ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

ტრაპაიძე ლიზი

Pseudomonas aeruginosa-ს სპეციფიკური ფაგის ფარმაკოკინეტიკისა და ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკის შესწავლა თაგვის მოდელზე

სამაგისტრო პროგრამა-ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად იმუნოლოგიაში

თემის ხელმძღვანელები-**მარინე თედიაშვილი**, ბმდ

ნინო ჯანელიძე, ბმდ

ნაშრომი შესრულდა გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის, და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში და თსუ-ს იმუნოლოგია/მიკრობიოლოგიის კათედრაზე

თბილისი, 2019

ანოტაცია 4
Abstract 6
თემის აქტუალობა 8
I. ლიტერატურული მიმოხილვა 10
1.1 Pseudomonas aeruginosa ზოგადი დახასიათება 10
1.2 კლინიკური მნიშვნელობა 11
1.3 დაავადების პათოგენეზი 12
2. ბაქტერიოფაგები 13
2.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია 13
2.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია და მათი სასიცოცხლო ციკლი 15
2.3 ფაგოტერაპია 16
3. ფარმაკოლოგია 17
4. ბაქტერიოფაგები და იმუნური სისტემა 22
II. გამოყენებული მასალები და მეთოდები 24
1. საკვლევი მასალები 24
2.1 ბაქტერიოფაგების სუფთა ხაზის მიღება (დაკლონვა) 25
2.2 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა 25
2.3 ლიზისური აქტივობისა და სპექტრის განსაზღვრა 26
2.3 ბაქტერიოფაგის გამრავლება 26
2.4 ფაგების ლიზისური სტაბილობა 27
2.5 ელექტრონული მიკროსკოპია 27
2.6 ბაქტერიოფაგების მიმართ რეზისტენტული მუტანტების მიღება 27
2.7 ფაგური დნმ-ის რესტქრიუქციული ანალიზი 27
2.8 ნეიტრალიზაცია 28
2.9 ცხოველური ორგანიზმებიდან აღებული ნიმუშების დამუშავება 29
2.10 ულტრაცენტრიფუგირება ცეზიუმის ქლორიდის ორმაგ გრადიენტზე 29
2.11 გელ-ელექტროფორეზი 30
2.12 ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი 31
2.13 ცხოველურ ორგანიზმებზე მუშაობის ტექნიკა 31
III. მიღებული შედეგები 32

3.1 PNMX ფაგის სუფთა ხაზის კლონის მიღება 32
3.2 *P.aeruginosa*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგის PNMX-ის დახასიათება 32
3.3 PNMX ფაგის გამრავლება სინთეზურ საკვებ არეში 33
3.4 ბაქტერიოფაგის გასუფთავებული პრეპარატის მიღება 36
3.5 ბაქტერიოფაგის ლიზისური სპექტრის შესწავლა 38
3.6 ბაქტერიოფაგის მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის განსაზღვრა 39
3.7 PNMX ფაგის ლიზისის სტაბილობილობა თხიერ არეში 40
3.8 ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი 41
3.9 ფარმაკოკინეტიკური და ფარმაკოდინამიკური ექსპერიმენტების შედეგები 42
3.10 ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკა 47
გამოყენებული ლიტერატურა 50

ანოტაცია

დღეისათვის, *Pseudomonas aeruginosa*-თი გამოწვეული ინფექციები და მათთან ბრძოლა კლინიკური მედიცინის პრიორიტეტს წარმოადგენს, რაც ამ მიკროორგანიზმის ანტიბიოტიკების მიმართ გაზრდილ რეზისტენტობას უკავშირდება. ამდენად, ამ ოპორტუნისტული პათოგენით გამოწვეულ დაავადებების სამკურნალოდ ფაგოთერაპიის მიმართ ინტერესი სულ უფრო მზარდია არა მარტო საქართველოში, არამედ მსოფლიო მასშტაბით.

ახალი სამკურნალო პრეპარატების, მათ შორის ფაგური პრეპარატების კლინიკაში დანერგვისათვის წინა მოსამზადებელ საფეხურს ფარმაკოლოგიურ კვლევები წარმოადგენს, რასაც დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მათი ეფექტურობისა და უსაბრთხოების დასაბუთების თვალსაზრისით. დღესდღეობით ფაგური თერაპიის რაციონალური გამოყენებისთვის აუცილებელია კანდიდატი ფაგების დეტალური დახასიათება და ფარმაკოკინეტიკური და ფარმაკოდინამიკური მახასიათებლების შესწავლა.

მოცემული კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა *P.aeruginosa*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგი PNMX, რომელიც გამოყოფილი იყო მტკვრის წყლიდან, 2017 წელს. აღნიშნული ფაგისათვის, როგორც ექსპეტიმენტულ თერაპიულ პრეპარატში შემავალი სავარაუდო კანდიდატისათვის შევისწავლეთ სხვადასხვა ბიოლოგიური მახასიათებლები: ლიზისური სპექტრი, გამრავლების დინამიკა, ფაგოსპეციფიკური მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე და სტაბილობა თხიერ არეში, რისთვისაც გამოვიყენეთ ნახევრად გასუფთავებული ფაგური პრეპარატი (ფაგოლიზატი). იგივე პრეპარატით მოვახდინეთ თაგვის მოდელზე ფარმაკოკინეტიკისა და ფარმაკოდინამიკის შესწავლა, ხოლო ფაგის ვირიონის მორფოლოგიისა და დნმ-ს რესტრიქციული პროფილის კვლევისათვის ვიყენებდით მაღალი სისუფთავის (CsCl გრადიენტში გასუფთავებული) ფაგური პრეპარატი. ჩატარებულ ექსპერიმენტებში განიყენებული იყო ფაგებზე კვლევის სანდარტული ბაქტერიოლოგიური და იმუნოლოგიერი მეთოდები.

ცხოველებზე სამოდელო ცდებში PNMX ფაგის ფარმაკოკინეტიკის და ფარმაკოდინამიკის შესასწავლად გამოყენებული იყო სუფთა ხაზის მდედრი თაგვები

(Hsd:ICR (CD1), FVB/NHanHsd). ფაგოლიზატის შეყვანას ინექციით ვახდენდით კანქვეშ, დროის სხვადასხვა ინტერვალებში (30 წთ, 4სთ, 24სთ, 48სთ და მე-7 დღე) და ვსაზღვრავდით ფაგის გადანაწილებას სისხლსა და სხვადასხვა ორგანოებში: ელენთა, თირკმელები, ღვიძლი, ფილტვები და ტვინი.

ფარმოკოკინეტიკური ექსპერიმენტების შედეგებმა გვიჩვენა, რომ PNMX ფაგი ხასიათდებოდა სისხლსა და სხვადასხვა ორგანოებში სწრაფი შეღწევადობით და მაქსიმალურ კონცენტრაციას აღწევდა 30წთ-ზე, რასაც მოსდევდა ფაგის რაოდენობის მკვეთრი შემცირება 24სთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც სტაბილურად ნარჩუნდებოდა მინიმალურ დონეზე 7 დღის მანძილზე. განსხვავებული სურათი მივიღეთ ტვინის შემთხვევაში, სადაც ფაგის შეღწევადობა იყო შენელებული და მაქსიმალურ კონცენტრაციას აღწევდა შეყვანიდან 24 საათის შემდეგ. აღნიშნული შედეგი შესაძლოა აიხსნას ჰემატოენცეფალური ბარიერის არსებობით და ტვინის ქსოვილის თავისებურებებით.

ჩატარებული კვლევის ერთ-ერთ მიზანს წარმოადგენდა ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკის შესწავლა თაგვებში ფაგის ერთჯერადი შეყვანით. წარმოქმნილი ანტისხეულების დეტექციას და რაოდენობრივ განსაზღვრას თაგვის სისხლის შრატში ვახდენდით ფაგის ნეიტრალიზაციის მეთოდის გამოყენებით შეყვანიდან მე-7, მე-14 და 23-ე დღეს. შედეგებმა გვიჩვენა, რომ მანეიტრალიზებელი ანტისხეულების არსებობა თაგვის ორგანიზმში ფიქსირდებოდა მე-7 დღიდან მცირე რაოდენობით და პიკს აღწევდა 23-ე დღეს.

აღწერილი სამუშაოს შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ PNMX ფაგი ხასიათდება თერაპიული თვალსაზრისით გამოსაყენებელი ფაგისათვის შესაბამისი ბიოლოგიური მახასიათებლებით, რაც გამოიხატება მყარ და თხიერ არეში მისი სწრაფი და მარტივი გამრავლების უნარით, ფართო ლიზისური სპექტრით, ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის დაბალი სიხშირითა და ლიზისის მაღალი სტაბილობით თხიერ არეში. ფაგის სწრაფი შეღწევადობა ექსპერიმენტული თაგვების სისხლსა და ორგანოებში ასევე მიუთითებს საკვლევი ფაგის მაღალ თერაპიულ პოტენციალზე. საკვლევი თაგვების სისხლის შრატში PNMX ფაგის მიმართ სპეციპიკური ანტისხეულების არსებობა გვიჩვენებს თაგვის ორგანიზმის ადეკვატური იმუნური პასუხს ფაგის ნუკლეოკაფსიდის, როგორც ანტიგენის შეყვანაზე.

Abstract

Nowadays, infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and fighting against them are a priority of clinical medicine that is associated with increased resistance to antibiotics of this microorganism. Therefore, interest in phagotherapy in the treatment of diseases caused by this opportunistic pathogen is increasing not only in Georgia, but worldwide.

Pharmacological studies are the previous preparatory stage for the introduction of medicines, including phagic drugs, in the clinic, which is of great importance in terms of their effectiveness and safety. Nowadays, the rational use of phagic therapy requires a detailed description of the candidate phages and the study of pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics.

The objective of this study was P.Aeruginosa specific phage called PNMx, which was separated from the Mtkvari water in 2018. For the above mentioned phage, as the proposed candidate in the experimental-therapeutic preparation we have studied the different biological features: lysine spectrum, multiplication dynamics, the frequency of generation and stability of phagospecific mutants in the thoracic area, for which we have used semi-purified phagic drug "phagolysate". the same drug was used to study the pharmacokinetics and pharmacodynamics on the mouse model, and high purity phagine preparation (CsCl gradient cleansed) was used for studying the phage virion

morphology and DNA restricting profile. The study used standard bacteriological and immunologic methods for research on phages.

pure-line female mice (Hsd: ICR (CD1), FVB / NHANHsd were used to study the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the PNMx phage in the samples of animals. We were using subcutaneous injections by intervals (30 min, 4 hrs, 24 hrs, 48 hrs and 7th day) and we have determined the distribution of phage in blood and various organs: spleen, kidneys, liver, lungs and brains.

The results of pharmacokinetic experiments showed that the PNMx phage was characterized by rapid penetration in the blood and various organs and reached maximum concentration in 30 minutes, which would have resulted in sharp decrease in the number of phages within 24 hours, and remained steady at a minimum level in 7 days. We got a different picture in the case of the brain where the penetration of the phage was slow and maximum concentration was reached after 24 hours of introduction. This effect can be explained by the existence of hematoencephalic barrier and the specifics of brain tissue.

One of the objectives of the research was to study the dynamics of the formation of antiphagal antibodies with a single phage entry. Detection and quantitative determination of the produced antibodies in the mouse blood serum on the 7th, 14th and 23th day was used by the method of phage neutralization. The results showed that the presence of neutralising antibodies in the mouse's body was observed from the 7th day and reached a peak on the 23rd day.

Based on the analysis of the results of the work, the PNMx phage is characterized by the feauters similar to the phage that is used for the therapic aims, which is expressed by fast and easy multiplication in the propagate area, with a wide range of lysis spect, low frequency of formation of phagoresistant mutants and high stablility of lysis In the …liquid.. area .The rapid penetration of the phage in the blood and organs of experimental mice also indicates high therapeutic potential of the research phage. The presence of a specific antibody to the PNMx phage in the serum of mice shows an adequate immune response of the mouse body on the introduction of phagine nucleocapsid as an antigen.

თემის აქტუალობა

ბაქტერიული წარმოშობის ინფექციებთან ბრძოლა თანამედროვე მედიცინის გლობალურ პრობლემას წარმოადგენს. როგორც ცნობილია ყველაზე ფართოდ მოხმარებად მედიკამენტს ანტიბიოტიკები წარმოადგენს. თუმცა ბოლო პერიოდში აღმოჩნდა, რომ ანტიბიოტიკები არ არის უნივერსალური საშუალება ბაქტერიების წინააღმდეგ საბრძოლველად, რაც გულისხმობს იმას რომ ბევრ ბაქტერიას, მათ შორის ორგანიზმისთვის საშიშ მიკროორგანიზმებს აქვთ უნარი განავითარონ ანტიბოტიკების მიმართ რეზისტენტულობა, რაც დღეისათვის მნიშვნელლოვან პრობლემას წარმოადგენს თანამედროვე მედიცინაში. გარდა ანტიობიოტიკო რეზისტენტობისა, ცნობილია რომ ანტიბიოტიკებს გააჩნიათ მრავალი უარყოფითი თვისებები, რაც გამოიხატება ანტიბიოტიკებით მკურნალობისას გამოვლენილი გვერდითი ეფექტებით, მაგალითად ალერგიული რეაქციები, ნაწლავური პრობლემები, სოკოვანი ინფექციები და სხვა. ისიც უნდა გავითვალისწინოთ, რომ ზოგიერთ ბაქტერიას აქვს უნარი წარმოქმნას თავის გარშემო სამგანზომილებიანი სტრუქტურები - ბიოფილმები, რომლებიც ხელს უშლის ანტიბიოტიკების ინფექციის კერაში შეღწევას. ბიოფილმები წარმოადგენენ კიდევ ერთ დიდ პრობლემას, რაც კიდევ უფრო ართულებს ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობას.

ბაქტერიებთან საბრძოლველად არსებობს ბუნებრივი ალტერნატიული საშუალება- ბაქტერიოფაგები. მათ გააჩნიათ მრავალი უპირატესობები ანტიბიოტიკებთან შედარებით. კერძოდ, ისინი შერჩევით ანადგურებენ ბაქტერიულ უჯრედებს, ებრძვიან მხოლოდ დაავადების გამომწვევ მიკრობებს, ისე რომ ზეგავლენას არ ახდენენ სასარგებლო ბაქტერიებზე. გარდა ამისა, ანტიბიოტიკებთან შედარებით ფაგებით მკურნალობა არ იწვევს სერიოზულ გვერდითი ეფექტების გამოვლინებას. მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ფაგებს არ ახასიათებთ ციტოტოქსიურობა და ასევე აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ ისინი თვითგამრავლებადია. აქედან გამომდინარე შეიძლება ვიმსჯელოდ, რომ ბაქტერიოფაგები ანტიბიოტიკების ერთ-ერთ საუკეთესო ალტერნატივაა ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიებით გამოწვეული დაავადებებთან ბრძოლაში.

ახალი სამკურნალო პრეპარატების, მათ შორის ფაგური პრეპარატების კლინიკაში დანერგვისათვის წინა მოსამზადებელ საფეხურს ფარმაკოლოგიურ კვლევები წარმოადგენს, რასაც დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მათი ეფექტურობისა და უსაბრთხოების დასაბუთების თვალსაზრისით. დღესდღეობით ფაგური თერაპიის რაციონალური გამოყენებისთვის აუცილებელია კანდიდატი ფაგების დეტალური დახასიათება და ფარმაკოკინეტიკური და ფარმაკოდინამიკური მახასიათებლების შესწავლა.

წარმოდგენილი კვლევის მიზანი იყო *P. aeruginosa*-ს მიმართ აქტიური PNMX-ის დეტალური დახასიათდება, აღნიშნული ფაგის ნაწილობრივად გასუფთავებული ლიზატის ფარმაკოკინეტიკის და ფარმაკოდინამიკის, და ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკის შესწავლა.

აქედან გამომდინარე ჩვენი კვლევის ამოცანები იყო:

1) PNMX ფაგის მაღალტიტრიანი გასუფთავებული და ნაწილობრივ გასუფთავებული პრეპარატის მიღება;
2) PNMX ფაგის სხვადასხვა ბიოლოგიური მახასიათებლების შესწავლა
3) თაგვის მოდელზე PNMX ფაგის ფარკაკოკინეტიკის შესწავლა სისხლსა და ორგანოებში.
4) PNMX ფაგის თაგვის ორგანიზმე ტოქსიური/ნეგატიური ზემოქმედების სავარაუდო ეფექტის (ფარმაკოდინამიკის) დადგენა ღვიძლისა და თირკმლის ნიმუშების ჰისტომორფოლოგიური კვლევის საშუალებით;
5) თაგვის ორგანიზმში PNMX ანტიფაგური ანტისხეულების წამოქმნის დინამიკის შესწავლა

I. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 Pseudomonas aeruginosa ზოგადი დახასიათება

Pseudomonas-ის გვარს ეს სახელწოდება 1894 წელს Walter Migula-მ უწოდა. პიგმენტური მახასიათებლის მიხედვით მან ამ გვარის წარმომადგენლები დაყო ხუთ ჯგუფად.

