

ჩირქოვან-ანთებითი ინფექციების საწინააღმდეგო ნატურალური
ანტიმიკრობულ-ანტიფუნგალური ბიოკომპოზიტის შექმნა

ნათია ქარუმიძე

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
მეცნიერებისა და ხელოვნების ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ
მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების
შესაბამისად.*

ბიოქიმია და ნეირობიოლოგია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი : აივენგო შათირიშვილი, ემერიტუსი
ზემფირა ალავიძე, ბმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2012 წელი

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ნათია ქარუმიძე

21/12/2012

აბსტრაქტი

ბოლო ხანებში შეიმჩნევა იმ დაავადებების ხვედრითი წილის მკვეთრი ზრდა, რომლებიც გამოწვეულია პირობით პათოგენური სოკოებისა და მიკრობების ასოციაციით. ანტიბიოტიკორეზისტენტული მიკროორგანიზმებისა და ასევე ტრადიციული ანტიფუნგალური პრეპარატების მიმართ რეზისტენტული სოკოების (*Candida Albicans*) ზრდისა და ფართოდ გავრცელების გამო შერეული ინფექციების მკურნალობა თანამედროვე მედიცინის მნიშვნელოვან პრობლემად იქცა. ყოველივე ამან აუცილებელი გახადა ქიმიური პრეპარატების ალტერნატიული სამკურნალო საშუალებების ძიება. ბაქტერიოფაგები მოისაზრებიან როგორც მიკროორგანიზმებით გამოწვეული ინფექციური პროცესების საწინააღმდეგო ყველაზე ოპტიმალური და უვნებელი საშუალება, რაც წლების მანძილზე დაგროვილმა გამოცდილებამ დაადასტურა. ბაქტერიოფაგებთან ერთად ქიმიური პრეპარატების ალტერნატივად გამოვიყენეთ ნატურალური ანტიფუნგალური ნივთიერება ვერხვის ექსტრაქტი, რაც საშუალებას გვაძლევს თავიდან ავიცილოთ ალერგიული და სხვა სახის გართულებები. ყოველივე ზემოთქმულიდან ჩვენი კვლევის მიზანი იყო *Pseudomonas aeruginosa* -ს, როგორც ჩირქოვანი ინფექციების ერთ-ერთი ძირითადი გამომწვევისა და *Klebsiella* -ს, როგორც რესპირატორული სისტემის ინფექციების დროს მნიშვნელოვანი პათოგენის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება, დახასიათებული ფაგებისა და ნატურალური ანტიფუნგალური ვერხვის ექსტრაქტის საფუძვლზე ბიოკომპოზიტის შექმნა და მისი აქტივობის განსაზღვრა. კვლევის განხორციელებისათვის თავდაპირველად სხვადასხვა კლინიკებიდან მიღებული შტამებისაგან შევქმენით *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* - ს შტამების კოლექცია. ხოლო გ. ელიავას სახ. ბმე ინსტიტუტის სადიაგნოსტიკო ცენტრიდან მივიღეთ *Candida Albicans* შტამები. მომდევნო ეტაპზე გამოვყავით *Pseudomonas aeruginosa* -ს სპეციფიკური ორი ფაგი, *Klebsiella pneumoniae* -ს სპეციფიკური ხუთი და *Klebsiella oxytoca* - ს საწინააღმდეგო ერთი ფაგი. შევისწავლეთ აღნიშნული ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლები. *Pseudomonas aeruginosa* -ს ორი ფაგიდან vB_Pae-Kakheti25 მიეკუთვნება *Siphoviridae* -ს ოჯახს, vB_Pae-TbilisiM32 კი წარმოადგენს *Podoviridae* ოჯახის წარმომადგენელს.

Klebsiella -ს სპეციფიკური ფაგებიდან კი, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_1* მიეკუთვნება *Siphoviridae* -ს ოჯახს, ხოლო ფაგები *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* წარმოადგენენ *Podoviridae* -ს. შემოწმებული იქნა ყველა აღნიშნული ფაგის ლიზისური მოქმედების დიაპაზონი და აქტივობა. ასევე შევისწავლეთ ფაგის მახასიათებლები, როგორცაა: პატრონ უჯრედზე ადსორბცია, ლატენტური პერიოდი და გამოსავლიანობა, სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის პირობებში. *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ფაგების გენომი მთლიანად დასექვენირდა და გაიშიფრა. *Klebsiella* -ს ფაგების გენეტიკური დახასიათებისათვის გამოვიყენეთ სხვადასხვა რესტრიქციული ფერმენტები. *vB_Klox-2* -ისა და *vB_Klp-5* -ის ფაგების *HincII* და *PstI* -ით დაჭრილი დნმ-ის ფრაგმენტების კლონირება მოვახდინეთ pBluescriptII KS ვექტორში ქიმიური ტრანსფორმაციის გზით. ვექტორში ჩართული *vB_Klp-5* და *vB_Klox-2* კლონების სექვენირებით და შემდგომი ანალიზით დადგინდა, რომ ორივე ფაგი მიეკუთვნება T7 ფაგების მსგავს *Podoviridae* -ს ოჯახს და *Autographivirinae* - ის ქვეოჯახს. *Klebsiella*-სა (*vB_Klox_2*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*) და *P.aeruginosa*-ს (*vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32*) ბაქტერიოფაგების აქტივობა შევისწავლეთ ბიოფილმების მიმართაც და ვნახეთ რომ მნიშვნელოვნად აინჰიბირებდნენ მათ. ვერხვის ექსტრაქტთან ურთიერთქმედების შესწავლისას ვნახეთ, რომ ვერხვის ექსტრაქტი არ იწვევდა ბაქტერიოფაგების ინჰიბირებას და ამასთანავე არ ცვლიდა კოლონიების მორფოლოგიას. საბოლოოდ *Klebsiella*-სა და *P.aeruginosa*-ს ბაქტერიოფაგებისა და ვერხვის ექსტრაქტისაგან შევქმენით მშრალი კომპოზიტი, რომელიც ავლენს მაღალ აქტივობას როგორც ბაქტერიული ისე სოკოვანი ფლორის მიმართ.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: ბაქტერიოფაგი, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Populus nigra*, ფაგოთერაპია

Abstract

The last 20 years is indicated great increasing of mixed infections caused by pathogenic fungi and bacteria. Developing and spreading of antibiotic and antifungal resistant strains became great problem for modern medicine. That's why it was important to seek the new, alternative remedy for treatment of bacterial and fungal infections. The most optimal and harmless way to suppress infectious diseases without any side effects is a – bacteriophage. In combination with bacteriophages instead of chemical antifungal substances will be used natural antifungal *Populus nigra*, that will help to avoid allergic and other complications. The aim of our project was to isolate and study bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa*, as the main cause of furulent infections and phages towards *Klebsiella* as main pathogen of respiratory tract infections, creation of biocomposite of bacteriophages and *Populus nigra* and study activity of biocomposite towards bacterial and fungal flora. For the beginning we created *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* strains collection. Totally were gathered 200 *Pseudomonas aeruginosa* and 50 *Klebsiella* strains. *Candida Albicans* strains were received from the diagnostic center of Eliava institute of Bacteriophages, Mikcorbiologu and Virology. We have isolated two specific phages of *Pseudomonas aeruginosa*: *vB_Pae-Kakheti25* belongs to the family *Siphovirus* and *vB_Pae-TbilisiM32* – to *Podoviridae*. Three phages of *Klebsiella* *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_1* belongs to the family *Siphoviridae* and *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6*, *vB_Klox_2* bacteriophages belongs to *Podoviridae*. Host range, adsorption to the host cells, one step growth curve and thermal and pH stability were studied for all the mentioned phages. Whole genomes of *Pseudomonas* phages *vB_Pae-Kakheti25* and *vB_Pae-TbilisiM32* were sequenced and analyzed. For genetical characterization of *Klebsiella* phages, phage dnas were extracted by standard phenol extraction and used different enzymes for restriction analyses. Shotgun subcloning of *PstI* and *HincII* phage DNA fragments into the high-copy number pBluescript II KS vector was performed. One each randomly selected clone corresponding to the phages *vB_Klp_5* and *vB_Klox_2* was investigated further. Of note, despite the very limited sequence data generated both *vB_Klp_5* and *vB_Klox_2* could be unambiguously assigned to the subfamily *Autographivirinae* of the T7-like Podoviruses. Phage activity was studied against biofilms and the result showed that phages were eradicating and destroying the integrity of biofilms Study interecation of bacteriophages and *Populus nigra*, showed that *Populus nigra* was not changing titer and plaque morphology of bacteriophages. At last was created the dried

composite including *Klebsiella* and *P.aeruginosa* bacteriophages and *Populus nigra*, which shows the high activity towards bacterial and fungal flora.

Key wards: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Populus nigra*, Bacteriophage, Phagetherapy

მადლობა

სადოქტორო ნაშრომის ძირითადი ნაწილი შესრულებულია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის ბაზაზე, ზოგადი მიკრობიოლოგიის ლაბორატორიაში.

მადლიერებას გამოვხატავ შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდისა და საქართველოს სამეცნიერო-ტექნოლოგიური განვითარების ფონდის მიმართ. მათ მიერ დაფინანსებული ინდივიდუალური პროექტების დახმარებით სადოქტორო ნაშრომის ნაწილი შესრულდა ამერიკაში “UT Health Science Center at San Antonio” უნივერსიტეტის ბიოქიმიის დეპარტამენტში ასოც. პროფ. სტეფენ ჰარდისის ხელმძღვანელობით. ხოლო მეორე პროექტი შესრულდა ინგლისში ლესტერის უნივერსიტეტში ინფექციების, ანთებებისა და იმუნოლოგიის დეპარტამენტში, კუმარ რაჯაკუმარის ლაბორატორიაში.

მადლობას ვუხდის ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტსა და სადოქტორო ნაშრომის სამეცნიერო ხელმძღვანელებს თანადგომისა და გაწეული დახმარებისათვის.

სარჩევი

სარჩევი	VIII
ცხრილების ჩამონათვალი	XII
გრაფიკების ჩამონათვალი	XIII
ილუსტრაციების ჩამონათვალი	XIV
აბრევიატურების ჩამონათვალი	XVI
შესავალი	17
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	21
თავი 1. შერეული ინფექციების ზოგადი მიმოხილვა	21
თავი 2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> –ს დახასიათება	22
2.1 ტაქსონომია, მახასიათებლები და გავრცელება	22
2.2 კლინიკური მნიშვნელობა	24
2.3 დიაგნოსტიკა - იდენტიფიკაცია	25
2.4 დაავადების პათოგენეზი	25
2.5 ეპიდემიოლოგია და მკურნალობა	28
თავი 3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> -ს დახასიათება	29
3.1 ტაქსონომია, გავრცელება და კლინიკური მნიშვნელობა	29
3.2 <i>Klebsiella spp</i> იდენტიფიკაცია - ბიოტიპირება, სეროტიპირება	30
3.3 <i>Klebsiella</i> -ს პათოგენობის ფაქტორები: კაფსულარული ანტიგენები, ფიმბრიები, შრატის რეზისტენტობა და ლიპოპოლისაქარიდი.	31
3.4 ეპიდემიოლოგია და მკურნალობა	34
თავი 4. <i>Candida albicans</i> - ის დახასიათება	37
თავი 5. <i>Populus nigra</i>	38
თავი 6. ბაქტერიოფაგები	39
6.1 ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და გავრცელება	39
6.2 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია	40

6.3 ბაქტერიოფაგების ფიზიოლოგია, ბაქტერიული ვირუსების განვითარების სასიცოცხლო ციკლი	41
6.3.1 ვირულენტური ფაგები და ლითიური ციკლი	42
6.3.2 ზომიერი ფაგები და ლიზოგენია	43
6.4 ბაქტერიოფაგების გამოყენება სხვადასხვა დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის	45
მასალები	48
მეთოდოლოგია	50
თავი 1. ბაქტერიული შტამების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები	50
1.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია	50
1.2 პოლიმერულ ჯაჭვური რეაქცია (PCR)	51
1.3 VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემა	51
თავი 2. ბაქტერიოფაგების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები	51
2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა.	51
2.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა Spot test	52
2.3 ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრ	52
2.4 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა	52
2.4.1. მყარ საკვებ არეზე - გრაციას მეთოდი	52
2.4.2. თხიერ საკვებ არეში- აპელმანის მეთოდი	53
2.4 გამრავლების გამრავლება	53
2.5.1 კონცენტრირების მეთოდი	53
2.5.2 გამრავლება თხიერ საკვებ არეში	54
2.6 ელექტრონული მიკროსკოპია	54
2.7 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია	54
2.8 ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	55
2.9 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა	56

2.10	ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა სხვადასხვა გარემო პირობებში ქლოროფორმის თანაობისას, ტემპერატურული ინაქტივაცია და pH - ის გავლენა	57
2.11	ბაქტერიოფაგების მოქმედების შესწავლა ბაქტერიულ ბიოფილმებზე	57
2.12	ბაქტერიოფაგების ანტიბაქტერიული მოქმედების განსაზღვრა <i>Galleria mellonella</i> -ს მოდელზე	58
2.13	პოლიეთილენგლიკოლით (PEG) პრეციპიტაცია	60
2.14	ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა და რესტრიქციული ანალიზი	60
2.15	გენომის ზომის დადგენა (PFGE)	61
2.16	ბაქტერიოფაგების პლაზმიდაში კლონირება და ტრანსფორმაცია	62
2.17	პლაზმიდის სექვენირება	63
2.18	ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი	64
2.19	ბაქტერიოფაგებისა და ვერხვის ექსტრაქტის ურთიერთქმედების შესწავლა	64
2.20	საცდელი ბიოკომპოზიტის მიღება და მისი აქტივობის განსაზღვრა	64
2.21	მოქმედების დიაპაზონი	65
	შედეგები	65
	თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება	65
	1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -ს შტამების იდენტიფიკაცია	65
	1.2 <i>Klebsiella</i> - ს შტამების იდენტიფიკაცია	66
	თავი 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -ს ბაქტერიოფაგების დახასიათება	67
	2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა	67
	2.2 <i>P. aeruginosa</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების vB_Pae-Kakheti25 და vB_Pae-TbilisiM32 ბიოლოგიური დახასიათება	68
	2.3 <i>P. aeruginosa</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების vB_Pae-Kakheti25 და vB_Pae-TbilisiM32 სეროლოგიური დახასიათება	72

2.4	<i>P. aeruginosa</i> - ს ფაგის <i>vB_Pae-Kakheti25</i> ანტიბაქტერიული მოქმედების განსაზღვრა <i>Galleria mellonella</i> -ს მოდელზე	73
2.5	<i>P. aeruginosa</i> - ს ბაქტერიოფაგების <i>vB_Pae-Kakheti25</i> და <i>vB_Pae-TbilisiM32</i> გენეტიკური დახასიათება. ფაგების მთლიანი გენომის სექვენსის ანალიზი	76
თავი 3.	<i>Klebsiella</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება	80
3.1	<i>Klebsiella</i> -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, მორფოლოგიისა და მოქმედების სპექტრის შესწავლა	80
3.2	<i>K. pneumoniae</i> და <i>K. oxytoca</i> სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის განსაზღვრა სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH - ის პირობებში	82
3.3	<i>K. pneumoniae</i> და <i>K. oxytoca</i> სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	84
3.4	<i>K. pneumoniae</i> და <i>K. oxytoca</i> სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათება	88
3.5	<i>vB_Klox-2</i> და <i>vB_Klp-5</i> ბაქტერიოფაგების პლაზმიდაში კლონირება და კლონების ნაწილობრივი სექვენირება	90
თავი 4	<i>Klebsiella</i> და <i>P. aeruginosa</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მოქმედების შესწავლა ბიოფილმებზე	93
თავი 5	<i>Klebsiella</i> და <i>P. aeruginosa</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგებისა და <i>Poppulus nigra</i> -ს ურთიერთქმედების შესწავლა და საცდელი ბიოკომპოზიტის შექმნა	97
	შედეგების ინტერპრეტაცია / დისკუსია	100
	დასკვნები და რეკომენდაციები	108
	გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი/ბიბლიოგრაფია	109

ცხრილების ჩამონათვალი :

<i>ცხრილი 1: კვლევაში გამოყენებული PCR-ის პრაიმერები</i>	50
<i>ცხრილი 2: vB_Pae-Kakheti25 და vB_Pae-TbilisiM32 ბაქტერიოფაგების ნეიტრალიზაციის რეაქცია.</i>	73
<i>ცხრილი 3: vB_Pae-TbilisiM32 მასსპექტროფოტომეტრული ანალიზი</i>	79
<i>ცხრილი 4: Klebsiella -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ტიტრები</i>	80
<i>ცხრილი 5: ბაქტერიოფაგების vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტა</i>	86

გრაფიკების ჩამონათვალი

გრაფიკი 1: vB_Pae-Kakheti25 (ა) და vB_Pae-TbilisiM32 (ბ) ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა და სპექტრი	69
გრაფიკი 2: vB_Pae-Kakheti25 (ა) და vB_Pae-TbilisiM32 (ბ) ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა pH-ი სპირობებში	70
გრაფიკი 3: vB_Pae-Kakheti25 და vB_Pae-TbilisiM32 ბაქტერიოფაგების ადსორბცია	71
გრაფიკი 4: vB_Pae-Kakheti25 (ა) და vB_Pae-TbilisiM32 (ბ) ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	72
გრაფიკი 5: Galleria mellonella-ს ინფექციური მოდელის დროს გადარჩენილი მუხლუხოების რიცხვი PA14 A ჯგუფში (ა) და PA14 B ჯგუფში (ბ)	75
გრაფიკი 6: vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობა და სპექტრი	82
გრაფიკი 7: vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ბაქტერიოფაგების ტემპერატურული ინაქტივაცია	83
გრაფიკი 8: vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ფაგების მგრძობელობა სხვადასხვა pH-ის პირობებში	84
გრაფიკი 9: vB_Klp_1 (ა) და vB_Klp_3 (ბ) ბაქტერიოფაგების ადსორბცია	85
გრაფიკი 10: vB_Klox_2 (ა) და vB_Klp_5 (ბ) ბაქტერიოფაგების ადსორბცია	85
გრაფიკი 11: vB_Klp-3 - ის გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	87
გრაფიკი 12: vB_Klox_2 (ა) და vB_Klp_5 (ბ) ფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი	88
გრაფიკი 13: vB_Klox_2, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5 ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ	94

გრაფიკი 14: <i>vB_Klox_2, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5</i> მოქმედება ბიოფილმებზე 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის დამატებისას	95
გრაფიკი 15: <i>vB_Pae-Kakheti25</i> და <i>vB_Pae-TbilisiM32</i> ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ	96
გრაფიკი 16: <i>vB_Pae-Kakheti25</i> და <i>vB_Pae-TbilisiM32</i> ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ ფაგის დამატებისას	96
გრაფიკი 17: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა <i>P. aeruginosa</i> -ს შტამების მიმართ	99
გრაფიკი 18: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა <i>Klebsiella</i> -ს შტამების მიმართ	99
გრაფიკი 19: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა <i>C. Albicans</i> - ის მიმართ	99

ილუსტრაციების ჩამონათვალი:

ილუსტრაცია 1: კვლევაში გამოყენებული <i>Galleria mellonella</i> –ს სახეობა	60
ილუსტრაცია 2: <i>P. aeruginosa</i> - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგის <i>vB_Pae-Kakheti25</i> (ა) და <i>vB_Pae-TbilisiM32</i> (ბ) ელექტრონული მიკროსკოპია	69
ილუსტრაცია 3: <i>vB_Pae-Kakheti25</i> ფაგის მთლიანი გენომი	77
ილუსტრაცია 4: <i>vB_Klp_1</i> , <i>vB_Klp_3</i> , <i>vB_Klp_4</i> , <i>vB_Klp_5</i> , <i>vB_Klp_6</i> და <i>vB_Klox_2</i> ბაქტერიოფაგის ელექტრონული მიკროსკოპია	81
ილუსტრაცია 5: <i>vB_Klp_4</i> და <i>vB_Klp_5</i> ფაგების რესტრიქციული ანალიზი	89
ილუსტრაცია 6: <i>vB_Klox_2</i> და <i>vB_Klp_3</i> ფაგების რესტრიქციული ანალიზი	89
ილუსტრაცია 7: <i>vB_Klox-2</i> , <i>vB_Klp-4</i> და <i>vB_Klp-5</i> PFGE -ს ანალიზი	90
ილუსტრაცია 8 : ქიმიური ტრანსფორმაციის შედეგად მიღებული თეთრი კოლონიები	90
ილუსტრაცია 9: ვექტორში ჩართული <i>vB_Klp-5</i> და <i>vB_Klox-2</i> კლონების ზომები	91
ილუსტრაცია 10: ეკზონუკლეაზა (ა) და სავარაუდო (hypothetical) (ბ) ცილების მიხედვით აგებული <i>vB_Klox-2</i> - ის ფილოგენეტიკური ხე	92
ილუსტრაცია 11: მშრალი ბიოკომპოზიტი	98

აბრევიატურების ჩამონათვალი:

Spp, გვარში გაერთიანებული სახეობები (Several Species);

bp, ნუკლეოტიდურ ფუძეთა წყვილი (base pair);

OMPs, გარე მემბრანული პროტეინები (Outer Member Proteins);

BHIB/A, გულ-ტვინის ნარევის ბულიონი/აგარი (Brain Heart Infusion Broth/Agar);

ფ.ნაწ/მლ, ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა 1 მილილიტრში

უჯრ/მლ, კოლონიების რაოდენობა (ბაქტერიების შემთხვევაში) 1 მილილიტრში

PCR, პოლიმერაზა ჯაჭვური რეაქცია (Polymerase Chain Reaction);

PFGE, გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (Pulsed field gel electrophoresis).

შესავალი

თანამედროვე მედიცინის მნიშვნელოვან პრობლემად გადაიქცა ჩირქოვანი ინფექციები, ვინაიდან ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული მიკროორგანიზმები ფართოდ არიან გავრცელებული, რაც ართულებს ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობასა და პროფილაქტიკას. ბოლო ოცი წლის განმავლობაში აღინიშნება როგორც გრამ დადებითი *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* და ასევე გრამ უარყოფითი *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*, *Acinetobacter* მიკროორგანიზმებით გამოწვეული ანთებითი დაავადებების მკვეთრი ზრდა. ფართო დიაპაზონის მქონე ანტიბიოტიკების გამოყენებამ მნიშვნელოვანი როლი შეასრულა ინფექციურ დაავადებებთან ბრძოლის საქმეში, თუმცა ამავე დროს ანტიბიოტიკების ხშირი და არამიზანმიმართული გამოყენება იწვევს მთელ რიგ სერიოზულ პრობლემებს (26, 27, 72, 115).

ბოლო ხანებში შეიმჩნევა იმ დაავადებების ხვედრითი წილის მკვეთრი ზრდა, რომლებიც გამოწვეულია პირობით პათოგენური სოკოებისა და მიკრობების ასოციაციით. სოკოებთან ასოცირებული შერეული ინფექციების მკურნალობა დღესდღეობით კლინიკური თერაპიის უდიდეს პრობლემას წარმოადგენს. პირობით პათოგენურ სოკოებს შორის წამყვანი ადგილი უჭირავს *Candida Albicans*. სტატისტიკურად ძალიან მაღალია *C. Albicans* კომბინაცია ბაქტერიულ ფლორასთან და მათ მიერ გამოწვეული გართულებები (109, 134, 155).

კანდიდოზების სიჭარბეს ხელი შეუწყო ისეთი თანამედროვე პრეპარატების გამოყენებამ როგორცაა ანტიბიოტიკები, ციტოსტატიკები, დასალევი კონტრაცეპტივები, ასევე გაზრდილმა რადიოაქტიურობამ და იმუნიტეტის შესუსტებამ. ყოველივე ზევით თქმულიდან აუცილებელი გახდა ალტერნატიული სამკურნალო საშუალებების ძიება, რომელიც თავიდან აგვაცილებდა ანტიბიოტიკების შედეგად განვითარებულ სოკოვან ინფექციებსა და უამრავი ქიმიური ანტიფუნგალური პრეპარატებით გამოწვეულ ალერგიულ და სხვა სახის გართულებებს (81).

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, აუცილებელი გახდა ანტიბიოტიკების ალტერნატიული სამკურნალო საშუალებების ძიება. ბაქტერიოფაგების აღიარება

ალატერნატიულ სამკურნალო და პროფილაქტიკურ საშუალებად წლების მანძილზე დაგროვილმა გამოცდილებამ და ინფორმაციამ განაპირობა. ამიტომ ბაქტერიოფაგები მოისაზრებიან როგორც ოპტიმალურ, ბუნებრივ, უვნებელ და გვერდითი მოვლენების არ მქონე ინფექციური პროცესის საკურნალო-პროფილაქტიკურ საშუალებად. დღესდღეობით ბაქტერიოფაგებით მკურნალობას დაავადებათა ფართო სპექტრი აქვს მოცული. ესენია: ნებისმიერი ლოკალიზაციის ყველა სახის ჩირქოვან - ანთებითი ინფექციები: დერმატოლოგიური, გინეკოლოგიური, სტომატოლოგიური და ა.შ., ტრამვული დაზიანებები, ინფიცირებული ჭრილობები, დამწვრობის შედეგად განვითარებული გართულებები. აგრეთვე აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ბაქტერიოფაგებთან ერთად შერეული ინფექციების დროს, ქიმიური პრეპარატების ნაცვლად ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა ნატურალური ანტიფუნგალური ნივთიერება ვერხვის ექსტრაქტი, რაც საშუალებას მოგვცემს თავიდან ავიცილოთ ალერგიული და სხვა სახის გართულებები.

ჩვენი კვლევის ობიექტებს წარმოადგენენ *Klebsiella* და *Pseudomonas aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები.

Klebsiella წარმოადგენს გრამ უარყოფით მოგრძო ფორმის ჩხირს. *Klebsiella* - ს რეზისტენტული შტამები ხშირად აწარმოებენ ფართო სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზებს, ასეთი შტამებით გამოწვეული ინფექციები კი შემთხვევათა დაახლოებით 15 % -ის ლეტალობის მიზეზია. ასეთ შტამებს გავრცელების სწრაფი უნარი აქვთ და შეიძლება ინფექციური აფეთქებების მიზეზიც გახდეს (112, 160). ალბათ ამიტომ არის, რომ ჰოსპიტალურ ინფექციათა 8 % და ბაქტერიემიათა 14 % ამ მიკრობით არის გამოწვეული. აშშ - ში ჩატარებული კვლევების საფუძველზე *Klebsiella pneumoniae* 8 ყველაზე მნიშვნელოვან პათოგენებს შორისაა მოხვედრილი.

Klebsiella pneumoniae - ით გამოწვეულ დაავადებათა ფართო სპექტრი მოიცავს პნევმონიას, ბაქტერიემიას, თრომბოფლებიტებს, შარდსასქესო ინფექციებს, ქოლევსტიტს, დიარეას, ზედა სასუნთქი გზების ინფექციებს, ჭრილობების ინფექციებს, ოსტეომიელიტსა და მენინგიტს. რესპირატორული სისტემების დამხმარე აღჭურვილობების კონტამინაცია, ურინალური კათეტერების და ანტიბიოტიკების გამოყენება ფაქტორებია რომლებიც ზრდიან *Klebsiella pneumoniae* - ით გამოწვეული ნოსოკომიალური ინფექციების

რიცხვს, რაც დაკავშირებულია ამ მიკრობებით ბიოფილმების წარმოქმნის უნართან (93, 123, 132, 156).

ბიოფილმების წარმოქმნა ხდება პლასტმასის ნაკეთობებზე - კათეტერებსა და ენდოტრაქეულ მილებზე, ასევე ადამიანის ქსოვილებზე. კათეტერებისა და მილების გამოყენება ხშირად ქსოვილების დაზიანების მიზეზია, რაც *Klebsiella pneumoniae* შტამებით მემბრანული ქსოვილების საფუძველზე ბიოფილმების წარმოქმნით არის განპირობებული. აქედან გამომდინარე ბიოფილმების წარმოქმნა ინფექციური პროცესის მნიშვნელოვან საფეხურად შეიძლება ჩაითვალოს (16, 35, 86).

Pseudomonas aeruginosa წარმოადგენს აერობულ, გრამ-უარყოფით პათოგენურ მიკოორგანიზმს. ბუნებაში ფართოდაა გავრცელებული. *Pseudomonas aeruginosa* ლოკალური და სისტემური ჩირქოვანი ინფექციების ძირითადი გამომწვევია. მას ასევე წამყვანი როლი უკავია ნოზოკომიალური დაავადებების, უროლოგიური დაავადებების და სასუნთქი სისტემების ინფექციების ეთიოლოგიაში. *Pseudomonas aeruginosa* ყველაზე ხშირად ავადდებიან იმუნოდეფიციტური და დიაბეტიკური პაციენტები (1, 92).

დღესდღეობით მსოფლიოში პრობლემატური დაავადების კისტოზური ფიბროზის - მუკოვისციდოზის მქონე პაციენტების დაახლოებით 60 % - ში ყურადღებას იქცევს *Pseudomonas aeruginosa* შტამებით კოლონიზაცია. კისტოზური ფიბროზით დაავადებულ პაციენტთა უმეტესობაში ავადმყოფობის გართულებისა და სიკვდილიანობის მატების ძირითადი მიზეზი სწორედ ეს მიკრობია (42).

Pseudomonas aeruginosa-ს სხვადასხვა ტიპის ზედაპირზე ბიოფილმების წარმოქმნის უნარი აქვს, მაგალითად კისტოზური ფიბროზით დაავადებულთა ფილტვების ლორწოვანზე, კათეტერებსა და კონტაქტურ ლინზეებზე. ბიოფილმის წარმოქმნა ეტაპობრივად მიმდინარეობს. ეს პროცესი იწყება თავისუფალი (პლანქტონური) უჯრედების ზედაპირზე ადგეზიით, უჯრედების ერთმანეთთან აგრეგაციითა და პროლიფერაციით. შემდეგ ხდება ეგზოპოლისაქარიდული მატრიქსის წარმოქმნა, მისი ზრდა, მომწიფება და ბოლოს გამოცალკეება. ბიოფილმში ეგზოპოლისაქარიდული მატრიქსი ბაქტერიას იცავს ანტიბიოტიკების, სხვადასხვა ქიმიური სადეზინფექციო საშუალებებისა და ასევე მასპინძელი უჯრედის იმუნური სისტემისაგან. ეგზოპოლისაქარიდული მატრიქსი მეტ

რეზისტენტობას მატებს ბაქტერიას და ამით ზრდის ქრონიკული ინფექციების ტოლერანტობას ანტიბიოტიკების მიმართ (51, 99).

კვლევი მიზანი: ზემოთქმულიდან გამომდინარე ჩვენი კვლევის მიზანია *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* -ს - ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და შესწავლა; დახასიათებული ფაგებისა და ნატურალური ანტიფუნგალური ვერხვის ექსტრაქტის საფუძვლზე ბიოკომპოზიტის შექმნა და მისი აქტივობის განსაზღვრა. ამ მიზნის მისაღწევად კვლევის მოდელად შერჩეულ იქნა: *Pseudomonas aeruginosa*, როგორც ჩირქოვანი ინფექციების ძირითადი გამომწვევი და *Klebsiella pneumoniae* - რესპირაციული სისტემის ინფექციების მნიშვნელოვანი პათოგენი და მათი შესაბამისი ბაქტერიოფაგები.

კვლევის ძირითადი ამოცანებია:

1. საქართველოსა და სხვა ქვეყნების *Pseudomonas aeruginosa* და *Klebsiella* -თი დაინფიცირებული პაციენტებიდან გამოყოფილი შტამების შეგროვება.
2. *Pseudomonas aeruginosa* -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, სელექცია და მათი მორფო-გენეტიკური დახასიათება.
3. *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* -ს საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, სელექცია და მათი მორფო-გენეტიკური დახასიათება.
4. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* -ს ბაქტერიოფაგების და ნატურალური ანტიფუნგალური ვერხვის ექსტრაქტის ურთიერთქმედების შესწავლა და ოპტიმალური თანაფარდობის დადგენა.
5. ბიოკომპოზიტის აქტივობის განსაზღვრა, როგორც ბაქტერიული ასევე სოკოვანი ფლორის მიმართ.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. შერეული ინფექციების ზოგადი მიმოხილვა

დღესდღეობით სხვადასხვა ეთიოლოგიის დაავადებებს შორის კვლავ უდიდეს პრობლემად რჩება პირობით პათოგენური სოკოებით გამოწვეული შერეული ინფექციების მკურნალობა. *C. Albicans* ფლორა ხშირად ურთიერთკავშირშია სხვა მიკროორგანიზმებთან და იმყოფება მიკრობების ასოციაციაში. სოკოები და ბაქტერიები კორელაციაში არიან და მოქმედებენ ერთმანეთზე. ამ დროს ხდება ე.წ. "შერეული" მოქმედება (117).

შერეული ინფექციები ვლინდება სხვადასხვა დაავადებების დროს. კანდიდა ან ცალკეული მიკრობები სისტემური ინფექციების დროს ლეტალობის მთავარ მიზეზს წარმოადგენენ, თუმცა ლეტალობის რისკი კიდევ უფრო იზრდება შერეული ინფექციების დროს. მრავალ სტატიამ აღწერილია *C. Albicans* და *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* და სხვა მიკრობებთან კოინფექცია. მაგალითად ევროპის საავადმყოფოებში აღწერილ კვლევებში, რომელშიც 814 პაციენტის ცალკეული შემთხვევაა განხილული, საავადმყოფოს შიდა და რესპირატორულ დაავადებებში დომინანტ მიკროორგანიზმებად *C. Albicans* და *Pseudomonas aeruginosa* მოიხსენიება შესაბამისი პროცენტული მაჩვენებლებით 28.7 % და 17.1 %. იმავე სტატიის მონაცემებით ენდოტრაქეულ მილებში განვითარებული ბიოფილმიდანაც უმეტესად *C. Albicans* და *Pseudomonas aeruginosa* ვლინდება, რაც კიდევ უფრო ცხადყოფს ამ ორი ორგანიზმის ურთიერთკავშირის მნიშვნელობას გარემოსთვის და ასევე სამედიცინო თვალსაზრისით (12). მომდევნო სტატია მიუთითებს *Candida* სოკოს, სტაფილოკოკური და სტრეპტოკოკური მუტანტების კოლონიზაციაზე პირის ღრუში, ენაზე, ლორწოვანზე, ასევე პროტეზის ზედაპირზე და სხვადასხვა სტომატოლოგიური ინფექციური პროცესების დროს (12). შარდსასქესო ინფექციების დროს კი *E.coli* და *Candida*-ს შერეული მოქმედება აღინიშნება (28).

ხშირად ვხვდებით ბაქტერიებს სოკოსთან ერთად განვითარებულ პოლიმიკრობულ ბიოფილმებში. აღწერილია უამრავი შერეული ბაქტერიულ - ფუნგალური ბიოფილმების განვითარების შემთხვევა (11, 69). ასეთი ტიპის ბიოფილმების მთლიანობის დარღვევა კიდევ უფრო რთულია, რადგან ცალკე მიკრობული თუ სოკოვანი ბიოფილმიც კი რეზისტენტულია ანტიბიოტიკებისა და ანტიმიკოზური პრეპარატების მიმართ, მათი კომბინაცია კი კიდევ უფრო მეტ რეზისტენტობას მატებს მას. პოლიმიკრობულ ბიოფილმებთანაა დაკავშირებული საავადმყოფოებში პლასტმასის დამხმარე ნაკეთობებთან დაკავშირებული გართულებები: რესპირატორული პნევმონია, ჭრილობები, ჩირქოვანი ინფექციები და ა.შ.

ანტიბიოტიკების და ანტიმიკოზური პრეპარატების მიმართ ასეთი გაზრდილი რეზისტენტობის გამო, შერეული ინფექციების მკურნალობისათვის განსაკუთრებული უპირატესობა ენიჭება ალტერნატიულ სამკურნალო საშუალებებს, როგორცაა ბაქტერიოფაგები და ანტიფუნგალური სუბსტანცია *Populus nigra*.

თავი 2. *Pseudomonas aeruginosa* –ს დახასიათება

2.1 ტაქსონომია, მახასიათებლები და გავრცელება

Pseudomonas გვარს ეს სახელწოდება 1894 წელს უწოდა Migula - მ. ამ გვარის წარმომადგენლები მან პიგმენტური მახასიათებლების მიხედვით დაყო ხუთ ძირითად ჯგუფად. მას შემდეგ მრავალი მეცნიერი ცდილობდა ამ ტაქსონომიის სრულყოფას.

1970 წ. ეს გვარი წარმოდგენილი იყო შემდეგი ჯგუფების სახით:

I -rRNA ჰომოლოგიური ჯგუფი gamma Proteobactetria- ს ქვესახეობა, rRNA

II ჰომოლოგიური ჯგუფს მიეკუთვნებოდა Burkholderia -ს სახეობები,

III - Comamonas, Acidovorax და Hydrogenophaga,

IV ჯგუფი - Brevundimonas.

V ჯგუფში შედიოდა *Stenotrophomonas* და *Xanthomonas* წარმომადგენლები.

დღესდღეობით *Pseudomonas* გვარის დაახლოებით 160 სახეობაა ცნობილი, კლინიკური მნიშვნელობით კი მხოლოდ 12 მათგანია აღწერილი, რომლის ერთ - ერთი მნიშვნელოვანი წარმომადგენელია *Pseudomonas aeruginosa* (10).

Pseudomonas aeruginosa წარმოადგენს გრამ უარყოფით, არაფერმენტირებად, აერობულ ჩხირს, რომელიც მიეკუთვნება *Pseudomonadaceae* - ს ოჯახს, *Pseudomonas* - გვარს და ბაქტერიების Gamma Proteobacteria კლასს. თითქმის ყველა შტამი არის მოძრავი, 1.0-1.5 დან 5.0µm ზომის და პოლარულად განლაგებული ერთი შოლტით (120).

Pseudomonas aeruginosa ფართოდაა გავრცელებული. გვხვდება ყველგან: მიწასა და წყალში, მცენარეებსა და ცხოველებში. *Pseudomonas* ბაქტერია გვხვდება ბიოფილმებშიც, სადაც მიმაგრებულია რაიმე ზედაპირზე ან პლანქტონური ფორმითაა და აქტიურად დაცურავს პოლარული შოლტის დახმარებით. *Pseudomonas* ზრდისათვის საჭიროებს მინიმალურ საკვებს. *Pseudomonas aeruginosa* მოიაზრება ასევე ფაკულტატურ ანაერობად, რადგან მარტივად იზრდება ჟანგბადის ნაწილობრივ ან სრულად გამოლევის შემდეგაც. ანაერობულ ზრდას ახორციელებს აზოტით, რომელიც ელექტრონების უნივერსალური აქცეპტორია.

