны, разнообразие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* у больных женщин-носителей *C. albicans* значительно отличалось от таковых у здоровых женщин (рис. 3.2.4"). По сравнению со здоровыми женщинами больные ПБ женщины-носители *Candida albicans* содержали большое количество ОТЕ родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* и *Trabulsiella* ($P < 10^{-5}$).

Применение обоих пробиотиков: "Наринэ" и "Колибактерон", привело к уменьшению разнообразия кишечных *Enterobacteriaceae*, особенно родов *Escherichia* и *Shigella* у больных ПБ женщин-носителей *C. albicans* ($P = 0,0036$) (рис. 3.2.4"").

В то же время не было выявлено существенных различий между разнообразием *Enterobacteriaceae* больных ПБ мужчин-носителей *C. albicans* и здоровых мужчин (рис. 3.2.4"").

Таким образом, достаточно большое число больных ПБ Армении является носителем *C. albicans*. Больные женщины несут широкий диапазон оппортунистических бактерий, которые могут быть частично устранены при помощи пробиотиков.

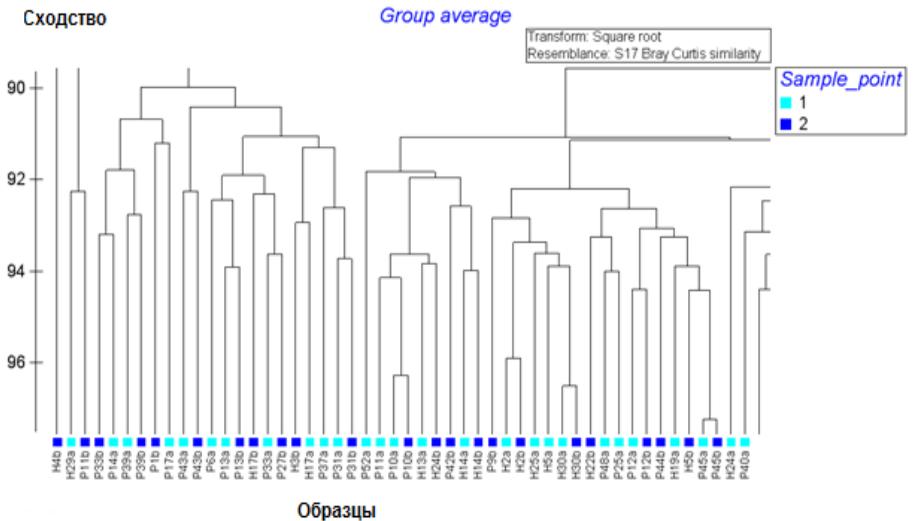


Рисунок 3.2.3. Состав кишечной микробиоты больных ПБ: Н-здоровые добровольцы, P-больные ПБ, 1 и 2-пробиотические группы.

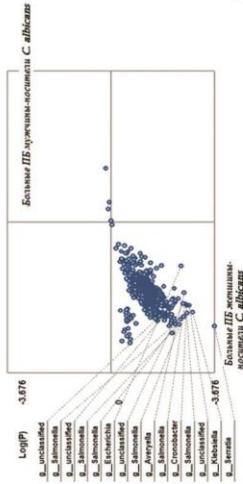


Рис.3.2.4'

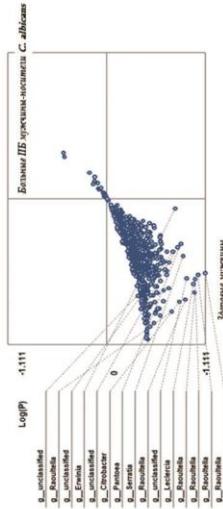


Рис.3.2.4''

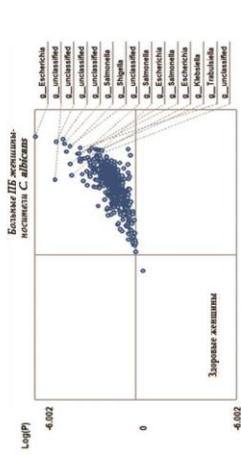


Рис.3.2.4'''

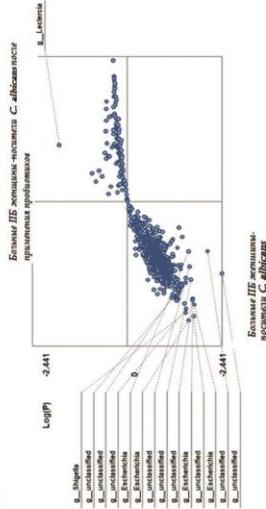


Рис.3.2.4''''

Рисунок 3.2.4. Сравнительный анализ ОТЕ кишечных *Enterobacteriaceae*:

3.2.4'- у больных ПБ мужчин и женщин-носителей *C. albicans*.