1970 წ. ეს გვარი წარმოდგენილი იყო შემდეგი ჯგუფების სახით:

I. rRNA ჰომოლოგიური ჯგუფი gamma Proteobactetria-ს ქვესახეობა
II. ჰომოლოგიური ჯგუფს მიეკუთვნბეოდა Burkholderia -ს სახეობები
III. Comamonas, Acidovorax და Hydrogenophaga
IV. ჯგუფი - Brevundimona
V. ჯგუფში შედიოდა Stenotrophomonas და Xanthomonas წარმომადგენლები

დღესდრეობით ცნობილია *Pseudomonas*-ის გვარის 160 სახეობა. ამათგან კი მხოლოდ 12 სახეობაა აღწერილი კლინიკურად მნიშვნელოვანი, მათ შორისაა *Pseudomonas aeruginosa.* *Pseudomonas aeruginosa* გრამ უარყოფითი, არაფერმენტირებადი, აერობული ჩხირებია, ისინი მიეკუთვნება *Pseudomonadaceae* -ს ოჯახს. [11]

Classification

Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gamma Proteobacteria
Order:	Pseudomonadales
Family:	Pseudomonadaceae
Genus:	*Pseudomonas*
Species:	*P. aeruginosa*

სურ.1 *Pseudomonas aeruginosa-ს* კლასიფიკაცია

თითქმის ყველა შტამი არის მოძრავი, აქვთ პოლარულად განლაგებული ერთი შოლტი და ზომით მერყეობენ 1.0-1.5 დან 5.0μm.

Pseudomonas aeruginosa საკმაოდ ფართოდაა გავრცელებული. გვხდება ყველგან:

წყალში, მიწაში, მცენარეებსა და ცხოველებში. ისინი არიან ბიოფილმებში, სადაც ემაგრებიან სხვადასხვა ზედაპირს ან პლანქტონური ფორმით, აქტიურად დაცურავენ შოლტის საშუალებით. *Pseudomonas*-ს გვარის წარმომადგენლები ზრდისთვის საჭიროებენ მინიმალურ საკვებს. ისინი არიან ფაკულტატური ანაერობები, რადგან მარტივად იზრდებიან უჟანგბადო ან ჟანგბადით ნაწილობრივ გაჯერებულ გარემოში. ანაერობულ ზრდას უზრუნველყოფს აზოტი, რომელიც ელექტრონების უნივერსალური აქცეპტორია.

P. aeruginosa ზრდისათვის ოპტიმალურ ტემპერატურაა 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* რეზისტენტულია ტემპერატურისა და სხვა ფიზიკური ფაქტორების მიმართ. მას შეუძლია გაუძლოს 42°C ტემპერატურას, ასევე სუსტ ანტისეპტიკებს, მარილისა და საღებავევების მაღალ ტემპერატურას.

მორფოლოგიურად, *P. aeruginosa* წარმოქმნის სხვადასხვა ტიპის კოლონიებს, ხშირ შემთხვევაში არის ლორწოვან-მუკოიდური. სწორედ მუკოიდურობა განსაზღვრავს შტამის ვირულენტობას, რაც მეტად ლორწოვანია მით უფრო ვირულენტურია.

Pseudomonas aeruginosa წარმოქმნის წყალში ხსნად ორი ტიპის პიგმენტს: მოყვითალო-მომწვანო ან მოყვითალო-მოყავისფრო პიოვერდინს და ლურჯი ფერის-პიოციანინს. პიოციანინინი უხვად წარმოიქმნება დაბალი კონცენტრაციით რკინის შემცველ საკვებ არეში. ზოგიერთი შტამი ასევე წარმოქმნის პიორუბინს, რომელსაც აქვს მოწითალო-მოყავისფრო შეფერილობა. [12, 13]

1.2 კლინიკური მნიშვნელობა

დღესდღეობით, *P. aeruginosa* კლინიკური მედიცინის მნიშვნელოვანი პრობლემას წარმოადგენს, რასაც ეპიდემიოლოგიური კვლევები ადასტურებს. ყოველწლიურად იზრდება ამ მიკრობის რეზისტენტობა ანტიბიოტიკების მიმართ. *Pseudomonas aeruginosa* საკმაოდ მნიშვნელოვანი ნოზოკომიალური პათოგენია. ის იწვევს საშარდე სისტემის, რესპირატორული ტრაქტის, ძვლისა და შემაერთებელი ქსოვილის, რბილი ქსოვილის, გასტროინტესტინალურ ინფექციებს, დერმატიტებს, ბაქტერიემიას და სხვა დაავადებებს.

საავადმყოფოებში მოიძებნება ამ მიკრობის უამრავი რეზერვუარი:დეზინფექტანტები, საკვები, კანი, სასუნთქი სისტემები და სხვა. ასევე მუდმივად ვლინდება საავადმყოფოს გარემოში, მცენარეებზე, ბოსტნეულზე, სხვადასხვა საშუალებებიდან მნახველებისა და პაციენტებზე გადატანით. ვრცელდება პაციენტიდან პაციენტზე, დაბინძურებულ საკვებტან და წყალთან უშუალო კონტაქტის დროს. გასაკუთრებით ხშირად ვლინდება იმუნუდეფიციტურ და ალკოჰოლიზმით დაავადებულ ადამიანებში. *Pseudomonas aeruginosa* ასევე სერიოზულ პრობლემას ქმნის კიბოთი, მუკოვისციდოზითა და დამწვრობებით ჰოსპიტალიზებულ პაციენტებში. სწორედ ამიტომ სიკვდილიანობის რიცხვი ამ ტიპის პაციენტებში 50%-ით მატულობს. აშშ-ში ინფექციური შემთხვევათა 0.4% ამ მიკრობითა გამოწვეული, CDC-ს მონაცემებით.

P. aeruginosa ცნობილია, როგორც ანტიბიოტიკების მიმართ მაღალ რეზისტენტური პათოგენი, სწორედ ამიტომ ის ერთ-ერთ ყველაზე საშიშ საავადმყოფოს შიდა მიკრობათაა მიჩნეული. საავადმყოფოებში იგი რეზისტენტულია ბევრი ტიპის ანტიბიოტიკების მამართ, რაც განპირობებულია რამდენიმე ფაქტორით: გრამ ურაყოფითი ბაქტერიებისთვის დამახასიათებელი გარეთა მემებრანითაა. აღსანიშნავია ისიც, რომ ბიოფილმების ფორმირებისას სხვადასხვა ზედაპირზე მისი მიმაგრება და კოლონიზაცია ხელს უშლის ანტიბიოტიკების შეღწევას. გარდა ამისა, *Pseudomonas aeruginosa* შეიცავს ანტიბიოტიკო რეზისტენტულ პლაზმილებს R ფაქტორი და RTF ახორციელებს გენების ჰორიზონტალურ გადატანას, ტრანსდუქციისა და კონიუგაციის საშუალებით, რაც გაზრდილი რეზისტენტობის კიდევ ერთი მიზეზია. სულ რამდენიმე ანტიბოტიკია, რომლის მიმართ ანტიბიოტიკწბი ეფექტურია, ესენია: გენტამიცინი, იმიპენემი, ფლუოროქინოლონები. მიუხედავად ამისა არსებობს შტამები, რომლებიც ამ ანტიბიოტიკების მამართაც გამძლენი არიან. ზოგიერთი დაავადების დროს, მაგალითად კისტოზური ფიბროზის შემთხვევებში, ანტიბიოტიკო რეზისტენტულობა იმდენად მაღალია, რომ განკურნება ზოგიერთ შემთხვევაში შეუძლებელი ხდება. [14, 15]

1.3 დაავადების პათოგენეზი

ფსევდომონასებით გამოწვეული ინფექციების უმეტესობა ინვაზიურია და ამავდროულად ტოქსიკურიც. ინფექციის განვითარება შეიძლება სამ სტადიად დავყოთ:

1. ბაქტერიის ადგეზია და კოლოზიცაზია, 2. ლოკალური ინვაზია, 3. ინფექციის სისტემური გავრცელება. ინფექციის შეწყევტა ყველა სტადიაზეა შესაძლებელი.

P. aeruginosa -ს თავიდან ასაცილებლად საჭიროა ასეპტიკური პირობების დაცვა, მუდმივი კონტროლი საავადმყოფოს აღჭურვილობის, როგორიცა კათეტერები და სხვა ინსტრუმენტები.

როგორც ვხედავთ, *Pseudomonas aeruginosa* საკმაოდ საშიშ პათოგენების სიაში შედის, რომელთან ბრძოლაც თანამედორვე მედიცინის კვლევის ერთ-ერთი მნიშვნელოვან ნაწილს წარმოადგენს. ფაგოთერაპიის როლი კი კიდევ უფრო იზრდება *Pseudomonas aeruginosa* -მიერ გამოწვეულ დაავადებების სამკურნალოდ. [16, 17]

2. ბაქტერიოფაგები

2.1 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს. მათი გავრცელების არეალი ფართოა, გვხვდებიან როგორც ჰაერში, ნიადაგში, წყალში, მცენარეების ზედაპირზე, განსაკუთრებით ჩამდინარე – საკანალიზაციო წყლებში, ასევე- ადამიანისა და ცხოველების სხვეულის სხვადასხვა ღრუებში და ნაწლავებში. ადამიანის ორგანიზმი გამუდმებით გამოყოფს დიდი რაოდენობით ენდოგენურ ფაგებს. ფსიქროფილური ფაგები გვხვდებიან გაფუჭებულ, გაყინულ ხორცში და თევზში [1, 20]

ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა უკავშირდება, 20-ე საუკუნეში მოღვაწე ორ მეცნიერს, ბრიტანელ ფრედერიკ ტოურტს (1915წ.) და კანადელ ფელიქს დერელს (1917წ.). სახელწოდება ბაქტერიოფაგი პირველად გამოიყენა დერელმა, მან ბაქტერიოფაგი დეზინტერიის გამომწვევი მიკრობის საწინააღმდეგო ვირუსს უწოდა. მან დაასკვნა, რომ ბაქტერიოფაგი წარმოადგენს ბაქტერიების ვირუსს, რომელიც მრავლდება ბაქტერიული უჯრედის შიგნით, რასაც მოყვება უჯრედის ლიზისი და გარემოში ვირიონის ახლად წარმოქმნილი შთამომავლობა გამოდის. აღსანიშნავია აგრეთვე, ქართველი მეცნიერის გიორგი ელიავას

ღვაწლი, რომელმაც 1917 წელს მტკვრის წყალში ვიბრიო ქოლერას აღმოჩენასთან ერთად ბაქტერიოფაგების ფენომენი აღწერა. [1; 2]

1948 წელს, Holmes-მა მოახდინა ბაქტერიოფაგების პირველი კლასიფიკაცია და მან ისინი სამ ოჯახად დაყო. Holme-ის კლასიფიკაცია დაფუძნებული იყო პატრონ უჯრედების ტიპებზე და ამ ბატერიებით გამოწვეული დაავადებების სიმპტომებზე, მაგრამ მოცემული სქემა არ იყო მეცნიერულად გამართული რადგან ვირუსების კლასიფიკაცია უნდა მომხდარიყო მათი ფიზიკო-ქიმიური თვისებებზე დაყრდნობით. 1962 წელს, Lwoff-ის, Horne-ის და Tournier-ის კლასიფიკაციას საფუძვლად დაედო ვირიონის მორფოლოგია, კერძოდ ნუკლეინის მჟავის ტიპი, კაფსიდის ფორმა და კაფსომერების რაოდენობა. მოგვიანებით მეცნიერები მივიდნენ იმ დასკვნამდე, რომ ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია უნდა მომხდარიყო მორფოლოგიისა და გენეტიკური თავისებურებების მიხედვით.

მორფოლოგიის მიხედვით ცნობილიო ბრედლის და ტიხონენკოს კლასფიკაციის სქემა, სადაც ფაგები დაყოფილია 6 ჯგუფად: კუბური ფორმის ფაგები, კუმშვადი წანაზარდით, მოკლე წანაზარდით, ერთძაფიანი დნმს-ის შემცველი, რნმ-ის შემცველი და ფილამენტური ფაგები.

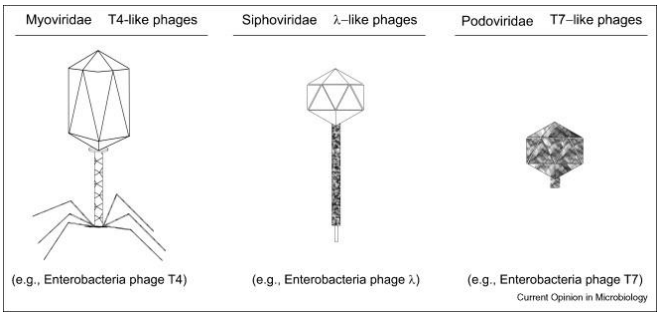
თანამედროვე კლასიფიკაციის მიხედვით, (International Committee on Taxonomy of Viruses), ფაგები გაერთიანებულია *Caudovirales*-ეს კლასის 13 ოჯახში და 31 გვარში. ეს კლასიფიკაცია დამყარებულია შემდეგ თვისებებზე:

1) ნუკლეინის მჟავას ტიპი;
2) მოლეკულური მასა;
3) ვირიონის ულტრასტრუქტურა (ბინალური სიმეტრიის, კუბური, ჰელიკალური, ფილამენტური და პლეიმორფული);
4) შემადგელობა და ანტიგენური თვისებები;
5) პატრონი უჯრედების ტიპი;

ბაქტერიოფაგების 96 პროცენტს სწორედ წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგები წარმოადგენენ. ისინი მიეკუთვნებიან სამ დიდ ფილოგენეტიკურ ოჯახს [3, 4]:

1) *Myoviridae*-გრძელი, კუმშვადი წანაზარდით;
2) *Siphoviridae*-გრძელი კუდით, რომლესაც შეკუმშვის უნარი არ აქვს;

3) *Podoviridae*-მოკლე წანაზარდით;



სურ. 2 წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგების მორფოლოგია

2.2 ბაქტერიოფაგების ბიოლოგია და მათი სასიცოცხლო ციკლი

ბაქტერიოფაგები არიან მკაცრად სფეციფიკურები ანუ ახდენენ მხოლოდ გარკვეული ტიპის ბაქტერიული უჯრედების დაინფიცირებას.

ფაგებისა და მასპინძელი უკრედების ურთიერთქმედების მიხედვით ისინი იყოფიან 3 ჯგუფად: ვირულენტური ფაგები, ზომიერი ფაგები და ფაგები, რომლებიც უჯრედის ინფიცირების შემდეგ არ იწვევს მის დაშლას.

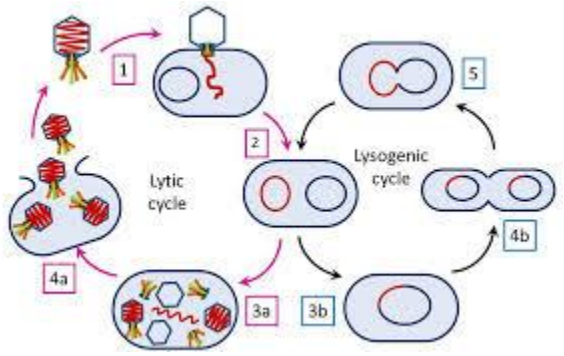
- **ლიზისური ციკლი**

ლიზისური ციკლი იწყება ფაგების ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბციის გზით, რაც ძალზედ სპეციფიკურია და დამოკიდებულია ზედაპირულ რეცეპტორებზე და მათ სტრუქტურულ თავისებურებებზე. ადსორბციის სიხშირე დამოკიდებულია გარემო ფაქტორებზე და მასპნძელი უჯრედის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე.

ბაქტერიოფაგების გენომი კუდის გავლით შედის მასპინძელ უჯრედში. ამ პროცესის შემდეგ უჯრედის რნმ პოლიმერაზა შეიცნობს ფაგის პრომოტორს და ხდება ადრეული გენების ტრანსკრიპცია. ამ გენების პროდუქტები იცავენ ახდენენ ფაგის დნმ-ის დაცვას და აინჰიბირებენ მასპინძელი უჯრედის პროტეაზებს, შლიან სხვადასხვა ცილებს. შემდეგ ეტაპზე ხდება შუალედური ცილების სინთეზი, რაც ხელს უწყობს ფაგის ახალი დნმ-ის ტრანსლაციას. შუალედური გენებს უკვე მოყვება გვიანი გენები და საბოლოოდ ხდება ფაგის ვირიონისთვსი საჭირო მორფოლოგიური ერთეულების სინთეზი. მასპინძელ უჯრედში ახალი ვირიონების წარმოქმნას ფაგების მომწიფება ეწოდება. ფაგების ლიზისური ციკლის საბოლოო ეტაპზე ხდება მათი ახალი თაობის გამოსვლა ბაქტერიული უჯრედიდან. [5,6]

- **ზომიერი ფაგების სასიცოცხლო ციკლი**

ზომიერი ფაგების სასიცოცხლო ციკლი შესაძლოა იყოს ზომიერი ან ლიზისური. თუ რომელი გზით წარიმართება ფაგების სასიცოცხლო ციკლი დამოკიდებულია მასპინძელი ბაქტერიების ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. ლიზისური გზის შემთხვევაში ფაგები გადიან იგივე გზას რაც ზემოთ უკვე აღვწერე ლიზისური ციკლის შემთხევავში. ზომიერი ციკლის შემთხვევაში კი ფაგის გენეტიკური მასალა (დნმ ან რნმ) ინტეგრირდება მასპინძელი უჯრედის დნმ-ში პროფაგის სახით და მასთან ერთად რეპლიცირებს. სწორედ ამას ეწოდება ლიზოგენია, ხოლო ბაქტერიულ კულტურას ლიზოგენური. ეს პროცესი საკმაოდ სტაბილურია, მაგრამ გარკვეული გარემო პირობების გავლენით შესაძლოა მოხდეს ფაგის ვირულენტობის განმსაზღვრელი გენების გააქტივება და მათი გამრავლება. [5, 6, 7]



სურ. 3 ფაგების ლიზოგენური და ლითიური ციკლები

2.3 ფაგოტერაპია

ფაგური თერაპია, ეს არის ბაქტერია სპეციფიკური ვირუსების გამოყენება პათოგენური თუ არასასიამოვნო ბაქტერიების რაოდენობის შესამცირებლად. რაც მოიცავს ორ თანმიმდევრულ პროცეს: აღნიშნული ვირუსების შეღწევა სამიზნე ბაქტერიებში, რასაც მოყვება მათი მოკვლა. ამ პროცესების ანალიზი ჩვეულებრივ ეკოლოგიურია, რადგან ის წარმოადგენს ფაგისა და გარემოს ურთიერთქმედებას. [19]

1919 წელს პარიზში, D'Herelle-მა ჩაატარა კვლევა და მან პირველად თერაპიული მიზნით გამოიყენა დეზინტერიის გამომწვევი ბაქტერიის საწინააღმდეგო ფაგი. თავდაპირველად რამდენიმე მოხალისე აიცრა, რათა დადასტურებულიყო ფაგის უვნებლობა, ხოლო ამის შემდეგ ის შეუყვანეს რეალურ პაციენტს, 12 წლის ბიჭს, რომელიც დეზინტერიით იყო დაავადებული. ბაქტერიოფაგის გამოყენება წარმატებით დასრულდა და ბიჭი რამდენიმე

დღეში განიკურნა. ამის შემდეგ დერელმა ფაგები ტერაპიული მიზნით გამოიყენა ინდოეთში ქოლერის, ხოლო ეგვიპტეში შავი ჭირის სამკურნალოდ. [8]

დერელის ლაბორატორია უშვებდა 5 სამკურანლო პრეპარატს სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ. ეს პრეპარატები იყო: Bacte-coli-phage, Bacte-rhino-phage, bacte-intesti-phage, Bacte-pyophage, Bacte-staphy-phage. პარალელუად ფაგების წარმოება ხდებოდა ასევე ამერიკაში ისეთი ინფექციები სამკურნალოდ როგორიცაა ჭრილობები, აბსცესები, ვაგინიტები, ქრონიკული ინფექციები და ა.შ.

