

УДК 618.1: 579.2

Հեշտոցից անջատված լակտոբակտերիաների համակեցության ուսումնասիրությունը

Գ.Գ. Գրիգորյան

ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ
0056, Երևան, Գյուրջյան փ., 14

Բանալի բառեր. լակտոբակտերիաներ, համակեցություն, սիմբիոտիկ
ինդեքս, հակամանրէային ակտիվություն

Լակտոբակտերիաները (ԼԲ) հանդիսանում են առողջ կնոջ հեշտոցի գերիշխող միկրոֆլորա: Նրանք արտադրում են կաթնաթթու, ջրածնի պերօքսիդ (H_2O_2), բակտերիացիններ և այլ հակամանրէային նյութեր, որոնք ճնշում են ախտածին միկրոօրգանիզմներին և պահում են հեշտոցի $pH < 4,5$ [5, 12-14]: Երբ լակտոբակտերիաների քանակը քիչ է կամ նրանք բացակայում են, անաերոբ միկրոօրգանիզմները սկսում են արագ բազմանալ և առաջացնում են բակտերիալ վագինոզ [8]: Տարբեր գործոնների ազդեցության տակ՝ սննդակարգ, հիգիենիկ պայմաններ, սթրեսներ, ինֆեկցիաներ, իմունիտետի անկում և այլն, հեշտոցի մանրէային բալանսը խախտվում է, որն արտահայտվում է լակտոբակտերիաների քանակի նվազմամբ և ախտածին միկրոօրգանիզմների քանակի, ինչպես նաև pH -ի բարձրացմամբ [9]: Վագինոզների բուժման արդյունավետությունը բարձրացնելու և սեռավարակների կրկնությունը կանխելու համար հակաբիոտիկային թերապիայից հետո հեշտոցն անհրաժեշտ է վերագաղութացնել լակտոբակտերիաներով: Լակտոբակտերիաների գաղութացման արդյունավետությունը կախված է նրանց ադապտիվ (բազմացման արագություն, էպիթելիալ բջիջների վրա ադհեզիա, սթրեսների հանդեպ կայունություն) և պրոբիոտիկ (միջմանրէային փոխազդեցություն, հակամանրէային միացությունների՝ կաթնաթթու, ջրածնի պերօքսիդ, բակտերիացիններ, սինթեզ) հատկություններից [6, 7, 11], ինչպես նաև իմունամոդուլյացիոն ունակություններից [10]:

Լակտոբակտերիաները տարբերվում են միմյանցից հակաբակտերիալ միացությունների սինթեզով և ախտածին միկրոօրգանիզմների ճնշման ուժով: Ներկայումս հեշտոցի գաղութացման համար օգ-

տագործվում են ԼԲ-ի տարբեր տեսակների մոնոկուլտուրալ մոմիկներ և պատիճներ:

Սպասվում է, որ ԼԲ-ի մի քանի կուլտուրաներից կազմված սիմբիոտիկ համակեցությունները կարող են ավելի արդյունավետ լինել սեռական ճանապարհով փոխանցվող հիվանդությունների և վազինոզի կանխարգելման համար:

Տվյալ աշխատանքի խնդիրն է հանդիսացել հայաստանաբնակ կանանց հեշտոցից անջատել լակտոբակտերիաների բնական համակեցություններ, ուսումնասիրել նրանց պրոբիոտիկ և սիմբիոտիկ հատկությունները:

Նյութը և մեթոդները

Լակտոբակտերիաների *Lactococcus sp. GH12* և *Lactobacillus sp. GH15* շտամները անջատվել են տվյալ աշխատանքի ընթացքում: Որպես թեստ-կուլտուրա օգտագործվել է *Escherichia coli* O157:H7 շտամը (ՀՀ ԳԱԱ “Հայկենսատեխնոլոգիա” ԳԱԿ-ի կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասնկերի լաբորատոր հավաքածուից):

Աշխատանքում օգտագործվել են MRS (Himedia, India), LAPTg [2] ագարային և արգանակային միջավայրերը, յուղագերծ կաթ, Tryptose agar (Ferak, Berlin), լիարժեք արգանակ՝ Nutrient broth standard 1 (Serva, New York):