P. aeruginosa ზრდისათვის ოპტიმალურ ტემპერატურაა 37 °C. *Pseudomonas aeruginosa* რეზისტენტულია ტემპერატურისა და სხვა ფიზიკური პირობების მიმართ. უნარი აქვს გაუძლოს 42 °C ტემპერატურას, მარილისა და საღებავების მაღალ კონცენტრაციას და სუსტ ანტიბიოტიკებს.

Pseudomonas aeruginosa წარმოქმნის სხვადასხვა ტიპის კოლონიებს. ხშირად ითესება ლორწოვან - მუკოიდური შტამები. მუკოიდურობა განსაზღვრავს შტამის ვირულენტობას, რაც უფრო ლორწოვანია შტამი, მით უფრო ვირულენტურია ის (43, 85, 118).

Pseudomonas aeruginosa წარმოქმნის წყალში ხსნად ორი ტიპის პიგმენტს: მოყვითალო-მომწვანო ან მოყვითალო-მოყავისფრო პიოვერდინს (ფლუოროესცენს) და ლურჯი ფერის - პიოციანინს. პიოციანინი უხვად წარმოიქმნება დაბალი კონცენტრაციით რკინის შემცველ საკვებ არეში და ფუნქციონირებს ბაქტერიაში რკინის მეტაბოლიზმის პროცესებში. ზოგიერთი შტამი წარმოქმნის ასვე პიორუბინს, რომელსაც აქვს მოწითალო-მოყავისფრო შეფერილობა (50, 102, 114, 116).

2.2 კლინიკური მნიშვნელობა

ეპიდემიოლოგიურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ *Pseudomonas aeruginosa* კლინიკური მედიცინის მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს და აღინიშნება ამ მიკრობის ანტიბიოტიკო რეზისტენტობის ზრდა (38, 135). (36, 37) *Pseudomonas aeruginosa* მნიშვნელოვანი ნოზოკომიალური პათოგენია და იწვევს საშარდე სისტემის, რესპირატორული ტრაქტის, რბილი ქსოვილების, ძვლისა და შემაერთებული ქსოვილის, გასტროინტესტინალურ ინფექციებს, დერმატიტებს, ბაქტერიემიას და უამრავ სისტემურ დაავადებებს. განსაკუთრებით ხშირია იმუნოდეფიციტითა და ალკოჰოლიზმით დაავადებულ ადამიანებში. *Pseudomonas aeruginosa* ასევე სერიოზულ პრობლემას ქმნის კიბოთი, მუკოვისციდოზითა და დამწვრობებით ჰოსპიტალიზებულ პაციენტებში. სწორედ ამიტომ ფატალურ შემთხვევათა რიცხვი ამ ტიპის პაციენტებში 50 % მატულობს. CDC ის მონაცემებით აშშ - ში ინფექციურ შემთხვევათა 0,4 % ამ მიკრობითაა გამოწვეული (20, 106, 149, 163).

Pseudomonas aeruginosa ცნობილია ანტიბიოტიკების მიმართ მაღალი რეზისტენტობით, რის გამოც ის ერთ-ერთი ყველაზე სახიფათო და საშიში საავადმყოფოს შიდა პათოგენია. იგი რეზისტენტულია უამრავი ანტიბიოტიკის მიმართ, რაც გრამ უარყოფითი -გარეთა მემბრანით არის განპირობებული. აღსანიშნავია აგრეთვე, რომ ბიოფილმების ფორმირებისას, სხვადასხვა ზედაპირზე მისი მიმაგრება და კოლონიზაცია ანტიბიოტიკებს შეუღწევადს ქმნის. გარდა ამისა *Pseudomonas aeruginosa* შეიცავს ანტიბიოტიკო რეზისტენტულ პლაზმიდებს. R ფაქტორი და RTF-ს ახორციელებს გენების ჰორიზონტალურ გადატანას ძირითადად ტრანსდუქციისა და კონიუგაციის გზით, რაც გაზრდილი რეზისტენტობის კიდევ ერთი მიზეზია (23, 60, 149).

მხოლოდ რამოდენიმე ანტიბიოტიკია ეფექტური ამ მიკრობის მიმართ, მათ შორის ფლუოროქინოლონები, გენტამიცინი და იმიპენემი, თუმცა ამ ანტიბიოტიკების მიმართაც ბევრი შტამია რეზისტენტული. კისტოზური ფიბროზის შემთხვევაში ანტიბიოტიკორეზისტენტულობა იმდენად მაღალია, რომ ხშირად მისი განკურნება შეუძლებელი ხდება.

2.3 დიაგნოსტიკა - იდენტიფიკაცია

P. aeruginosa გამოწვეული ინფექციების დიაგნოსტიკა ხდება პათოლოგიური მასალიდან გამოყოფილი კულტურის ლაბორატორიული იდენტიფიკაციით. იდენტიფიკაციისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს შტამების მიერ პიგმენტების წარმოქმნის უნარს, რადგან ასეთი ორგანიზმები ულტრაიისფერი სხივებით დასხივებისას ახდენენ ფლუორესცენციას. ეს მეთოდი ეხმარება ადრეულ სტადიაზე კოლონიების იდენტიფიკაციას (74). ყველაზე ხშირად მიმართავენ სელექციურ ნიადაგებზე გათესვას. საკვებ ნიადაგებზე: სისხლიან, მაკკონკის ან ეოზინ-მეთილთიონინ ლურჯ აგარზე გათესვისას იდენტიფიცირებას ახდენენ კოლონიების მორფოლოგიით. წამოიქმნება მუკუოიდური, დაკბილულ კიდეებიანი ან მეტალური ბზინვარების მქონე კოლონიები. იდენტიფიკაციისათვის გამოიყენება ასევე გრამის წესით შეღებვა, ლაქტოზის არაფერმენტირების უნარი, 15% ჟელატინის გაჯირჯება, ოქსიდაზაზე დადებითი რეაქცია, ჟასმინის დამახასიათებელი სურნელის წარმოქმნა და 42 °C ზრდის უნარი (37, 57).

2.4 დაავადების პათოგენეზი

ფსევდომონადური ინფექციების უმეტესობა ინვაზიურიც არის და ტოქსიკურიც. ინფექციის განვითარება შეიძლება სამ სტადიად დაიყოს: 1 ბაქტერიის ადგეზია და კოლონიზაცია, 2, ლოკალური ინვაზია, 3. ინფექციის სისტემური გავრცელება. ინფექციის შეწყვეტა ყველა სტადიაზე შესაძლებელია, თუმცა თითოეულ სტადიაზე კონკრეტული ბაქტერიული ვირულენტობის ფაქტორებია პასუხისმგებელი.

ადჰეზია და კოლონიზაცია. *Pseudomonas* ფიმბრიები ემაგრება ზედა სასუნთქი გზების ეპითელიუმის უჯრედებს. ეპითელიუმის უჯრედზე ადგეზიები უკავშირდება გალაქტოზის, მანოზის ან სიალის მჟავის სპეციფიკურ რეცეპტორებს. სასუნთქი სისტემის ეპითელიუმზე ადგეზიაში ფიმბრიების გარდა მიკრობს ხელს უწყობს ფერმენტი პროტეაზაც, რომელიც ანგრევს ფიბრონექტინს მის ქვეშ მდებარე ეპითელიუმის უჯრედების გამოსავლენად.

ქსოვილის დაზიანებისას, სასუნთქი სისტემის კოლონიზაცია ხდება ტრაქეის ეპითელიუმზე მიკრობის ადგეზიით. ასეთ შემთხვევას ოპორტუნისტული მიმაგრება ეწოდება და მნიშვნელოვანი საფეხურია ფსევდომონადებით გამოწვეულ კერატიტებსა, საშარდე და სასუნთქი სისტემის ინფექციების დროს. ტრაქეულ ეპითელიუმის უჯრედზე *Pseudomonas* საცეცებისათვის არსებული რეცეპტორები სიალის მჟავისაა. მუკოიდურ შტამებს, რომლებიც ეგზოპოლისაქარიდს (ალგინატს) აწარმოებენ აქვთ დამატებითი ალტერნატიული ადგეზინი რომელიც ტრაქეობრონქულ მუცინს ემაგრება (ნ-აცეტილგლუკოზამინი). პილების და მუკოიდური პოლისაქარიდის გარდა, მიკრობის ადჰეზია სასუნთქი სისტემის გლიკოლიპიდებზე შესაძლოა ასევე ეკზოენზიმ - S ით (52, 53).

მუკოიდური ეგზოპოლისაქარიდი წარმოქმნის ჯაჭვურ პოლიმერს, ალგინატს. ალგინატი აწარმოებს ბიოფილმის მატრიქსს და ემაგრება უჯრედებს. წარმოქმნილი მატრიქსით იცავს მიკრობს მასპინძელი უჯრედის ლიმფოციტების, ფაგოციტების, ანტისხეულებისა და კომპლემენტისაგან. ბიოფილმების წარმოქმნილი მუკოიდური შტამები ანტიბიოტიკების მიმართ კიდევ უფრო რეზისტენტულია.

დაავადების პათოგენზის მომდევნო ეტაპია ინვაზია. *Pseudomonas aeruginosa* ქსოვილებში ვრცელდება უჯრედგარე ფერმენტებისა და ტოქსინების წარმოების ხარჯზე, რომლებიც ფიზიკურ ბარიერს ანგრევენ და აზიანებენ უჯრედებს. მნიშვნელოვანია ორი უჯრედგარე პროტეაზა : ელასტაზა და ალკალაინ პროტეაზა (144). ელასტაზას ვირულენტური მოქმედება აიხსნება მისი უნარით დაშალოს კოლაგენი, IgG, IgA და კომპლემენტი. ელასტაზა შლის სასუნთქი სისტემის ეპითელიუმს და იწვევს პულმონალურ სისხლდენებს. ალკალაინ პროტეაზა იწვევს ფიბრინის დაშლას. ელასტაზა და ალკალაინ პროტეაზა ერთად კი იწვევენ ფიბრინის, ელასტინისა და სხვა დამხმარე სტრუქტურული კომპონენტების დაშლას და გამა ინტერფერონის ინაქტივაციას.

ინვაზიურ პროცესებში მნიშვნელოვანია აგრეთვე პროტეინები: ციტოტოქსინი და ჰემოლიზინები. ციტოტოქსინი ახდენს უჯრედში სტრუქტურულ ცვლილებებს, იწვევს არხების ფორმირებას და ამით ხელს უწყობს K^+ , Ca^{2+} , Na^+ და გლუკოზის შემცველობის დარღვევას. ეუკარიოტული უჯრედების ნეიტროფილებზე ციტოტოქსიკური მოქმედების გამო ციტოტოქსინს ლეიკოციდინსაც უწოდებენ.

მიკროორგანიზმები წამოქმდიან ორ ჰემოლიზურ სუბსტანციას: ფოსფოლიპაზასა და ლეციტინაზას. ციტოტოქსინი და ჰემოლიზინები კომბინაციაში ციტოტოქსიკურ მოქმედებას ახდენენ ნეიტროფილებზე, ლიმფოციტებსა და ეუკარიოტულ უჯრედებზე. ჰემოლიზინები კი, თავის მხრივ იწვევენ ფოსფოლიპიდებისა და ლეციტინის ჰიდროლიზს (122). პიოციანინი ვირულენტობის განმსაზღვრელი ერთ-ერთი ფაქტორია. ლურჯი პიგმენტი იწვევს რესპირატორული სისტემის ეპითელიუმის დაშლას და გავლენას ახდენს ფაგოციტების მოქმედებაზე.

”რკინის ხელატი” (siderophore) პიოცელინი წარმოიქმნება რკინის დაბალი კონცენტრაციის შემთხვევაში. პიოცელინი მონაწილეობს ინვაზიურ პროცესებში იმ შემთხვევაში, თუ მოახერხებს მასპინძლის უჯრედიდან რკინის ექსტრაქციას და რკინა-დეფიციტურ გარემოში ბაქტერიის ზრდას (116, 130). ინვაზიურ პროცესების შემდეგ ადგილი აქვს პროლიფერაციას.

პროლიფერაცია ლოკალური ადგილებიდან *Pseudomonas* სისხლში გავრცელება. სავარაუდოდ, იგი დაკავშირებულია იმავე უჯრედგარე და უჯრედთან დაკავშირებული პროდუქტების წარმოებაზე, რომლებიც პასუხისმგებელი არიან ლოკალურ ინფექციებზე.

ფაგოციტოზისა და შრატის ბაქტერიოციდულობის მიმართ *P. aeruginosa* რეზისტენტობა განპირობებულია მუკოიდური კაფსულითა და ლიპოპოლისაქარიდით. პროტეაზები ჭრიან IgG ანტისხეულებს, ინაქტივირებენ კომპლემენტსა და ციტოკინების მოქმედებას.

პროლიფერაციასთან ერთად ინფექციურ პროცესებში მნისვნელოვანი ადგილი უკავია ტოქსიგენებს - მიკრობის მიერ ტოქსინის წარმოქმნის უნარს. *P. aeruginosa* აწარმოებს ორ უჯრედგარე ცილა ტოქსინს ეგზოენზიმ S და ეგზოტოქსინ A -ს. ეგზოენზიმ S - ს აქვს ადგ-ტრანსფერაზული აქტივობა. ბაქტერია აწარმოებს ეგზოენზიმ S - ს დამწვარ ქსოვილში მისი ზრდით. ეგზოენზიმ S შესაძლოა იწვევდეს სისხლში ფაგოციტური უჯრედების დაშლას და შინაგანი ორგანოების ინვაზიური პროცესებისათვის მზადებას. ეგზოტოქსინ A - ს აქვს ზუსტად დიფტერიის ტოქსინის მსგავსი მოქმედება, რაც ვლინდება ზოგადი ტოქსიკურობით, შემუპებით, ნეკროზით, ფილტვების ჰემორაგიული დაზიანებით, ჰეპატოციტების ნეკროზითა და ა. შ (17, 19).

Quorum sensing. *P. aeruginosa* - ს გენების ექსპრესიის რეგულაცია შეუძლია Quorum sensing - ის, ანუ პატარა მოლეკულების ე.წ. ავტონდუქტორების წარმოქმნის საშუალებით, რომლებიც გარემოში სიგნალების გამოცემით ბაქტერიას სწრაფი ადაპტაციის საშუალებას აძლევენ. QS მონაწილეობს ვირულენტობის სხვადასხვა ფაქტორების ექსპრესიის რეგულირებაში, მათ შორს ბიოფილმების წარმოქმნაშიც. *P. aeruginosa* -ს ბიოფილმები ქრონიკული ინფექციების მიზეზი შეიძლება გახდეს. ბიოფილმების წარმოქმნა განსაკუთრებით საშიშია საავადმყოფოს შიდა ინფექციების დროს, როდესაც პაციენტებს პლასტმასის დამხმარე ნაკეთობები უკეთიათ. წარმოქმნილი ბიოფილმი იცავს ბაქტერიას გარემო ფაქტორებისაგან და უფრო მეტ ვირულენტობას მატებს მას. ასეთი ტიპის შტამები კიდევ უფრო რეზისტენტული ხდებიან ანტიბიოტიკების მიმართ (126, 137, 139).

2.5 ეპიდემიოლოგია და მკურნალობა

Pseudomonas aeruginosa ფართოდაა გავრცელებული. აღწერილია რამდენიმე შემთხვევა, როდესაც იგი გამოიყო ჯანმრთელი არაჰოსპიტალიზებული ადამიანის ყელიდანაც. თუმცა საავადმყოფოებში მოიძებნება ამ მიკრობის შემცველი უამრავი რეზერვუარი: დეზინფექტანტები, სასუნთქი სისტემები, საკვები, კანი, შხაპები, იატაკის საწმენდები და ა.შ. ის ასევე პერმანენტულად ვლინდება საავადმყოფოს გარემოში ხილზე, მცენარეებზე, ბოსტნეულზე, სხვადასხვა საშუალებებიდან მნახველებსა და პაციენტებზე გადატანით. ვრცელდება პაციენტიდან პაციენტზე, მედპერსონალის ხელეებზე პირდაპირი კონტაქტისა და ასევე კონტამინირებულ საკვებთან და წყალთან კონტაქტის გზით (98, 149).

P. aeruginosa გავრცელების თავიდან ასაცილებლად, საუკეთესო გზაა ასეპტიკური პირობების დაცვა, საავადმყოფოს აღჭურვილობის სტერილიზაცია და მათი ფრთხილად დასუფთავება, მონიტორინგი რესპირატორებზე, კათეტერებსა და სხვა ინსტრუმენტებზე. დამწვრობითი ჭრილობების თერაპია ანტიბაქტერიული საშუალებებით, როგორცაა ვერცხლის სულფოდიაზინის გამოყენება ჭრილობის ქირურგიულ დამუშავებასთან ერთდ, რაც დამწვრობით პაციენტებში მკვეთრად ამცირებს *P. aeruginosa* სეფსისით განვითარებული შემთხვევების რიცხვს.

P. aeruginosa ბუნებრივადაა რეზისტენტული მრავალი ანტიბიოტიკის მიმართ და არამიზანმიმართულმა მკურნალობამ შესაძლოა რეზისტენტობა უფრო მეტად გაზარდოს. ამიტომ ანტიბიოტიკების ემპირიულ გამოყენებამდე უმჯობესია ანტიბიოტიკო მგრძობელობის შემოწმება და მხოლოდ შემდეგ მკურნალობა შესაბამისი ანტიბიოტიკებით (54, 106). ანტიბიოტიკებს, რომლებიც მოქმედებენ *P. aeruginosa* მიეკუთვნება:

- ამინოგლიკოზიდები (გენტამიცინი, ამიკაცინი, ტობრამიცინი)
- ქინოლონები (ციპროფლოქსაცინი და ლევოფლოქსაცინი)
- ცეფალოსპორინები (ცეფტაზიდინი, ცეფეპიმი, ცეფპრომი)
- ანტიფსევდომონური პენიცილინები: კარბოქსიპენიცილინები და ურეიდოპენიცილინები
- კარბაპენემები (მეროპენემი, იმიპენემი, დორიპენემი)
- პოლიმიქსინი (პოლიმიქსინი B და კოლისტინი)

მიუხედავად ანტიბიოტიკების ამ ფართო რიცხვისა, *P. aeruginosa* - ს მაღალი რეზისტენტობა ახასიათებს, რაც ქრომოსომაში კოდირებული რეზისტენტობის გენებითაა გამოწვეული (მაგ. *mexAB*, *mexXY* და სხვა). შესაძლოა ასევე მოხდეს რეზისტენტობის გენების ჰორიზონტალური გადატანა პლაზმიდების, ტრანსპოზონებისა და ინტეგრონების საშუალებით, რაც ამ პრობლემას კიდევ უფრო ართულებს.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ცხადი ხდება ფაგოთერაპიის როლი *P. aeruginosa* - თი გამოწვეული ინფექციების მკურნალობაში. მნიშვნელოვანია ის ფაქტი, რომ ბაქტერიოფაგები შესაძლოა გამოყენებული იქნეს კომბინაციაში ანტიბიოტიკებთან ერთად.

თავი 3. *Klebsiella pneumoniae* -ს დახასიათება

3.1 ტაქსონომია, გავრცელება და კლინიკური მნიშვნელობა

Klebsiella-ს გვარს ეს სახელწოდება გერმანელი ბაქტერიოლოგის Edwin Klebs-ის (1834–1913) პატივსაცემად ეწოდა. ამ გვარიდან კლინიკური მნიშვნელობით

გამოირჩევა შემდეგი სახეობები: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* და *Klebsiella ornithinolytica*.

Klebsiella pneumoniae გრამ უარყოფითი, უმოძრაო, ფაკულტატური ანაერობია. აქვს ლაქტოზის ფერმენტირებისა და კაფსულის წარმოქმნის უნარი. წარმოადგენს ჩხირისებურ ბაქტერიას, რომელიც გვხვდება პირის, კანის და ნაწლავების ნორმალურ ფლორაში. თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით *Klebsiella pneumoniae* მიეკუთვნება *Enterobacteriaceae* - ს ოჯახს, *Klebsiella* - ს გვარს, *Klebsiella pneumoniae* - სახეობას.

Klebsiella spp ფართოდაა გავრცელებული ბუნებაში. ის ბინადრობს ადამიანისა და ცხოველების ლორწოვან ზედაპირზე, რომლის კოლონიზაციასაც ახდენს (24, 119).

K. pneumoniae იწვევს პნევმონიას, ამ დროს ხდება ადამიანის ფილტვებში დესტრუქციული ცვლილებები. როგორც წესი *K. pneumoniae* - თი გამოწვეული ინფექციები ძირითადად ემართებათ სუსტი იმუნიტეტის მქონე პირებს. უფრო ხშირად ავადდებიან საშუალო და ხანდაზმული ასაკის ადამიანები. ასევე ხშირად ინფიცირდებიან დიაბეტით, ალკოჰოლიზმით, ღვიძლის დაავადებებით, ფილტვების ქრონიკული ობსტრუქციული დაავადებების დროს, გლუკოკორტიკოიდული და ანტიბიოტიკო თერაპიის შემდეგ. ყველაზე ხშირია საავადმყოფოს შიდა ინფექციები (21, 127, 150).

K. pneumoniae ყველაზე ხშირად იწვევს პნევმონიას და ბრონქო პნევმონიას. თუმცა ის არის ასევე საშარდე გზების ინფექციების, თრომბოფლებიტებს, ქოლესისტიტს, დიარეის, ოსტეომიელიტის, მენინგიტის, ბაქტერიემიისა და სეპტიცემიის გამომწვევიც. გაზრდილ რისკ ჯგუფში არიან საავადმყოფოში ჰოსპიტალიზირებული ადამიანები, განსაკუთრებით კი იმ შემთხვევაში, თუ მათ ინვაზიური მოწყობილობებიც აქვთ (76, 125, 157).

3.2 *Klebsiella spp* იდენტიფიკაცია - ბიოტიპირება, სეროტიპირება

შტამების ბიოტიპირება დაფუძნებულია ბიოქიმიური და კულტივირების ტესტების ფართო სპექტრზე. ბიოტიპირება შესაძლოა ჩატარდეს API 20E სისტემით დამატებითი macrotube ტესტებით (185, 217). თუმცა დიდი რაოდენობის რეაქციების

გამო და ხშირად ხანგრძლივი კულტივაციის გამო ბიოტიპირება *Klebsiella* spp -ს შტამების იდენტიფიკაციისათვის არახელსაყრელია (119).

შტამების სეროტიპირება დღესდღეობით ყველაზე ფართოდ გამოიყენება *Klebsiella* spp იდენტიფიკაციისათვის. ძირითადად ის დაფუძნებულია კაფსულარული ანტიგენების ჯგუფებად დაყოფაზე. ჩვეულებრივ *Klebsiella* spp აქვს კარგად განვითარებული პოლისაქარიდული კაფსულა, რაც მის კოლონიებს კლებსიელასათვის დამახასიათებელ ლორწოვნებას აძლევს. ეს მეთოდი დაფუძნებულია სეროლოგიურ ჯვარედინ რეაქციებზე ინდივიდუალური შრატის ადსორბციით ჯვარედინი რეაქციის K ანტიგენით.

Klebsiella - ს გვარის წევრებისათვის ტიპურია უჯრედის ზედაპირზე 2 ტიპის ანტიგენის ექსპრესია: ლიპოპოლისაქარიდული O - ანტიგენი და კაფსულარული K ანტიგენი. ორივე ანტიგენი პათოგენურობას უწყობს ხელს. არსებობს დაახლოებით 77 K და 9 O-ანტიგენი. ამ ანტიგენების სტრუქტურული განსხვავება სხვადასხვა სეროტიპებად კლასიფიკაციას უდევს საფუძვლად (119, 147). იდენტიფიკაციისათვის გამოიყენება აგრეთვე ფაგოტიპირებისა და ბაქტერიოცინით იდენტიფიცირების მეთოდები. ბაქტერიოცინი წარმოადგენს ნივთიერებას, რომელიც განაპირობებს იმავე სახეობის მიკრობის ინჰიბირებას. მიკროორგანიზმი შესაძლოა იდენტიფიცირებული იქნეს მის მიერ ინდიკატორი შტამის ინჰიბირების სტაბილურობით ან ბაქტერიოცინის მიმართ მისი მგრძობელობით, რომელიც სინთეზირებულია ამა თუ იმ შტამის მიერ (9, 33, 119).

3.3 *Klebsiella* -ს პათოგენობის ფაქტორები: კაფსულარული ანტიგენები, ფიმბრიები, შრატის რეზისტენტობა და ლიპოპოლისაქარიდი.

Klebsiella როგორც უკვე აღვნიშნეთ წარმოქმნის კაფსულას, რომელიც შედგება მჟავასა და პოლისაქარიდის კომპლექსისაგან - 4 დან 6 მდე შაქრის მოლეკულისა და ძალიან ხშირად ურონის მჟავისაგან (როგორც უარყოფითად დამუხტული კომპონენტები). ამ მხრივ ისინი კლასიფიცირდებიან 77 სეროტიპად. კაფსულა არის *Klebsiella* -ს ვირულენტობის საფუძველი. კაფსულა იცავს ბაქტერიას ფაგოციტოზისაგან. ანტიფაგოციტური აქტივობის გარდა კაფსულის პოლისაქარიდი მაკროფაგების დიფერენციაციასა და ფუნქციონირების უნარის ინჰიბირებას ახდენს. მიკრობს

ვირულენტობის ხარისხი ენიჭება კონკრეტული K ანტიგენით, რომელიც დაკავშირებული უნდა იყოს კაფსულის პოლისაქარიდის შემადგენლობაში მყოფ მანოზასთან. სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა, რომ K2 სეროტიპი ყველაზე ხშირად აღმოჩენილია შარდსასქესო ინფექციებით, პნევმონიებითა და ბაქტერიემიით დაავადებულ პაციენტებში (104, 119).

ინფექციური პროცესის პირველი და ყველაზე კრიტიკული საფეხურია ამა თუ იმ ზედაპირზე ბაქტერიის ადგეზია. *Enterobacteriaceae* - ის ოჯახში ამ პროცესში ძირითად ფუნქციას ასრულებენ სხვადასხვა ტიპის ფიმბრიები. ფიმბრიები წარმოადგენენ 10 მმ სიგრძის ძაფისებრ გამონაზარდებს უჯრედის ზედაპირზე. ისინი შედგებიან მომრგვალო ფორმის პროტეინული სუბერთეულების პოლიმერისაგან. ფიმბრიების დაყოფა ხდება მათი უნარით მოახდინონ სხვადასხვა სახეობის ცხოველების ერთროციტების აგლუტინაცია. თუკი რეაქცია ინჰიბირდება დ-მანოზით, ადგეზივებს მიაკუთვნებენ მანოზ-სენსიტიურ ან მანოზ-რეზისტენტულ ჰემაგლუტინინებს (119).

Enterobacteriaceae- ში განასხვავებენ ორი ტიპის ფიმბრიას. ყველაზე კარგად შესწავლილია პირველი ტიპის ფიმბრიები. ისინი წარმოადგენენ მანოზ-სენსიტიურ ჰემაგლუტინინებს და ახდენენ ზღვის გოჭების ერთროციტების აგლუტინაციას. ადჰეზიის პროტეინით მიმაგრება ხდება მასპინძლის გლიკოპროტეინის მანოზის შემცველ ტრისაქარიდთან. ფიქრობენ, რომ ფიმბრიის ეს ტიპი ზრდის ბაქტერიის ვირულენტობას მისი უროლოგიური, რესპირატორული და ნაწლავების ლორწოვან ან ეპითელიუმის ზედაპირზე მიმაგრებით. *K. pneumoniae* -ს როლი შარდსასქესო ინფექციების პათოგენეზის დროს შესწავლილია ცხოველურ მოდელზე. ასევე შესაძლოა, რომ ფიმბრიის ეს ტიპი პიელონეფრიტის პათოგენეზშიც მონაწილეობდეს. სასუნთქი მილის უჯრედებზე ბაქტერიის ადჰეზია ხშირად იწვევს ამ პათოგენის ზედა სასუნთქ გზებში კოლონიზაციასა და პროფილერაციას, რასაც მივყავართ პნევმონიის განვითარებამდე. ლორწოვანის მემბრანაზე ადჰეზიის შემდეგ ხდება მიკრობის ინვაზია ქსოვილებში მისი თანხმლები პროცესებისა და ინფექციის განვითარებით (119, 131, 140).

დანარჩენი ფიმბრიებისაგან განსხვავებით მე - 3 ტიპის ფიმბრია იწვევს მხოლოდ ტანინით დამუშავებული ერითროციტების აგლუტინაციას. მას მანოზ - რეზისტენტულ, *Klebsiella* -ს მსგავს ჰემაგლუტინინსაც (MR/K-HA) უწოდებენ. *K.*

pneumoniae -ს შტამების მიერ ექსპრესირებული მე - 3 ტიპის ფიმბრიები ემაგრებიან ენდოთელიუმის უჯრედებს. ტანინის მქავით დამუშავებულ ერთროციტებზე მიმაგრება ინჰიბირდება სპერმიდინით - პოლიამინით, რომელიც სეკრეტირდება შარდში. ამიტომ, დაზიანებული ერთროციტების ზედაპირზე სპერმიდინის გამოსვლა ხსნის სპერმიდინის შუამავლობას MR/K ჰემაგლუტინაციაში. ეს ხსნის იმას, რომ მე - 3 ტიპის ფიმბრიები ემაგრებიან ტანინის მქავით- ან გაცხელებით დამუშავებულ ერთროციტებს, მაგრამ არა დაუმუშავებელ ერთროციტებს.

სტატიებში მე - 3 ტიპის ფიმბრიის როლი ბიოფილმების ფორმირებაშიც არის აღწერილი. განსაკუთრებით დიდ როლს თამაშობს იგი კათეტერებსა და სხვა სამედიცინო პლასტმასის ნაკეთობებით გართულებული საშარდე და სხვა სისტემების ინფექციების დროს, რაც მე - 3 ტიპის ფიმბრიის მქონე *K. pneumoniae* -ს შტამების კოლონიზაციათა და ბიოფილმების წარმოქმნით არის გაპირობებული. მე - 3 ტიპის ფიმბრია ასევე მონაწილეობს სხვადასხვა ტიპის ადჰეზიის ფუნქციებში, მაგალითად, რესპირატორული და საშარდე სისტემების ეპითელიუმის უჯრედებზე და მატრიქს გარე პროტეინებზე (მაგ. კოლაგენ V) ადჰეზიაში.

დახასიათებულია ადგენილების ახალი ტიპიც: *K. pneumoniae* -ს R- პლაზმიდ - მაკოდირებელი CF29K ადჰეზინი, მონაწილეობს ადამიანის ნაწლავების უჯრედებზე მიმაგრებაში (64, 119, 140).

დღესდღეობით ბაქტერიული შრატის რეზისტენტობის ზუსტი მექანიზმი უცნობია. კლებსიელას შემთხვევაში არსებობს ჰიპოთეზა, რომ კაფსულის პოლისაქარიდებს შეუძლიათ ერთი მხრივ დაფარონ და შენიღბონ მის ქვეშ მდებარე ლოპოპოლისაქარიდული შრე და ჰქონდეთ ისეთი სტრუქტურული ზედაპირი, რომელიც არ ააქტიურებს კომპლიმენტს. მეორე მხრივ, კი ლიპოპოლისაქარიდის O მხარის არხებს შეუძლიათ შეაღწიონ კაფსულის შრეში. რადგანაც ლიპოპოლისაქარიდს უნარი აქვს გააქტიუროს კომპლიმენტი, ჩვეულებრივ C3b დეპონირდება ლოპოპოლისაქარიდის მოლეკულებზე. დეპონირებული C3b-ის რაოდენობა განსაზღვრავს ასევე შრატის რეზისტენტობის ხარისხს.

უნდა აღინიშნოს, რომ O ანტიგენებს შორის O1 ანტიგენი ყველაზე ხშირია *Klebsiella* -ს კლინიკურ შტამებში. დღეისათვის ცნობილია O ანტიგენის 8 სეროტიპი. შრატის რეზისტენტობა არ არის სტაბილური მახასიათებელი. გარემო ფაქტორები

გავლენას ახდენენ ლიპოპოლისაქარიდის შემადგენლობასა და მის ეფექტურობაზე (119, 148).

ბაქტერიის ზრდა მასპინძლის ქსოვილში შეზღუდულია არა მარტო მასპინძლის დაცვითი მექანიზმით არამედ რკინის სათანადო მარაგითაც. ბაქტერიის ზრდისათვის მნიშვნელოვანი ფაქტორია რკინა, რომელიც ასრულებს კატალიზატორის ფუნქციას პროტეინებში ქანგბადისა და ელექტრონების ტრანსპორტირების პროცესებში. თავისუფალი რკინით მომარაგების შესაძლებლობა, რომელიც ხელმისაწვდომია ბაქტერიისათვის მასპინძლის გარემოში, ძალიან დაბალია, რადგანაც ამ ელემენტის უჯრედის შიგნით პროტეინებს ემაგრება, მაგალითად, როგორც ჰემოგლობინი, ფერირინი, ჰომოსიდერიინი და მიოგლობინი, ხოლო უჯრედგარეთ მიმაგრება ხდება მაღალი აფინურობის მქონე პროტეინებზე მაგალითად, როგორიცააა ლაქტოფერინი და ტრანსფერინი. მასპინძლის ორგანიზმში რკინის მარაგის მონაწილეობა ინფექციის პათოგენეზში აღწერილია *Klebsiella* - ს მაგალითზე. ზღვის გოჭებში რკინის პარენტერალურად მიღების შემდეგ *K. pneumoniae* -თი გამოწვეული ინფექციების მიმართ მგრძობელობა საგრძობლად გაიზარდა (73).

მრავალი ბაქტერია რკინის მარაგის დაცვას ცდილობს მაღალი აფინურობის გამოიმუშავებით, დაბალი მოლეკულური წონის რკინის ხელატების ე. წ. "რკინის მატარებლებით", რომელთაც კონკურენტუნარიანი მასპინძლის პროტეინებთან რკინის შებოჭვის უნარი აქვთ. რკინის უკმარისობის შემთხვევაში მაგ. მასპინძლის გარემოში, *Enterobacteriaceae* - ს წარმომადგენლები ასინთეზირებენ სხვადასხვაგვარ "რკინის ხელატებს", რომლებიც მიეკუთვნებიან სხვადასხვა ქიმიურ ჯგუფს, პირველი შედგება ფენოლური ტიპისაგან, მორე კი - ჰიდროქსამატ - siderophores - გან. უფრო ხშირია ფენოლური ტიპი, რომლის საუკეთესო სახეობაა ენტერობაქტინი იგივე ენტეროხელინი (13, 94). *Klebsiella* სახეობები გამოიმუშავებენ აგრეთვე ციტოტოქსინს, ენტეროტოქსინს და ჰემოლიზინს (119).

3.4 ეპიდემიოლოგია და მკურნალობა

საავადმყოფოში *K. pneumoniae* - თი კოლონიზაცია იქ ყოფნის ხანგრძლივობასთან ერთად პირდაპირპროპორციულად იზრდება. მედპერსონალში

გაზრდილია *K. pneumoniae* მატარებლობის შემთხვევები. *K. pneumoniae* მატარებლობის შესახებ გამოქვეყნებული ანგარიშით ეს მიკრობი ეთესებოდა ჰოსპიტალიზირებულ პაციენტების 77 % - ის განავალში, 19 % - ის ცხვირახახაში და 42 % - ის პაციენტის ხელებზე იქნა აღმოჩენილი. როგორც აღმოჩნდა *K. pneumoniae* - თი კოლონიზაციის მაღალი პროცენტი უფრო მეტად გამოწვეულია ანტიბიოტიკების გამოყენებით, ვიდრე იმ ფაქტორებით, რომლებიც საავადმყოფოში მის გავრცელებას განაპირობებენ. ერთ-ერთ კვლევაში აღწერილი იყო, რომ საავადმყოფოში პაციენტების მიღებიდან 2 კვირის შემდეგ გაიზარდა *K. pneumoniae* შტამებით კოლონიზაცია იმ პაციენტებში, რომლებიც რამდენიმე ან ფართო ჯგუფის ანტიბიოტიკებს ღებულობდნენ. გარდა ამისა, აღსანიშნავია, რომ ანტიბიოტიკოთერაპია ძალიან ხშირად გამხდარა რეზისტენტული ფორმების გამრავლების მიზეზი საავადმყოფოში. ამიტომ აუცილებელია ანტიბიოტიკების გამოყენების მკაცრი კონტროლი, რათა თავიდან იქნეს აცილებული მისი არამიზნობრივი და გადამეტებული გამოყენება.

K. pneumoniae -ს გამრავლებისათვის რეზერვუარია პაციენტის გასტროინტესტინალური ტრაქტი და საავადმყოფოს პერსონალის ხელები. ამ მიკრობის სწრაფად გავრცელების უნარს ხშირად მივყავართ ნოზოკომიალურ აფეთქებამდე, განსაკუთრებით კი ახალშობილთა განყოფილებებში. 1983-1991 წლებში ლიტერატურაში აღწერილი იყო 145 შემთხვევა ეპიდემიური ნოზოკომიალური ინფექციებისა ინგლისში, მათგან 13 შემთხვევა განპირობებული იყო *K. pneumoniae* - თი. დაავადებათა კონტროლის ცენტრების სტატისტიკური მონაცემებით *Klebsiella* spp სახელდებოდა ენდემური ჰოსპიტალური ინფექციების 8 % - ისა და ეპიდემიური აფეთქებების 3 % - ის მიზეზად. განსაკუთრებით შიშისმომგვრელია მულტირეზისტენტული შტამებით გამოწვეული ჰოსპიტალური ინფექციების ეპიდემია. 1970 - იან წლებში განსაკუთრებით ხშირი იყო ამინოგლიკოზიდებისადმი რეზისტენტული შტამები. 1982 წლიდან კი გავრცელდა ფართო-სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების მწარმოებელი შტამები. ამერიკაში ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების მწარმოებელი *Klebsiella* -ს შტამები ეროვნული ნოზოკომიალური ინფექციების 5 % ის გამომწვევი იყო. ევროპაში კი, კერძოდ, საფრანგეთსა და ინგლისში, მსგავსი შემთხვევების მაჩვენებელი კიდევ უფრო მაღალია (71, 113, 119).

ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზები ჩვეულებრივ პლაზმიდებს შეიცავენ. პლაზმიდები ადვილად გადაიტანებიან ერთი შტამიდან მეორეზე, შედეგად კი შეიძლება მოხდეს რეზისტენტული გენების აკუმულაცია ერთ შტამზე, რომელიც მულტირეზისტენტული პლაზმიდის შემცველია. ამ მიზეზის გამო ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების მწარმოებელი შტამები რეზისტენტულია უამრავი ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ.

ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების წარმოება ხშირად დაკავშირებულია ანტიბიოტიკებისადმი მულტირეზისტენტულობით, თუმცა ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების მწარმოებელი *Klebsiella* - ს შტამები მგრძობიარე აღმოჩნდნენ კარბაპენემების - იმიპენემისა და მეროპენემის მიმართ. ორივე პრეპარატი არჩევითია *Klebsiella* -ს ასეთი შტამებით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ. თუმცა ამ მხრივაც ძალიან შემაშფოთებელი იყო ის ფაქტი, რომ ფართო სპექტრის ბეტა ლაქტამაზების მწარმოებელი *K. pneumonia* -ს შტამებმა რეზისტენტობა იმიპენემის მიმართაც გამოამჟღავნეს (124, 136, 159, 161).