ანტიბიოტიკების აქტიურმა გამოყენებამ ადვილად ჩაანაცვლა ფაგოთერაპია, თუმცა ფაგების აქტიური გამოყენება სამკურნალო მიზნით კვლავ გაგრძელდა აღმოსავლეთ ევროპაში და ყოფილი საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში, მათ შორის საქართველოში. [9]

გიორგი ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი დაარსდა 1923 წელს. დერელისა და ელიავას კოლაბორაციამ ხელი შეუწყო საქართველოში ფაგების კვლევის წარმართვასა და ინსტიტუტის წინსვლას. მიუხედავად იმისა, რომ 1937 წელს გიორგი ელიავა დაპატიმრეს და დახვრიტეს, ინსტიტუი გადარჩა და დღეს მსოფლიოში ცნობილიო როგორც ერთე-ერთი ყველაზე დიდი ინსტიტუტი სადაც ხდება ფაგების კვლევა და იწარმოება კომერციული ბაქტერიოფაგები. [9, 10]

დღესდღეობით ფაგები აქტიურად გამოიყენება სხვადასხვა დაავადებების სამკურნალოდ, როგოგრიცაა ჩირქოვან-ანთებითი, ნაწლავური, შარდ-სასქესო გზები და სხვა. ყველაზე ხალნგრძლივი ისტორია აქვს პიოფაგს და ინტესტის, რომლებიც 1930 წლიდან იწარმოება. [10].

3. ფარმაკოლოგია

ფარმაკოლოგია (ბერძ. Pharmacon-წამალი, შხამი. Logos-მეცნიერება) შეისწავლის ადამიანისა და ცხოველის ორგანიზმზე სამკურნალო და სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების მოქმედებას.

ფარმაკოლოგია არის მეცნიერება წამლის მოქმედების მექანიზმების, მისი ფიზიკურ ქიმიური თვისებების, ორგანიზმში შეყვანის გზების, ორგანიზმში გადანაწილების, გამოყოფის, დოზირების და ორგანიზმისა და წამლის ყოველგვარი ურთიერთქმედების შესწავლა.

ფარმაკოლოგია სამ ძირითად ნაწილს მოიცავს:თეორიულს (ზოგადს), ექსპერიმენტულს და კლინიკურს.

i. ზოგადი ფარმაკოლოგია სწავლობს ორგანიზმსა და წამალს შორის ურთიერთქმედების ზოგად განზომილებას, ზმნის ნივთიერების ფარმაკოთერაპიული ეფექტრუობის მექანიზმების თეორიებსა და კონცეფციებს.
ii. ექსპერიმენტული ფარმაკოლოგია სწავლობს ცხოველთა ორგანიზმზე ფიზიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ზეგავლენას, წარმოადგენს შემაკავშირებელ რგოლს თეორიულ და კლინიკურ ფარმაკოლოგიას შორის.
iii. კლინიკური ფარმაკოლოგია არის მეცნიერება, რომელიც სწავლობს სამკურნალო საშუალებების გამოყენებას ადამიანის ორგანიზმზე. [18]

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ფარმაკოლოგია არის ორგანიზმისა და წამლის ურთიერთკავშირის შესწავლა. ფარმაკოლოგია მოიცავს ორ მთავარ კომპონენტს: ფარმაკოკინეტიკას და ფარმაკოდინამიკას. ფარმაკოკინეტიკა აღწერს ორგანიზმის გავლენას პრეპარატზე (წამალის გადადგილება ორგანიზმში ორგანოების გავლით), ფარმაკოდინამიკა კი შეისწავლის წამლის გავლენას ცოცხალ ორგანიზმზე. „ორგანიზმი“ თავის მხრივ გულისხმობს როგორც ქსოვილებს ასევე ორგანიზმის მიკრობულ ფლორას, რადგანაც ანტიბაქტერიული ფარმოკიდინამიკის ყველაზე მნიშვნელოვან კომპონენტს სწორედ სამიზნე მიკრობების ინჰიბირება წარმოადგენს.

ფარმაკოკინეტიკა მოიცავს ოთხ კატეგორიას: წამლის ადსორბცია, მისი გავრცელება ორგანიზმიში, წამლის მეტაბოლიზმი და საბოლოოდ მისი გამოდევნა ორგანიზმიდან. ადსორბცია და გავრცელება გულისხმობს წამლის გადაადგილებას ორგანიზმიში ორგანოების გავლით. თვდაპირველად ხდება სისხლში ადსორბცია და შემდგომ სისხლის საშუალებით გავრცელება მთელს ორგანიზმში. აბსორბცია და გავრცელება შესაძლოა შესწავლილ იქნებას წამლის რაოდენობის მატებით ორგანიზმის სხვადასხვა სპეციფიკურ ადგილებში (ქსოვილებიში ან ორგანოებში). წამლის მეტაბოლიზმი და მისი გამოდევნა ორგანიზმიდან ეხება წამლის რაოდების კლებას, გარდა ორი გამონაკლისისა. ესენია,

როდესაც წამალი მეტაბოლიზმის დროს გარდაიქმნება თავიანთ აქტიურ ფორმებად, ან მაშინ როცა წამალი მიაღწევს თავის აქტიურ საიტს ექსქრეციით.

იმისთვის, რომ წამალი იყოს ქმედითი, მან უნდა მიაღწიოს თავის მოქმენდების ზონას და წარმოდგენილი უნდა იყოს ეფექტური, საკმარისი რაოდენობით დროის შესაბამის პერიოდში და ამავდროულად ის არ უნდა ახდენდეს საზიანო ზეგავლენას პაციენტის ორგანიზმზე.

წამლის ერთერთი სახეობა რომელიც, მკურნალობის აქტიურ ფორმად არის მიჩნეული ბაქტერიოფაგებია. ისინი, როგორც უკვე აღვნიშნეთ არიან ბაქტერიიის ვირუსები და მედიცინაში გამოიყენება როგორც ანტიბაქტერიული აგენტი პათოგენური და არასასიამოვნო ბაქტერიებსი წინააღმდეგ. ფაგები როგორც ცნობილია არის დაბალტოქსიური, გარდა ამისა ის თვითგამრავლებადია.

- ფაგების უსაფრთოხოება

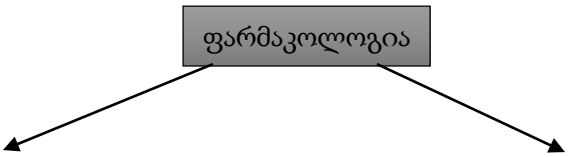
ხშირ შემთხვევაში, ჩვენ ვუგულველლყოფთ ფაგის უსაფრთოხების საკითხს, რაც ფაგური თერაპიის შემთხვევაში ერთერთი პრიორიტეტულია. უფრო მეტიც შესაძლოა ფაგის როგორც ანტიბაქტერიულ აგენტად, გამოყენებს მთავარ მიზეზს, არამხოლოდ მისი უნარი წარმოაგდენს რომ მოკლას ბაქტერიები, არამედ მისი ბადალი ტოქსიკურობა. რაც განპირობებულია, ფაგის შემადგენლობით, მის ძირითად ნაწილს წარმოაგდენს ცილა და დნმ. სხვა წამლებისგან განსხვავებით ფაგების დეგრადაცია არ იწვევს ტოქსიკური პროდუქტების წარმოქმნას.

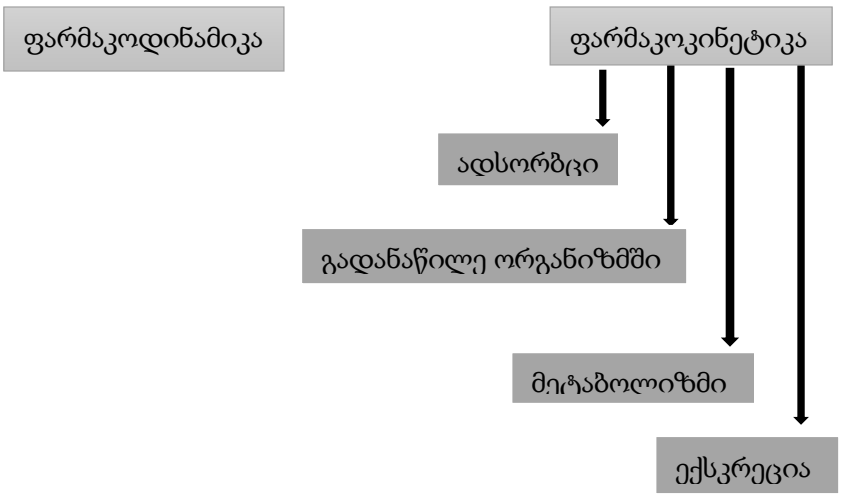
დღესდღეობით ფაგური თერაპიის რაციონალური გამოყენებისთვის აუცილებელია ფაგების ფარმაკოლოგიის უკეთ შესწავლა. [20]

- ფარმაკოკინეტიკა

არსებობს რამდენიმე მექანიზმი, რამაც შეიძლება ორგანიზმში მოახდინოს ფაგების ბლოკირება, რაც გამოიწვევს მათი პოტენციალის შემცირებას. ეს მექანიზმები მოიცავს: ორგანიზმის ბარიერულ სისტემებს, რომელთაც შეუძლიათ ეფექტურად დაბლოკონ ფაგების მოძრაობა, რეტიკულურ-ენდოთელიულური სისტემა რომელიც ეფექტურად მოაშორებს ვირუსის მსგავს „უცხო სხეულებს“ სისხლიდან. ყოველივე ეს, კი საბოლოოდ მიგვიყვანს იქამდე, რომ ბაქტერიები გახდებიან მედეგი ფაგური თერაპიის მიმართ. აქედან გამომდინარე, ბაქტერიული ინფექციების წარმატებულად სამკურნალოდ ფაგური თერაპიის გამოყენებით, საჭიროა ფარმაკოლოგიური ასპეკტების უკეთ შესწავლა.

ფარმაკოკინეტიკა შეისწავლის ორგანიზმის გავლენას წამალზე და ის მოიცავს სამ ეტაპს: წამლის ადსორბცია, ორგანიზმში გავრცელება, წამლის მეტაბოლიზმი და საბოლოოდ მისი გამოდევნა ორგანიზმიდან.





- ადსორბცია

სამკურნალო საშუალების (წამლის) გამოყენება რამდენიმე გზა არსებობს:ადგილობრივი, enteric, შესუნთქვით (ინჰალაცია), დასალევი, ინექციის საშუელბით კუნთში ან ვენაში. დასალევი წამლები არ გულისხმობს მათ სისტემურ გავრცელებას ორგანიზმში, ინჰალაციის საშუალებით წამლის მიღება წამლის გამოყენების ადგილობრივი გზაა, ორალური მიღებაც ასევე გულისხმობს სისტემურ გავრცელეაბას, ხოლო ინექცია სისტემური გავრცელების ერთ ერთი მეთოდია. გარდა ინექციისა, სისტემური გავრცელების სხვა გზებიც არსებობს, მათ შორისაა კანქვეშ შეყვანა, ასევე მუკოზური მემბრანის საშუალებით, ცხვირის ღრუს საშუალებით, რომელიც ასევე მუკოზურ მემბრანას წარმოადგენს, და წამალი უფრო სწრაფად აღწევს ცნს-ში. ადსორბცია მოიცავს წამლის მოძრაობას სისხლის მიმოქცევის სისსტემამდე.

ფაგები განსაკუთრებით ადვილად ახდენენ ადსორბციას, მათ შორის მუკოზური მემბრანის საშუალებით. მაგალითად ანალური გზით ფაგების შეღწევამ ორგანიზმში შეიძლება გაზარდოს ადსორბცია, სისხლში მათი კონცენტრაციის გაზომვამ გვიჩვენა რომ, ფაგების რაოდენობა ისეთივე მაღალია, როგორც კუნთში ინექციის საშუელბით შეყვანის დროს.

- ორგანიზმნში გადანაწილება

წამლის გავრცელება მოიცავს მის გადასვლას სისხლიდან ორგანიზმის სხვადასხვა ქსოვილებში. მექანიზმი რის საშუალებითაც ფაგი ახორციელებს მსგავსი ტიპის მოძრაობას განპირობებულია მისი თვისებებით, რაც დღესდღეობით ნაკლებადაა შესწავლილი.

- მეტაბოლიზმი

ფარმაკოკინეტიკური პერსპექტივით მემტაბოლიზმი გულისხმობს წამლის ქიმიურ გარდაქმნას. ზოგჯერ ის გულისხმობს ფაგის საბოლოოდ ელიმინაციას ორგანიზმიდან, ზოგიერთ შემთხვევაში კი ის წამალს გარდაქმნის აქტიურ სამკურნალო ფორმად. ქიმიური ფარმაცევტიული საშუალებები ძირითად გარდაქმნებს განიცდიან ღვიძლში. სადაც ციტოქრომ P450 ოჯახის ფერმენტები ლიპოფილურ ქსენობიოტიკებს გარდაქმნიან უფრო პოლარულ ფორმებად, რომელიც ორგანიზმში არც თუ ისე ხშირად გვხვდებიან. ასეთი ფორმით ისინი უფრო მარტივად გამოიდევნებიან ორგანიზმიდან შარდსასქესო გზების საშუალებით. ფაგები როგორც ვიციდთ შეიცავს დნმ-ს და ცილას ამიტომაც ის არ არის ქსენობიოტიკი. გარდა იმისა, რომ ფაგები ანადგურებენ სამიზნე ბაქტერიებს, მათ აქვთ ორი მნიშვნელოვანი თვისება რაც ზრდის მათ მნიშვნელობას თერაპიული თვალსაზრისით გამოყენების მიზნით, ესენია: უსაფრთხოება და თვით გამრავლების უნარი. აღსანიშნავია ის დეტალიც, რომ ფაგური თერაპიისას მუდმივად უნდა იყოს ფაგების ეფექტური ტიტრი ანუ რაოდენობა შენარჩუნებული. მაგალითად თუ ფაგების ოპტიმაური სიმკვრივე არის 10^8, და მისი ინაკტივაციის დონე არის 1% წუთში, 10^6 ხარისხის ფაგი უნდა დაემატოს ყოველ წუთში რათა შევინარჩუნოთ ეფექტური რაოდენობა. ყოველივე ეს საჭიროა რათა თავიდან ავიცილოთ მათი მუდმივი რაოდენობის კლება. იმ შემთხეევევაში თუ ფაგი კარგად მრავლდება, იმუნური სისტემის მიერ მათი განეიტრალება არ წარმოადგენს დიდი პრობლემა. ფაგების თვითგამრავლება მოიაზრება როგორ მათი მეტაბოლიზმი, მაგრამ ის დაკავშირებული არ არის ღვძლში არსებულ ფერმენტ P450 თან.

ფაგების ინაქტივაციისა და ორგანიზმიდან გამოდევნის ალბათობა ზეგავლენას ახდენს მათ პოტენციალზე, ფაგური თერაპიის თვალსაზრისით. თითოელი ეს პროცესი (გამოდევნა და ინაქტივაცია) დამოკიდებულია მეტაბოლიზმზე. მათი როგორც თვითგამრავლება, ასევე რაოდენობრივი კლება განპირობებულია ორგანიზმის გავლენით წამალზე ამ შემთხვევაში ფაგზე. ბაქტერიების სიკვდილი და ფაგების ტოქსიკურობა ასახავს ფაგის როგორც წამლის ზეგავლენას ორგანიზმზე.