Լակտոբակտերիաների անջատման նպատակով հեշտոցային քսուկները վերցվել են հայաստանաբնակ վերարտադրողական տարիքի կանանցից ստերիլ բամբակյա տամպոնով հեշտոցի միջին մասից պտտածն շարժումով, այնուհետև կատարվել է ցանքս LAPTg ագարի վրա և ստերիլ յուղագերծ կաթի մեջ ու դրվել են ջերմապահարանում 37°C տակ [1]: Ֆերմենտացված կաթերի նմուշներից կատարվել է ցանքս LAPTg ագարի վրա՝ մաքուր կուլտուրաներ ստանալու նպատակով: Առաջացած գաղութները մաքրվել են վերացանքսերի միջոցով և ստուգվել նրանց կողմից կաթը ֆերմենտացնելու ունակությունը:

Անջատված լակտոբակտերիաները ներկվել են ըստ Գրամի և լուսային մանրադիտակի տակ ուսումնասիրվել է նրանց մորֆոլոգիան:

Կուլտուրաները աճեցվել են LAPTg և MRS արգանակներում թափահարիչով ջրային բաղնիքում 37°C տակ ինտենսիվ խառնման պայմաններում և աճի արագությունը որոշվել է օպտիկական խտությունների (ՕԽ) չափման միջոցով 590 նմ ալիքի երկարության տակ (սպեկտրաֆոտոմետր 7800 WV/VIS Cole Parker) [3]:

Կուլտուրաների սիմբիոտիկ ինդեքսները որոշվել են հայտնի եղանակով [4]:

Անջատված կաթնաթթվային կուլտուրաների հակամանրէային ակտիվությունը որոշելու համար գիշերային կուլտուրաները 1:20 հարաբերությամբ ինոկուլացվել են թարմ MRS արգանակում, ինկուբացվել 37°C տակ 24 ժ, որից հետո բակտերիաները նստեցվել են 3000 g ցենտրիֆուգման միջոցով և վերնստվածքային հեղուկների հակաբակտերիալ ակտիվությունները որոշվել են ազարում դիֆուզիայի եղանակով՝ գլանակներով (0,3մլ) և կաթիլներով (20մլլ), թեստ-կուլտուրայի վրա: Բակտերիացիները օրգանական թթուներից տարանջատելու համար վերնստվածքային հեղուկների pH-ը հասցվել է 6,0 [7]:

Արդյունքները և դրանց քննարկումը

Հայաստանաբնակ առողջ կանանցից մեկի հեշտոցից վերցված քսուկից LAPTg ազարի վրա արված ցանքսի արդյունքում հայտնաբերվել է գաղութներով միմյանցից խիստ տարբերվող բնական մանրէային համակեցություն (նկ. 1)՝ բաղկացած սպիտակ և կաթնագույն գաղութներ առաջացնող բակտերիաներից: Ազարի վրա արված կրկնակի ցանքսերի արդյունքում մաքրված գաղութների ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ նրանք ունակ են մակարդել կաթը և մոնո-, և համատեղ կուլտուրաներով: Կաթի մակարդումը վկայում է այն մասին, որ երկու կուլտուրաներն էլ պատկանում են կաթնաթթվային բակտերիաների շարքին:

Նշված կուլտուրաների բջիջների մորֆոլոգիական հատկությունները բերված են աղ. 1-ում:

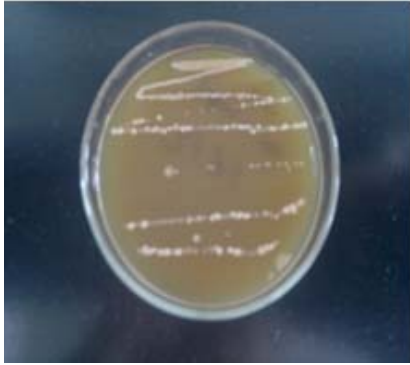
Աղյուսակ 1

Հեշտոցից անջատված բակտերիաների մորֆոլոգիական հատկությունները

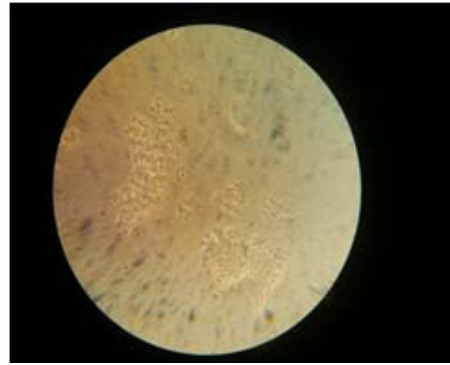
Շտամի անվանումը	Գաղութների մորֆոլոգիան		Բջիջների մորֆոլոգիան		Գրամ
	Տեսքը	Չափսերը, մմ	Տեսքը	Չափսերը, մկմ	
<i>Lactococcus sp. GH12</i>	սպիտակ	1-2	կոկ, կարճ շղթաներ	1,0-1,5	+
<i>Lactobacillus sp. GH15</i>	կաթնագույն	3	ցուլիկ	1,0 x 3,0	+

Մանրադիտակային ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ սպիտակ, փոքր չափսի (1-2 մմ) գաղութները ձևավորվել են կոկային կուլ-

տուրայով, իսկ կաթնագույն, մեծ (3 մմ) գաղութները՝ ցուպիկային կուլտուրայով (նկ. 2): Ինչպես կոկերը, այնպես էլ ցուպիկները գրամ դրական են:



Նկ. 1. Հեշտոցից վերցված քսուկից ազարի վրա արված անմիջական ցանքսի արդյունքում առաջացած գաղութների մորֆոլոգիան

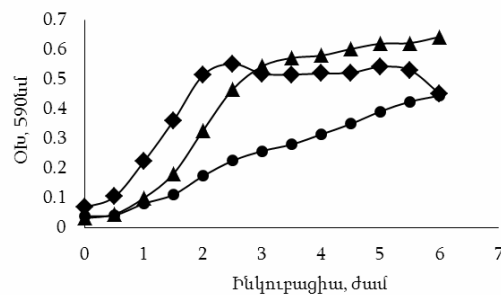


Նկ. 2. Հեշտոցից անջատված խառը կուլտուրայի մանրադիտակային պատկերը

Ուսումնասիրվել են մոնո- և խառը կուլտուրաների աճի օրինաչափությունները MRS միջավայրում ինտենսիվ խառնման պայմաններում (նկ. 3):

Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին, որ կուլտուրաները ինչպես առանձին, այնպես էլ համատեղ աճի դեպքում բնութագրվում են տիպիկ S – նման աճի կորերով: Բացիլային կուլտուրայի երկու ժամ աճից հետո ՕԻ հասնում է 0,54 և անցնում ստացիոնար փուլ, այն դեպքում, երբ կոկային կուլտուրայի աճը շարունակվում է 7 ժամից ավելի: Խառը կուլտուրայի աճը երեք ժամվա ընթացքում արագությամբ չի տարբերվում բացիլային կուլտուրայի աճի արագությունից, սակայն այն շարունակում է աճել 7 ժամ և ավելի արդեն կոկային կուլտուրայի արագությամբ:

Նկար 3-ում ներկայացված ՕԻ կորերի առավելագույն արժեքների հիման վրա հաշվարկվել են կուլտուրաների սիմբիոտիկ ինդեքսները՝ SI (աղ. 2):



Պայմանական նշաններ: ● - *Lactococcus sp. GH12*; ■ - *Lactobacillus sp. GH15*; ▲ - Mix կուլտուրա

Նկ. 3. Լակտոբացիլի և լակտոկոկի աճի արագությունը մոնո- և խառը կուլտուրաներում MRS միջավայրում 37°C-ի տակ ինտենսիվ խառնման պայմաններում

Աղյուսակ 2

Համակեցության կուլտուրաների սիմբիոտիկ ինդեքսները (ՄԻ)

Կուլտուրա	ՕԲ _{max}	ՄԻ
Համակեցություն	0.643	-
<i>Lactococcus sp. GH12</i>	0.404	1,59
<i>Lactobacillus sp. GH15</i>	0.545	1,17

Սիմբիոտիկ ինդեքսների վերլուծությունից երևում է, որ համատեղ աճը երկուսի համար էլ նպաստավոր է, սակայն առավել նպաստավոր է կոկային կուլտուրայի համար:

Որոշվել է անջատված շտամների հակամիկրոբային ակտիվությունը թեստ-շտամի գազոնի վրա կաթիլային և գլանակային եղանակներով (նկ. 4):



ա) կաթիլային եղանակ Բ) գլանակներով դիֆուզիայի եղանակ
Նկ. 4. Թեստ-շտամի՝ *Escherichia coli* O157:H7 աճի ճնշումը կուլտուրաների վերնատվածքային հեղուկների կողմից (1- խառը, 2- *Lactococcus sp. GH12*, 3- *Lactobacillus sp. GH15*)

Նկար 4-ից հստակ երևում է, որ *L.F*-ների արգանակային կուլտուրաների բջջագուրկ հեղուկները լիովին ճնշում են թեստ-շտամի աճը՝ առաջացնելով 15-20 մմ ճնշման գոտիներ: Խառը տարրերակի դեպքում հակաբակտերիալ ակտիվությունը առավել բարձր է՝ 20-22 մմ:

Բազմացման բարձր արագությունը շատ կարևոր է հեշտոցում լակտոբակտերիաների քանակի և pH-ի արագ վերականգնման համար, որոնք խախտվում են մենստրուալ ցիկլից և սեռական հարաբերություններից հետո: Այս տեսանկյունից խառը, սիմբիոտիկ, հակաբակտերիալ բարձր ակտիվությամբ օժտված լակտոբակտերիաները արագ բազմանալով՝ առաջացնում են մեծ քանակի կաթնաթթու և բակտերիացիներ, որոնք ճնշում են պաթոգեն միկրոօրգանիզմների աճը և վերականգնում հեշտոցի թթվային pH-ը [9]:

Поступила 26.11.13

Изучение ассоциации лактобактерий, выделенной из женского влагалища

Г.Г. Григорян

Цель настоящей работы – выделение натуральных ассоциаций лактобактерий из влагалища здоровых женщин, обладающих высокими антибактериальными свойствами. Из влагалищных мазков, взятых у женщин Армении репродуктивного возраста, была изолирована натуральная микробная ассоциация, состоящая из палочек и кокков. Изучение свойств чистых культур и их смеси показало, что изолированные бациллы и кокки в смешанной культуре растут быстрее и накапливают большую биомассу, чем в отдельности. Симбиотические индексы обеих культур оказались намного выше единицы, что свидетельствует о ярко выраженном синергизме между ними. Высокий синергизм был обнаружен также при изучении их антибактериальной активности в отношении *Escherichia coli O157:H7*. Полученные результаты можно использовать при создании искусственных ассоциаций влагалищных лактобактерий, обладающих более высоким лечебно-профилактическим эффектом по отношению к инфекциям, передающимся половым путем, и вагинозам.

The study of a community of lactic acid bacteria isolated from a woman`s vagina

G.G. Grigoryan

The aim of this study is the isolation of natural associations of lactobacilli with high antibacterial properties from a healthy women vagina. From vaginal smears taken from Armenian women of reproductive age, a natural microbial

association composed of rod-shaped and cocci bacteria was isolated. The study of the properties of pure cultures and their mixture showed that the isolated bacilli and cocci in the mixed culture grow faster and accumulate greater biomass than individually. Symbiotic indices of both cultures were much higher than one, which demonstrates well pronounced synergy between them. High synergy was also observed when studying their antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7. The results can be used to create artificial associations of vaginal lactobacilli with a high therapeutic effect on sexually transmitted infections and vaginosis.

Գրականություն

1. Գրիգորյան Գ.Գ., Հովհաննիսյան Հ.Գ. Հեշտոցային լակտոկոկերի անջատումը և բնութագրումը: Հայաստանի բժշկագիտություն ՀՀ ԳԱԱ, 2013, հ. LIII, էջ. 94-101
2. Оганесян Г.Г., Барсегян А.А., Пашиаян М.М. Изучение эффективности усвоения лактулозы вагинальными молочнокислыми бактериями in vitro, Мед. наука Армении НАН РА, 2011, т. L1, 3, с. 25-27.
3. Перт Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. Пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н. Под. ред. Работнова И.Л. М., 1978.
4. Печуркин Н.С. Популяционная микробиология, Новосибирск, 1978.
5. Boris S., Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect., 2000, 4; 543–546.
6. Diep D.B., Nes I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram-positive bacteria, Curr. Drug Targets, 2002, 3; 107-22.
7. Klaenhammer T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria, Biochimie, 1988, 70; 337-49.
8. Larsen B., Monif G. R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. Clin. Infect. Dis., 2001, 32; 69–77.
9. Lepargneur J.P., Rousseau V. Protective role of the Doderlein flora. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod., 2002, 31; 485–494.
10. Marteau P., Rambaud J. C. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. FEMS Microbiol. Rev., 1993, 12: 207-220.
11. Pashayan M.M., Hovhannisyan H.G. Isolation and characterization of vaginal lactobacilli producing hydrogen peroxide. Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2011, 6; 90-93.
12. Redondo-Lopez V., Cook R. L., Sobel J. D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. Rev. Infect. Dis., 1990, 12; 856–872.
13. Reid G., Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect., 2002, 4; 319–324.
14. Zhou X., Bent S. J., Schneider M. G., Davis C.C., Islam.M. R., Forney L. J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology, 2004, 150; 2565–2573.