3.2.4''- у больных ПБ женщин-носителей *C. albicans* и здоровых женщин.

3.2.4'''- у больных ПБ мужчин-носителей *C. albicans* и здоровых мужчин.

3.2.4''''- у больных ПБ женщин-носителей *C. albicans* до и после применения пробиотиков.

Примечание: носители содержали свыше 10^3 КОЕ/г грибов в фекальном материале до лечения, а после применения пробиотиков ни у одного больного в кишечной микрофлоре не было выявлено свыше 10^3 КОЕ/г *C. albicans*.

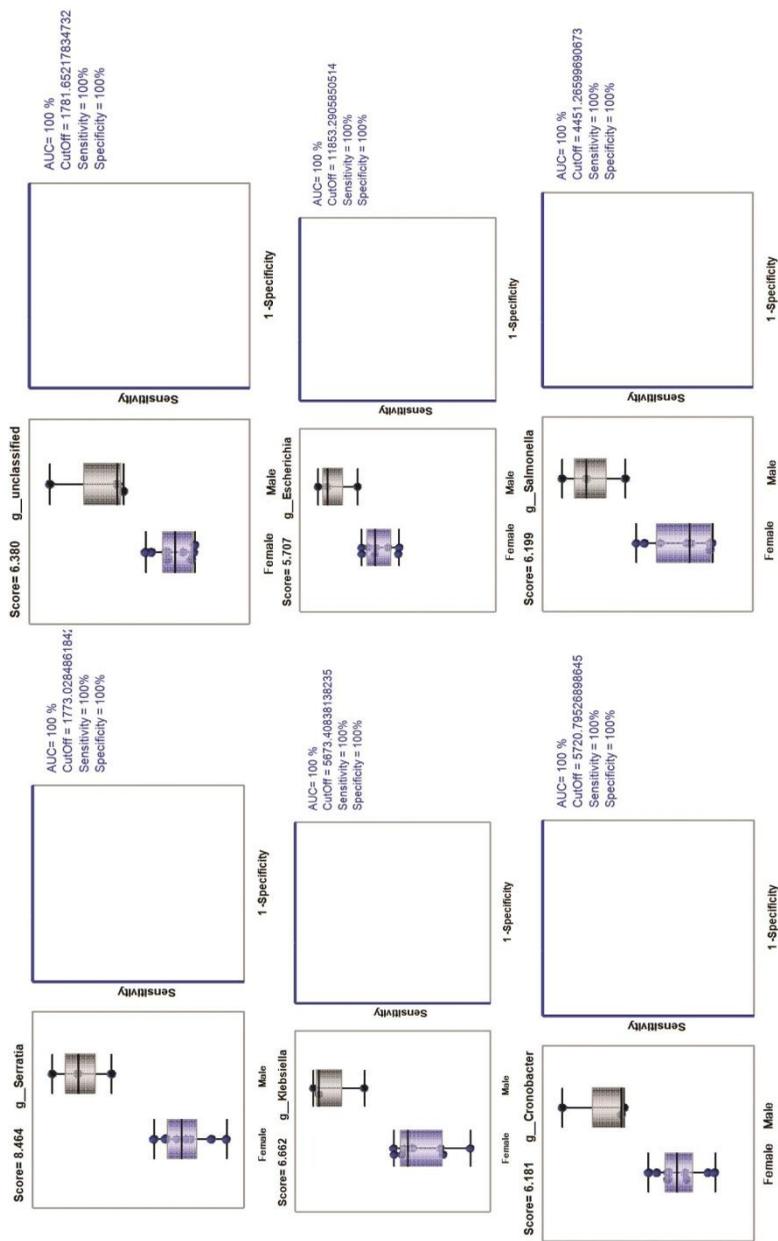


Рисунок 3.2.5. Сравнение разнообразия клонических *Enterobacteriaceae* у больных ПБ женщин и мужчин-носителей *Candida albicans* (специфичности ОТЕ).