- ექსკრეცია

ფაგების ელიმინაცია ორ გზით შეიძლება მოხდეს, ერთ შემთხვევაში ეს განპირობებულია იმუნურის სისტემის მოქმედებით და მეორე მხრივ ორგანიზმის უნარით მოახდინოს მისი ინაქტივაცის და ორგანიზმიდან გამოდევნა იგივე ფორმით როგორითაც ის მოხვდა ცოცხალ ორგანიზმში. ფაგებს აქვთ გარკევული კავშირი საშარდე სისტემასთან, რაც შესაძლოა ხელსაყრელი იყოს საშარდე გზების ინფექციების სამკურალოდ ფაგების გამოყენების თვალსაზრისით. [19, 20]

ფარმაკოლოგიური კვლევის მიზანი არის ეფექტური და უსაფრთხო სამკურნალო საშუალების შექმნა, რომელიც გამოსადეგი იქნება სხვადასხვა სახის დაავადებების სამკურნალოდ და პრევენციისთვის. პრაქტიკაში, ფარმაკოლოგია საჭიროებს რეალურ

ემპირიულ კვლევებს, მათ შორის ცხოველურ მოდელში და ცოცხალ პაციენტებში. როგორც ცხოველებზე ექსპერიმენტები ასევე კლინიკური კვლევები საჭიროა, რადგან ფარმაკოლოგიური მონაცემები მხოლოდ "in vitro" მოდელებიდან არ გვაძლევს სრულ ინფორმაციას, მას არ შეუძლია აღწეროს წამლის თვისებათა ერთობლიობა (emergent properties) რომლებიც დაკავშირებულია სისტემასთან, რომელთანათ წამალი ურთიერთქმედებს. შესაბამისად, საკვლევი წამალი გახდება თუ არა კლინიკურად გამოსადეგი, დამოკიდებულია ფაქტორებზე რომელთა წინასწარ განსაზღვრა არც თუ ისე მარტივია. ეს ფაქტორები უკვე აღმოჩენილია როგორც ცხოველურ მოდელებზე ასევე ადამიანებზე ჩატარებულ კვლევებში. ფარმაკოლოგიური კვლევის ძირითად მიზანს კი წარმოადგენს წამლის პოტენციალის კომბინაცია ბიოლოგიურ სისტემასათან რათა გამოვავლინოთ მათი მოქმედების რეალური პოტენციალი. (19)

ყოველწლიურად, ევროპაში, დაახლოებით 25000 ადამიანი იღუპება ბაქტერიული ინფექციებისაგან, რომლებზეც ანტიბიტიკები ვეღარ მოქმედებს. „ანტიბიოტიკების კრიზის" ფონზე ბაქტერიოფაგები, როგორ ნახევრად ავტონომიური გენეტიკური ერთეულები, მოიაზრება როგორ ალტერნატიული საშუალება ბატქერიულ ინფექციებთან საბრძოლველად.

4. ბაქტერიოფაგები და იმუნური სისტემა

დღესდღეობით ცნობილია, რომ ორგანიზმში ბაქტერიოფაგების ფაგოციტოზი ხდება ცხოველური უჯრედების მიერ. იმუნური სისტემა თამაშობს მთავარ როლს ფაგის ორგანიზმიდან გამოდევნაში. მონონუკლეარული ფაგოციტები ელენთასა და ღვიძლში ახდენენ უცხო „სხეულების" ფილტრაციას, მათ შორის ფაგების. სწორედ ელენთა და ღვიძლი არის ფაგების აკუმულაციის მთავარი ადგილი ორგანიზმში, ფაგების ტიტრი ამ ორგანოებში ჩვეულებრივ ყველაზე მაღალია. როგორც ვიცით, ორივე ორგანო შეიცავს დიდი რაოდენობით „პროფესიონალ" ფაგოციტები, ამიტომაც აქ ხდება ბაქტერიოფაგების ნეიტრალიზაცია.

კვევებმა, როგორც in vivo, ასევე in vitro სისტემებში აჩვენა რომ ფაგების მიერ გამოწვეულმა უჯრედულმა იმუნურმა პასუხმა გამოავლინა ფაგების უნარი იურთიერთქმედონ ორგანიზმის იმუნურ სისტემასთან. აქვე აღსანიშნავია ისიც, რომ იმუნური სისტემის გააქტივება ხდება ფაგოლიზატის მიერ, რაც როგორც მოგეხსენებათ ბაქტერიულ ნაჩენებსაც შიეცავს (მაგალითად: LPS, ბაქტერიული მემბრანის ნაწილები, ციტოზოლური ცილები და სხვა). ამიტომაც, რთულია ზუსტად იმის დადგენა ფაგური ლიზატის კონკრეტულად რომელი კომპონენტი ააქტივებს იმუნურ სისტემას, ბაქტერიული ნარჩენები თუ თავად ბაქტერიოფაგები.

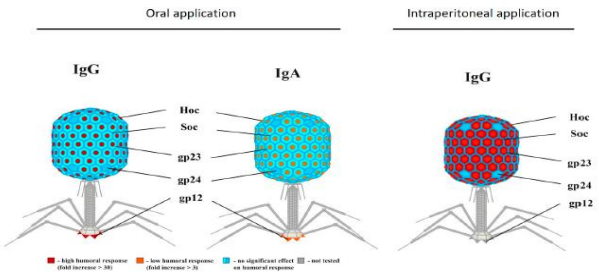
ფაგები ასევე ზრდიან ფაგოციტების მიერ ბაქტრიული უჯრედების ფაგოციტოზის პროცეს, რაც განპირობებულია ოფსომიზაციით. რაც გულისხმობს იმას, რომ ფაგები ზედაპირულად უკავშრდებაინ სამიზნე ბატერიებს, ახდენენ მათ ოფსონიზაციას, რითაც აიოლებენ მათ აღქმას და ამოცნობას ორგანიზმის იმუნური სისტემის მიერ.

ცნობილია, რომ ფაგოციტური უჯრედების პასუხს უცხო სხეულების მიმართ მოხვება reactive oxigene species (ROS) გამოყოფა. ჭარბი რაოდენობით ROS-ის გამოყოფამ შეიძლება გამოიწვიოს ოქსიდაციური სტრესი და ქსოვილების დაზიანება. Przerwa et al.-ს მიერ ჩატარებულმა კვლევამ გვიჩვენა რომ T4 ფაგი ზეგავლენას ახდენს ფაგოციტურ სისტემაზე და იწვევს ROS-ის გამოყოფის დათრგუნვას. ეს ფენომენი, როგორც აღმოჩნდა დამოკიდებული ფაგი-ბაქტრეიის ურთიერთ კავშირზე, მაგრამ ზუსტი მექანიზმი ჯერ-ჯერობით უცნობია.

გარდა ამისა, რამდენიმე კვლევამ დაადასტურა ფაგების უნარი ორგანიზმში გამოიწვიოს ცოტოკინების პროდუქცია იმუნური სისტემის მიერ. ხშირ შემთხვევებში ეს კვლევები მოიცავს ისეთი პრეპარატის გამოყენებას, რომელიც არ არის სრულიად გაწმენდილი და შეიცავს ბაქტრეიულ ტოქსინებს და ცილებს. მაგალითად Park et al-ის ექსპერიმენტი ცტოკინებზე, რომელიც ინდუცირებული იყო T7 ფაგის მიერ. ამ შემთხვევაში შეინიშნებოდა უმნიშვნელოდ ანთებითი ციტოკინების გამომუშავება თაგვის ორგანიზმში, თუმცა ჰისტოლოგიურმა კვლევებმა ორგნოებსა და ქსოვილებში არანაირი ცვლილება არ აჩვენა. მეორეს მხრივ, სრულიად გასუფტავებული ფაგის შეყვანის შემდეგ თაგვების ორგანიზმში ანთებითი ციტოკინების გამომუშავება არ მოხდა.

რადგანაც ფაგები შეიცავენ მჭიდროდ „შეფუთულ“ დნმ-ს ან რნმ-ს, რომელიც გარშემორტმულია ცილოვანი გარსით, აშკარაა რომ მათი მოხვედრა ორგანიზმში იწვევს ანტიფაგური ანტისხეულების გამომუშავებას. ფაგების იმუნოგენურობა მედიცინაში უკვე დიდი ხანია გამოიყენება პაციენტების იმუნოკომპეტენტურობის დასაგენად (მაგალითად HIV პაციენტებში). 1970 წლიდან ფაგებს იყენებენ პირველადი და მეორეული იმუნოდეფიციტების დიაგნოსტირებისთვის. როგორც ვხედავთ ფაგების დაბალი ტოქსიურობა იმის საშუალებასაც კი იძლევა რომ ის გამოვიყენოთ იმუნოკომპეტენტურ პაციენტებში.

ბაქტერიოფაგები ასევე იწვევენ ჰუმორული იმუნერ პასუხს. ანტიფაგური ანტისხეულების გამომუშავება, ფაგების თერაპიული მიზნით გამოყენების დროს, უკვე აღინიშნა რამდენიმე ექსპერიმენში, სხვადასხვა სამოდელო ორგანიზმებში როგორებიცაა თაგვი, ცხენი და ადამიანი. 50 პაციენტს, რომელთაც აქამდე არასდროს მიეღოთ ფაგები, გაუკეთდა T4 ფაგის ინექცია, შედეგად ორგანიზმში მანეიტრალიზებელი ანტისხეულების წარმოქმნა მოხდა. შრატის გამოკველვამ აჩვენა რომ 81% ფაგებისა შემცირდა, რაც მიუთითებს ანტიფაგური ანტისხეულების წარმონქმაზე. აღნიშნულ შრატი შეიცავდა IgG, რომელიც სპეციფიკურია ფაგის ცილების: gp23*, gp24*,Hoc, and Soc.



სურ. 4 ფაგის IgG სპეციფიური კაფსიდური ცილები,

ამის საპირისპიროდ, Bruttin and Brüssow-ის მიერ ჩატარებულმა ცდამ, რომელშიც T4 ფაგის ინექცია პერორალურად მოხდა მცირე კონცეტრაციით. ამ შემთხვევაში ანტსიხეულების გამომუშავება არ შეინიშნებოდა. რაც სავარაუდოდ გამოწვეულია, ფაგების დაბალი ტიტირით ან ადიუვანტის ნაკლებობით. [21]

II. გამოყენებული მასალები და მეთოდები

1. საკვლევი მასალები

- <u>ბაქტერიული შტამი:</u>*pseudomonas aeruginosa*, ტექნიკური სახელწოდებით „573“. მოცემული შტამი ინახება გიორგი ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში, კერძოდ მიკრობული ეკოლოგიის ლაბორატორიაში.
- <u>ბაქტერიოფაგი</u>: კვლევის ფარგლებში ვიყენებდით *pseudomonas aeruginosa*-ს მიმართ სპეციფიკურ ფაგს, ტექნუკური სახელწოდებით „PNMx”.
- <u>საკვლევი ცხოველებიდან აღებული ნიმუშები:</u> სისხლი, ელენთა, თირკმელები, ღვიძლი, ფილტვები და ტვინი.(20გრ სუფთა ხაზის მდედრი თაგვები, (Hsd:ICR (CD1), FVB/NHanHsd)).
- <u>ბუფერული სისტემები და რეაქტივები:</u>
- PBS-დაბუფერებული ფიზიოლოგიური ხსნარი, pH 7.4
- 5M NaCl ხსნარი
- პროტეაზას ინჰიბიტორი

- <u>მიკრობიოლოგიური არეები:</u> ბაქტერიული შტამების კულტივერებისთვის ვიყენებდით Tryptic soy-ს აგარი და ბულიონი.
- <u>რესტრიქციული ენდონუკლეაზები</u> ბაქტერიოფაგების რესტრიქციული პროფილის შესასწავლად

ცხრილი 1. ფაგის რესტრიქციური პროფილის შესასწავლად გამოყენებული ენდონუკლეაზები

რესტრიქციული ენდონუკლეაზა	**ამოსაცნობი თანმიმდევრობა**	**გაჭრის ადგილი**
Sau3A	5'GATC 3'	5'-- GATC---3'
	3'CTAG 5'	3'-- CTAG --5'
EcoR V	5'GATATC 3'	5'--GAT ATC--3'
	3'CTATAG 5'	3'--CTA TAG--5'

Xba I	5'TCTAGA 3'	5'--T CTAGA--3'
	3'AGATCT 5'	3'--AGATC T--5'
Sal I	5' GTCGAC 3'	5'--G TCGAC--3'
	3' CAGCTG 5'	3'--CAGCT G--5'

2.1 ბაქტერიოფაგების სუფთა ხაზის მიღება (დაკლონვა)

გრაციას ორშრიანი მეთოდის საშუალებით ვტიტრავთ ფაგს. პეტრის ფინჯანზე სადაც ნათლად ჩანს ნეგატიური კოლონიები, სტერილური პიპეტით ვიღებთ ერთ ნეგატიურ კოლონიას და შეგვაქვს 1მლ ბულიონში. ვაყოვნეთ გარკვეული პერიოდი და შემდეგ ისევ ვტიტრავთ. ამ პროცედურას ვიმეორებთ მანამ სანამ არ დავრწმუნდებით რომ ჩვენ მიერ ამოკლონილი ბაქტერიოფაგი სუფთა ხაზისაა. [22]

2.2 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა

მყარ საკვებ არეზე-გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდი

გრაციას მეთოდით, ვსაზღვრავთ ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა 1 მლ-ში. ამისათვის საკვლევი ფაგის ლიზატს ვანზავებთ ათჯერადად ან ასჯერადად (10^1დან 10^{10}-მდე ან 10^2დან 10^{10}მდე). შემდგომ კი სათანადო განაზავებიდან სტერილურ სინჯარაში გადაგვაქვს 1მლ, ვუმატებთ 0,1მლ მილიარდიან კულტურას და 5მლ ნახევრად თხიერ აგარს (0,7%). სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნარევ დაგვაქვს 1.8% აგარიან პეტრის ფინჯანზე. გამყარების შემდეგ ფინჯანს ვათავსებთ თერმოსტატში. შედეგებს ვითვლით 18-24 საათში. ფაგის ტიტრს ვსაზღვრავთ ფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით. [23]

2.3 ლიზისური აქტივობისა და სპექტრის განსაზღვრა

მასპინძელ ბაქტერიათა სპექტრი წარმოადგენს ბაქტერიოფაგების დახასიათების, იდენტიფიკაციისა და კლასიფიკაციის ერთ-ერთ საშუალებას. ამისათვის ვიღებთ 24 საათიანი კულტურის ჩამონარეცხს ირიბი (დაცერავებული) აგარიდან, ვანზავებთ ათჯერ, ვაკეთებთ გაზონებს პეტრის ფინჯანზე და ვაწვეთებთ 10µl საკვლევ ფაგს, ინკუბაციას ვახდენთ ბაქტერიული კულტურის ზრდის ოპტიმალურ ტემპერატურაზე, 18-24 საათის განმავლობაში. ფაგის მიერ წარმოქმნილი ლიზისური ზონების ხარისხის მიხედვით ხდება ლიზისური აქტივობის განსაზღვრა. [24]

2.3 ბაქტერიოფაგის გამრავლება

2.3.1 კონცენტრირების მეთოდი

კონცენტრატის მომზადება ხდება ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით. თავდაპირველად ფაგს ვტიტრავთ სასურველ განზავებამდე. საკვლევი ფაგის ლიზატის 10-ჯერადი განზავების შემდეგ (10^1დან 10^{10}მდე) სათანადო განზავებიდან 0,1მლ გადაგვაქვს სტერილურ სინჯარაში, ვუმატებთ 1მლ$1*10^9$ უჯრ/მლ კონცენტრაციის ბაქტერიული შტამი და 3-5მლ ნახევრად თხიერ აგარს (0,7%). თერმოსტატში 24 საათიანი კულტივირების შემდეგ მიღებულ კონცენტრატს ვასუფთავებთ 5000g-ზე 30-40წთ ცენტრიფუგირებით და შემდგომ სუპერნატანტის ფილტრაციით მემბრანული ფილტრის გამოყენებით (0.22 µm ზომის). (23)

2.3.2 გამრავლება თხიერ საკვებ არეში

ფაგის გამრავლება ხდება ასევე თხიერ საკვებ არეში. ამისთვის 18 საათიანი 1*109 უჯრ/მლ კონცენტრაციის ბაქტერიული შტამის 0.1მლ შეაქვთ 9.9 მლ ბულიონში. სინჯარა თავსდება სანჯღრეველაზე 37 °C -ზე. 2-3 სთ -ის შემდეგ შესაბამის ბაქტერიულ კულტურას ლოგარითმულ ფაზაში (როდესაც მიკრობის ტიტრი აღწევს 2×108 უჯრ/მლ) ემატება გასამრავლებელი ფაგის 0.1 მლ 2×107 ნაწ/მლ ტიტრით. სინჯარას ტოვებენ 18 – 24 სთ ინკუბაციისათვის, ხოლო შემდეგ ფილტრავენ 0.45 - 0.22 µm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore) და ტიტრს ადგენენ გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. [24]

2.4 ფაგების ლიზისური სტაბილობა

ფაგების ლიზისური სტაბილობის შესწავლას ვახდენდით თხიერ არეში აპელმანის მეთოდით. 4.5მლ TS ბულიონის შემცველ სინჯარაში შეგქვონდა 2×10^8 ნაწ/მლ ფაგი 0.5მლ, ვაკეთებდით გაზავებას 10^7 მაწ/მლ-10^1მაწ/მლ. თითოელ სინჯარას ვუმატებდით 50მკლ ბაქტერიულ კულტურას 10^8კწე/მლ-ში. პარალელურად ვაკეთებთ კულტურის კონტროლს, სადაც TS ბულიონის შემცველ სინჯარაში შეგვაქვს მხოლოდ ბაქტერიული კულტურა, ასევე საჭიროა ფაგის კონტროლი, სადაც TS ბულიონს ვუმატებთ მხოლოდ ფაგს. ინკუბაციას ვახდენთ 37^0C-ზე 4-6-24-48. საკვლევი ფაგის ლიზისის სტაბილობის მახასიათებლად აღრიცხავენ ინკუბაციის დროს და იმ ბოლო განზავებას რომელ სინჯარაშიც არ იღინიშნებოდა ბატერიული კულტურის ზრდა.