ეპიდემიოლოგიური სტანდარტების მკაცრი დაცვა საშარდე კათეტერების, ინტრავენური ტრაქეოსტომების და ჭრილობების მართვაში, შენახვა და გაფრთხილება სხადასხვა სამედიცინო აღჭურვილობის და ასევე ხელების ხშირი დაბანა დაგვეხმარება *K. pneumoniae* - თი განპირობებული ნოზოკომიალური ინფექციების პრევენციაში. მეორე გზა ამ ინფექციების თავიდან ასაცილებლად საავადმყოფოებში ანტიბიოტიკების გამოყენების კონტროლი და რეგულაციაა.

ისევე, როგორც ყველა ბაქტერიული ინფექციის შემთხვევაში, რეკომენდებული მკურნალობა შეიცვალა ანტიბიოტიკორეზისტენტული ორგანიზმების განვითარების გამო. განსაკუთრებით ხშირია რეზისტენტობა ამინოგლიკოზიდების, ტეტრაციკლინების, ქლორამ-ფენიკოლის და სულფამეტაქსაზოლ-ტრიმეტოპრიმის მიმართ. ანტიმიკრობული მკურნალობის არჩევანი დამოკიდებულია ინფექციის კონკრეტულ შემთხვევაზე და ორგანიზმის უბანზე, რომელიც ინფიცირებულია. თუკი მიკრობი არ ავლენს რეზისტენტობას, მაშინ შესაძლოა გამოყენებულ იქნეს სხვადასხვა ჯგუფის ანტიბიოტიკები, როგორცაა ამპიცილინი, ტეტრაციკლინი, ცეფტაზიდიმი, ცეფეპემი, ნორფლოქსაცინი, მეროპენემი და სხვა. თუმცა ალტერნატიულ სამკურნალო საშუალებად კვლავ რჩება ბაქტერიოფაგებით მკურნალობა (119, 124).

თავი 4. *Candida albicans* - ის დახასიათება

უკანასკნელ წლებში შეიმჩნევა იმ დაავადებების ხვედრითი წილის მკვეთრი ზრდა, რომლებიც გამოწვეულია პირობით პათოგენური სოკოებით. მათ შორის წამყვანი ადგილი კანდიდოზებს უჭირავთ.

კანდიდა სოკო მოიცავს დაახლოებით 150 - მდე სახეობას, თუმცა ადამიანის ინფექციების გამომწვევი მხოლოდ რამოდენიმე მათგანია, მათ შორის ყველაზე მნიშვნელოვანი პათოგენი კი არის *Candida albicans*. ეს სახეობა პირველად აღწერა ბოტანიკოსმა ქრისტინ მარი ბერხუმმა 1923 წელს. კანდიდა არის დიპლოიდური საფუარი სოკო, რომელსაც შეუძლია ჰიფებისა და ფსევდოჰიფების წარმოქმნა. კანდიდა სიმბიოზურად იმყოფება პირის ღრუსა და კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის ნაწლავურ ფლორაში. კანდიდა ცხოვრობს ადამიანების 80%-ში, თუმცა გარეგნულად არ მჟღავნდება.

კანდიდოზებს ხშირად საფუარ ინფექციებსაც უწოდებენ და მისი გამომწვევი ყველაზე ხშირად არის *Candida albicans* (34, 44, 108). კანდიდათი გამოწვეული კანისა და ლორწოვანის ზედაპირული ინფექციები ვლინდება ადგილობრივი ანთებითი პროცესებით. კანდიდათი გამოწვეული ადგილობრივი და სისტემური დაავადებების ფართო გავრცელება ხშირად განპირობებულია მასპინძლის იმუნური სტატუსით. მექსიკაში ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ორალური კანდიდოზით დაავადებულ პაციენტთა 40-60% ეთესებოდა *Candida albicans*, ხოლო პაციენტთა უმეტესობა იმუნოდეფიციტური ვირუსით იყო დაავადებული (22, 56, 62, 128). სისტემური ინფექციებით დაავადებული ადამიანების სისხლის კულტურიდან გამოყოფილი კანდიდას სახეობა დღესდღეობით მეოთხე ადგილზე მყოფი ყველაზე ხშირი პათოგენია (14, 162). კანდიდოზი ჩვეულებრივ კანისა და ლორწოვანი გარსების ძალიან ლოკალური ინფექციებია. მათ შორისაა პირის ღრუ, ყელი, საყლაპავი, ნაწლავები, შარდის ბუშტი, ვაგინა. ვაგინალური ინფექციების გამომწვევი ხშირ შემთხვევაში სწორედ სოკო კანდიდაა (15, 80, 103, 121, 166).

Candida სოკო ძირითადად არსებობს მიკრობებთან ასოციაციაში (53,3%), უფრო ნაკლებად მონოკულტურაში (46+3 %). *Candida* –ს ფლორა მიკრობებთან ასოციაციაში

უფრო რეზისტენტულია ანტიმიკოზური პრეპარატების მიმართ, ვიდრე მონოკულტურაში (25, 61, 110). ტრადიციული ანტიმიკოზური პრეპარატები კარგავენ მაღალ ეფექტურობას, რაც გამოწვეულია მიკრობებში რეზისტენტული შტამების თანამიმდევრული სელექციურობით და ძველი პრეპარატების მიმართ პოლირეზისტენტული მიკროფლორის დომინირებით (100, 165).

კანდიდა სოკოები ამჟღავნებენ მაღალ მგრძობელობას ისეთი წამლების მიმართ, როგორცაა: ლამიზილი, მაკმირორი, ლევორინი, კალიუმის მარილი, ათრიკანი 250, ლიფლუკანი, ამფოტერინი, ამფოგლუკანი, ნიზორალი და ნისტატინი. ანტიმიკოზური პრეპარატების დიდი არსენალის მიუხედავად არ ხერხდება სრული სანაციის მიღწევა. ამასთანავე ტრადიციული ანტიმიკოზური საშუალებები კარგავენ მაღალ ეფექტურობას, რაც გამოწვეულია რეზისტენტული ფორმების სელექციით და არსებული პრეპარატების მიმართ პოლირეზისტენტული მიკროფლორის დომინირებით. აღნიშნულიდან გამომდინარე, აუცილებელია მოიძებნოს ალტერნატიული საშუალებები და ჩატარდეს პრევენციული ზომები რეზისტენტული მიკროორგანიზმებისა და სოკოს წინააღმდეგ (8, 59, 129).

თავი 5. *Populus nigra*

Populus nigra მიეკუთვნება *Populus*-ის სახეობასა და *Salicaceae*-ს ოჯახს. იგი ტირიფისებრთა ოჯახის ფოთოლმცვენი, ორსახლიანი ხეა. გავრცელებულია ევროპაში, კავკასიასა და ცენტრალურ აზიაში. იზრდება 40 მ სიმაღლემდე, მდინარის, ტყისა და გზის პირებზე. ყვავის მარტ-აპრილში, აქვს გლუვი სამკუთხედი ფორმის ფოთლები.

Populus nigra -ს საფოთლე კვირტები შეიცავს უამრავ ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებას. მათ მიეკუთვნება ფლავონოიდები, C ვიტამინი, კაროტინი, ტოკოფეროლი, გლიკოზიდები: სალიცინი და პოპულინი (47, 65, 75).

Populus nigra-ს საფოთლე კვირტებისაგან მიღებული სამკურნალო საშუალებები ხასიათდება ბიოლოგიური მოქმედების ფართო სპექტრით. ამ მცენარისაგან მიღებული პრეპარატები უძველესი დროიდან გამოიყენება როგორც

ანტიმიკრობული, ანთებისსაწინააღმდეგო და ანტიოქსიდანტური მოქმედების საშუალებები. დღესდღეობით მრავალ სტატიაშია აღწერილი (47, 48) თუმცა დღესდღეობით აღმოჩენილია *Populus nigra* -ს ანტიფუნგალური მოქმედება(79). (111) ვერხვის ექსტრაქტის ანტიფუნგალური აქტივობა შესწავლილი იქნა კვებეკის უნივერსიტეტში.

თავი 6. ბაქტერიოფაგები

6.1 ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა და გავრცელება

ბაქტერიოფაგები - ბაქტერიული ვირუსები ფართოდ არის გავრცელებული მთელ სამყაროში. ისინი გვხვდებიან ოკეანეებში, ნიადაგში, ზღვის სიღრმეებში, სასმელ წყლებში, საკვებში, ადამიანის, ცხოველების სხეულის და მცენარეების ზედაპირზე. ისინი მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ეკოსისტემაში მიკრობული ბალანსის რეგულაციაში (58, 146). (116, 117) ბაქტერიოფაგები გამოირჩევიან მდგრადობით სხვადასხვა ფიზიკო - ქიმიური ზემოქმედების მიმართ, უძლებენ მაღალ ტემპერატურას (50-60 °C), იტანენ გამოშრობას, გაყინვას და დიდი ხნის განმავლობაში ინარჩუნებენ სტაბილურობას დაბალ ტემპერატურაზე. თუმცა ულტრაიისფერი სხივებითა და მაიონიზირებელი რადიაციით ხდება მათი ინაქტივაცია (6, 67). (120, 122)

ბაქტერიოფაგები პირველად 1898წ. რუსი ბაქტერიოლოგის ნიკოლაი გამალეას მიერ იქნა აღწერილი, რომელმაც შეამჩნია, რომ ციმბირის წყლულის გამომწვევი ბაცილების ფილტრატი იწვევდა ამ მიკროორგანიზმების კულტურის ლიზის. მოგვიანებით კი, 1915 და 1917 წლებში, *Frederick Twort* და *Felix d'Herelle* - მათ ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად მოახდინეს ამ ვირუსების იდენტიფიცირება ბაქტერია მშთანთქმელებად - ბაქტერიოფაგებად (46, 90). (118, 119) 1917 წელს გ. ელიავამ აღწერა ბაქტერიოფაგის ფენომენი. მას შემდეგ კი უამრავი მეცნიერი განაგრძობდა და დღემდე განაგრძობს ბაქტერიოფაგების კვლევასა და მუშაობას. მათ

რიცხვს მიკუთვნება *Mark Adams* (Adams, 1959), *Max Delbruck*, *Alfred Hershey* (1971წ), *Gunther Stent*, *Karam, J.D.*(1994წ.) და სხვები.

6.2 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

დროთა განმავლობაში უფრო და უფრო მეტი ბაქტერიოფაგის აღმოჩენის გამო აუცილებელი იყო მათი სისტემატიზაცია და კლასიფიკაცია. 1943 წელს პირველად ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით Ruska -მ მოახდინა ვირუსების კლასიფიკაცია და ბაქტერიოფაგების დაყოფა სამ მორფოლოგიურ ტიპად.

1948 წელს კი Holmes -მა ვირუსების ჯგუფის ქვეშ გააერთიანა 46 სახეობა. მან ყველა ჯგუფს მიაწოდა ლათინური ან ბერძნული სახელი, დააჯგუფა ისინი კოლონიებისა და ნაწილაკების ზომის, ბაქტერიოფაგის მოქმედების სპექტრისა და სხვა მახასიათებლების მიხედვით, თუმცა ეს სქემა სამეცნიერო კომიტეტისათვის მიუღებელი აღმოჩნდა.

Lwoff, Horne და Tournier - ის მიერ 1962 წელს შემოთავაზებული კლასიფიკაცია დაფუძნებული იყო ვირუსული ნუკლეის მჟავის ბუნებაზე (DNA თუ RNA-მ შემცველი), კაფსიდის ფორმის, კაფსომერების რაოდენობასა და სხვა მახასიათებლებზე. შემდგომ იყო Bradley-ის (1967წ) მიერ მოწოდებული ნუკლეინის მჟავის ტიპსა და მორფოლოგიაზე დამყარებული კლასიფიკაცია, რომლის მიხედვითაც მან ბაქტერიოფაგები 6 ძირითად ჯგუფად დაყო. 1968 წელს Tikhonenko - მ თითქმის ასეთივე სქემა წარმოადგინა. Bradley-ის სქემა მოგვიანებით უფრო გაფართოვდა და შეიცავდა ახლად აღმოჩენილ სხვადასხვა კუბურ, ფილამენტურ და პლეომორფულ ფაგებს (Ackermann and Eisenstark, 1974) (4, 5, 67).

თანამედროვე კლასიფიკაციით (ICTV -ის რეკომენდაციით) მორფოლოგიისა და ნუკლეინის მჟავის ტიპის მიხედვით ბაქტერიოფაგები გაერთიანებულია 13 ოჯახად და 31 გვარად.

დღესდღეობით კუდიანი ფაგები წარმოადგენს ყველაზე მრავალრიცხოვან და ფართოდ გავრცელებულ ჯგუფს, რომლებიც მორფოლოგიური, ფიზიკოქიმიური და ფიზიოლოგიური მახასიათებლებით ემსგავსებიან ერთმანეთს, ამიტომ ისინი

გაერთიანებული არიან ცალკე რიგად *Caudovirales*. ამ რიგში შემავალი ფაგები კი კუდის სტრუქტურის მიხედვით იყოფა სამ დიდ ჯგუფად:

Myoviridae - წარმოადგენენ ფაგებს კუმშვადი კუდით, რომელიც შედგება ცენტრალური ღერძისაგან და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისაგან. (ამ ოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების დაახლოებით 25 %). ტიპური წარმომადგენელია T4 ფაგი.

Siphoviridae ფაგები გრძელი კუდით, რომლის შალითსაც არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. (გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების დაახლოებით 61 %). ტიპური წარმომადგენლები არიან T5 და λ ფაგები.

Podoviridae ფაგები მოკლე კუდებით, რომლთაც ასევე არ აქვთ შეკუმშვის უნარი. ტიპური წარმომადგენელია T7 ფაგი.

Caudovirales ანუ კუდიანი ფაგები შეიცავენ ორჯაჭვიან დნმ-ს (dsDNA). მათი გენომის ზომა შესაძლოა 18,000 - დან 500,000 bp სიგრძემდე მერყეობდეს. ვირუსის ნაწილაკებს აქვთ მკაფიო ბინალური სიმეტრია, მათი თავები არის კუბური სიმეტრიის, ხოლო კუდები ჰელიკალურია. კაფსიდი კი არის იკოსაედრა (ოცწახნაგა), რომელიც შეიცავს ვირუსულ გენომს და საყელოს საშუალებით უკავშირდება კუდს. კაფსიდური პროტეინები ორგანიზებულია კაპსომერში სუბერთეულებად. თუმცა კაპსომერი იშვიათად ჩანს. კუდიანი ფაგების სტრუქტურაში შედის აგრეთვე თავისა და კუდის ფიმბრიები, ბაზალური ფირფიტა, საყელო და ტერმინალური სპიკები. აღსანიშნავია, რომ *Myoviridae* -ს კაფსიდი უფრო დიდი ზომისაა და მეტი რაოდენობით დნმ-ს შეიცავს.

აღსანიშნავია რომ სწორედ კუდიანი ფაგების ეს ფართო ჯგუფი გამოიყენება ფაგოთერაპიაში.

6.3 ბაქტერიოფაგების ფიზიოლოგია, ბაქტერიული ვირუსების განვითარების სასიცოცხლო ციკლი

კუდიანი ფაგებით პატრონი უჯრედის შეცნობის პროცესი ძალზედ სპეციფიკურია და იწყება მასპინძელი უჯრედის ზედაპირზე არსებული მოლეკულებისა და ბაქტერიოფაგის კუდზე განლაგებული მიმაგრების საიტების ურთიერშეცნობით.

ფაგის სასიცოცხლო ციკლი მოიცავს 4 ძირითად ეტაპს:

1. ფაგისა და მასპინძლის უჯრედგარე შეცნობა
2. უჯრედზე ფაგის ადსორბცია და ვირუსული გენომის უჯრედში შეჭრა.
3. ფაგის ინექცია, გენომის რეპლიკაცია და ახალი ფაგური ნაწილაკების აწყობა
4. ზომიერი ფაგებისათვის ინფექციის პროცესში შესაძლოა ჩაერთოს ლიზოგენიის პერიოდი, რომლის დროსაც ფაგი ერთვება მასპინძლის გენომში და რეპლიცირდება მასთან ერთად ან რეპლიცირდება პლაზმიდის მსგავსად სინქრონულად. რის გამოც ლითიურ ციკლზე პასუხისმგებელი გენები რეპრესირდება, რასაც მოყვება ინფიცირებული ბაქტერიიდან პროგენის გამონთავისუფლება.

6.3.1 ვირულენტური ფაგები და ლითიური ციკლი

სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით ფაგები შესაძლოა დავეყოთ ორ ჯგუფად: ვირულენტურ და ზომიერ ფაგებად (2, 36).

ვირულენტური ფაგები გადიან მხოლოდ ლითიურ სასიცოცხლო ციკლს. ფაგის ვირიონი ემაგრება მასპინძელი უჯრედის ზედაპირს და ფაგის გენომი კუდის საშუალებით შედის უჯრედში. კუდის წვერი ენზიმური აქტივობით იჭრება პეპტიდოგლიკანში და შემდგომ უკვე შიდა მემბრანის გავლით გამონთავისუფლებს დნმს უშუალოდ უჯრედში, რის შემდეგაც ფაგის დნმ ქრება და გადადის ე.წ. ლატენტურ მდგომარეობაში. დროის მინიმალურ პერიოდში პირველი ფაგური ნაწილაკების წარმოქმნისათვის საჭირო დრო იწოდება ეკლიპსად.

ბაქტერიოფაგის უჯრედშიდა განვითარება იწყება ფაგის ძლიერი პრომოტორების მიერ რნმ პოლიმერაზას შეცნობით და ადრეული გენების

ტრანსკრიფციით. ადრეული გენების პროდუქტები იცავენ ფაგის გენომს, მათ შეუძლიათ მასპინძლის პროტეაზის ინაქტივირება, რესტრიქციული ფერმენტების ბლოკირება და სხადასხვა პროტეინის დაშლა. ადრეულ გენებს თანმიმდევრულად მოყვება შუალედური და გვიანი გენების ექსპრესია. ბაქტერიული ვირუსი იწყებს მასპინძლის დნმ-ის დეგრადაციას, მ-რნმ -ის ტრანსლიაციის ინჰიბირებას, უჯრედის გენეტიკურ მართვასა და საბოლოოდ ახალი თაობის ფაგური ნაწილაკების აწყობას. დნმ იფუთება წინასწარ აწყობილ იკოსაედრულ ე.წ. პროკაფსიდში. ფაგების უმეტესობაში პროკაფსიდი შეიცავს კომპლექსურად დაკავშირებულ სპეციფიკურ სამშენებლო ცილებსა და კაფსიდის მთავარ სრუქტურულ ცილებს. შემდეგ ხდება სამშენებლო და მთავარი კაფსიდური პროტეინის N-terminus -ის დაჭრა. შეფუთვის პროცესში თავი ფართოვდება, მატულობს დნმ-ს შიდა მოცულობაც და თავი უფრო სტაბილური ხდება. თავის ერთ-ერთ კუთხეში არის მთავარი კომპლექსი, რომელიც თავის აწყობის საწყის წერტილს წარმოადგენს. ფაგის კუდის აწყობა კი ხდება სხვა ბოლოში (7).

ბაქტერიოფაგის შთამომავლობის წარმოქმნის შემდეგ ხდება მასპინძლის უჯრედის ლიზისი და ბაქტერიული ვირუსის ახალი თაობის გამოთავისუფლება. კუდიანი ფაგები ლიზისისათვის იყენებენ ლიზინსა და ჰოლინს. ლიზინი არის ფერმენტი, რომლსაც აქვს მატრიქსის პეპტიდოგლიკანის დაჭრის უნარი, ჰოლინი კი ცილაა, რომელიც მონაწილეობს არხების ფორმირებაში და ლიზინს საშუალებას აძლევს, ამ არხების გავლით მიაღწიოს პეპტიდოგლიკანის შრემდე და დაალიზიროს ის (164).

6.3.2 ზომიერი ფაგები და ლიზოგენია

მასპინძლის უჯრედში შეჭრის შემდეგ ზომიერმა ფაგებმა შესაძლოა გაიარონ ჩვეულებრივი ლითიური ციკლი, რომელიც ვირულენტური ფაგების მსგავსად დამთავრდება უჯრედის ლიზისითა და ახალი ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლებით. თუმცა შეიძლება მოხდეს ლიზოგენური ციკლის ინიცირება. რეპლიცირების მაგივრად გენომი გადავა პროფაგის მდგომარეობაში, ინტეგრირდება

მასპინძლის გენომში და რეპლიცირდება მასთან ერთად, ან შესაძლოა, არ ინტეგრირდეს და დარჩეს პლაზმიდის სახით. პროფაგის შემცველ უჯრედებს უწოდებენ ლიზოგენურს, რადგან პროფაგი შეიძლება შემთხვევით გამოვიდეს პასიური მდგომარეობიდან და ჩაერთოს ლითიურ ციკლში (2, 152). (126, 127)

წარმოდგენას ლიზოგენიის შესახებ ცვალებადი ისტორია აქვს. 1920 და 1930 - იან წლებში მკვლევარებმა დაადასტურეს მასპინძელ უჯრედებთან არარეგულარულ ურთიერთობაში მყოფი ფაგების აღმოჩენა. მათ სწამდათ, რომ ბაქტერიას შეეძლო სპონტანურად ფაგის გენერირება, რომელიც მაშინ კონკრეტული ტიპის ფერმენტად მოიაზრებოდა. თუმცა T1-T7 ფაგებზე მუშაობისას დელბრუკსა და მის კოლეგებს ბაქტერიოფაგის მსგავსი თვისება არ შეუმჩნევიათ. მიუხედავად ყველაფრისა, ამ ფენომენის უარყოფა შეუძლებელი გახდა Lwoff და Gutmann (1950წ) სამუშაოს შემდეგ. მიკროსკოპში *Bacillus megatherium* -ს მიკროწვეთებზე დაკვირვებისას მათ აღმოაჩინეს, რომ ფაგებისაგან თავისუფალ საკვებ არეშიც კი უჯრედებს შეეძლოთ დაყოფა ფაგების პროდუქციის გარეშე, თუმცა მოგვიანებით უჯრედები სპონტანურად ლიზირდებოდა, რაც ფაგის გამოთავისუფლებით მთავრდებოდა. Lwoff - მა ზემოთ აღწერილ ფაგის გენომის უჯრედშიდა მდგომარეობას პროფაგი უწოდა. მოგვიანებით კი აჩვენა, რომ ლიზოგენური კულტურის ულტრაიისფერი სხივებით დასხივება პროფაგის ინდუქციას და მისი ლითიური სასიცოცხლო ციკლით გამრავლებას განაპირობებდა.

1951 წელს Esther Lederberg აღმოაჩინა *E. coli* K-12 შტამები, რომლებიც მსგავს ფაგს შეიცავდნენ და მას ლამბდა ფაგი უწოდა. ზომიერი ფაგებისათვის ტიპურია ბუნდოვანი კოლონიების წარმოქმნა, რაც კოლონიაში ბაქტერიის ლიზოგენიზაციით არის განპირობებული. კვლევების საფუძველზე აღმოჩენილია სამი გენი: *cI*, *cII*, და *cIII*, რომელთა პროდუქტებიც ლიზოგენიაზე არიან პასუხისმგებელი. *cI* გენი აკოდირებს რეპრესორ ცილას.

მოლეკულური მექანიზმი, რომელიც განსაზღვრავს ფაგის ლითიურ თუ ზომიერ ციკლს დეტალურადაა აღწერილი λ ფაგზე. ლიზოგენია იმართება რეპრესორული CI პროტეინით, რომელიც ლიზოგენიის სტადიაზე უკავშირდება ოპერატორებს და რეპრესირებს ყველა გენის ექსპრესიას, გარდა თავისი გენებისა. რითიც აინჰიბირებს ლითიურ ზრდას. λ ფაგის შემთხვევაში ამ პროცესებში

ჩართულია კიდევ ერთი ცილა Cro, რომელიც ჩართულია ლითიურ ციკლში და უპირისპირდება CI ცილას. CII და პროტეინის სტაბილურობა განისაზღვრება სხვადასხვა ფაქტორით, რაც უჯრედის ენერგეტიკულ დონეს განსაზღვრავს. cAMP - ის მაღალი კონცენტრაცია CII- ის სტაბილიზაციასა და, მაშასადამე, ლიზოგენიასაც უწყობს ხელს (40).(129)

ზომიერ ფაგებს აქვთ ერთი ბაქტერიიდან მეორეზე გენების გადატანის ანუ ტრანსდუქციის უნარი. ბევრ ზომიერ ფაგს ინტეგრაციისათვის სპეციფიკური საიტებიც კი აქვთ. ლითიურ ციკლში პროფაგის ინდუცირებისას ხშირად პროფაგის დნმ შეცდომით წამოიღებს მასპინძლის დნმ-ს ნაწილს. დნმ-ის ამ პატარა მონაკვეთის სხვადასხვა უჯრედებში გადატანას და შემდგომ რეკომბინაციას სპეციალიზირებული ტრანსდუქცია ეწოდება. ზოგიერთ ფაგს ინტეგრირებისათვის სპეციფიკური საიტები არ გააჩნია, ამიტომ გენომში ინტეგრირება შემთხვევით ადგილებში ხდება. ამ ტიპის ტრანსდუქციისას ადგილი აქვს გენერალიზირებულ ტრანსდუქციას. ტრანსდუქცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ბაქტერიების გენეტიკაში, როგორც გარემოში, ასევე ლაბორატორიაში.

ზომიერ ფაგებს, ასევე, განსაკუთრებული ადგილი უჭირავთ გენების ჰორიზონტალურ გადატანაში (158).

6.4 ბაქტერიოფაგების გამოყენება სხვადასხვა დაავადებების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის

ბაქტერიოფაგების გამოყენება რეზისტენტული ფორმის მიკროორგანიზმების საწინააღმდეგო ანტიბიოტიკების შემცვლელ ალტერნატიულ სამკურნალო საშუალებებად დაიწყო 30 - იანი წლებიდან და ფართოდ გამოიყენებოდა ყოფილ საბჭოთა კავშირში, ცენტრალურ ევროპასა და საფრანგეთში (3, 141).

პირველად ბაქტერიოფაგები სამკურნალოდ გამოიყენა d'Herelle დიზენტერიის სამკურნალოდ (39, 142). ეს კვლევები ტარდებოდა პარიზის ბავშვთა საავადმყოფოში 1919 წლის ზაფხულში. პირველი განკურნებული პაციენტი იყო 12 წლის ბიჭი, რომელიც მწვავე დიზენტერიით იყო ინფიცირებული. თუმცა პირველი პუბლიკაცია ბაქტერიოფაგების სამკურნალოდ გამოყენების შესახებ ეკუთვნის Richard Bruynoghe -

სა და Joseph Maisin-ის (1921) (141). იგი ეხებოდა კანის სტაფილოკოკური ინფექციების მკურნალობას. ავტორებს აღწერილი ჰქონდათ ინფექციის უკუსვლა 24-48 საათის განმავლობაში. მორიგი კვლევა სტაფილოკოკური ინფექციების შესახებ, რომელიც ასევე სტატიის სახით იყო გამოცემული ეკუთვნის Andre Gratia-ს (1922).

აღსანიშნავია ჰოსპიტალიზირებულ პაციენტებში ქოლერის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების გამოყენება, როგორც სამკურნალო, ასევე პროფილაქტიკური მიზნით. 1927 წლის მონაცემებით, ამ სწავლებაში მონაწილეობდნენ d'Herelle, Major R. Malone, და Dr. M.N. Lahiri. თავდაპირველად მათ მკაცრი კონტროლის ქვეშ 27 პაციენტს ჩაუტარეს ქოლერას საწინააღმდეგო ფაგებით თერაპია. ფაგების მიღების შემდეგ საავადმყოფოში ამ დაავადების ფატალურ შემთხვევათა რიცხვი 27 % - 30 % - დან ნულამდე დაეცა.

ასევე წარმატებული აღმოჩნდა საველე ცდები ინდოეთის სოფლებში. სადაც ლეტალურ შემთხვევათა რიცხვმა 8 % მდე დაიკლო, ხოლო იმ ჯგუფში, სადაც ფაგებს არ ღებულობდნენ, 124 პაციენტიდან 63% შემთხვევა სასიკვდილო აღმოჩნდა. შემდგომ ფაგებით მკურნალობა ინდოეთის სხვა რეგიონებშიც გაგრძელდა.

პირველ კვლევას ბაქტერიოფაგების კანქვეშ ინექციის შესახებ ხელმძღვანელობდა აშშ-ის მიჩიგანის ჯანდაცვის დეპარტამენტი. მათი მონაცემებით კანქვეშა ინექცია ჩაუტარდა ქრონიკული ფურუნკულოზით დაავადებულ 208 პაციენტს (Larkum, 1929წ). ფაგებით მკურნალობა წარმატებული აღმოჩნდა 162 პაციენტის შემთხვევაში. ფაგების მიღებიდან სულ მცირე 6 თვემდე მათ განმეორებითი ინფექცია აღარ შეხვედრიათ.

1940- იან წლებში ფაგოთერაპია ჩაუტარდათ მუცლის ტიფით დაავადებულ პაციენტებს, თუმცა ანტიბიოტიკები უკვე ხელმისაწვდომი იყო.

იმ დროისათვის მრავალი მკვლევარი ყოფდა ახალ ფაგებს და იყენებდა მათ სამკურნალოდ. მათ შორის იყო d'Herelle. მისმა ლაბორატორიამ დაიწყო სხვადასხვა ინფექციების საწინააღმდეგო ფაგური პრეპარატების წარმოება - *Bacté-rhino-phage*, *Bacté-intesti-phage*, *Bacté-coli-phage*, *Bacté-pyo-phage*, *Bacté-staphy-phage*.

ანტიბიოტიკების ერაში, მათი სიმრავლისა და სასწაულების მიუხედავად ფაგოთერაპია და ფაგური პრეპარატების წარმოება სხვადასხვა ქვეყნებში კვლავ

გრძელდებოდა. სწორედ ამ წლებში (1960-1980წ.წ.) ფაგოთერაპიამ ყოფილ საბჭოთა ქვეყნებსა და აღმოსავლეთ ევროპის ქვეყნებში მწვერვალს მიაღწია (107, 141).

ყოფილ საბჭოთა ქვეყნებს შორის ფაგოთერაპიის მხრივ მნიშვნელოვანი როლი ჰქონდა საქართველოს, კერძოდ კი გ. ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტს. 1923 წელს ეს ინსტიტუტი დააარსა გიორგი ელიავამ, რომელიც პირველად 1918 წელს შეხვდა d'Herelle -ს პარიზში და მას შემდეგ მასთან მჭიდრო კოლაბორაცია და მეგობრობა აკავშირებდა. იმ დროისათვის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი წარმოადგენდა ყოფილი საბჭოთა კავშირის ქვეყნების ფაგოთერაპიის კვლევით ცენტრს. თუმცა 1937 წელს გიორგი ელიავა ხალხის მტრად შერაცხეს და დახვრიტეს, d'Herelle კი საქართველოში აღარ დაბრუნებულა. მიუხედავად ყველაფრისა, ინსტიტუტი გადარჩა და დღემდე წარმოადგენდეს მსოფლიოში უმნიშვნელოვანეს ფაგოთერაპიის ცენტრს, განაგრძობს რა ფაგური პრეპარატების კვლევასა და განვითარებას.

თანამედროვე კვლევების შესახებ ინფორმაცია ისევ იბეჭდება სხვადასხვა სტატიებსა და წიგნებში, თუმცა ამ კვლევებს უარყოფითი შედეგები ჯერ არ მოჰყოლია. ადამიანის კანისა და კანქვეშა ქსოვილის ჩირქოვან-ანთებითი დაავადების პრობლემა ერთ-ერთი აქტუალურია დერმატოლოგიაში. ამ მხრივ მეტად მნიშვნელოვანია ქ.შველიძის მიერ ჩატარებული გამოკვლევები. შესწავლილი იქნა ფურუნკულოზის, კარბუნკულოზის და გიდრადენიტების ჩირქოვანი დაავადებები გამოწვეული სტაფილოკოკების მიერ და მათი მკურნალობა სპეციფიკური სტაფილოკოკის საწინაღმდეგო ფაგით. მკურნალობას ექვემდებარებოდა 161 ავადმყოფი. ბაქტერიოფაგებით მკურნალობა უტარდებოდათ კანქვეშა მცირე დოზების შეყვანით, ინფექციის კერიდან მოშორებით. გარდა ამისა, დაზიანებული ადგილიდან ჩირქის გამოდევნის შემდეგ იყენებდნენ ფაგით გაჟღენთილ საფენებს. მიღებული შედეგების მონაცემები: 161 ავადმყოფის სტაფილოდერმიის ღრმა ფორმების მკურნალობის შედეგად 152 კლინიკური გამოჯანმრთელება აღინიშნება, რაც 94,4% შეადგინა, კლინიკური გაუმჯობესება 7 ავადმყოფს აღენიშნა, სასურველი შედეგი არ იქნა მიღებული 2 შემთხვევაში. ავტორის მიერ შესწავლილ იქნა ავადმყოფების იმუნობიოლოგიური მდგომარეობა ბაქტერიოფაგებით მკურნალობამდე და მკურნალობის შემდეგ (8).

დღესდღეობით ბაქტერიოფაგებით მკურნალობას დაავადებათა ფართო სპექტრი აქვს მოცული. ესენია: ნებისმიერი ლოკალიზაციის ყველა სახის ჩირქოვან – ანთებითი პროცესი, ტრავმული დაზიანებები, ინფიცირებული ჭრილობები, დამწვრობის შედეგად განვითარებული გართულებები, გინეკოლოგიური, სტომატოლოგიური, დერმატოლოგიური, თვალისა და ყელ-ყურ ცხვირის ანთებად- ჩირქოვანი დაავადებები და სხვა. ჩატარებული ლაბორატორიული გამოკვლევებით დადასტურდა ბაქტერიოფაგების მაღალი ეფექტი. ფაგური პრეპარატებით მკურნალობის მრავალწლიანი გამოცდილებით საქართველოში, რუსეთსა და პოლონეთში დადასტურებულია, რომ მათ არასასურველი შედეგი არ მოყვოლიათ. გარდა ამისა ბაქტერიოფაგებით მკურნალობა ანტიბიოტიკებისაგან განსხვავებით ხასიათდება ეფექტურობითა და უვნებლობით (3, 41, 101, 141).

ბაქტერიოფაგების პრეპარატები არსებობს თხევადი, მყარი (ტაბლეტები), რბილი(სუპოზიტორია) და აეროზოლური ფორმით. მათი გამოყენება შეიძლება ლოკალურად, პერორალურად, კანქვეშ, ინტრავენურად და კუნთში (83).

მასალები

მუშაობის პროცესში გამოყენებული იყო ბაქტერიული შტამები:

1. *P. aeruginosa* -ს 200 შტამი - 50 შტამი მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნიდან მიღებული (მათ შორის ტრინიდადიდან) და 150 - საქართველოს კლინიკებში *P. aeruginosa* ინფიცირებული პაციენტებიდან გამოყოფილი შტამები. კვლევის დროს გამოყენებული იყო აგრეთვე *P. aeruginosa*-ს სტანდარტული შტამები PA14 და PAO1, რომლებიც სრულად არის დასექვენირებული და შესწავლილი (55, 89). (143, 144) ჩვენს კოლექციაში არსებული შტამებიდან პატრონ შტამები PA25 და PA32 გ. ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის გარდა ინახება გერმანიის მიკროორგანიზმთა და უჯრედული კულტურების კოლექციაში (DSMZ) შესაბამისი ნომრებით: PA25 DSM 25642 და PA32 DSM 25641.
2. *Klebsiella* - ს 123 შტამი. მათგან 50 შტამი ინახება გ. ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის მიკრობთა კოლექციაში, ხოლო დანარჩენი 73 შტამი, რომელიც ასევე გამოყენებული იყო ჩვენს კვლევაში,

ინახება ლესტერის უნივერსიტეტის (ინგლისი) ერთ-ერთი დეპარტამენტის (Department of Infection, Immunity and Inflammation) მიკრობთა კოლექციაში.

3. კვლევის პროცესში გამოყენებულია, აგრეთვე, ჩვენს ლაბორატორიაში არსებული *Esherichia coli*-ს, 12 *Enterococcus*- ს 10, 11 *Staphylococcus* - ისა და 15 *Streptococcus* - ს შტამები.

მუშაობის პროცესში გამოყენებული ბაქტერიოფაგები:

P. aeruginosa -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32*. ორივე ფაგი ინახება გერმანიის მიკროორგანიზმთა და უჯრედული კულტურების კოლექციაში (DSMZ) შესაბამისი ნომრებით *vB_Pae-Kakheti25* - DSM 25636 და *vB_Pae-TbilisiM32* - DSM 25635.

K. Pneumoniae სპეციფიკური ხუთი და *K. oxytoca* -ს საწინააღმდეგო ერთი ფაგი, რომელთაც ვუწოდებთ სახელები შესაბამისი პატრონ შტამების მიხედვით *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2*. აღნიშნული ბაქტერიოფაგები შესაბამისი შტამებით ინახება გ. ელიავას სახ. ბმვ ინსტიტუტის კოლექციაში.

ბაქტერიოფაგების დასახელებებში პრეფიქსი *vB* აღნიშნავს ბაქტერიულ ვირუსს (Bacterial virus), ” *Pae* ” - *P. aeruginosa*-ს, ხოლო ” *Klp* ” და ” *Klox* ” შეესაბამება *K. Pneumoniae* და *K. oxytoca* -ს (78). (149)

კვლევის მანძილზე გამოყენებული საკვები ნიადაგები და ძირითადი რეაქტივები:

1. Brain Heart Infusion Broth; Brain Heart Infusion agar (Difco);
2. Luria Broth (LB) and Luria Agar (LA);
3. Pseudomonas Agar F • Flo Agar
4. Herellea Agar (საიდენტიფიკაციო ნიადაგი)
5. Millipore - ის მემბრანული სასტერილიზაციო ფილტრები ფორების ზომით 0.45 და 0.22 μm
6. ანტიფაგური შრატი
7. ადიუვანტი (Freund's complete adjuvant, Difco)
8. რესტრიქციული ენდონუკლეაზები: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*, *DdeI*, *DpnI*, *KpnI*
9. pBluescript II KS პლაზმიდა
10. *E. coli* DH5 α ქიმიური კომპეტენტური უჯრედები
11. გამოყენებული პრაიმერები

ცხრილი 1 კვლევის პროცესში გამოყენებული პრაიმერები

სახელი	სექვენსი (5' - 3')
KpneuSp-F	CAACGGTGTGGTTACTGACG
KpneuSp R	TCTACGAAGTGGCCGTTTTC
KoxySp F	GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG
KoxySp R	TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG
FimH F	CACGCAAGGCACCATTC
FimH R	GCTCAGAATCAACATCGGTAAC
mrkD F	AATAGCAGCCACGCGTAGT
mrkD R	TGTTTATCAGCGATGCGAAC
T3 Sequencing	AATTAACCCTCACTAAAGG
T7 Sequencing	TAATACGACTCACTATAGG

მეთოდოლოგია

თავი 1. ბაქტერიული შტამების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები

1.1 ბაქტერიული შტამების იდენტიფიკაცია

ლაბორატორიაში არსებული *Klebsiella* - ს 50 შტამის იდენტიფიცირება მოხდა ჰერელას სადიფერენციაციო ნიადაგზე გათესვით. ჰერელას აგარი გამოიყენება გრამ უარყოფითი ბაქტერიების იდენტიფიკაციისათვის, რაც დაფუძნებულია ამ ოჯახის წარმომადგენლების ფერმენტირების უნართან. ნიადაგის შემადგენლობაში შემავალი კარბოჰიდრატებს ლაქტოზასა და მალტოზას, სუბსტრატის დაჟანგვის შედეგად ბრომკრეზოლ იისფერი გადაყავთ ყვითელ შეფერილობაში. ამიტომ Enterobacteria-ს წარმომადგენლები იძლევიან ყვითელ კოლონიებს, რომლებიც ირგვლივ ყვითელი შეფერილობის რკალით არიან შემოსაზღვრული.

