ბიოფილმის ფორმირების მარეგულირებელი გენების ექსპრესიის ცვლილებების შესწავლა ანტიბიოტიკების თანაობისას β-ლაქტამაზის მაპროდუცირებელი *E.coli*-ში

ლელა ჩიტაძე

სამაგისტრო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებების და საინჟინრო ფაკულტეტზე მოლეკულური ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სამაგისტრო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ასოცირებული პროფესორი ეკატერინე თევდორაძე

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2018

განცხადება

“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. “

ლელა ჩიტაძე

სარჩევი

I აბსტრაქტი iv

II აბრევიატურის ჩამონათვალი vi

III ცხრილების ჩამონათვალი vii

IV სურათების ჩამონათვალი viii

V შესავალი 1

VI ლიტერატურის მიმოხილვა 3

6.1 ანტიობიოტიკორეზისტენტობა 3

6.2 რეზისტენტობის განვითარების მექანიზმი 3

6.3 ნაწლავის ჩხირი (Escherichia coli) 6

6.4 ESBLs განსაზღვრა და კლასიფიკაცია 7

6.4.1 SHV ჯგუფი 8

6.4.2 CTX ჯგუფი 8

6.4.3 OXA ჯგუფი 8

6.4.4 PER ჯგუფი 9

6.4.5 GES-1 ჯგუფი 9

6.5 ბიოფილმის აღმოჩენის ისტორიული მიმოხილვა 9

6.6 ბიოფილმის სტრუქტურული კომპონენტები 11

6.7 უჯრედგარე პოლიმერული მატრიქსი 12

6.7.1 უჯრედგარე ცილები 13

6.7.2 უჯრედგარე დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავა (eDNA) 14

6.8 ბიოფილმის ფორმირების მიზეზები 15

6.9 ბიოფილმის ფორმირების მექანიზმი 16

6.9.1 მიმაგრება 17

6.9.2 მიკრო კოლონიზაციის ფორმირება 18

6.9.3 გამოყოფა 18

6.10 ბიოფილმები და ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა 19

6.11 ბიოფილმთან დაკავშირებული დაავადებები 23

6.11.1 სამედიცინო მოწყობილობებთან დაკავშირებული ინფექციები 23

6.11.2 სამედიცინო მოწყობილობასთან არა დაკავშირებული ინფექციები 25

6.12 პრევენციული ზომები ბიოფილმის წინააღმდეგ 27

VII მეთოდოლოგია 28
7.1 კვლევის ობიექტი და მეთოდები 28
7.2 ბაქტერიების კულტივირება 30
7.3 ტოტალური რნმ გამოყოფა 31
7.4 ტოტალური რნმ-ის კონცენტრაციის განსაზღვრა 33
7.5 ბიოფილმის ფორმირებაზე პასუხისმგებელი გენების შერჩევა ტრანსკრიპტომის ანალიზით (RNAseq) 34
7.6 ოლიგონუკლეოტიდების დიზაინი 34
7.7 რნმ-ის უკუტრანსკრიფცია კომპლემენტარული დნმ-ის მისაღებად 35
7.8 რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში 37
VIII შედეგები 40
IX რეალურ დროში პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით მიღებული შედეგების სტატისტიკური ანალიზი 44
9.1 მთავარი ფიბრილარული ცილა Fml1A 45
9.2 ფიბრილარული გარე მემბრანის ცილა 46
9.3 ფიბრილარული ჩაპერონული ცილა 47
9.4 ბიოფილმის რეგულატორი 48
9.5 ფილმის ფორმირების რეპრესორი ინდოლის ტრანსპორტერის რეგულაციით 49
9.6 ბეტა -ლაქტამაზა TEM-1 50
X დასკვნა 51

I აბსტრაქტი

დღევანდელი მონაცემებით ანტიბიოტიკორეზისტენტობა სერიოზულ გამოწვევას წარმოადგენს ბიოსამედიცინო სფეროში. ცნობილია, რომ ბაქტერიების აგრეგაცია თითწარმოქმნილ მატრიქსში, რომელსაც ბიოფილმი ეწოდა, მნიშვნელოვან როლს თამაშობს რეზისტენტობის განვითარებაში. წარმოდგენილი სამეცნიერო კვლევის მიზანია ბიოფილმის მარეგულირებელი გენების ექსპრესიის ცვლილებების შესწავლა ანტიბიოტიკიან და უანტიბიოტიკო არეზე გაზრდილ მრავლობით–რეზისტენტულ *Escherichia coli*-ში. ბიოფილმის მარეგულირებელი გენების ექსპრესიის ცვლილების შესწავლა მნიშვნელოვანია ახალი ანტიბაქტერიული და ბიოფილმის საწინააღმდეგო საშუალებების შექმნაში. ბაქტერიული ბიოფილმის მარეგულირებელი გენების ექსპრესიის შესწავლა დაგვეხმარება ეფექტური საკონტროლო სტრატეგიების შემუშავებასა და მკურნალონის გაუმჯობესებაში.

კვლევაში განხორციელდა β-ლაქტამაზის მაპროდუცირებელი (ESBL) *E.coli* ბაქტერიული შტამის (იდენტიფიცირებულია საქართველოში) მთლიანი ტრანსკრიპტომის (ე.წ. RNA_SEQ) შედარებითი ანალიზით იდენტიფიცირებულ 250 გენს შორის - ბიოფილმის მარეგულირებელი გენების ექსპრესიის ცვლილების ვალიდაცია რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით რეალურ დროში. კვლევის ფარგლებში დასმული ამოცანების განსახორციელებლად გამოყენებული იქნა სხვადასხვა მეთოდები: მიკროორგანიზმების კულტივირება ანტიბიოტიკიან და უანტიბიოტიკო საკვებ არეზე, ტოტალური რნმ–ის გამოყოფა, ბიოფილმის ფორმირების რეგულატორული გენების (bssR-Uniprot sp|C3THB2; bssS-Uniprot sp|A0A0A8KE27) და მოურავი გენების (Housekeeping genes) პრაიმერების დიზაინის შერჩევა, რნმ-ის უკუტრანსკრიფცია კ-დნმ-ის მისაღებად (RETROscript® Reverse transcription for RT-PCR), პოლიმერაზულ ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (RT-PCR).

აღნიშნულმა კვლევამ გამოამჟღავნა, რამდენიმე ბიოფილმთან დაკავშრებული გენი, რომელთა ექსპრესია იცვლებოდა ანტიობიოტიკებთან კულტივაციის დროს და ასევე რეფერენსთან მიმართებაში და თანხვედაში მოდიოდა მთლიანი ტრანსკრიპტომიკის ანალიზის შედეგებთან.

საკვანძო სიტყვები: ანტიბიოტიკორეზისტენტობა, ბაქტერიული ბიოფილმი, მრავლობით–რეზისტენტული *Escherichia coli,* β-ლაქტამაზა.