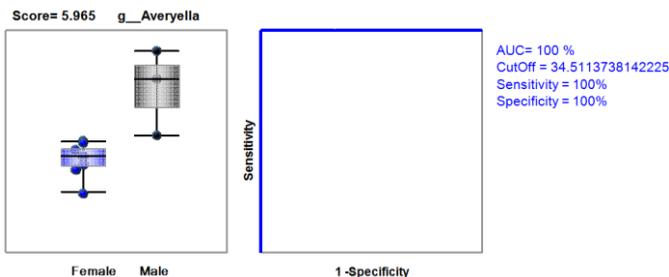


Рисунок 3.2.5. (Продолжение)

3.3. ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КИШЕЧНЫХ *Escherichia* И ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КОММЕНСАЛЬНЫХ *E. coli* КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ БОЛЬНЫХ ПБ

Роль антимикробных препаратов в уменьшении заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний трудно переоценить. Тем не менее, чрезмерное и зачастую необоснованное использование антибиотиков привело к быстрому распространению антибиотикорезистентных комменсальных бактерий в различных экосистемах, в том числе и в кишечной микробиоте здоровых и больных людей [Peyouan A. et al, 2005; Sommer M. et al, 2009; Davies J., 2010].

E. coli часто используют для мониторинга антибиотикорезистентности по причине широкой распространенности этих бактерий у различных хозяев, а также тем, что они легко приобретают резистентные свойства и обмениваются ими с другими бактериями [Tadesse D. et al, 2012; Yip P., 2014].

Было идентифицировано 157 ОТЕ, принадлежащих роду *Escherichia*. Сравнительный анализ ОТЕ кишечных бактерий рода *Escherichia* больных ПБ и здоровых добровольцев представлен на рис. 3.3.1. На данном рисунке видно увеличение количества ОТЕ бактерий рода *Escherichia* в кишечной микробиоте исследуемых больных. С другой стороны, сравнительный культуральный бактериологический анализ показал, что увеличение количества ОТЕ у больных ПБ не оказывает существенного влияния на титры комменсальных *E. coli*. Согласно нашим экспериментальным данным, титры комменсальных *E. coli* у больных ПБ находились в пределах нормы (табл. 3.3.1).

Исследования профилей антибиотикорезистентности комменсальных *E. coli* больных периодической болезнью показали, что комменсальные изоляты *E. coli* этих больных имели высокую резистентность к антибиотикам группы тетрациклина - к антибиотикам старого поколения, которые дольше всего находятся в обращении (64% - 88%) (табл. 3.3.2). Высокая степень резистентности была показана также для группы β -лактамов антибиотиков (38–72%): амоксициллина, ципринола и цефазолина, которые составляют основу современной антимикробной химиотерапии.

Наименьшая резистентность была зарегистрирована для левомецетина (хлорамфеникола), что, вероятно, обусловлено редкостью его назначения из-за наличия широкого спектра побочных эффектов и патогенности.

Результаты рис. 3.3.2. свидетельствуют, что пробиотикотерапия приводит к уменьшению количества ОТЕ кишечных *Escherichia* у больных ПБ. Статистически достоверные изменения количеств ОТЕ после приема как плацебо, так и "Нарине" у здоровых людей не наблюдались (рис. 3.3.3). Плацебо также не оказало статистически достоверного влияния на количество ОТЕ кишечных *Escherichia* у больных ПБ (результаты не приведены). Данные табл. 3.3.1 показывают, что количество кишечных комменсальных *E. coli* как до, так и после пробиотикотерапии находились в пределах нормы клинического бактериологического анализа.

Для мониторинга антибиотикорезистентности изолятов *E. coli* после приема пробиотиков всего, в общей сложности, 749 комменсальных изолятов *E. coli* было протестировано на чувствительность к различным антибиотикам. Результаты представлены в табл. 3.3.2. Обнаружено, что после применения пробиотиков количество мультирезистентных изолятов в кишечной микробиоте больных ПБ достоверно снижалось.

Таким образом, выявлен большой процент резистентных и мультирезистентных изолятов комменсальных *E. coli* в кишечной микробиоте больных периодической болезнью на фоне увеличения количества ОТЕ бактерий рода *Escherichia* в кишечной микробиоте этих больных. Применение коммерческого пробиотика "Наринэ" приводит к уменьшению количества ОТЕ рода *Escherichia*. Выявлено также, что после приема плацебо и пробиотиков количество мультирезистентных изолятов *E. coli* в группах "Плацебо", "Наринэ" и "Колибактерон" достоверно снижается. Факт изменения профилей резистентности комменсальных *E. coli* после плацебо и пробиотика "Наринэ" нуждается в дополнительных исследованиях для выяснения механизмов, ответственных за смену антибиоткорезистентных профилей бактерий в кишечнике.