Pseudomonas შტამების იდენტიფიკაციისათვის გამოყენებული იყო “ Pseudomonas Agar F • Flo Agar (pH 7.0 ± 0.2)” ნიადაგი (18).

1.2 პოლიმერულ ჯაჭვური რეაქცია (PCR)

Klebsiella - ს შტამების იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ პოლიმერული ჯაჭვური რეაქცია *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* - ს სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით (97).

1.3 VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემა

Klebsiella და *Pseudomonas* პატრონ შტამების იდენტიფიკაცია მოხდა VITEK 2 bioMérieux სისტემის გამოყენებით. ეს მეთოდი დაფუძნებულია 41 ფლუორესცენტული ბიოქიმიური ტესტის შემცველ 64 - უჯრიან პლასტმასის მიკრო თევზებით (card) იდენტიფიკაციაზე. Card ავტომატურად ივსება ვაკუუმის საშუალებით და ავტომატურადვე ილუქება. შემდეგ კი აღნიშნული Card- ი იდება VITEK 2 სისტემის თერმოსტატში და შედეგები იკითხება (49).

თავი 2. ბაქტერიოფაგების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები :

2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა.

ბაქტერიოფაგების გამოყოფა ძირითად ხდება ჩამდინარე წყლებიდან. ჩამდინარე წყლის 100 მლ-ს უმატებენ 10 მლ კონცენტრირებულ ბულიონს და 1 მლ წინასწარ შერჩეული ინდიკატორული კულტურის ან კულტურების ნარევს. თერმოსტატში 37 °C-ზე 18 სთ ინკუბაციის შემდეგ ნარევს აცენტრიფუგებენ 5,000 გ-ზე 30-40 წთ-ით და სუპერნატანტს ფილტრავენ 0.22 μm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore). ფილტრატს ამოწმებენ ფაგის შემცველობაზე. ფაგების გამოყოფის შემთხვევაში მათი გასუფთავება გრძელდება ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების მიღებამდე. ფაგის კოლონიებიანი ფინჯებიდან ხდება სტერილური პასტერის პიპეტით ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიის ამოღება და მისი შეტანა 1 მლ ბულიონიან სინჯარაში. სინჯარას 1 სთ ათავსებენ თერმოსტატში 37 °C ტემპერატურაზე. შემდგომ ტიტრავენ

გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. აღნიშნული პროცესი მეორდება ფაგის მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების მიღებამდე, რაც თანამიმდევრულად რამდენიმე პასაჟს მოითხოვს (49, 70).

2.2 ბაქტერიოფაგების გამოვლენა - Spot test

ბაქტერიოფაგების გამოსავლენად ვაკეთებთ კულტურის გაზონს. 0.1 მლ ინდიკატორულ კულტურას ვამატებთ 4.5 მლ 0.7 % ნახევრად თხიერ აგარს და ვასხამთ ფინჯანზე. გამყარების შემდეგ ვაწვეთებთ საკვლევი სუპერნატანტის 10 μ l -ს. 37 °C-ზე 18 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის არსებობას ვამოწმებთ ლიზისური უბნების არსებობით. აღნიშნული მეთოდი გამოიყენება აგრეთვე ლიზისური აქტივობის განსაზღვრისათვის (49, 82).

2.3 ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრა

ლიზისური აქტივობისა და სპექტრის განსაზღვრისათვის ვიღებთ ირიბ აგარზე გათესილი ღამის კულტურის ჩამონარეცხის ათჯერად განზავებას (10^8 უჯრ/მლ). ვაკეთებთ კულტურის გაზონს, როგორც ეს Spot test -ის მეთოდშია აღწერილი და ვაწვეთებთ 10 μ l ფაგს . 37 °C- ზე 18 - 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ შედეგებს აფასებენ ფაგის მიერ წარმოქმნილი ლიზისური ზონების ხარისხის მიხედვით. შეფასებისათვის იყენებენ სხადასხვა აღნიშვნებს:

CI - სრული ლიზისი, მიკრობზე ფაგის მოქმედების ადგილი გამჭვირვალეა

OCl - აღინიშნება ლიზისური უბნები მეორადი ზრდით

Tv - არასრული ლიზისი

R - შტამი რეზისტენტულია ფაგისადმი

2.4 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა

2.4.1 თხიერ საკვებ არეში- აპელმანის მეთოდი

თხიერ საკვებ არეში ტიტრის დასადგენად 4.5 მლ ბულიონიან სინჯარებში ხდება საკვლევი ფაგის თანმიმდევრული ათჯერადი განზავება, რისთვისაც წინა სინჯარიდან 0.5 მლ გადააქვთ მომდევნო სინჯარაში (10^{-1} -დან 10^{-6} განზავებამდე). ბოლო სინჯარიდან ამოღებულ 0.5 მლ-ს კი ასხამენ. შემდეგ თითოეულ სინჯარაში ამატებენ 0,1 მლ შტამის ბულიონიან კულტურას 10^8 უჯრ/მლ კონცენტრაციით. პარალელურად იდგმება კულტურის კონტროლი. 37°C -ზე 18 – 24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის აქტივობა განისაზღვრება კულტურის კონტროლთან შედარებით საკვლევი სინჯარების გამჭვირვალობის ხარისხის მიხედვით.

2.4.2 მყარ საკვებ არეზე - გრაციას მეთოდი

გამოსაკვლევ ფაგს ტიტრავენ სასურველ განზავებამდე ათჯერადი განზავების მეთოდით. სათანადო განზავების შემდეგ ფაგის 1 მლ გადააქვთ ცალკეულ სტერილურ სინჯარებში, რომელთაც ემატება 0.1 მლ ტესტ-კულტურისა და დაახლოებით 7 მლ 0.7%-იანი აგარი. სინჯარებს აღნიშნული ნარევიტ სწრაფად ანჯღრევენ და შიგთავსს თანაბრად ანაწილებენ 2 % -იან აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. გამყარების შემდეგ ფინჯნებს ათავსებენ საინკუბაციოდ თერმოსტატში 37°C -ზე. 18-24 სთ-ის შემდეგ ფინჯნებზე ითვლიან ნეგატიური კოლონიების რაოდენობას. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება 1 მლ საკვლევ სითხეში აქტიური ფაგური ნაწილაკების რაოდენობით (49, 77).

2.5 ბაქტერიოფაგების გამრავლება

2.5.1 კონცენტრირების მეთოდი

ბაქტერიოფაგების გასამრავლებლად კონცენტრირების გზით გამოიყენება პეტრის ფინჯანზე ორშრიანი აგარის მეთოდი. თავდაპირველად ტიტრავენ ფაგს სასურველ განზავებამდე. იღებენ ირიბ აგარზე ბულიონით ჩამორეცხილი კულტურის 10-ჯერად განზავებას ($1 \cdot 10^9$ უჯრ/მლ მილიარდიანი კულტურა). თითოეულ სინჯარაში გადააქვთ მილიარდიანი კულტურის 1მლ, რომელსაც ემატება 0.1 მლ ფაგი შესაბამისი განზავებიდან და 7 მლ 0.7 % ნახევრად თხიერი აგარი. სინჯარას კარგად

ანჯლრევენ და შიგთავსს ასხამენ 2 % აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. 37 °C 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ფინჯნებიდან მიღებულ ზედა შრეს ჩამოხვეტავენ და და 5,000 გ -ზე 30-40 წთ ცენტრიფუგირების გზით მიღებული სუპერნატანტი იფილტრება 0.22 μm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore).

2.5.2 გამრავლება თხიერ საკვებ არეში

ფაგის გამრავლება ხდება ასევე თხიერ საკვებ არეში. ამისთვის იღებენ 18 საათიანი 10⁹ კულტურის 0.1მლ -ს და შეაქვთ 9.9 მლ ბულიონში. სინჯარას ათავსებენ სანჯლრეველაზე 37 °C -ზე. 2-3 სთ -ის შემდეგ შესაბამის კულტურას ლოგარიტმულ ფაზაში (როდესაც მიკრობის ტიტრი აღწევს 2×10^8 უჯრ/მლ) ამატებენ გასამრავლებელი ფაგის 0.1 მლ-ს. სინჯარას ტოვებენ 18 – 24 სთ ინკუბაციისათვის, ხოლო შემდეგ ფილტრავენ 0.45 - 0.22 μm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore) და ტიტრს ადგენენ ორშრიანი აგარის გრაციას მეთოდით.

2.6 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია

ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიის შესწავლა ხდება ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის გამოყენებით. ელექტრონული მიკროსკოპისათვის გამოიყენება მაღალ ტიტრიანი PEG – ით (პოლიეთილენგლიკოლით) გასუფთავებული ფაგური ლიზატი (49, 111). (152) ამისათვის 5 μl PEG- იანი ლიზატი თავსდება პიოლოფორმის საფენის მქონე ბადეზე. ბადე ირეცხება ორჯერ, ორმაგად დისტილირებული წყლით და ემატება 2 წვეთი 1 % -იანი ურანილ აცეტატის ხსნარი. ზედმეტი ხსნარი მაშინვე სცილდება და ბადეები შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება 80kV დენის ძაბვით JEOL JEM 1400 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით.

2.7 ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია

ბაქტერიულ უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარე გამოისახება სპეციალური ფორმულით:

$k = 2.3/Bt \times \log P_0/P$, სადაც k ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტაა (მლ/წთ); B - ბაქტერიების კონცენტრაცია, t - დრო, რომლის განმავლობაშიც ფაგის საწყისი ტიტრი P_0 ეცემა ფაგის საბოლოო P ტიტრამდე.

ცდაში იღებენ ფაგისა (10^8 pfu/ml) და ლოგარითმული ფაზის მიკრობის (10^7 cfu/ml) თანაბარ რაოდენობას. სინჯარა აღნიშნული ნარევით თავსდება 37°C - ზე წყლის აბაზანაში. 0.1 მლ -ის ოდენობით სინჯები იღება დროის გარკვეულ ინტერვალებში (0', 3', 5', 7', 10', 12') და ემატება 9.9 მლ ბულიონიან და 0.4 მლ ქლოროფორმიან წინასწარ გაციებულ სინჯარას, სინჯარას კარგად ვანჯღრევთ და 10 წუთით იდგმება საყინულეში. შემდეგ შესაბამისი განზავებები გადაიტანება და იტიტრება ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით. მეორე დღეს ფაგის ნეგატიური კოლონიების დათვლით ხდება შედეგების შეჯამება და ადსორბციის დროისა და ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტის გამოთვლა (49, 63, 95). (

2.8 ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

ბაქტერიოფაგის გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლისას განისაზღვრება ორი ისეთი მნიშვნელოვანი მახასიათებელი, როგორცაა ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების ლატენტური პერიოდი და ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის შემდგომ თითოეული ინფიცირებული უჯრედისაგან ფაგის გამოსავლიანობა (49, 63). (153) ამისათვის,

- 9.9 მლ ბულიონს ემატება 0.1 მლ ღამის კულტურის ჩამონარეცხი, თავსდება 37°C - ზე წყლის აბაზანაში ექსპონენციალური ფაზის მიღწევამდე (10^8 უჯრ/მლ)
- 0.9 მლ ზემოთ აღნიშნული ექსპონენციალური ფაზის კულტურას ემატება 0.1 მლ ფაგი (ტიტრით 10^8), რაც წარმოქმნის 1მლ უჯრედებს ინფიცირების მრავლობითობით 0.1 (MOI). აღნიშნული ნარევი იდგმება 37°C - ზე წყლის აბაზანაში 3 წთ და იწყება დროის ათვლა. 3წთ-ის შემდეგ ვიღებთ 0.1 მლ-ს, რომელიც ზავდება

10 მლ ბულიონში. კარგად შენჯღრევის შემდეგ ამოაქვთ ისევ 0.1 მლ-ი და ემატება 2.5 მლ ბულიონი, რომელსაც პირობითად "განზავებულ კულტურას" უწოდებენ.

- "განზავებულ კულტურას" აბრუნებენ წყლის აბაზანაში. აფიქსირებენ დროს და იღებენ პირველ სინჯს. სინჯების აღება გრძელდება დროის გარკვეულ ინტერვალში (5', 7', 10', 15', 18', 20', 25', 35', 50', 60', 75', 80', 90') 0.1 მლ -ის ოდენობით.
- სინჯებს გადაიტანენ ორშრიანი აგარის მეთოდით სხვადასხვა განზავებებით (1:4, 1:10, 1:100 და 1:1000), რათა მეორე დღეს შესაძლებელი გახდეს კოლონიების ზუსტად დათვლა.

2.9 ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური ნათესაობის შესწავლა

ბაქტერიოფაგებს შორის სეროლოგიურ ნათესაობას ადგენენ სეროლოგიური მეთოდით. მეთოდი მოიცავს ორ ეტაპს. პირველ ეტაპზე ხდება ცხოველების იმუნიზაცია სპეციფიკური ანტიფაგური შრატის მისაღებად, ხოლო მეორე ეტაპზე ნეიტრალიზაციის რეაქციის განსაზღვრა.

იმუნიზაციისათვის გამოიყენება 1,5-2კგ ბოცვრები (2-3 ბოცვერი 1 ანტიფაგური შრატის მისაღებად). იმუნიზაცია ტარდება ორჯერადად. პირველადი იმუნიზაციისას თითოეული კურდღლის უკანა თათის კუნთში შეყავთ ფაგისა და ადიუვანტის (Freund's complete adjuvant, Difco) ნარევი 1:1 თანაფარდობით. ფაგი განზავებული უნდა იყოს ფიზიოლოგიურ ხსნარში ტიტრით $1 \cdot 10^{11}$ ნაწ/მლ. მეორადი იმუნიზაცია კეთდება ინტრავენურად 1 თვის შემდეგ და შეყავთ 1 მლ ბაქტერიოფაგი ადიუვანტის გარეშე ტიტრით $1 \cdot 10^{11}$ ნაწ/მლ. მეორადი იმუნიზაციიდან ორი კვირის შემდეგ კურდღლების გულის მარცხენა პარკუჭიდან იღებენ სისხლს შრატის მოსამზადებლად (49, 151).

მიღებულ შრატს იყენებენ ნეიტრალიზაციის რეაქციისათვის. იღებენ 0.1 მლ ფაგს ტიტრით $1 \cdot 10^7$ ნაწ/მლ და ამატებენ 0.9 მლ შრატს სხვადასხვა განზავებებით (1:50, 1:100, 1:500), შემდეგ კი აღნიშნულ ნარევს ათავსებენ 37 °C - ზე წყლის აბაზანაში. იღებენ 0.1 მლ სინჯებს დროის გარკვეულ ინტერვალებში (0', 5', 10', 20'), ანზავებენ 100-

ჯერადად წინასწარ გაციებულ ბულიონში და გადააქვთ ფინჯანზე ორშრიანი აგარის მეთოდით.

პარალელურად დგამენ ფაგის კონტროლს, რომელშიც ანტიფაგური შრატის ნაცვლად ფიზიოლოგიურ ხსნარს იყენებენ. ფინჯნებს დებენ საინკუბაციოდ თერმოსტატში 37 °C ტემპერატურაზე.

2.10 ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის შესწავლა სხვადასხვა გარემო პირობებში ქლოროფორმის თანაობისას, ტემპერატურული ინაქტივაცია და pH - ის გავლენა

ფაგის აქტივობაზე ქლოროფორმის გავლენის შესასწავლად, 0.1მლ ფაგურ ლიზატს (ტიტრით $1 \cdot 10^8$ ნაწ/მლ) ემტაება 9.9 მლ ბულიონი და 0.4 მლ ქლოროფორმი. ნარევს აყოვნებენ და დროის გარკვეულ ინტერვალებში ხდება სინჯების აღება (0', 5სთ, 24სთ). სინჯებს ტიტრავენ გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით შესაბამისი განზავებებიდან. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი ქლოროფორმის გარეშე. ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში საინკუბაციოდ (49, 70).

ფაგის აქტივობასა და სტაბილურობას სწავლობენ აგრეთვე სხვადასხვა ტემპერატურის პირობებში 37°C, 50°C, 70°C - ზე. ბაქტერიოფაგის ლიზატს (ტიტრით $1 \cdot 10^8$ ნაწ/მლ) ათავსებენ შესაბამის ტემპერატურებზე და იღებენ სინჯებს დროის სხვადასხვა მონაკვეთებში 0', 5სთ, 24სთ. შედეგებს ითვლიან გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით (70).

ბაქტერიოფაგზე pH - ის გავლენის შესასწავლად იღებენ სხვადასხვა pH- (pH 3', 5', 7', 9', 11') საკვებ ბულიონს . ცდისათვის გამოყენებული ფაგის (ტიტრით $1 \cdot 10^9$ ნაწ/მლ) 0.5 მლ შეაქვთ შესაბამისი pH-ის მქონე 4.5 მლ ბულიონებში და საინკუბაციოდ ათავსებენ თერმოსტატში 37 °C - ზე. სინჯების აღება ხდებოდა 0', 5სთ და 24სთ-იანი დროის ინტერვალით და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით დგინდება ფაგის აქტივობა (70).

2.11 ბაქტერიოფაგების მოქმედების შესწავლა ბაქტერიულ ბიოფილმებზე

ბიოფილმების წარმოქმნის შესასწავლად გამოიყენება სხვადასხვა მეთოდი. ერთ-ერთი მეთოდით ბიოფილმების ფორმირება ხდება 96 უჯრიან მიკროთეფშებზე. თეფშის თითოეული უჯრა ივსება 100µl 1/100 განზავებული 18 საათიანი კულტურით. შემდეგ ხდება თეფშების 8 და 24 სთ - იანი ინკუბაცია 37 °C ტემპერატურაზე. ფაგის დამატება ხდება კულტურასთან ერთად ან 8 – 24 სთ -იანი ინკუბაციის შემდეგ, ფაგის დამატების შემდეგ კი მიკროთეფშები კვლავ თავსდება საინკუბაციოდ. თეფშები შეიცავს როგორც დადებით, ასევე უარყოფით კონტროლსაც. ინკუბაციის შემდეგ თეფშები იცლება მასში არსებული კულტურისგან და თითოეული უჯრა ივსება ჯერ გამოხდილი წყლით, ხოლო შემდეგ 0.1 % (V/V) კრისტალ ვიოლეტით. 10 წუთით დაყოვნების შემდეგ თეფშები ორჯერ ირეცხება გამოხდილი წყლით და გასაშრობად ლაგდება ქაღალდზე ადსორბციისთვის. ბოლოს კი ყველა უჯრას ემატება 95 % ეთანოლი და 15 წუთის შემდეგ იკითხება სპექტროფოტომეტრზე 595 ნმ- ზე (143).

2.12 ბაქტერიოფაგების ანტიბაქტერიული მოქმედების განსაზღვრა *Galleria mellonella* -ს მოდელზე

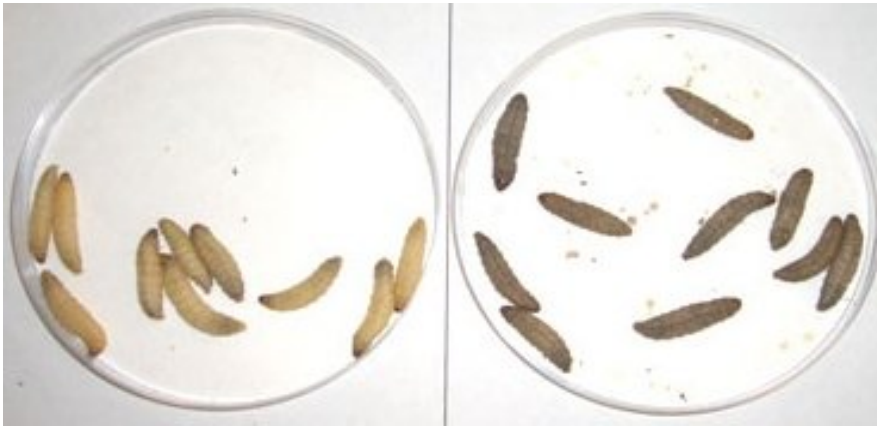
Galleria mellonella წარმოადგენს Greater Wax Moth სახეობის პეპელას. პეპლის ამ სახეობის მუხლუხოები დღესდღეობით ფართოდ გამოიყენება ლაბორატორიულ პირობებში სხვადასხვა ტიპის ინფექციური მოდელის შექმნისათვის (68, 105). *Galleria mellonella* -ს მოდელი გამოვიყენეთ *Pseudomonas aeruginosa* PA14 -ს შტამით ინფიცირებისათვის და შემდგომ შესაბამისი ბაქტერიოფაგის შეყვანით ამ ფაგის ანტიბაქტერიული მოქმედების შესასწავლად. აღნიშნული ცდები ჩატარდა ორ ეტაპად. პირველი ცდისას გვექონდა მხოლოდ ფაგიანი ჯგუფი, მეორედ კი ცალკე გამოვყავით ფაგიანი, ანტიბიოტიკიანი და ფაგი + ანტიბიოტიკიანი ჯგუფები. პირველი ცდა: PA14 შტამის ორი ცალკეული კოლონია საინკუბაციოდ შეაქვთ 5-5 მლ LB- ს ბულიონში. 100- ჯერადად განზავებული ღამის კულტურებს (ორი სინჯარით) ათავსებენ 4 საათით საინკუბაციოდ სანჯღრეველაზე (37 °C). შემდეგ ათავსებენ

ცენტრიფუგაში 20 °C 4400g - ზე 10 წუთით, ნალექს კი ხსნიან ბულიონში სპექტროფოტომეტრზე, რომ მიიღონ OD-0.2. შემდგომ კვლავ ათავსებენ ცენტრიფუგაში და ნალექს ხსნიან 10 mM MgSO₄ - ში (OD - 0.2). განზავებულ კულტურებს ტიტრავენ 10⁻⁵ მდე და ბოლო სამი განზავებიდან 10 - 10 µl აწვეთებენ ფინჯანზე ცალკეული კოლონიების დასათვლელად. ინკუბაციის შემდეგ მიკრობის ტიტრი აღმოჩნდა 1.6 * 10⁵ ერთ და 1.8 * 10⁵ ნაწ/მლ მეორე სინჯარაში. ფაგის განზავება ხდება 10 mM MgSO₄ - ში 10⁻⁷მდე.

ცდისათვის შეირჩა *Galleria mellonella* -ს 7 ჯგუფი. თითოეულ ჯგუფში შედიოდა 10 მუხლუხო. I - საკონტროლო ჯგუფი, რომელთაც ინექცია გაუკეთდათ მხოლოდ 10 mM MgSO₄ - ით. II - ჯგუფის მუხლუხოებს შევუყვანეთ PA14 შტამი 1.6 * 10⁵ ნაწ/მლ, III ჯგუფს - გაუკეთდა PA14 (A) შტამი 1.6 * 10⁵ უჯრ/მლ, ხოლო ერთი საათის შემდეგ შევუყვანეთ ფაგი ტიტრით 1*10² ნაწ/მლ. IV ჯგუფს გაუკეთდა იგივე ინექცია, რაც მესამე ჯგუფს, მხოლოდ 1*10² - ის მაგივრად გაუკეთდათ ფაგი ტიტრით 1*10⁷ ნაწ/მლ, V, VI და VII ჯგუფებში ინექცია ჩატარდათ PA14 (A)-ს ჯგუფების ანალოგიურად, იმ განსხვავებით, რომ PA14 (B) ტიტრი იყო 1.8 * 10⁵ ნაწ/მლ.

ინექციის შემდეგ ყველა ჯგუფი მოთავსებული იყო თერმოსტატში 37 °C- ზე და საათში ერთხელ (გარდა ღამის საათებისა) ხდებოდა მათი სიცოცხლისუნარიანობის შემოწმება. მკვდარი მუხლუხოები შავდებოდნენ და პინცეტის შეხებაზე არ რეაგირებდნენ. (ილუსტრაცია 1)

მეორე ცდა: მეორედ ცდის ჩატარებისას გამოყენებულ იქნა ზემოთ აღწერილი მეთოდი ზუსტი თანმიმდევრობით. პირველი ცდისაგან განსხვავებით, PA14 (A)- ის მიკრობის ტიტრი იყო 2*10⁶, ხოლო PA14 (B) - ის შემთხვევაში 2.4 *10⁶. ფაგის იგივე ტიტრი იყო გამოყენებული. ხოლო გენტამიცინის დოზა გამოთვლილი იყო მუხლუხოების წონაზე გადაანგარიშებით, რაც დაახლოებით 50 µg/ml კონცენტრაციას შეესაბამებოდა. შესაბამისად იყო კონტროლის ჯგუფი (10 mM MgSO₄), მხოლოდ შტამით ინფიცირებული ჯგუფი (PA14 A და B), ფაგიანი (ტიტრით 10² და 10⁸), ანტიბიოტიკიანი და ფაგი + ანტიბიოტიკიანი ჯგუფები.



ილუსტრაცია 1: *Galleria mellonella*

2.13 პოლიეთილენგლიკოლით (PEG) პრეციპიტაცია

თავდაპირველად ფაგის ლიზატს ემატება NaCl (5,84გ NaCl /100მლ). ნარევის აყოვნებენ ყინულზე 1 საათით. შემდგომ აცენტრიფუგირებენ 11000 გ - ზე 4 °C 20 წუთით. სუპერნატანტი გადააქვთ სუფთა ფლაკონში, სადაც ემატება პოლიეთილენგლიკოლი (PEG 8000) სუპერნატანტის საბოლოო მოცულობის 10 % - ის ოდენობით წონა/მოცულობაზე გადაანგარიშებით. ფლაკონებს კარგად ანჯღრევენ, რომ PEG - ი გაიხსნას და ტოვებენ მაცივარში 24 საათით (ან ყინულზე 1სთ). შემდეგ ფლაკონები გამოაქვთ მაცივრიდან და აცენტრიფუგირებენ 4000 გ - ზე 50 წთ. სუპერნატანტს გადავლვრით, ნალექი კი იხსნება 1-2 მლ SM ბუფერში (NaCl, MgSO₄·7H₂O, 1M Tris.Cl, pH 7.5) და ემატება 1მლ-ზე 1-1 μl ფერმენტები Dnase და Rnase და ერთი საათით საინკუბაციოდ იდება თერმოსტატში 37 °C-ზე. 1 საათის შემდეგ ემატება თანაბარი მოცულობის ქლოროფორმი და ენერგიულად ვანჯღრევთ. ორგანულ და წყლის ფაზას გამოვყოფთ 4000 გ - ზე 40 წთ ცენტრიფუგირებით (4 °C). სუპერნატანი ფრთხილად ამოაქვთ და ინახავენ მაცივარში 4 °C -ზე (111).

2.14 ბაქტერიოფაგების დნმ-ის გამოყოფა და რესტრიქციული ანალიზი

ფაგის დნმ-ის გამოსაყოფად გამოიყენება კლასიკური ფენოლით ექსტრაქციის მეთოდი.

თავდაპირველად ფაგის ლიზატს (უმჯობესია PEG პრეციპიტირებული SM ბუფერში) ემატება 1-1 μ ლ ფერმენტები Dnase და Rnase მიკრობული დნმ-ის მოსაცილებლად და საინკუბაციოდ დევენ 37 °C-ზე 1 საათით. შემდგომ ამატებენ თანაბარი მოცულობით ფენოლს, ხელში ფრთხილად ურევენ და აცენტრიფუგირებენ 15000 გ-ზე 4 °C 10 წთ. სუპერნატანტს იღებენ ისე, რომ პიპეტმანი არ შეეხოს ქვედა ფენას, შეგროვილ წყლიან ფაზას კი ამატებენ თანაბარი მოცულობით P:C:I-ს (ფენოლ : ქლოროფორმ : იზოამილალკოჰოლს (25:24:1)). ხელში ნაზად ანჯღრევენ და აცენტრიფუგირებენ 15000 გ-ზე 4 °C 10 წთ. ისევ ფრთხილად ამოაქვთ სუპერნატანტი და ამატებენ თანაბარი რაოდენობით ქლოროფორმ : იზოამილალკოჰოლს (C:I 24:1). კვლავ ათავსებენ ცენტრიფუგაში 15000 გ-ზე 4 °C 10 წთ და ამოღებულ სუპერნატანტს უმატებენ რაოდენობის 0.4 მოცულობას 7.5 M ამონიუმის აცეტატს და ორმაგ რაოდენობა იზოპროპანოლს. ტოვებენ ყინულზე 1 სთ, შემდეგ კი აცენტრიფუგირებენ 21000 გ-ზე 20 წუთი. სუპერნატანტს ღვრიან, ნალექს კი რეცხავენ 70 % ეთანოლით 15000 გ-ზე 10წთ ცენტრიფუგირების პირობებში. ეთანოლს ასხამენ, ნალექს აშრობენ ჰაერზე (არაუმეტეს 20 წთ) და ხსნიან 50 μ ლ სტერილურ გამობდილ წყალში ან EB ბუფერში (10mM Tris HCl, pH 8.5).

დნმ-ის კოცენტრაციას საზღვრავენ სპექტროფოტომეტრ Nanodrop ND1000 - ით, ან ჰორიზონტალური გელ - ელექტროფორეზის საშუალებით. ელექტროფორეზზე დნმ - ის ფრაგმენტებს ადარებენ შესაბამის მარკერს.

რესტრიქციული ანალიზისათვის შერჩეული იქნა სხვადასხვა რესტრიქციული ფერმენტები *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*, *DdeI*, *DpnI*, *KpnI*. დნმ -ის ფრაგმენტების დასაცალკევებლად გამოყენებული იყო ჰორიზონტალური გელ ელექტროფორეზი (70).

2.15 გენომის ზომის დადგენა (PFGE)

1. ეპენდორფებში მზადდება 3 % ადვილად ლლობადი აგაროზა 0. 5×TBE ბუფერში (0.9 M Tris base, 0.9 M boric acid, 0.02 M EDTA, pH 8.0). აგაროზის გასაღობად ეპენდორფებს ვაჩერებთ 100 °C ზე heating block - ში (96). (160)
2. 120 µl საკვლევი ფაგი გადაგვაქვს ცალკე ეპენდორფში და ემატება 63 µl გამლღვალი აგაროზა, ნაზად ერევა ისე, რომ ბუმტები არ წარმოიქმნას და მთლიანი მოცულობა გადაგვაქვს აგაროზიანი საცობების მოსამზადებელ ყალიბში. ყალიბს ვტოვებთ ოთახის ტემპერატურაზე 20 წთ და შემდეგ ვდებთ მაცივარში ნახევარი საათით.
3. ეპენდორფებში გადაგვაქვს დაახლოებით 1მლ ლიზისის ბუფერი (50 mM Tris, 50 mM EDTA [pH 8.0], 1% sarcosine, 0.1 mg/ml proteinase K, რომელშიც იდება ყალიბიდან ფრთხილად ამოღებული აგაროზის საცობები და რჩება წყლის აბაზანაში 55 °C 18 საათით.
4. ელექტროფორეზზე გასაშვებად მზადდება 1 % აგაროზის გელი 5×TBE ბუფერში (pH 8.0), რომელიც ისხმება წინასწარ აწყობილ გელის რეზერვუარში და რჩება ოთახის ტემპერატურაზე 40 წთ. ამ დროის განმავლობაში ეპენდორფები ამოგვაქვს წყლის აბაზანიდან და პიპეტით ფრთხილად ვაცილებთ ლიზისის ბუფერს ისე, რომ პიპეტი არ შეეხოს აგაროზის ნაჭრებს. აგაროზის ნაჭრები სამჯერ ირეცხება 1×TE ბუფერით და გამშრალი ნაჭრები ბრტყელთავიანი პატარა ნიჩბის საშუალებით იდება წინასწარ გამზადებულ გელში, თითოეული აგაროზის საცობი თითოეულ ნაჭდევეში. პირველ რიგში იდება მარკერი.
5. ელექტროფორეზისათვის ვიყენებთ შემდეგ პირობებს: დენი - 6 volt/cm, დრო - 17 საათი, ტემპერატურა - 14 °C , პულსირების დრო - საწყისი 5 წამი, საბოლოო 13 წამი.
6. 17 საათის შემდეგ გელი ამოგვაქვს და ვაყოვნებთ კონტეინერში, რომელშიც ასხია 0. 5×TBE (0.9 M Tris base, 0.9 M boric acid, 0.02 M EDTA, pH 8.0) ბუფერი + 100 µl Etbr ეთიდიუმ ბრომიდი, ვტოვებთ სანჯღრეველაზე 30წთ. გელს ვათვალიერებთ ულტრაიისფერი სხივების დაშუქებით.

2.16 ფაგის დნმ-ის პლაზმიდაში კლონირება და ტრანსფორმაცია

გამოყოფილი დნმ ის ფრაგმენტები, რომლებიც დაიჭრა *Pst*I და *Hinc*II ფერმენტებით, pBluescript II KS პლაზმიდაში მათთვის შესატყვის საიტებთან დაკავშირებისა და ჩართვისათვის გამოვიყენეთ T4 DNA ლიგაზა (მწარმოებლებისაგან რეკომენდირებული და მოწოდებული პროტოკოლით). *E. coli* DH5α ქიმიურ კომპეტენტურ უჯრედებში ტრანსფორმაციისათვის ზემოთ აღნიშნული ნარევი 30 წთ გავაჩერეთ ყინულზე, 45 წამით 42 °C -ზე, შემდეგ 2 წთ ისევ ყინულზე. შემდეგ კი დავამატეთ 1 მლ SOC ნიადაგი და 1,5 სთ საინკუბაციოდ დავტოვეთ 37 °C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ გადავიტანეთ ამპიცილინისა (100 µg/ml) და X-gal - ის შემცველ აგარიან ფინჯნებზე. (X-gal წარმოადგენს ორგანულ შენაერთს და გამოიყენება კლონირების დროს ლურჯი/თეთრი კოლონიების მისაღებად. კოლონიების შეფერილობა განსაზღვრავს პლაზმიდაში ჩართვას ან არ ჩართვას). ფინჯნები დავტოვეთ თერმოსტატში საინკუბაციოდ. ფინჯნებზე მიღებული თეთრი ფერის კოლონიები მიუთითებდა დნმ-ის ფრაგმენტების პლაზმიდაში ჩართულობაზე. შეირჩა რამდენიმე რეკომბინირებული კოლონია, რომლებიც შევიტანეთ 5 მლ ბულიონში 5 µl ამპიცილინის შემცველობით (100 µg/ml) და შევდგით 37 °C-ზე საინკუბაციოდ. 18 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ კულტურებიდან სპეციალური კიტის - GenElute Plasmid Miniprep (Sigma) დახმარებით გამოვყავით პლაზმიდები. პლაზმიდების რესტრიქცია მოვახდინეთ იმავე ფერმენტებით და ელექტროფორეზის დახმარებით დავადგინეთ პლაზმიდაში ჩართული ფაგების კლონების ზომები (70).

2.17 პლაზმიდის სექვენირება

პლაზმიდაში ჩართული დნმ -ის ფრაგმენტების სექვენირებისათვის გამოყენებულ იქნა T3 და T7 უნივერსალური პრაიმერები.

T3 Sequencing 5'-AATTAACCCTCACTAAAGG-3'

T7 Sequencing 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

სექვენსის შედეგების ანალიზი ჩატარდა Blastn და Blastp პროგრამების გამოყენებით, რის საშუალებითაც ხდება NCBI -ს მონაცემთა ბაზაში არსებულ უამრავ ნუკლეოტიდურ წყვილთან ჰომოლოგიების ძიება.

2.18 ბაქტერიოფაგების მთლიანი გენომის სექვენირება და ანალიზი

მთლიანი გენომის სექვენირებისათვის დნმ გამოყოფილი იყო სტანდარტული მეთოდით. გამოყოფილი დნმ - ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გაშიფვრა განხორციელდა Pyrosequencing -ის მეთოდის გამოყენებით, ხოლო დაბალი ხარისხის სექვენსის შედეგები გაკონტროლდა Beckman CEQ2000 სექვენატორით. გენომი აიწყო Newbler და Phredprap კომპიუტერული პროგრამებით.

ბიონფორმატიკული ანალიზი ჩატარდა Psi-Blast, rps-blast, HHpred და HMMER პროგრამებით (145).

სექვენირებული ფაგის მონაცემთა ბაზა კი შეიქმნა MySQL კომპიუტერული პროგრამის დახმარებით.

2.19 ბაქტერიოფაგებისა და ვერხვის ექსტრაქტის ურთიერთქმედების შესწავლა

ბაქტერიოფაგებისა და ვერხვის ექსტრაქტის ურთიერთქმედების შესასწავლად თხიერ ბაქტერიოფაგს ემატებოდა ვერხვის ექსტრაქტის სხვადასხვა დოზა და თავსდებოდა 37 °C. სინჯებს ალუბა ხდებოდა დროის სხვადასხვა ინტერვალში – 10წთ, 2სთ, 6სთ, 18სთ, 24სთ, 48სთ... და იტიტრებოდა მყარ საკვებ არეზე გრაციას მეთოდით. კონტროლისათვის ვიღებდით ბაქტერიოფაგის სინჯებს დროის იმავე მონაკვეთში ვერხვის ექსტრაქტის დამატების გარეშე.