2.5 ელექტრონული მიკროსკოპია

ფაგის ვირიონის მორფოლოგიის შესასწავლად ვიყენებთ ელექტრონულ მიკროსკოპიას. კვლევისთვის გამოსადეგია მაღალტიტრიანი ($1*10^9$pfu/ml) ფაგის ლიზატი. 5 მკლ მასალა დაიტანება პიოლოფორმით დაფარულ ბადეზე, ირეცხება ბიდისტილირებული წყლით, ემატება 1% იანი ურანილის აცეტატის 2 წვეთი და შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება ელექტრონული მიკროსკოპით JEOL JEM 1400 TEM ში 80kV-ზე. [23]

2.6 ბაქტერიოფაგების მიმართ რეზისტენტული მუტანტების მიღება

TS აგარის შემცველ ფინჯანზე შეგვაქვს 10^6 ბაქტერიული უჯრედი და 10^8 ნაწ/მლ ფაგი. 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ გაზრდილი ცალკეული კოლონიები გადაგვქონდა TS აგარიან და ფაგის შემცველ ფინჯნზებზე და ვახდენდით შემდგომი კლონირების რამდენიმე ციკლს გასუფთავების მიზნით. ფაგისადმი რეზისტენტულ კლონებს ვამოწმებდით სხვა ფაგისადმი მგრძნობელობაზე. [23]

2.7 ფაგური დნმ-ის რესტქრიუქციული ანალიზი

ფაგურ დნმ-ს ვამუშავებდით სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით შემდეგ სინჯები შეგქვონდა 0.8% აგაროზის გელში და ვაკეტებდით ელექტროფორეზს 1.5-2 სთ განმანვლობაში. მარკირებული პრეპარატად ვიყენებდით HindIII ფერმეტით დაჭრილ λ ფაგის დნმ-ს. გელს ვრებავდით ეთიდიუმ ბრომიდით (0.5კგ/მლ). შედეგს ვნახულობდით UV-

ილუმინატორზე. მირებული რესტრიქციული ფერმენტების მოლეკულური მასას ვსაზღვრავდით საკალიბრაციო მრუდის საშუალებით. [24]

2.8 ნეიტრალიზაცია

პირველ ეტაპზე ხდება ცხოველების იმუნიზაცია სპეციფიკური ანტიფაგური შრატის მისაღებად. დროის სხვადასხვა ინტერვალებში ხდება იმუნიზირებული ცხოველებიდან სისხლის აღება. შრატის მისაღებად სისხლს ვათავსებთ სტერილურ ეპენდორფში და ვაყოვნებთ 37^{0}C დაახლოებით 30წთ-ის განმავლობაში. უჯრედული ფრაქციის მოსაშორებლად ვაცენტრიფუგირებთ 1000-2000g-ზე.

მიღებულ შრატში ანტიფაგური ანტისხეულების არსებობასა და ტიტრს საზღვრავენ ნეიტრალიზაციის რეაქციით, რისთვისაც 0,1 მლ ბაქტერიოფაგს ტიტრით 1x10^7 ნაწ/მლ ემატება 0,9 მლ შრატი გარკვეული განზავებით (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000), ვათავსებთ წყლის აბაზანაში და დროის გარკვეულ ინტერვალებში (5წთ, 10წთ, 15წთ,20წთ,30წთ) იღებენ სინჯებს 0,1 მლ ოდენობით და ანზავებენ 100 ჯერ. შემდგომ ამ განზავებიდან 0,1 მლ გადააქვთ პეტრის ფინჯნებზე ბაქტერიულ კულტურასთან ერთად და ასხამენ ორშრიანი აგარის მეთოდით. პარალელურად იდგმება ფაგის კონტროლი, რომელშიც ანტიფაგური შრატის ნაცვლად იყენებენ ფიზიოლიგიურ ხსნარს, PBS, ან საკვებ ბულიონს. პეტრის ფინჯნები საინკუბაციოდ თავსდება თერმოსტატში 37^{0}C-ზე. 18-24 საათის შემდეგ თითოეულ ფინჯანზე ითვლიან ბაქტერიოფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობას. ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა გამოითვლება სპეციალური ფორმულით:

$$\mathbf{K=2.3\,\frac{D}{t}\times\log\frac{po}{Pt}}$$

სადაც P0 არის ფაგის რაოდენობა დროის საწყის მომენტში; Pt -ფაგის რაოდენობა t დროისთვის; D - ანტიფაგური შრატის განზავება; K- ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა(წთ-1). [24]

ნეიტრალიზაციისთვის საინექციოთ გამოვიყენეთ PNMx ფაგოლიზატი 0.1 მლ ტიტრით 6×10^9 ნაწ/მლ. შრატის გამოსაყოფად სისხლს ვიღებდით მე-7, მე-14 და 23-ე დღეს. ნეიტრალიზაციის

მეთოდის შესასრულებლად შევარჩიეთ შრატის განზავება 1:50 ხოლო საინკუბაციო პერიოდი იყო 30წთ.

2.9 ცხოველური ორგანიზმებიდან აღებული ნიმუშების დამუშავება

ცხოველების ანესთეზიისთვის გამოიყენება ხსნარი, რომელიც შეიცავს კეტამინსა და ქსილაზინს. ის ცხოველს სრულიად უკარგავს მგრძნობელობას, რაც საშუალებას გვაძლევს თაგვის ორგანიზმიდან ავიღოთ შესაბამისი რაოდენობის სისხლი და სხვადასხვა ორგანოები. გაკვეთის დაწყებამდე აუცილებელია ქვედა კიდურებზე შემოწმდეს მგრძნობელობა, რათა ცხოველს არ მივაყენოთ ტკივილი. გაკვეთის შემდეგ პირველად მუცლის ღრუ ვენიდან ვიღებთ სისხლს, შემდეგ ვაკეთებთ პერფუზიას და ვიწყებთ ორგანოების ამოღებას, ვრეცხავთ წყლით და სუფთა ხელსახოცზე მოთავსებით ვაშორებთ ზედმეტ წყლის წვეთებს. ორგანოებს ვათავსებთ 1მლ პროტეაზას ინჰიბიტორში.

2.10 ულტრაცენტრიფუგირება ცეზიუმის ქლორიდის ორმაგ გრადიენტზე

ცეზიუმის ქლორიდის ორმაგ გრადიენტზე ულტრაცენტრიფუგირებით ხდება ბაქტერიოფაგების გაწმენდა დაზიანებული ვირიონების, ბაქტერიული "ნაფლეთების", ნუკლეინის მჟავებისა და ცილებისაგან. აღნიშნული მეთოდი, ფაგების გასუფთავების საუკეთესო საშუალებაა.

ულტრაცენტრიფუგირებამდე წინასწარ უნდა მომზადდეს:

1. 10mM Tris HCL, (pH 7.6, 100მლ);
2. ამავე ბუფერზე დამზადებული 40%-იანი საქაროზა, 15მლ;
3. ცეზიუმის ქლორიდის ორი სიმკრივის გრადიენტი (1.6 და 1,4 ρ);

ულტრაცენტრიფუგის სინჯარებში შეგვაქვს ერთი მილილიტრი 40%-იანი საქაროზის ხსნარი, შემდეგ გრძელი ნემსით სიმჯარის ფსკერზე შეგვაქვს ჯერ 1,4 ρ, ხოლო შემდეგ 1,6 ρ ცეზიუმის ქლორიდის ხსნარი, ისე რომ თითოეული ხსნარის ფენა ერთმანეთს არ შეერიოს. საბოლოო ეტაპზე, საქაროზის ფენას ზემოდან ვაშრევებთ მაღალ კონცენტრირებულ ფაგურ პრეპარატს. ფაგური კონცენტრატის მოცულობა მერყეობს 2-9 მილილიტრამდე, რაც დამოკიდებულია ცენტრიფუგის სინჯარის მოცულობაზე. ულტრაცენტრიფუგირება ხდება 100000g-ზე 3 საათის განმავლობაში.

ულტრაცენტრიფუგირების შემდეგ ცეზიუმის ქლორიდის ორ გრადიენტს შორის შეინიშნება რძისფერი, ოპალესცირებადი ზოლი, რომელიც გაწმენდილი ფაგების სუსპენზია.

ხოლო საქაროზის ფენაში კი ფაშარი ზონაა, რომელიც დაზიანებული ვირიონებს, ბაქტერიული „ნაფლეთებს“, ნუკლეინის მჟავებს და ცილებს შიეცავს.

ფაგის სუსპენზიის ამოსაღებად შესაძლებელია სინჯარა გაიხვრიტოს ფაგური ბენდის ადგილიდან 2-4მმ-ით ქვემოთ, რის შემდეგაც ნელი მოძრაობით მოხდეს ფაგის ამოღება. იმ შემთხვევაში თუ სინჯარას ღია თავი აქვს და არ გვსურს მისი დაზიანება, შესაძლებელია პიპეტით ნელ-ნელა მოხდეს ფაგური ბენდის ზედა ფენების მოშორება და შემდეგ უკვე ახალი პიპეტით ამოვიღოთ გასუფთავებული ფაგური პრეპარატი. უნდა ვეცადოთ, რომ ამოღების დროს პრეპარატი არ გაგვიზავდეს.

მიღებული გაუსფთავებული ფაგური პრეპარატი კვლევის შესასრულებლად არ გამოდგება, რადგან ის შეიცავს ცეზიუმის ქლორიდის იონებს, ამიტომაც საჭიროა აღნიშნული იონების მოცილება, რაც დიალიზის საშუალებით ხორციელდება.

ბაქტერიოფაგების დიალიზი

სადიალიზო ბუფერად ვიყენებთ სამ სხვადასხვა მოლარობის ხსნარს: 0,01 M Tris-Hcl ან PBS-ზე მომზადებულ სხვადასხვა ოსმოსური წნევის NaCl-ის (3M; 0,3 M; 0,9%-ანი) ხსნარებს, ვირიონების სტაბილურობის გასაზრდელად ბუფერს შეიძლება დაემატოს Mg^{2+} იონები (10 mM $MgSO_4$). დიალიზს ვიწყებთ მაღალი ოსმოსური წნევის ბუფერით (3M NaCl), შემდეგ კი დიალიზს ვაგრძელებთ შედარებით დაბალი ოსმოსური წნევის ბუფერში, რათა ფაგურ პრეპარატში თავიდან ავირიდოთ ოსმოსური წნევის სწრაფი ვარდნა და ოსმოსური შოკით ფაგური ვირიონების დაზიანება.

ბუფერის მოცულობა სადიალიზე მოცულობას 1:1000-ჯერ უნდა არემატებოდეს. [25]

დიალიზის პარკები

ა.

ბ.

სურ 5. დიალიზის პარკები

2.11 გელ-ელექტროფორეზი

ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტების ვიზუალიზაციისათვის ვიყენებთ გელ-ელექტროფორეზის მეთოდს.

გელის მომზადებისთვის ვიყენებთ TEAE (1x) ბუფერს და მოლეკულურ-ბიოლოგიური სისუფთავის აგაროზას. 40მლ 1% იანი აგაროზის გელის მოსამზადებლად მცირე მოცულობის 80მლ სტერილურ ფლაკონში 40მლ ბუფერს ვუმატებთ 0.4გ აგაროზას და გასალღობად ვათავსებთ 2-3 წუთით მიკროტალღურ ღუმელში 800W-ზე, ვაგრილებთ 50-60 გრადუსამდე. წინასწარ გამზადებულ გელ-ელექროფორეზის კონტეინერში ვათავსებთ სავარცხელს და შემდეგ ვასხამთ გელს.

ნიმუშის შეტანის დროს პირველად შეგვაქვს დნმ-ს მარკერი, შემდეგ ნიმუშები, რომელიც შერეულია საღებავთან-ბრომფენოლის ლურჯთან. საღებავი საჭიროა ვიზუალიზაციისათვის და ასევე დნმ-ის უკეთ დასალექად.

ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ გელს 15-20 წუთის განმავლობაში ვათავსებთ ეთიდიუმბრომიდში შეღებვისთვის. ხოლო შემდეგ დისტილირებულ წყალში 10-15 წუთით. შედეგების ანალიზს ვახდენდით ულტრაიისფერი UV-ტრანსილუმინაციის მეშვეობით. სურათის დოკუმენტირებისათვის ვიყენებდით Gel-Logic 100 (Kodak) სისტემის ფოტოკამერას და Molecular Imaging Software V.4.0.3. (Kodak) კომპიუტერულ პროგრამას.

2.12 ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი

ფაგურ დნმ-ს ვამუშავებდით სხვადასხვა რესტრიქციული ენზიმებით (Sau 3AI, Not I, Eco RV, X ba I, Sal I). შემდეგ სინჯები შეგვქნოდა 0.8% აგაროზის გელში და ვაწარმოებდით ელექტროფორეზს 1,5-2 სთ-ის განმავლობაში. მარკერულ პრეპარატად ვიყენებდით HindIII ფერმენტით დაჭრილ λ ფაგის დნმ-ს (Sigma). გელს ვღებავდით ეთიდიუმის ბრომიდით (0.5მ კგ/მლ). სანჯღრეველაზე. შედეგს ვნახულობდით UV-ილუმინატორზე.

2.13 ცხოველურ ორგანიზმებზე მუშაობის ტექნიკა

ცხოველებზე სამოდელო ცდებში PNMx ფაგის ფარმაკოკინეტიკისა და ფარმაკოდინამიკის შესასწავლად ვიყენებდით სუფთა ხაზის მდედრი თაგვებს (Hsd:ICR (CD1), FVB/NHanHsd)). შევარჩიეთ 5 სხავდასხვა დროის ინტერვალი: 30წთ, 4სთ, 24სთ, 48სთ, 7 დღე. ჩვენს საკვლევ მასალას წარმოადგენდა ცხოველების ორგანიზმიდან აღებული სისხლი და ორგანოები:ელენთა, ღვიძლია, თირკმელები, ფილტვები, ტვინი. საინექციოთ

გამოვიყენეთ ზემოთ აღწერილი ექსპერიმენტების შედეგად მიღებული PNMx ფაგის ფაგოლიზატი, ტიტრით 6×10^9 ნაწ/მლ, 0.1 მლ. თითოელი ცდის შემთხვევაში ექსპერიმენტი ტარდებოდა 5 პარალელად.
ცხოველების ორგანიზმიდან ვიღებდით სისხლს, და ორგანოებს, ვაცენტრიფუგირებდით: სისხლს 4000rpm-ზე 10 წუთის განმავლობაში, ხოლო ორგანოებს 2500rpm-ზე ასევე 10 წუთის მანძილზე. სუპერნატანტი გადავქონდა სტერილურ ეპენდორფებში და ვახდენდით მათ გატიტვრად გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით.

III. მიღებული შედეგები

3.1 PNMX ფაგის სუფთა ხაზის კლონის მიღება

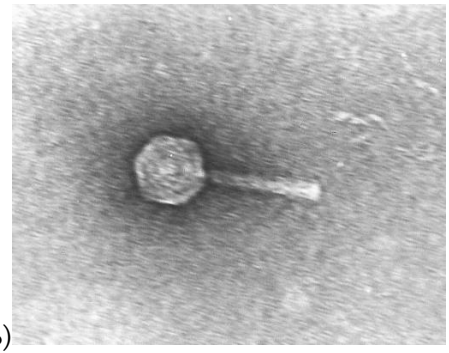
ორშრიანი აგარის მეთოდის გამოყენებით, მაღალი განზების ფინჯნიდან ვახდენდით PNMX ფაგის ცალკეული, ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების შერჩევას და მათ ამოღებას. 6 თანმიმდევრული პასაჟის შედეგად მივიღეთ საკვლევი ფაგის სუფთა ხაზი (ფაგის კლონი) რომელიც სისუფთავეზე შემოწმდა ტრანსმისიური ელექტორნული მიკროსკოპით.

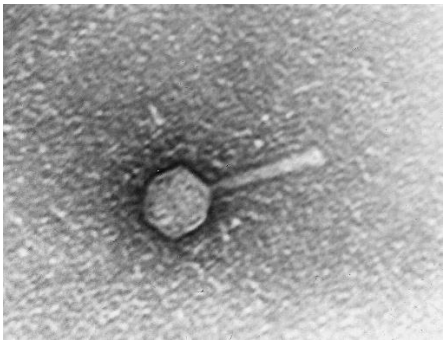
3.2 *P.aeruginosa*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგის PNMX-ის დახასიათება

ბაქტერიოფაგის ნეგატიური კოლონიის ფორმას ვნახულობდით მასპინძელი ბაქტერიის გაზონებზე მათი ფორმირების დამთავრების შემდეგ, დაახლოებით 24 საათში. PNMx ფაგის ნეგატიური კოლონიის დიამეტრი იყო 3-4მმ, ნათელი ცენტრითა და მღვრიე ორეოლით (სურ.N6). აღსანიშნავია, რომ საკვლევი ფაგი ხასიათდებოდა პოლიმორფიზმით, რაც ნეგატიური კოლონიების არაერთგვაროვნებაში გამოიხატებოდა.

სურ 6. PNMX-ის ნეგატიური კოლონიები

ფაგის ვირიონის მორფოლოგიას ვსწავლობდით ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. PNMx ფაგის მიკროსკოპულმა დათვალიერებამ გვიჩვენა, რომ ის მიეკუთვნება Myoviridae-ს ოჯახს, იზომეტრული, ჰექსაგონალური თავითა და კუმშვადი კუდით (სურ 7 და ცხრილი 2).





სურ 7. ა) და ბ) PNMx-ის მორფოლოგია

ცხრილი 2. *P. aureginosa*-ს მიმართ სპეციფიკური ფაგი PNMX-ის მორფოლოგია

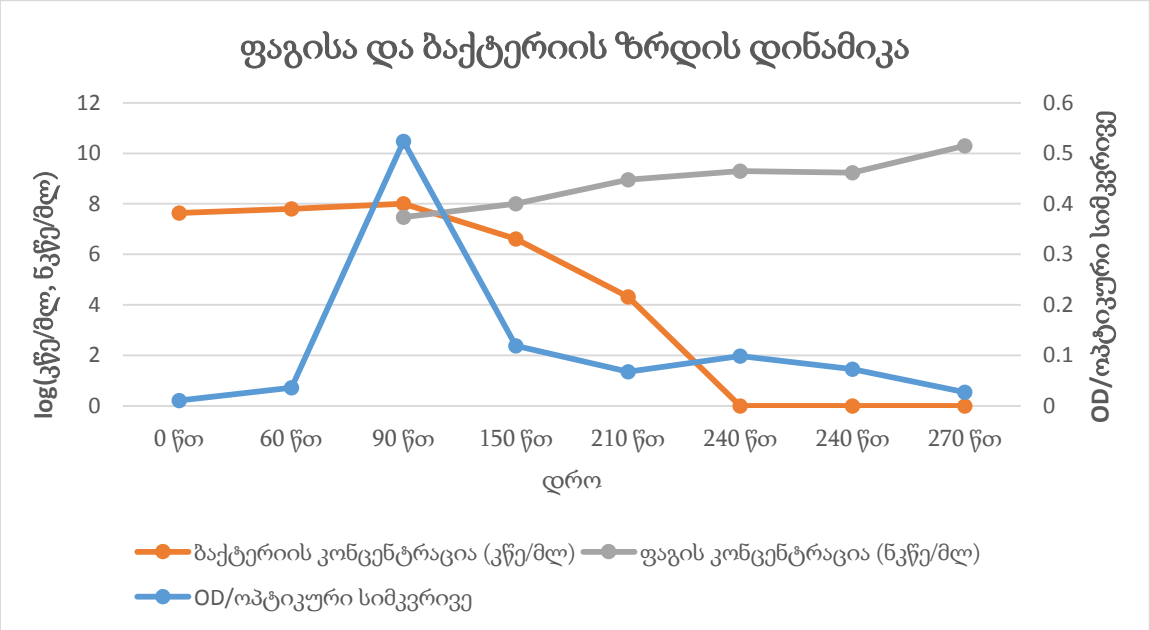
ბაქტერიოფაგი	მასპინძელი ბაქტერია	ბაქტერიოფაგის გამოყოფის წყარო	რიგი	ოჯახი	თავის ზომა (nm)	კუდის ზომა (nm)
PNMx	"573" *Pseudomonas aeruginosa*	მტკვრის წყალი	Caudovirales	Myoviridae	61.3±0.3	109±0.5

3.3 PNMX ფაგის გამრავლება სინთეზურ საკვებ არეში

კვლევის საწყის ეტაპზე PNMX ფაგს ვამრავლებდით სინთეზურ საკვებ არეში-კელენ ბერგერში. ვაკვირდებოდით ფაგის გამრავლებისა და ბაქტერიის ზრდის დინამიკას ფაგი-ბაქტერიის სხვადასხვა თანაფარდობისას. ინფექციური ფაგური ნაწილაკების რაოდენობას სარეაქციო არეში ვსაზღვრავდით ორშრიანი აგარის მეთოდით. იგივე ნარევში ვსაზღვრავდით მასპინძელი ბაქტერიის რაოდენობასაც. დროის სხვადასხვა ინტერვალში აღებულ ნიმუშებში ასევე ვზომავდით ოპტიკურ სიმკვრივეს სპექტროფოტომეტრზე, 660ნმ ტალღის სიგრძეზე. ფაგის დამატებას სარეაქციო ნარევში ვახდენდით მაშინ, როდესაც სარეაქციო ნარევში ოპტიკური სიმკვრივე აღწევდა 0.5, რაც ბაქტერიის ლოგარითმული ზრდის ფაზას შეესაბამება. ფაგი-ბაქტერიის სხვადასხვა მრავლობითობაზე ჩატარებული ცდების სერიების შედეგად დავადგინეთ, რომ საკვლევი ფაგი ყველაზე მაღალ გამოსავალს გვაძლევდა 100:1 ბაქტერია -ფაგის თანაფარდობისას.

ცხრილი 3.

დრო	OD/ოპტიკური სიმკვრივე	ბაქტერიის კონცენტრაცია (კწე/მლ)	ფაგის კონცენტრაცია (ნკწე/მლ)
0 წთ	0.011	43200000	
60 წთ	0.036	64000000	
90 წთ	0.511	100000000	30000000
150 წთ	0.119	4100000	100000000
210 წთ	0.068	21000	900000000
240 წთ	0.099	0	2000000000
260წთ	0.073	0	1700000000
270 წთ	0.027	0	20000000000

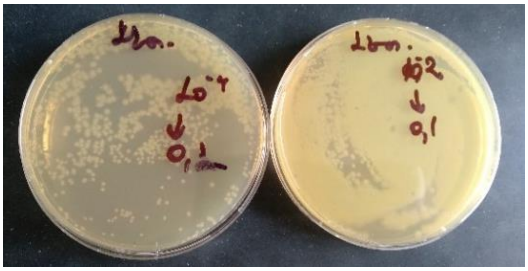


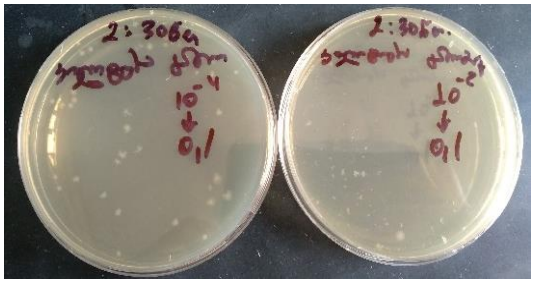
დიაგრამა 1. ფაგისა და ბაქტერიის ზრდის დინამიკა 1:100 თანაფარდობისას

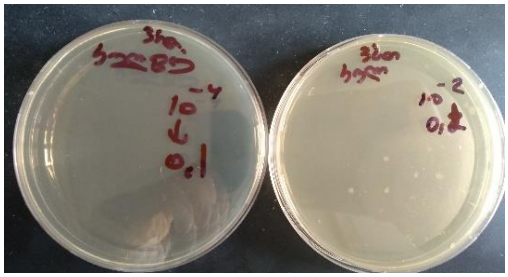
100:1 ბაქტერია-ფაგის თანაფარდობისას სარეაქციო ნარევში ფაგის შეტანიდან 60წთ-ში ინფექციური ფაგური ნაწილაკების რაოდენობამ საწყისთან შედარებით 3-ჯერ მოიმატა, ორ საათში 30-ჯერ, ხოლო ექსპერიმენტის ბოლოსთვის (ფაგის შეტანიდან 4 საათში) მათმა რიცხვმა $2*10^{10}$ ნკწე/მლ მიაღწია, რაც საწყის რაოდენობასთან შედარებით დაახლოებით 700-ჯერ მეტი იყო (3 ლოგ-ით მატება). კელენ-ბერგერის სინთეზურ არეში ბაქტერიებმა (საწყისი რაოდენობა $4*10^6$კწე/მლ) ლოგარითმული ზრდის ფაზას ($2*10^8$კწე/მლ) მიაღწია საათ ნახევარში, ხოლო ფაგის დამატებიდან ერთ საათში მასპინძელი ბაქტერიის რაოდენობა

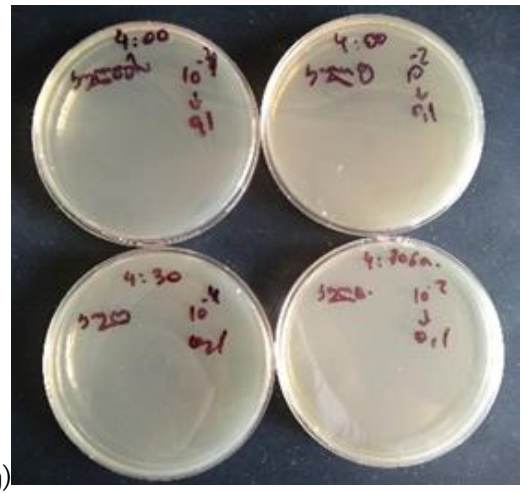
შემცირდა 2ლოგ-ით, 2სთ-ში 4ლოგ-ით, ხოლო 2 საათსა და 30 წთ-ში კოლონიის წარმომქმნელი ბაქტერიების რიცხვი 1 მლ-ში 0 ტოლი იყო. შეიძლება ითქვას, რომ ფაგისა და ბაქტერიის 1:100 თანაფარდობისას PNMX ფაგი ეფექტურად მრავლდება და 6 საათში ფაგის ტიტრი საკმაოდ მაღალ მაჩვენებელს (4×10^{10}ნაწ/მლ) აღწვს, რაც მიუთითებს საკვლევი ფაგის ეფექტურ და სწრაფ გამრავლების უნარზე თხიერ სინთეზურ საკვებ არეში. ეს, კი თერაპიული მიზნით გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური მახასიათებელია.

ა)

ბ) 

გ) 

დ) 



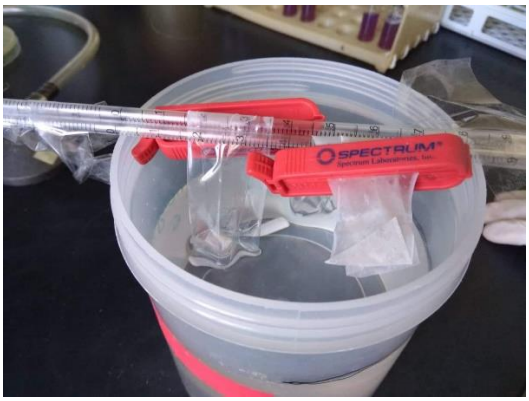
ე)

სურ 7. ბაქტერიების კონცენტრაცია ა)საწყის ხსნარში ბ) 1 სთ-ში გ) 2საათისა და 30 წუთში დ) 3 საათში ე) 4 საათში და 4:30 წუთში

3.4 ბაქტერიოფაგის გასუფთავებული პრეპარატის მიღება

მაღალტიტრიანი გასუფთავებული ფაგური პრეპარატის მისაღებად პირველ ეტაპზე ფაგოლიზატის მსხვილი ბაქტერიული ფრაგმენრტებისაგან გასათავისუფლებლად მოვახიდეთ მიღებული ფაგოლიზატის 400მლ-ის (იხ. 3.1) ცენტრიფუგირება დაბალ სიჩქარეზე (6000ბრ/წთ 30 წთ-ის განმავლობაში). მომდევნო ეტაპი წარმოადგენდა მაღალსიაჩქარიან ცენტრიფუგირებას (20000 ბრუნი/წთ-ზე 3სთ-ის განმავლობაში), რაც მიზნად ისახავდა ფაგოლიზატის დაკონცენტრირებას. შედეგად ფაგოლიზატის მოცულობა 400მლ-იდან დავიყვანეთ 20მლ-მე, ხოლო PNMx ფაგი დაკონცენტრირდა 10-ჯერ (ფაგის კოცენტრატი ტიტრით 5×10^{11}ნაწ/მლ). მესამე ეტაპს წარმოადგენდა დაკონცენტრირებული PNMx ფაგის გასუფთავება- ულტრაცენტრიფუგირება ცეზიუმის ქლორიდის ორმაგ გრადიენტში.

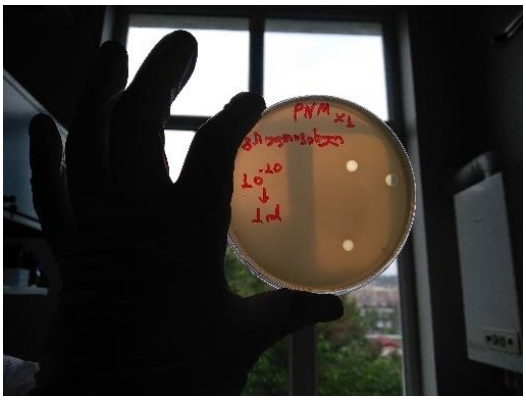
სურ. 8 ცეზიუმის ორმაგ გრადიენტზე გაწმენდილი ფაგის სუსპენზია

ა) 

ბ)

სურ. 9 დილიაზის პროცესი ა) სადიალიზო პარკებში ჩასხმულია PNMx ფაგი და პარკები თავის მხრივ მოთავსეულია სადიალიზე ბუფერში.

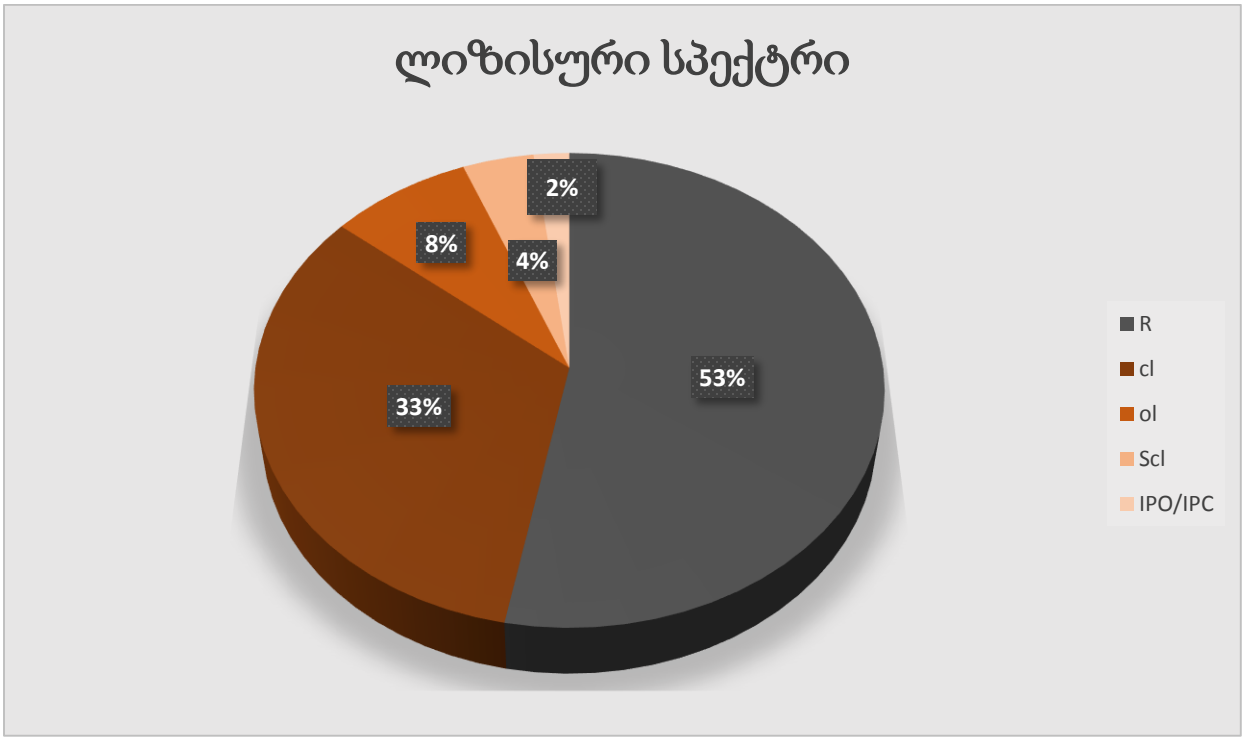
შედეგად მივიღეთ 1,5მლ მარალგასუფთავებული ფაგური პრეპარატი, რომლის ტიტრიც შეადგენდა 3×10^{12}ნაწ/მლ. აღნიშნული პრეპარატი გამოყენებული იყო ფაგის ვირიონსი მორფოლოგიის/ულტრასტრუქტურის შესასწავლად და ასევე ფაგური დნმ-ს რესტრიქციული პროფილის შესასწავლად.



სურ 10. PNMx ფაგის ნეგატიური კოლონიები ა) PNMX 10^{-10} განზავება

3.5 ბაქტერიოფაგის ლიზისური სპექტრის შესწავლა

PNMX-ფაგის ლიზისური აქტივობის დიაპაზონის დასადგენად შევარჩიეთ 49 *Pseudomonas aeruginosa*-ს შტამი, რომლებიც გამოყოფილი იყო STCU P664a საპარტნიორო პროექტის ფარგლებში ინახება მიკრობული ეკოლოგიის ლაბორატორიის ბაზაზე. არსებული შტამები გამოყოფილია იაშვილის კლინიკისა და გორის ჰოსპიტლის პაციენტების ნიმუშებიდან და ხასიათდებიან მრავლობითი რეზისტენტობით სხვადასხვა ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ.



დიაგრამა 2. PNMx-ის ლიზისური აქტივობა

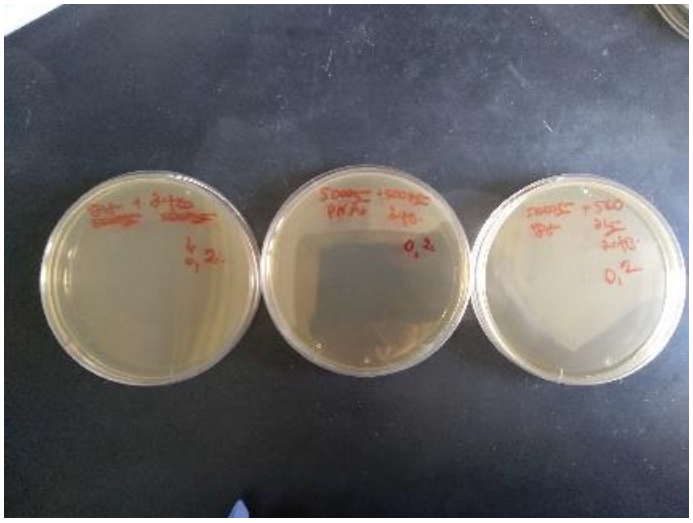
CL – სრული ლიზისის ზონა;
SCL – ფაგის დატანის ზონაში ერთეული მიკრობული კოლონიების არსებობა;
OL – ფაგის დატანის ზონაში ლიზისის ფონზე მეორადი ბაქტერიული ზრდა;
IPO/IPC - ფაგის დატანის ზონაში ერთეული ფაგური ნეგატიური, თვლადი კოლონიების არსებობა. გამჭირვალე ნეგატიური კოლონიების შემთხვევაში – **IPC**, ხოლო მღვრიე კოლონიების შემთხვევაში – **IPO.**

შედეგებმა გვიჩვენა, რომ შერჩეული შტამების 47% ავლენდა მგრძნობელობას, ხოლო 53% შტამებისა კი იყო რეზისტენტული PNMx ფაგის მიმართ. მიღებული შედეგებით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ აღნიშნულ ფაგს აქვს საკმაოდ ფართო ლიზისური სპექტრი და მოქმედებს *P.aeruginosa* ისეთ იზოლატებზე, რომლებიც მდგრადია სხვადასხვა ჯგუფის, მათ შორის ფართო სპექტრის მქონე ანტიბიოტიკების მიმართაც.

3.6 ბაქტერიოფაგის მიმართ რეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის განსაზღვრა

ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ PNMX ფაგის მიმართ ბაქტერიული მუტანტების წარმოიქმნლი სიხშირე არის ძალიან დაბალია და შეესებამება 0.000001ნკწე-ს 48 საათის განმავლობაში. ფაგი ბაქტერიის გაზონზე, სადაც ფაგისა და ბაქტერიის თანაფარდობა იყო 100:1 48 საათში წარმოიქმნა მხოლოდ 2 ბაქტერიული კოლონია (სამი პარალელური ექსპერიმეტის შედეგი). ის, რომ გაზონზე გაზრდილი ბაქტერიული კოლონიები ნამდვილად იყო საკვლევი ფაგის მუტანტური მასპინძელ ბაქტერია, დავადგინეთ ფაგოტიპირების ტესტით, კერძოდ მათზე საკვლევი ფაგისა და ასვევე საკონტროლო ბაქტერიოფაგის (PNM ბაქტერიოფაგი) დაწვეთებით. მუტანტური შტამები რეზისტენტობას ავლენდა PNMX ფაგის მიმართ, ხოლო მგრძნობიარე იყო PNM ფაგის მიმართ, რაც სწორედ მუტაციის არსებობაზე მიუთითებს.

ფაგორეზისტენტული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის შედეგები კორელაციაში მოდის PNMX თხიერ არეში ლიზისის სტაბილობის შედეგებთან.



სურ 12. ფაგი-ბაქტერიის გაზონი 100:1 ფაგი ბაქტერიის თანაფარდობისას

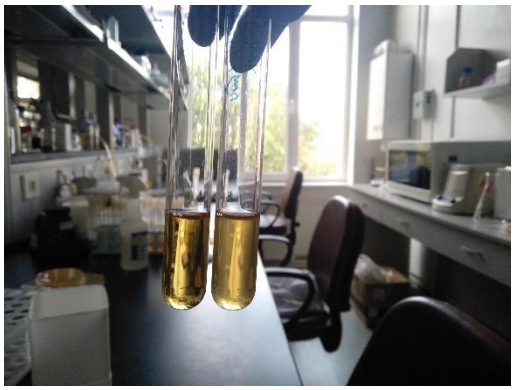
3.7 PNMX ფაგის ლიზისის სტაბილობილობა თხიერ არეში

საკვლევი ფაგის ლიზისის სტაბილობა თხიერ არეში შევისწავლეთ აპელმანის მეთოდით. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ PNMX ფაგი სტაბილურ ლიზისს ავლენდა 8 საათის განმავლობაში, ინარჩუნებდა რა სტაბილურ ლიზისს ყველა განზავებაში. 24 საათში ბაქტერიული ზრდა არ აღინიშნა მხოლოდ 10^{-1} და 10^{-2} განზავებებში სადაც ფაგისა და ბაქტერიის თანაფარდობა შესაბამისად იყო 10:1 და 1:1. ბაქტერიული ზრდა შეინიშნებოდა ყველა დანარენ განზავებაში (10^{-3} განზავებიდან 10^{-6} განზავების ჩათვლით).

ცხრილი 3.

ფაგი	**საწყისი ტიტრი: ფაგი-10^8 ნაწ/მლ, ბაქტერია 10^6 ნაწ/მლ**						
	დრო	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
PNMx	4სთ	-	-	-	-	-	-
	6სთ	-	-	-	-	-	-
	8სთ	-	-	-	-	-	-
	24სთ	-	-	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ
	48სთ	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ	ბზ

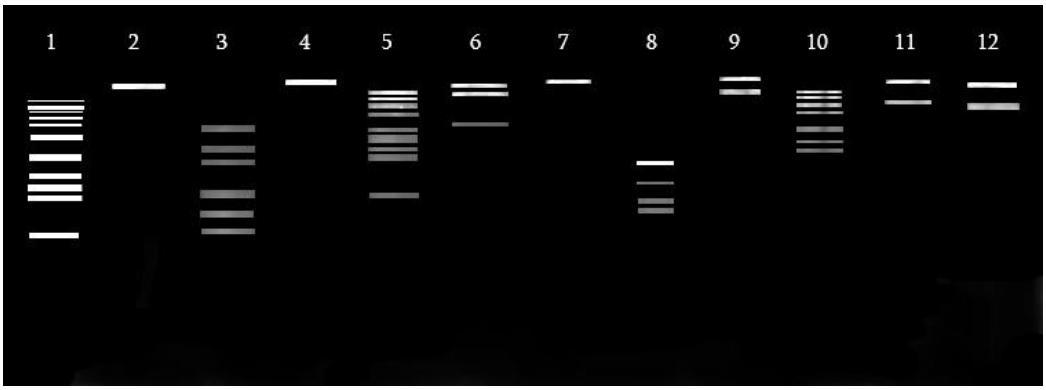
*ბზ-ბაქტერიული ზრდა



სურ.13. PNMX ფაგის ლიზისის სტაბილობილობა თხიერ არეში: ბაქტერიული კულტურის კონტროლი და საცდელი სინჯარა ფაგი ბაქტერიით (10^{-6} განზავება) 8სთ-ში

3.8 ფაგური დნმ-ის რესტრიქციული ანალიზი

PNMX ფაგის რესტრიქციული პროფილის შესასწავლად ფაგური დნმ გამოვყავით ფენოლ-ქლოროფორმის მეთოდით. საკვლევი ფაგიდან გამოყოფილი დნმ დავჭერთ 5 სხვადასხვა რესტრიქციული ენდონუკლეაზებით (იხ.სურ 15). PNMX ფაგის რესტრიქციული პროფილი შევადარეთ იგივე ფერმენტებით დაჭრილ PNM ფაგის რესტრიქციულ პროფილს. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა რომ 5 გამოყენებული ენდონუკლეაზიდან ფაგური დნმ Xba I დაჭრა მცირე ფრაგმენტებად და Sau 3AI da NotI მსხვილ ფრაგმენტებად. ექსპერიმენტების შედეგებინდან ნათლად ჩანს რომ PNMX და PNM ფაგი განსხვავდებიან არა მარტო მორფოლოგიურად, არამედ დნმ-ს რესტრიქციური პროფილითაც.



სურ. 14 გელ-ელექტროფორეზი, PNM და PNMX ფაგების დაჭრილი დნმ

1. დნმ მარკერი

2.ნატიური PNMX ფაგური დნმ.

3.Sau3AI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNMX ფაგური დნმ.

4. NotI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNMX ფაგური დნმ.

5. EcoRVენდონუკლეაზით დაჭრილი PNMX ფაგური დნმ.

6. XbaI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNMX ფაგური დნმ.

7. Sal I ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNMX ფაგური დნმ.

8. Sau3AI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNM ფაგური დნმ.

9. NotI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNM ფაგური დნმ.

10. EcoRVენდონუკლეაზით დაჭრილი PNM ფაგური დნმ.

11. XbaI ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNM ფაგური დნმ.

12. Sal I ენდონუკლეაზით დაჭრილი PNM ფაგური დნმ.

სურ. 15 PNM და PNMX ფაგის დნმ-ის დასაჭრელად გამოყენებული რესტრიქციული ენდონუკლეაზები

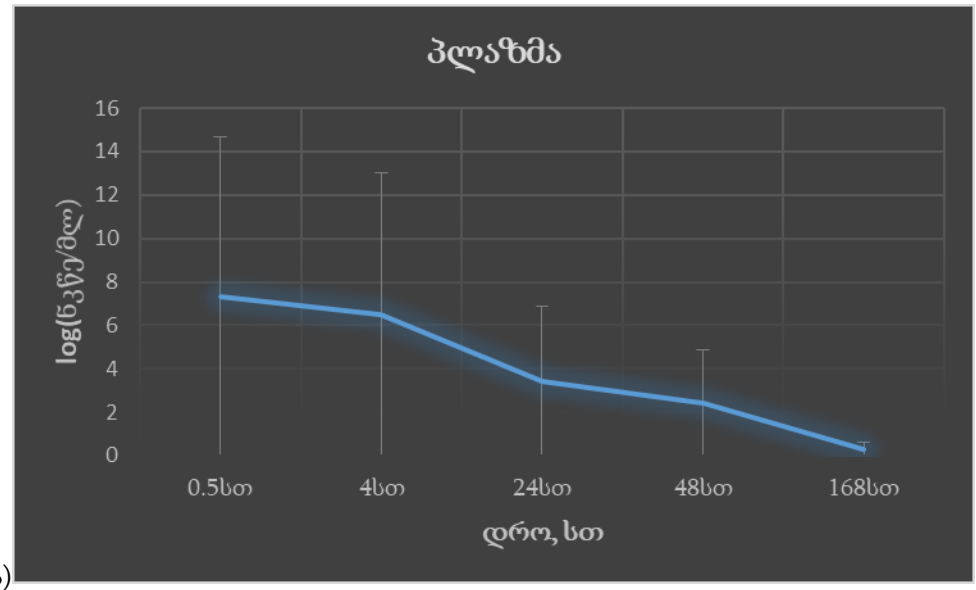
3.9 ფარმაკოკინეტიკური და ფარმაკოდინამიკური ექსპერიმენტების შედეგები

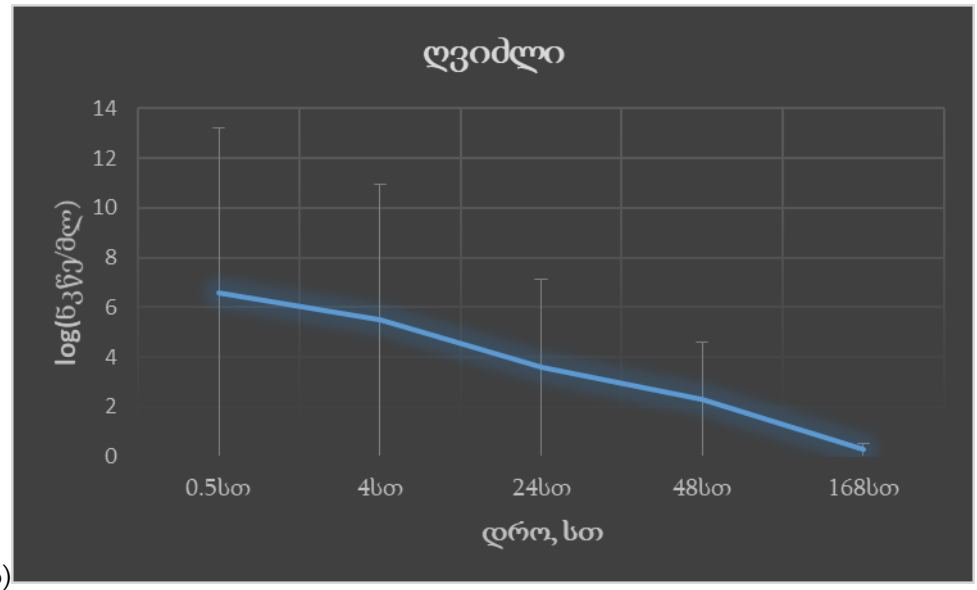
ფარმოკოკინეტიკური ექსპერიმენტების შედეგებმა გვიჩვენა, რომ PNMX ფაგი ხასიათდებოდა სისხლსა და სხვადასხვა ორგანოებში სწრაფი შეღწევადობით და მაქსიმალურ კონცენტრაციას აღწევდა 30წთ-ზე, რასაც მოსდევდა ფაგის რაოდენობის მკვეთრი შემცირება 24სთ-სი განმავლობაში, რის შემდეგაც სტაბილურად ნარჩუნდებოდა მინიმალურ დონეზე 7 დღის მანძილზე. განსხვავებული სურათი მივიღეთ ტვინის შემთხვევაში, სადაც ფაგის შეღწევადობა იყო შენელებული და მაქსიმალურ კონცენტრაციას აღწევდა შეყვანიდან 24 საათის შემდეგ. აღნიშნული შედეგი შესაძლოა აიხსნას ჰემატოენცეფალური ბარიერის არსებობით და ტვინის ქსოვილის თვისებურებებით. (იხ დიაგრამა 3)

ფარმაკოკინეტიკურმა კვლევამ გვიჩვენა, რომ ჰისტომორფოლოგიური ცვლილელებები ღვიძლსა და თირკმელში არ დაფიქსირებულა. (იხ. სურ.17)

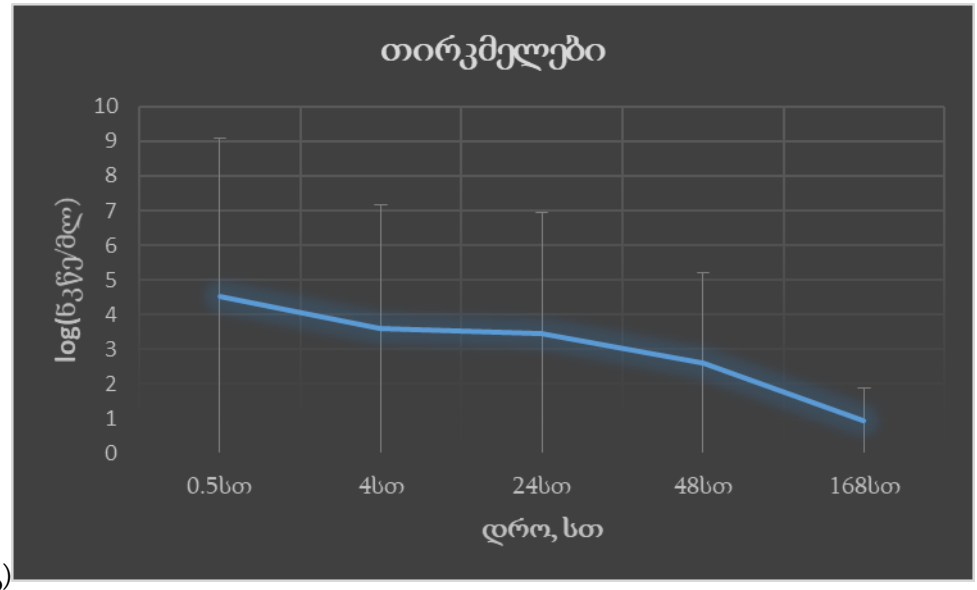
ა) ბ)

სურ 16. ა) ინექციის პროცესი ბ) საკვლევი ცხოველები

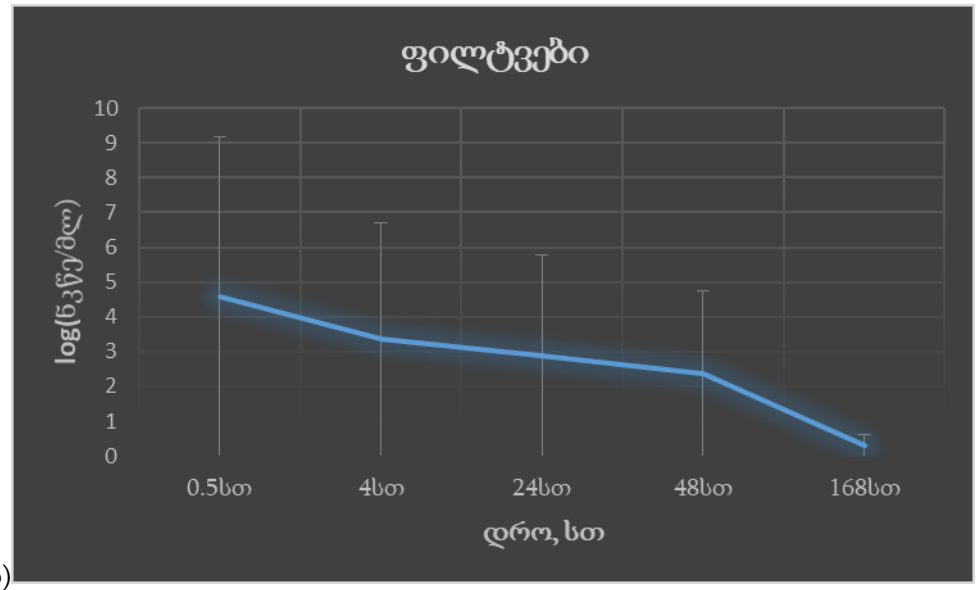
ა) 