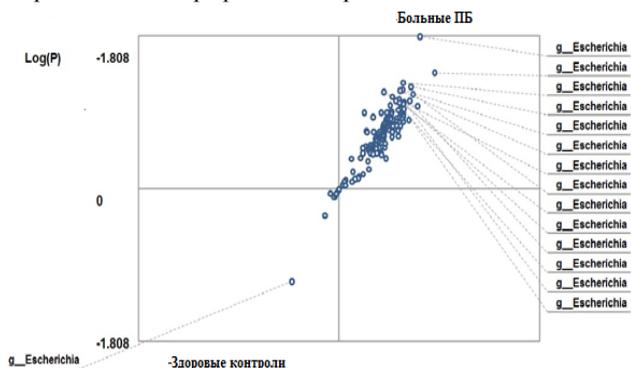


Рисунок 3.3.1. Сравнительный анализ операционных таксономических единиц кишечных бактерий рода *Escherichia* у больных периодической болезнью и здоровых добровольцев.

Контролем являлись здоровые добровольцы, тестируемой группой – больные периодической болезнью.

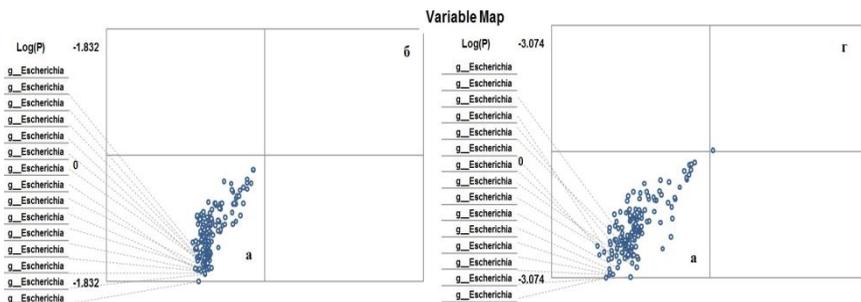


Рисунок 3.3.2. Сравнительный анализ операционных таксономических единиц кишечных бактерий рода *Escherichia* у больных периодической болезнью: до приема "Наринэ" (а), после прекращения приема "Наринэ" (б) и через 1,5 месяца после прекращения приема "Наринэ" (г).

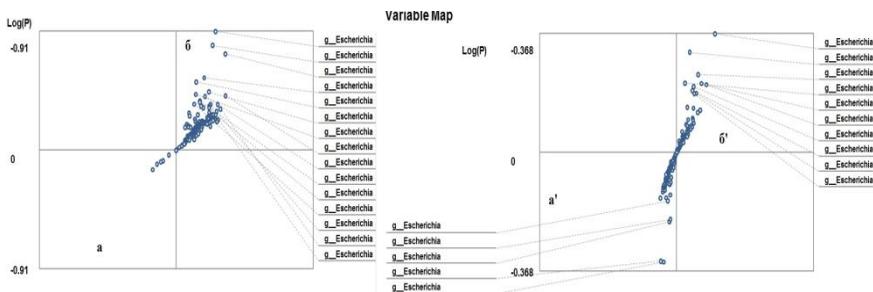


Рисунок 3.3.3. Сравнительный анализ операционных таксономических единиц кишечных бактерий рода *Escherichia* у здоровых добровольцев: до приема плацебо (а), после прекращения приема плацебо (б), до приема "Наринэ" (а') и через 1,5 месяца после прекращения приема "Наринэ" (б').

Таблица 3.3.1. Сравнительный анализ количества комменсальных *E. coli* и *Lactobacillus spp.* в кишечной микрофлоре больных периодической болезнью.

Log КОЕ/г (Среднее число ±STDEV)	Группа больных, принимающих пробиотик "Гаринэ" N=15			Группа больных, принимающих пробиотик "Колібактерон" N=15			Группа больных, принимающих плацебо N=15		
	До приме нения	После пробиотико терапии*	Через 1,5 месяца после пробиотико терапии*	До приме нения	После пробиотико терапии*	Через 1,5 месяца после пробиотико терапии*	До приме нения	После пробиотико терапии*	Через 1,5 месяца после применения плацебо*
Комменсальные <i>E. coli</i>	7,54±0,6 9	6,54±0,83 (P<0,05)	7,05±0,75 (P<0,05)	5,17±2,13	6,60±1,12 (P<0,05)	6,71±1,53 (P=0,095)	7±0,67	7,09±0,5 (P<0,05)	7,12±0,97 (P=1,27)
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	7,36±1,0 2	8,18±1,07 (P<0,05)	7,41±1,01 (P<0,05)	8,53±0,83	8,47±0,74 (P=1,51)	8,501±0,93 (P=1,11)	8,08±0,9	9,833±0,83 (P<0,05)	8,11±0,955 (P=1,15)

P<0,05 – считается статистически достоверным,

N – число больных в исследуемой группе,

*- Результаты сравнивались с результатами до терапии.

Таблица 3.3.2. Профили антибиотикорезистентности комменсальных *E. coli* больных периодической болезнью.

Изоляты, %	Группа Плацебо		Группа Пробиотики		Группа "Наринэ"		Группа "Колибактерон"	
	Перед N=18 n=99	После ^a N=13 n=78	Перед N=30 n=148	После ^a N=24 n=138	Перед N=17 n=87	После ^a N=10 n=53	Перед N=13 n=61	После ^a N=14 n=85
Тетрациклины Tc, Dc	88	55	78	60	87	64	64	59
β -лактамы Ac, Cp, Cf	54	27	52	37	38	25	72	45
Левомецетин	12	12	3	13	0	13	8	13
Чувствительные	11	40	13	31	13	34	13	29
Мультирезистентные*	54	22	43	31	38	23	49	36
Резистентные	35	38	45	38	56	42	30	36

* - резистентные по крайней мере к двум классам антибиотиков,
N - количество добровольцев,
n – количество изолятов,
Тетрациклин-Tc, доксициклин-Dc, амоксициллин-Ac, ципринол-Cp и пефлоксалин-Cf,
p < 0,05 – считается статистически достоверным (CHITEST).

ВЫВОДЫ

На основе проведенных исследований и полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. Показано соответствие результатов по культуральному и Phylochip™ исследованиям для количественной оценки *Escherichia* и *Lactobacillus* spp.. Соответствие между результатами Phylochip™ и культурального анализа для количественной оценки *Bifidobacteria* не обнаружено.
2. Были выявлены различия среди числа мужчин и женщин, больных ПБ, в стадии ремиссии с повышенными значениями СОЭ и уровнем С-РБ, в то время как показатели РФ в сыворотке крови были статистически нормальными для этих же больных. У больных ПБ наблюдалась также нормальная переносимость лактозы.
3. Выявлено, что около 35% больных ПБ Армении являются носителями *C. albicans*.
Обнаружено увеличение количества ОТЕ бактерий рода *Escherichia* в кишечной микробиоте больных ПБ.
Обнаружено качественное различие в разнообразии кишечных бактерий между представителями женского и мужского пола армянского населения, больных ПБ. В частности, число ОТЕ бактерий семейства *Enterobacteriaceae* выше в кишечной микробиоте больных женщин по сравнению с мужчинами.
4. Изучение влияния пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" (Витамакс-Е, Армения) на состав кишечной микробиоты больных ПБ показало, что пробиотикотерапия приводит к уменьшению количества *C. albicans* и ОТЕ семейства *Enterobacteriaceae* на основе нормализации клинических параметров крови.
5. Изучение антибиотикорезистентности комменсальных *E. coli* выявило большой процент резистентных и мультирезистентных изолятов в кишечной микробиоте больных периодической болезнью. Выявлено также, что после приема пробиотиков "Наринэ" и "Колибактерон" количество мультирезистентных изолятов *E. coli* в кишечной микробиоте больных ПБ достоверно снижается.

Практические рекомендации

- Результаты исследований указывают на необходимость переоценки критериев дисбактериоза при клиническом бактериологическом анализе.
- Больным ПБ Армении может быть рекомендована целенаправленная корректирующая пробиотикотерапия.

Список публикаций по теме диссертационной работы

1. **Harutyunyan N.A.**, Pepoyan E.S., Manvelyan A.M., Malxhasyan L.M., Pepoyan A.Z., Nakopyan G.S., Horie H. Quantitative and qualitative changes of commensal *Enterobacteriaceae* in gut microflora of patients with Familiar Mediterranean Fever disease // Electronic Journal of Natural Sciences.– 2007.- V. 8 №1.- P. 41-44.

2. **Արություն Н.**, Манвелян А., Пепоян Э., Пепоян А., Малхасян Л., Геворкян Г. Биохимические аспекты лабораторной оценки микробиологического дисбаланса толстой кишки // Международный симпозиум под эгидой Юнеско “Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики”, посвященный 100-летию со дня рождения академика Н.М. Сисакаяна: Сборник аннотаций – Ереван- Аштарак, апрель 2-4, 2007.- С. 52
3. Манвелян А., **Արություն Н.**, Алоян С., Багдасарян А., Мирзабекян С., Акопян А., Пепоян А. Состав кишечной микрофлоры больных болезнью Крона // Международный симпозиум под эгидой Юнеско “Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики”, посвященный 100-летию со дня рождения академика Н.М. Сисакаяна: Сборник аннотаций – Ереван- Аштарак, апрель 2-4, 2007.- С. 53
4. Shahbazi Sh., **Harutyunyan N.**, Mirzabekyan S., Manvelyan A., Pepoyan A. Comparative analysis of *Lactobacillus* isolates from kefir and matsun // Electronic Journal of Natural Sciences.- 2011.- V. 17 № 2.- P. 11-12
5. **Արություն Н. А.** Влияние пробиотиков на антибиотикорезистентность комменсальных *E. Coli* изолятов, выделенных из кишечной микрофлоры больных периодической болезнью // Доклады Национальной Академии Наук Армении.- 2013.- Т. 113 №3.- С. 311-315
6. Piceno Y.M., **Harutyunyan N.**, Balayan M., Tsaturyan V., Manvelyan A., Pepoyan A., Torok T. Effects of Probiotics on the Gut Microbiota of Armenian Populations with Familial Mediterranean Fever Using Phylochip™ and Culture-based Analyses // International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics: Proceedings- Kosice, Slovakia, June 11th - 13th, 2013.- P. 37-38
7. **Harutyunyan N.A.**, Manvelyan A.M., Balayan M.H., Mirzabekyan S.S., Malkhasyan L.M., Pepoyan A., Piceno Y., Torok T. Philochip™ Microarray Comparison of Sampling Methods used for Gut Microbiota Investigation // 2nd International Scientific Conference “Contribution of Young Generation in the Development of Biotechnology”: Book of abstracts- Yerevan, October 1-4, 2013.- P. 83
8. **Harutyunyan N.A.**, Manvelyan A.M., Mirzabekyan S.S., Malkhasyan L.M. Effects of probiotics on antibiotic resistance of commensal *E. coli* isolated from intestinal microflora of periodic disease patients // 1st Taiwan-Armenian Medical Conference // Blood and Cancer Secrets.- October, 2013.- V. 1 №1.- P. 22-23.

Նատալյա Արամի Հարությունյան

ՊՐՈՌԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԱՐԲԵՐԱԿԱՆ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՄԲ ՀԻՎԱՆԴՆԵՐԻ ԱԴԻՔԱՅԻՆ ՄԻԿՐՈՖԼՈՐԱՅԻ ՎՐԱ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ պարբերական հիվանդություն, աղիքային միկրոֆլորա, պրոբիոտիկ, կոլիսիցին, *Enterobacteriaceae*, հակաբիոտիկակայունություն:

Պարբերական հիվանդությունը (ՊՀ) աստոտսմ ռեցեսիվ աստոտիմունային հիվանդություն է, որը բնութագրվում է շճաթաղանթների բորբոքման հետ կապված

պարբերաբար կրկնվող ցավի, տենդի նույններով: ՊՀ-ի զարգացման համար պատասխանատու է MEFV գենը, որը պոզիցիոն կրոնավորման ճանապարհով քարտեզագրված է 16 քրոմոսոմի p13,3 հատվածում:

ՊՀ-ի դեպքում կոլիսիցինի օգտագործման արդյունավետության մասին առաջին անգամ նշվել է դեռևս 1972 թ-ին: Չնայած սրան, հայտնի են նաև կոլիսիցինի օրգանիզմի վրա ունեցող բազմաթիվ բացասական ազդեցությունները: Ադիքային միկրոֆլորայի նորմալ կարգավիճակի պահպանումն իր կարևոր նշանակությունն ունի ինչպես շատ այլ, այնպես էլ ՊՀ հիվանդների առողջության պահպանման և բարելավման գործառույթներում, երբ հիվանդների ադիքային միկրոբիոտայում նկատվող ամենատարբեր շեղումները կարող են կոլիսիցինի նկատմամբ անհանդուրժողականության պատճառ հանդիսանալ:

Մյուս կողմից, հայտնի է պրոբիոտիկների բավարար քանակությունների դրական ազդեցությունը մարդկանց ադիքային միկրոֆլորայի վրա:

Ատենախտական աշխատանքը նվիրված է պրոբիոտիկաթերապիայի ազդեցությանը պարբերական հիվանդությամբ հիվանդների ադիքային միկրոֆլորայի վրա:

Առաջին անգամ ուսումնասիրվել է ՀՀ-ում պարբերական հիվանդների կողմից բավականին հաճախակի օգտագործվող պրոբիոտիկների՝ «Նարինե» և «Կոլիբակտերոն» (Վիտամաքս-Ե, Հայաստան) ազդեցությունը հիվանդների ադիքային միկրոբիոտայի կառուցվածքային ամբողջականության վրա, հաշվի առնելով հիվանդների արյան պարամետրերի փոփոխությունները պրոբիոտիկաթերապիայի արդյունքում:

Առաջադրվել է լուծվել են հետևյալ խնդիրները՝ կաթնաթթվային և *Escherichia* բակտերիաների բնութագրման միջոցով կլինիկական բակտերիոլոգիական և ադիքային միկրոբիոտայի ուսումնասիրման ժամանակակից PhyllochirTM մեթոդների համեմատական անալիզ, արյան մի շարք կենսաքիմիական ցուցանիշների ֆոնի վրա «Նարինե» և «Կոլիբակտերոն» պրոբիոտիկների ազդեցության ուսումնասիրություն *Enterobacteriaceae* ցեղի բակտերիաների որակաքանակական կազմի վրա, ՊՀ հիվանդների ադիքային միկրոբիոտայում կոմենսալ *E. coli* անջատուկների հակաբիոտիկազգայունության հետազոտում:

Յույց է տրվել, որ կուլտիվացիոն և PhyllochirTM մեթոդները հաջողությամբ կարելի է կիրառել *Escherichia* և *Lactobacillus spp.* բակտերիաների քանակական գնահատման համար, այնինչ բիֆիդոբակտերիաների քանակական բնութագրման ժամանակ գրանցվել է այս երկու մեթոդների արդյունքների անհամապատասխանություն:

Յույց է տրվել, որ ռեմիսիայում գտնվող ՊՀ հիվանդների մոտ գոյություն ունի C-ռեակտիվ սպիտակուցի (C-ՌՍ) և արյան էրիթրոցիտների նստեցման արագության (ԷՆԱ) մակարդակների շեղումներ՝ պայմանավորված հիվանդների սեռով: Գրանցվել է C-ՌՍ-ի ցուցանիշի նորմալացում՝ պրոբիոտիկների կիրառման արդյունքում: Ի հակադրություն գրականության տվյալների, ցույց է տրվել, որ հայ ՊՀ հիվանդները երկարատև կոլիսիցինաթերապիայի արդյունքում չեն տառապում լակտազային անբավարարվածությամբ ի տարբերություն այլազգի ՊՀ հիվանդների:

Հայտնաբերվել է, որ հայ ՊՀ հիվանդների 35%-ը հանդիսանում է *C. albicans* կրողներ: Ադիքային *Enterobacteriaceae*-ների օպերացիոն տաքսոնոմիկ միավորների (OSU) գնահատման արդյունքում ցույց է տրվել, որ ՊՀ հիվանդների մոտ նկատվում է *Escherichia* բակտերիաների OSU քանակի ավելացում: Յույց է տրվել,

որ ՊՀ հիվանդները տարբերվում են իրենց աղիքային միկրոբիոտայի կազմով՝ կախված հիվանդների սեռից: Մասնավորապես, բացահայտվել է, որ կին պարբերական հիվանդների մոտ *Enterobacteriaceae* բակտերիաների O/SU-ների քանակը զգալիորեն բարձր է, քան արական սեռի հիվանդներինը: ՊՀ հիվանդների մոտ ցույց է տրվել ՀՀ-ում լայնորեն կիրառվող հակաբիոտիկների նկատմամբ աղիքային կոմենսալ *E. coli* բակտերիաների բարձր հակաբիոտիկակայունություն:

Նկարագրվել է, որ «Նարինե» և «Կոլիբակտերոն» պրոբիոտիկների ընդունումը հիվանդների կողմից նպաստում է հիվանդների արյան պարամետրերի նորմալացմանը, ինչպես նաև աղիքային միկրոբիոտայում օպորտունիստիկ բակտերիաների քանակի և տարածվածության նվազեցմանը: Հիվանդների աղիքային միկրոբիոտայում պրոբիոտիկաթերապիայի արդյունքում նկատվում է նաև հակաբիոտիկակայուն կոմենսալ *E. coli* անջատկների քանակի նվազում:

Վերոհիշյալ տվյալները վկայում են ՊՀ հիվանդների աղիքային միկրոբիոտայի վրա «Նարինե» և «Կոլիբակտերոն» պրոբիոտիկների դրական ազդեցությունների մասին և ունենալով մանրէաբանական, մոլեկուլային գենետիկական, կենսաքիմիական և կենսատեխնոլոգիական նշանակություն, կարևոր են նաև առողջապահական խնդիրների լուծման համար: Մասնավորապես, ատենախոսական ուսումնասիրությունների արդյունքները վկայում են կլինիկական բակտերիալոգիական հետազոտությունների չափորոշիչների վերազնահատման անհրաժեշտության մասին և հիմք են հանդիսանում ՊՀ-ի դեպքում ուղղորդված պրոբիոտիկաթերապիայի կիրառման համար:

Natalya A. Harutyunyan

EFFECTS OF PROBIOTICS ON GUT MICROBIOTA OF PERIODIC DISEASE PATIENTS

SUMMARY

Keywords: Periodic disease, gut microbiota, probiotic, colchicine, *Enterobacteriaceae*, antibiotic resistance.

Periodic disease (PD) is an autosomal recessive autoinflammatory disorder which is characterized by inflammations of the serious membranes with recurrent attacks of fever and pain. Development of PD is connected with mutations in a gene of MEFV which is mapped by a method of position cloning on a site p13,3 of chromosome 16.

About positive impact of use of colchicine it was for the first time described in 1972. Despite, it is known a number of negative effects of colchicine on an human organism. Preservation of the normal status of gut microbiota is important at preservation and improvement of patients' health for both various diseases, and PD patients, when various frustration of gut microbiota can become the reason of unsusceptibility to colchicine.

On the other hand, it is known that probiotics enough quantity has a positive effect on people's gut microbiota.

Dissertation work is devoted to the effect of a probiotics on PD patients' gut microbiota.

It was for the first time to study the influence often applied probiotics "Narine" and "Colibacteron" (Vitamaks-E, Armenia) by PD patients of Armenia on structural integrity of a gut microbiota, considering changes of blood parameters as a result of a treatment by probiotics.

The following tasks were carried out: comparative analysis of the modern Phylochip™ and a clinical bacteriological methods of gut microbiota study by description of lactic acid bacteria and *Escherichia*; assessment of influence of probiotics of "Narine" and "Colibacteron" on qualitative and quantitative structure of gut bacteria from *Enterobacteriaceae* family on a basis of blood biochemical indicators of PD patients; studying of antibiotic resistance of commensal *E. coli* isolates from gut microbiota of PD patients.

It was stated that the Phylochip™ methods and the cultural analysis can be applied successfully to a quantitative assessment of *Escherichia* and *Lactobacillus* spp. while at a quantitative assessment of *Bifidobacteria* there was no compliance between the both used method results.

Deviations in the erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) parameters of PD patients in a remission stage, mainly, the patients connected with gender were revealed. Normalization of an indicator of CRP after application of probiotics was registered. Contrary to literary data, it was shown that PD patients of Armenia unlike PD patients of other nations don't suffer lactase deficiency in connection with long use of colchicine.

It was revealed that 35% PD patients are *C. albicans* carriers. As a result of an assessment of operational taxonomic units (OTU) of gut *Enterobacteriaceae* it was shown that in PD patients the increase in quantity of OTU of bacteria of *Escherichia* is observed. It was revealed, that PD patients differ on structure of a gut microbiota, depending on a gender. In particular it was revealed that women PD patients have a quantity of OTU of *Enterobacteriaceae* family bacteria much more, than men. The high antibiotic resistance of commensal gut *E. coli* of PD patients to widely applied antibiotics in Armenia was revealed.

It was described that application of probiotics "Narine" and "Colibacteron" in PD patients leads to normalization of blood, and also the therapy by probiotics promotes reduction of quantity and prevalence of opportunistic bacteria of their gut microbiota. In patients' gut microbiota, as a result of treatment by probiotics, decrease of antibiotic resistance *E. coli* isolates is also observed.

The above-stated data testify to the positive influence of probiotics "Narine" and "Colibacteron" and, having microbiological, molecular genetical, biochemical and biotechnological meaning, are important also for the decision of health care tasks. In particular, the results of dissertation researches testify the need of reevaluation of criteria of clinical bacteriological trials, and they are the base for application of a purposeful treatment by probiotics during a periodic disease.