2.20 საცდელი ბიოკომპოზიტის მიღება და მისი აქტივობის განსაზღვრა

საცდელი ბიოკომპოზიტის მისაღებად დახასიათებული ფაგებისაგან შეიქმნა კოქტეილი და გამოყენებულ იქნა *Poppulus nigra* -ს 30 % წყალხსნარი და 15 % პოლიეთილენგლიკოლიანი ხსნარი. ამასთანავე *Poppulus nigra*-სა და ფაგს შორის ოპტიმალური თანაფარდობის დასადგენად, გაკეთებულ იქნა ორ-ორი ვარიანტი. სულ შეირჩა 4 ვარიანტი:

1. 1 : 1 10მლ ფაგი + 10 მლ 30 % წყალხსნარი
2. 2 : 1 20 მლ ფაგი + 10 მლ 30 % წყალხსნარი
3. 1 : 1 10 მლ ფაგი + 15 % PEG იანი ხსნარი
4. 2 : 1 20 მლ ფაგი + 10 მლ 15 % PEG იანი ხსნარი

თითოეულ ვარიანტს დაემატა საქაროზა - ჟელატინის ნარევი (საერთო მოცულობის 1/5 მლ - ის ოდენობით), კარგად შერევის შემდგომ და 2 – 2 მლ ჩამოისხა ფლაკონებში გასაშრობად.

შრობის შემდეგ აღმოჩნდა, რომ PEG იანი ხსნარები იყო წებოვანი და კარგად არ შრებოდა. ამის გამო, შრობის შემდეგ ფაგის აქტივობა შემოწმებულ იქნა მხოლოდ წყალხსნარებზე. რისთვისაც გამშრალი ფაგი გაიხსნა 2 მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით იტიტრებოდა პატრონ შტამებზე შესაბამის განზავებამდე. შედეგების შედარება ხდებოდა შრობამდე გატიტრული ფაგის ტიტრებთან.

2.21 მოქმედების დიაპაზონი

ბიოკომპოზიტის მოქმედების დიაპაზონის განსაზღვრა ხდება spot test - ის გამოყენებით.

შედეგები

თავი 1. ბაქტერიული შტამების დახასიათება

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* -ს შტამების იდენტიფიკაცია

მუშაობის პროცესში შეიქმნა *Pseudomonas aeruginosa* -ს შტამების კოლექცია, რომელიც 200 იზოლატისაგან შედგება. მათგან 50 შტამი მიღებულია მსოფლიოს სხვადასხვა კლინიკებიდან, მათ შორის 10 - ტრინიდადიდან, ხოლო დანარჩენი 150 კი არის საქართველოში ფსევდომონადური ინფექციებით დაავადებული პაციენტებიდან

გამოყოფილი შტამები. აღნიშნული შტამები გამოყოფილი იქნა სხვადასხვა საკვლევი მასალიდან - ნახველი, ჩირქი, შარდი, ინფიცირებული ჭრილობები და ა.შ.

უცხოეთიდან მიღებული შტამები უკვე იდენტიფიცირებული იყო, როგორც *Pseudomonas aeruginosa* სახეობები და ამიტომ ისინი ხელახალ იდენტიფიკაციას არ საჭიროებდნენ. საქართველოს სხვადასხვა საავადმყოფოებიდან შეგროვილი შტამების იდენტიფიკაცია კი მოვახდინეთ *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკურ მყარ საკვებ არეზე “*Pseudomonas* Agar F • Flo Agar (pH 7.0 ± 0.2)” -ზე გათესვით. ამ ნიადაგით იდენტიფიკაცია დაფუძნებულია *Pseudomonas aeruginosa* -ს მიერ პიგმენტ ფლუორესცინის წარმოქმნაზე, რაც ნიადაგის შემადგენლობაში პეპტონებთან ერთად შემავალი ფოსფორით არის განპირობებული. ფოსფორი ასტიმულირებს ფლუორესცინის წარმოქმნას. შტამების 80 % ამ ნიადაგზე გათესვისას მომწვანო-მოყვითალო შეფერილობას იძლეოდა, რაც დამახასიათებელია *P. aeruginosa* შტამებისათვის, თუმცა *Pseudomonas aeruginosa* -ს ყველა შტამი არ წარმოქმნის ფლუორესცინს და ამიტომ შესაძლოა არ გამოავლინოს მსგავსი შეფერილობა.

P. aeruginosa- ს შტამები იზრდება 4-42°C ინტერვალში, თუმცა ჩვეულებრივ საკვებ ნიადაგზე ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა არის 37 °C.

Pseudomonas - ს ორი შტამი PA25 და PA32, რომლებიც წარმოადგენენ ამ კვლევაში დახასიათებული ბაქტერიოფაგების პატრონ შტამებს, შესწავლილ იქნა VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემის საშუალებით. ამ შტამების VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემის საშუალებით ბიოქიმიური თვისებების შესწავლამ აჩვენა, რომ ორივე შტამი მიეკუთვნება *Pseudomonas aeruginosa* -ს სახეობას.

1.2 Klebsiella - ს შტამების იდენტიფიკაცია

Klebsiella - ს შტამებიდან კვლევის პროცესში ჩვენს ლაბორატორიაში მიღებული იყო 50 შტამი. 25 შტამი წარმოადგენდა უროლოგიური პაციენტებიდან გამოყოფილ კლინიკურ მასალას, ხოლო დანარჩენი 25 შტამი სხვადასხვა საკვლევი მასალიდან იყო გამოყოფილი. 50 შტამიდან 27 იყო მსოფლიოს სხვადასხვა კლინიკებიდან მიღებული შტამები, მათ შორის 9 - აშშ-დან.

ორმოცდაათივე შტამის იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ Herellea-ს საიდენტიფიკაციო აგარი, რომელზეც ყველა გათესილი შტამი გაიზარდა მოყვითალო შეფერილობით, რაც ამ გვარის წარმომადგენლებისათვის არის დამახასიათებელი.

50 - დან 9 შტამის ზუსტი იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ PCR-ის მეთოდი *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* - ს სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით. მათგან 5 შტამი აღმოჩნდა *Klebsiella pneumoniae*-ს პოზიტიური, დანარჩენი 4 შტამი კი ორივე პრაიმერის მიმართ უარყოფით შედეგს იძლეოდა. ამ კვლევაში გამოვიყენეთ აგრეთვე FimH და mrkD სპეციფიკური პრაიმერები, რაც აღნიშნული შტამების მიერ კლებსიელას ზოგიერთი შტამისათვის დამახასიათებელი ფიმბრიების წარმოქმნის უნარზე მიუთითებდა (87, 138). ამ მიმართებით ხუთი შტამი აღმოჩნდა პოზიტიური. კიდევ 73 *Klebsiella*-ს შტამი კი, რომელიც ასევე გამოყენებული იყო ჩვენს კვლევაში ინახება ლესტერის უნივერსიტეტის ერთ-ერთი დეპარტამენტის (Department of Infection, Immunity and Inflammation) მიკრობთა კოლექციაში. აღნიშნული შტამები შეგროვილ იქნა ქალაქ ლესტერის (ინგლისი) სხვადასხვა საავადმყოფოებიდან. 73 შტამიდან 50 იდენტიფიცირებული იყო როგორც *Klebsiella pneumoniae* -ს წარმომადგენელი, 11 შტამი *Klebsiella oxytoca* -ს წარმოადგენს, ხოლო 12 შტამის ზუსტი სახეობა დადგენილი არ არის. ჩვენს კვლევებში ამ შტამების განმეორებითი იდენტიფიკაცია არ მოგვიხდენია.

ექსპერიმენტების დროს გამოყენებული ფაგების პატრონ შტამები დამატებით იდენტიფიცირებულ იქნა VITEK 2 სისტემის საშუალებით. ამ მონაცემებით *Klebsiella* 3 და *Klebsiella* 6 წარმოადგენენ *Klebsiella oxytoca* -ს სახეობას 99 % - იანი იდენტიფიკაციით. *Klebsiella* 26 და 33 ავლენენ ასევე 99 % - იან, ხოლო *Klebsiella* 80 - 98 % - ით მსგავსებას *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* - სთან.

თავი 2. *Pseudomonas aeruginosa* -ს ბაქტერიოფაგების დახასიათება

2.1 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა

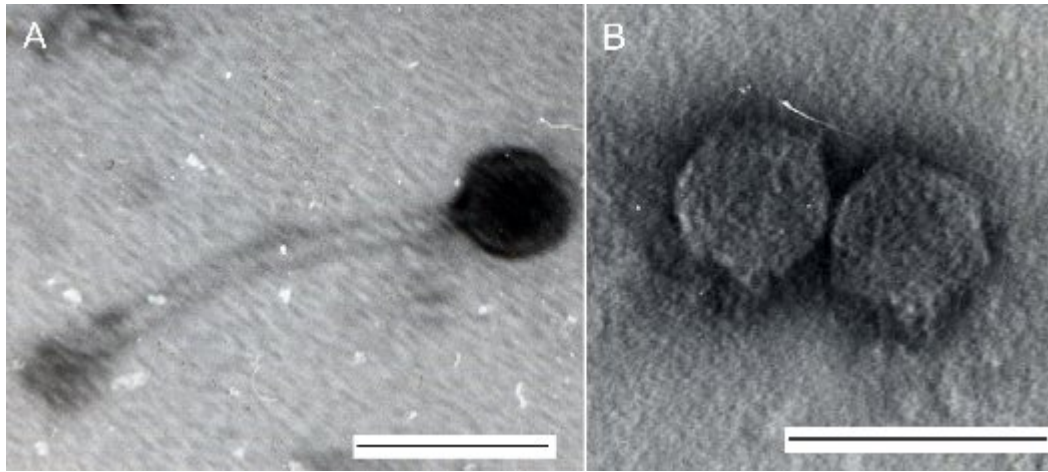
P. aeruginosa - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მისაღებად ჩვენს ლაბორატორიაში არსებულ რეზისტენტულ შტამებს პერიოდულად ვთესავდით საქართველოს სხვადასხვა ადგილებიდან აღებულ ჩამდინარე წყლებში. მიღებული ფილტრატების შემოწმება ხდებოდა ჩვენ მიერ უკვე აღწერილი Spot tset - ის მეთოდით. საბოლოოდ ფილტრატების მრავალჯერადი პასაჟის შედეგად მივიღეთ ორი ბაქტერიოფაგი: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32*, რომელთა პატრონი შტამებია *P. aeruginosa* PA25 და PA32. ბაქტერიოფაგების დასახელებიდანაც ჩანს, რომ *vB_Pae-Kakheti25* გამოყოფილია კახეთის ჩამდინარე წყლიდან, ორივე ფაგი და მათი პატრონი შტამები გ. ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის გარდა ინახება გერმანიის მიკროორგანიზმთა და უჯრედული კულტურების კოლექციაში (DSMZ) შესაბამისი ნომრებით: *vB_Pae-Kakheti25* - DSM 25636 და *vB_Pae-TbilisiM32* - DSM 25635, ხოლო მათი პატრონი შტამების ნომრებია PA25 DSM 25642 და PA32 DSM 25641.

vB_Pae-Kakheti25 და *vB_Pae-TbilisiM32* ფაგების გამრავლებისათვის შეირჩა BHIB/A საკვები ნიადაგი (pH – 7.0 - 7.4), ხოლო ზრდისათვის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30 – 37 °C. გამრავლების შემდეგ ფაგის ტიტრები გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდის მიხედვით იყო *vB_Pae-Kakheti25* 1×10^{11} , ხოლო *vB_Pae-TbilisiM32* 5×10^{10} ნაწ/მლ, ხოლო აპელმანის მეთოდით 10^{-6} (ფ.ნ/მლ).

2.2 *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბიოლოგიური დახასიათება

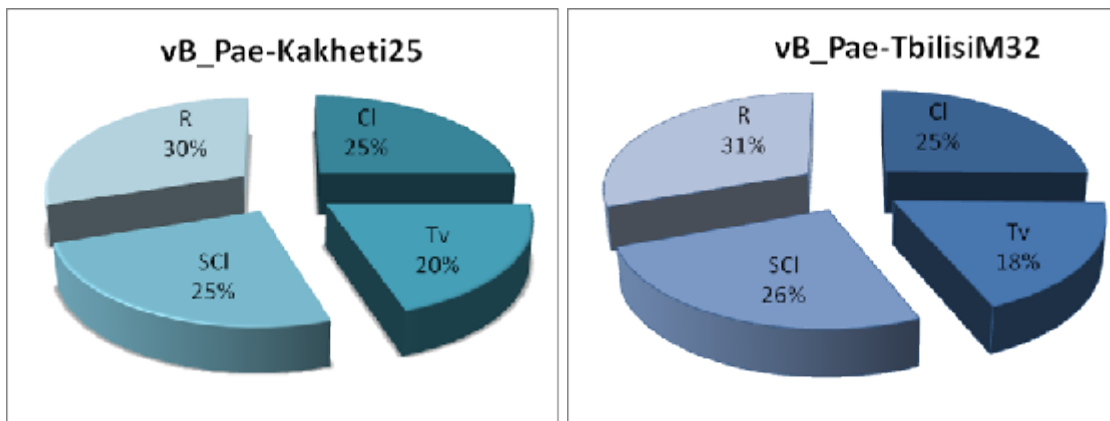
P. aeruginosa - ს სპეციფიკური ორივე ბაქტერიოფაგი *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* წარმოქმნის დიდი ზომის კოლონიებს ნათელი ცენტრით. აღნიშნული ბაქტერიოფაგების მორფოლოგია და ზომები შესწავლილ იქნა ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით. ელექტრონულმა მიკროსკოპიამ აჩვენა, რომ *vB_Pae-Kakheti25* მიეკუთვნება *Siphoviridae* -ს ოჯახს, 166.6 nm სიგრძის უკუმშვადი კუდითა და 55.5 nm თავის დიამეტრით. *vB_Pae-TbilisiM32* კი წარმოადგენს *Podoviridae*-ს ოჯახს, 60 nm თავის დიამეტრითა და ძალიან მოკლე კუდით. (ილუსტრაცია 2)

ილუსტრაცია 2: *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგის *vB_Pae-Kakheti25* (ა) და *vB_Pae-TbilisiM32* (ბ) ელექტრონული მიკროსკოპია



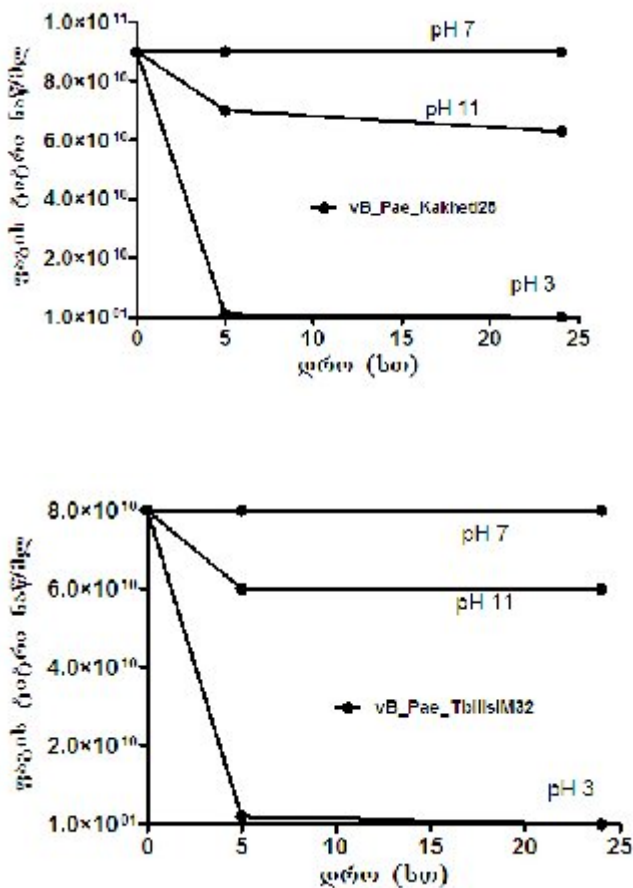
ბაქტერიოფაგების *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ლიზისური აქტივობისა და მოქმედების დიაპაზონის შესასწავლად გამოყენებული იყო *P. aeruginosa*-ს 200, *Klebsiella*-ს 12, 10 *Esherichia coli*-ს, 12 *Enterococcus*-ს, 11 *Staphylococcus* - ისა და 15 *Streptococcus* - ის შტამები. დადგინდა, რომ ორივე ფაგი ხასიათდებოდა მაღალი (70 %) აქტივობით *P. aeruginosa* -ს შტამების მიმართ. მათი მოქმედების სპექტრი მცირედ განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან და შტამების მხოლოდ 10 % იყო ორივე ფაგის მიმართ რეზისტენტული. (გრაფიკი 1)

გრაფიკი 1: *vB_Pae-Kakheti25* (ა) და *vB_Pae-TbilisiM32* (ბ) ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა და სპექტრი



ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა და მდგრადობა გარემოს ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორებისადმი შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ტემპერეტურისა და pH-ის პირობებში. შედეგებმა გვაჩვენა, რომ *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ინარჩუნებენ ცხოელმყოფელობას 5 -11 pH-ის ფარგლებში, pH- 3-ზე კი 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მაინც ინარჩუნებებენ ტიტრს $2 \cdot 10^3$ -მდე *vB_Pae-Kakheti25*, ხოლო $3 \cdot 10^3$ *vB_Pae-TbilisiM32*. (გრაფიკი 2, ა) ხოლო ტემპერატურული ინაქტივაცია კი ხდებოდა 70°C-ზე. (გრაფიკი 2, ბ)

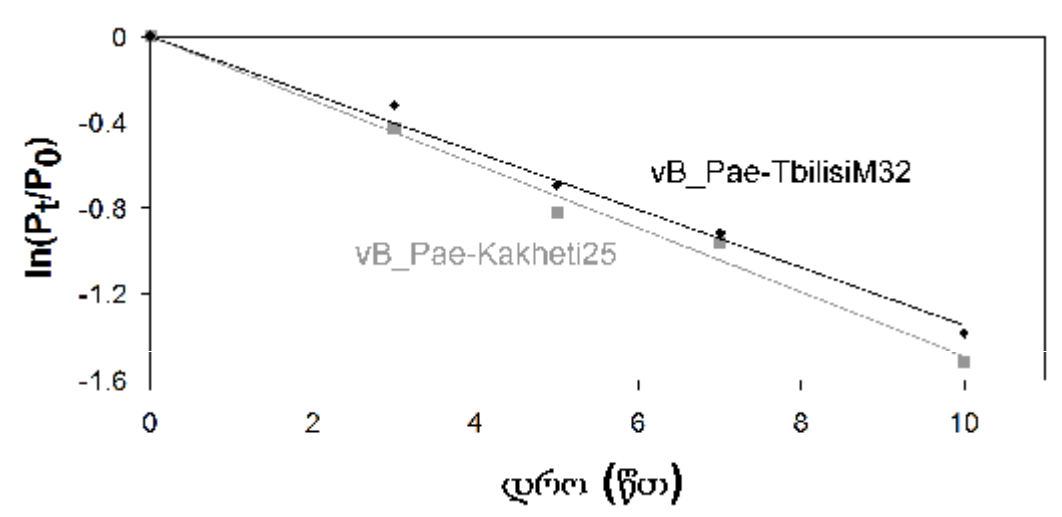
გრაფიკი 2: *vB_Pae-Kakheti25* (ა) და *vB_Pae-TbilisiM32* (ბ) ბაქტერიოფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა pH-ის პირობებში



ბიოლოგიური მახასიათებლებიდან მეტად მნიშვნელოვანია ფაგის ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი. კუდიანი ბაქტერიოფაგების გამრავლების პირველი ეტაპი არის სამიზნე მიკრობზე ადსორბცია, რაც სპეციალური სპიკების ან

ფიმბრიების საშუალებით ხდება. ადსორბციის სიჩქარე და ეფექტურობა მნიშვნელოვანი პარამეტრებია, თუმცა ეს პარამეტრები შეიძლება შეიცვალოს სხვადასხვა გარემო ფაქტორებისა და მასპინძლის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის გავლენით. ექსპერიმენტებმა გვაჩვენა რომ, *P. aeruginosa* - ს ორივე სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი ხასიათდებოდა მოკლე ლატენტური პერიოდით, მაღალი გამოსავლითა და ადსორბციის საკმარისი სიჩქარით. კერძოდ, ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტა ბაქტერიოფაგების *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32*-ისათვის შესაბამისად იყო 2.7×10^{-8} და 3.0×10^{-8} მლ/წთ, ადსორბციისათვის საჭირო დრო კი ორივე ფაგისათვის 10 წთ. -ს წარმოადგენდა. (გრაფიკი 3)

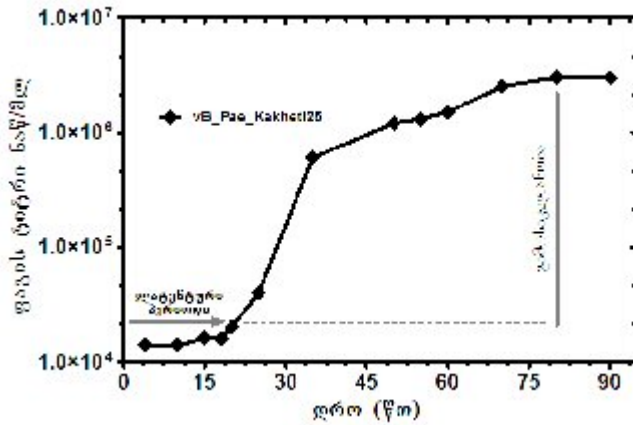
გრაფიკი 3: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგების ადსორბცია



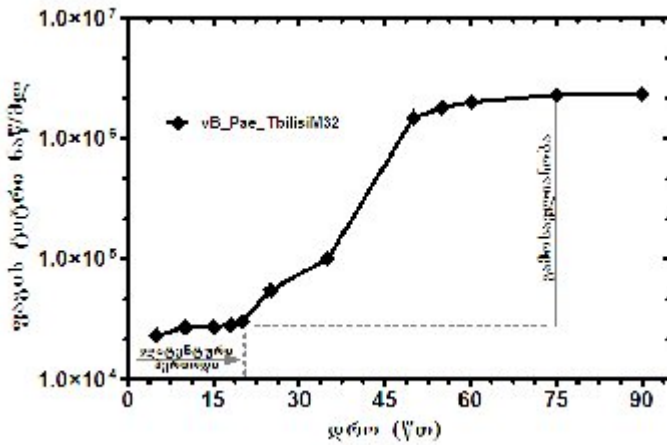
ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლით, ჩვენ მიერ დადგინდა იქნა, რომ ორივე ფაგის შემთხვევაში ლატენტური პერიოდი გრძელდება 20 წუთს, ხოლო *vB_Pae-Kakheti25* ფაგის საშუალო გამოსავალი ერთი ინფიცირებული ბაქტერიული უჯრედიდან შეადგენს 130 ნაწ/მლ. *vB_Pae-TbilisiM32* -ის საშუალო გამოსავალი კი არის 210 ნაწ/მლ. (გრაფიკი 4 ა და ბ)

გრაფიკი 4: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

ა.



ბ.



2.3 *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების vB_Pae-Kakheti25 და vB_Pae-TbilisiM32 სეროლოგიური დახასიათება

P. aeruginosa - ს ბაქტერიოფაგების ანტიგენური თვისებების დადგენისა და მათ შორის ნათესაური კავშირის შესწავლისათვის გამოვიყენეთ ნეიტრალიზაციის რეაქცია. ამ მიზნით ჩვენ მიერ კურდღლების იმუნიზაციის შედეგად მივიღეთ *P. aeruginosa* ბაქტერიოფაგის vB_Pae-Kakheti25 (*Siphoviridae*) ანტიფაგური შრატი,

რომელიც თავის მხრის ფრინდის სრული ადიუვანტის გამოყენებით იქნა მიღებული. ანტიგენის სახით გამოვიყენეთ ბაქტერიოფაგების კონცენტრატები ტიტრით 10^{11} ფ.ნ/მლ.

ნეიტრალიზაციის რეაქციის შედეგად ვნახეთ, რომ *vB_Pae-Kakheti25* შრატი ანეიტრალებს *vB_Pae-Kakheti25* ფაგს. თუმცა არ ანეიტრალებს *vB_Pae-TbilisiM32* ფაგს, რომელიც მიეკუთვნება *Podoviridae* - ს. რაც მოწმობს, რომ ამ ფაგებს შორის სეროლოგიური კავშირი არ არსებობაზე. (ცხრილი 2)

ცხრილი 2: *Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგების ნეიტრალიზაციის რეაქცია.

ფაგის დასახელება	მორფოლოგია	<i>vB_Pae-Kakheti25</i> ანტიფაგური შრატის განზავება	ნეიტრალიზაციის დრო (წთ)	ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა წთ ⁻¹	ნეიტრალიზაციის პორცენტი
<i>vB_Pae-Kakheti25</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:500	5	345	96.8
<i>vB_Pae-Kakheti25</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:500	10	-	95.7
<i>vB_Pae-Kakheti25</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:500	20	-	96.5
<i>vB_Pae-Kakheti25</i>	<i>Siphoviridae</i>	1:500	30	-	97
<i>vB_Pae-TbilisiM32</i>	<i>Podoviridae</i>	1:500	5	-	-
<i>vB_Pae-TbilisiM32</i>	<i>Podoviridae</i>	1:500	10	-	-
<i>vB_Pae-TbilisiM32</i>	<i>Podoviridae</i>	1:500	20	-	-
<i>vB_Pae-TbilisiM32</i>	<i>Podoviridae</i>	1:500	30	-	-

2.4 *P. aeruginosa* - ს ფაგის *vB_Pae-Kakheti25* ანტიბაქტერიული მოქმედების განზსაზღვრა *Galleria mellonella* -ს მოდელზე

დღესდღეობით *Galleria mellonella* -ს მოდელი ფართოდ გამოიყენება ლაბორატორიულ პირობებში ინფექციური მოდელის შექმნისათვის. მიუხედავად იმისა, რომ ცხოველურ მოდელთან შედარებით ბევრად უფრო პრიმიტიულ და მარტივ პროცედურას საჭიროებს, *Galleria mellonella* -ს მსგავს ორგანიზმზე

სხვადასხვა ცდების ჩატარება საშუალებას გვაძლევს, რომ ბაქტერიოფაგის ანტიბაქტერიული მოქმედება ცოცხალ ორგანიზმზეც შევამოწმოთ.

ჩვენი ცდისათვის გამოვიყენეთ *Pseudomonas aeruginosa* სტანდარტული შტამი PA14. ამ მოდელის შექმნამდე ჩვენ მიერ შესწავილი ფაგის *vB_Pae-Kakheti25*-ის აქტივობა ამ შტამის მიმართ შევამოწმეთ სტანდარტული Spot test-სა და ორშრიანი აგარის მეთოდების გამოყენებით. შედეგმა გვაჩვენა, რომ ფაგ *vB_Pae-Kakheti25* საკმაოდ ძლიერი მოქმედება ჰქონდა აღნიშნული შტამის მიმართ, ტიტრი კი იყო 10^{11} ფ.ნ/მლ.

PA14 შტამის შეყვანა ხდებოდა ინსულინის ნემსით სპეციალური ინჟექტორის დახმარებით. მიკრობის შეყვანის შემდეგ მუხლუხოებს ვდებდით თერმოსტატში 1 საათით და ერთი საათის შემდეგ ვახდენდით ფაგის ინექციას. იმისათვის რომ ექსპერიმენტის ცდომილება გაგვეთვალისწინებინა, თავდაპირველად მუხლუხოები გავანაწილეთ PA14 A და PA14 B ჯგუფებში. სადაც პრაქტიკულად ერთიდაიმავე დროს ერთი და იგივე პროცედურები ორ ვარინტად იქნა ჩატარებული. PA14 A და PA14 B ჯგუფებში კი თავის მხრივ ოთხი ჯგუფი გამოვყავით, თითოეულში შედიოდა 7 ცალი *Galleria*.

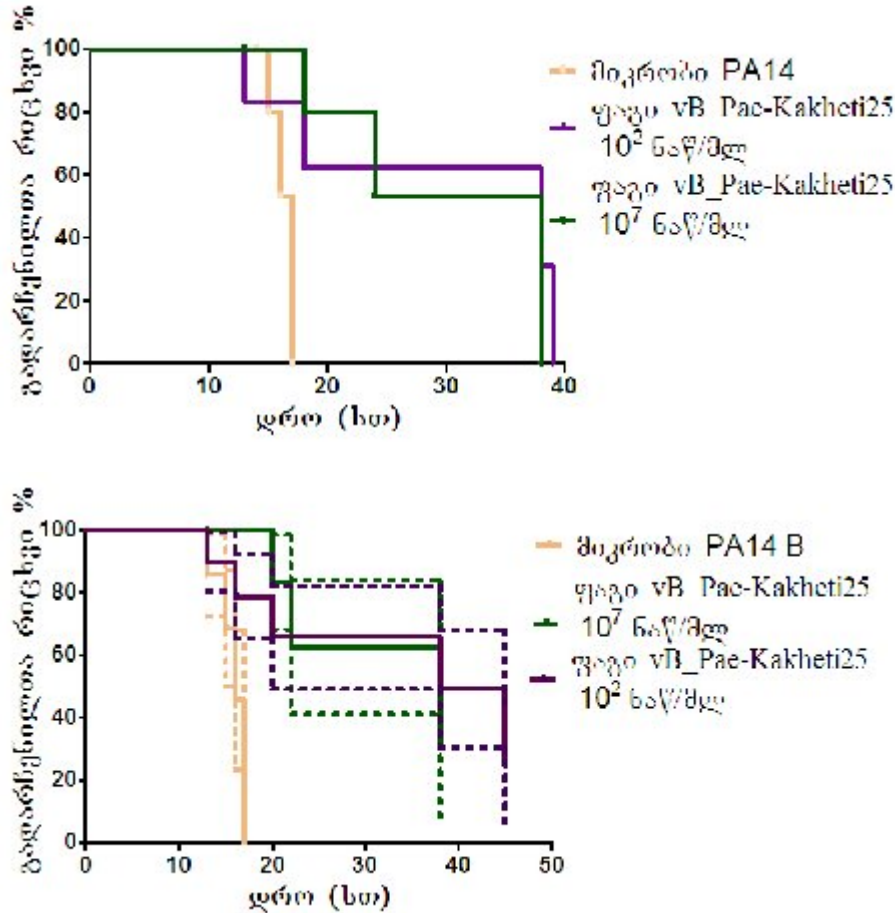
პირველი ჯგუფი იყო საკონტროლო ჯგუფი, რომელთაც ინექცია უკეთდებოდათ მხოლოდ 10 mM MgSO₄ -ის ხსნარით. საკონტროლო ჯგუფში მთელი ექსპერიმენტის მანძილზე არც ერთი მუხლუხო არ მომკვდარა.

მეორე ჯგუფის მუხლუხოებს შევუყვანეთ მხოლოდ PA14 A და PA14 B შტამები შესაბამისი ტიტრებით 1.6×10^5 და 1.8×10^5 უჯრ/მლ. PA14 A -ს მიკრობთა ჯგუფში ინექციიდან 17 საათის შემდეგ ყველა გალერია დაიხოცა, ისევე როგორც PA14 B -ს ჯგუფში.

მესამე ჯგუფში თავდაპირველად შევიყვანეთ მიკრობი, ხოლო ერთი საათის შემდეგ ფაგი *vB_Pae-Kakheti25* ტიტრით 10^2 ფ.ნ/მლ. ამ ჯგუფში PA14 A -ს შემთხვევაში 3 დაილუპა 10 საათის შემდეგ, ასევე, 13 საათის შემდეგ 2 დაილუპა PA14 B -ში. ხოლო დაახლოებით 40 საათში ყველა დაიხოცა PA14 A -ს ჯგუფში და 48 სთ-ში PA14 B -ში.

მეოთხე ჯგუფში განსხვავება იყო მხოლოდ ფაგის ტიტრში, სადაც ინექცია გაუკეთდათ 10^7 ფ.ნ/მლ ფაგით. ამ PA14 A -ის ამ ჯგუფში 18 საათის შემდეგ მხოლოდ ერთი დაილუპა და ყველა დანარჩენი დაახლოებით 40 საათის შემდეგ დაიხოცა. PA14 B -ს შემთხვევაში პირველი მუხლუხო დაილუპა 20 საათის შემდეგ, ხოლო დანარჩენები - PA14 A ჯგუფის მუხლუხოების მსგავსად. (გრაფიკი 5 ა და ბ)

გრაფიკი 5: *Galleria mellonella*-ს ინფექციური მოდელის დროს გადარჩენილი მუხლუხობების რიცხვი PA14 A ჯგუფში (ა) და PA14 B ჯგუფში (ბ)



Galleria mellonella-ს მოდელზე განმეორებითი ექსპერიმენტის დროს დავამატეთ კიდევ ორი ჯგუფი, რომელთაგან ერთ ჯგუფს ინექცია უკეთდებოდა ანტიბიოტიკ გენტამიცინით. ეს ანტიბიოტიკი შევარჩიეთ იმ მიზეზით, რომ მისი მგრძობელობა *Pseudomonas aeruginosa* PA14 შტამზე უკვე განსაზღვრული იყო. მუხლუხობების მეორე ჯგუფს შევუყვანეთ ფაგი და ანტიბიოტიკი კომბინაციაში (10 µl ფაგი გავხსენით 100 µl გენტამიცინის ხსნარში). დანარჩენ ჯგუფებს კი ყველაფერი იმავე პროცედურით ჩაუტარდათ. ექსპერიმენტის შედეგად ვნახეთ, რომ 40 საათის შემდეგ ფაგიან და ანტიბიოტიკიან ჯგუფებშიც ყველა *Galleria* დაიხოცა, ხოლო ფაგი + ანტიბიოტიკიან ჯგუფში 72 საათის შემდეგ 10-დან 4 ჯერ კიდევ ცოცხალი იყო.

2.5 *P. aeruginosa* - ს ბაქტერიოფაგების *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* გენეტიკური დახასიათება. ფაგების მთლიანი გენომის სექვენსის ანალიზი

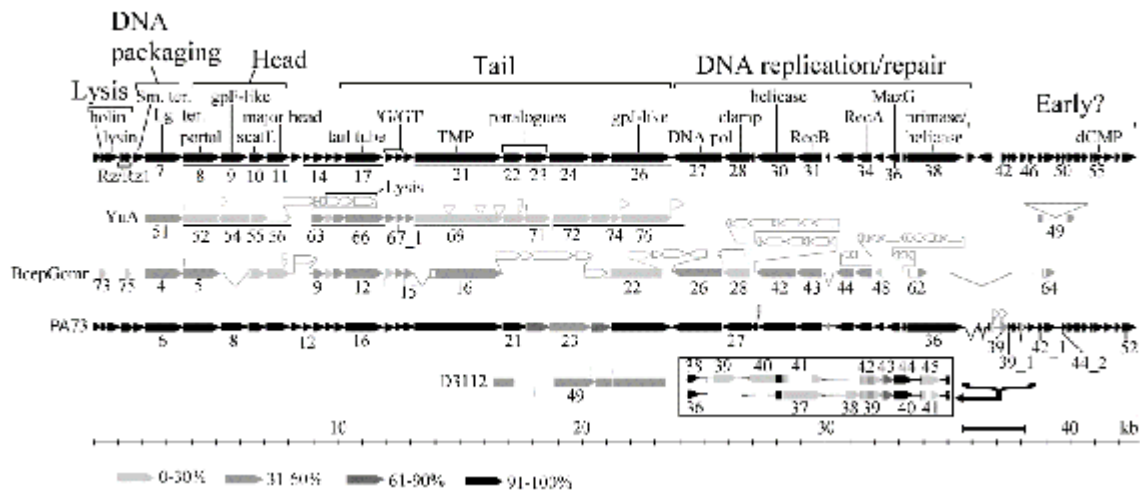
P. aeruginosa ბაქტერიოფაგების გენეტიკურ დახასიათებას დიდი მნიშვნელობა აქვს პრეპარატის შექმნისათვის. *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ფაგების დნმ-ი გამოვყავით მეთოდების თავში აღწერილი სტანდარტული ფენოლური ექსტრაქციით. რესტრიქციული ანალიზისათვის გამოვიყენეთ რესტრიქციული ენზიმები: BamHI, EcoRI, HindIII, SspI, FspI და DdeI. დნმ-ის ფრაგმენტირება ხდებოდა 0.8 % აგაროზს გელში. რესტრიქციული ანალიზის შედეგად აღმოჩნდა, რომ BamHI და DdeI ენზიმების მიმართ ორივე ფაგის დნმ-ი ავლენდა რეზისტენტობას.

vB_Pae-Kakheti25 ფაგის გენომის სრულმა სექვენირებამ აჩვენა, რომ გენომის სიგრძე 42,844 bp შეადგენს, ხოლო გენები წრიულადაა განლაგებული. G + C შემადგენლობა შეესაბამება 53.7 % -ს. პროტეინებთან მსგავსების ძიების მეთოდით 58 orf -ის (ღია წაკითხვის ჩარჩო) უმეტესობა იდენტიფიცირდა მოფუნქციონირედ.

არავითარი ტ-რნმ - ის გენები და მობილური ინტორნები არ იქნა იდენტიფიცირებული. ფაგის გენომი ამჟღავნებდა მაღალ მსგავსებას *Pseudomonas* PA73 ფაგთან (84). (164) გარდა 2.6- kb რეგიონისა, რომელიც, სავარაუდოდ, მდებარეობს ადრეული გენების რეგიონში (ილუსტრაცია 3).

vB_Pae-Kakheti25 ფაგის სექვენსის შედარებამ რამდენიმე სხვა ფაგთან ასევე გვაჩვენა: 1. *vB_Pae-Kakheti25* ფაგის სტრუქტურული ცილა კომპლემენტი მსგავსია უკვე კარგად დახასიათებული *Pseudomonas* ფაგ YuA-სა (30) (165), *Siphoviridae*-თვის დამახასიათებელი ბაზალური ფირფიტის ნათესაურად დაკავშირებული ცილების ნაკრების ჩათვლით (gps 22-26). თუმცა YuA-ს კავსიდის მთავარი პროტეინი, რომელიც თავის წაგრძელებულ ფორმას განსაზღვრავს, შეცვლილია *Siphoviridae* -თვის უფრო მეტად დამახასიათებელი თავის პროტეინით, ეს ცილა კი *vB_Pae-Kakheti25* ფაგის სიმეტრიულ თავის ფორმას განაპირობებს. 22 -26 გენები ბაზალურ ფირფიტასა და კუდის ფიმბრიებს წარმოქმნიან, რომლებიც მასპინძელი უჯრედის ამოცნობას ახორციელებენ. მათი ჰიპერვარიანობა აშკარად ჩანს PA73 - თან მონათესავე ფაგებთან BcepGomr-სა და D3112-ის ძლიერი განსხვავების გამო(153)

(166). ლამბდა ფაგის კუდის ცენტრალური ფიბრის gpJ-თან (154) (167) მსგავსებიდან გამომდინარე შესაძლებელია მასპინძლის მთავარი ანტი-რეცეპტორით gp26 -ის C ტერმინალური დომენის დაკავება. ფაგების ამ ჯგუფისთვის დამახასიათებელია ამ დომენის მაღალი ჰიპერვარიბელურობა, რაც მისი YuA-სა და ასევე მასთან უახლოეს არა - *Pseudomonas* ფაგ BcepGomr -ში (NC_009447) არის დახასიათებული. ეს ყველაფერი კი, მიუთითებს იმაზე, რომ მასპინძლის ამოცნობაზე პასუხისმგებელია არა ერთი, არამედ რამდენიმე დომენი.



ილუსტრაცია 3: *vB_Pae-Kakheti25* ფაგის მთლიანი გენომი

vB_Pae-TbilisiM32 ფაგის სექვენსმა აჩვენა, რომ აღნიშნული ფაგი phiKMV ჯგუფის ფაგების მსგავსია და 99 % -ით *Pseudomonas* PT5-ფაგის იდენტურია (29). (168) დნმ-ის სიგრძე არის 42,966 bp, რომელიც შეიცავს 423 bp სიგრძის ტერმინალურ განმეორებებს, რაც ასევე ჯგუფის phiKMV ფაგებისთვის არის დამახასიათებელი (88). (169) გენომის სექვენსმა აჩვენა, რომ დნმ შეიცავს 62,3 % G + C და 50 orf-ს. გენების თანმიმდევრობა ისეთივეა, როგორც phiKMV ში, რამდენიმე გამონაკლისის გარდა:

(1) Gp6 გენისთვის სტარტ კოდონის მდებარეობა აღინიშნა „downstream“, რაც არის განპირობებული *vB_Pae-TbilisiM32* და phiKMV-ს მსგავს სხვა გენომებში არსებული სტოპ კოდონების თავიდან ასაცილებლად.

(2) რეპლიკაციური ჰელიკაზა (gp 15) phiKMV-ს ჯგუფის ფაგებთან შედარებით, 25 კოდონით „upstream“ იწყება, რაც არა-phiKMV ჯგუფის წარმომადგენლების ჰელიკაზებთან მსგავსებას განაპირობებს.

(3) Gp13 და gp28 გენები HHpred ძიების შედეგად დადგინდა, რომ აცეტილტრანსფერაზებს აკოდირებენ.

(4) Gp16 - ნუკლეოტიდილ-ტრანსფერაზას დომენს წარმოადგენს, ეს პროტეინი ძალიან მცირე ზომისაა და არ შეიძლება წარმოადგენდეს არც ტ-რნმ ის CCA-დამამატებელ ენზიმს და არც poly(A) პოლიმერეზას, თუმცა აქვს ppGpp სინთეტაზისათვის დამახასიათებელი ზუსტი ზომა და დომენის ორგანიზაცია. (nucleotidyl ტრანსფერაზის დომენი). nucleotidyl ტრანსფერაზის დომენის შესაძლო ფუნქციებისათვის, ეს პროტეინი ძალიან პატარაა, რომ იყოს ტ-რნმ ის CCA-ის დამამატებელი ენზიმი ან poly(A) პოლიმერეზა).

(5) გამოვლინდა (აღინიშნა) მოკლე ჩარჩო (frame) 25 - სა და 26 - ს გენებს შორის. ეს ჩარჩო არსებობს, თუმცა არ არის ანოტირებული phiKMV-ში. ის ანოტირებულია phiKMV-ის მსგავს სხვა ხუთ ფაგში.

(6) Gp38 - ი აღინიშნება როგორც კუდის სპიკების კაფსიდური მიმაგრების დომენი და Gp40- ი როგორც კუდის სპიკების ლიზოსომის დომენი.

Podoviridae - ის მიერ მასპინძელი უჯრედის შეცნობა ხდება ექვსად მოლუნული კუდის ფიმბრიებისაგან, რომლებიც დაკავშირებული არიან და გამოდიან კაფსიდური კუდის მილიდან, რაც აღწერილია ეფსილონ 15 gp20 - ის cryo-EM-ით ჩატარებულ (ელექტრონული მიკროსკოპი) კვლევებში (66).(170) *Podoviridae* -ის უმრავლესობაში ფიმბრიის მონაღუნი ერთი დიდი პოლიიპეპტიდის ტრიმერს წარმოადგენს. ამ ცილის მხოლოდ N- ტერმინალ დომენია დამახასიათებელი *Podoviridae* - ის უმრავლესობისათვის. დანარჩენი სეგმენტები კი ვარიირებდა და ხშირად შეიძლება არა-*Podoviridae* -ს წარმომადგენელი ფაგის ჰომოლოგიური იყოს.

შემადგენელი პროტეინების იდენტიფიცირებისათვის მასსპექტრომეტრული ანალიზი ჩავატარეთ დაუზიანებელ და უ-დნმ-ოვირიონებზე. ყველა პროტეინი, რომელიც მოსალოდნელი იყო და დამახასიათებელია phiKMV-ის მსგავსი ვირიონისათვის აღმოჩნდა დაუზიანებელ ვირიონებში, რომელთაგან სამი პროტეინის ადგილმდებარეობა ჯერჯერობით უცნობია (gps 29,47,48). (ცხრილი 3) რამდენიმე პროტეინი, რომლებიც არ მიიჩნევიან ვირიონის პროტეინებად ასევე აღმოჩნდა მოწიფულ ვირიონებშიც (gps 20, 33, 37, 45, 50). უ-დნმ-ო ვირიონებში არ აღმოჩნდა კუდის მილის (hub) პროტეინები (gps 33, 34). *Podoviridae* წარმომადგენელი ფაგების ინფექციური პროცესი შეიძლება განიხილოს რამდენიმე ნაირად: (1) კუდის

ღერძი (hub) იხსნება და წარმოქმნის მილს, რომელიც გრძელდება ვირიონის Internal პროტეინით რათა დნმ-ს უჯრედში გადასვლის საშუალება მისცეს (32).(171) (2) სხვა მოსაზრებით კუდის ღერძი იცვლის მდებარეობას და ინტერნალ ვირიონის პროტეინს საშუალებას აძლევს წარმოქმნას ინჟექციის მილი დნმ-ის შესასვლელად (31).(172) ჩვენი შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ კუდის ღერძის შეჭრა კომპლექსური პროცესია. მხოლოდ Gp37 ის შეკავება ინტერნალურ ვირიონის პროტეინებს შორის ხსნის იმას, რომ ეს კომპონენტი phiKMV -ს მსგავს ფაგებში წარმოადგენს ინჟექციის კუდის შემადგენელ კომპონენტს და კაფსიდის პროქსიმალურია.

ცხრილი 3 *vB_Pae-TbilisiM32* მასსპექტრომეტრული ანალიზი

Gp ^a ფუნქცია	დანიშნული სპექტრის რისკხვი	
	მოწუფული ვირიონები	ვირიონები ნაკლები დნმ-ით
12 ?	19	2
16 ppGpp სინთეტაზა	3	0
18 ?	3	0
20 ?	2	0
24 3' - >5' ეკზო	8	0
29 ?	13	8
30 პორტალი (Portal)	30	28
32 კაფსიდის მთავარი პროტეინი	301	186
33 კუდის მილი A (hub)	4	0
34 კუდის მილი B (hub)	20	0
35 ვირიონის შიდა პროტეინი (Internal virion protein)	8	0
36 ვირიონის შიდა პროტეინი, C-ტერმინალური ლიზოციმის დომეინი	53	0
37 ვირიონის შიდა პროტეინი (Internal virion protein)	56	27
38 კუდის ფიმბრია, ვირიონზე მიმაგრება	12	7
39 კუდი ფიმბრია	0	1 ^b
40 კუდის ფიმბრია, ლიზოციმი	18	9
41 კუდის ფიმბრია	10	2
47 კუდის დამხმარე სპიკი	11	5
48 კუდის დამხმარე სპიკი	3	3 ^b

? უცნობია, ^a მინიმუმ ორი პეპტიდი მოითხოვება, 95 % პეპტიდურ მსგავსება, 99 % პროტეინული მსგავსება Scaffold (კომპიუტერული პროგრამით)

^b Required lowered stringency to assign these spectra

თავი 3. *Klebsiella* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება

3.1 *Klebsiella*-ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, მორფოლოგიისა და მოქმედების სპექტრის შესწავლა

Klebsiella -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად კვლევის პროცესში შეგროვილ შტამებს ვთესავდით სხვადასხვა დროს სხვადასხვა ადგილიდან აღებულ ჩამდინარე წყლებში. შედეგად მივიღეთ 10 ფილტრატი, თუმცა მომდევნო კვლევებისათვის შევარჩიეთ ექვსი ფაგი, რომელთა პატრონი შტამებია *K. pneumoniae* (KP1, KP80, KP163, KP26, KP33) და *K. oxytoca* (KO 6). საბოლოოდ მივიღეთ *K. Pneumoniae* სპეციფიკური ხუთი და *K. oxytoca* -ს საწინააღმდეგო ერთი ფაგი, რომელთაც ვუწოდეთ სახელები შესაბამისი პატრონი შტამების მიხედვით: *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2*. (აღნიშნული ბაქტერიოფაგები შესაბამისი შტამებით ინახება გ. ელიავას სახ. ბმვ ინსტიტუტის კოლექციაში.)

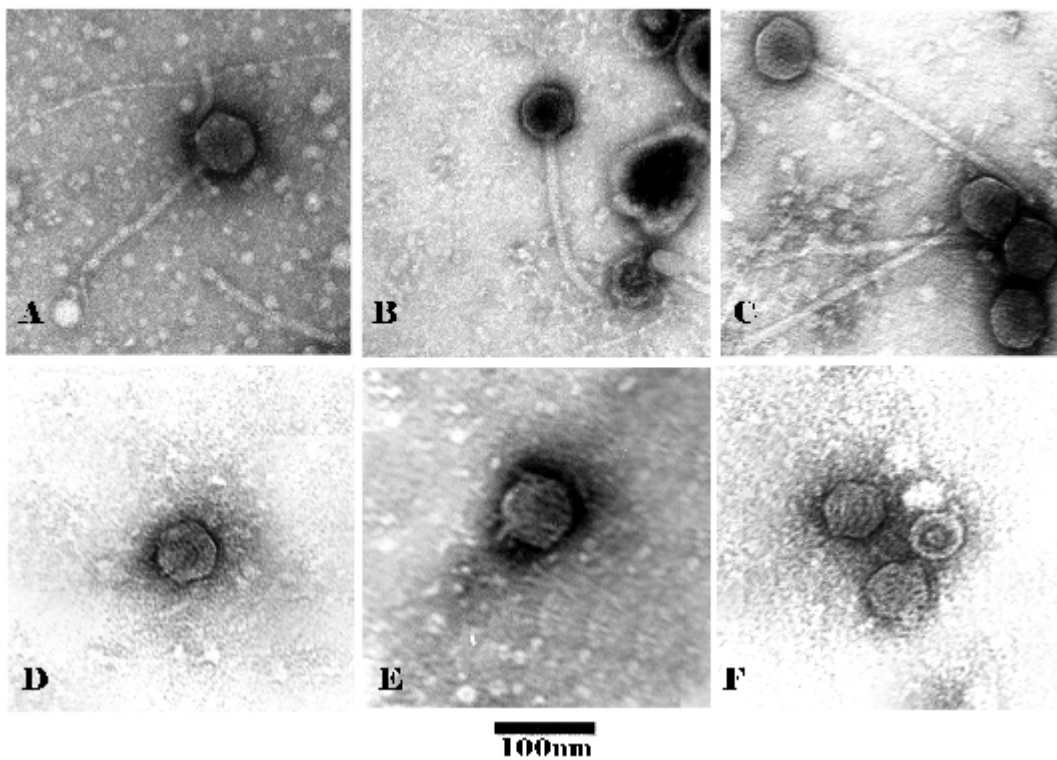
ექვსივე ფაგი წარმოქმნის 2-3 მმ დიამეტრის ნათელ ცენტრიან კოლონიებს. ფაგების გასამრავლებად შეირჩა BHIB/A - ისა და LB/LA -ს საკვები ნიადაგები (pH – 7.0 - 7.4), ხოლო ზრდისათვის ოპტიმალურ ტემპერატურას წარმოადგენდა 30 – 37 °C. გამრავლების შემდეგ ფაგის ტიტრები იყო: ცხრილი 4

ცხრილი 4: ბაქტერიოფაგების *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ტიტრები

ფაგის დასახელება	გრაცის მეთოდით ფ.ნ/მლ	აპელმანის მეთოდით
<i>vB_Klp_1</i>	6×10^8	10^{-4}
<i>vB_Klp_3</i>	8×10^9	10^{-4}
<i>vB_Klp_4</i>	9×10^9	10^{-5}
<i>vB_Klp_5</i>	4×10^9	10^{-4}
<i>vB_Klp_6</i>	2×10^{10}	10^{-5}
<i>vB_Klox_2</i>	3×10^8	10^{-4}

ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიური თვისებები შევისწავლეთ ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით. ელექტრონულმა მიკროსკოპიამ გვაჩვენა, რომ ექვსი ფაგიდან სამი: *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_1* მიეკუთვნება *Siphoviridae* -ს ოჯახს (ილუსტრაცია 4 A, B, C) და აქვთ ამ ოჯახისათვის დამახასიათებელი გრძელი და უკუმშვადი კუდი, ხოლო ფაგები *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* წარმოადგენენ *Podoviridae* -ს ოჯახს. აქვთ დაახლოებით 60 nm დიამეტრის თავი და ძალიან მოკლე კუდები. (ილუსტრაცია 4 D, E, F)

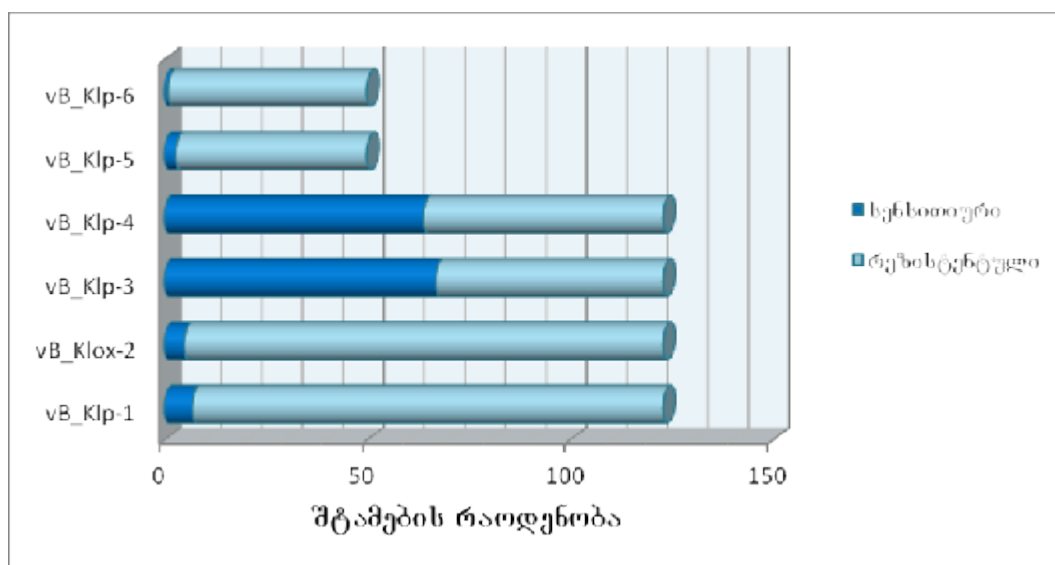
ილუსტრაცია 4. ვირიონების ელექტრონული მიკროსკოპია. (a) *vB_Klp_3*, (b) *vB_Klp_4*, (c) *vB_Klp_1*, (d) *vB_Klp_5*, (e) *vB_Klp_6*, and (f) *vB_Klox_2*.



Klebsiella -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა და მოქმედების სპექტრი განვსაზღვრეთ *Klebsiella* -ს 50 შტამზე, რომელიც ჩვენს ლაბორატორიაში ინახება. მოქმედების დიაპაზონი ასევე შესწავლილი იქნა 73 *Klebsiella* -ს შტამზე ინგლისში, ლესტერის უნივერსიტეტის ინფექციისა და იმუნოლოგიის

დეპარტამენტში. შედეგად გამოიკვეთა ორი *vB_Klp_3* და *vB_Klp_4* კლონი, რომლებიც ხასიათდებოდნენ მოქმედების ფართო სპექტრით და აღიზიარებდნენ 76 % -ს ინგლისისა და საქართველოში არსებული შტამების 26 % -ს. დანარჩენ ოთხ ფაგს: *vB_Klp_1*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* -ს მოქმედების ვიწრო სპექტრი ჰქონდათ და შემოწმებული შტამების 5 – 10 % -ის ლიზის იწვევდნენ. (გრაფიკი 6)

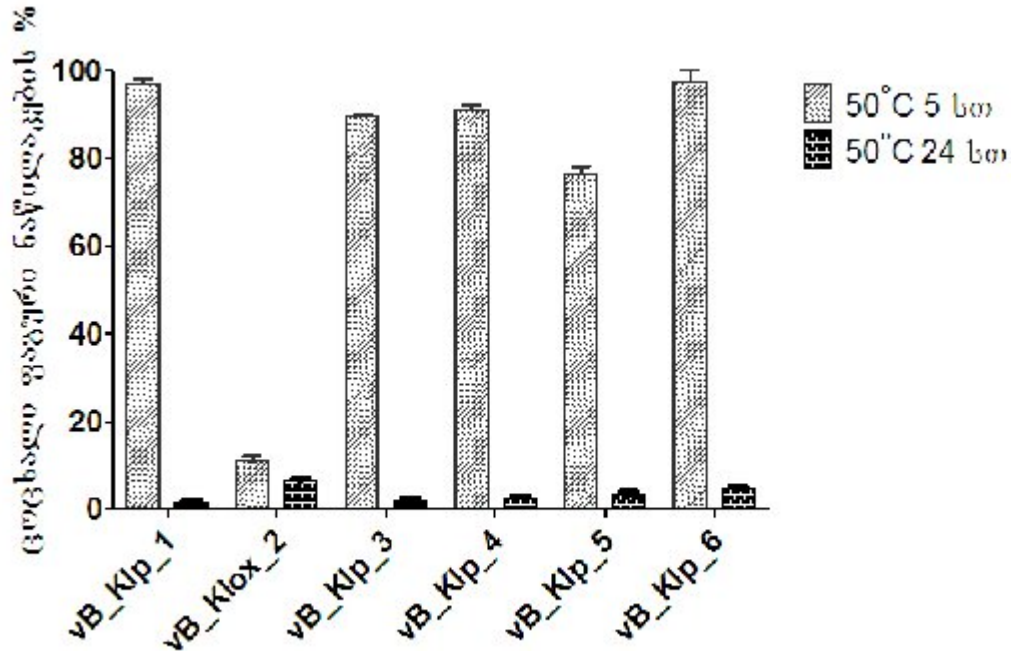
გრაფიკი 6 *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობა და სპექტრი



3.2 *K. pneumoniae* და *K. oxytoca* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების სტაბილურობის განსაზღვრა სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH - ის პირობებში

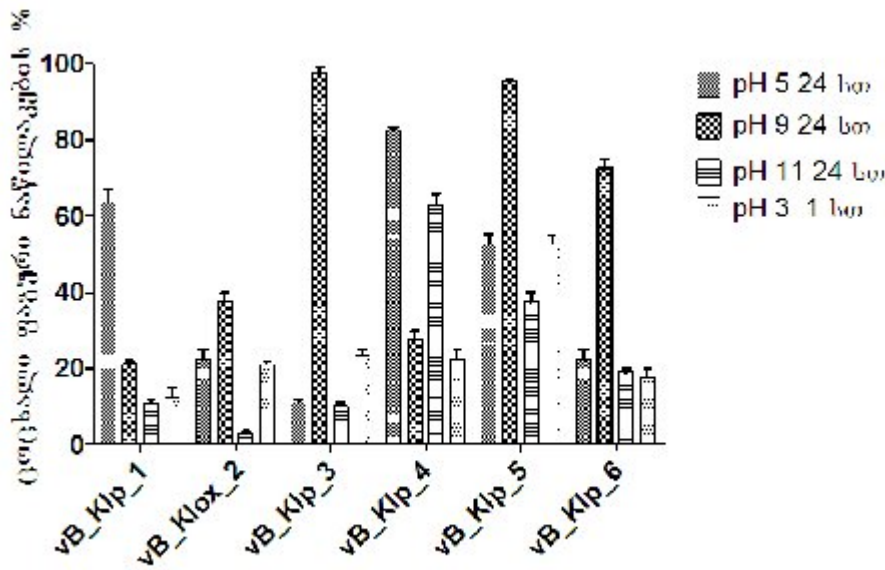
ბაქტერიოფაგების მდგრადობა განსახვავებულ პირობებში მნიშვნელოვანია როგორც სამკურნალო თვალსაზრისით, ასევე ფაგების ტრანსპორტირებისთვისაც. *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ფაგების აქტივობა შევისწავლეთ განსხვავებულ ტემპერატურებზე, 50 და 70 °C -ზე, და, ასევე, სხვადასხვა pH - ის პირობებში. *vB_Klox_2* -ს გარდა არც ერთი ფაგის სტაბილურობა არ იცვლებოდა 50 °C -ზე 5 საათის განმავლობაში. 24 საათის შემდეგ კი ცოცხალი ფაგური ნაწილაკების რიცხვი საწყისი რაოდენობის დაახლოებით, 2 -10 % შეადგენდა. 70 °C -ზე 3 საათიანი

ინკუბაციის შემდეგ ყველა ფაგი ინაქტივირდებოდა. *vB_Klox_2* 50 °C -ზე 5 საათის შემდეგ დაახლოებით 80 % - ი ინაქტივირდებოდა, თუმცა 24 საათის შემდეგ თითქმის იგივე ტიტრს ინარჩუნებდა. (გრაფიკი 7)



გრაფიკი 7: *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ფაგების სტაბილურობა სხვადასხვა ტემპერატურის პირობებში

pH 5 – 11 ფარგლებში ფაგების ტიტრი თითქმის არ იცვლებოდა. თუმცა 24 სთ - იანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგების აქტივობა მკვეთრად ეცემოდა და თითოეული ფაგისათვის სიცოცხლიუნარიან ფაგურ ნაწილაკთა რიცხვი დაახლოებით 15 % იყო. pH – 3 ის პირობებში კი, მკვეთრად განსხვავებული სურათია, სადაც 1 საათის შემდეგ ექვსივე ფაგის ტიტრი ეცემოდა, 5 საათის შემდეგ კი ფაგები თითქმის სრულად ინაქტივირდებოდა და მათი ტიტრი ექვსი ხაზით კლებულობდა. (გრაფიკი 8)



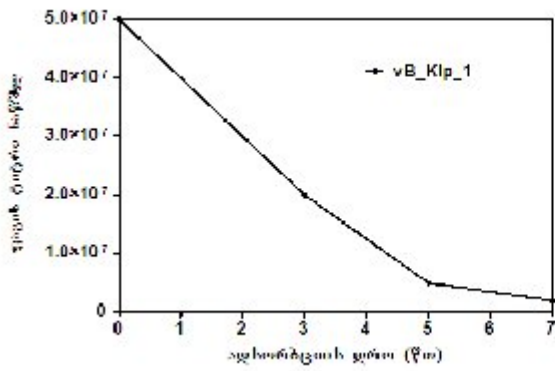
გრაფიკი 8: vB_Klp_1, vB_Klp_3, vB_Klp_4, vB_Klp_5, vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ფაგების მგრძობელობა სხვადასხვა pH-ის პირობებში

3.3 *K. pneumoniae* და *K. oxytoca* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების პატრონ უჯრედზე ადსორბცია და გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

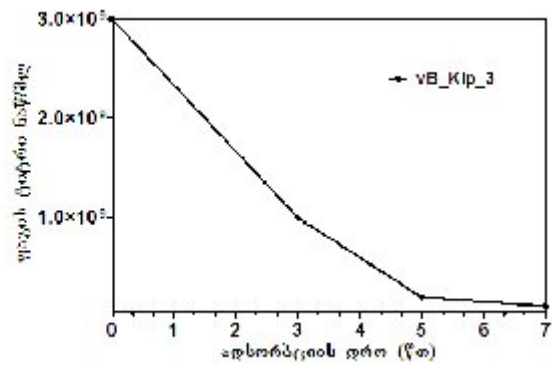
პატრონ შტამებზე ფაგის ადსორბციის შესწავლამ გვაჩვენა, რომ *K. Pneumoniae*-ს და *K. Oxytoca* - ს ექვსივე ფაგს ჰქონდა ადსორბციისათვის საკმარისი დრო. *vB_Klp_1*- ი და *vB_Klp_3* -ი ადსორბციისათვის საჭიროებენ 7 წთ და ამ დროს, შესაბამისად, ფაგური ნაწილაკების 93.3-ი და 95 % ადსორბცირდებოდა. (გრაფიკი 9)

გრაფიკი 9: *vB_Klp_1* (ა) და *vB_Klp_3* (ბ) ბაქტერიოფაგების ადსორბცია

ა.



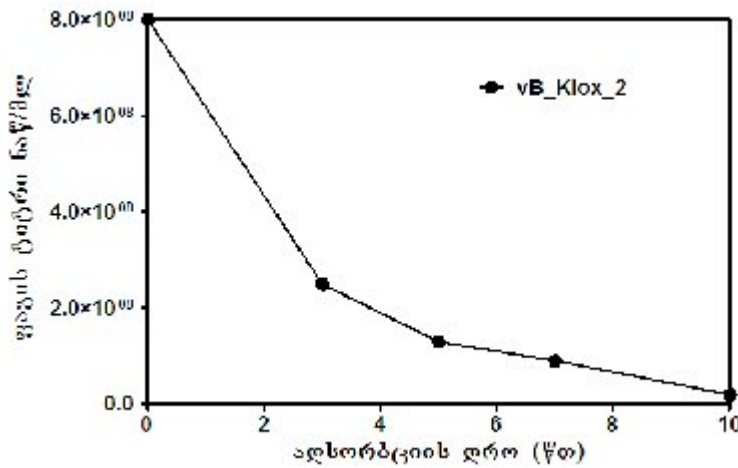
ბ.



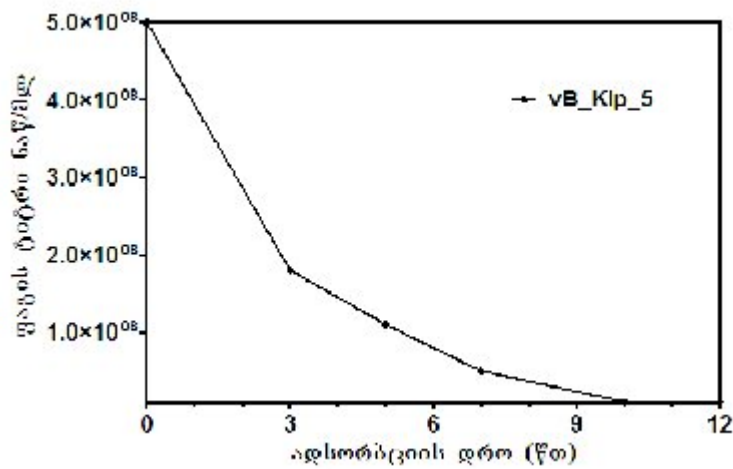
vB_Klp_4, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ბაქტერიოფაგები აღსორბიდებიან 10 წთ-ში. (გრაფიკი 10) აღსორბვის პროცენტი კი შესაბამისი ფაგებისათვის არის 96.7, 98.7, 98.3 და 97.5 % -ი. ყველა ფაგისათვის გამოვთვალეთ, ასევე, აღსორბვის სიჩქარის კონსტანტა. (ცხრილი 5)

გრაფიკი 10: *vB_Klox_2* (ა) და *vB_Klp_5* (ბ) ბაქტერიოფაგების აღსორბცა

ა.



ბ.

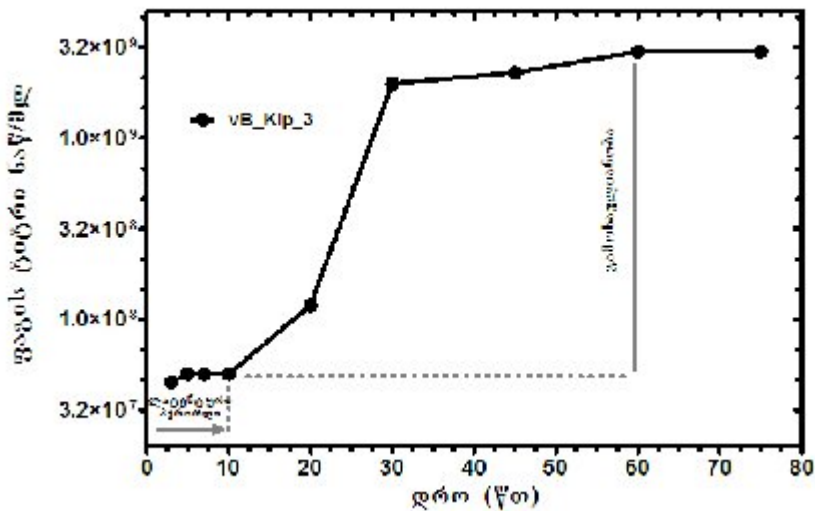


ცხრილი 5: ბაქტერიოფაგების vB_Klp_1 , vB_Klp_3 , vB_Klp_4 , vB_Klp_5 , vB_Klp_6 და vB_Klox_2 ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტა

ფაგის დასახელება	გამოყოფის წყარო	პატრონ შტამი	ფაგის მორფოლოგია	$K_{adsorption}$ (ml/min) ^b	ადსორბციის (%)
vB_Klp-1	Tbilisi, Georgia	KP 1	Siphovirus	1.8×10^{-8}	93.3
vB_Klp-3	Tbilisi, Georgia	KP 80	Siphovirus	1.4×10^{-8}	95
vB_Klp-4	Tbilisi, Georgia	KP 163	Siphovirus	3.4×10^{-8}	96.7
vB_Klox-2	Tbilisi, Georgia	KO 6	Podovirus	3.7×10^{-9}	97.5
vB_Klp-5	Tbilisi, Georgia	KP 33	Podovirus	3.9×10^{-9}	98.7
vB_Klp-6	Tbilisi, Georgia	KP 26	Podovirus	4.07×10^{-8}	98.3

vB_Klp_1 ლატენტური პერიოდი გრძელდება 10 წთ, ფაგის საშუალო გამოსავალი კი არის 62.5 ნაწ/მლ. რაც შეეხება *vB_Klp-3* -ს, როგორც გრაფიკიდან ჩანს, (გრაფიკი 11) მისი ლატენტური პერიოდი გრძელდება 10 წუთს, ხოლო საშუალო გამოსავალი ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან შეადგენს 60 ნაწ/მლს.

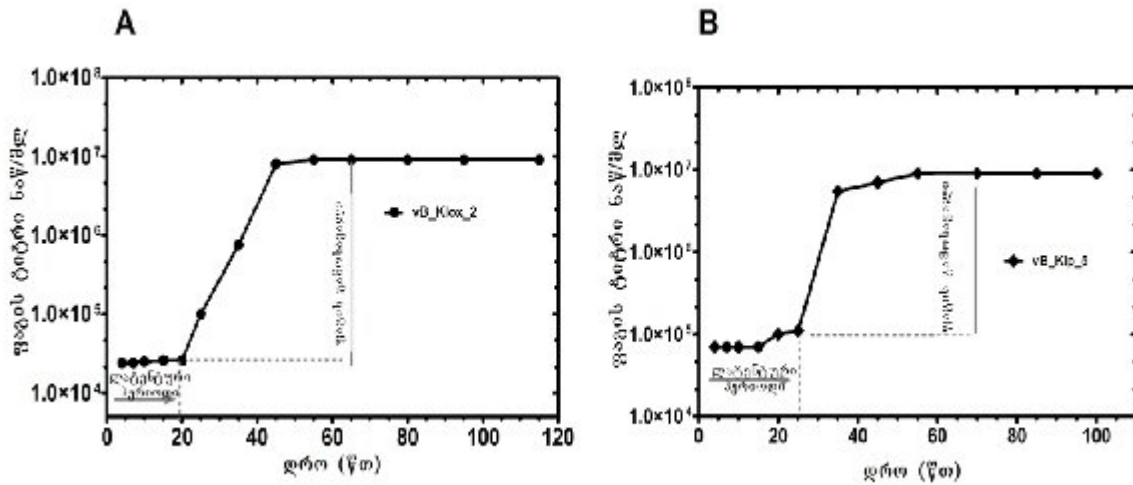
გრაფიკი 11: *vB_Klp-3* - ის გამრავლების ერთჯერადი ციკლი



vB_Klp_4 - ისა და *vB_Klp_6* -ის შემთხვევაში ლატენტური პერიოდები 12 წუთს გრძელდებოდა, თუმცა განსხვავდება ამ ფაგების გამოსავლიანობა, რაც *vB_Klp_4* - ისთვის საკმაოდ მაღალი იყო და 300 ნაწ/მლ, ხოლო *vB_Klp_6* - ის საშუალო გამოსავალი - 75 ნაწ/მლ.

ფაგ *vB_Klox_2* ის ლატენტური პერიოდი 20 წუთს გრძელდებოდა, ფაგის გამოსავლიანობა კი საკმაოდ მაღალი იყო, 346 ნაწ/მლს შეადგენდა. *vB_Klp_5* ის ლატენტური პერიოდი შეადგენდა 25 წთ, ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან ფაგის გამოსავალი კი - 90 ნაწ/მლ.

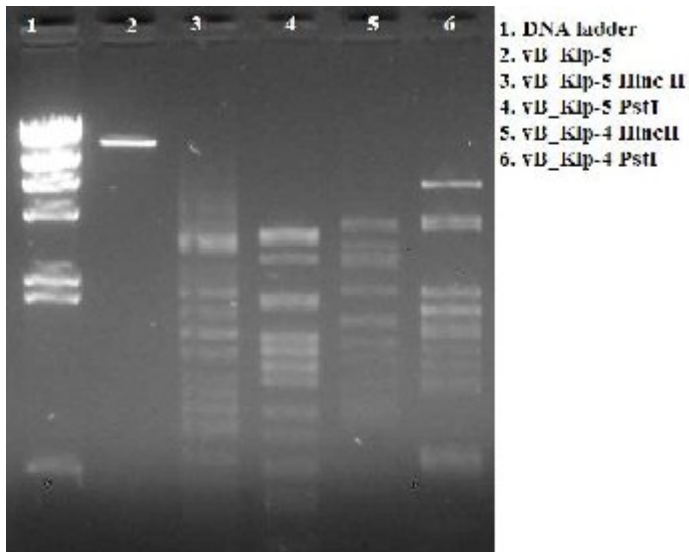
გრაფიკი 12: *vB_Klox_2* (ა) და *vB_Klp_5* (ბ) ფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი



3.4 *K. pneumoniae* და *K. oxytoca* სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათება

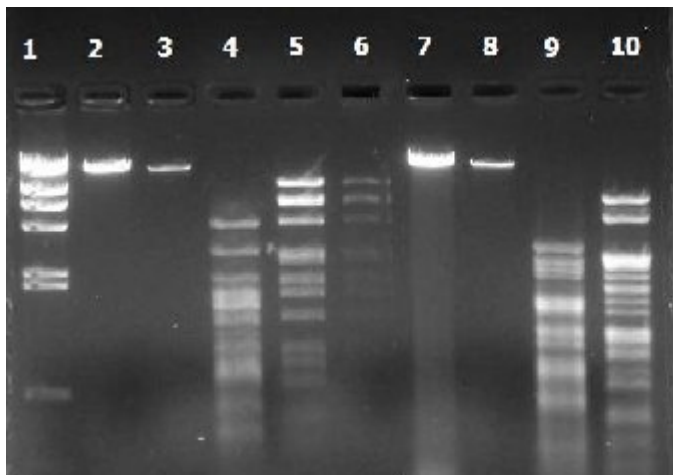
Klebsiella - ს ბაქტერიოფაგების გენეტიკური დახასიათებისათვის ექვსივე ფაგის დნმ-ი გამოვყავით ფენოლით ექსტრაქციის სტანდარტული მეთოდით. რესტრიქციული ანალიზისათვის გამოვიყენეთ ფერმენტები: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*, *DpnI*, *KpnI*, *HinfI*. დნმ-ის ფრაგმენტები დავაცალკევით ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზით 0,8 % - იანი აგაროზას გელის გამოყენებით. აღნიშნული რესტრიქციული ფერმენტებიდან *DpnI*, *KpnI* და *HinfI*-ის მიმართ ყველა ფაგი აღმოჩნდა რეზისტენტული. *vB_Klp-4* და *vB_Klp-5* (ილუსტრაცია 5), *vB_Klox-2*, *vB_Klp-3* (ილუსტრაცია 6) ფაგების დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი ნაჩვენებია სურათზე. რესტრიქციულმა ანალიზმა გვაჩვენა, რომ ყველა ფაგის გენომი ორჯაჭვიანი დნმ-ის შემცველია.

ილუსტრაცია 5: *vB_Klp_4* და *vB_Klp_5* ფაგების რესტრიქციული ანალიზი



1. DNA ladder
 2. vB_Klp-5
 3. vB_Klp-5 HincII
 4. vB_Klp-5 PstI
 5. vB_Klp-4 HincII
 6. vB_Klp-4 PstI

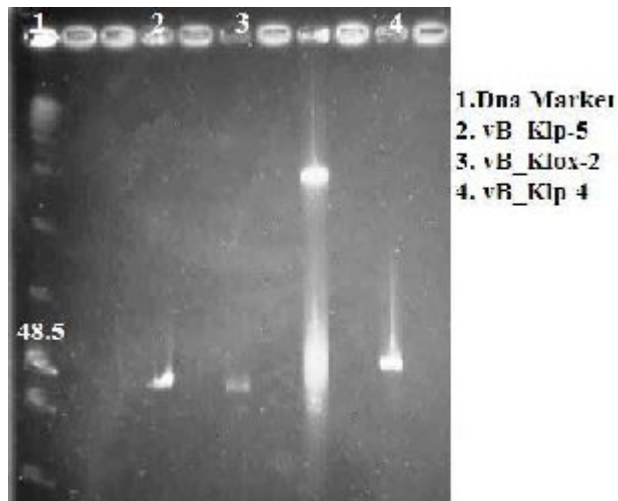
ილუსტრაცია 6: vB_Klox_2 და vB_Klp_3 ფაგების რესტრიქციული ანალიზი



1. DNA ladder
 2. vB_Klox-2 ფაგ
 3. vB_Klox-2 დაუჭრელი
 4. vB_Klox-2 HincII
 5. vB_Klox-2 EcoRV
 6. vB_Klox-2 PstI
 7. vB_Klp-3 ფაგ
 8. vB_Klp-3 დაუჭრელი
 9. vB_Klp-3 HincII
 10. vB_Klp-3 EcoRV

ფაგების დაუჭრელი დნმ-ის გენომის ზომები დავადგინეთ პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის (PFGE) მეთოდით. ამ მეთოდის დროს დნმ-ის მოლეკულები ზომების მიხედვით სხვადასხვა სისწრაფით ლაგდებიან აგაროზას გელში. PFGE -ს ანალიზმა გვაჩვენა, რომ vB_Klox-2 და vB_Klp-5 ფაგების გენომის ზომები იყო დაახლოებით 45 kb, რაც ადასტურებს მათ კლასიფიკაციას Podoviridae ოჯახში. vB_Klp-3 - ისა და vB_Klp-4 -ის ფაგების ზომები კი დაახლოებით 48.5 kb - ია. (ილუსტრაცია 7)

ილუსტრაცია 7: *vB_Klox-2*, *vB_Klp-4* და *vB_Klp-5* PFGE -ს ანალიზი



3.5 *vB_Klox-2* -ისა და *vB_Klp-5* - ის ბაქტერიოფაგების პლაზმიდაში კლონირება და კლონების ნაწილობრივი სექვენირება

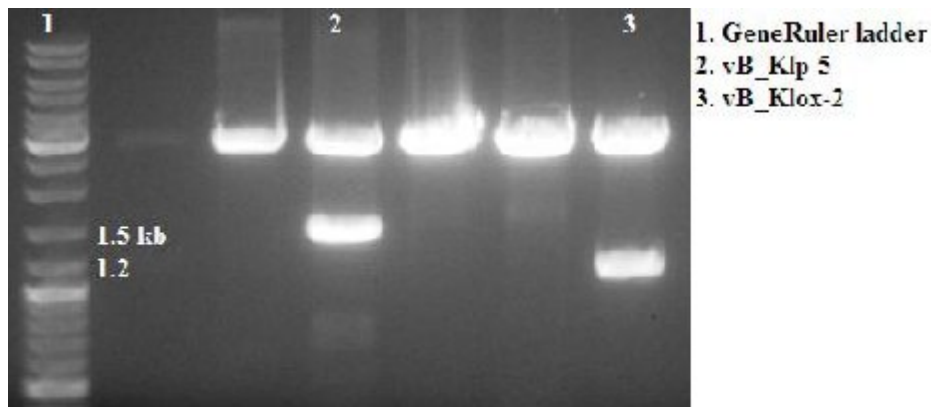
vB_Klox-2 -ისა და *vB_Klp-5* -ის ფაგების *HincII* და *PstI* -ით დაჭრილი დნმ-ის ფრაგმენტების კლონირება მოვახდინეთ pBluescriptII KS ვექტორში ქიმიური ტრანსფორმაციის გზით. კლონირებული ფრაგმენტების არსებობას ამპიცილინიან და X-gal - ის შემცველ აგარიან ფინჯნებზე თეთრი კოლონიების მიღება ადასტურებდა. (ილუსტრაცია 8)

ილუსტრაცია 8: ქიმიური ტრანსფორმაციის შედეგად მიღებული თეთრი და ლურჯი კოლონიები



შემდგომ რანდომულად შევარჩიეთ თითო რეკომბინირებული კოლონია და სპეციალური კიტის - GenElute Plasmid Miniprep (Sigma) -ს დახმარებით გამოვყავით პლაზმიდები. ვექტორში ჩართული *vB_Klp-5* და *vB_Klox-2* კლონების ზომები დავადგინეთ გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით, რაც შეესაბამებოდა დაახლოებით 1.5 და 1.2 kb -ს. (სურ.)

ილუსტრაცია 9: ვექტორში ჩართული *vB_Klp-5* და *vB_Klox-2* კლონების ზომები



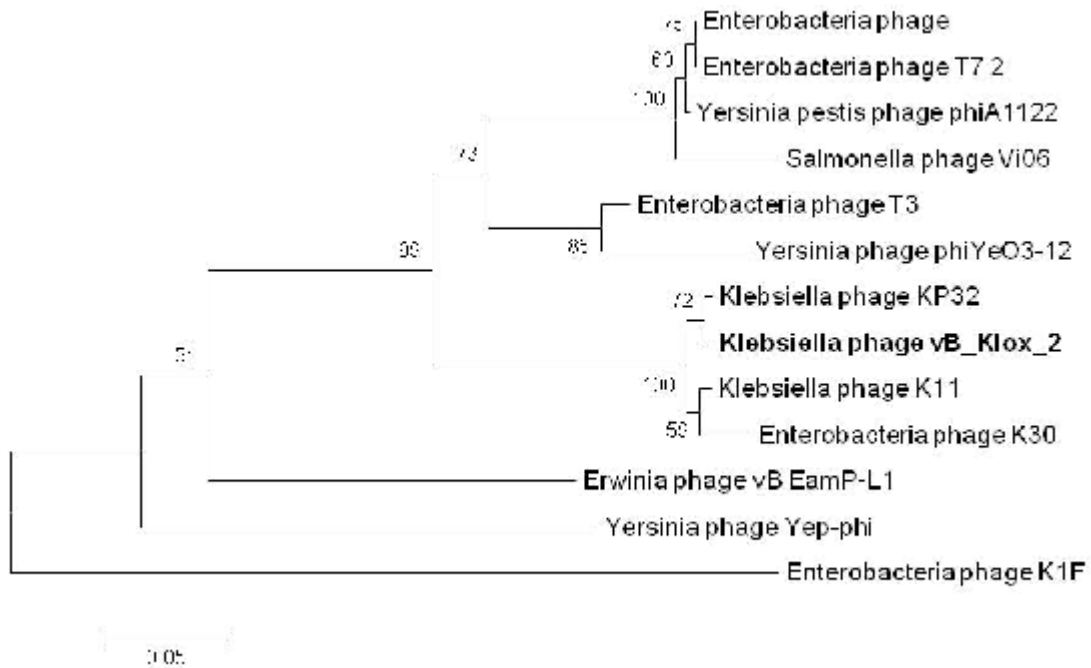
ორივე კლონის ფაგის სექვენირებით და შემდგომი ანალიზით დადგინდა, რომ 945 bp -ს სექვენსი *vB_Klp-5* -დან 93 % ით იდენტური იყო NCBI -ის მონაცემთა ბაზაში არსებული *Klebsiella*-ს ფაგ KP34-ისა, რომელიც ეკუთვნის *Podoviridae*-ს ოჯახს და არის φKMV ფაგების მსგავსი (45) . Blastp -ის ანალიზმა კი სექვენსის რეგიონიდან იდენტიფიცირება მოახდინა gp 39 გენისა, რომელიც აკოდირებს "conserved hypothetical" პროტეინს KP34 ფაგში. სექვენსის მეორე რეგიონი კი ჰომოლოგიური იყო gp 40 -ის გენისა, რომელიც აკოდირებს თავის კუდთან დამაკავშირებელ "head-tail connector" -ის პროტეინს და, რომელიც, თავის მხრივ, დიდ მსგავსებას ამჟღავნებდა ფუნქციურად ექვივალენტ პროტეინთან *Vibrio* ფაგ VP93- ში.

vB_Klox-2 -ის სექვენსის ანალიზი აჩვენებდა 96 -დან 99% -მდე მსგავსებას *Klebsiella*-ს ფაგ KP11, KP32 -ის და *Enterobacteria* ფაგ K30 -თან. სამივე ფაგი მიეკუთვნება T7 ფაგებს და არიან *Podoviridae*-ს ოჯახის წარმომადგენლები. *vB_Klp-5* -ის მსგავსად, მონაცემთა ბაზაში არსებული სავარაუდო ჰომოლოგიური პროტეინების იდენტიფიკაციისათვის ჩავატარეთ Blastp-ის ანალიზი. *Klebsiella*-ს ფაგებში, KP11-სა

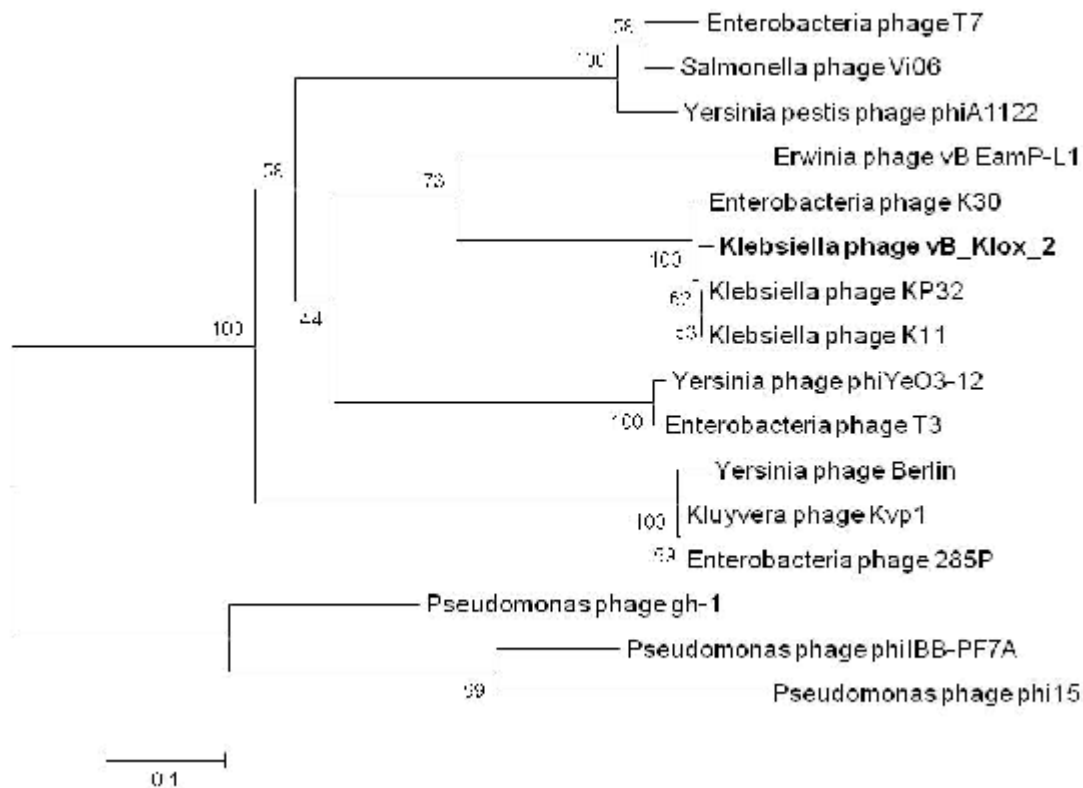
და KP32 -ში იდენტიფიცირებული იქნა გე 6 და გე 24 გენები, რომლებიც აკოდირებენ ეკზონუკლეაზას. ეკზონუკლეაზა T7 ფაგებში საჭიროა მოლეკულური რეკომბინაციისათვის და, ასევე, მნიშვნელოვან როლს ასრულებს დნმ-ის რეპლიკაციისა და შეფუთვის პროცესებში (91, 133) . პროტეინის სექვენსმა ძლიერი მსგავსება აჩვენა ასევე გე 6.5 -სა და გე 25 -ის კოდირებულ "hypothetical" პროტეინთან. აღნიშულ პროტეინებზე დაყრდნობით ჩავატარეთ ფილოგენეტიკური ანალიზი და *vB_Klox-2* -ის მონათესავე ფაგების საჩვენებლად ავაგეთ ფილოგენეტიკური ხე. (ილუსტრაცია 10)

ილუსტრაცია 10 : *vB_Klox-2* - ის ფილოგენეტიკური ხე ეკზონუკლეაზა (ა) და "hypothetical" (ბ) პროტეინის მიხედვით აგებული

ა.



ბ.



თავი 4 *Klebsiella* და *P. aeruginosa* - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების მოქმედების შესწავლა ბიოფილმებზე

Klebsiella -სა და *P. aeruginosa* -ს შტამებს, როგორც უკვე აღვნიშნეთ აქვთ ბიოფილმების წარმოქმნის უნარი. ამიტომ ძალიან საინტერესო იქნებოდა, გაგვეჩვენა მოქმედებდნენ თუ არა მათი სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები ბიოფილმებზე. არღვევდნენ უკვე წარმოქმნილი ბიოფილმების მთლიანობას თუ აინჰიბირებდნენ მათ ზრდას.

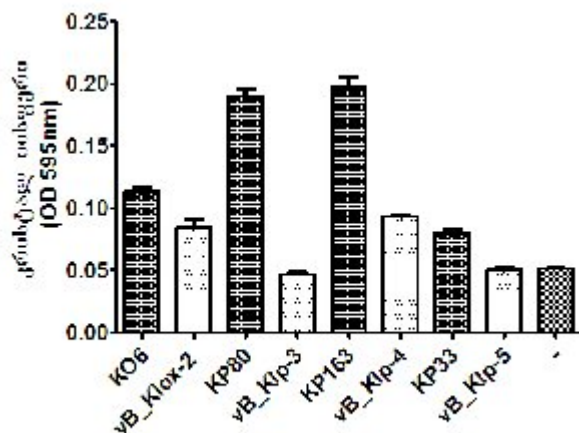
ბიოფილმების ფორმირება მოვახდინეთ *Klebsiella* -ს სხვადასხვა შტამებზე და ასევე *P. aeruginosa* შტამ PA14 -ზეც *P. aeruginosa* -ს ფაგების *vB_Pae-Kakheti25* -ისა და *vB_Pae-TbilisiM32* -ის აქტივობის შესამოწმებლად. ცნობილია, რომ PA14-ი წარმოქმნის საკმაოდ ძლიერ ბიოფილმს და ამიტომ საინტერესო იყო PA14-ის პლანქტონურ უჯრედებზე მოქმედების გარდა აღწევდნენ თუ არა ეს ფაგები ამ

შტამის ბიოფილმშიც. *Klebsiella* - ს შტამების მიერ ბიოფილმების წარმოქმნის შესწავლისას გამოვიყენეთ ასევე ორი სხვადასხვა შტამი: ერთი, რომელზეც უკვე ვიცოდით, რომ წარმოქმნიდა ბიოფილმს, დადებით კონტროლად, ხოლო მეორე შტამი უარყოფით კონტროლად. თუმცა, რადგან ყველა შტამის მიმართ არ გვქონდა აქტიური ფაგები, შემდგომი კვლევებისათვის გამოვიყენეთ ჩვენ მიერ დახასიათებული ფაგების ის პატრონ შტამები (KP 80, KP 163, KO 6, KP 33), რომლებიც წარმოქმნიდნენ ბიოფილმებს.

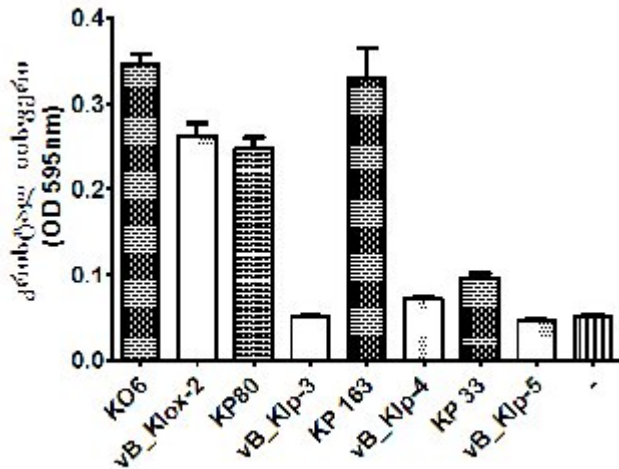
ბიოფილმების ფორმირებისათვის შტამების ინკუბაციას ვახდენდით 96 უჯრიან მიკროთეფშებზე (ზემოთ აღწერილი მეთოდით). ერთ რიგში ვახდენდით შესაბამისი შტამებით ბიოფილმების ფორმირებას, ხოლო გვერდით რიგში ვიყენებდით იმავე შტამს ფაგის დამატებით. ექსპერიმენტი ჩავატარეთ ორ ვარიანტად: თავდაპირველად შტამისა და ფაგის დამატება ხდებოდა ერთდროულად, ბიოფილმების წარმოქმნამდე და შემდგომ ვათავსებდით საინკუბაციოდ. ერთ შემთხვევაში ინკუბაციის დრო იყო 8 სთ, ხოლო მეორე შემთხვევაში - 24 სთ. ფაგით დამუშავებული უჯრების მონაცემებს თუ შევადარებთ ფაგის გარეშე იმავე შტამის მონაცემებს, ნათლად ჩანს, თუ როგორ თრგუნავენ ბაქტერიოფაგები ბიოფილმების წარმოქმნას, როგორც 8 ასევე, 24-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. (გრაფიკი ა და ბ) ორივე გრაფიკზე ბოლო მონაცემი შეესაბამება უარყოფით კონტროლს.

გრაფიკი 13: *vB_Klox_2*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5* ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 საათიანი (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ

ა.

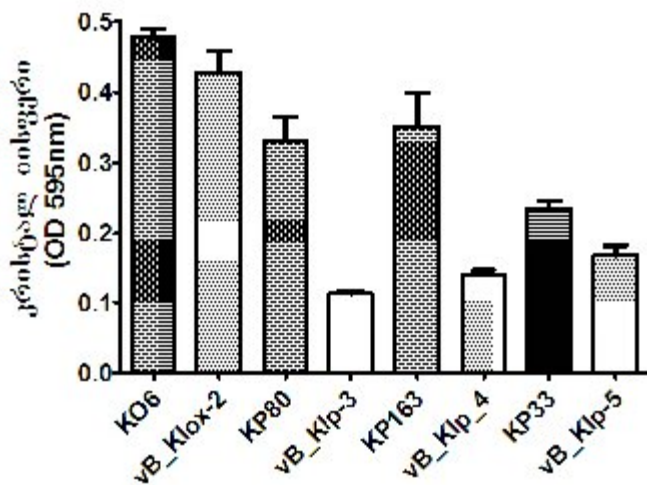


ბ.



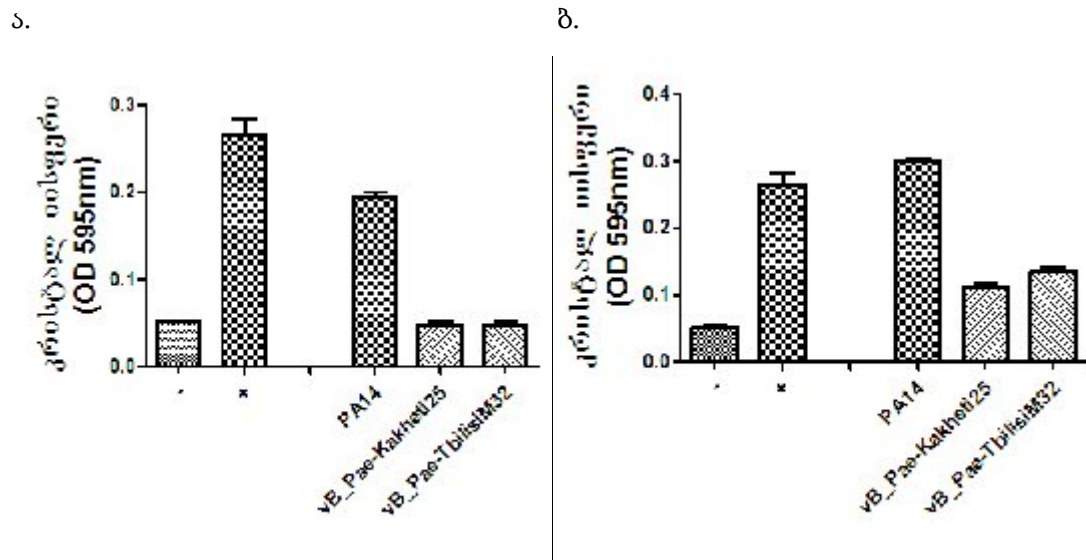
ექსპრიმენტის მომდევნო ეტაპზე ვამატებდით ფაგს 96 უჯრიან მიკროთეფშებზე ბიოფილმების 8 და 24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ. ფაგის დამატების შემდგომ მიკროთეფშებს ისევ ვტოვებდით თერმოსტატში 8 და 24 სთ-ით, შესაბამისად. შედეგებმა გვაჩვენა, რომ ბაქტერიოფაგები: *vB_Klox-2*-ი, *vB_Klp-3*-ი, *vB_Klp-4*-ი, *vB_Klp-5*-ი გარკვეულ დონეზე ისევ ახდენდნენ ბიოფილმების ინჰიბირებას, მიუხედავად უფრო ძლიერი ბიოფილმების წარმოქმნისა.

გრაფიკი 14 : *vB_Klox_2*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5* მოქმედება ბიოფილმებზე 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ფაგის დამატებისას



მსგავსი ექსპერიმენტები, როგორც უკვე აღვნიშნეთ ჩავატარეთ *P. aeruginosa* -ს შტამ PA14 ზე *P. aeruginosa*-ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგებით: *vB_Pae-Kakheti25*-ით და *vB_Pae-TbilisiM32*-ით. ცდის შედეგებმა გვაჩვენა, რომ ექსპერიმენტის დასაწყისში აღნიშნული ფაგების დამატება და შემდგომი ინკუბაცია იწვევდა ბიოფილმების ზრდის ინჰიბირებას. გრაფიკის პირველი ორი მონაცემი შეესაბამება დადებით და უარყოფით კონტროლებს.

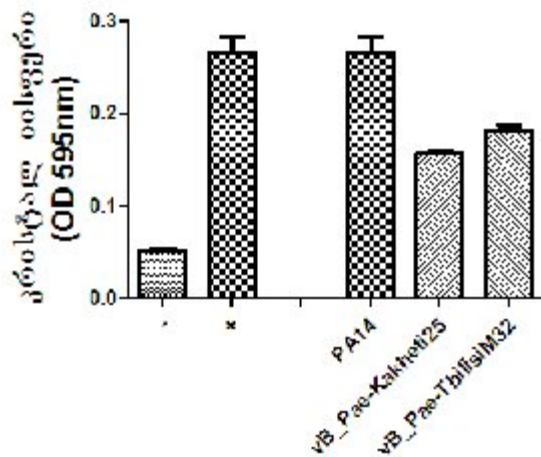
გრაფიკი 15: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ



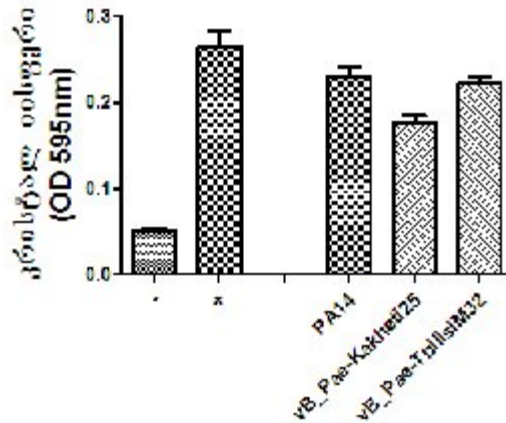
vB_Pae-Kakheti25-ისა და *vB_Pae-TbilisiM32* -ის ფაგების აქტივობა *Klebsiella* -ს ფაგების მსგავსად შევამოწმეთ 8 და 24 სთ - იანი ბიოფილმების მიმართაც. გრაფიკიდან ჩანს, რომ ფაგების აქტივობა 8 სთ-იანი ბიოფილმების მიმართ ძლიერია, 24 სთ -იანის შემთხვევაში კი შედარებით სუსტი თუმცა მაინც შესამჩნევი მოქმედება აქვს.

გრაფიკი 16: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგების მოქმედება ბიოფილმებზე 8 (ა) და 24 საათიანი (ბ) ინკუბაციის შემდეგ ფაგის დამატებისას

ა.



ბ.



თავი 5 Klebsiella და P. aeruginosa - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების და Populus nigra-ს ურთიერთქმედების შესწავლა და საცდელი ბიოკომპოზიტის შექმნა

შევისაწავლეთ კვლევის მანძილზე დახასიათებული *Klebsiella* -სა და *P. aeruginosa*-ს ფაგების ურთიერთქმედება *Populus nigra* -სთან. ცდისათვის გამოვიყენეთ *Populus nigra* -ს სქელი ექსტრაქტი, 5, 10, 15 % სპირტ და წყალხსნარები და ასევე 7 % პოლიეთილენგლიკოლიანი ხსნარი. აღნიშნული ხსნარები მოგვაწოდა სახ. სამედიცინო უნივერსიტეტის ფარმაცოგნოზის კათედრამ.

ცდის შედეგებმა გვაჩვენა, რომ ანტიფუნგალური მოქმედების *Populus nigra*-ს ხსნარები არ ახდენდა გავლენას ფაგის ტიტრზე და, ამავე დროს, არ ცვლიდნენ ფაგების ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგიას.

მიუხედავად იმისა, რომ სპირტხსნარები და სქელი ექსტრაქტი ფაგების ინაქტივაციას არ იწვევდა, შემდგომი კვლევებისათვის მათი გამოყენება ვერ მოხერხდა, რადგან კონსისტენციისა და წებვადობის გამო მათი შრობა შეუძლებელი გახდა. ამიტომ ბიოკომპოზიტის შექმნისათვის გამოვიყენეთ *Populus nigra*-ს 30 % წყალხსნარი და ასევე 7 % პოლიეთილენგლიკოლის ხსნარი.

შრობისათვის საცდელი ბიოკომპოზიტის მოსამზადებლად გავაკეთეთ ჩვენ მიერ შესწავლილი ფაგების: *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2*, *vB_Pae-Kakheti25*-ისა და *vB_Pae-TbilisiM32* -ის კოქტეილი, მოვამზადეთ

პოლივალენტური ფაგი და შვეურიეთ *Populus nigra*-ს ზემოთ აღნიშნულ ხსნარებს თანაფარდობით: 1:1 და 2:1(2 წილი იყო ფაგი). ანტიფუნგალურ სუბსტანციებთან შერევამდე ფაგურ კოქტეილში განვსაზღვრეთ ცალკეული ფაგის ტიტრები. შრობის შედეგად ვნახეთ, რომ პოლიეთელინეგლიკოლის ხსნარი სპირტხსნარების და სქელი ექსტრაქტის მსგავსად არ შრებოდა და იწებებოდა. ყველაზე ოპტიმალური ვარიანტი აღმოჩნდა ფაგური კოქტეილისა და 30 % *Populus nigra*-ს წყალხსნარი, როგორც 1:1, ასევე, 2:1-თან თანაფარდობით. (ილუსტრაცია 11)

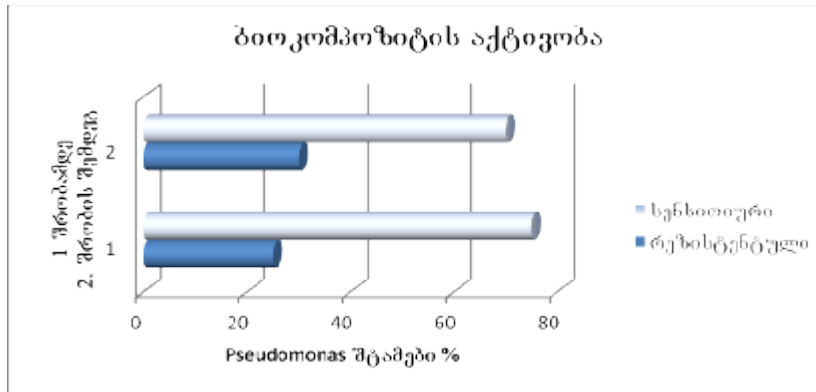
ილუსტრაცია 11: მშრალი ბიოკომპოზიტი



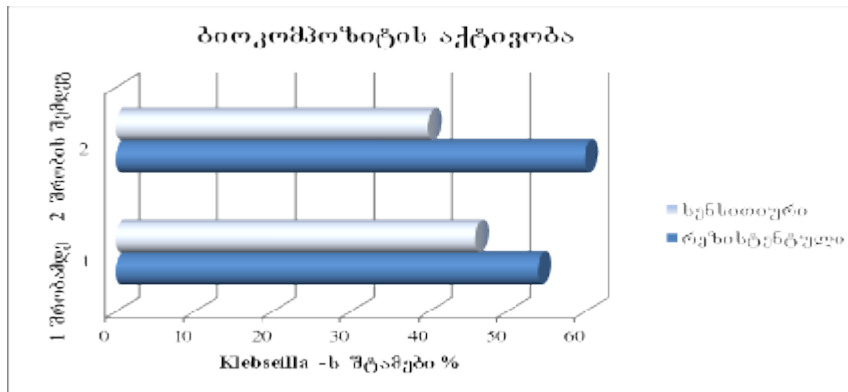
მშრალ წყალხსნარიან ბიოკომპოზიტში განვსაზღვრეთ ფაგების აქტივობა და შევადარეთ შრობამდე გატიტრული ფაგისას. შედეგად ვნახეთ, რომ ტიტრი დაწეული იყო ერთი ან ორი რიგით, რაც შრობის შემდეგ სრულიად დასაშვებია. კოქტეილისათვის გამოვიყენეთ მაღალტიტრიანი ფაგები (10^{10} - 10^{11} ფ.ნ/მლ), შრობის შემდეგ ფაგის ტიტრი კი შეადგენდა 10^7 - 10^8 ნაწ/მლს, რაც ფაგოთერაპიისათვის საკმარისია.

გამშრალ ბიოკომპოზიტში ფაგის აქტივობას ვამოწმებდით პერიოდულად, რის შედეგადაც დაგინდა, რომ იგი არ იცვლებოდა. შევამოწმეთ, ასევე, ბიოკომპოზიტის აქტივობა ლაბორატორიაში არსებული *Klebsiella*-ს, *P. aeruginosa*-სა და *C. Albicans*- ის შტამების მიმართ და კიდევ ერთხელ დავრწმუნდით, რომ შრობამდე და შრობის შემდეგ ფაგის აქტივობა თითქმის უცვლელი იყო.

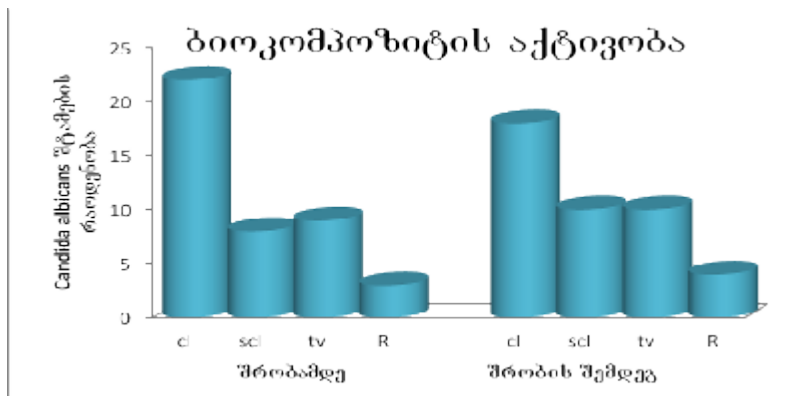
გრაფიკი 17: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა *P. aeruginosa*-ს შტამების მიმართ



გრაფიკი 18: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა *Klebsiella* -ს შტამების მიმართ



გრაფიკი 19: მშრალი ბიოკომპოზიტის აქტივობა *C. Albicans* - ის მიმართ



შედეგების ინტერპრეტაცია/ დისკუსია

სოკოები და ბაქტერიები თანაცხოვრობენ სხვადასხვა გარემო პირობებში, ნიადაგისა და საკვები პროდუქტებიდან, მცენარეებისა და ძუძუმწოვრების ჩათვლით. სოკოსა და ბაქტერიის ურთიერთქმედებას შესაძლოა დრამატული გავლენა ჰქონდეს ამ ორგანიზმების გადარჩენას, კოლონიზაციასა და პათოგენეზზე. არსებობს მაგალითები, სადაც ბაქტერია უზრუნველყოფს სოკოებს ისეთი სტრუქტურებით, რომლებიც იწვევენ სოკოს ვირულენტური დეტერმინანტების ზრდას.

ფუნგალურ-ბაქტერიული ბიოფილმები თავიანთი თვისებებით მკაფიოდ განსხვავდება ცალკეული ორგანიზმების მიერ წარმოქმნილი ბიოფილმებისაგან. ბიოფილმების განვითარება ართულებს ინფექციებს, რომლებიც სამედიცინო აღჭურვილობების გამოყენებით არის გამოწვეული. ასეთი ტიპის ინფექციების დროს შერეული ბიოფილმების არსებობისას ანტიბიოტიკებითა და ანტიფუნგალური საშუალებებით მკურნალობა ძალზე რთულია, რადგან მსგავსი ბიოფილმები უფრო რთული შემადგენლობის მატრიქსის გამო კიდევ უფრო რეზისტენტული ხდებიან.

სოკოები ხშირად არიან შერწყმული ბაქტერიებთან დამწვრობით გართულებული ინფექციების დროს. დამწვრობის მქონე პაციენტები ფართო ჯგუფის ოპორტუნისტული პათოგენებით დაინფიცირების რისკის ქვეშ არიან, რადგან დამწვრობის დროს ხდება კანის დაზიანება, რასაც მოყვება დამწვარ რეგიონებში იმუნური ფუნქციების ცვლილება. Gupta et al. -ის კვლევაში აღწერილია, რომ დამწვრობის შედეგად განვითარებული შერეული ინფექციების 59 % -ის შემთხვევაში *C. Albicans* -ი მონაწილეობს. თუმცა იმ შემთხვევებში, სადაც *Pseudomonas aeruginosa* იყო კონფექციაში, მიკრობი *Candida*-ს კოლონიზაციას მნიშვნელოვნად აინჰიბირებდა.

Pseudomonas aeruginosa ხშირად ითესება დამწვრობის შედეგად განვითარებული ინფექციების დროს, როგორც ცალკე, ასევე *C. Albicans*-თან ასოციაციაში. შერეული ინფექციების დროს ხშირია, ასევე, *Klebsiella* -თი ინფიცირების შემთხვევები, რადგან ეს მიკრობი კათეტერებისა და მილებით ქსოვილების დაზიანების მნიშვნელოვანი მიზეზია, რაც *Klebsiella pneumoniae*-ის შტამებით მემბრანული ქსოვილების საფუძველზე ბიოფილმების წარმოქმნით არის განპირობებული. თავის მხრივ კი *C.*

Albicans-ი მნიშვნელოვანი პათოგენია ბიოფილმების ფორმირების პროცესში. ორივე მიკრობს, *Pseudomonas aeruginosa*-სა და *Klebsiella pneumoniae*-ს ბიოფილმების წარმოქმნის დიდი უნარი აქვს, ხოლო სოკოებთან მათი ასოციაცია კიდევ უფრო ართულებს სხვადასხვა ინფექციურ პროცესებს. ვენტილაციასთან ასოცირებული პნევმონიის დროს, რომელიც გამოწვეული *Pseudomonas aeruginosa*, მნიშვნელოვნადაა გაზრდილი *C. Albicans* კოლონიზაციის შემთხვევებიც. ისევე, როგორც *Klebsiella pneumoniae* ზრდის *C. Albicans* ეპითელიუმზე მიმაგრების ხარისხს შარდ-სასქესო ინფექციების დროს. ამიტომ, აღნიშნული შემთხვევების სიხშირის გამო, გადავწყვიტეთ ჩვენი კვლევისას *Pseudomonas aeruginosa*-სა და *Klebsiella*-ს საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგებზე შეგვეჩერებინა ყურადღება.

ჩვენი ნაშრომის სიახლეს წარმოადგენს ბუნებრივ კომპონენტებზე დაფუძნებული ბიოკომპოზიტის შექმნა, რომელშიც შეყვანილია ბაქტერიოფაგები, როგორც ანტიბიოტიკების ალტერნატიული ანტიბაქტერიული საშუალებები და ასევე, ნატურალური ანტიფუნგალური ნივთიერება ვერხვის ექსტრაქტი.

ბაქტერიოფაგების გამოყენება ალტერნატიულ სამკურნალო საშუალებად სხვადასხვა ინფექციური დაავადებების დროს განპირობებულია გრამდადებითი და გრამუარყოფითი მიკროორგანიზმების გაზრდილი რეზისტენტობით ანტიბიოტიკების მიმართ. ხშირ შემთხვევაში რეზისტენტობა იმდენად მაღალია, რომ ახალი თაობის ანტიბიოტიკებიც კი უძლურნი არიან მათ წინაშე. აღსანიშნავია, რომ თერაპიული მიზნით ბაქტერიოფაგების გამოყენებამდე აუცილებელია დავრწმუნდეთ ამ ფაგების ვირულენტურ ბუნებაში, რადგან ხშირ შემთხვევაში ლიზოგენური ფაგები თავად არიან რეზისტენტული გენებისა და პლაზმიდის გადამტანები. აღნიშნული ფაქტი კი რეზისტენტობის განვითარებისა და გავრცელების მიზეზი შეიძლება გახდეს. დროთა განმავლობაში რეზისტენტობა შესაძლოა განვითარდეს ბაქტერიოფაგების მიმართაც, თუმცა ფაგური კოქტილის განახლება ყოველთვის შეიძლება კოქტილში ახალი აქტიური ფაგების შეყვანით.

ბაქტერიების მსგავსად ანტიფუნგალური ნივთიერებების მიმართ რეზისტენტობას ივითარებენ *C. Albicans* - ის შტამებიც. ამიტომ ჩვენი მიზანი იყო ბაქტერიოფაგების მსგავსად მოგვეპოვებინა ალტერნატიული ანტიფუნგალური საშუალება და შეგვექმნა ეფექტური სამკურნალო პრეპარატი შერეული ინფექციების მკურნალობისათვის. გამოიყენება *Poppulus nigra* - ს მცენარის სხვადასხვა ნაწილები, რომელიც მდიდარია

ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებით. ჩვენს კვლევაში გამოყენებულია *Poppulus nigra* - ს საფოთლე კვირტებისაგან მიღებული პრეპარატი, რადგან იგი ხასითდება მაღალი ანტიფუნგალური და ანტიბაქტერიული მოქმედებით.

ექსპერიმენტების ჩატარებისათვის პირველ რიგში მნიშვნელოვანი იყო შესაბამისი მიკროორგანიზმების მოძიება. ამიტომ კვლევის პროცესში შევექმნით *Pseudomonas aeruginosa*- სა და *Klebsiella* -ს შტამების კოლექცია. კოლექციაში შედის 200 *Pseudomonas aeruginosa* -სა და 50 *Klebsiella* -ს შტამი, რომელთა ნაწილი მივიღეთ მსოფლიოს სხვადასხვა კლინიკებიდან. შტამები გამოყოფილი იყო სხვადასხვა საკვლევი მასალიდან: ჩირქიდან, შარდიდან, ნახველიდან, ჭრილობითი ინფექციებიდან და ა.შ. გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტთან არსებული სადიაგნოსტიკო ცენტრიდან მოვიპოვეთ ასევე *C. Albicans* - ის შტამები.

P. aeruginosa - ს შტამების იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ “ *Pseudomonas Agar F • Flo Agar (pH 7.0 ± 0.2)*” -ზე გათესვით, სადაც შტამების 80 % -ი გაიზარდა მომწვანო-მოყვითალო შეფერილობით, რაც იმაზე მიუთითებდა, რომ აღნიშნული შტამები ნამდვილად არიან *Pseudomonas* ოჯახის წარმომადგენლები. კვლევაში აღწერილი *Pseudomonas aeruginosa* -ს სპეციფიკური ორი ფაგის, *vB_Pae-Kakheti25*-ისა და *vB_Pae-TbilisiM32*-ის პატრონ შტამები PA25 და PA32 უფრო ზუსტად დავახასიათეთ VITEK 2 სადიაგნოსტიკო სისტემის საშუალებით, რომელიც აღნიშნული შტამების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლას ეფუძნება. შედეგებმა კი გვიჩვენა, რომ ორივე შტამი მიეკუთვნება *Pseudomonas aeruginosa*-ს სახეობას.

Klebsiella -ს ორმოცდაათივე შტამი *Herellae*-ს საიდენტიფიკაციო ნიადაგზე გათესვით იძლეოდა ყვითელი ფერის კოლონიებს, რაც *Enterobacteriaceae*-ს ოჯახისათვის არის დამახასიათებელი. 50 - დან 9 შტამის იდენტიფიცირება მოვახდინეთ PCR-ის მეთოდის დახმარებით *Klebsiella pneumoniae* და *Klebsiella oxytoca* - ს სპეციფიკური პრაიმერების გამოყენებით და დავრწმუნდით, რომ 5 შტამი მიეკუთვნება *Klebsiella pneumoniae* -ს სახეობას, ხოლო დანარჩენი ოთხი - ორივე პრაიმერის მიმართ უარყოფითი აღმოჩნდა. აღნიშნული 9 შტამის (KI 1, 6, 8, 78, 80, 160, 163, 182, 244) მიერ *Klebsiella* - თვის დამახასიათებელი ფიმბრიების წარმოქმნის შესწავლის მიზნით გამოვიყენეთ, აგრეთვე, *FimH* და *mrkD* სპეციფიკური პრაიმერები. შედეგად ორივე პრაიმერის მიმართ ხუთი შტამი აღმოჩნდა პოზიტიური, რაც იმას

ნიშნავს, რომ აღნიშნულ შტამებს ბიოფილმების წარმოქმნის უნარი აქვთ. ამ კვლევებში გამოყენებული ფაგების პატრონ შტამების ზუსტი იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ VITEK 2 სისტემის საშუალებით. ამ მონაცემებით *Klebsiella* 3-ი და *Klebsiella* 6-ი წარმოადგენენ *Klebsiella oxytoca* -ს სახეობას 99 % - იანი იდენტიფიკაციით. *Klebsiella* 26 და 33 ავლენენ ასევე 99 % - იან, ხოლო *Klebsiella* 80 - 98 % - ით მსგავსებას *Klebsiella pneumoniae* spp *pneumoniae* - სთან.

P. aeruginosa - ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები გამოვყავით თბილისისა და კახეთის ჩამდინარე წყლებიდან. კვლევის გასაგრძელებლად შევარჩიეთ ორი ფაგი: *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32*, რომელთაგან *vB_Pae-Kakheti25* მიეკუთვნება *Siphoviridae* -ს ოჯახს, ხოლო *vB_Pae-TbilisiM32* *Podoviridae*-ს. ფაგური პრეპარატის შექმნისას მნიშვნელოვანია სხვადასხვა ტიპის ფაგების შეყვანა კოქტილში, რათა თავიდან ავიცილოთ ჯვარედინი რეზისტენტობა. ამიტომ, ეს ორი ფაგი შევარჩიეთ ერთმანეთისაგან მათი ძლიერი განსხვავების გამო. მათ შორის მსგავსება არ არის ნუკლეოტიდურ და პროტეინულ დონეზეც კი. განსხვავებული ფაგების შერჩევა მნიშვნელოვანია, ასევე, მასპინძლის იმუნური სისტემის ურთიერთქმედების დროსაც.

გარდა იმისა, რომ ჩვენ მიერ დახასიათებული ბაქტერიოფაგები *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* ერთმანეთისაგან განსხვავდება სტრუქტურულად, მათ არ აქვთ საერთო მგრძობელობა რეზისტენტობასა და ჯვარედინ ანტიგენობასთან. ამ ფაგებს აქვთ რიგი თვისებებისა რის გამოც შესაძლებელია მათი გამოყენება ფაგოთერაპიაში: ორივე ფაგი სტაბილურია 37 °C-ზე და ხანმოკლე პერიოდით შეუძლიათ გადარჩნენ ისეთ მაღალ ტემპერატურაზეც კი, როგორცაა 70 °C-ისა, რაც მნიშვნელოვანი მახასიათებელია ფაგების ტრანსპორტირებისათვის და შესაძლებელს ხდის მათ გადატანას მაცივრის გარეშეც. სამკურნალო - პროფილაქტიკური პრეპარატის შექმნისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ფაგების მაღალ ლიზისურ აქტივობასა და მოქმედების ფართო სპექტრს, ამიტომ აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ *P. aeruginosa* -ს შტამების მიმართ ორივე ფაგი ავლენს მაღალი ლიზისური აქტივობის პოტენციალს. ამასთანავე ლიზისური მოქმედების დიაპაზონის მიხედვით ისინი ახდენენ ურთიერთგადაფარვას. *vB_Pae-Kakheti25* და *vB_Pae-TbilisiM32* სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებს აქვთ მოკლე ლატენტური პერიოდი, მაღალი გამოსავლიანობა და ადსორბციის მაღალი პროცენტი მოკლე დროში, რაც ორივე ფაგის შემთხვევაში 10

წთ-ს შეადგენს. ყველა ჩამოთვლილი მახასიათებელი ამ ფაგების ვირულენტურ ბუნებაზე მიუთითებს.

ზომიერ ფაგებს შეიძლება ჰქონდეთ ვირულენტობის გენები, ხოლო თერაპიაში გამოყენებული ფაგებისათვის პრიორიტეტულია ის ფაქტი, რომ ისინი არ მონაწილეობენ ზომიერ ციკლში. ჩვენს კვლევაში დახასიათებული ფაგები წარმოქმნიან ლითიური ფაგებისათვის დამახასიათებელ ნათელ კოლონიებს. დამატებითი ბიონფორმატიკული ანალიზი ჩატარდა ასევე, იმისათვის, რომ დარწმუნებული ვყოფილიყავით ამ ფაგების ვირულენტობაში. ანალიზმა გვიჩვენა, რომ *vB_Pae-Kakheti25*-ი და *vB_Pae-TbilisiM32*-ი ბაქტერიოფაგები არ შეიცავდნენ ზომიერი ფაგებისათვის დამახასიათებელ ინტეგრაზებს, რეკომბინაზებსა და ტრანსპოზონებს. ასევე არ ყოფილა აღმოჩენილი არც ერთი გენი, რომელიც ამ ფაგების შესაძლო ზომიერ სასიცოცხლო ციკლზე მიუთითებდა. ბიონფორმატიკულმა ანალიზმა გვაჩვენა, რომ ფაგ *vB_Pae-Kakheti25*-თვის მასპინძლის მთავარი ანტი-რეცეპტორი მდებარეობს gp26 C ტერმინალურ დომენში და მონათესავე ფაგების მსგავსია. *vB_Pae-TbilisiM32* ბაქტერიოფაგში კუდის ფიმბრია უკვე კარგადაა ცნობილია phiKMV-ის მსგავსი ფაგებიდან და წარმოდგენილია gp38-დან gp41-ი გენების ჩათვლით, რომლებიც წარმოქმნიან T7 ფაგების ცალკეული პოლიპეპტიდის gp 17-ის ანალოგიური კუდის ფიმბრიებს.

ბაქტერიოფაგების სამკურნალოდ გამოყენებამდე, დიდი მნიშვნელობა აქვს ამ ფაგების უვნებლობისა და თერაპიული პოტენციალის შესწავლას ექსპერიმენტულ ცხოველებზე. ჩვენს კვლევაში *in vivo* ცდისათვის თაგვების ნაცვლად გამოვიყენეთ Greater Wax Moth სახეობის პეპლის მუხლუხეობი - *Galleria mellonella*. *vB_Pae-Kakheti25* ფაგის ეფექტურობის შესწავლამ *Galleria mellonella* -ს მოდელებზე კიდევ ერთხელ დაგვარწმუნა ფაგოთერაპიაში ამ ფაგის გამოყენების შესაძლებლობაში. ექსპერიმენტების შედეგად ფაგ *vB_Pae-Kakheti25*-ის აქტივობა შევისწავლეთ *Galleria mellonella*-ს მსგავს ცოცხალ ორგანიზმზე. ეს ორგანიზმები დღესდღეობით ფართოდ გამოიყენება სხვადასხვა ინფექციური მოდელების შექმნისათვის, რასაც მრავალი სტატია ადასტურებს. აღსანიშნავია, რომ ჩვენს ცდებში გამოყენებული იყო არა ამ ფაგის პატრონი შტამი, არამედ *Pseudomonas aeruginosa*-ს სტანდარტული PA14 შტამი, რომელიც საკმაოდ ვირულენტურია. თუმცა, მიუხედავად ამისა, ვნახეთ, რომ ფაგის გამოყენება ეფექტური აღმოჩნდა და მხოლოდ შტამით ინფიცირებულ ჯგუფთან

შედარებით, სადაც 17 საათის შემდეგ ყველა მუხლუხო დახოცილი იყო, ფაგის ჯგუფებში მათი სიცოცხლის ხანგრძლივობა 40 საათამდე გაიზარდა. ფაგი + ანტიბიოტიკიან ჯგუფებში კი 72 საათის შემდეგ *Galleria* ჯერ კიდევ ინარჩუნებდა სიცოცხლისუნარიანობას. ეს ფაქტი საკმაოდ მნიშვნელოვანია და საშუალებას გვაძლევს დავრწმუნდეთ ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინაციაში გამოყენების ეფექტურობაშიც. ამგვარად, ჩვენს მიერ ჩატარებული *in vivo* ექსპერიმენტის შედეგები მიუთითებს *vB_Pae-Kakheti25* ბაქტერიოფაგის უვნებლობაზე, მაღალ თერაპიულ პოტენციალზე, მისი სამკურნალოდ გამოყენების შესაძლებლობასა და ბაქტერიოფაგებისა და ანტიბიოტიკების ერთდროული გამოყენების მაღალ თერაპიულ ეფექტზე.

Pseudomonas aeruginosa-ს სპეციფიკურ ბაქტერიოფაგებთან ერთად კვლევა მიმდინარეობდა *K. Pneumoniae*-სა და *K. oxytoca* -ს საწინააღმდეგო ფაგებზეც. შედეგად გამოვყავით *K. Pneumoniae* სპეციფიკური ხუთი და *K. oxytoca* -ს - ერთი ფაგი *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2*. ფაგები გამოვყავით მდინარე მტკვრის ჩამდინარე წყლებიდან სხვადასხვა დროს. მათგან *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4* *Siphoviridae* -ს ოჯახს მიეკუთვნება, ხოლო *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* არიან *Podoviridae* -ს წარმომადგენლები. მიუხედავად იმისა, რომ ამ ფაგებიდან მხოლოდ *vB_Klp_3* -სა და *vB_Klp_4*-ს აქვს მოქმედების ფართო სპექტრი, აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ლიზისური მოქმედების დიაპაზონის მიხედვით ისინი ახდენენ ურთიერთგადაფარვას. ამიტომ სამკურნალო - პროფილაქტიკურ კოქტეილში ვიწრო მოქმედების სპექტრის ფაგების შეყვანასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს. მათი შეყვანა ფაგურ კოქტეილში კიდევ უფრო აამაღლებს კოქტეილის თერაპიულ ეფექტს. გარდა ამისა, კვლევის პროცესში შესწავლილი სხვა ბიოლოგიური მახასიათებლები საშუალებას გვაძლევს დავრწმუნდეთ დანარჩენი ფაგების შესაძლებლობებშიც.

კვლევის დროს ექვსივე ფაგი წარმოქმნიდა ნათელ კოლონიებს, რაც მხოლოდ ვირულენტური ფაგებისთვის არის დამახასიათებელი და რაც ძალზე მნიშვნელოვანია ამ ფაგების ფაგოთერაპიაში გამოყენების დროს. ფაგები ხასიათდებოდნენ სტაბილურობით სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH - ის პირობებში და ასევე არ ინაქტივირდებოდნენ ქლოროფორმის თანაობისას. ფაგების შესწავლისას ვნახეთ, რომ ყველა მათგანს ჰქონდა ადსორბციისათვის საკმარისი დრო და ადსორბციის საკმაოდ მაღალი პროცენტი. *vB_Klp_1* და *vB_Klp_3*

ადსორბციისათვის საჭიროებდნენ 7 წთ-ს, ხოლო *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ბაქტერიოფაგები 10 წთ -ს. მოკლე დროში ადსორბციის მაღალი პროცენტი კი ფაგების ვირულენტობაზე მიუთითებს.

გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლამ დაგვანახა, რომ ფაგების ლატენტური პერიოდი ხანმოკლე იყო და ზოგიერთ მათგანს ჰქონდა საკმაოდ მაღალი გამოსავალი. *vB_Klp_4* -ისა და *vB_Klox_2* -ის ფაგების შემთხვევაში გამოსავლიანობა შესაბამისად იყო 300 და 346 ნაწ/მლი, ხოლო დანარჩენებისათვის - შედარებით დაბალი.

ბაქტერიოფაგების გენეტიკური შესწავლა საშუალებას გვაძლევს ვნახოთ, თუ რამდენად ენათესავებიან ერთმანეთს. ამისათვის *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* ფაგების დნმი გამოვყავით სტანდარტული მეთოდით, ხოლო რესტრიქციული ანალიზისათვის გამოვიყენეთ რესტრიქციული ფერმენტები: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *HincII*, *PstI*, *DpnI*, *KpnI*, *HinfI*. ფაგები ამჟღავნებდნენ განსხვავებულ რეზისტენტობას აღნიშნული ენზიმების მიმართ. ფაგების დაუზიანებელი დნმ-ები გამოვიყენეთ გენომის დაახლოებითი ზომების დასადგენად. ამისათვის კი გამოვიყენეთ პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზი PFGE. PFGE ანალიზის შედეგებმა გვაჩვენა, რომ გენომის ზომები ექვსივე ფაგისათვის 45 -50 kb - ის ფარგლებში მერყეობდა. ფაგების ბიბლიოთეკების შესადგენად და მათ შორის ნათესაური კავშირის დასადგენად შევეცადეთ მოგვეხდინა დაჭრილი ფაგის დნმ-ების პლაზმიდაში კლონირება, მათი შემდგომი შესწავლის მიზნით. ამისათვის გამოვიყენეთ pWSK29-ისა და pBluescriptII KS-ის ვექტორები. ექსპერიმენტების დროს ვცდილობდით მოგვეხდინა ტრანსფორმაცია, როგორც ქიმიურ, ასევე ელექტროკომპეტენტურ უჯრედებში. თუმცა ხანგრძლივი მცდელობით დადებითი შედეგი მივიღეთ მხოლოდ ორ ფაგზე: *vB_Klp_5*-სა და *vB_Klox_2*-ზე. *vB_Klp_5*-ისა და *vB_Klox_2*-ის ფაგების *HincII* და *PstI* -ით დაჭრილი დნმ-ის ფრაგმენტების კლონირება მოვახდინეთ pBluescriptII KS-ის ვექტორში შემდგომი ქიმიური ტრანსფორმაციით. რეკომბინირებული კლონების ზომები დავადგინეთ გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით, რაც შეესაბამებოდა დაახლოებით 1.5 და 1.2 kb -ს შესაბამისი ფაგებისათვის. აღნიშნული კლონების სექვენირებისა და შემდგომი ბიოინფორმატიკული ანალიზით *vB_Klp-5* 93 % ით ემსგავსებოდა ϕ KMV-ს მსგავს ფაგ KP34-ს, რომელიც ეკუთვნის *Podoviridae*-ს ოჯახს. ხოლო *vB_Klox_2* აჩვენებდა 96 -დან 99% -მდე მსგავსებას *Klebsiella*-ს ფაგ KP11, KP32 და *Enterobacteria* ფაგ K30 -თან.

მიუხედავდ ძალიან მცირე სექვენსის მონაცემებისა შეგვიძლია ცალსახად ვთქვათ, რომ ორივე ფაგი, *vB_Klp_5* და *vB_Klox_2*, მიეკუთვნება T7 ფაგების მსგავს *Podoviridae* - ს ოჯახს და *Autographivirinae* - ის ქვეოჯახს.

Klebsiella და *P. aeruginosa*-ს ფაგების ბიოლოგიური და გენეტიკური შესწავლის შემდეგ ვნახეთ, თუ რამდენად მოქმედებენ ამ კვლევაში დახასიათებული ფაგები ბიოფილმებზე, რადგანაც, როგორც უკვე აღვნიშნეთ ორივე მიკრობს ახასიათებს ბიოფილმების წარმოქმნის დიდი უნარი. შედეგებმა გვაჩვენა რომ *Klebsiella*-სა და *P. aeruginosa* -ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგები, ექსპერიმენტის დასაწყისშივე დამატების შემთხვევაში აინჰიბირებდნენ ბიოფილმების ზრდას. ხოლო ფაგით დამუშავების შემდეგ უკვე წარმოქმნილი ბიოფილმების მთლიანობას არღვევდნენ და ასუსტებდნენ მას. აღნიშნულ შედეგებს დიდი მნიშვნელობა აქვს, რადგან საავადმყოფოებში პლასტმასის დამხმარე ნაკეთობების დროს გართულებულ ინფექციებში ბიოფილმების განვითარებას მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს, თუმცა მსგავსი ინფექციების დროს მიკრობები კიდევ უფრო რეზისტენტული ხდებიან ანტიბიოტიკების მიმართ.

ბიოფილმების წარმოქმნის პროცესში დიდ პრობლემას წარმოადგენს ასევე მიკრობებთან ერთად სოკოების თანაარსებობა და შერეული ინფექციების განვითარება. აღნიშნული პრობლემის გამო ჩვენი მიზანი იყო შეგვექმნა კომპოზიტი, რომელშიც ბაქტერიოფაგებთან ერთად შევიდოდა ალტერნატიული ანტიფუნგალური საშუალება, რადგანაც თანამედროვე ქიმიური ანტიფუნგალური პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის წარმოქმნა ძალიან გახშირებულია. ალტერნატიულ ანტიფუნგალურ საშუალებად შევარჩიეთ მცენარეული წარმოშობის *Populus nigra*. თავდაპირველად შევისწავლეთ ცალკეული ფაგების ურთიერთქმედება ვერხვის ექსტრაქტთან, ხოლო მას შემდეგ რაც დავრწმუნდით, რომ ეს ნივთიერება არ იწვევდა ფაგების ინჰიბირებას შევქმენით ბიოკომპოზიტი. ბიოკომპოზიტის შექმნისათვის გამოვიყენეთ კვლევის მანძილზე დახასიათებული *Klebsiella* და *P. aeruginosa*-ს სპეციფიკური ფაგები და *Populus nigra*-ს 30 % წყალხსნარი. შევამოწმეთ მისი აქტივობა როგორც *Klebsiella*-სა და *P. aeruginosa*-ს ფლორის, ასევე სოკოვანი ფლორის მიმართაც. კომპოზიტი გავაშრეთ მისთვის დასრულებული სახის მისაცემად და შრობის შემდეგ კიდევ ერთხელ შევამოწმეთ მისი აქტივობა და მოქმედების სპექტრი.

შედეგად მივიღეთ კარგად დახასიათებული *Klebsiella* -სა და *P. aeruginosa*-ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგებისაგან და ანტიფუნგალური *Poppulus nigra*-საგან შემდგარი ბიოკომპოზიტი. ბიოკომპოზიტი ხასიათდებოდა მაღალი აქტივობითა და მოქმედების ფართო სპექტრით, როგორც ბაქტერიული ისე სოკოვანი ფლორის მიმართ და მომავალში შესაძლოა გამოყენებულ იქნეს სამკურნალო და პროფილაქტიკური მიზნით.

დასკვნები და რეკომენდაციები

1. შექმნილია *Pseudomonas aeruginosa* -ს 200 და *Klebsiella* -ს 50 შტამისაგან შემდგარი კოლექცია.
2. გამოყოფილია *Pseudomonas aeruginosa*-ს სპეციფიკური ორი ფაგი, რომელთაგან *vB_Pae-Kakheti25*-ი მიეკუთვნება *Siphoviridae*-ს, ხოლო *vB_Pae-TbilisiM32* – *Podoviridae* -ს.
3. გამოყოფილია *K. Pneumoniae*-ს სპეციფიკური ხუთი და *K. oxytoca* -ს საწინააღმდეგო ერთი ფაგი. მათგან *vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4* არიან *Siphoviridae* -ს ოჯახის წარმომადგენლები, ხოლო *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2* – *Podoviridae* -ს.
4. შესწავლილია *Pseudomonas*-ისა და *Klebsiella* -ს სპეციფიკური ფაგების ლიზისური აქტივობა და მოქმედების სპექტრი. *Pseudomonas*- ორივე და *K. Pneumoniae* -ს სპეციფიკური ორი ფაგი ხასიათდებოდა მაღალი აქტივობით (70 %). ხოლო *Klebsiella* -ს დანარჩენ ოთხ ფაგს მოქმედების შედარებით ვიწრო სპექტრი ჰქონდა.
5. *Pseudomonas*-სა და *Klebsiella* -ს ფაგების სასიცოხლო ციკლის შესწავლისას გამოვლინდა მცირე დროის (7 - 10 წთ) განმავლობაში ადსორბციის მაღალი პროცენტი (93 - 98 %), მოკლე ლატენტური პერიოდი (15-20 წთ) და მაღალი გამოსავლიანობა (60-300 ნაწ/მლ).
6. *P. aeruginosa* - ს ფაგების *vB_Pae-Kakheti25*-ისა და *vB_Pae-TbilisiM32*-ის გენომის სექვენირების შედეგებმა გვაჩვენა, რომ *vB_Pae-Kakheti25* ამჟღავნებდა მაღალ მსგავსებას *Pseudomonas* ფაგ PA73 თან, ხოლო *vB_Pae-TbilisiM32* 99 % -ით იდენტური იყო *Pseudomonas* ფაგ PT5-სა.

7. *K. Pneumoniae*-სა და *K. oxytoca* -ს სპეციფიკური ფაგების *vB_Klp_5*-სა და *vB_Klox_2*-ის პლაზმიდაში კლონირების და შემდგომი ბიონფორმატიკული ანალიზით დადგინდა, რომ ორივე ფაგი მიეკუთვნება T7 ფაგების მსგავს *Podoviridae* -ს ოჯახსა და *Autographivirinae* -ის ქვეოჯახს.
8. ბაქტერიოფაგებისა და *Populus nigra*-ს ურთიერთქმედების შესწავლისას ვნახეთ, რომ ვერხვის ექსტრაქტი არ იწვევდა ფაგების ინჰიბირებას და ამავე დროს, არ ცვლიდა ფაგების ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგიას.
9. *Pseudomonas aeruginosa* ფაგების (*vB_Pae-Kakheti25*-ისა და *vB_Pae-TbilisiM32*-ის), *Klebsiella* -ს სპეციფიკური ფაგებისა (*vB_Klp_1*, *vB_Klp_3*, *vB_Klp_4*, *vB_Klp_5*, *vB_Klp_6* და *vB_Klox_2*) და *Populus nigra*-ს-აგან შექმნილია ბიოკომპოზიტი, რომელიც ხასიათდება მაღალი აქტივობით როგორც ბაქტერიული, ისე სოკოვანი ფლორის მიმართ.

Literature Cited

1. *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections associated with contaminated ultrasound gel used for transesophageal echocardiography - Michigan, December 2011-January 2012. 2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 61:262-4
2. Abedon ST. 2009. *Adv. Appl. Microbiol.* 67:1-45
3. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. 2011. *Bacteriophage.* 1:66-85
4. Ackermann HW. 2007. *Arch. Virol.* 152:227-43
5. Ackermann HW. 2009. *Methods Mol. Biol.* 501:127-40
6. ADAMS MH. 1949. *J. Gen. Physiol* 32:579-94

7. Aksyuk AA, Rossmann MG. 2011. *Viruses*. 3:172-203

8. Alavidze Z MGSA. *Bacteriophage Therapy*. 2002.

Ref Type: Generic

9. Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S. 2000. *Infect. Immun.* 68:953-5

10. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. 2000. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 4:1563-89

11. Ariani N, Vissink A, van Oort RP, Kusdhany L, Djais A et al. 2012. *Biofouling*. 28:583-91

12. Azoulay E, Timsit JF, Tafflet M, de LA, Darmon M et al. 2006. *Chest* 129:110-7

13. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. 2012. *MBio*. 3:

14. Baddley JW, Winthrop KL, Patkar NM, Delzell E, Beukelman T et al. 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1664-9

15. Badiee P, Alborzi A. 2011. *Exp. Clin. Transplant.* 9:355-62

16. Balestrino D, Haagensen JA, Rich C, Forestier C. 2005. *J. Bacteriol.* 187:2870-80

17. Barclay NG, Spurrell JC, Bruno TF, Storey DG, Woods DE, Mody CH. 1999. *Infect. Immun.* 67:4613-9

18. Barnes WG, Gitta PS. 1979. *Am. J. Med. Technol.* 45:688-91

19. Ben Haj KA, Moissenet D, Vu TH, Khedher M. 2011. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 69:393-403

20. Bendiak GN, Ratjen F. 2009. *Semin. Respir. Crit Care Med.* 30:587-95

21. Bodey GP, Elting LS, Rodriguez S, Hernandez M. 1989. *Cancer* 64:2368-76
22. Brawner DL, Cutler JE. 1989. *J. Clin. Microbiol.* 27:1335-41
23. Breidenstein EB, Fuente-Nunez C, Hancock RE. 2011. *Trends Microbiol.* 19:419-26
24. Brisse S, Verhoef J. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:915-24
25. Brogden KA GJ. Polymicrobial Diseases. David R.Soll. Mixed Mycotic Infections. 2002.

Ref Type: Generic

26. Carmeli Y, Eichelberger K, Soja D, Dakos J, Venkataraman L et al. 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36:595-7
27. Castanheira M, Deshpande LM, Farrell SE, Shetye S, Shah N, Jones RN. 2012. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*
28. Cateau E, Cognee AS, Tran TC, Vallade E, Garcia M et al. 2012. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72:328-31
29. Ceysens PJ, Glonti T, Kropinski NM, Lavigne R, Chanishvili N et al. 2011. *Virology* 44:134
30. Ceysens PJ, Mesyanzhinov V, Sykilinda N, Briers Y, Roucourt B et al. 2008. *J. Bacteriol.* 190:1429-35
31. Chang J, Weigle P, King J, Chiu W, Jiang W. 2006. *Structure*. 14:1073-82
32. Chang JT, Schmid MF, Haase-Pettingell C, Weigle PR, King JA, Chiu W. 2010. *J. Mol. Biol.* 402:731-40
33. Chavan M, Rafi H, Wertz J, Goldstone C, Riley MA. 2005. *J. Mol. Evol.* 60:546-56

34. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. 2012. *Infect. Immun.* 80:1304-13
35. Choe HS, Son SW, Choi HA, Kim HJ, Ahn SG et al. 2012. *Am. J. Infect. Control* 40:e249-e254
36. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. 2011. *Bacteriophage.* 1:31-45
37. Cooper M, Tavankar GR, Williams HD. 2003. *Microbiology* 149:1275-84
38. Cunha BA. 2002. *Semin. Respir. Infect.* 17:231-9
39. d'Herelle F. 1931. *Can. Med. Assoc. J.* 24:619-28
40. Dale JW, Greenaway PJ. 1985. *Methods Mol. Biol.* 2:201-9
41. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A et al. 2010. *J. Infect. Dis.* 201:1096-104
42. Deretic V, Schurr MJ, Boucher JC, Martin DW. 1994. *J. Bacteriol.* 176:2773-80
43. Deretic V, Schurr MJ, Boucher JC, Martin DW. 1994. *J. Bacteriol.* 176:2773-80
44. Douglas LM, Wang HX, Keppler-Ross S, Dean N, Konopka JB. 2012. *MBio.* 3:
45. Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kesik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dabrowska B et al. 2011. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1333-45
46. Duckworth DH. 1976. *Bacteriol. Rev.* 40:793-802
47. Dudonne S, Poupard P, Coutiere P, Woillez M, Richard T et al. 2011. *J. Agric. Food Chem.* 59:4527-36

48. Dudonne S, Poupard P, Coutiere P, Woillez M, Richard T et al. 2011. *J. Agric. Food Chem.* 59:4527-36
49. Funke G, Monnet D, deBernardis C, von GA, Freney J. 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36:1948-52
50. Fuse K, Fujimura S, Kikuchi T, Gomi K, Iida Y et al. 2012. *J. Infect. Chemother.*
51. Gasik M, Van ML, Pierron D, Braem A, Hofmans D et al. 2012. *Adv. Healthc. Mater.* 1:117-27
52. Grimwood K, Semple RA, Rabin HR, Sokol PA, Woods DE. 1993. *Pediatr. Pulmonol.* 15:135-9
53. Grimwood K, To M, Rabin HR, Woods DE. 1989. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:41-7
54. Hachem RY, Chemaly RF, Ahmar CA, Jiang Y, Boktour MR et al. 2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1905-11
55. Hare NJ, Solis N, Harmer C, Marzook NB, Rose B et al. 2012. *BMC. Microbiol.* 12:16
56. Hassan HM, Papanikolaou T, Mariatos G, Hammad A, Hassan H. 2010. *Clin. Ophthalmol.* 4:1211-5
57. Hassett DJ. 1996. *J. Bacteriol.* 178:7322-5
58. Hatfull GF, Hendrix RW. 2011. *Curr. Opin. Virol.* 1:298-303
59. Hofling JF, Mardegan RC, Anibal PC, Furletti VF, Foglio MA. 2011. *Mycopathologia* 172:117-24

60. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35:322-32
61. Howard F, Jenkinson L, Julia Douglas. Interactions between *Candida* Species and Bacteria in Mixed Infections.

Ref Type: Generic

62. Hsu JL, Ruoss SJ, Bower ND, Lin M, Holodniy M, Stevens DA. 2011. *Crit Rev. Microbiol.* 37:277-312
63. Hyman P, Abedon ST. 2009. *Methods Mol. Biol.* 501:175-202
64. Jagnow J, Clegg S. 2003. *Microbiology* 149:2397-405
65. Jerkovic I, Mastelic J. 2003. *Phytochemistry* 63:109-13
66. Jiang W, Chang J, Jakana J, Weigele P, King J, Chiu W. 2006. *Nature* 439:612-6
67. Jonczyk E, Klak M, Miedzybrodzki R, Gorski A. 2011. *Folia Microbiol. (Praha)* 56:191-200
68. Junqueira JC. 2012. *Virulence.* 3:474-6
69. Kania RE, Lamers GE, van de Laar N, Dijkhuizen M, Lagendijk E et al. 2010. *Biofouling.* 26:519-26
70. Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, Goderdzishvili M, Rajakumar K, Alavidze Z. 2012. *Curr. Microbiol.*
71. Kaye KS, Engemann JJ, Fraimow HS, Abrutyn E. 2004. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 18:467-511, viii
72. Kerr S, Kerr GE, Mackintosh CA, Marples RR. 1990. *J. Hosp. Infect.* 16:35-48

73. Khimji PL, Miles AA. 1978. *Br. J. Exp. Pathol.* 59:137-47
74. KING EO, WARD MK, RANEY DE. 1954. *J. Lab Clin. Med.* 44:301-7
75. Kipiani NV, Kuchukhidze DK, Chichua ZD, Kipiani VA, Datunashvili IV. 2007. *Georgian. Med. News*35-8
76. Korvick JA, Bryan CS, Farber B, Beam TR, Jr., Schenfeld L et al. 1992. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2639-44
77. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. 2009. *Methods Mol. Biol.* 501:69-76
78. Kropinski AM, Prangishvili D, Lavigne R. 2009. *Environ. Microbiol.* 11:2775-7
79. Kucukhidze J. FARPKN. Antifungal activity of *Populus Nigra* matsh (Salicacea). 2002.

Ref Type: Generic

80. Kumamoto CA. 2011. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:386-91
 81. Kutter Elizabeth, Sulakvelidze Alexandre. "Bacteriophages. Biology and Applications" . 2012.
- Ref Type: Generic
82. Kutter E. 2009. *Methods Mol. Biol.* 501:141-9
 83. Kutter E, De VD, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L et al. 2010. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:69-86
 84. Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, Pelletier J. 2006. *J. Bacteriol.* 188:1184-7
 85. Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW. 1980. *Infect. Immun.* 28:546-56

86. Lavender HF, Jagnow JR, Clegg S. 2004. *Infect. Immun.* 72:4888-90
87. Lavender HF, Jagnow JR, Clegg S. 2004. *Infect. Immun.* 72:4888-90
88. Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM. 2008. *Res. Microbiol.* 159:406-14
89. Lecoutere E, Verleyen P, Haenen S, Vandersteegen K, Noben JP et al. 2012. *Microbiologyopen.* 1:169-81
90. Lederberg J. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:3167-8
91. Lee M, Miller RC, Jr. 1974. *J. Virol.* 14:1040-8
92. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE et al. 2005. *JAMA* 293:581-8
93. Liam CK, Lim KH, Wong CM. 2001. *Respirology.* 6:259-64
94. Lin CT, Wu CC, Chen YS, Lai YC, Chi C et al. 2011. *Microbiology* 157:419-29
95. Lin NT, Chiou PY, Chang KC, Chen LK, Lai MJ. 2010. *Res. Microbiol.* 161:308-14
96. Lingohr E, Frost S, Johnson RP. 2009. *Methods Mol. Biol.* 502:19-25
97. Lopes AC, Rodrigues JF, Clementino MB, Miranda CA, Nascimento AP, de Moraes Junior MA. 2007. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:827-32
98. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2000. *Microbes. Infect.* 2:1051-60
99. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. 2009. *PLoS. Pathog.* 5:e1000354

100. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. 2012. *Obstet. Gynecol.* 120:1407-14
101. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T et al. 2005. *J. Infect. Chemother.* 11:211-9
102. Mavrodi DV, Parejko JA, Mavrodi OV, Kwak YS, Weller DM et al. 2012. *Environ. Microbiol.*
103. Mendling W, Brasch J. 2012. *Mycoses* 55 Suppl 3:1-13
104. Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. 1992. *Infect. Immun.* 60:2529-35
105. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martinez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. 2012. *Med. Mycol.*
106. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1306-11
107. Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S et al. 2012. *Adv. Virus Res.* 83:73-121
108. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. 2010. *Crit Care* 14:R222
109. Moellering RC, Jr., Graybill JR, McGowan JE, Jr., Corey L. 2007. *Am. J. Med.* 120:S4-25
110. Morales DK, Hogan DA. 2010. *PLoS. Pathog.* 6:e1000886
111. Nale JY, Shan J, Hickenbotham PT, Fawley WN, Wilcox MH, Clokie MR. 2012. *PLoS. One.* 7:e37263

112. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. *Lancet Infect. Dis.* 9:228-36
113. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. *Lancet Infect. Dis.* 9:228-36
114. Ogunnariwo J, Hamilton-Miller JM. 1975. *J. Med. Microbiol.* 8:199-203
115. Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS et al. 1992. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13:582-6
116. Peek ME, Bhatnagar A, McCarty NA, Zughaiier SM. 2012. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012:843509
117. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. 2012. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:193-213
118. Pier GB, Saunders JM, Ames P, Edwards MS, Auerbach H et al. 1987. *N. Engl. J. Med.* 317:793-8
119. Podschun R, Ullmann U. 1998. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:589-603
120. Pollack M. 1984. *Rev. Infect. Dis.* 6 Suppl 3:S617-S626
121. Rautemaa R, Ramage G. 2011. *Crit Rev. Microbiol.* 37:328-36
122. Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A et al. 1992. *J. Appl. Physiol* 72:2271-7
123. Restuccia PA, Cunha BA. 1984. *Infect. Control* 5:343-7
124. Restuccia PA, Cunha BA. 1984. *Infect. Control* 5:343-7
125. Riser E, Noone P, Howard FM. 1980. *J. Clin. Pathol.* 33:400-7

126. Rutherford ST, Bassler BL. 2012. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2:
127. Sahly H, Podschun R, Ullmann U. 2000. *Adv. Exp. Med. Biol.* 479:237-49
128. Sanchez-Vargas LO, Ortiz-Lopez NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM et al. 2005. *J. Clin. Microbiol.* 43:4159-62
129. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. 2011. *Arch. Oral Biol.* 56:951-9
130. Schalk IJ, Guillon L. 2012. *Environ. Microbiol.*
131. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. 2005. *Infect. Immun.* 73:4626-33
132. Sedor J, Mulholland SG. 1999. *Urol. Clin. North Am.* 26:821-8
133. Serwer P, Watson RH, Son M. 1990. *J. Mol. Biol.* 215:287-99
134. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. 2009. *FEMS Microbiol. Lett.* 299:1-8
135. Shorr AF. 2009. *Crit Care Med.* 37:1463-9
136. Sidjabat H, Nimmo GR, Walsh TR, Binotto E, Htin A et al. 2011. *Clin. Infect. Dis.* 52:481-4
137. Smith DJ, Lamont IL, Anderson GJ, Reid DW. 2012. *Eur. Respir. J.*
138. Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Struve C, Weissman SJ, Aprikian P et al. 2009. *J. Bacteriol.* 191:1941-50
139. Stewart PS. 1994. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1052-8
140. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. 2009. *Infect. Immun.* 77:5016-24

141. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:649-59
142. Summers WC. 2011. *Bacteriophage.* 1:50-1
143. Sundell K, Wiklund T. 2011. *J. Fish. Dis.* 34:373-83
144. Suter S. 1994. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 150:S118-S122
145. Thomas JA, Rolando MR, Carroll CA, Shen PS, Belnap DM et al. 2008. *Virology* 376:330-8
146. Thurber RV. 2009. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:582-7
147. Toivanen P, Hansen DS, Mestre F, Lehtonen L, Vaahtovuo J et al. 1999. *J. Clin. Microbiol.* 37:2808-12
148. Tomas JM, Benedi VJ, Ciurana B, Jofre J. 1986. *Infect. Immun.* 54:85-9
149. Traugott KA, Echevarria K, Maxwell P, Green K, Lewis JS. 2011. *Pharmacotherapy* 31:598-608
150. Tu YC, Lu MC, Chiang MK, Huang SP, Peng HL et al. 2009. *Infect. Immun.* 77:2657-71
151. Waddell TE, Franklin K, Mazzocco A, Johnson RP. 2009. *Methods Mol. Biol.* 501:287-92
152. Waldor MK FDAS. Phages Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. Little JW. Loysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. 2005.
153. Wang J, Michel V, Hofnung M, Charbit A. 1998. *Res. Microbiol.* 149:611-24

154. Wang PW, Chu L, Guttman DS. 2004. *J. Bacteriol.* 186:400-10
155. Wargo MJ, Hogan DA. 2006. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:359-64
156. Warren JW. 2001. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:299-303
157. Warren JW. 2001. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:299-303
158. Weinbauer MG, Rassoulzadegan F. 2004. *Environ. Microbiol.* 6:1-11
159. Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. 2009. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:233-5
160. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. 2011. *Clin. Infect. Dis.* 53:532-40
161. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. 2011. *Clin. Infect. Dis.* 53:532-40
162. Yang YL. 2003. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36:223-8
163. Young LS. 1984. *Rev. Infect. Dis.* 6 Suppl 3:S603-S607
164. Young R. 1992. *Microbiol. Rev.* 56:430-81
165. Youngsaye W, Dockendorff C, Vincent B, Hartland CL, Bittker JA et al. 2012. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22:3362-5
166. Zuber TJ, Baddam K. 2001. *Postgrad. Med.* 109:117-6, 131