ღვიძლი
14
12
10
8
6
4
2
0
log(ნკწე/მლ)
0.5სთ
4სთ
24სთ
48სთ
168სთ
დრო, სთ

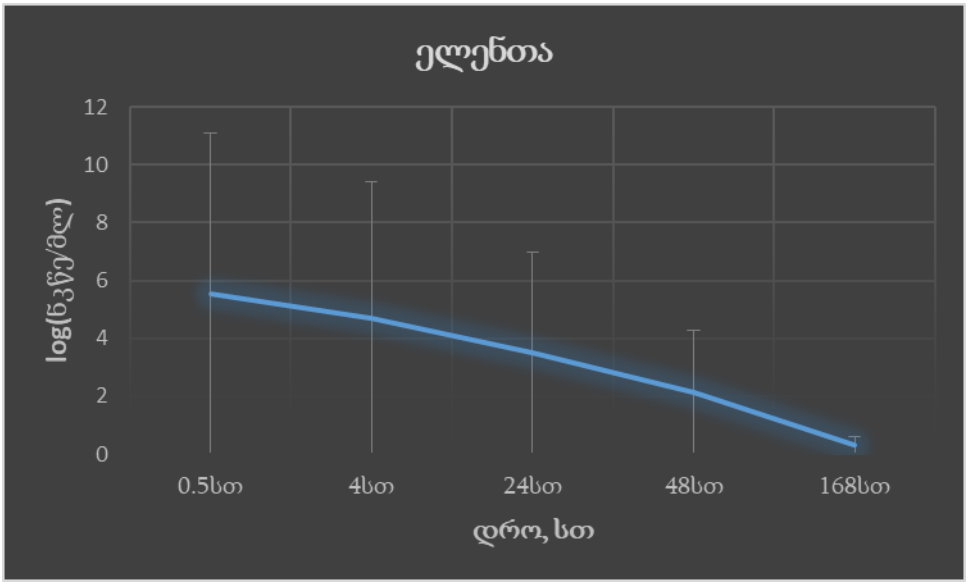
გ)


თირკმელები
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
log(ნკწე/მლ)
0.5სთ
4სთ
24სთ
48სთ
168სთ
დრო, სთ

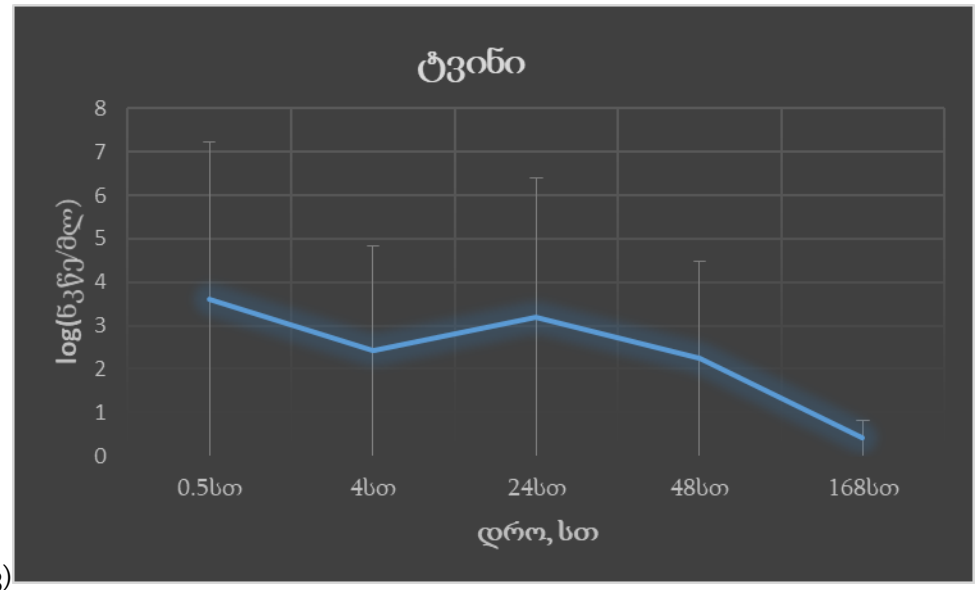
გ)


ფილტვები
log(ნკწუ/მლ)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0.5სთ
4სთ
24სთ
48სთ
168სთ
დრო, სთ

დ)


ელენთა
log(ნკწუ/მლ)
12
10
8
6
4
2
0
0.5სთ
4სთ
24სთ
48სთ
168სთ
დრო, სთ

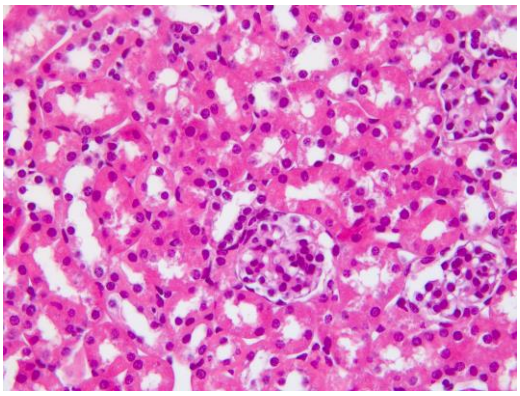
ე)



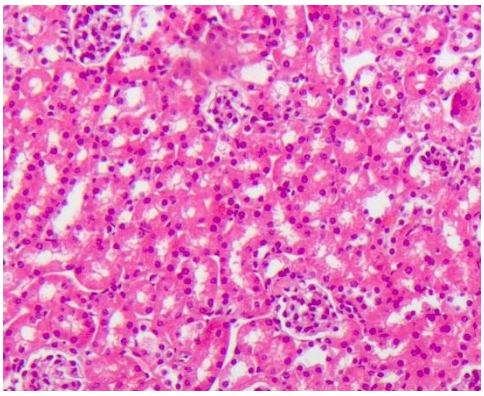
ვ)

დიაგრამა 3. პლაზმასა და ორგანოებში ფაგის განაწილების დინამიკა

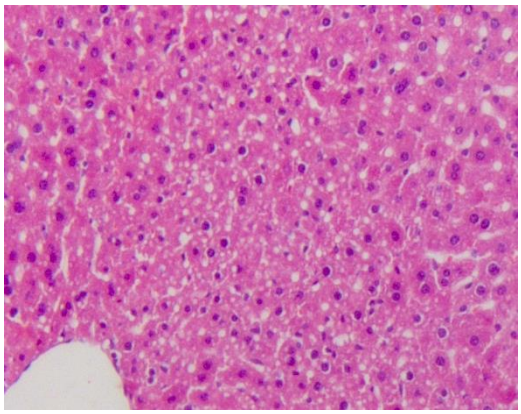
ა)



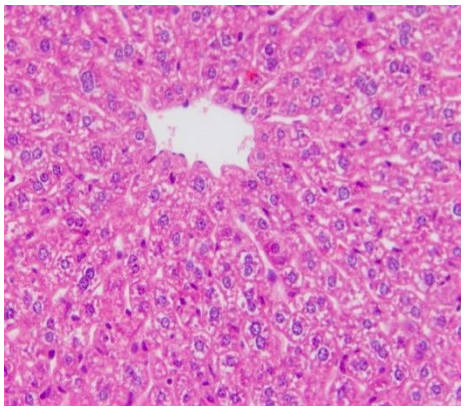
ბ)



გ)



დ)



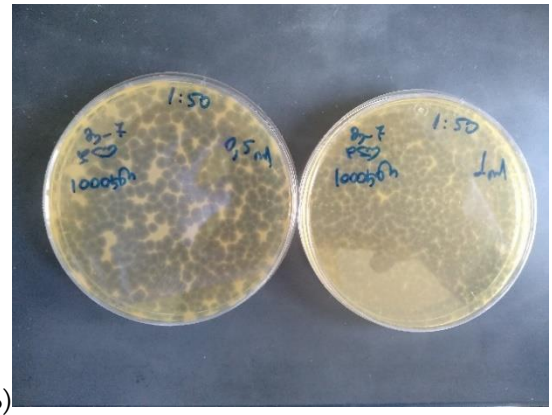
სურ.17 ა)თირკმლის ქსოვილი, მე-7 დღე ბ)კონტროლი, მე-7 დღე გ)ღვიძლის ქსოვილი, მე-7 დ)კონტროლი, მე-7 დღე

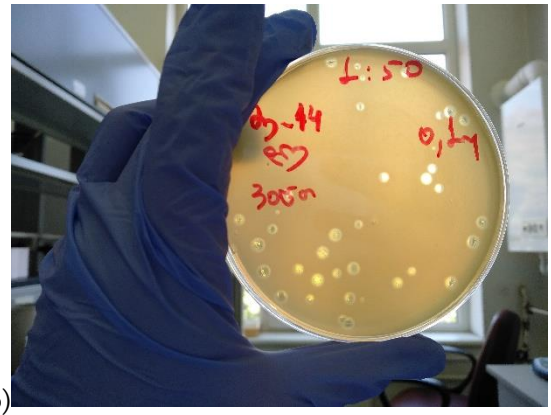
3.10 ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკა

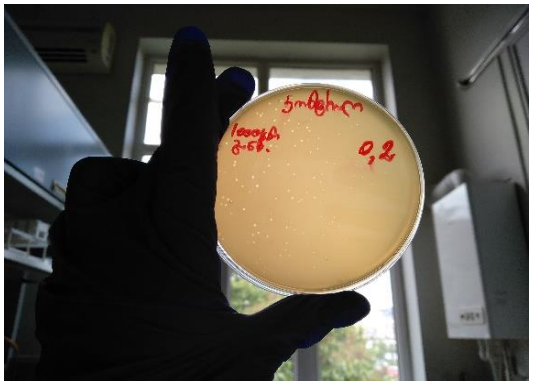
ჩატარებული კვლევის ერთ-ერთ მიზანს წარმოადგენდა ანტიფაგური ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკის შესწავლა თაგვებში ფაგის ერთჯერადი შეყვანით. წარმოქმნილი ანტისხეულების დეტექციას და რაოდენობრივ განსაზღვრას თაგვის სისხლის შრატში ვახდენდით ფაგის ნეიტრალიზაციის მეთოდის გამოყენებით შეყვანიდან მე-7, მე-14 და 23-ე დღეს. შედეგებმა გვიჩვენა, რომ მანეიტრალიზებელი ანტისხეულების არსებობა თაგვის ორგანიზმში ფიქსირდებოდა მე-7 დღიდან მცირე რაოდენობით და პიკს აღწევდა 23-ე დღეს. (იხ. დიაგრამა 4).

იმისათვის, რომ შეგვემოწმებინა თუ რამდენად სპეციფიკური იყო თაგვების ორგანიზმში გამომუშავებული ანტიფაგური ანტისხეულები ნეიტრალიზაცია გავაკეთედ, *E.coli*-ის მიმართ სპეციფიკურ ფაგ UN-ზე, რომელიც Myoviridae-ს ოჯახს მიეკუთვნება.

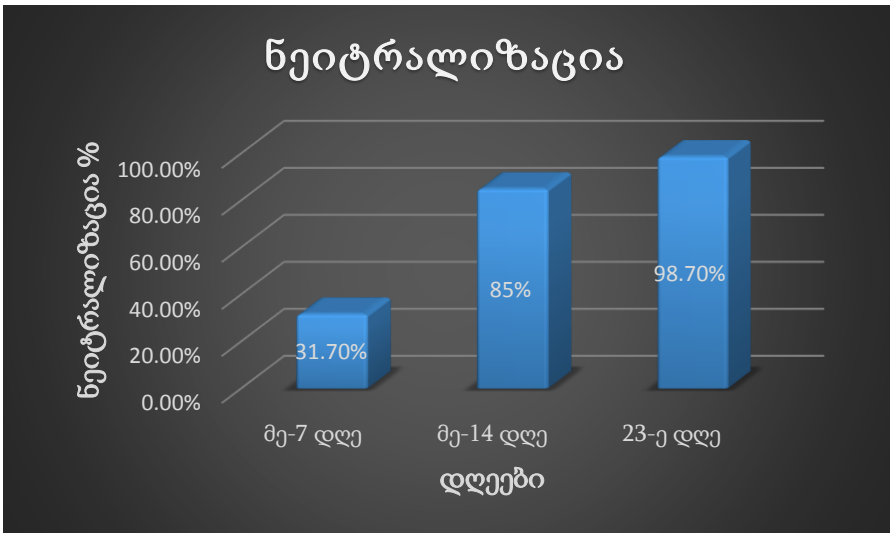
შედეგებმა გვიჩვენა, რომ თაგვის ორგანიზმნში გამომუშავებული ანტიფაგური ანტისხეულები ხასიათდება სპეფიციკურობით PNMx ფაგის მიმართ, რადგან ისინი არ ანეიტრალებენ იგივე მორფოლოგიის სხვა ფაგს.

ა) 

ბ) 



სურ. 18 ა) PNMX ფაგი ბაქტერიის გაზონი, მე-დღე ბ) ფაგი ბაქტერიის გაზონი მე-14 დღე გ) UN ფაგი ბაქტერიის გაზონი (კონტროლი)



დიაგრამა 4 მანეიტრალიზებელი ანტისხეულების წარმოქმნის დინამიკა

დასკვნა

1. PNMX ფაგის სწრაფი და მარტივი გამრავლების უნარი მყარ და თხიერ საკვებ არეში, ფართო ლიზისური სპექტრი, ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნის დაბალი სიხშირე და ლიზისის მაღალი სტაბილობა თხიერ არეში, ასევე მისი სწრაფი შეღწავადობა ექსპერიმენტული თაგვების სისხლსა და ორგანოებში და მისი თანდთანობითი გამოსვლა ორგანიზმიდან აკმაყოფილებს თერაპიულად გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგებისადმი წაყენებულ მოთხოვნებს და შესაძლოა მივიჩნიოთ პერსპექტიულ კანდიდატად ფაგოთერაპიისთვის;
2. საკვლევ მასალაში ჰისტომორფოლოგიური ცვლილელებების არქონა, საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ თაგვის ორგანიზმზე საკვლევი ფაგი არ ახდენს მავნე ზეგავლენას.
3. ანტიფაგური ანტისეხეულები წარმოქმნის დინამიკა მიყვება კლასიკურ მოდელს, რაც ადასტურებს ფაგის ანტიგენურ თვისებას, და ასევე განსაზღვრავს ფაგის პრეპარატის პარენტერულად გამოყენების მაქსიმალურ ხანგრძლივობას.

გამოყენებული ლიტერატურა

3)Ackermann, H.-W. (2011, May). Bacteriophage taxonomy. Canada.

14) Andrea Endimiani, 1. K. (2011). Are We Ready for Novel Detection Methods to Treat Respiratory Pathogens in Hospital-Acquired Pneumonia? *Infectious Diseases Society of America*.

11) Anzai Y1, K. H. (2000, July). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

16) Denton M, W. M. (1997). Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 468-74.

12) Douthit, S. A. (2004). *Characterization of enzymes that modify or degrade the Pseudomonas virulence factor, alginate.* Bozeman: Montana State University.

8) Drotman, D. P. (2017). Emerging Infectious Disease. *D. Peter Drotman*, 1621-1768.

4) Galina Novik*, A. L. (n.d.). Bacteriophage taxonomy and classification. Belarus, Minsk.

5) Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011, October 1). Bacteriophages and their Genomes. Pittsburgh, the United States.

13) J Lam, R. C. (1980). Production of mucoid microcolonies by Pseudomonas aeruginosa within infected lungs in cystic fibrosis. *AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY*.

21) Jonas D. Van Belleghem, *. K. (2018). Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses*, 10.

2) Kurtböke, I. (2012, March). BACTERIOPHAGES. Croatia.

17) Robert Wilson, R. B. (1998). Pseudomonas aeruginosa and other related species. *British Thoracic Society*, 213–219.

20) Shawna McCallin, J. C. (2019). Current State of Compassionate Phage Therapy. *Viruses — Open Access Journal*.

19) Stephen T. Abedon, C. T.-A. (210). Phage Therapy Pharmacology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 28-47.

9) Stephen T. Abedon, S. J. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*.

6) T. Mdzinarashvili, M. K. (2005). Biophysics of T5, IRA phages, Escherichia coli outer membrane protein FhuA and T5-FhuA interaction. *European Biophysics Journal*.

7) T. Mdzinarashvili, M. K. (2005). Biophysics of T5, IRA phages, Escherichia coli outer membrane protein FhuA and T5-FhuA interaction. *European Biophysics Journal*.

15) Tängdén, T. (2014). Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 149–153.

1) გუნია, ს. (2016, 06 20). *ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყენება ბრუცელების დიფერენცირებისა და ფაგოტიპირებისთვის.* თბილისი. Retrieved from

18) ი. ჩეკმანი, თ. ც. (2009). *ფარმაკოლოგია.* თბილისი: საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი.

23) კუსრაძე, ი. (2012). *ანტიბიოტიკორეზისტენტული Acinetobacter baumannii-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატის შექმნის მიზნით.* თბილისი: ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი.

25) ლასარეიშვილი, ბ. (n.d.). ფაგების გამოყოფა, კლონირება,კონცენტრირება და გასუფთავება. თბილისი.

24) რიგვავა, ს. (2014). *მულტირეზისტენტული Enterococcus spp-ს სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების დახასიათება.* თბილისი: ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი.

22) ცხვედიანი, ა. (2014). *საქართველოს წყლიან გარემოში გავრცელებული vibrio parahaemolyticus-ის და მის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა,*

დახასიათება და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა. თბილისი: თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი.