

ՀՏԴ 604

Կենսաբանություն

**ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱՐԳԱՍԻՔՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՐՈՇԱԿԻ ԱԽՏԱԾԻՆ
ՄԱՆՐԷԱՆԵՐԻ ԱՃԻ ՎՐԱ**

**Արևիկ ԻՍՐԱԵԼՅԱՆ,
Լիլիա ԱՌԱՍԱՄՅԱՆ, Ֆլորա ՏԽՐՈՒՆԻ**

Բանալի բառեր՝ ախտածին մանրէ, ԿԹԲ, հակամանրէային արգասիք, ճնշման գոտի, բակտերիոցին, պրոբիոտիկ, միկրոֆլորա, հակաբիոտիկ, սկավառակ-դիֆուզիոն մեթոդ:

Ключевые слова патогенные бактерии, МКБ, противомикробный продукт, зона давления, бактериоцин, пробиотик, микрофлора, антибиотик.

Keywords pathogenic bacterium, LAB, antimicrobial product, inhibition zone, bakteriotsin, probiotic, micro flora, antibiotic.

А. Израелян, Л. Арстамян, Ф.Тхруни

Изучение влияния биологических метаболитов на рост некоторых патогенных микробов

Изучение пробиотических микроорганизмов и препараты, полученные на основе синтезируемых ими веществ, являются актуальным направлением в национальной политике многих стран.

Нами исследовано биоразнообразие молочнокислых бактерий, выявленных в различных регионах Арцаха. Показано, что некоторые из них проявляют антимикробную активность. Разработана технология их выделения из культуральной жидкости, полученной после выращивания микроорганизмов и показана возможность их использования в медицине.

A.Israyelyan, L. Arstamyanyan, F.Tkhruni

Investigation of Influence of Biological Metabolites on the Growth of some Pathogenic Bacteria

Studies of probiotic microorganisms and preparations produced on the basis of the substances synthesized by them are an actual direction in the national policy of many countries.

We have investigated biodiversity of lactic acid bacteria revealed in different regions of Artsakh. It has been shown that some of them have antibacterial activity. The technology of their isolation from culture liquid obtained after microorganisms' growth has been developed and the opportunity of their use in medicine has been shown.

Պրոբիոտիկ մանրէների և նրանց կենսաբանական ակտիվ նյութերի արտադրատման հիման վրա մշակված նոր պատրաստուկները հանդիսանում են մի շարք առաջատար երկրների ազգային քաղաքականության արդիական ուղղվածությունը:

Մեր կողմից ուսումնասիրվել և հետազոտվել են ԼՂՀ-ի տարբեր շրջանների կաթնաթթվային մանրէների բազմատեսականությունը: Պարզվել է, որ որոշները օժտված են հակամանրէային հատկություններով: Մշակվել է նաև հակամանրէային նյութերի ստացումը աճեցված մանրէների կուլտուրալ հեղուկից և նրանց կիրառումը բժշկության մեջ:

Ներկա ժամանակներում զարգացող երկրներում առաջնահերթ խնդիր է հանդիսանում մարդու և կենդանիների համար վտանգավոր ախտածին մանրէների տարածվածությունը: Վերջին երկու տասնամյակներում հակաբիոտիկակայուն մանրէների քանակն ավելացել է՝ պայմանավորված հակաբիոտիկների լայնորեն օգտագործմամբ, ինչը բերել է վարակիչ հիվանդությունների տարածմանը, ինչպես մարդկանց, այնպես էլ կենդանիների մոտ: Երկրագնդի տարբեր ծայրերում՝ ԱՄՆ-ում, Եվրոպական մի շարք երկրներում գրանցվել են մի քանի հիվանդությունների համաճարակներ, որոնց հարուցիչներն են հանդիսանում երկու տարբեր տեսակների՝ սալմոնելա և լիստերիա, պատկանող սննդային ախտածին բակտերիաները: Ուստի, սննդամթերքի անվտանգության ապահովումը համարվում է արդիական խնդիր բոլոր երկրների համար: Ախտածին մանրէների նկատմամբ պայքարի ուժեղ միջոց են հանդիսանում հակաբիոտիկները: Սակայն տասնյակ տարիների ընթացքում հակաբիոտիկների անվերահսկելի կիրառումը ինչպես բժշկության, այնպես էլ

անասնաբուծության մեջ բերել է հակաբիոտիկների հանդեպ կայուն մանրէների շտամների ձևավորմանը, այսինքն առկա է նրանց անընդհատ աճ: Այս բոլորը նպաստել է այլընտրանքային բնական մանրէաբանական պատրաստուկների, ինչպես նաև պրոբիոտիկների՝ կենդանի մանրէների, նկատմամբ հետաքրքրության ավելացմանը:

ԿԹԲ-ները սինթեզում են դիացետիլ, ջրածնի պերօքսիդ, օրգանական թթուներ, կաթնաթթու, ամինաթթուներ, ինչպես նաև ցածրամոլեկուլային միացություններ՝ ինդոլներ, բակտերիոցիններ, որոնք ունեն հակամանրէային ակտիվություն և լայն կիրառություն են գտել սննդաարդյունաբերությունում՝ որպես կենսապահպանիչներ: [Leroy F., De Vuyst L., 2007]: Բակտերիոցինների մեծ մասը գործում է մեմբրանային լուսանցքների ձևավորման միջոցով, որոնք բերում են զգայուն բջջի թաղանթի էլեկտրոնային ներուժի փոփոխմանը՝ հանգեցնելով ամինաթթուների և կատիոնիտների ոչ բնորոշ արտահոսքին, բջջաթաղանթի քայքայմանը և բջջի ոչնչացմանը [Yoneyama H., Katsumata R., 2006]:

Ադեստամոքսային համակարգի միկրոֆլորան իրենից ներկայացնում է բարդ էկոհամակարգ, որտեղ աղիքային միկրոֆլորայի մանրէների տեսակային բազմազանության և քանակության միջև գոյություն ունի նուրբ հավասարակշռություն: Դրանց թվին են դասվում կաթնաթթվային բակտերիաները (ԿԹԲ), որոնց աճման ընթացքում սինթեզվող նյութերը (օրգանական թթուներ, ջրածնի պերօքսիդ, դիացետիլ, բազմաշաքարներ, տարբեր մոլեկուլային զանգվածներով պեպտիդներ, ինդոլներ), ճնշում են ախտածին մանրէների աճը [Lipsitch M., Bergstrom C.T., Levin B.R., 2000]:

Վերջին տասնամյակներում ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Միկրոբային պատրաստուկների լաբորատորիայում ստանում են կենսաբանական արգասիքներ, որոնք պարունակում են բակտերիոցիններ, վերջիններս էլ ճնշում են ախտածին մանրէների աճը: Հետազոտությունների արդյունքում պարզվել է, որ *Lactobacillus rhamnosus* BTK 109 (INMIA №9614) մանրէն սինթեզում է 2 ակտիվ բակտերիոցիններ (BCN)՝ BCN 1 (1427 Da) և BCN 2 (602,6 Da), որոնց մոլեկուլային զանգվածը տարբերվում է *Lactobacillus acidophilus* 1991-ից (VKMP-6527, n.v. Er 317/402 Նարինե շտամ), որը արտադրում է BCN(1100Da) մոլեկուլային զանգվածով [K. Karapetyan, F. Tkhruni, 2013]: Այս պեպտիդները դրսևորում են տարբեր ազդեցություններ Գրամ դրական և Գրամ բացասական ախտածին բակտերիաների նկատմամբ:

Աշխատանքի խնդիրն ԿԹԲ-ներից ստացված հակամանրէային արգասիքները փորձարկել ԼՂՀ բնակչության տարբեր հիվանդություններով տառապողներից անջատված ախտածին մանրէների տարբեր տեսակների վրա: Աշխատանքը կատարվել է ԼՂՀ ԱՆ «Համաճարակաբանության և հիգիենայի կենտրոն» ՊՈԱԿ-ի հետ համատեղ:

ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

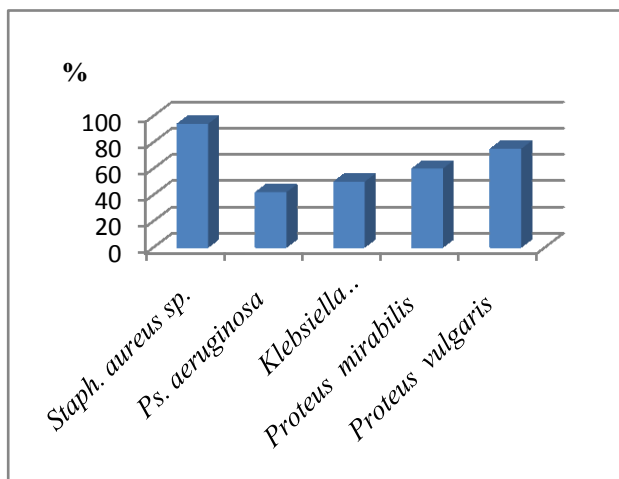
Ուսումնասիրությունների առարկան: Հակամանրէային արգասիքները ստացվել են ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի Միկրոբային պատրաստուկների լաբորատորիայում [Արտոնագիր ՀՀ №1723 A2, Աղաջանյան Ա.Ե., Տխրունի Ֆ.Ն., Երևան, 2006]: Արգասիքները հանդիսանում են կաթնաթթվային բակտերիաներ՝ *Lactobacillus acidophilus* 1991 (ՀՄՊ-1) և *Lactobacillus rhamnosus* BTK 20-12 (MDC 9631) (ՀՄՊ-2) աճեցումից ստացված նյութափոխանակության արգասիքներ և պարունակում են տարբեր մոլեկուլյար կշռով բակտերիոցիններ:

Հակաբիոտիկների նկատմամբ զգայունության որոշում (*in vitro*): Միկրոօրգանիզմների նկատմամբ հակաբիոտիկների զգայունության որոշման սկավառակ-դիֆուզիոն եղանակը հիմնված է հաստատուն հակաբիոտիկների սկավառակի շուրջ ճնշման գոտու տրամագծի որոշման վրա՝ [Parente E., Brienza C., et al., 1995]: Օգտագործվել են հետևյալ հակաբիոտիկների սկավառակները՝ ամպիցիլին-10մգ (AMP), գենտամիցին-10մգ (GN), ցիպրոֆլոկսացին-5մգ (CIP), օֆլոկսացին-5մգ (OFX), ցեֆուրոկսիմ-30մգ (CXM), ազիտրոմիցին-15մգ (AZM), դոկսիցիլին-30մգ (DXT), տետրացիկլին-30մգ (TE), աուգմենտին-30մգ (AMOX/CLAV.AC), կոտրիմոքսազոլ-

25մգ (SXT), ամոքսացիլին-3մգ (AMC-30), էրիթրոմիցին-15մգ (E-15), լևոֆլոքսատին-30մգ (LEV-30), պենիցիլին-10մգ (P-10), ստրեպտոմիցին-10մգ (S-10):

Արդյունքներ և քննարկում: Մեր կողմից օգտագործվել են ախտածին մանրէներ, որոնք անջատվել են հիվանդ մարդու կոկորդից, կղանքից, մեզից, և այլն: Նույնականացման արդյունքները ցույց են տվել, որ 7 մանրէները պատկանում են *St. aureus* ցեղին, 7 մանրէները՝ *Pr.mirabilis* ցեղին, ջրից և հիվանդ մարդու կղանքից, մեզից, աչքից 5 մանրէները պատկանում են *Ps.aeruginosa*..:

Ուսումնասիրվել է մեկուսացված ախտածին մանրէների դիֆակայունությունը տարբեր հակաբիոտիկների նկատմամբ, որոնք օգտագործվում են բուժական նպատակներով: Տվյալները բերված են նկար 1-ում:



Նկար 1. Ախտածին մանրէների դիֆակայունությունը տարբեր հակաբիոտիկների նկատմամբ

Նկար 1-ում բերված արդյունքները ցույց են տալիս, որ հիվանդ մարդկանց տարբեր աղբյուրներից անջատված ախտածին մանրէները օժտված են տարբեր դիֆակայունությամբ՝ տարբեր հակաբիոտիկների նկատմամբ («Համաճարակաբանության և հիգիենայի կենտրոն» ԼՂՀ ք. Ստեփանակերտ):

Որոշ հետազոտություններ ցույց է տրվել, որ օգտագործվող հակամանրէային պատրաստուկները, որոնք ստացվել են *Lactobacillus rhamnosus* БТК 20-12 (ՀՄՊ-5) և *Lactobacillus acidophilus* 1991 (ՀՄՊ-1) ԿԹԲ-ների շտամերից ճնշում են հակաբիոտիկակայուն ախտածին մանրէների շտամերին, որոնք անջատվել են ՀՀ ք. Երևանի տարբեր վարակիչ հիվանդություններով տառապող հիվանդ մարդկանցից [F.N. Tkhruni, G.G. Melik-Andreasyan, et al., 2013]:

Հետազոտել ենք *Lactobacillus rhamnosus* БТК 20-12 (ՀՄՊ-5) և *Lactobacillus acidophilus* 1991 (ՀՄՊ-1) շտամերի ազդեցությունը հիվանդ մարդկանցից անջատված ախտածին մանրէների վրա: Աշխատանքը կատարվել է ԼՂՀ «Համաճարակաբանության և հիգիենայի կենտրոն» ՊՈԱԿ-ում: Ստացված տվյալները ներկայացված են աղյուսակում (շտամ *Lactobacillus rhamnosus* 20-12 (ՀՄՊ-5), որը ստացվել է շտամ *Lactobacillus rhamnosus* БТК 109-ից կլոնալ եղանակով):

Աղյուսակ 1.

Հակամանրէային արգասիքների ազդեցությունը տարբեր ախտածին մանրէների աճի վրա

N	Հետազոտվող ՀՄՊ-ներ	<i>Pr.mirabilis</i> (Ø, մմ)						
		Ախտածին մանրէներ՝ անջատված տարբեր տեղերից						X
		կղանքից	մեզից	Կղանքից	Կղանքից	մեզից	կղանքից	

1	<i>L.acidophilus</i> -1991 (ՀՄՊ-1)	0	18	18	18	13	17	20(+)	15.00%
2	<i>L.rhamnosus</i> 20-12 (ՀՄՊ-5)	0	16	16	17	12	16	18(+)	13.57%

Ա.

Ինչպես երևում է աղյուսակ 1 Ա-ի տվյալներից՝ ՀՄՊ-1 և ՀՄՊ-5-ը ճնշում են *Pr.mirabilis* բակտերիայի աճը՝ տարբեր արդյունավետությամբ, ճնշման գոտիները կազմում են 14-20մմ և 12-18մմ, որոնք կախված են անջատված շտամի տեսակներից: ՀՄՊ-ի և ՀՄՊ-5-ի միջև տարբերությունը չնչին է:

N	Հետազոտվող ՀՄՊ-ներ	<i>St.aureus</i> (Ø, մմ)							
		Ախտածին մանրէներ՝անջատված տարբեր տեղերից							Χ
		կղանքից	կոկորդից	կղանքից	կղանքից	մեզից	կղանքից	վերքից	
1	<i>L.acidophilus</i> -1991 (ՀՄՊ-1)	14	20	18	15	12	14	0	11.28%
2	<i>L.rhamnosus</i> 20-12 (ՀՄՊ-5)	0	18	16	12	13	20(+)	0	11.14%

Բ.

Աղյուսակ 1 Բ-ում ցույց է տրված, որ ՀՄՊ-1 և ՀՄՊ-5-ը ճնշում են *St. aureus* բակտերիայի աճը տարբեր արդյունավետությամբ, ճնշման գոտիները կազմում են 12-20 մմ և կախված են անջատված շտամների տեսակներից: Շտամներից միայն մեկը, որը անջատված է վերքից՝ ՀՄՊ-ները չեն ճնշում:

N	Հետազոտվող ՀՄՊ-ներ	<i>Ps. aeruginosa</i> (Ø, մմ)					
		Ախտածին մանրէներ՝անջատված տարբեր տեղերից					Χ
		Կղանքից	կղանքից	կղանքից	աչքից	ջրից	
1	<i>L.acidophilus</i> -1991 (ՀՄՊ-1)	0	19	21	13(+)	27	16.00%
2	<i>L.rhamnosus</i> 20-12 (ՀՄՊ-5)	0	16	18	12	21	11.00%

Գ.

Անջատված մանրէները փորձարկվել են ՀՄՊ-երի ազդեցության տակ: Աղյուսակ 1 Գ-ում ցույց է տրված, որ ՀՄՊ-1-ն և ՀՄՊ-5-ը ճնշում են *Ps. aeruginosa* բակտերիայի աճը տարբեր արդյունավետությամբ, ճնշման գոտիները կազմում են 13-27մմ և 16-21մմ, որոնք կախված են անջատված շտամների տեսակներից: ՀՄՊ-1-ի և ՀՄՊ-5-ի միջև տարբերությունը կազմում էր մոտավորապես 5%:

Այսպիսով, կարելի է եզրահանգել, որ հիվանդ մարդկանցից անջատված ախտածին շտամերը հակաբիոտիկների նկատմամբ տարբեր կայունություն դրսևորումը վկայում է օգտագործվող հակաբիոտիկների թույլ արդյունավետության մասին: Օգտագործվող հակամանրէային պատրաստուկները, որոնք ստացված և ներկայացված են «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի մասնագետների կողմից, օժտված են հակաբիոտիկակայուն ախտածին շտամների աճի ճնշմամբ: Աճի ճնշումը կախված է հետազոտվող շտամների տեսակային կազմից, էթիոլոգիայից և այն բակտերիայի շտամից, որի նյութափոխանակության արգասիքներից ստացվել է պատրաստուկը: Ստացված արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ կենսաբանական պատրաստուկները, որոնք հանդիսանում են ԿԹԲ-ների նյութափոխանակության արգասիքներ, կարող են հանդիսանալ հակաբիոտիկների այլընտրանքային տարբերակներ, ընդ որում նրանց ազդեցությունից հետո չի նկատվում

հակաբիոտիկակայուն մանրէների շտամերի երկրորդնային աճ: Դա ևս մեկ անգամ պնդում է, որ բակտերիոցինների օգտագործման ժամանակ չի առաջանում բակտերիաների կայուն ձևեր:

Աշխատանքը իրականացվել է Արցախի գիտաշխատողների հետազոտությունների աջակցության ծրագիր-2013» ֆինանսավորման շրջանակներում:

Գրականություն

1. Արտոնագիր, ՀՀ № 1723 A2, Երևան 2006: Աղաջանյան Ա.Ե., Տիրունի Ֆ.Ն., Համբարձումյան Հ.Վ. Բալբեկյան Ծ., Վարդանյան Ա. Հ., Կուլտուրալ հեղուկից մանրէասպան հատկություններ ունեցող նյութերի խառնուրդի անջատման և մաքրման եղանակը:
2. F.N. Tkhruni, G.G. Melik-Andreasyan, A.V. Tsakanyan, K.J. Karapetyan, Ts.R. Balabekyan, Yu.T.Alexanyan. Multiple-Antibiotic Resistance of pathogens and using of biologically active peptides as an alternative to antibiotics. International scientific-practical conference "Actual Questions of Epidemiology". 4-5 November, 2013, Yerevan, Armenia. P. 242-246.
3. K. Karapetyan, F. Tkhruni, Ts. Balabekyan, L. Khachatryan, A. Isakhanyan. *Low molecular mass bacteriocins from Lactobacillus rhamnosus 109* // Biological Journal of Armenia, Yerevan, Armenia. Volume LXV, supplement 1, 2013. P. 84-85.
4. Leroy, F., De Vuyst L. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification, and food applications. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 2007, 13:194–199.
5. Lipsitch M., Bergstrom C.T., Levin B.R. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97: 1938–1943.
6. Melik-Andreasyan G.G., Tkhruni F.N., Tsakanyan A.V., Karapetyan K.J., Khanjyan G.J., Khachatryan T.V. Evaluation of antibiotic resistance of human gut microbiota pathogens. International scientific-practical conference "Modern problems of infectious pathology of human " October 31-November 1, 2013, Minsk, Belarus. Book of scientific papers, Volume 6, p. 208-213.
7. Parente E. Brienza C. Moles M. Ricciardi. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbiol. Methods. 1995, 22: 95-108.
8. Yoneyama H, Katsumata R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006, 70(5):1060-75.

Արևիկ Իսրայելյան - Արցախի գիտական կենտրոն, ՊՈԱԿ, Ստեփանակերտ, ԼՂՀ

E-mail: arevik_israelyan@mail.ru

Լ.Ա.Առստամյան - Արցախի գիտական կենտրոն, ՊՈԱԿ, Ստեփանակերտ, ԼՂՀ

E-mail: lilya17777@mail.ru

Ֆ.Ն.Տիրունի - Հայկենսատեխնոլոգիա, ՀՀ ԳԱԱ ԳԱԿ

Հոդվածը տպագրության է նրաշխարհում խմբագրական կոլեգիայի անդամ, կ.գ.դ., Վ.Տ.Հայրապետյանը: