

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი
ფიზიკის დეპარტამენტი

ირინე პაპუკაშვილი

„ბაქტერიებზე ანტიბაქტერიული აგენტების სინერგეტიკული მოქმედების
ეფექტების ბიოლოგიური და ფიზიკური კვლევები“

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ფიზიკის დოქტორის
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

თსუ ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა
ფაკულტეტის ფიზიკის დეპარტამენტის პროფესორი,
ფიზ-მათ. მეცნ. დოქტორი
თამაზ მძინარაშვილი

მარსელის უნივერსიტეტი,
ხმელთაშუა ზღვის მიკრობიოლოგიის ინსტიტუტი
ბიოლოგიის. მეც. დოქტორი
მირეი ანსალდი

თბილისი 2018

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Faculty of Exact and Natural Sciences

Department of Physics

Irine Papukashvili

**“Biological and Physical Studies of Effects of Synergistic Action of
Antibacterial Agents on Bacteria”**

The thesis work is performed to obtain a PhD degree in Physics

Scientific Supervisors:

Professor Tamaz Mdzinarashvili
Doctor of Phys.-Math. Sciences
Department of Physics
Tbilisi State University

Professor Mireille Ansaldi
Doctor of Biology
Aix-Marseille University,
Institute of Microbiology of
the Mediterranean Sea

Tbilisi 2018

ა ბ ს ტ რ ა ქ ტ ი

ანტიბიოტიკების მიმართ მიკრობთა რეზისტენტობა თანამედროვე მსოფლიოს ჯანდაცვისა და საზოგადოების უსაფრთხოების სერიოზულ პრობლემას წარმოადგენს. ფაგების თერაპიული მიზნით გამოყენება, ე.წ. ფაგოთერაპია დღეისათვის მიიჩნევა ანტიბიოტიკოთერაპიის ერთ-ერთ ალტერნატივად. ანტიბიოტიკებისგან განსხვავებით ბაქტერიოფაგებით მკურნალობისას არანაირი სერიოზული გვერდითი მოვლენები არ არის გამოვლენილი. იმის გათვალისწინებით, რომ თერაპიაში ფაგები თავსებადია ანტიბიოტიკებთან, მათი ერთობლივი გამოყენება ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობის ეფექტურ საშუალებად შეიძლება იყოს განხილული. თუმცა საჭიროა ბაქტერიებზე მათი ერთობლივი ზემოქმედება უფრო ღრმად იყოს შესწავლილი. სწორედ ამიტომ წარმოდგენილი ნაშრომის მიზანი იყო შეგვესწავლა ბაქტერიების გამრავლებაზე ანტიბიოტიკებისა და ფაგების კომბინაციური მოქმედებით გამოწვეული ეფექტები ფიზიკური და ბიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით.

ვინაიდან ბაქტერიების გამრავლებას თან ახლავს ხსნარის სიმღვრივის მატება, მათი გამრავლების პროცესზე ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ზემოქმედების შესასწავლად გამოვიყენეთ ხსნარების სიმღვრივის საზომი მაღალმგრძნობიარე დანადგარი, ტურბიდიმეტრი, რომელიც არის ახალი, ჩვენ მიერ უნივერსიტეტში ბიოფიზიკის ლაბორატორიაში აგებული ხელსაწყო. ტურბიდიმეტრი საშუალებას იძლევა უჯრედების გამრავლების პროცესი შევისწავლოთ უწყვეტ დროით რეჟიმში, რაც ძალზედ მნიშვნელოვანია ბაქტერიებისა და ანტიბაქტერიული აგენტების ურთიერთქმედების მექანიზმების ასახსნელად. კვლევებში ასევე გამოყენებული იყო სპექტროფოტომეტრი ბაქტერიების ზრდის და ბიოფილმების ფორმირების შესასწავლად. ბაქტერიების გამრავლების პროცესში წარმოქმნილი უჯრედების დასათვლელად, ანტიმიკრობული აგენტებით გამოწვეული ბაქტერიული უჯრედების მორფოლოგიური ცვლილებების შესასწავლად და ბაქტერიების მუტაციებზე დასაკვირვებლად გამოყენებული იყო როგორც ფიზიკური მეთოდები (გამდინარე

ციტომეტრია, ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპია), ასევე ზოგადი მიკრობიოლოგიური ტექნიკა.

საწყის ეტაპზე შევისწავლეთ ბაქტერიულ უჯრედებზე ანტიმიკრობული აგენტებისა და გარემო პირობების ზეგავლენა. ხსნარში ბაქტერიოფაგების რაოდენობის დათვლა ხორციელდება კლასიკური ბიოლოგიური მეთოდით (გრაციას მეთოდი). ჩვენი კვლევებით ვაჩვენეთ, რომ ფაგების რეალური რიცხვი მოცემულ ხსნარში რამოდენიმე რიგით აღემატება აღნიშნული ბიოლოგიური მეთოდით განსაზღვრულ ფაგების რიცხვს. დავადგინეთ ფაგისა (T5 და სხვა) და ანტიბიოტიკის (Ampicillin და სხვა) მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციები (MIC - ანტიმიკრობული აგენტის ის უმცირესი კონცენტრაცია, რომლითაც კიდევ არის შესაძლებელი მიკრობის ზრდის ინჰიბირება) და ავხსენით MIC-ის ბუნება. კვლევებით ვაჩვენეთ, რომ ფაგისა და ანტიბიოტიკის გარკვეული კომბინაციების შემთხვევაში დაიმზირება სინერგიული მოქმედება *E.coli* ბაქტერიების ზრდაზე - ამ აგენტების ერთობლივი ზემოქმედება ეფექტურად თრგუნავს ბაქტერიის ზრდას, მაშინ როცა ცალკე ფაგი და ცალკე ანტიბიოტიკი (MIC-ზე ნაკლები კონცენტრაციის) მნიშვნელოვან გავლენას ვერ ახდენს ბაქტერიის გამრავლებაზე. ვაჩვენეთ, რომ ანტიბიოტიკების მცირე კონცენტრაციების (MIC-ის მიდამოში) მოქმედება იწვევს ფაგის ნაწილაკების წარმოქმნის სტიმულირებას. ბევრი სხვადასხვა ტიპის ბაქტერია გარე ზემოქმედებისგან თავდაცვის მიზნით წარმოქმნის ბიოფილმებს, რომლებიც ანტიბიოტიკის თერაპიული კონცენტრაციისთვის შეუღწევად ბარიერს ქმნის, ფაგს უნარი აქვს ბიოფილმებში შეაღწიოს, თუმცა ჩვენი კვლევებით ნაჩვენებია, რომ თუ გამოვიყენებთ ანტიბიოტიკის და ფაგის კომბინაციას მივიღებთ სინერგიულ ეფექტს ბაქტერიების (*P.aeruginosa*) მიერ ბიოფილმების ფორმირებაზე. რადგან წამლების მიმართ მიკრობთა რეზისტენტობა დღეისათვის გლობალური შესწავლის საკითხია, ჩვენი კვლევის ერთ-ერთი ამოცანა იყო მიკრობთა რეზისტენტობაზე დაკვირვება, მათზე ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინირებული მოქმედებისას. კვლევებით ვაჩვენეთ, რომ ფაგისა და ანტიბიოტიკის ბაქტერიებზე კომბინირებული მოქმედების შედეგად მცირდება როგორც ანტიბიოტიკებით

გამოწვეული ბაქტერიული მუტაგენების, ასევე ფაგებით გამოწვეული ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე.

ჩვენ მიერ მიღებული შედეგები ცხადყოფს, რომ ფაგებისა და ანტიბიოტიკების ერთობლივი გამოყენება შესაძლოა იყოს ბევრად უფრო ეფექტური და ნაკლებად მიდრეკილი რეზისტენტობის განვითარების მიმართ, ვიდრე თერაპია მხოლოდ ანტიბიოტიკებით, ან მხოლოდ ფაგებით. ჩვენი კვლევების შედეგები გვიჩვენებს ფაგებითა და ანტიბიოტიკებით კომბინირებული გამოყენების დიდ პოტენციალს ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ.

Abstract

The microbial resistance to antibiotics is a big burden for the health care and public safety of the modern world. The use of bacteriophages for therapeutic purpose, e.i. phage therapy is considered to be one of the alternatives of antibiotic therapy. Unlike antibiotics, bacteriophage therapy has not shown serious side effects. Considering that the phage therapy is compatible with antibiotics, their combined use may be foreseen as effective solution for treatment of bacterial infections. However the joint impact of phages and antibiotics on bacteria has to be studied more deeply. Therefore the aim of the present work was to study the effects of combinations of antibiotics and bacteriophages on bacteria growth using physical and biological methods.

Since bacterial multiplication is accompanied by increased turbidity of the solution, to study the action of biological active agents on bacteria growth we used a device - turbidimeter which is a novel apparatus, developed by us in the laboratory of biophysics of Tbilisi State University for measuring turbidity of fluids with a high sensitivity. Turbidimeter gives the possibility to study the growth process of cells in an infinite time regime, which is very important to describe the mechanisms of interaction of bacteria and antibacterial agents. The Spectrophotometric method was used to study the growth and biofilm formation of bacteria. To count the cells produced during bacteria growth, to study the morphological changes and observe the mutations of bacterial cells induced by action of antibacterial agents we used both physical (Flow Cytometry, Epi-fluorescent Microscopy) and biological (microbiological technic) methods.

At the initial stage we studied the action of antimicrobial agents and different environmental conditions on bacteria. The quantification of bacteriophage particles in solution is performed by classical biological method (Gratia method). Our studies have shown that the real number of phages in a given solution is a few logs more than it is defined by biological method. We have determined the minimal inhibitory concentrations (MIC - the lowest concentration of antimicrobial agent which prevents visible growth of a bacterium) of phages (T5

and others) and antibiotics (Ampicillin and others) and we have explained its nature. Performed experiments have shown that some of the combinations of phages and antibiotics have a synergistic effect on bacteria growth - combined action of these agents effectively suppress bacterial growth, while each of them separately (with concentrations less than MIC) does not have a significant impact on the bacterial multiplication process. Also, we have shown that the small concentrations of antibiotics (close to MIC) cause stimulation of phage particle production. Many different bacteria have an ability to form biofilms. The therapeutic doses of antibiotics cannot penetrate into bacterial biofilms, whereas phages are able to cross the biofilm barrier and more over, our studies have shown that in combination phages and antibiotics have a synergistic effect on bacterial (*P.aeruginosa*) biofilm formation as well. While the microbial resistance to drugs is a global problem, one of the aims of our study was to observe microbial resistance induced by the joint action of phages and antibiotics. Our studies have shown that the bacterial mutagenesis frequency caused by antibiotics, as well as the bacterial mutations caused by phages are decreased when bacteria are influenced by both of these agents.

The results obtained by us show that the joint use of phages and antibiotics might be much more effective and less oriented to resistance development than the therapy with only antibiotics, or with only phages. The results obtained by our research studies show the high potential of the use of phage/antibiotic combinations for treatment of bacterial infections.

მადლობა

სადოქტორო ნაშრომის ნაწილი შესრულებულია ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის ბიოფიზიკის კათედრაზე, ხოლო ნაშრომის ნაწილი შესრულებულია მარსელის უნივერსიტეტის ბაქტერიული ქიმიის ლაბორატორიაში ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორის მირეი ანსალდის ხელმძღვანელობით და დუსელდორფის ჰეინრიჰ-ჰეინის უნივერსიტეტის სამედიცინო მიკრობიოლოგიისა და ჰოსპიტალური ჰიგიენის ინსტიტუტში პროფესორ კოლინ მაკენზის ხელმძღვანელობით.

გაწეული დახმარებისთვის მადლობას ვუხდის ჩემი სადოქტორო ნაშრომის სამეცნიერო ხელმძღვანელებს და ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტს.

მადლობას ვუხდის შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს და გერმანიის აკადემიური გაცვლის სამსახურს (DAAD) საფრანგეთისა და გერმანიის სამეცნიერო-კვლევით ლაბორატორიებში სტაჟირებისა და კვლევის ჩასატარებლად ფინანსური მხარდაჭერისთვის.

სარჩევი

აბრევიატურების ჩამონათვალი 3

შესავალი 5

1. ლიტერატურის მოძიება

1.1 ბაქტერიები, მათი რეზისტენტობა და სხვა თავდაცვითი საშუალებები 10

1.2 ბაქტერიების გამრავლების ეტაპების მათემატიკური ანალიზი 16

1.3 ბაქტერიოფაგების ზოგადი მიმოხილვა, ბაქტერიული ვირუსების
განვითარების ციკლი 20

1.4 ანტიბიოტიკები, როგორც ბაქტერიებთან ბრძოლის საშუალება 24

1.5 ანტიბაქტერიული აგენტების მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციის
განსაზღვრის გზები 26

1.6 ფაგოთერაპია 27

ექსპერიმენტული ნაწილი

2. გამოყენებული მასალები და მეთოდები 30

2.1 გამოყენებული მასალები 30

2.1.1 ბაქტერიული შტამები, ფაგები, ანტიბიოტიკები 30

2.1.2 კულტურებზე მუშაობისას გამოყენებული ხსნარები და საკვები
ნიადაგები 31

2.2 კვლევებში გამოყენებული ფიზიკური მეთოდები 32

2.2.1 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი 32

2.2.2 ტურბიდომეტრული მეთოდი 33

2.2.3 გამდინარე ციტომეტრული მეთოდი 34

2.2.4 ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპია 35

2.3 კვლევებში გამოყენებული ბიოლოგიური მეთოდები 36

3. ჩატარებული კვლევები 37

3.1 სპექტროფოტომეტრული და ტურბიდომეტრული კვლევები 37

3.1.1 ანტიმიკრობული აგენტებისა და გარემო პირობების ზეგავლენის შესწავლა ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე.....	37
3.1.2 ფაგებისა და ანტიბიოტიკების სინერგიული ზემოქმედება <i>E.coli</i> ბაქტერიების ზრდაზე.....	44
3.2 ბიოლოგიური მეთოდით განსაზღვრული ფაგი ტიტრის ცდომილება.....	50
3.3 T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკების ბაქტერიაზე ზემოქმედების ეფექტების შესწავლა გამდინარე ციტომეტრის გამოყენებით	53
3.4 ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპით ჩატარებული კვლევები.....	57
3.5 T5 ფაგის ტიტრზე ანტიბიოტიკ ამპიცილინის (2მკგ/მლ და 3 მკგ/მლ) ზეგავლენის შესწავლა.....	59
3.6 ბაქტერიის მუტაგენეზის სიხშირეების და რეზისტენტობის განვითარების შესწავლა	60
3.6.1 T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის კომბინირებული მოქმედების შესწავლა ბაქტერიების მუტაგენეზის სიხშირეზე.....	60
3.6.2 ანტიბიოტიკების სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის გავლენა ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნაზე.....	63
3.7 ბაქტერიოფაგებისა და ბეტა-ლაქტამ ანტიბიოტიკის მოქმედების შესწავლა <i>P.aeruginosa</i> ბიოფილმების ფორმირებაზე.....	65
4. მიღებული შედეგების ანალიზი	72
დასკვნები.....	84
გამოყენებული ლიტერატურა.....	86

აბრევიატურების ჩამონათვალი

MIC, მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია (Minimum Inhibitory Concentrations).

pfu/ml, ნეგატიური კოლონიების წარმოქმნელი ერთეულის რაოდენობა 1 მილილიტრში (ml). (ფაგების შემთხვევაში) (plaque forming unit).

cfu/ml, კოლონიების წარმოქმნის რაოდენობა 1 მილილიტრში (ml).

nm, სიგრძის საზომი ერთეული - ნანომეტრი.

LB, ბაქტერიული საკვები ნიადაგი Luria Bertrain.

µg/ml, კონცენტრაციის ერთეული, მიკროგრამი მილილიტრში.

µl, ml, მოცულობის ერთეულები, მიკროლიტრი, მილილიტრი.

OD₆₀₀, ოპტიკური სიმკვრივე გაზომილი 600 ნანომეტრზე.

Ter R, ტეტრაციკლინ რეზისტენტული.

ApR, ამპიცილინ რეზისტენტული.

rpm, ცენტრიფუგის როტორის ბრუნების რიცხვი, Revolutions per minute.

MSS, მემბრანის მგრძობიარე საიტები.

SSC, ბუფერი (saline-sodium citrate).

PFA, Paraformaldehyde.

eve/ml, გამდინარე ციტომეტრის კონცენტრაციის ერთეული, შემთხვევათა რიცხვი მილილიტრში, events/ml.

GFP, მწვანე ფლუორესცენციული ცილა.

PBS, ფოსფატბუფერული ხსნარი.

PA01 - ბაქტერია ფსევდომონა აეროგინოზა 01.

ანტიბიოტიკები:

Amp, ამპიოქსი

IPM, იმიპენემი

Gn, გენტამიცინი

MEM, მეროპენემი

TC, ტეტრაიკლინი

PIP, პიპერაცილინი

Kn, კანამიცინი

KAZ, ცეფტაზიდიმი

Ap, ამპიცილინი

FEP, ფეროპენემი

Cm, ქლორამფენიკოლი

ATM, ასტრეონამი

Spc, სპექტინომიცინი

შესავალი

ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლა თანამედროვე მედიცინის გლობალური პრობლემაა. ცნობილია, რომ მედიცინაში ყველაზე ფართოდ მოხმარებადი მედიკამენტი ანტიბიოტიკებია, რომლის აღმოჩენას უდიდესი მნიშვნელობა ჰქონდა კაცობრიობისთვის. შეიძლება ითქვას, რომ 1929 წელს ფლემენგის აღმოჩენამ, ანტიბიოტიკმა, მწვავე ინფექციებით დაავადებული, სასიკვდილოდ განწიურული მილიონობით ადამიანი გადაარჩინა [1]. თუმცა ბოლო პერიოდში აღმოჩნდა, რომ ანტიბიოტიკი არ არის უნივერსალური საშუალება ბაქტერიების წინააღმდეგ საბრძოლველად. კერძოდ, მრავალ ბაქტერიულ შტამს, მათ შორის ჯანმრთელობისთვის მეტად საშიშ ბაქტერიებს გააჩნიათ უნარი განავითარონ ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტულობა [2, 3, 4], რაც წარმოადგენს დღეისათვის ჯანდაცვის ერთ-ერთ ყველაზე მწვავე პრობლემას. ამ სიტუაციიდან ერთ-ერთი გამოსავალი მდგომარეობს იმაში, რომ მოხდეს არსებული ანტიბიოტიკების ჩანაცვლება სხვა ტიპის ანტიმიკრობული აგენტების მოძიებით [5]. მითუმეტეს რომ ანტიბიოტიკებს აღმოაჩნდათ სხვა მრავალი უარყოფითი თვისებებიც, რაც გამოიხატება ანტიბიოტიკებით მკურნალობისას გამოვლენილ მრავალი გვერდითი მოვლენების არსებობაში, მაგალითად: ალერგიები, ნაწლავური პრობლემები, სოკოვანი ინფექციები და სხვა [6, 7, 8]. ისიც გასათვალისწინებელია, 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.

ბაქტერიების წინააღმდეგ საბრძოლველად არსებობს კიდევ ერთი ეფექტური და ბუნებრივი საშუალება ბაქტერიოფაგები. მათ გააჩნიათ მრავალი უპირატესობა ანტიბიოტიკებთან შედარებით. კერძოდ: ისინი შერჩევით ანადგურებენ ბაქტერიულ უჯრედებს, ადამიანის ორგანიზმში მოხვედრისას, ფაგებს შეუძლიათ ებრძოლონ

მხოლოდ ავადმყოფობის გამომწვევ ბაქტერიებს ისე რომ არ მოახდინონ ორგანიზმისთვის სასარგებლო ბაქტერიებზე ზემოქმედება, რის გამოც ადამიანებს არ უწვითარდებათ ისეთ საშიში სინდრომი, როგორცაა დისბაქტერიოზი. ბაქტერიოფაგების გამოყენებისას მათ გააჩნიათ კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი უპირატესობა ანტიბიოტიკებთან შედარებით - ფაგებით მკურნალობისას სერიოზული გვერდითი ეფექტები გამოვლენილი არ არის. მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ფაგებს არ ახასიათებთ ციტოტოქსიური მოქმედება, ანუ ადამიანის უჯრედებზე არ იწვევენ ტოქსიკურ ზემოქმედებას [9, 10, 11]. გარდა ამისა, ანტიბიოტიკებისგან განსხვავებით, ფაგებს უნარი აქვთ შეიჭრან ბაქტერიების მიერ წარმოქმნილ ბიოფილმებში და მოახდინოს მათი დაშლა. სწორედ ამიტომ ფაგი შეიძლება წარმატებით იყოს გამოყენებული ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისა და პროფილაქტიკისათვის. შეიძლება ითქვას, რომ ფაგები ანტიბიოტიკების ერთ-ერთი საუკეთესო ალტერნატივაა ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ [12,13, 4].

ისიც გასათვალისწინებელია, რომ ფაგოთერაპიას თან ახლავს გარკვეული შემაფერხებელი და უარყოფითი ფაქტორებიც. მაგალითად, ფაგის ორგანიზმი შეყვანის შემდეგ, ორგანიზმის მიერ წარმოქმნება ფაგის საწინააღდეგო ანტისხეულები, რომლებსაც შესწევთ უნარი ბაქტერიოფაგები გაანადგურონ, რის გამოც ფაგოთერაპიას შეიძლება ჰქონდეს ხანმოკლე მოქმედება. ნაჩვენებია, რომ ზოგიერთ ბაქტერიებს შეუძლიათ ბაქტერიული ვირუსების მიმართ გამოავლინონ რეზისტენტობაც, თუმცა აღსანიშნავია ისიც, რომ ბაქტერიები ანტიბიოტიკის მიმართ მუტაციებს უფრო მაღალი სიხშირით განიცდიან, ვიდრე ფაგის მიმართ [14].

როგორც ზემოთ ვაჩვენეთ, ანტიბიოტიკებსაც და ფაგებსაც გააჩნიათ როგორც დადებითი, ასევე უარყოფითი მხარეები. უარყოფითი მხარეები უფრო ძლიერად მჟღავნდება მაშინ, როდესაც ვიყენებთ ანტიმიკრობული აგენტების დიდ დოზებს, მაგრამ მცირე დოზების მოქმედება არაეფექტურია როგორც ანტიბიოტიკების, ისე ფაგის შემთხვევაში. თუ გათვალისწინებით იმ ფაქტს, რომ ფაგი და ანტიბიოტიკი ერთმანეთზე

არ მოქმედებს, ხომ არ იქნებოდა უკეთესი მათი ერთობლივი გამოყენება მცირე კონცენტრაციებით ბაქტერიული ინფექციების წინააღმდეგ საბრძოლველად?

ნაშრომის აქტუალობა: ნაშრომის აქტუალობა გამოიხატება იმაში, რომ გამოყენებული იყოს ფაგისა და ანტიბიოტიკის მინიმალური რაოდენობები მაქსიმალური სამკურნალო ეფექტის მისაღებად. ლოგიკურია ვიფიქროთ, რომ ანტიმიკრობული აგენტების დოზების შემცირებამ უნდა გამოიწვიოს მათ მიერ გამოვლენილი უარყოფითი ფაქტორების შემცირებაც, ან საერთოდ გაქრობა. თუმცა ეს ამ ეტაპზე კიდევ უფრო ღრმად შესწავლის საკითხია. სანამ სამედიცინო პრაქტიკაში ფაგი/ანტიბიოტიკის კოქტეილის გამოყენების დანერგვა მოხდება, საჭიროა ღრმად და დეტალურად იყოს შესწავლილი ამ აგენტების ბაქტერიულ უჯრედებზე ერთდროული ზემოქმედების ეფექტები და მათი დამახასიათებელი კანონზომიერებები.

კვლევის მიზანი: წარმოდგენილი ნაშრომის კვლევის მიზანი იყო შეგვესწავლა ბაქტერიის გამრავლების პროცესები სხვადასხვა გარე ზემოქმედების პირობებში ფიზიკური და ბიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით. დაგვედგინა ბაქტერიების გამრავლების პროცესის უწყვეტ დროით რეჟიმში ანტიბაქტერიული აგენტების (ფაგი, ანტიბიოტიკი) ბაქტერიულ უჯრედებზე ზემოქმედების ბუნება. აღნიშნული მეთოდების გამოყენებით განგვესაზღვრა ანტიბაქტერიული აგენტების მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციები (MIC). ასევე შეგვესწავლა ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტები ბაქტერიების ზრდაზე. კვლევის მნიშვნელოვან მიზანს წარმოადგენდა ბაქტერიების მიერ ბიოფილმების ფორმირებაზე ფაგებისა და ანტიბიოტიკების ერთობლივი მოქმედების შესწავლა. ასევე კვლევის ერთ-ერთი მიზანი იყო დაგვედგინა თუ რა ზეგავლენას ახდენს ფაგებისა და ანტიბიოტიკების ერთობლივი გამოყენება ბაქტერიების მიერ რეზისტენტობის შექმნაზე.

მეცნიერული სიახლე: წარმოდგენილი კვლევის ფარგლებში ვაჩვენეთ, რომ მცირე დოზით აღებული ფაგებისა და ანტიბიოტიკების ნარევის (კოქტეილის) გამოყენებით მნიშვნელოვნად გაიზარდა ბაქტერიაზე მოქმედების ეფექტურობა, კერძოდ სწრაფად და ეფექტურად დაითრგუნა ბაქტერიების გამრავლების პროცესი, რასაც თან ახლავს მათი

განადგურება. ასევე დავადგინეთ, რომ აღნიშნული კოქტეილი მნიშვნელოვნად თრგუნავს ბიოფილმების წარმოქმნის პროცესსაც.

აღსანიშნავია ის, რომ ჩვენ მიერ უნივერსიტეტში ბიოფიზიკის კათედრაზე შექმნილი ახალი, ხსნარების სიმღვრივის საზომი მაღალმგრძობიარე დანადგარის, ტურბიდიმეტრის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა ბაქტერიების ზრდაზე უწყვეტ დროით რეჟიმში დაკვირვება. ამ მეთოდმა საშუალება მოგვცა დაგვედგინა ბაქტერიების გამრავლებაზე სხვადასხვა გარე ზემოქმედების (საკვები არის კონცენტრაციის, ტემპერატურის, ანტიბიოტიკების და სხვა) დამახასიათებელი კანონზომირებები, ჩამოვაცალიბეთ მოსაზრება ანტიბაქტერიული აგენტების მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციის არსებობის შესახებ (MIC). ეს კი მნიშვნელოვანი ინფორმაციაა, ვინაიდან რაც მეტი გვეცოდინება სხვადასხვა გარემო პირობებში ბაქტერიების ცხოვლმყოფელობის შესახებ, მით უფრო მარტივად შევძლებთ როგორც მათთან ბრძოლას (მაგნე ბაქტერიები), ასევე მათ დაცვას (სასარგებლო ბაქტერიები). ჩვენი კვლევის ერთ-ერთი შედეგის მიხედვით, ფაგების და ანტიბიოტიკების კოქტეილის ბაქტერიების გამრავლებაზე ზემოქმედების დროს ბაქტერიები ნაკლებად არიან მიდრეკილი რეზისტენტობის შექმნის მიმართ, ვიდრე მხოლოდ ფაგის ან მხოლოდ ანტიბიოტიკის მოქმედების დროს.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა: ჩვენი კვლევის შედეგებზე დაყრდნობით, შეიძლება ითქვას, რომ ბაქტერიოფაგისა და ანტიბიოტიკის გამოყენებას გააჩნია უდიდესი პოტენციალი. ამ დროს შესაძლოა შემცირდეს როგორც ამ აგენტების სამკურნალო დოზები, ასევე ბაქტერიების მიერ წამლის მიმართ რეზისტენტობის განვითარება. აქედან გამომდინარე, ჩვენს მიერ წარმოდგენილი კვლევის შედეგები საყურადღებო უნდა იყოს არა მხოლოდ ჯანდაცვის, არამედ ვეტერინარიის, აგრიკულტურის, გარემოს უსაფრთხოებისა და ყველა იმ დარგისთვის სადაც ბაქტერიები ქმნიან პრობლემას. ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევის შედეგები და რეკომენდაციები შესაძლებელია გადაეცეს ფარმაცევტულ ორგანიზაციებს ფაგი/ანტიბიოტიკის კოქტეილის შექმნისა და მისი პრაქტიკაში დანერგვის მიზნით.

პუბლიკაციები:

დისერტაციის მასალები - გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო სტატია, აქედან 2 იმპაქტ ფაქტორის მქონე ჟურნალში, 1 რეფერირებად და რეცენზირებულ ჟურნალში, 7 საერთაშორისო და რესპუბლიკური კონფერენციის თეზისების სახით.

ნაშრომის მოცულობა და სტრუქტურა:

სადისერტაციო ნაშრომი მოიცავს 104 გვერდს. შედგება შემდეგი ძირითადი თავებისაგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, ექსპერიმენტული ნაწილი, დისკუსია, დასკვნები, ციტირებული ლიტერატურა. ცხრილები (4), ნახაზები (28), სურათები (4).

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული პუბლიკაციები:

- Papukashvili I, Lomadze E, Mdzinarashvili T. (2016). The Action of Bacteriophages and β -Lactam Antibiotic on *P. aeruginosa* Biofilm Formation Bull. Georg. Natl. Acad. Sci., vol. 10, no. 1, pp 91-96;
- Mdzinarashvili T, Papukashvili I, Shengelia N. Khvedelidze M. (2014) Features of Membrane Receptors in Bacterial Multiplication Process and Necessary Conditions for Phage Infection of Bacteria. Curr Microbiol vol. 69, no 6, pp. 858–865;
- Mdzinarashvili T. Papukashvili I. Partskhaladze T. Shengelia N. Khvedelidze M. (2013). Study of Environmental and Antimicrobial Agents Impact on Features of Bacterial Growth. Cell Biochem Biophys. Vol. 66, no 3, pp 759-764;

1. ლიტერატურის მომოხილვა

1.1 ბაქტერიები, მათი რეზისტენტობა და სხვა თავდაცვითი საშუალებები

ბაქტერიები წარმოადგენენ უძველეს ორგანიზმებს, რომლებიც დედამიწაზე არსებობენ დაახლოებით 3 მილიარდ წელზე მეტი ხანია [16, 17]. ისინი დღესაც აქტიურად მონაწილეობენ დედამიწაზე მიმდინარე უმეტეს ბიოგეოქიმიურ ციკლებში [18]. მიუხედავად იმისა, რომ ბაქტერიები (პათოგენური) არის მიზეზი ადამიანის, ცხოველების და მცენარეების მძიმე დაავადებებისა, არ შეიძლება არ აღინიშნოს, ზოგადად მათი დადებითი როლი და საჭიროება ცოცხალი სამყაროსთვის. საკმარისია დასახელდეს თუნდაც ნიადაგწარმოქმნაში ბაქტერიების უდიდესი როლი, რითაც დედამიწაზე დღევანდელი ცოცხალი ბუნების ასეთი მრავალფეროვნობა არსებობს [19]. ბაქტერიების გარეშე შეუძლებელია ღვინის, რძის პროდუქტების, აცეტონის, ძმრის, ლიმონის მჟავის, ზოგიერთი ვიტამინების, ანტიბიოტიკების და სხვა მნიშვნელოვანი პროდუქტების დამზადება [20, 21, 22, 23]. მათი მეშვეობით შესაძლებელია მარტივად, სწრაფად და დიდი რაოდენობით ამინომჟავების, ცილების, სამკურნალო წამლების მიღება და სხვა [24, 25].

დედამიწაზე, ცოცხალი სამყარო ბაქტერიების ერთ-ერთი ყველაზე დიდი რიცხვით არის წარმოდგენილი, მათი რიცხვი საშუალოდ 10^{30} შეადგენს [26]. უმეტესი ბაქტერიები მრავლდება განივი გაყოფით (ბინარული გაყოფა), ანუ ე.წ. ვეგეტატიური გამრავლება, რომელი პროცესიც მიმდინარეობს გარკვეული სიჩქარით [27]. გამრავლების ეს სიჩქარე დამოკიდებულია როგორც მიკრობის ტიპზე ასევე კულტურის ასაკზე, საკვების შემადგენლობაზე, ტემპერატურაზე, ჟანგბადის არსებობა/არარსებობაზე და ზოგიერთ სხვა ფაქტორებზე. მაგალითად, ნაწლავის ჩხირის ახალი თაობა ოპტიმალურ პირობებში წარმოიქმნება 20 წუთის, ტუბერკულოზის მიკობაქტერია 15-20 საათის შემდეგ და სხვა [27, 28].

ბუნებრივი, ევოლუციური გადარჩევის პროცესში ბაქტერიებს განუვითარდათ გარემოსგან თავდაცვითი მექანიზმები. ამის ერთ-ერთ მაგალითს ბაქტერიების ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტობა წარმოადგენს. ბაქტერიების რეზისტენტობა შეიძლება იყოს თანდაყოლოლი, ან შეძენილი - ამ შემთხვევაში ბაქტერია განიცდის ცვლილებას, ისე რომ იგი ხდება მდგრადი ანტიბიოტიკების ზემოქმედების მიმართ. როდესაც წამალი მოქმედებს ბაქტერიების ერთ სახეობაზე, ნაწილი ბაქტერიებისა შესაძლოა გადარჩეს და შემდეგ ახალ თაობას გადასცეს რეზისტენტობის გენი (გენების ვერტიკალური გადატანა). რესისტენტობის გენის გადაცემა შესაძლოა მოხდეს ბაქტერიის სახეობებს შორისაც (გენების ჰორიზონტალური გადატანა). ამის გამო ბაქტერიების ახალ თაობებში წამლების მიმართ რეზისტენტობა მატულობს დროთა განმავლობაში.

ბაქტერიების გარემოს მავნე ზემოქმედებისგან კიდევ ერთი თავდაცვითი საშუალებას ბიოფილმების ფორმირება წარმოადგენს, რაც მიკრობული განვითარების პროცესის შედეგია [29, 32]. ბაქტერიები შეიძლება გაერთიანდნენ, მიემაგრონ ერთმანეთს და ზედაპირებს და წარმოქმნან სამგანზომილებიანი სტრუქტურები - ბიოფილმები. უჯრედები ბიოფილმებში ერთმანეთს ემაგრებიან ლორწოვანი არაუჯრედოვანი მატრიქსის საშუალებით, რომელიც არაუჯრედოვანი პოლიმერული ნივთიერებებისგან (არაუჯრედოვანი დნმ, ცილები, პოლისაქარიდები) შედგება [30, 31]. ბიოფილმების ფორმირება შეიძლება მოხდეს სხვადასხვა ზედაპირებზე, ისინი გვხვდება როგორც ბუნებაში, ცოცხალ ზედაპირებზე, ასევე სამრეწველო დანადგარებზე, სამედიცინო ხელსაწყოებზე და სხვა. ბიოფილმის შიგნით ბაქტერიები ბევრად უფრო დაცულია გარე ზემოქმედებისგან და ამგვარად წამლებით მათი განადგურება კიდევ უფრო რთულდება - ბიოფილმების ფორმირებით ბაქტერიები მზარდ რეზისტენტობას ავლენენ ანტიბიოტიკების მიმართ. დადგენილია, რომ ბაქტერიული ინფექციების 80% გამოწვეულია ინფექციების ადგილებში ბიოფილმების არსებობით [33].

ბაქტერიებზე ფუნდამენტური სამეცნიერო კვლევების ჩასატარებლად ერთ-ერთ ყველაზე კარგ საკვლევ ორგანიზმს *E.coli* წარმოადგენს. ამ მიკრობის შტამების

უმრავლესობა უვნებელია. ხელსაყრელ პირობებში *E.coli*-ის რეპროდუქცია ხდება სწრაფად (20 წთ). მისი კულტივირება, ისევე როგორც გენეტიკური მანიპულირება მარტივია, რის გამოც იგი იდეალურ საკვლევ ობიექტად განიხილება. *P. aeruginosa* ბაქტერიების მიერ წარმოქმნილი ბიოფილმები დიდ როლს თამაშობს პნევმონიის, საშარდე გზების ინფექციების, ბაქტერიული კერატიტის, ოტოტის, დამწვრობის და სხვა ბაქტერიული ინფექციების პათოგენეზში. სწორედ ამიტომ ბიოფილმებზე კვლევების ჩასატარებლად *P.aeruginosa* ყველაზე ხშირად გამოიყენება, როგორც საკვლევ ორგანიზმი [34].

განვიხილოთ ეს ორი მიკრობული გვარი უფრო დეტალურად:

E.coli ბაქტერიული გვარის ზოგადი დახასიათება. *Escherichia coli* (*E.coli*) პირველად გამოყოფილ იქნა 1885 წელს ადამიანის მსხვილი ნაწლავიდან გერმანელი ბაქტერიოლოგის თეოდორ ეშერიხიას მიერ, რომელსაც მან *Bacterium coli* უწოდა, შემდგომ კი მისი აღმომჩენის პატივსაცემად სახელწოდება *Escherichia coli*-ით ჩაანაცვლეს [35, 36]. *E.coli* მიეკუთვნება ოჯახს *Enterobacteriaceae*, გვარს *Escherichia* – გრამ-უარყოფითი, 1,1-1,5X2,0-6,0 მკმ ზომის სწორი ჩხირისებრი ბაქტერიებია, ლაგდება ცალ-ცალკე ან წყვილებად. შტამთა უმრავლესობას გააჩნია კაფსულა ან მიკროკაფსულა. სპორებს არ წარმოქმნიან. გვხვდება მოძრავი და უძრავი შტამები; აერობები ან ფაკულტატური ანაერობებია. ტემპერატურული ოპტიუმია 37°C. ყოფენ ლაქტოზის მაფერმენტირებელ და არამაფერმენტირებელ ბაქტერიებად. ოქსიდაზა-უარყოფითია; კატალაზა-დადებითი. აღადგენენ ნიტრატებს; რძეს ადედებენ პეპტონიზაციის გარეშე. ეშერიხიები გამოყოფენ ბაქტერიცინებს – კოლიცინებს [37]

E.coli-ს ხშირად მოიხსენიებენ, როგორც ყველაზე კარგად შესწავლილ ორგანიზმს [38, 39, 40]. შტამების უმრავლესობა უვნებელია ადამიანისათვის, ზოგიერთი სეროტიპი ადამიანისთვის სარგებელის მომტანია, თუმცა ზოგიერთმა სეროტიპმა შეიძლება გამოიწვიოს სერიოზული მოწამვლა საკვების დაბინძურების გზით, კუჭ-ნაწლავის ინფექციები, საშარდე გზების ინფექციები და სხვა [35, 38]. *E.coli*-ს ცალკეული სეროვარები იწვევენ ენტერიტებს, პიელონეფრიტებს, ქოლერისტიტებს, პერიტონიტს,

სეპტიცემიას, მენინგიტს ბავშვებში, ქრილობის ინფექციას, საავადმყოფოს შიდა ინფექციებს და ა.შ. [41]. *E.coli*-იმ შეიძლება დააზიანოს ადამიანის სხვადასხვა ორგანოები და ქსოვილები. ყველაზე კარგად ცნობილი პათოგენური *E.coli* შტამია *E. coli* O157:H7, რომელიც წარმოქმნის შიგა ტოქსინს, მსგავსად სხვა პათოგენური *E.coli* შტამებისა [52, 53].

E.coli მყარ ნიადაგებზე წარმოქმნის ამობურცულ, შემღვრეულ, სწორკიდეებიან ან ოდნავ ტალღისებრკიდეებიან S-კოლონიებს ან ბრტყელ, მშრალ, არასწორკიდეებიან R-კოლონიებს. ზოგჯერ წარმოიქმნება ლორწოვანი M კოლონიები. თხიერ ნიადაგზე დიფუზიურად იზრდება. ჰისის ნიადაგებზე შეუძლია აირის წარმოქმნა. ენდოს ნიადაგზე ლაქტოზის მაფერმენტებელი ეშერიხიები წარმოქმნიან ჟოლოსფერ-წითელ კოლონიებს მეტალური ელფერით (ან მის გარეშე), ლაქტოზის არამაფერმენტებელი ეშერიხიები წარმოქმნიან ბაც-ვარდისფერ ან უფერულ მუქცენტრიან კოლონიებს; მაკ-კონკის ნიადაგზე – წითელ და უფერულ კოლონიებს; პლოსკირევის ნიადაგზე – წითელი ფერის მოყვითალო ელფერით და უფერულ კოლონიებს; შესაძლოა სრული ჰემოლიზი [61].

E. coli ბუნებრივად ბინადრობს თბილსისხლიანთა კუჭ-ნაწლავის ქვედა ნაწილში [38,41], შეუძლიათ სარგებელი მოუტანონ მათ პატრონს ვიტამინ K₂-ს წარმოქმნით [42] და პრევენცია მოახდინონ ნაწლავების კოლონიზაციისა პათოგენური ბაქტერიებით [41, 43, 44, 45]. პათოგენური სეროვარების გავრცელების ძირითად გზას ორალურ-ფეკალური გადაცემა წარმოადგენს.

E.coli შტამები ფართოდ გამოიყენება მიკრობიოლოგიაში, როგორც საკვლევი ორგანიზმები (მაგ.*E.coli* B, *E.coli* C, *E.coli* K-12 და სხვა). კულტივირებული შტამები კარგად ადაპტირებულია ლაბორატორიულ გარემოსთან და დაკარგული აქვთ უნარი ადამიანის ნაწლავებში კოლონიზების, ასევე ბევრ ლაბორატორიულ შტამს ბიოფილმების წარმოქმნის უნარიც აქვს დაკარგული [46, 47]. ეს თვისებები იცავს მიკრობებს ანტისხეულებისა და ქიმიური ნივთიერებების ზემოქმედებისგან მაგრამ მოითხოვს დიდი ენერგეტიკული და მატერიალური რესურსების ხარჯვას. ჯომუა

ლედერბერგმა და ედუარდ ტატუმ 1946 წელს პირველად აღწერეს ბაქტერიული კონიუგაციის მოვლენა, რისთვისაც მათ საკვლევ ობიექტად *E.coli* ბაქტერია გამოიყენეს [48, 49], ფაგის გენეტიკის შესწავლის პირველი ექსპერიმენტებიც სწორედ *E.coli* ბაქტერიის საშუალებით განხორციელდა [50], ადრეულ კვლევებში *E. coli* და T4 ფაგი იყო გამოყენებული გენის სტრუქტურის ტოპოგრაფიის შესასწავლად [51].

P.aeruginosa ბაქტერიული გვარის ზოგადი დახასიათება. *P.aeruginosa* კლინიკური მედიცინის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს. ამ მიკრობის მიმართ აღინიშნება ანტიბიოტიკო რეზისტენტობის სწრაფი ზრდა [58]. *P.aeruginosa* მიეკუთვნება პირობით პათოგენურ მიკროორგანიზმებს, რომელთათვისაც დამახასიათებელია მაღალი ბუნებრივი და შექმნილი რეზისტენტობა ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკების, ანტიმიკრობული ქიმიოთერაპიული საშუალებებისა და დეზინფექტანტების მიმართ [57]. *P.aeruginosa* ადამიანის ინფექციური დაავადებების ერთ-ერთი წამყვანი გამომწვევია, მათ წამყვანი როლი აკისრიათ ნოზოკომიალური პნევმონიის, უროლოგიური დაავადებების, ჩირქოვან-ქირურგიული ინფექციების ეტიოლოგიაში [54, 55, 56, 59], ყველაზე ხშირი გამომწვევია დამწვრობის დროს წარმოქმნილი ინფექციების და ხშირად იწვევს სამედიცინო ხელსაწყოების კოლონიზებას [60]. *P.aeruginosa* გამოწვეული ინფექციების რისკი მატულობს იმუნოდეფიციტის მქონე ავადმყოფებში და განსაკუთრებით ხშირად გვხვდება ამ მიკრობით გამოწვეული ინფექციები კისტური ფიბროზის მქონე პაციენტებში [56, 60].

Pseudomonas aeruginosa (ლურჯ-მწვანე ჩხირი) გრამ უარყოფითი, ჩხირის ფორმის (ზომით 1-5 მკმ - სიგრძე, 0.5-1 მკმ სიგანე), აერობული ბაქტერია, მიეკუთვნება კლასს - *Gammaproteobacteria*, ტიპს - *Proteobacteria*, ოჯახს - *Pseudomonadaceae* გვარს - *Pseudomonas*, სახეობას - *P.aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* წარმოადგენს პირობით-პათოგენურ მიკროორგანიზმებს, კატალაზა და ოქსიდაზა დადებითია, [61], *P.aeruginosa*-ს მიერ საკვებ ნიადაგზე წარმოქმნილი კოლონიებისათვის დამახასიათებელია ყურძნის მსგავსი სუნი. შერეული კულტურებიდან მისი იდენტიფიკაცია შესაძლებელია MacConkey-ის აგარზე (რამდენადაც ის არ არის ლაქტოზას მაფერმენტირებელი),

რომელიც ოქსიდაზა დადებითი იქნება. *P.aeruginosa* წარმოქმნის მოლურჯო-მომწვანო ფერის პიგმენტ პიოცენინს და მისთვის დამახასიათებელია 4-42°C ტემპერატურულ ინტერვალში ზრდა [61, 62]. ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30-37°C.

P.aeruginosa-ს ერთ-ერთი ყველაზე შემაშფოთებელი მახასიათებელია მისი დაბალი ანტიბიოტიკომგრძობელობა. ბუნებრივ რეზისტენტობასთან ერთად იგი სწრაფად ანვითარებს შეძენილ რეზისტენტობას ქრომოსომით კოდირებული გენების მუტაციების, ან ანტიბიოტიკორეზისტენტული დეტერმინანტების გენების ჰორიზონტალური გადატანის გზით. [63, 64].

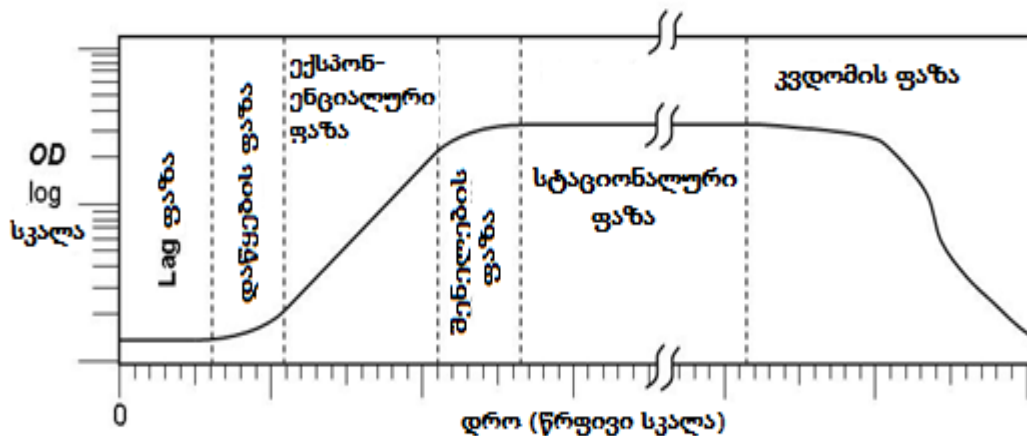
ამ მიკრობების ანტიბიოტიკების მიმართ მულტი-რეზისტენტობის განვითარების ერთ-ერთი განმსაზღვრელი ფაქტორი არის *P.aeruginosa*-ს უნარი წარმოქმნას სამგანზომილებიანი სტრუქტურები - ბიოფილმები. პათოგენური ბაქტერიები ბიოფილმების ფორმირების გზით ამცირებენ ანტიბიოტიკების ეფექტურ კონცენტრაციებს ბიოფილმების შიგნით და ამგვარად ფაქტობრივად რეზისტენტულნი ხდებიან ანტიბიოტიკების თერაპიული დოზების მიმართ [65].

P.aeruginosa-თი გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ ყველაზე ფართოდ გამოყენებული ანტიბიოტიკების ჯგუფია β-ლაქტამ ანტიბიოტიკები, თუმცა მათ მიმართ მიკრობი თავდაცვას ანხორციელებს მეტალო-ბეტა-ლაქტამაზას წარმოქმნით, რომელიც იწვევს β-ლაქტამ ანტიბიოტიკების დაშლას [66]. *Pseudomonas aeruginosa*-ს მულტი-რეზისტენტობა დაკავშირებულია სწორედ მეტალო-ბეტა-ლაქტამაზას აქტივობასთან. ანტიმიკრობული რეზისტენტობის გავრცელებაში დიდი წვლილი მიუძღვის ტრანსპოზონებს. ზოგიერთი ტრანსპოზონი არის ერთი, ან რამოდენიმე რეზისტენტობის მაკოდირებელი გენის მატარებელი, ასეთმა ტრანსპოზონმა შესაძლოა პატრონი უჯრედიდან გადაინაცვლოს სხვა უჯრედში და ამგვარად გამოიწვიოს ანტიბიოტიკების მიმართ მულტი-რეზისტენტობის სწრაფი გავრცელება [67, 68, 69]

1.2 ბაქტერიების გამრავლების ეტაპების მათემატიკური ანალიზი

ბაქტერიების გამრავლება ხდება უჯრედების ბინარული გაყოფის გზით. თუ უჯრედის გაყოფის პროცესში მუტაციებს ადგილი არ ექნება, შვილეული უჯრედები გენეტიკურად იდენტური იქნება საწყისი ბაქტერიული უჯრედის. ამგვარად, ბაქტერიის გამრავლების დროს ხდება ბაქტერიული უჯრედის „გაორმაგება“. თუმცა ორივე შვილეული უჯრედი შესაძლოა არ იყოს სიცოცხლისუნარიანი. იმ შემთხვევაში, როცა გამრავლების დროს ცოცხალი შვილეული ბაქტერიული უჯრედების რიცხვი ბაქტერიების საერთო რიცხვის საშუალო მნიშვნელობაზე მეტია, ბაქტერიული პოპულაცია განიცდის ექსპონენციალურ ზრდას.

ბაქტერიების ზრდის მრუდი იყოფა რამოდენიმე ეტაპად (ფაზად) [70, 71]: lag ფაზა, ზრდის დაწყების ფაზა, ექსპონენციალური ფაზა, შენელების ფაზა, სტაციონალური ფაზა, შენელების ფაზა, კვდომის ფაზა (იხ. ნახ. 1)



ნახ. 1. ბაქტერიის გამრავლების ეტაპები.

ბაქტერიების ზრდის გაზომვისა და ზრდის მრუდის ასაგებად (ბაქტერიების რიცხვის (N) დამოკიდებულება დროზე (t)), უნდა განვსაზღვროთ ბაქტერიების საწყისი რიცხვი (დროის საწყისი მომენტისათვის) და ბაქტერიების რიცხვი დროის გარკვეული ინტერვალის გასვლის შემდეგ. აღვნიშნოთ $N^{ნიმუში}$ -ით ბაქტერიების რიცხვი

მოცულობის (V) ერთეულში, მაშინ მივიღებთ შემდეგ ტოლობას: $N^{ნიმუში} = \frac{N}{V}$ (1), უჯრედების რიცხვის თანაფარდობას მოცულობაზე ეწოდება „უჯრედების სიმკვრივე“, ანუ „უჯრედების კონცენტრაცია“. (1) ტოლობა შეიძლება ასეც ჩაიწეროს [1]:

$$N^{ნიმუში} = \text{უჯრედების სიმკვრივე} \quad (2)$$

უჯრედების სიმკვრივის გაზომვა შესაძლებელია ოპტიკურიად სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით [70]. სპექტროფოტომეტრში მოთავსებულ ბაქტერიული კულტურის ნიმუშზე სინათლის სხივების დაცემისას ადგილი აქვს გაბნევას. რაც მეტია უჯრედების სიმკვრივე, მით მეტად განიბნევა სინათლე. თვალით გაბნევას აღვიქვამთ, როგორც სიმღვრივეს. ნიმუშში უჯრედების მატებასთან ერთად მატულობს მისი სიმღვრივე. გაბნევის ინტენსივობას, ანუ სიმღვრივეს უწოდებენ ოპტიკურ სიმკვრივეს (OD), რომელიც პროპორციულია ბაქტერიული უჯრედების სიმკვრივისა:

$$N^{ნიმუში} \sim OD \quad (3)$$

სინათლის გაბნევის ინტენსივობა, ანუ კულტურის OD დამოკიდებულია ნიმუშზე დაცემული სინათლის ტალღის სიგრძეზე. მოკლე ტალღის სიგრძის შემთხვევაში (მაგ. ლურჯი ფერის სინათლე) გაბნევა უფრო ძლიერია, ვიდრე გრძელი ტალღის სიგრძის შემთხვევაში (მაგ. წითელი ფერის სინათლე).

ბაქტერიების გამრავლება შეიძლება აღვწეროთ მათემატიკურად [70]. მოცემული Δt დროის ინტერვალში ბაქტერიების რიცხვის მატება (ახლად წარმოქმნილი ბაქტერიების რიცხვი) ΔN პროპორციული იქნება ბაქტერიების საერთო რიცხვისა:

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} \sim N,$$

ვინაიდან ახლად წარმოქმნილი ბაქტერიების რიცხვი მუდმივად მატულობს, ანუ N იზრდება მუდმივად, შეიძლება N -ის ცვლილება განვიხილოთ უსასრულოდ მცირე დროის ინტერვალში, ანუ: $\frac{dN}{dt} \sim N$

თუ შემოვიღებთ პროპორციულობის ფაქტორს - μ , რომელიც არის სპეციფიკური ზრდის სიხშირე, მივიღებთ ტოლობას:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

აქედან: $\frac{1}{N} dN = \mu dt$

μ მუდმივი სიდიდეა, ამიტომ ტოლობის გაინტეგრალებით მივიღებთ:

$$\int \frac{1}{N} dN = \mu \int dt, \text{ საიდანაც ვღებულობთ } \ln N = \mu t + \text{constant}$$

$t=0$ მომენტისათვის ბაქტერიების რიცხვს თუ აღვნიშნავთ N_0 -ით, მივიღებთ: $\ln N_0 = \text{constant}$, აქედან

$$\ln N = \mu t + \ln N_0,$$

$$\ln N - \ln N_0 = \mu t \quad (4)$$

საბოლოოდ კი ვღებულობთ:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (5)$$

იმ შემთხვევაში თუ გასული დროის მონაკვეთი t არის ბაქტერიების რიცხვის გაორმაგების დრო (t_d), რაც ნიშნავს რომ $N = 2N_0$, (1) ფორმულიდან მივიღებთ:

$$\ln \frac{2N_0}{N_0} = \mu t_d, \text{ საიდანაც } \mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

(4) ფორმულის საშუალებით შეიძლება განვსაზღვროთ μ -ს მნიშვნელობა ზრდის მრუდის ნებისმიერი ორი წერტილის ოპტიკური სიმკვრივის (OD) მნიშვნელობიდან. თუ გავითვალისწინებთ (3) დამოკიდებულებას, (4) ფორმულა ასეც შეიძლება ჩაიწეროს:

$$\ln OD - \ln OD_0 = \mu t$$

μ -ს განსაზღვრისათვის ამ ფორმულაში უნდა ჩავსვათ OD-ს ორ მნიშვნელობა ზრდის მრუდის (ფიგ. 1) ექსპონენციალური ფაზიდან OD₁ და OD₂, რომელთაც შეესაბამებათ დროები - t_1 და t_2 , მივიღებთ:

$$\ln OD_1 - \ln OD_0 = \mu t_1$$

$$\ln OD_2 - \ln OD_0 = \mu t_2$$

საიდანაც ვღებულობთ:

$$\mu = \frac{2,303(\lg OD_2 - \lg OD_1)}{(t_2 - t_1)}$$

1.3 ბაქტერიოფაგების ზოგადი მიმოხილვა, ბაქტერიული ვირუსების განვითარების ციკლი

მიკრობთა ანტიბიოტიკორეზისტენტობის ზრდამ, რეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციების სიმრავლემ და თანამედროვე მეთოდებით მათთან ბრძოლის სირთულემ მსოფლიო მედიკოსთა ინტერესი განაახლა ბიოლოგიური სამკურნალო-პროფილაქტიკური საშუალების, ბაქტერიოფაგის პრეპარატის მიმართ.

ფორმალურად ბაქტერიოფაგების აღმოჩენად მიიჩნევა მე-20 საუკუნის 10-იანი წლები, როდესაც გამოქვეყნდა პირველი პუბლიკაცია 1915 წელს ინგლისელი ბაქტერიოლოგის ფრედერიკ ტუორტის მიერ, ხოლო 1917 წელს კანადელი მეცნიერის ფელიქს დერელის მიერ. ტუორტი სწავლობდა ვირუსების ზრდას სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე, არაპათოგენური ვირუსების აღმოჩენის მიზნით. ექსპერიმენტების მსვლელობისას ადგილი ჰქონდა საკვები ნიადაგის (ფინჯნების) სტაფილოკოკებით დაბინძურებას. ტუორტმა შეამჩნია სტაფილოკოკურ კოლონიებზე უჩვეულო „მინისებრი“ არეები, რომელიც გადათესვის შემდეგ კარგავდა ზრდის უნარს და მათი შეტანა ჯანმრთელ კოლონიებში კვლავ იწვევდა მინისებრი არეების წარმოქმნას [72], ტუორტმა მისი დაკვირვებებით აღმოაჩინა ბაქტერიოფაგის არსებითი ნიშნები, თუმცა არ ემხრობოდა აზრს, რომ ეს იყო სიცოცხლის დამოუკიდებელი ფორმა, იგი აღნიშნავდა მის პუბლიკაციაში (1915 წ. ჟურნალი “The Lancet”), რომ მინისებრი არეების წარმოქმნელი აგენტი იყო ფერმენტი, რომელიც გამომუშავდებოდა ბაქტერიების მიერ [72, 73]. ბაქტერიოფაგების აღმოჩენა მეცნიერულად დასაბუთებული იქნა კანადელი ბაქტერიოლოგის ფელიქს დერელის მიერ, რომელიც მუშაობდა პარიზში, პასტერის ინსტიტუტში. ტუორტის აღმოჩენისგან დამოუკიდებლად დერელმა შენიშნა “უჩინარი დიზენტერიის ბაცილის ანტაგონისტის არსებობა”. მან დიზენტერიით დაავადებული ავადმყოფის ნაწლავებიდან გამოყო შიგელები, რომლებიც შეიცავდა ბაქტერიების ლიზისის უნარის მქონე აგენტს, რომელსაც “ბაქტერიოფაგი”, ანუ “ბაქტერიის მშთანთქმელი” უწოდა. ეს აღმოჩენა დერელმა პირველად გამოაქვეყნა 1917 წლის 3 სექტემბერს [74].

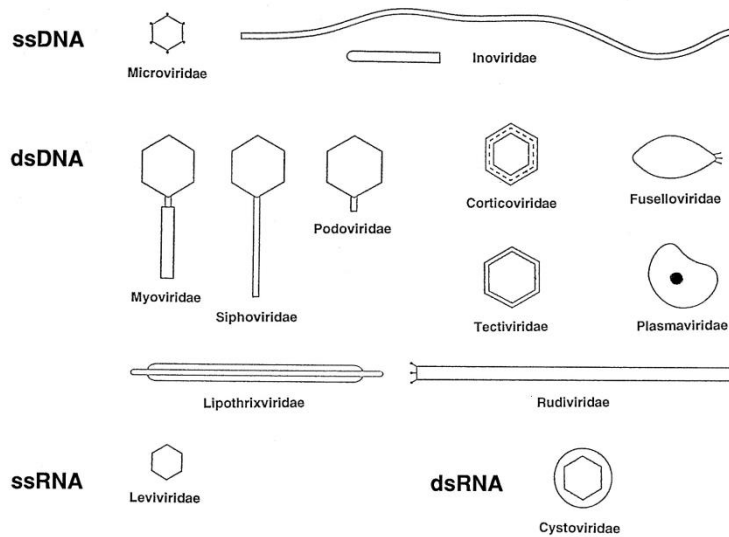
ბაქტერიოფაგების მიმართ სხვა მეცნიერებაც ავლენდნენ ინტერესს. ანტიბაქტერიულ ფენომენზე პირველი დაკვირვებები ეკუთვნის რუს ბაქტერიოლოგს ნიკოლაი გამალეას (1898 წ.), მან შეამჩნია, რომ ციმბირის წყლულის გამომწვევი ბაცილების ფილტრატი იწვევდა ამ მიკროორგანიზმების ახალი კულტურების ლიზისს [75],

ბაქტერიული კულტურების ლიზისის ფენომენზე დაკვირვებები ჰქონდათ ასევე მეცნიერებს - ჰანკინს 1869 წელს, კრუსსა და პანსისნის 1895 წელს, ემერიჰს და ლოუს 1897 წელს [76, 77], ასევე ქართველ მეცნიერს გ. ელიავას, რომელმაც აღნიშნა *Vibrio cholerae*-ს ბაქტერიების თვითლიზისის მოვლენა 1917 წელს. თუმცა დერელი იყო პირველი ვინც სწორად შეაფასა ბაქტერიოფაგის ფენომენის ბიოლოგიური არსი. მისი ჰიპოთეზის თანახმად, ბაქტერიოფაგი წარმოადგენს ბაქტერიის ვირუსს, რომელიც აინფიცირებს ბაქტერიას, მრავლდება მის შიგნით და იწვევს ბაქტერიის ლიზისს [78, 79]. ბაქტერიოფაგების მიმართ მეცნიერთა ინტერესი გააღრმავა მისმა მრავალმხრივმა გამოყენებამ. ბაქტერიოფაგების საშუალებით შესაძლებელი გახდა ფუნდამენტური მოლეკულური ბიოლოგიის განვითარება, რესტრიქციული ფერმენტების იდენტიფიკაცია, გენეტიკის საფუძვლების, ბაქტერიების ევოლუციის შესწავლა. ისინი წარმოადგენენ როგორც დიაგნოსტიკურ საშუალებას, ასევე მათი გამოყენება შესაძლებელია თერაპიული და პროფილაქტიკური მიზნით. ფაგებისა და მათი მასპინძელი უჯრედების ურთიერთქმედების საშუალებით შესაძლებელი გახდა მიკრობული სისტემების შესწავლა და სხვა.

ბაქტერიოფაგები ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს წარმოადგენს. ბიოსფეროში საშუალოდ 10^{31} ფაგის ნაწილაკია [80]. მათი აღმოჩენა შესაძლებელია თითქმის ყველგან სადაც ბაქტერიაა - მაგ. ნიადაგში, ჰაერში, ოკეანეში, ჩამდინარე და სასმელ წყალში, ადამიანის, ცხოველის ნაწლავებში, მცენარეების ზედაპირებზე.

ბაქტერიოფაგის სტრუქტურა: ბაქტერიოფაგები შედგებიან ნუკლეინის მჟავებსა და ცილებსაგან. ფაგის ნუკლეინის მჟავა შეიძლება იყოს დნმ, ან რნმ სხვადასხვა ფორმით. ფაგების ნუკლეინის მჟავები ხშირად შეიცავენ უჩვეულო, ან მოდიფიცირებულ ფუძეებს. მოდიფიცირებული ფუძეები იცავენ ფაგის ნუკლეინის მჟავას ნუკლეაზებისგან, რომლებიც იწვევენ პატრონი ბაქტერიული უჯრედის ნუკლეინის

მჟავას დარღვევას ფაგით ინფიცირების დროს. ფაგის ნუკლეინის მჟავის ზომა დამოკიდებულია ფაგზე. ზოგ ფაგს აქვთ მხოლოდ 3-5 სამუალო ზომის გენური პროდუქტის მაკოდირებელი ნუკლეინის მჟავა, ზოგმა ფაგებმა კი შეიძლება მოახდინოს 100, ან მეტი გენური პროდუქტის კოდირება. რაც შეეხება ცილებს, ზოგ ფაგში გვხვდება მხოლოდ ერთი, ან ორი სახის ცილა, მაშინ როცა ზოგ ფაგებში შეიძლება იყოს ბევრი განსხვავებული სახის ცილა. ცილები მონაწილეობას დებულობენ ინფიცირებაში და ასევე ფაგის ნუკლეინის მჟავას იცავენ გარემო ზემოქმედებისგან. თანამედროვე კლასიფიკაციით (1992 ICTV) ფაგები დაყოფილია 13 ოჯახად [77] (ფიგ. 1). ფაგების კლასიფიკაცია დამყარებულია შემდეგი კრიტერიუმების შესწავლაზე: ვირიონის ულტრასტრუქტურა: წანაზრდიანი, კუბური, ჰელიკალური, ფილამენტური ან პლეომორფული; ნუკლეინის მჟავას ტიპი; ქიმიური შემადგენლობა და ანტიგენური თვისებები; მოლეკულური მასა; მოქმედების სპექტრი. წანაზრდიანი ფაგები შესწავლილი ფაგების ყველაზე დიდ ჯგუფს წარმოადგენს (96%) და სწორედ ამ ფაგებს გამოიყენებენ ფაგოთერაპიაში. ისინი იყოფიან სამ ოჯახად: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae (ნახ. 2) [77, 81, 82, 83].



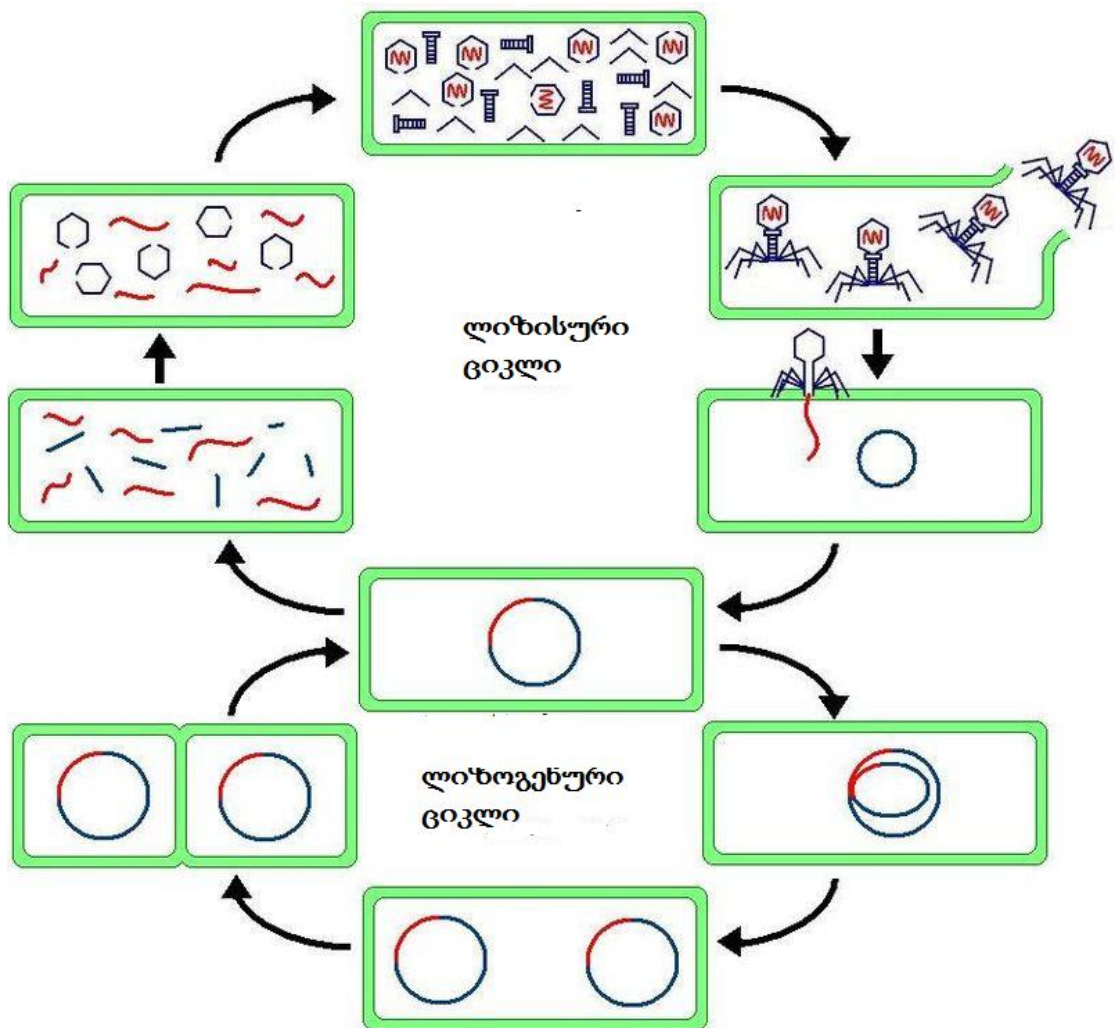
ნახ. 2. ბაქტერიოფაგების სხვადასხვა ოჯახების მორფოლოგია - სქემატური გამოსახულება.

Myoviridae: ფაგები, რომლებსაც აქვს გრძელი კომპლექსური კუდი. კუდი შედგება ცენტრალური ღერძისაგან და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისაგან. ამ ოჯახის წარმომადგენლებია: T2, T4, P1,P2, Mu ფაგები და სხვა [77, 81].

Siphoviridae: ფაგები გრძელი, მოქნილი კუდით, რომლის შალითას არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი. ტიპური წარმომადგენლებია: T1, T5, λ ფაგები და სხვა.

Podoviridae: კუდიანი ფაგებისთვის დამახასიათებელია მოკლე კუდი. ტიპური წარმომადგენლებია: P22, T7 ფაგები და სხვა [77, 81].

ბაქტერიის ბაქტერიოფაგით ინფიცირება: ბაქტერიოფაგისა და ბაქტერიულ უჯრედის ურთიერთქმედება მკაცრად სპეციფიურია, ანუ ისინი ზემოქმედებენ მხოლოდ მათ სმიზნე პატრონ ბაქტერიულ უჯრედებზე. მათ არ შეუძლიათ ადამიანის, ან სხვა რომელიმე ეუკარიოტული უჯრედების ინფიცირება. გამოყოფენ ბაქტერიოფაგების განვითარების ორი ციკლს: ლიზისურს და ზომიერს (ნახ. 3).



ნახ. 3. ბაქტერიოფაგის განვითარების ორი ციკლი - ლიზისური და ზომიერი (ლიზოგენური) ციკლი

განვითარების ლიზისურ ციკლს ყოველთვის გადის ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები. ლიზისურ ციკლი შედგება შემდეგი ეტაპებისგან: ადსორბცია; ვირუსული გენომის შესვლა ბაქტერიულ უჯრედში; ფაგის რეპროდუქცია; მასპინძელი უჯრედის ლიზისი და ახლად წარმოქმნილი ვირუსების გამოთავისუფლება [84].

რაც შეეხება ლიზოგენური ციკლს, ამ ციკლს გადიან ზომიერი ფაგები [84]. ლიზოგენური, ანუ ზომიერი არის ფაგი, რომელსაც შეუძლია ან გამრავლდეს უჯრედის შიგნით, ან უჯრედში იმყოფებოდეს უმოქმედო (ლატენტურ) მდგომარეობაში. ლატენტურ მდგომარეობაში ფაგის გენომი იმყოფება რეპრესირებულ მდგომარეობაში. ფაგის დნმ-ს ასეთ მდგომარეობაში უწოდებენ პროფაგს, რადგანაც ეს არ არის ფაგი, მაგრამ აქვს პოტენციალი რომ წარმოქმნას ფაგი. უმრავლეს შემთხვევაში ფაგის დნმ ინტეგრირდება პატრონი უჯრედის ქრომოსომაში, ზოგ შემთხვევაში პროფაგი წარმოდგენილია პლაზმიდის სახით და ასე გადაეცემა შვილეულ უჯრედებს. პროფაგის მატარებელი უჯრედები ზიანს არ განიცდიან მისი არსებობით და ლიზოგენური მდგომარეობა შეიძლება შენარჩუნდეს განუაზღვრელი დროით. უჯრედს, რომელიც პროფაგის მატარებელია, ლიზოგენს უწოდებენ. ლიზოგენური მდგომარეობა ნებისმიერ დროს შეიძლება შეწყდეს, ლიზოგენის არახელსაყრელ პირობებში მოხვედრის გამო. ამ პროცესს უწოდებენ ინდუცირებას. არასელსაყრელი პირობები, რომლებიც ლიზოგენური მდგომარეობის შეწყვეტას იწვევენ, შეიძლება იყოს გამოშრობა, ულტრაიისფერი, ან მაიონიზირებელი დასხივება, მუტაგენური ნივთიერებების ზემოქმედება და სხვა. ამის შემდეგ ხდება ფაგის გენების ექსპრესია, რასაც მოყვება ფაგის ახალი პოპულაციის წარმოქმნა.

თავი 1.4. ანტიბიოტიკრბი, როგორც ბაქტერიებთან ბრძოლის საშუალება

1929 წ-ს შოტლანდიელი მეცნიერის ა.ფლემინგის მიერ აღმოჩენილ და გამოყოფილი იქნა სოკო *Penicillium notatum*-იდან ქიმიური ნივთიერება, რომელიც აჩერებდა სტაფილოკოკების ზრდას [1, 85, 86]. აღმოჩენილ ნივთიერებას დაარქვეს

პენიცილინი, თუმცა მისი სტაბილური სახით მიღება და გასუფთავება მოხდა მოგვიანებით 1940 წ. ინგლისში ხ. ფლორისა და ე.ჩეინის მიერ. ამის შემდგომ დაიწყო პენიცილინის წარმოება, მისი ფარმაკოლოგიური სახით გამოშვება და გაყიდვა. 1945 წ. ფლემინგმა, ჩეინმა და ფლორმა მიიღეს ნობელის პრემია პენიცილინის აღმოჩენისა და მისი წარმოებისათვის [87, 88, 89]. ტერმინი “ანტიბიოტიკი” შემოთავაზებული იქნა გერმანელი მეცნიერის სელმან ვაქსმანის მიერ 1942 წ-ს, რომელმაც აღნიშნავს მიკროორგანიზმების მიერ პროდუცირებულ ბუნებრივი ნივთიერებებს, რომელთაც უნარი აქვთ მიკრობების ზრდის დათრგუნვისა (ბაქტერიოსტატიკური მოქმედება) ან მიკრობების დაღუპვის გამოწვევა (ბაქტერიოციდული მოქმედება) [92].

ანტიბიოტიკებს წარმოება ძირითადად ხდება სოკო ასპერგილუსის და აქტინომიცეტების რიგის წარმომადგენლებისგან და ასევე ზოგიერთი ბაქტერიებისგან [90, 91].

ანტიბიოტიკთა სიაში პირველ ადგილზეა პენიცილინი [93]. ის ეფექტურია უმეტესად გრამ დადებითი ბაქტერიების წინააღმდეგ. პენიცილინი დღესდღეობით ცნობილი ანტიბიოტიკებიდან ყველაზე ნაკლებად ტოქსურია, თუმცა მასაც გააჩნია გვერდითი მოვლენები: შესაძლებელია ალერგიული რეაქციების განვითარება, ვინაიდან წარმოადგენს ძლიერ სენსიბილიზატორს, პენიცილინს შეუძლია დიარეის, გრანულოციტოპენიის გამოწვევა და მაღალი დოზით მიღების შემთხვევაში აზიანებს ცენტრალურ ნერვულ სისტემას [94, 95]. კლინიკაში გამოიყენება სტრეპტო, მენინგო, პნევმო, გონოკოკების, აქტინომიცეტების, კლოსტრიდიების, სპიროქეტების წინააღმდეგ. პენიცილინის აღმოჩენის და მისი ქიმიური ფორმულის გაშიფვრის შემდეგ, სხვადასხვა რადიკალების დამატებით მისგან ნაწარმოები იქნა უამრავი სხვა ანტიბიოტიკი, რომელიც დღეს ერთიანდება ბეტა-ლაქტამების კლასის სახელწოდებით და მოიცავს ყველა ტიპის პენიცილინს, ამოქსაცილინს, ოქსაცილინს და სხვ.

ქლორომიცეტინი [96] - იგივე ქლორამფენიკოლი, მოქმედებს გრამ უარყოფით ბაქტერიებზე, გამოიყენება სალმონელოზის, ჰემოფილუსის, ანაერობული და შერეული ინფექციის, სხვადასხვა რიკეტსიული და ქლამიდიური ინფექციების სამკურნალოდ. მისი გვერდითი მოვლენებია: გასტროენტეროლოგიური დარღვევები, სისხლის წითელი

უჯრედების დესტრუქცია, ანემია, იშვიათად აღინიშნება ძვლის ტვინის ფუნქციის დარღვევები და შედეგად აპლასტიური ანემიის განვითარება.

ტეტრაციკლინები და აქტინომიცინები [97] – ასევე სტრუპტომიცეტების წარმოებული, ახასიათებთ ბაქტერიოსტატიკური მოქმედება, გამოირჩევიან მოქმედების ფართო სპექტრით და დაბალი ტოქსიურობით. გამოიყენებიან შიგელების, ვიბრიოების მიერ გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ და სხვა. სტრუპტომიცინებთან კომბინაციაში იხმარებიან ასევე ბრუცელების, იერსინიას და ნოკარდიული ინფექციების დროსაც.

სულფანილამიდები [98] – წარმოადგენს სინთეზურ პრეპარატს ბაქტერიოსტატიკური მოქმედების ფართო სპექტრით. სულფანილამიდები ეფექტურია უმეტესობა გრამ დადებითი და გრამ უარყოფითი ბაქტერიების მიმართ. სულფანილამიდები გამოიყენება: საშარდე მილების ინფექციების, ნოკარდიოზების, ტოქსოპლაზმოზის სამკურნალოდ, მენინგოკოკური ინფექციების პროფილაქტიკისათვის. ამ ანტიბიოტიკებით მკურნალობისას აღსანიშნავია შემდეგი გვერდითი მოვლენები: კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის დაზიანება, ალერგიული რეაქციები, თავის ტკივილები, პერიფერიული ნევრიტები და სხვა.

1.5 ანტიბაქტერიული აგენტების მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციის განსაზღვრის გზები

მიკრობიოლოგიაში მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია (MIC) არის ანტიმიკრობული აგენტის ის უმცირესი კონცენტრაცია, რომელიც იწვევს ბაქტერიის ხილული ზრდის შეჩერებას (სხვა სიტყვებით, ის უმცირესი კონცენტრაცია, რომელსაც ჯერ კიდევ ახასიათებს ანტიბაქტერიული აქტივობა).

მინიმალური ინჰიბიტორული კონცენტრაცია შეიძლება განისაზღვროს მიკროორგანიზმების კულტივირებით თხევად საკვებ ნიადაგზე, ან მყარი საკვები ნიადაგის შემცველ ფინჯნებზე [99, 100, 101]. რაც უფრო მცირეა MIC-ის მნიშვნელობა მით ნაკლები კონცენტრაციის წამალი არის საჭირო მიკრობული ორგანიზმის ზრდის შესაჩერებლად. მცირე MIC-ის მქონე წამლები ითვლებიან მაღალი ეფექტურობის მქონე ანტიმიკრობულ აგენტებად.

განვიხილოთ MIC-ის განსაზღვრის რამოდენიმე გზა:

განზავების მეთოდი - ამ მეთოდით მიკროორგანიზმების ზრდის ტესტირება ხდება აგარის ფინჯნებზე (აგარის განზავებები), ან ბულიონიან სინჯარებში (ბულიონის განზავებები), რომლებიც შეიცავენ სხვადასხვა კონცენტრაციის ანტიმიკრობულ აგენტს. მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია იქნება ანტიმიკრობული აგენტის უმცირესი კონცენტრაცია, რომელიც გამოიწვევს მიკროორგანიზმის ხილული ზრდის შეჩერებას განსაზღვრული დროის მონაკვეთში, წინასწარ განსაზღვრულ ინ ვიტრო პირობებში. MIC-ის განსაზღვრა აუცილებელია მკურნალი ექიმისათვის, სწორი მკურნალობის დანიშნისათვის [99, 100].

ანტიმიკრობული წამლების MIC-ის დადგენის სტანდარტული მეთოდი დროის მხრივ ძალზედ შრომატევადია და ამასთან რუტინულად არ ტარდება. როლინსონი და რასელი (1972) აღწერენ მგრძნობელობის დადგენის მეთოდს ცნობილი რაოდენობის წამლით გაჟღენთილი ფილტრის ქაღალდების გამოყენებით, წამლის გავრცელება ხდება აგარის ზედა ფენაზე [101]. ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა წამლის მგრძნობელობის რაოდენობრივი განსაზღვრისა რუტინულ მიკრობიოლოგიაში და მოიხსენიება როგორც ქაღალდით დიფუზიის მეთოდი.

დისკო-დიფუზიური მეთოდი - Kirby-Bauer-ის, ანუ დისკო-დიფუზიური მეთოდი - ამ მეთოდში გამოიყენებენ დისკებს, რომლებიც შეიცავენ წამლის (ანტიბიოტიკის) განსაზღვრულ კონცენტრაციას. დისკებს ათავსებენ ბაქტერიების შემცველ აგარის ფინჯანზე და შემდეგ ათავსებენ თერმოსტატში საინკუბაციოდ. ინკუბაციის დროის გასვლის შემდეგ აგარის ზედაპირზე დისკების გარშემო ჩნდება ზონა, სადაც ბაქტერიამ ვერ შეძლო გაზრდა. ამ ზონას ინჰიბირების ზონას უწოდებენ და წამლის მიმართ მგრძნობელობაც ზონის დიამეტრის საშუალებით განისაზღვრება [101].

1.6 ფაგოთერაპია

ბაქტეროფაგების აღმოაჩინისთანავე, მათ ბაქტერიული ინფექციების სწინააღმდეგო პოტენციურად ძლიერ სამკურნალო საშუალებად თვლიდნენ და იყენებდნენ თერაპიული მიზნით ანტიბიოტიკების ერის დაწყებამდე [102, 106].

ფაგოთერაპიის პრაქტიკაში გამოყენება პირველად შემოთავაზებული იყო დერელის მიერ. 1919 წელს დერელმა პირველად წარმატებით გამოიყენა ბაქტერიოფაგები დიზენტერიით დაავადებულ ავადმყოფებში [103]. მის მიერ დაარსებულ იქნა ლაბორატორია, რომელიც აწარმოებდა სამკურნალო კომერციულ ბაქტერიოფაგის პრეპარატებს: Bacte-coli-phage, Bacte-rhino-phage, bacte-intesti-phage, Bacte-pyophage, Bacte-staphy-phage. XX საუკუნის 20-30-იან წლებში ფაგების მიმართ ინტერესი აღმოცენდა ამერიკის შეერთებულ შტატებშიც [10]. ამერიკაში ერთ-ერთი პირველი კლინიკური კვლევები ფაგის გამოყენებისა ჩატარებულ იქნა მიჩიგანის ჯანდაცვის დეპარტამენტის მიერ, ქრონიკული ფურუნკულოზით დაავადებულ 208 პაციენტზე. მკურნალობის დადებითი შედეგი მიღწეული იქნა პაციენტების 97%-ში [10] აღწერილია აშშ-ში ფაგების წარმატებით გამოყენების შემთხვევები სტაფილოკოკური სეპტიცემიისა და მენინგიტის დროს. 1930 წლიდან რამდენიმე ცნობილი ამერიკული ფარმაცევტული კომპანია დაინტერესდა ფაგის პრეპარატების წარმოებით. მაგ. კომპანია Eli Lilly აწარმოებდა სტერილურ-გაფილტრულ ფაგოლიზატებს: Staphylo-lysate, Colo-lysate, Ento-lysate, Neiso-lysate - აბსცესების, ჩირქოვანი ჭრილობების, ვაგინიტის, მასტოიდიტის და რესპირატორული ინფექციების სამკურნალოდ. ჩატარებული კლინიკური კვლევები ადასტურებდა, რომ ფაგების გამოყენება სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების სამკურნალოდ იყო ძალიან უსაფრთხო, მაგრამ მიუხედავად ამისა, ანტიბიოტიკების გამოჩენისთანავე, რომლის ეფექტური გამოყენებაც შეიძლებოდა ფართო სპექტრის პათოგენური ბაქტერიების წინააღმდეგ, როგორც აშშ-ში, ისე დასავლეთ ევროპაში ბაქტერიოფაგები თანდათანობით მოხმარებიდან ამოიღეს [10]. თუმცა ფაგოთერაპიის მიმართ ინტერესი არ შეუწყვეტიათ ყოფილ საბჭოთა კავშირის და აღმოსავლეთ ევროპის ქვეყნებში, [9, 10, 104, 105, 106, 107, 108]. სხვადასხვა ქვეყნის რამდენიმე ინსტიტუტი აქტიურად იყო ჩართული ფაგების კვლევასა და წარმოებაში, ამ ინსტიტუტებიდან მნიშვნელოვანია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი საქართველოში და ჰირსოფილდის იმუნოლოგიისა და ექსპერიმენტული თერაპიის ინსტიტუტი ვროცლავში, პოლონეთში.

გიორგი ელიავას მიერ 1923 წ. საქართველოში დაარსდა ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის (ბმვ) ინსტიტუტი. ინსტიტუტის დაარსების საქმეში დიდი წვლილი ეკუთვნის დერელს. გიორგი ელიავას სახელობის ბმვ ინსტიტუტში ბაქტერიული პათოგენების საწინააღმდეგო მრავალი ფაგი იქნა გამოყოფილი და შესწავლილი, რომელიც ყოფილ საბჭოთა კავშირის მამულებით ფართოდ გამოიყენებოდა სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისა და პროფილაქტიკისათვის [109, 110, 111].

XX საუკუნის 80-იანი წლებიდან ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული შტამების წარმოქმნამ და გავრცელებამ, განაპირობა ანტიბიოტიკების ალტერნატიული საშუალებების ძიების აუცილებლობა, რის შედეგადაც განახლდა ინტერესი ბაქტერიოფაგების მიმართ. დღეისათვის მთელ მსოფლიოში ტარდება ამ მიმართულებით მრავალრიცხოვანი კვლევები [112, 113, 114].

ექსპერიმენტული ნაწილი

2. გამოყენებული მასალები და მეთოდები

2.1 გამოყენებული მასალები

2.1.1 ბაქტერიული შტამები, ფაგები, ანტიბიოტიკები

მუშაობის პროცესში გამოყენებული იყო შემდეგი ბაქტერიული შტამები:

E.coli MG1655; *E.coli K12*; *E.coli C* - შტამები, რომლებიც T4 , T5 , T7, DDVI, P1 ფაგების პატრონ უჯრედებია.

E.coli TD 2158 - შტამი წარმოადგენს HK 620 ბაქტერიოფაგის პატრონ უჯრედს.

E.coli LCB6183 - წარმოადგენს *E.coli MG1655* შტამს, რომელიც ქრომოსომაში შეიცავს GFP გენს.

E.coliMG1655 ApR pPY98 - წარმოადგენს *E.coli MG1655* შტამს, რომელიც შეიცავს *pPY98* პლაზმიდს. არის ampicillin-ის მიმართ რეზისტენტული - ეს შტამი შერჩეულ იქნა მუტაგენეზის შესასწავლად, ამავე მიზნით შერჩეულ იქნა შტამი *E.coliMG1655 CI – MG1655 attl::ci(Ind-)-tet#C1 leading Dara::FRT DmetRE::FRT*.

კვლევაში ასევე გამოვიყენეთ ბიოფილმების წარმომქმნელი ბაქტერიული შტამები:

ველური ტიპის - *P.aeruginosa 01-PAO1* და კლინიკური *P.aeruginosa* შტამები: 22101; 22369; 22270; 22345; 27095; 27297; 22272; 8647; 8640; 8710; 8681.

მუშაობის პროცესში გამოყენებული იყო შემდეგი ბაქტერიოფაგები:

პოლიკომპონენტური, კომბინირებული პრეპარატი – პიობაქტერიოფაგი. პრეპარატი წარმოადგენს სტაფილოკოკური, სტრეპტოკოკური, პათოგენური ნაწლავის ჩხირის, ფსევდომონა აეროგინოზას და პროტეუსის ბაქტერიების ფაგოლიზატის სტერილურ ფილტრატს. პრეპარატის სპეციფიკური აქტივობა აპელმანის მეთოდით – 10^{-5} , ხოლო ტიტრი გრაციას ორშრიანი მეთოდით - 1×10^7 pfu/ml

T4 , T5 , T7, DDVI – ვირულენტური ფაგები.

HK 620, P1 – ზომიერი ფაგები.

ანტიბიოტიკები: ამპიცილინი, გენტამიცინი, ტეტრაციკლინი, ქლორამფენიკოლი, კანამიცინი, სპექტინომიცინი

2.1.2 კულტურებზე მუშაობისას გამოყენებული ხსნარები და საკვები ნიადაგები

კულტურებზე მუშაობისას გამოყენებული საკვები ნიადაგები:

1. Luria Broth;
2. Luria agar;
3. Endo Agar;
4. Muller-Hinton Agar;

კვლევებში გამოყენებული ხსნარები:

1. სპირტი (70%, 95%)
2. ფიზიოლოგიური ხსნარი (NaCl 0,9%)
3. კრისტალური იისფერი (0,1 %)
4. გლიცეროლი

2.2 კვლევებში გამოყენებული ფიზიკური მეთოდები

2.2.1 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი

კვლევისთვის გამოვიყენეთ მიკროფინჯნების სპექტროფოტომეტრი - infinite M200 ბაქტერიული უჯრედების კონცენტრაციის დროში ცვლილებაზე დასაკვირვებლად (ნახ.4).მეთოდი საშუალებას იძლევა განისაზღვროს ბაქტერიის ზრდა საკვები ბულიონის სიმღვრივის, ანუ მისი ოპტიკური სიმკვრივის გაზომვით დროის გარკვეულ ინტერვალებში [115, 116, 117].

სპექტროფოტომეტრის მოქმედება დამყარებულია შემდეგ პრინციპზე: გარკვეული (მაგ. 600nm) ტალღის სიგრძის სინათლე ეჯახება საკვლევ ნაწილაკს, კერძოდ ბაქტერიულ უჯრედს, რა დროსაც ხდება სინათლის გაბნევა. უჯრედზე გაბნეული სინათლის ინტენსივობა გამოისახება რელეის გაბნევის ფორმულით (i) და აღირიცხება სპექტროფოტომეტრის მიერ [115, 116]. როგორც ფორმულიდან ჩანს, გაბნეული სინათლის ინტენსივობა დამოკიდებულია დაცემული სინათლის ტალღის სიგრძეზე, გაბნევის კუთხეზე, ნაწილაკის (ბაქტერიის) ზომაზე, ნაწილაკამდე მანძილზე და ნაწილაკის რეფრაქციის ინდექსზე [118].

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6 \quad (i)$$

სადაც:

I - დაცემული სინათლის ინტენსივობა

I_0 - გამოსული სინათლის ინტენსივობა

R - ნაწილაკამდე მანძილი

λ - დაცემული სინათლის ტალღის სიგრძე

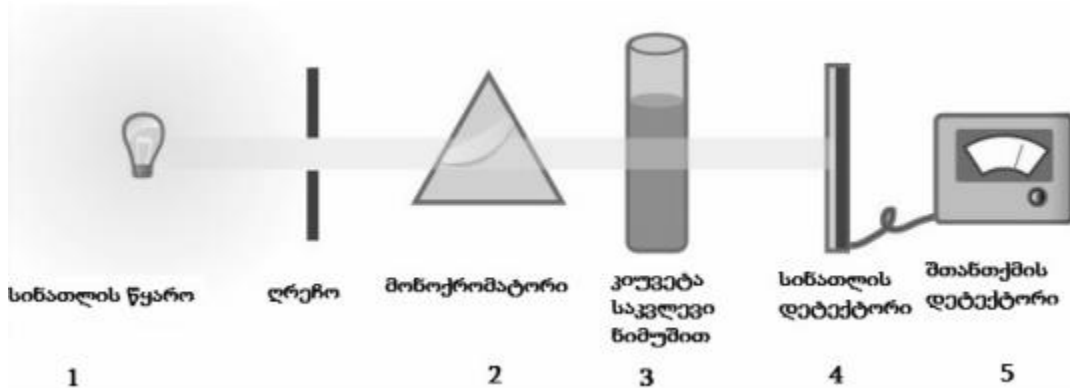
θ - გაბნევის კუთხე

n - ნაწილაკის რეფრაქციის ინდექსი

სინათლის ინტენსივობა და ოპტიკური სიმკვირვე დაკავშირებულია შემდეგი ფორმულით:

$$OD = \lg \frac{I}{I_0}$$

ნახ. 3-ზე წარმოდგენილია სპექტროფოტომეტრის პრინციპული სქემა:

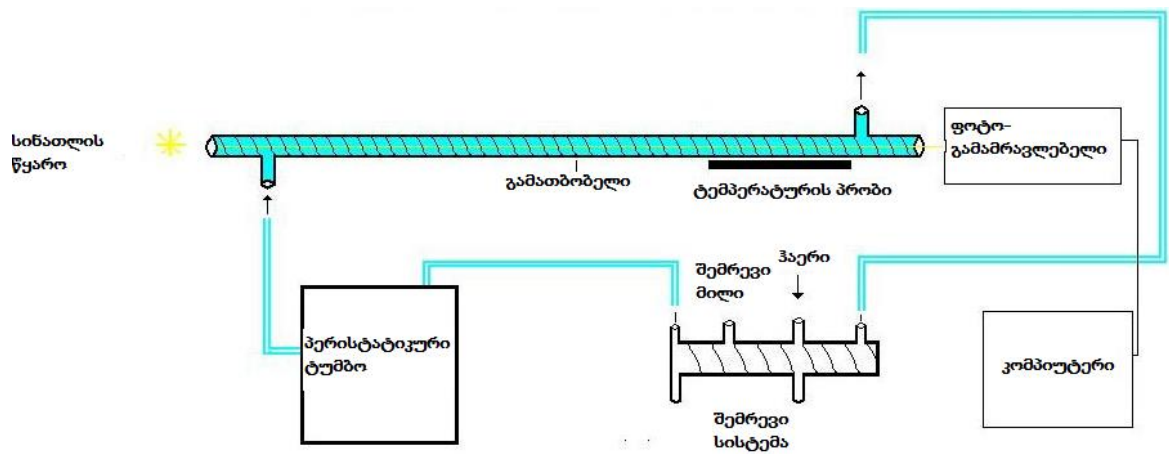


ნახ. 4. სპექტროფოტომეტრის პრინციპული სქემა: 1- სინათლისწყარო 2- მონოქრომატორი 3-კიუვეტა საკვლევი ნიმუშით 4- სინათლის ინტენსივობის დეტექტორი 5- სინათლის ინტენსივობის გაზომვის ელექტრონული მოწყობილობა.

2.2.2 ტურბიდიმეტრული მეთოდი

ტურბიდიმეტრული მეთოდის მეშვეობით შესაძლებელია დამზერილი იყოს უწყვეტ დროის რეჟიმში უჯრედების გამრავლების პროცესი. ჩვენს მიერ უნივერსიტეტში, ბიოფიზიკის ლაბორატორიაში აგებულია/მოდიფიცირებულია ხსნარების სიმღვრივის საზომი მგრძნობიარე დანადგარი, რომელიც შექმნილი იქნა სპეციალურად, ბაქტერიების (ზოგადად უჯრედების) გამრავლების პროცესზე უწყვეტ დროით რეჟიმში დასამზერად (ნახ. 5). დანადგარში საკვები გარემო რომ იყოს ერთგვაროვანი, პერისტალტიკური ტუმბო საკვებ სითხეს ამომრავებს ციკლურ რეჟიმში, ხოლო ბაქტერიების გამრავლებისათვის ხელსაყრელი ტემპერატურა საკვების თერმოსტატირებით მიიღწევა (ყველა ექსპერიმენტი ჩატარებულია 37°C ტემპერატურაზე). სინათლის წყაროდ გამოყენებულია ლურჯი სინათლე, რომელიც გადის სამუშაო მოცულობაში (10 სმ სიგრძის მინის მილი), მილის ბოლოში

მოთავსებულია სინათლის მიმართ მგრძობიარე ფოტოგამამრავლებელი, რომელიც დაკავშირებულია კომპიუტერთან, სადაც ხდება მონაცემების ჩაწერა [119, 120].

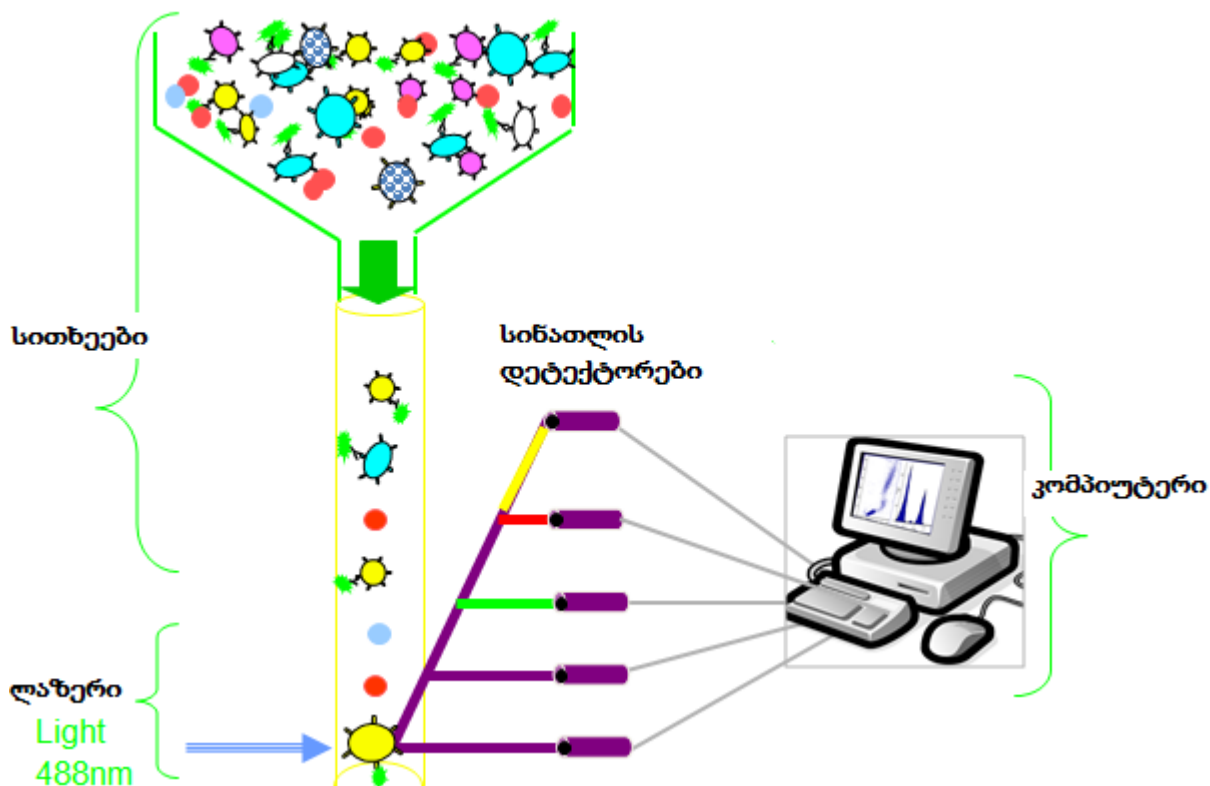


ნახ. 5. ტურბიდიმეტრის პრინციპიალური სქემა.

2.2.3 გამდინარე ციტომეტრული მეთოდი

გამდინარე ციტომეტრია - თანამედროვე ტექნოლოგია, რომლის საშუალებითაც შეიძლება გავანალიზოთ და დავახასიათოთ უჯრედები [92]. წარმოდგენილ კვლევაში გამოვიყენეთ Apogee Flow Systems-ის (UK) გამდინარე ციტომეტრით, რომელიც აღჭურვილია არგონის იონური ლაზერით (ტალღის სიგრძით 488 nm) და სპეციფიკური ფლუორესცენტული ფილტრებით (მწვანე (Gn): 535/35 nm, წარინჯისფერი (Or): 585/20 nm, წითელი (Rd): >610 nm, ხოლო მიღებული გაზომვების გაანალიზებას ვახდენდით FlowJoV10 პროგრამით (TreeStarInc). ამ ტექნოლოგიის საშუალებით შეიძლება უჯრედების ფიზიკური მახასიათებლების, კერძოდ უჯრედების ზომის, ფორმის, გრანულარობის, ფლუორესცენციის აღრიცხვა და გაანალიზება. ამ ტექნოლოგიით შესაძლებელია ნებისმიერი 0,2 – 50 მკმ ზომის ნაწილაკების, უჯრედების სუსპენზიის შესწავლა. იგი შეიცავს ლაზერს, ლინზების სისტემას, გამდინარე ნაკადის სისტემას, დეტექტორებს, ფოტოანალიზატორს, რომელსაც ფოტოსიგნალი გადაყავს ელექტრონულ

ფორმაში და სიგნალის პროცესორებს, რომელიც სიგნალის შემდგომ დამუშავებას ახდენს და გადასცემს ციტომეტრთან დაკავშირებულ კომპიუტერს, სადაც ხდება მიღებული სიგნალის ჩაწერა (ნახ. 6) [122, 123, 124, 125].

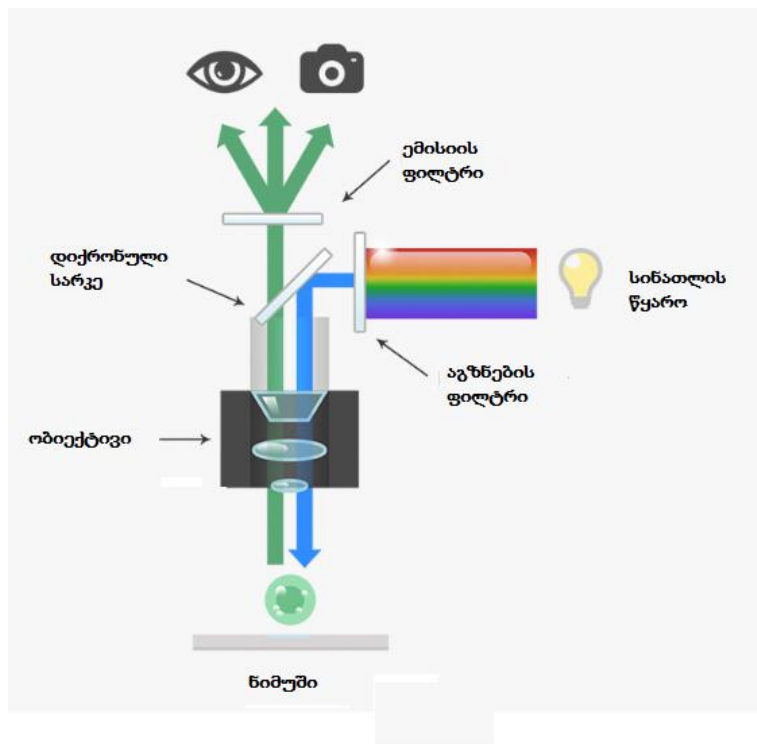


ნახ. 6. გამდინარე ციტომეტრის სქემა

2.2.4 ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპია

ფლუორესცენტული მიკროსკოპი - ოპტიკური მიკროსკოპი, რომელიც იყენებს ფლუორესცენციასა და ფოსფორესცენციას, აბსორბციისა და არეკვლის მაგივრად, ან მათთან ერთად [126]. წარმოდგენილ ნაშრომში კვლევა ჩავატარეთ ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპის - Nikon TiE-PFS-ის გამოყენებით. ამ მიკროსკოპის გამოყენების პრინციპი მდგომარეობს შემდეგში: ნიმუში განათებულია გარკვეული ტალღის სიგრძის სინათლით, რომელიც შთაინთქმება ნიმუშის ფლუოროფორის მიერ, რის შემდეგაც იგი ასხივებს უფრო მაღალი ტალღის სიგრძის სინათლეს. მისი

კომპონენტებია სინათლის წყარო, გამოსხივების, აგზნების ფილტრები, ობიექტივი და დიქრონული სარკეები. დიქრონული სარკეები ისე არის შერჩეული, რომ მორგებული იყოს გამოყენებული ფლუოროფორის სპექტრულ გამოსხივებასა და ემისიის მახასიათებლებს (ნახ. 7) [126]. ამგვარად, მიკროსკოპით მიღებულ სურათზე ხდება ფლუოროფორის (ფერის) განაწილების ასახვა.



ნახ. 7. ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპის სქემა.

2.3 კვლევებში გამოყენებული ბიოლოგიური მეთოდები

გრაციას მეთოდი გამოყენებული იქნა ბაქტერიოფაგების ტიტრის დასადგენად [84]. აპელმანის მეთოდით მოხდა ბაქტერიოფაგების გამოვლენა [84]. ასევე განსაზღვრული იქნა ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა და სპექტრი [84, 127]. მოვახდინეთ ბაქტერიოფაგების კლონირება და ბაქტერიოფაგების გამრავლება [84]. დავადგინეთ ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირიე (მოდიფიცირებული) [84].

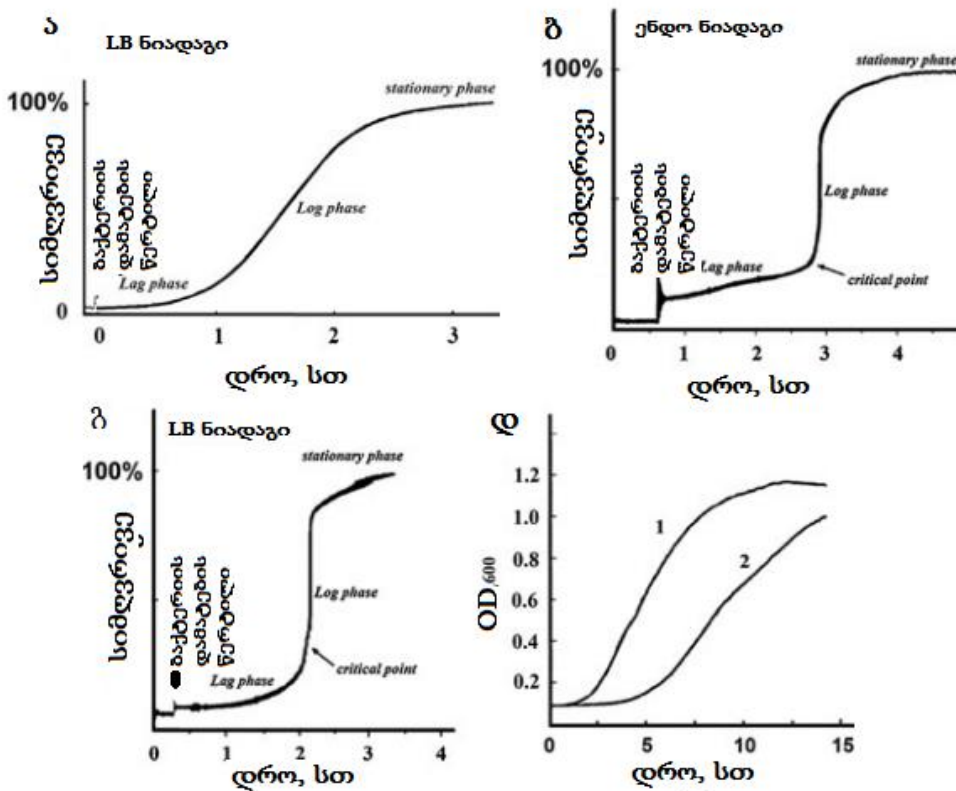
3. ჩატარებული კვლევები

3.1 სპექტროფოტომეტრული და ტურბიდიმეტრული კვლევები

3.1.1 ანტიმიკრობული აგენტებისა და გარემო პირობების ზეგავლენის შესწავლა ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე

ჩვენ მიერ შემოთავაზებული ტურბიდიმეტრული მეთოდი საშუალებას იძლევა დავაკვირდეთ ბაქტერიის რეპლიკაციის თანმხლებ ეფექტებს სხვადასხვა გარემო პირობებში ბაქტერიების ზრდის დროს. ბაქტერიების გამრავლების დროს, საკვები ბულიონის სიმღვრივის მატება მათი ტიტრის პროპორციულია - რაც მეტია საკვები ბულიონის სიმღვრივე, მით მეტია ბაქტერიების რიცხვი.

ნახ. 8-ზე მოცემულია ტურბიდიმეტრული მეთოდით შესწავლილი *E.coli* C ბაქტერიის ზრდის დამოკიდებულება საკვებ ბულიონზე, მის კონცენტრაციაზე და ალკოჰოლის ზემოქმედებაზე.

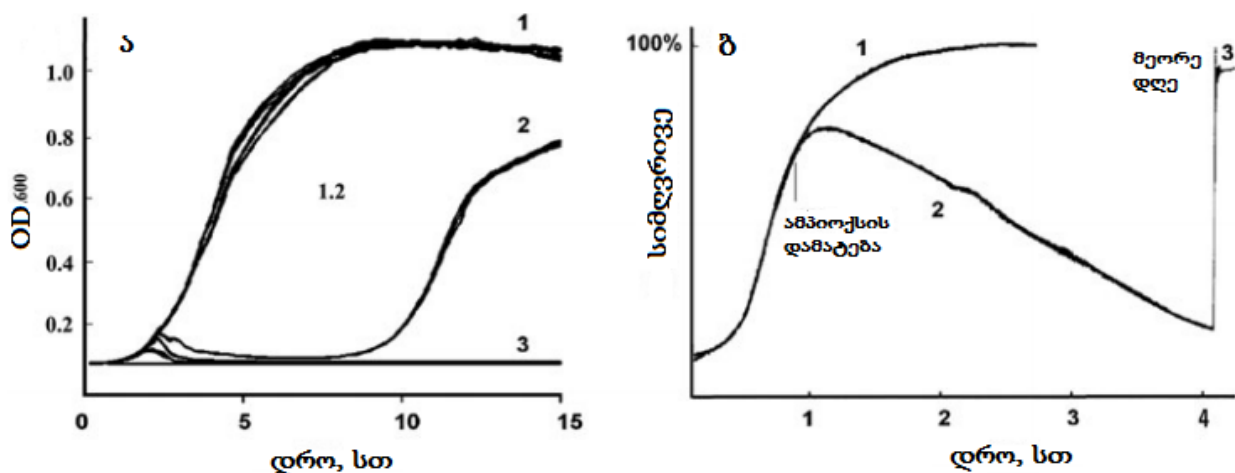


ნახ. 8. *E.coli C* ბაქტერიის ზრდის დამოკიდებულება: ა) LB ბულიონზე; ბ) 5-ჯერ განზავებულ ენდო ნიადაგზე; გ) 20-ჯერ განზავებულ LB ბულიონზე; დ) LB ბულიონზე, რომელიც შეიცავს 7% ეთანოლს. ბაქტერიის ზრდა ხორციელდებოდა ფიზიოლოგიურ ტემპერატურაზე - 37°C-ზე.

ნახ. 8ა-ზე გამოსახული მრუდი გვიჩვენებს LB საკვებ ბულიონში *E.coli C* ბაქტერიის ზრდის *Lag*, *Log* (ექსპონენციალური) და სტაციონარულ ფაზებს, რომელიც ზუსტად შეესაბამება ლიტერატურაში აღწერილ ბაქტერიების ზრდის ფაზებს [128]. LB ბულიონს ვიყენებდით როგორც სტანდარტულ საკვებ ბულიონს, ექსპერიმენტულად ვაჩვენეთ, რომ საკვები ბულიონის განზავების შემთხვევაში ბაქტერიების რეპროდუქცია სტანდარტულიდან განსხვავებული მრუდით აღიწერება (ნახ. 8 (ბ,გ) - განზავებული LB და ენდო ნიადაგები), ასევე განსხვავებული ხასიათისაა. როდესაც ვადარებთ სტანდარტულ პირობებში (განუზავებელი LB ბულიონი) ბაქტერიების ზრდის მრუდს, განზავებულ ბულიონში ბაქტერიების ზრდის მრუდთან, ნათლად ჩანს *Lag* და *Log* ფაზებში განსხვავებები. ბულიონების განზავების შემთხვევაში *Log* ფაზაში ბაქტერიების გამრავლება მიმდინარეობს სტანდარტულ პირობებთან შედარებით ბევრად უფრო სწრაფად და შესაბამისად სტაციონარული ფაზაც მალე დგება. უჯრედის მემბრანის გარშემო არსებული გარემო მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ცოცხალი უჯრედის ფუნქციონირებაში, რაც დადასტურებული იქნა ჩვენი ექსპერიმენტებით. ნახ. 8დ-ზე ნაჩვენებია ბაქტერიის ზრდის დამოკიდებულება ალკოჰოლზე - მრუდი 2. აღნიშნული ნახაზიდან ჩანს, რომ გარემოში 7% ალკოჰოლის არსებობის შემთხვევაში ბაქტერიების რეპროდუქცია იწყება რამოდენიმე საათის დაგვიანებით სტანდარტულ პირობებში ბაქტერიის გამრავლებასთან შედარებით - მრუდი 1.

ტურბიდიმეტრული და მოდიფიცირებული სპექტროფოტომეტრული მეთოდის გამოყენებით შევისწავლეთ ბაქტერიოფაგებისა და ანტიბიოტიკების ზეგავლენა ბაქტერიების გამრავლებაზე. ნახ.9-ზე ნაჩვენებია ანტიბიოტიკის (Ap) ზემოქმედება *E.coli* ბაქტერიების ზრდაზე [119]. ნახაზი გვიჩვენებს, რომ მაღალი კონცენტრაციის

ანტიბიოტიკი ($>2 \mu\text{g/ml}$) (ნახ. 9ა - მრუდები 2 და 3) ბაქტერიის ზრდის პროცესს აჩერებს, ხოლო დაბალი კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის შემთხვევაში ($<2 \mu\text{g/ml}$) ბაქტერიების გამრავლების პროცესი არ წყდება და გამრავლების აღმწერი მრუდი სტანდარულ პირობებში ბაქტერიის ზრდის მრუდს აღწერს (ნახ 9ა, მრუდები 1). გაურკვეველია ის მექანიზმები, თუ რატომ არ აქვს გავლენა დაბალი კონცენტრაციის ანტიბიოტიკს ბაქტერიების ზრდის პროცესზე.



ნახ.9. სხვადასხვა კონცენტრაციის ანტიბიოტიკ ამპიოქსის (Amp - ამპიცილინი, ოქსაცლინი) ზემოქმედება *E.coli K12* ზრდაზე. ა) სპექტროფოტომეტრული მეთოდით მიღებული ზრდის მრუდი - ამპიოქსის კონცენტრაცია არის $1 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$, $3,7 \mu\text{g/ml}$. ბ) ტურბიდომეტრული მეთოდით მიღებული მრუდები - სტანდარტული ზრდის მრუდი LB ბულიონში (მრუდი 1), $300 \mu\text{g/ml}$ კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის $100 \mu\text{l}$ -ის დამატებით მიღებული მრუდი (მრუდი 2), ანტიბიოტიკის დამატებიდან 18სთ-ის შემდეგ მიღებული მრუდი (მრუდი 3).

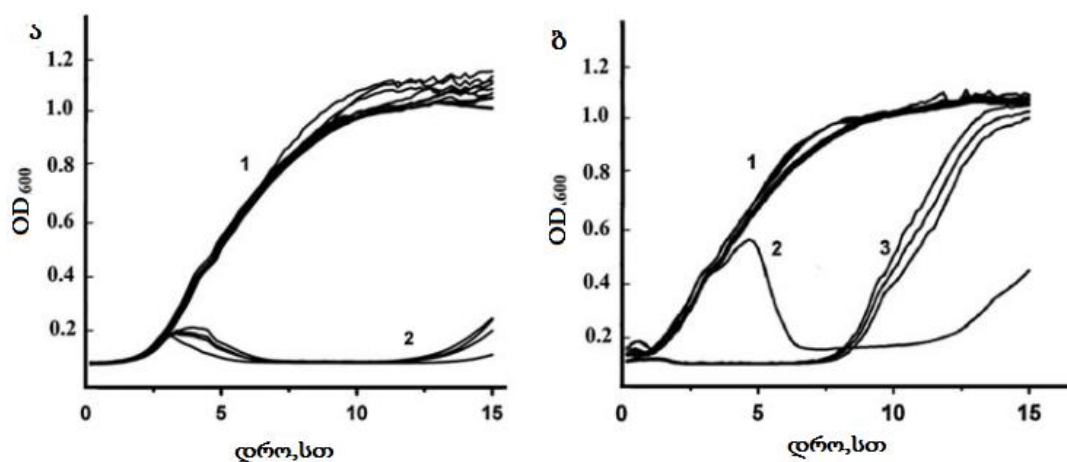
ბაქტერიის რეპლიკაციაზე უწყვეტ დროში დაკვირვება საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ და დავადგინოთ ანტიმიკრობული აგენტების ბაქტერიულ უჯრედებზე ზეგავლენის მექანიზმები. კერძოდ, ნახ. 9ბ-ზე მოცემული ექსპერიმენტული შედეგი სადაც $100 \mu\text{l}$ ანტიბიოტიკი ამპიოქსი ($300 \mu\text{g/ml}$) ემატება თხევად საკვებ ბულიონში გაზრდილ *E.coli K12*-ს (10 ml ; ანტიბიოტიკი ზავდებოდა 100 -ჯერადად) ექსპონენციალურ ფაზაში. მრუდიდან ჩანს, რომ ანტიბიოტიკის დამატებიდან

დაახლოებით 20 წთ-ის შემდეგ სუსპენზიაში ბაქტერიების რიცხვი თანდათანობით იკლებს (მრუდი 2). მიღებული შედეგი აჩვენებს, რომ ამპიოქსი არა მხოლოდ აჩერებს ბაქტერიების ზრდას, არამედ მათი ტიტრი დროის მიხედვით იკლებს (მრუდს აქვს კლების მიმართულებით დახრა). სხვა სიტყვებით, ამპიოქსი იწვევს ბაქტერიების ლიზისს და ხსნარი თანდათან ხდება გამჭვირვალე. თუმცა, ნიმუშის დამით ტურბიდიმეტრში დატოვების შემდეგ, მეორე დღეს აღინიშნება ბაქტერიების ზრდა (მრუდი 3).

ზემოთ აღწერილი ექსპერიმენტის მსგავსი ექსპერიმენტები ჩატარდა ბაქტერიოფაგის, როგორც ანტიმიკრობული აგენტის გამოყენებით. ბაქტერიოფაგები ინფიცირებას ახდენენ ბაქტერიულ მემბრანაზე არსებულ რეცეპტორებთან სპეციფიკური ურთიერთქმედების შემდეგ [129]. ფაგები გამოირჩევიან მაღალი სპეციფიურობით [130-132].

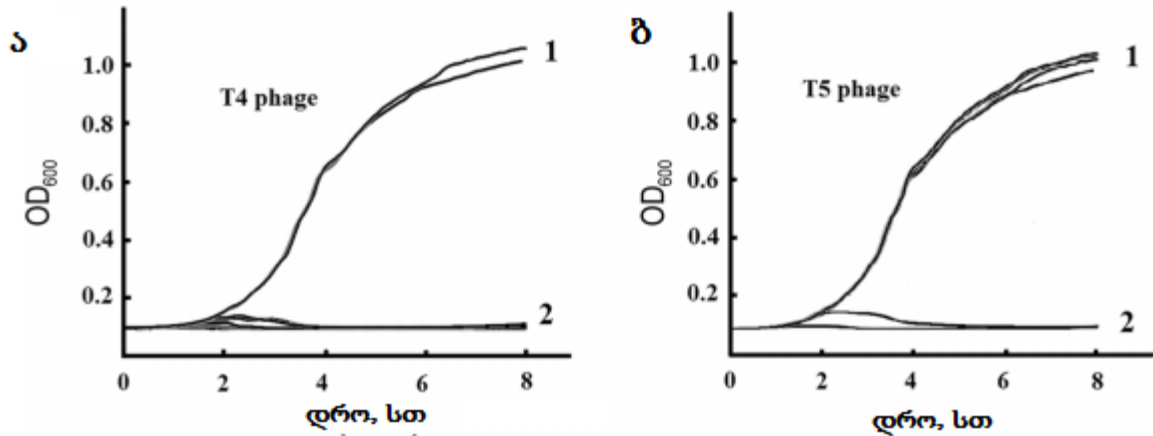
ნახ.10-ზე მოცემულია ფაგების (ა-Pyophage, ბ-P1 ფაგი) სხვადასხვა განზავებების ზემოქმედება *E.coli* K12 ბაქტერიის გამრავლებაზე [119]. განვიხილოთ ნახ. 10(ა) - ნიმუშზე 10^2 pfu/ml-ზე მაღალი ტიტრის ბაქტერიოფაგის განზავების დამატების შემთხვევაში ვლუბულობთ ბაქტერიული უჯრედების სრულ ლიზისს (მრუდი 2), ხოლო 10^2 pfu/ml-ზე ნაკლები ტიტრის ბაქტერიოფაგის განზავების დამატებისას ბაქტერიების ზრდაზე ხილული ზეგავლენა არ შეიმჩნევა (ხსნარის სიმღვრივე დროის სხვადასხვა მომენტში ისეთივეა, როგორც საკონტროლო ნიმუშში, სადაც მხოლოდ ბაქტერიის ზრდა დაიკვირვება). ხოლო რაც შეეხება ნახ. 10 ბ-ზე გამოსახულ შედეგს, ამ შემთხვევაში ბაქტერიის ზრდაზე P1 ფაგის ზეგავლენას ვაკვირდებით. P1 ფაგის სხვადასხვა განზავებებს, რომლის ტიტრი ნაკლებია 10^3 pfu/ml-ზე, არ იწვევს ბაქტერიების ზრდაზე ცვლილებებს (მრუდი 1), ხოლო 10^5 pfu/ml-ზე მაღალი ტიტრის ფაგის დამატების დროს ადგილი აქვს ბაქტერიების ლიზისს (მრუდი 3). რაც შეეხება ნახ. 10 ბ-ზე გამოსახულ მრუდ 2-ს, ამ შემთხვევაში ნიმუშზე დამატებულია P1 ფაგი ტიტრით 10^5 pfu/ml, ინკუბაციის პირველი 5 საათის განმავლობაში ბაქტერიის ზრდა ისეთივეა როგორც კონტროლში (ბაქტერიის ზრდა სუფთა ბულიონში), ხოლო 5

საათის გასვლის შემდეგ იწყება ფაგის მიერ ბაქტერიების ლიზისი (მრუდი იხრება სიმღვრივის შემცირების მიმართულებით).



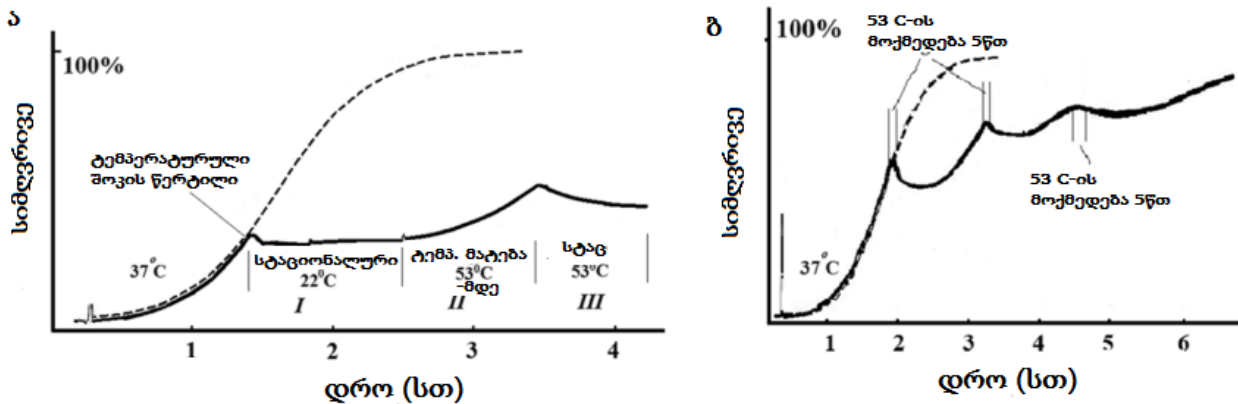
ნახ. 10. ფაგების (A-Pyophage, B- P1 ფაგი) ზემოქმედება *E.coli* K12 ბაქტერიაზე. ა) 1 – Pyophage-ის ტიტრი ბულიონში მეტია 10^2 pfu/ml-ზე, ხოლო 2 - ტიტრი ნაკლებია 10^2 pfu/ml-ზე. ბ) 1 - P1 ფაგის ტიტრი ბულიონში ნაკლებია 10^3 pfu/ml-ზე, 2 - ფაგის ტიტრი არის 10^4 pfu/ml, 3 - ფაგის ტიტრი მეტია 10^5 pfu/ml-ზე.

ზემოთ აღწერილი (ნახ. 10) ექსპერიმენტის მსგავსი შედეგები იქნა მიღებული ბაქტერიების ზრდაზე T4 და T5 ფაგების სხვადასხვა განზავებების ზემოქმედების შესწავლიასას (ნახ. 11) [120]. როგორც ანტიბიოტიკის, ასევე ფაგის შემთხვევაში არსებობს რაღაც გარკვეული მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია (MIC), რომელზე ნაკლები კონცენტრაციის ანტიბაქტერიული აგენტის გამოყენება გავლენას აგარ ახდენს ბაქტერიების გამრავლებაზე.



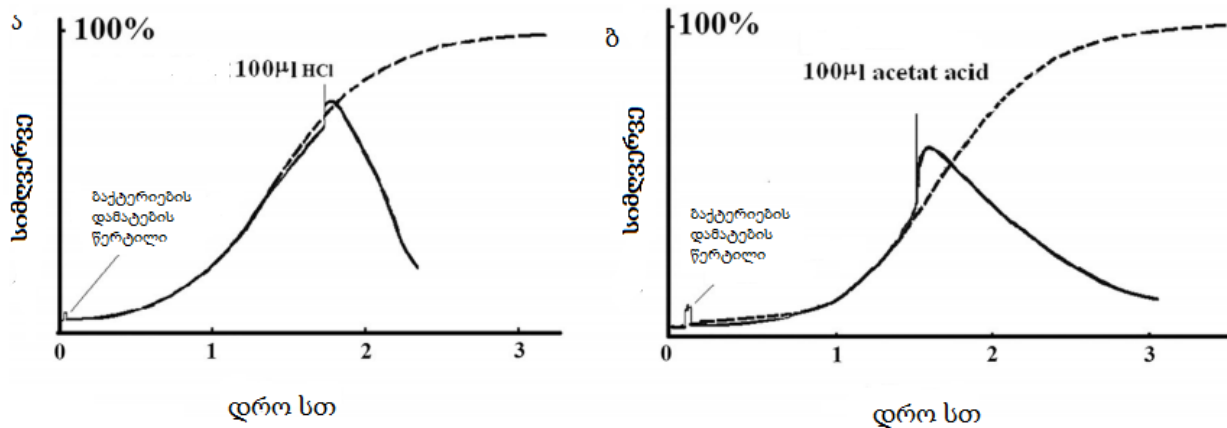
ნახ. 11. ბაქტერიის გამრავლების დროზე დამოკიდებულება სხვადასხვა ტიტრის ფაგების ზემოქმედებით. ა - *E. coli C* ბაქტერიას დამატებული აქვს T4 ფაგის სხვადასხვა განზავებები ბ - *E. coli K12* -ზე T5 ფაგის სხვადასხვა განზავებების ზემოქმედება.

კვლევის ფარგლებში ასევე შევისწავლეთ ტემპერატურისა და მჟავიანობის ზეგავლენა ბაქტერიებზე. განვიხილოთ ტემპერატურული შოკის ზემოქმედება *E.coli C* ბაქტერიების გამრავლებაზე, რომელიც ნაჩვენებია ნახ.12-ზე [120]. როგორც ნახაზიდან ჩანს, ტემპერატურის დაცემისას 37°C-დან 22° C-მდე იწვევს ბაქტერიის ზრდის სიჩქარის ნულამდე დაცემას, ხოლო ტემპერატურის მატებისას, ბაქტერიის ზრდის სიჩქარე ნელ-ნელა მატულობს სანამ ტემპერატურა მიაღწევს 53°C-ს, ხოლო ამ წერტილზე ბაქტერია წყვეტს გამრავლებას და იწყება მისი ტიტრის შემცირება (ნახ. 12 ა), ნახ. 11 ბ-ზე ნაჩვენებია *E.coli C* ბაქტერიის გამრავლებაზე მაღალი ტემპერატურული შოკის მოქმედება, კერძოდ 53°C-ის მოქმედება 3-5 წუთიანი ინტერვალით რამდენიმეჯერ. ტემპერატურული შოკის შემდეგ, მიუხედავად გამრავლების ფიზიოლოგიური პირობების შექმნისა, ბაქტერია საჭიროებს გარკვეულ დროს გამრავლების პროცესის აღსადგენად. ყოველი შემდგომი ტემპერატურული შოკის მოქმედებამ გვიჩვენა მსგავსი ეფექტი.



ნახ.12. ტემპერატურის ზემოქმედება *E.coli* C ბაქტერიების გამრავლებაზე. ა) ბაქტერიის ზრდის პროცესის დამოკიდებულება ტემპერატურის ცვლილებაზე, ბ) ბაქტერიის ზრდის პროცესის დამოკიდებულება მაღალ ტემპერატურულ შოკზე.

ნახ.13 ზე ნაჩვენებია სუსტი მჟავას მოქმედების ეფექტი ბაქტერიების გამრავლებაზე. კვლევისათვის გამოყენებული იყო 1%-იანი HCl და სუსტი სუფთა ძმარმჟავა [120].



ნახ.13. სუსტი მჟავას მოქმედება *E.coli* C ბაქტერიების ზრდაზე. ა) 1%-იანი HCl-ის ეფექტი. ბ) ძმარმჟავას ეფექტი. მჟავას დამატების მომენტი მითითებულია მრუდზე. ექსპერიმენტი ჩატარდა ფიზიოლოგიურ ტემპერატურაზე 37°C-ზე.

3.1.2 ფაგებისა და ანტიბიოტიკების სინერგიული ზემოქმედება *E.coli* ბაქტერიების ზრდაზე

შესწავლილ იქნა ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების ეფექტები ბაქტერიების (*E.coli*) ზრდაზე მოდიფიცირებული სპექტროფოტომეტრული მეთოდით. დავადგინეთ მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციები (MIC) ამ ანტიმიკრობული აგენტებისა ჩვენ მიერ შერჩეულ ბაქტერიებზე (*E.coli* MG1655; *E.coli* C, *E.coli* TD 2158) და შემდეგ შევარჩიეთ MIC-ის მიდამოში კონცენტრაციები, რათა სინერგიული ეფექტების დამზერა ყოფილიყო შესაძლებელი.

მიკროფინჯნების სპექტროფოტომეტრი - infinite 200 გამოვიყენეთ *E.coli*-ს კონცენტრაციის დროში ცვლილებაზე დასაკვირვებლად. ღამის კულტურას ვანზავებდით 100-ჯერ და 3 საათის განმავლობაში ვათავსებდით თერმოსტატში სანჯღრეველაზე 37°C-ზე. შემდეგ ნიმუშს ვანზავებდით ბულიონში ისე, რომ 600 ნმ-ზე ყოფილიყო 0.1 OD.

170µl *E.coli*-ის შემცველი ბულიონს ვასხამდით 96 მიკროუჯრიანი ფინჯანის თითოეულ უჯრაში, რომელსაც ვამატებდით 15µl ბაქტერიოფაგს, ანტიბიოტიკს, ან მათი კომბინაციას.

პროგრამა: 10 წუთიანი ნჯღრევის შემდეგ სპექტროფოტომეტრი იღებდა ჩანაწერს 600ნმ-ზე. ექსპერიმენტი ტარდება 8 - 16 საათის განმავლობაში 30°C-ზე.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინირებული მოქმედების შემთხვევაში ხდება *E.coli* ბაქტერიის ზრდის მნიშვნელოვანი დათრგუნვა, მაშინ როდესაც ბაქტერიოფაგის აღებული განზავება და ანტიბიოტიკის გამოყენებული კონცენტრაცია დამოუკიდებლად გავლენას ვერ ახდენს ბაქტერიის ზრდის პროცესზე. ასეთი ეფექტები იყო დამზერილი T4, T5, DDVI, Pyophage და ანტიბიოტიკების სუბლეტალური დოზების გარკვეული კომბინაციების შემთხვევაში (ცხ. 1).

ცხრილ 1-ზე მოცემულია შესწავლილი ფაგი/ანტიბიოტიკის კომბინაციები და მიღებული სინერგიული ეფექტები.

ATB ფაგი	გენტამიცინი (Gn)	ამპიცილინი (Ap)	ქლორამფენიკოლი (Cm)	ტეტრაციკლინი (TC)	სპექტინომიცინი (Spc)	კანამიცინი (Kn)
T4 (ვირულენტური)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
T5 (ვირულენტური)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
T7 (ვირულენტური)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DDVI (ვირულენტური)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
პიოფაგი (ვირულენტური)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P1 (ზომიერი)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
HK 620 (ზომიერი)	✓	✓	✓	✓	✓	✓

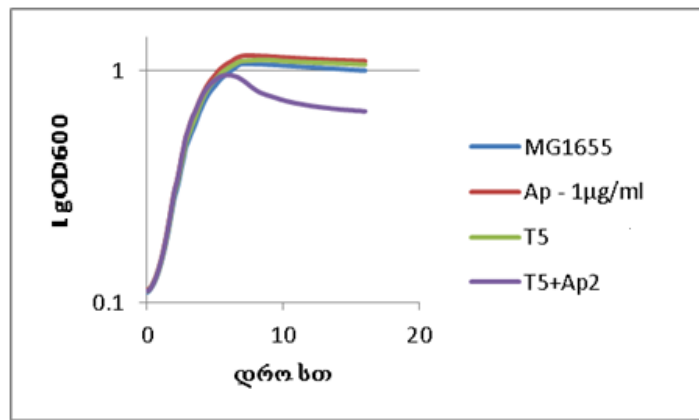
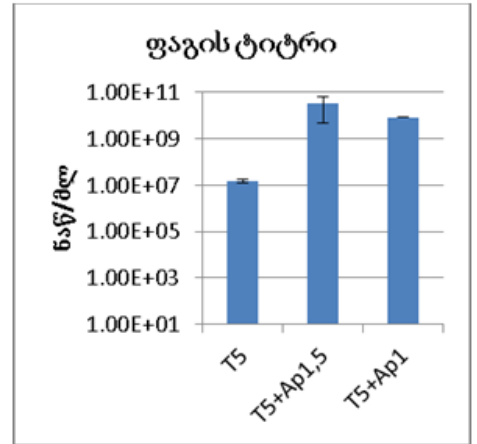
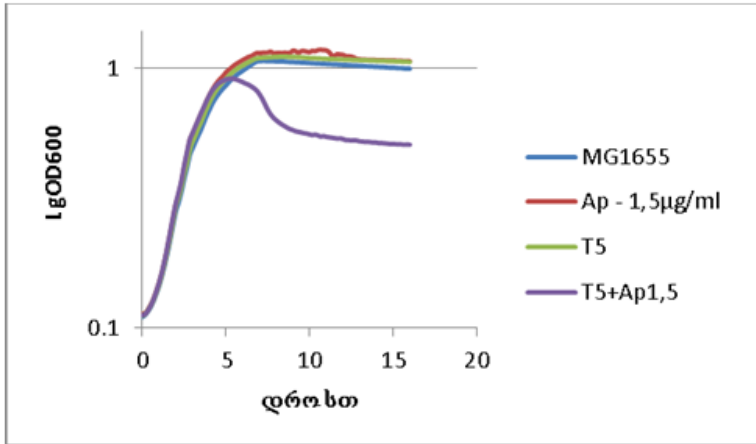
ცხრილი 1. ანტიბიოტიკისა და ფაგის კომბინირებული მოქმედება ბაქტერიებზე - ✓ - შესწავლილი კომბინაციები; ფერადი უჯრები - ფაგი/ანტიბიოტიკის კომბინაციები, რომელიც გაცივებით ეფექტურია ბაქტერიის ზრდის დასათრგუნად, ვიდრე ცალკეული ანტიბაქტერიული აგენტი დამოუკიდებლად.

სურ. 2-ზე მოცემულია მიკროფინჯნის ფოტო, რომელზეც სინერგიული ეფექტის მაგალითია გამოსახული - T5 ფაგისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და ampicillin-ის მცირე კონცენტრაციების (3 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$) კომბინირებული მოქმედება *E.coli MG1655* ბაქტერიაზე, 16 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ. სურათიდან ნათლად ჩანს ფაგისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების შედეგად მიღებული ბაქტერიული ლიზისი - უჯრები სადაც დამატებულია ფაგი და ანტიბიოტიკი ერთდროულად, უფრო ნაკლებად მღვრია (აღინიშნება მცირე ოპალესცენცია), ვიდრე საკონტროლო უჯრები, სადაც მხოლოდ ფაგი, ან მხოლოდ ანტიბიოტიკი არის დამატებული.

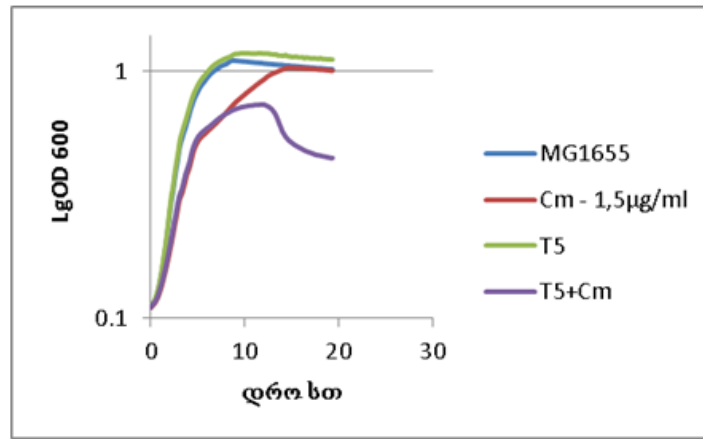
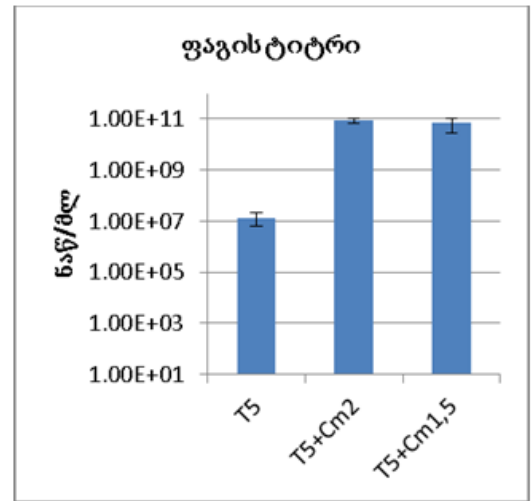
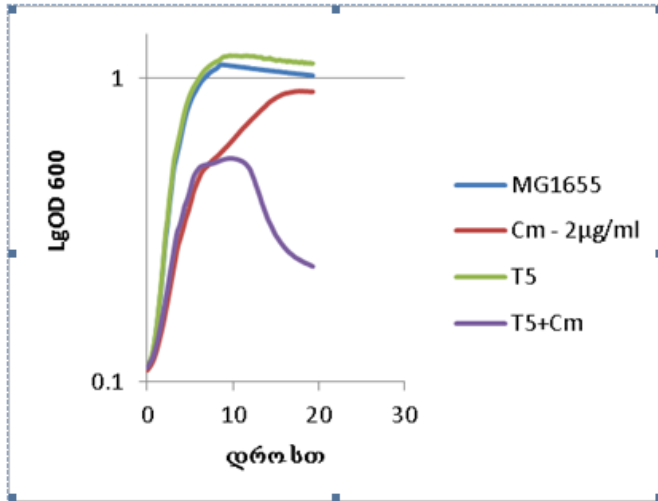


სურ. 2. სინერგიული ეფექტი მიღებული T5 ფაგისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და ampicillin-ის მცირე კონცენტრაციების (3 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$) კომბინირებული მოქმედებით *MG1655* ბაქტერიაზე, 16 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ.

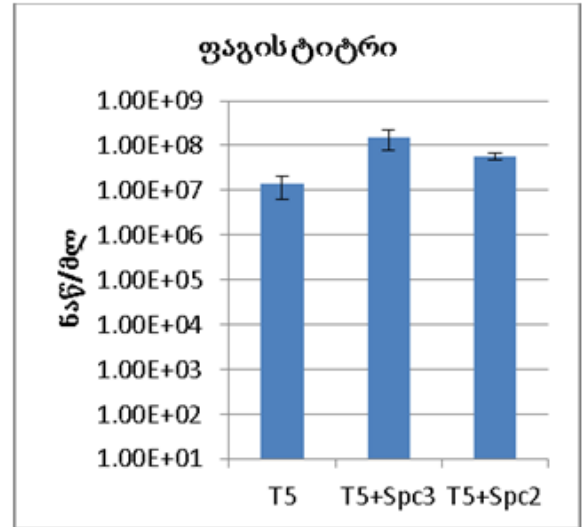
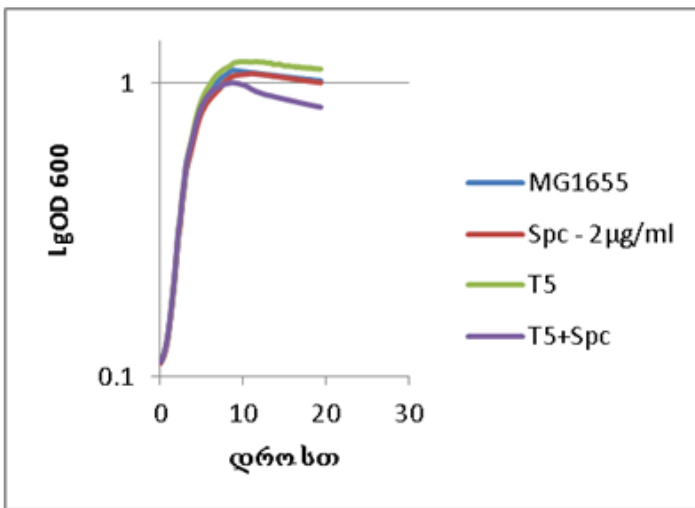
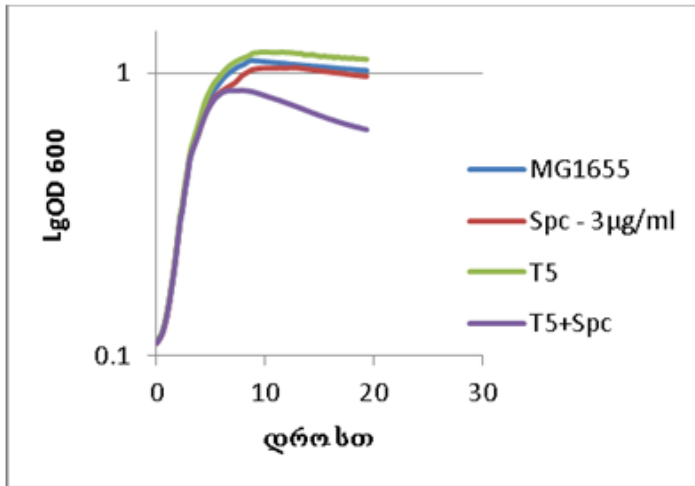
იმისათვის, რომ გაგვერკვია ანტიბიოტიკის სუბ-ლეტალური კონცენტრაცია იწვევს ფაგის მოქმედების გაძლიერებას, თუ პირიქით, გრაცხას ორშრიანი აგარის მეთოდით განვსაზღვრეთ ფაგის ტიტრები ექსპერიმენტის დასრულების მომენტში. როგორც დადგინდა (ნახ. 14 - ნახ. 16) ფაგის ტიტრი მნიშვნელოვნად მატულობს საკვებ ბულიონში სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის დამატებისას. ეს შედეგი ნაჩვენებია იქნა, ამპიცილინის, სპექტინომიცინისა და ქლორამფენიკოლის გამოყენების შემთხვევაში T5 ბაქტერიოფაგის ტიტრის მატებაზე ანტიბიოტიკის მოქმედების შესწავლისას.



ნახ.14. ამპიცილინის 1,5 µg/ml, 1 µg/ml და T5 (~5x10³ pfu/ml) ფაგის კომბინირებული მოქმედების ეფექტის მრუდები და ფაგის ტიტრზე ამპიცილინის ადებული კონცენტრაციების მოქმედების ეფექტი შესაბამისად (ინფიცირებიდან 16 სთ-ის შემდეგ).

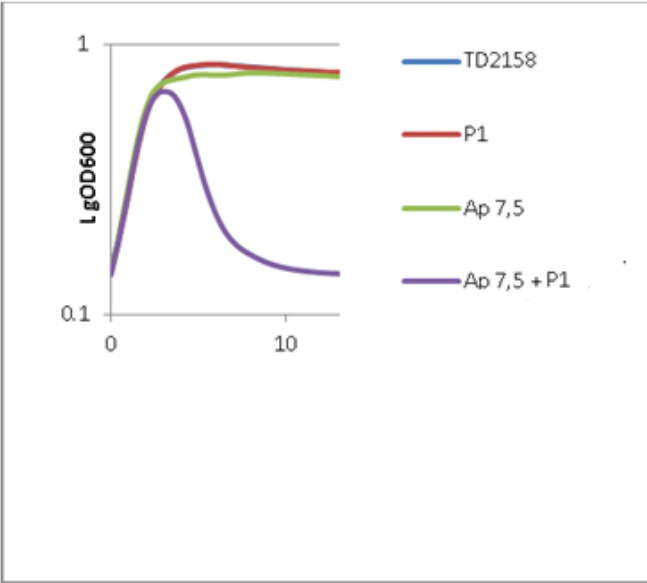


ნახ.15. ქლორამფენიკოლის 2 µg/ml, 1,5 µg/ml და T5 (~5x10³ pfu/ml) ფაგის კომბინირებული მოქმედების ეფექტის მრუდები და ფაგის ტიტრზე ამპიცილინის ადებული კონცენტრაციების მოქმედების ეფექტი შესაბამისად (ინფიცირებიდან 16სთ-ის შემდეგ).

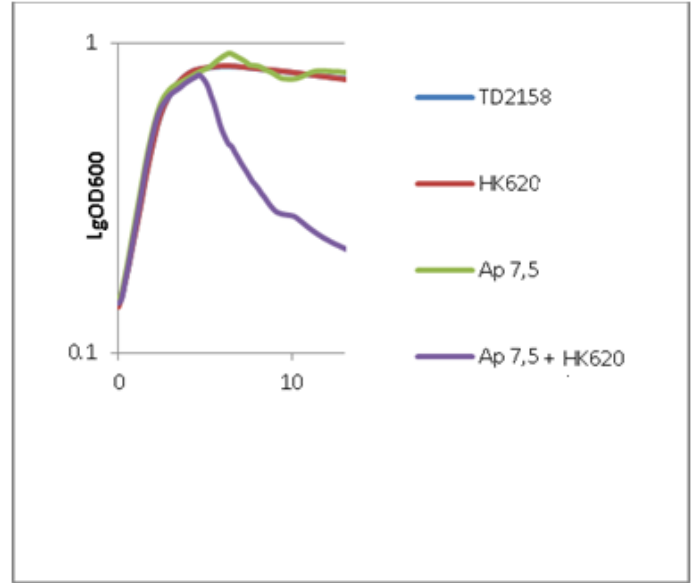


ნახ. 16. სპექტინომიცინის 3 µg/ml, 2 µg/ml და T5 (~5x10³ pfu/ml) ფაგის კომბინირებული მოქმედების ეფექტის მრუდები და ფაგის ტიტრზე ამპიცილინის აღებული კონცენტრაციების მოქმედების ეფექტი შესაბამისად (ინფიცირებიდან 16 სთ-ის შემდეგ).

აღსანიშნავია, რომ ისევე როგორც ვირულენტურმა ფაგებმა, ზომიერი ფაგების, როგორცაა P1 და HK 620, ანტიბიოტიკთან კომბინაციურმა გამოყენებამაც აჩვენა სინერგიული ეფექტი (იხ. ნახ. 17. და ნახ. 18.).



ნახ.17. კომბინირებული მოქმედების ეფექტი P1 (10^3 pfu/ml) ბაქტერიოფაგისა და ამპიცილინის (7,5 μ g/ml) *MG1655* ბაქტერიაზე.

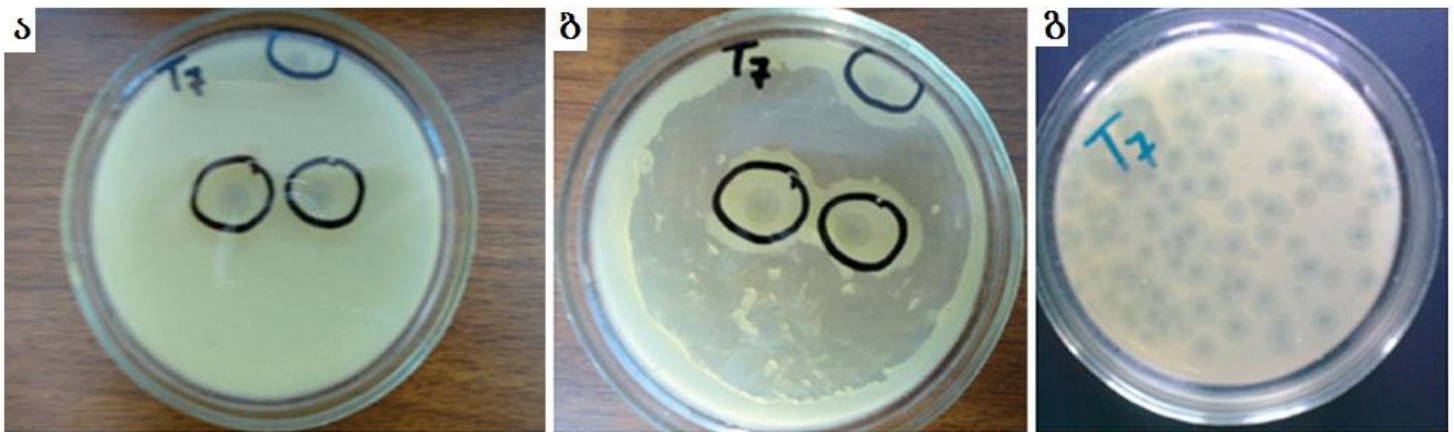


ნახ. 18. კომბინირებული მოქმედების ეფექტი HK 620 (10^2 pfu/ml) ბაქტერიოფაგისა და ამპიცილინის (7,5 μ g/ml) *MG1655* ბაქტერიაზე.

3.2 ბიოლოგიური მეთოდით განსაზღვრული ფაგი ტიტრის ცდომილება.

ჩატარებული ექსპერიმენტის აღწერა მოცემულია სურ. 3-ზე, რომლის მიზანიც იყო, გვეჩვენებინა, რომ პეტრის ფინჯნის ის ნაწილი, რომელზეც ფაგის ნეგატიური კოლონიები თვალთ არ შეიმჩნევა, შეიცავს დიდი რაოდენობით ფაგურ ნაწილაკებს. წარმოდგენილ ექსპერიმენტში გამოყენებულია T7 ფაგი და მისი პატრონ უჯრედი - *E.coli.C*. რამოდენიმე პეტრის ფინჯნიდან (დაახლოებით 10 ფინჯნიდან) ვაგროვებდით აგარის ზედა ფენის იმ ნაწილს, რომელიც არ შეიცავდა ნეგატიურ კოლონიებს - პეტრის ფინჯნიდან (სურ. 3 ა), სადაც ნათლად ჩანს T7 ფაგის ნეგატიური კოლონიები, ამოვჭერთ აგარის ზედა ფენის ის ნაწილი, რომელიც არ შეიცავდა ფაგის „ნეგატიურ კოლონიებს“ (სურ. 3 ბ). ნიმუშებიდან ვახდენდით ფაგის გამოყოფას და კვლავ ვნახულობდით ტიტრს ორშრიანი აგარის მეთოდით. სურ. 3 (გ)-ზე ნაჩვენებია აგარის

ამოჭრილი ნაწილიდან გამოყოფილი ფაგის მიერ წარმოქმნილი ნეგატიური კოლონიები. ექსპერიმენტი ცალსახად გვიჩვენებს, რომ ფინჯნის ის ნაწილი, სადაც ნეგატიური კოლონიები არ ჩანს, შეიცავს დიდი რაოდენობით აქტიურ ფაგის ნაწილაკებს. უნდა აღინიშნოს რომ ეს ექსპერიმენტი ჩატარებულია რამდენიმეჯერ და ყოველ ჯერზე მიღებულია მსგავსი შედეგი. ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ შეგროვებული აგარის ზედა ფენას ემატებოდა 30 ml 1xSSC - ხსნარი, შემდეგ ვათავსებდით მაცივარში 18სთ და შემდეგ დღეს ნარევს ვაცენტრიფუგებდით 6000 rpm-ზე 15 წთ, რათა მოგვეცილებინა ნარევიდან ბაქტერიები და აგარის ნარჩენები. ფაგების გაწმენდას და კონცენტრირებას ვახდენდით სუპერნატანტის დაცენტრიფუგებით 30 წთ 20000 rpm-ზე, შემდეგ ნალექს ვხსნიდით 0,1 ml 1xSSC ბუფერში და ვათავსებდით მაცივარში. მეორე დღეს ვამოწმებდით ფაგის არსებობას მიღებულ ნიმუშში წერტილოვანი ტესტირებისა და გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. ამგვარად, სურ. 3. გ-ზე ნათლად ჩანს, რომ აღწერილი გზით მიღებული ნიმუში შეიცავს T7 ფაგს, მიუხედავად იმისა, რომ აგარის ზედაპირზე თვალის ნეგატიური კოლონიების არსებობა არ შეიმჩნეოდა. მსგავსი ექსპერიმენტი ჩატარდა T4 და T5 ფაგებზეც და განმეორებულ იქნა მინიმუმ 4-5-ჯერ არტიფაქტების გამორიცხვის მიზნით. ყოველ ჯერზე მიღებული შედეგი იყო დადებითი და მსგავსი აღწერილი შედეგისა.



სურ. 3. პეტრის ფინჯნების ფოტოები, რომელზეც გამოსახულია *E. coli* ბაქტერიაზე მიღებული T7 ფაგის ნეგატიური კოლონიები: ა - ფოტო გვიჩვენებს პეტრის ფინჯანს,

რომელზეც ნათლად ჩანს 3 ნეგატიურ კოლონია; ბ - ზედაპირული აგარის ამოჭრილი ნაწილი (რომელიც არ შეიცავს ნეგატიურ კოლონიებს); გ - აგარის ამოჭრილი ზედაპირიდან გამოყოფილი

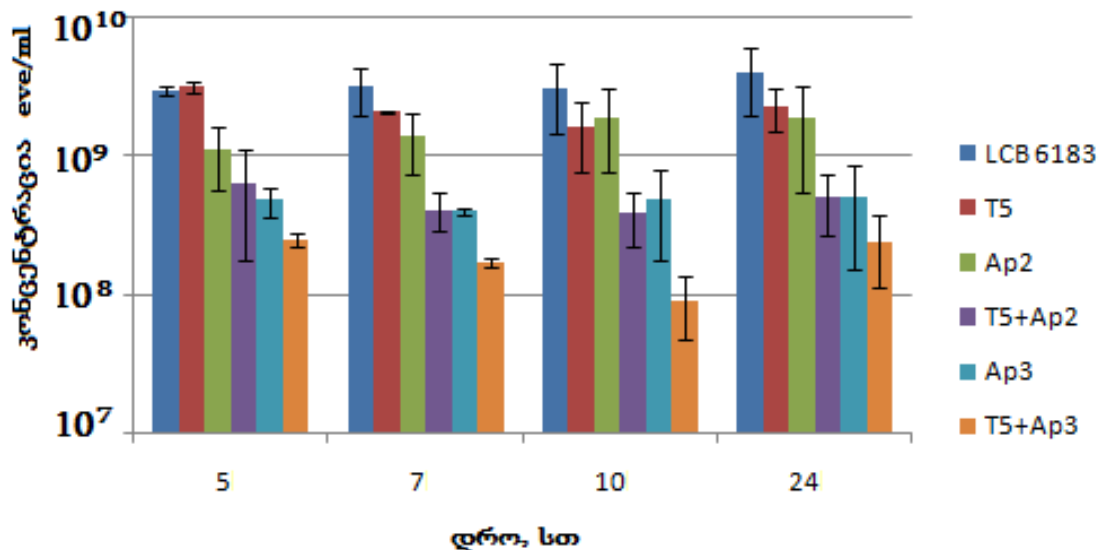
T7

ფაგი.

3.3 T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკების ბაქტერიაზე ზემოქმედების ეფექტების შესწავლა გამდინარე ციტომეტრის გამოყენებით

მიკრობის ღამის კულტურის 100-ჯერად განზავებას ($OD \sim 0.01$) ვამატებდით ბაქტერიოფაგს შერჩეული კონცენტრაციით, ანტიბიოტიკის მცირე კონცენტრაციას (სუბ-ლეტალური) ან მათ კომბინაციას და ინკუბირებას ვახდენდით სანჯღრეველაზე $37^{\circ}C$ ზე. ნიმუშებს ვიღებდით ინკუბაციიდან სხვადასხვა დროის შემდეგ (2სთ, 3სთ, 5სთ, 7სთ და სხვ.). უჯრედებს ვაფიქსირებდით PFA ხსნარით და ვზომავდით გამდინარე ციტომეტრით. ამ მეთოდმა მოგვცა საშუალება ნიმუშებში დაგვეთვალა ცოცხალი ბაქტერიების რაოდენობა.

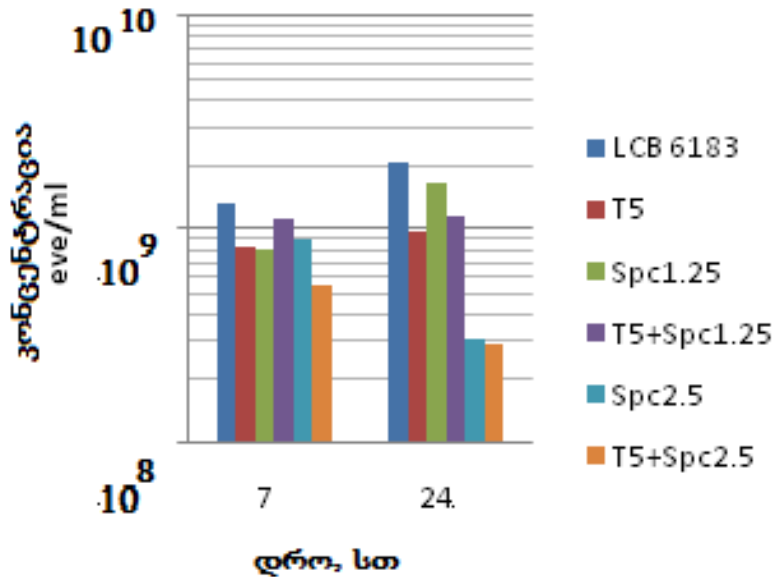
T5 ფაგისა და ამპიცილინის მოქმედების ეფექტების შესწავლა ბაქტერიების კონცენტრაციის ცვლილებაზე: გამდინარე ციტომეტრით შევისწავლეთ ანტიბიოტიკებისა და ფაგების კომბინირებული და დამოუკიდებელი მოქმედების ეფექტები ბაქტერიაზე. ნახ. 19 - ზე მოცემულია ბაქტერიის ზრდაზე (კონცენტრაციის ცვლილებაზე) T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკ ამპიცილინის მოქმედების შედეგი. როგორც ნახაზიდან ჩანს ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედებით ბაქტერიის კონცენტრაცია უფრო ეფექტურად მცირდება, ვიდრე მათი დამოუკიდებლად მოქმედების შემთხვევაში .



ნახ. 19. ბაქტერიის *E.coli* LCB6183 კონცენტრაციაზე ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედების ეფექტები. (სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის საშუალო მნიშვნელობა) ლურჯი სვეტი - ბაქტერიის ზრდის კონტროლი, წითელი სვეტი - T5 (~5x10³ pfu/ml) ბაქტერიოფაგის მოქმედების ეფექტი დროის სხვადასხვა მომენტში, მწვანე სვეტი - ანტიბიოტიკ ამპიცილინის 2 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება ბაქტერიის გამრავლებაზე, იისფერი სვეტი - T5-სა (~5x10³ pfu/ml) და ანტიბიოტიკ ამპიცილინის (2 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი, ცისფერი სვეტი - ანტიბიოტიკ ამპიცილინის 3 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება, ნარინჯისფერი სვეტი - T5-სა (~5x10³ pfu/ml) და ანტიბიოტიკ ამპიცილინის (3 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი.

T5 ფაგისა და სპექტინომიცინის მოქმედების ეფექტების შესწავლა ბაქტერიების კონცენტრაციის ცვლილებაზე: გამდინარე ციტომეტრით ასევე შევისწავლეთ ანტიბიოტიკ სპექტინომიცინისა და T5 ფაგისა მოქმედების ეფექტი ბაქტერიების ზრდაზე, როგორც დამოუკიდებლად, ასევე კომბინაციაში. როგორც ნახაზიდან (ნახ. 20) ჩანს ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედებით ბაქტერიის კონცენტრაცია უფრო ეფექტურად მცირდება, ვიდრე მათი დამოუკიდებლად მოქმედების შემთხვევაში. აღებული კომბინაციის შემთხვევაში ეფექტი უფრო მცირეა, ვიდრე ამპიცილინისა და T5

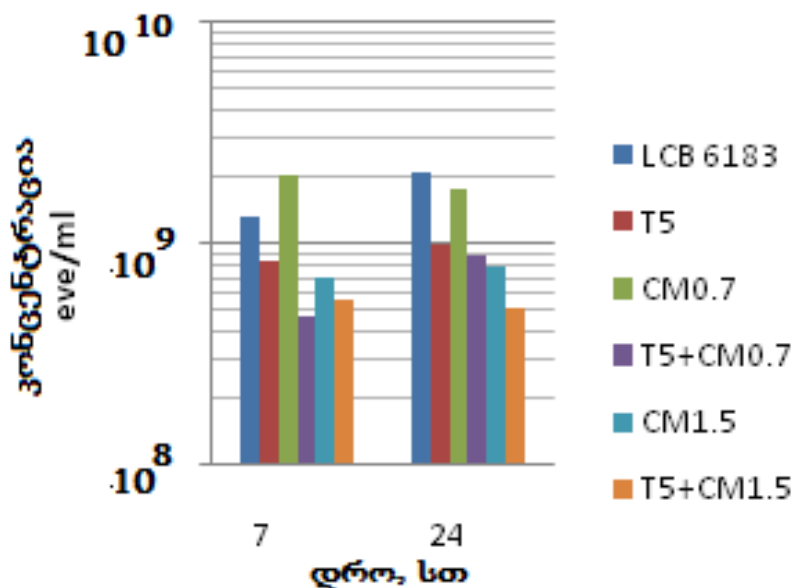
ფაგის ერთობლივი მოქმედების დროს, თუმცა კონცენტრაციის შემცირება მაინც აღნიშნება და თვალსაჩინოა ინფიცირებიდან 24 საათის შემდეგ.



ნახ. 20. ბაქტერიის *E.coli* LCB6183 კონცენტრაციაზე ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედების ეფექტები. ლურჯი სვეტი - ბაქტერიის ზრდის კონტროლი, წითელი სვეტი - T5 (~5x10³ pfu/ml) ბაქტეროფაგის მოქმედების ეფექტი დროის სხვადასხვა მომენტში, მწვანე სვეტი - ანტიბიოტიკ სპექტინომიცინის 1,25 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება ბაქტერიის გამრავლებაზე, იისფერი სვეტი - T5-სა (~5x10³ pfu/ml) და ანტიბიოტიკ სპექტინომიცინის (1,25 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი, ცისფერი სვეტი - ანტიბიოტიკ სპექტინომიცინის 2,5 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება, ნარინჯისფერი სვეტი - T5-სა (~5x10³ pfu/ml) და ანტიბიოტიკ სპექტინომიცინის (3 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი.

T5 ფაგისა და ქლორამფენიკოლის მოქმედების ეფექტების შესწავლა ბაქტერიების კონცენტრაციის ცვლილებაზე: გამდინარე ციტომეტრით ასევე შევისწავლეთ ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლისა და T5 ფაგისა მოქმედების ეფექტი ბაქტერიების ზრდაზე, როგორც დამოუკიდებლად, ასევე კომბინაციაში. როგორც ნახაზიდან (ნახ. 21) ჩანს ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედებით ბაქტერიის კონცენტრაცია უფრო

ეფექტურად მცირდება, ვიდრე მათი დამოუკიდებლად მოქმედების შემთხვევაში. აღებული კომბინაციის შემთხვევაში ეფექტი უფრო მცირეა, ვიდრე ამპიცილინისა და T5 ფაგის ერთობლივი მოქმედების დროს, თუმცა კონცენტრაციის შემცირება მაინც აღინიშნება და თვალსაჩინოა ინფიცირებიდან 24 საათის შემდეგ.



ნახ. 21. ბაქტერიის *E.coli* LCB6183 კონცენტრაციაზე ფაგისა და ანტიბიოტიკის მოქმედების ეფექტები. ლურჯი სვეტი - ბაქტერიის ზრდის კონტროლი, წითელი სვეტი - T5 (~5x10³ pfu/ml) ბაქტეროფაგის მოქმედების ეფექტი დროის სხვადასხვა მომენტში, მწვანე სვეტი - ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის 0,7 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება ბაქტერიის გამრავლებაზე, იისფერი სვეტი - T5-სა და ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის (0,7 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი, ცისფერი სვეტი - ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის 1,5 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედება, ნარინჯისფერი სვეტი - T5-სა (~5x10³ pfu/ml) და ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის (3 µg/ml) კომბინირებული ზემოქმედების ეფექტი.

3.4 ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპით ჩატარებული კვლევები

ეპი-პლუორესცენტული მიკროსკოპის გამოყენებით შევისწავლეთ ანტიბიოტიკ ამპიცილინის, ქლორამფენიკოლისა და სპექტინომიცინის, T5 ბაქტერიოფაგის, ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინაციების ბაქტერიების მორფოლოგიაზე მოქმედების ეფექტი.

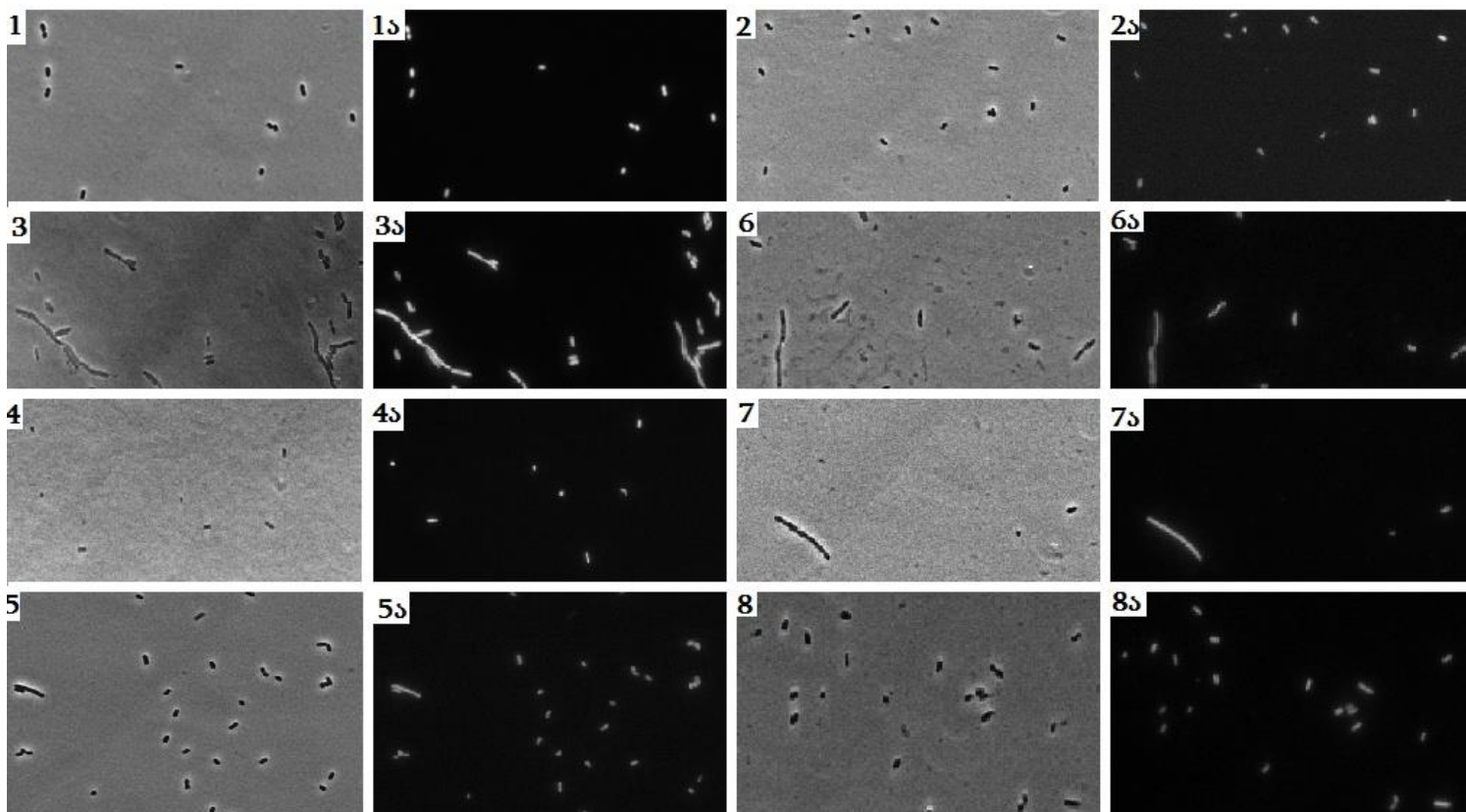
სურ. 3-ზე მოცემულია *E.coli* LCB6183 ბაქტერიის მორფოლოგიური სურათი, მიღებული ფლუორესცენტული მიკროსკოპით, ოპტიმალურ პირობებში ზრდის შემთხვევაში, ასევე ანტიბიოტიკებისა და ფაგების და ამ აგენტების კომბინაციური ზემოქმედების შემთხვევაში. მიკრობის (LCB6183) ღამის კულტურას 1:100 ვანზავებდით (OD~0.01) LB ბულიონში, ასევე LB ბულიონში, რომელიც შეიცავს ანტიბიოტიკს სუბ-ლეტალური კონცენტრაციით. შტამებს ვაინფიცირებდით ფაგით (~5x10³ pfu/ml) და ვათავსებდით თერმოსტატში სანჯღრეველაზე 10 სთ. უჯრედებს ვაფიქსირებდით PFA ხსნარით და ვაანალიზებდით მათ მორფოლოგიას ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპის გამოყენებით.

სურ. 4 (1, 1ა)-ზე მოცემულია LCB6183 ბაქტერიის კონტროლი - ოპტიმალური გამრავლების პირობებში მიღებული გამოსახულება, ფაზათა კონტრასტული და GFP-გამოსხივებით შესაბამისად.

სურ. 4 (3, 3ა)-ზე მოცემულია LCB6183 ბაქტერიაზე ანტიბიოტიკ Ampicillin- ის 2 µg/ml-ის ზემოქმედების შედეგად მიღებული მორფოლოგიური სურათი - ფაზათა კონტრასტული (3) და GFP-გამოსხივებით (3ა) მიღებული სურათები. როგორც სურათიდან ჩანს, ანტიბიოტიკ Ampicillin- ის ჩვენ მიერ შერჩეული სუბ-ლეტალური კონცენტრაცია იწვევს ბაქტერიის ფილამენტაციას (ბაქტერიების ზომის ანომალური გადიდება). მსგავსი შედეგი მივიღეთ Chloramphenicol (2 µg/ml) - ის და Spectinomycin (3 µg/ml) - ის LCB6183 ბაქტერიაზე ზემოქმედების შემთხვევაშიც, თუმცა ამ ანტიბიოტიკების აღებული კონცენტრაციებით გამოწვეული ფილამენტაციის ხარისხი უფრო ნაკლებია ვიდრე Ampicillin- ის 2 µg/ml-ის შემთხვევაში იქნა მიღებული.

როგორც კვლევებით დადგინდა ფაგი T5 (~5x10³ pfu/ml) გავლენას არ ახდენს *E.coli* ბაქტერიის მორფოლოგიურ ცვლილებაზე, ხოლო T5 ფაგისა და შერჩეული

ანტიბიოტიკების (Amp, Cm, Spc) კომბინაციური ზემოქმედება ბაქტერიის მორფოლოგიურ ცვლილებაზე ისეთივეა, როგორც იქნებოდა ანტიბიოტიკის ადებული კონცენტრაციის მოქმედების შემთხვევაში.

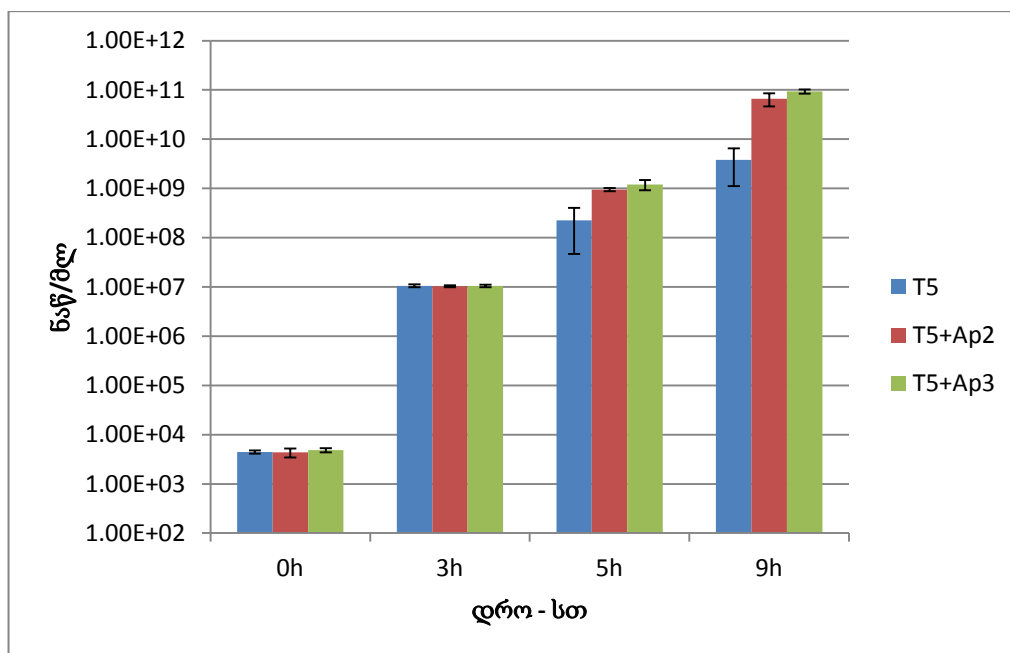


სურ. 4. ეპი-ფლუორესცენტული მიკროსკოპით მიღებული სურათები. 1, 2, 3, 4, 5, - *LCB6183* ბაქტერიის მორფოლოგიური სურათი, კონტრასტული გამოსახულება (1- ბაქტერიის კონტროლი, 2 - T5 ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) ფაგის ზემოქმედება, 3 - 2 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin-ის ზემოქმედება, 4 - 2 $\mu\text{g/ml}$ Cloramphenicol-ის ზემოქმედება, 5 - 3 $\mu\text{g/ml}$ Spectinomycin-ის ზემოქმედება, 6 - T5-ისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და 2 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin-ის ზემოქმედება, 7 - T5-ისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და 2 $\mu\text{g/ml}$ Cloramphenicol-ის ზემოქმედება, 8 - T5-ისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და 3 $\mu\text{g/ml}$ Spectinomycin-ის ზემოქმედება). 1ა,2ა,3ა,4ა,5ა,6ა,7ა,8ა - 1ა - *LCB6183* ბაქტერიის გამოსახულება მიღებული GFP გამოსხივებით (1ა - ბაქტერიის კონტროლი, 2ა - T5 (MOI-10-4 pfu/b) ფაგის ზემოქმედება, 3ა - 2 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin-ის ზემოქმედება, 4ა - 2 $\mu\text{g/ml}$ Cloramphenicol-ის ზემოქმედება, 5ა - 3 $\mu\text{g/ml}$ Spectinomycin-ის ზემოქმედება, 6ა - T5-ისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და 2 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin-ის ზემოქმედება, 7ა - T5-ისა ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml)

და 2 µg/ml Cloramphenicol-ის ზემოქმედება, 8ა - T5-ისა (~5x10³ pfu/ml) და 3 µg/ml Spectinomycin-ის ზემოქმედება)

3.5 T5 ფაგის ტიტრზე ანტიბიოტიკ ამპიცილინის (2მკგ/მლ და 3 მკგ/მლ) ზეგავლენის შესწავლა

ნახ. 22- ზე მოცემულია T5 ფაგის ტიტრზე ამპიცილინის მცირე - სუბ-ლეტალური კონცენტრაციების გავლენა, ბაქტერიის *E.coli* Mg1655 ფაგით ინფიცირებიდან სხვადასხვა დროს შემდეგ (0 სთ, 3 სთ, 5 სთ, 9 სთ). როგორც ნახაზიდან ჩანს, ფაგის ტიტრი ანტიბიოტიკის შემცველ გარემოში უფრო სწრაფად იზრდება, ვიდრე სტანდარტულ გარემო პირობებში. ტიტრებს შორის განსხვავება შესამჩნევია უკვე ინფიცირებიდან 5 საათის შემდეგ, ხოლო 9 საათის შემდეგ სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის დამატებით გამოწვეული ფაგის ტიტრი 1-2 რიგით აღემატება საკონტროლო (გარემო ანტიბიოტიკის გარეშე) სინჯარაში მიღებულ ფაგის ტიტრს.



ნახ. 22. T5 ფაგის ტიტრი ამპიცილინის 2 µg/ml და 3 µg/ml კონცენტრაციის ზემოქმედებით. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის საშუალო მნიშვნელობა.

3.6 ბაქტერიის მუტაგენეზის სიხშირეების და რეზისტენტობის განვითარების შესწავლა

3.6.1 T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინირებული მოქმედების შესწავლა ბაქტერიების მუტაგენეზის სიხშირეზე

T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის კომბინირებული მოქმედების შესწავლა ბაქტერიების მუტაგენეზის სიხშირეზე

მიკრობის (*E.coli* MG1655 ApR pPY98) დამის კულტურას 1:100 ვანზავებდით (OD~0.01) LB ბულიონში, ასევე LB ბულიონში, რომელიც შეიცავს 2 µg/ml და 3 µg/ml ამპიცილინს. შტამები ვაინფიცირდებიან ფაგით და ვათავსებდით თერმოსტატში სანჯღრეველაზე 7სთ. უჯრედები ვაცენტრიფუგებდით (3 წუთი 10 000rpm) ორჯერ და ვანზავებდით PBS ხსნარში. სხვადასხვა განზავებები გადაგვქონდა LB აგარიან ფინჯნებზე და ფინჯნებზე, რომელიც დამატებით შეიცავდა ტეტრაციკლინს (3,5 µg/ml). ფინჯნებს ვათავსებდით თერმოსტატში 18-24სთ და შემდეგ ვითვლიდით მუტაგენეზის სიხშირეს.

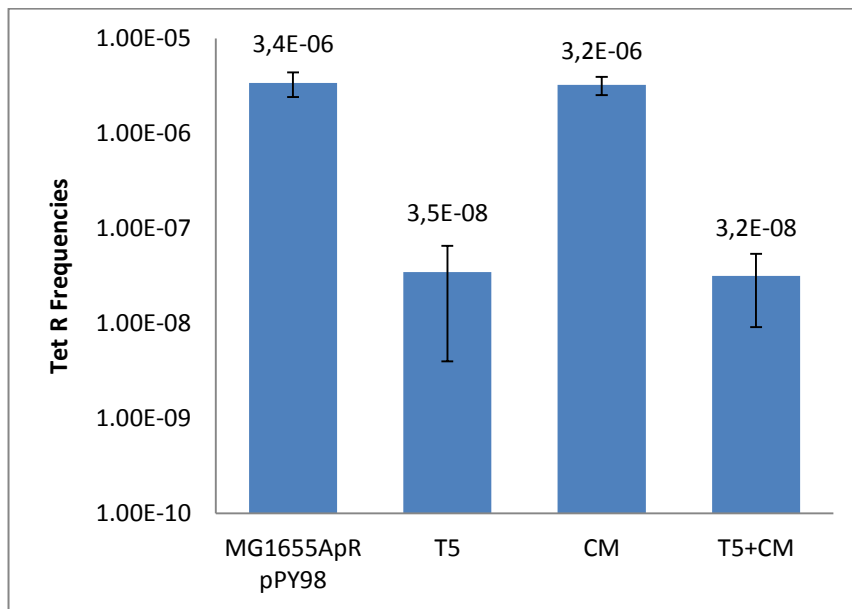
$$\text{მუტაგენეზის სიხშირე} = \text{CFU(TC)} / \text{CFU(LB)}$$

CFU(TC) - ტეტრაციკლინის შემცველ ფინჯნებზე მიღებული ბაქტერიული კოლონიების რიცხვი

CFU(LB) - საკონტროლო სინჯარებზე, სუფთა LB აგარის შემცველ სინჯარებზე მიღებული ბაქტერიული კოლონიების რიცხვი.

ნახ.23-ზე მოცემულია ფაგისა და ანტიბიოტიკის გავლენა ბაქტერიული მუტაგენეზის სიხშირეზე. კვლევა ჩატარებულია *E.coli* MG1655 ApR pPY98 შტამით. შტამი შეიცავს პლაზმიდს, რომელიც ჩვეულებრივ მგრძობიარეა ანტიბიოტიკ

ტეტრაციკლინის მიმართ, ხოლო სტრესის შედეგად ხდება პლაზმიდაში ტეტრაციკლინ-რესისტენტული გენების ექსპრესია, რაც საშუალებას იძლევა დავაკვირდეთ მუტაგენზის სიხშირის ცვლილებას სხვადასხვა სტრესულ პირობებში. ჩვენ სტრეს ფაქტორებად შევარჩიეთ T5 ფაგი ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml) და ანტიბიოტიკი ქლორამფენიკოლის სუბ-ლეტალური კონცენტრაცია (0,7 $\mu\text{g/ml}$). კვლევამ გვაჩვენა მუტაგენზის სიხშირის მკვეთრი შემცირება ფაგის ზემოქმედების შედეგად, ასევე ფაგისა და ანტიბიოტიკის ერთობლივი მოქმედების შემთხვევაშიც.



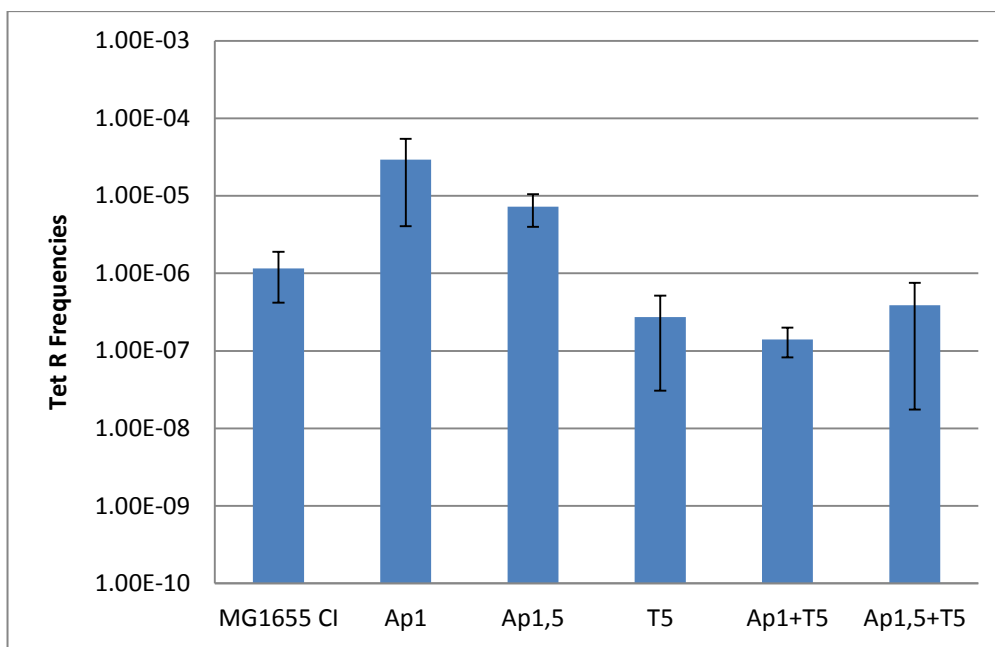
ნახ. 23. ბაქტერიული მუტაგენზის სიხშირეები (Tet R Frequencies) გამოწვეული T5 ფაგის ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml), ანტიბიოტიკ ქლორამფენიკოლის 0,7 $\mu\text{g/ml}$ კონცენტრაციის და მათი კომბინაციის მოქმედებით *MG 1655ApRpPY98* ბაქტერიულ კულტურაზე. (სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის საშუალო მნიშვნელობა).

T5 ფაგისა და ანტიბიოტიკ ამპიცილინის კომბინირებული მოქმედების შესწავლა ბაქტერიების მუტაგენზის სიხშირეზე:

მუტაგენზის სიხშირის შესწავლა *E.coli MG 1655 CI tet* - ბაქტერიის გამოყენებით *E.coli* დამის კულტურას ვანზავებდით LB ბულიონში (1/100,000), ან LB ბულიონში, რომელიც შეიცავდა ამპიცილინს, T5-ს, ან ამპიცილინ + T5-ს (სუბ-ლეტალურ

კონცენტრაციებს) და საინკუბაციოდ ვათავსებდით 10 სთ 37°C-ზე სანჯღრეველაზე. შესაბამისი განზავებები გადაიტანებოდა LB შემცველ ფინჯნებზე და ფინჯნებზე რომელსაც დამატებული ჰქონდა 12,5 µg/ml ტეტრაციკლინი. cfu-ს საერთო რიცხვი განისაზღვრებოდა LB ფინჯნებიდან. კოლონიების დათვლა ხდებოდა 37°C-ზე 2 დღიანი ინკუბაციის შემდეგ, კოლონიების რიცხვის თანაფარდობა - ტეტრაციკლინის შემცველ ფინჯნებზე მიღებული რიცხვის ფარდობა საკონტროლო სინჯარებზე მიღებულ რიცხვთან გვაძლევდა ინფორმაციას მუტაგენეზის სიხშირეზე.

ჩვენს მიერ ასევე შესწავლილი იქნა ფაგისა და ანტიბიოტიკ ამპიცილინის სუბლეტალური დოზების გავლენა ბაქტერიული მუტაგენეზის სიხშირეზე. კვლევა ჩატარებულია *MG1655 CI* შტამით. შტამი შეიცავს ტეტრაციკლინ რეზისტენტულ გენს, რომლის ინდუცირებაც ხდება სტრესის პირობებში, მაგ. ანტიბიოტიკების ზეგავლენის შედეგად. ამგვარად სტრესის შედეგად ხდება ქრომოსომული ტეტრაციკლინ-რეზისტენტული გენების ექსპრესია, რაც საშუალებას იძლევა დავაკვირდეთ მუტაგენეზის სიხშირის ცვლილებას სხვადასხვა პირობებში. ჩვენ სტრეს ფაქტორებად შევარჩიეთ T5 ფაგი (~5x10³ pfu/ml) და ამ შემთხვევაში ანტიბიოტიკი ამპიცილინის სუბლეტალური კონცენტრაცია (1 µg/ml და 1,5 µg/ml). კვლევამ გვაჩვენა მუტაგენეზის სიხშირის შემცირება ფაგის ზემოქმედების შედეგად, ასევე ფაგისა და ანტიბიოტიკის ერთობლივი მოქმედების შემთხვევაშიც. იხ ნახ. 24

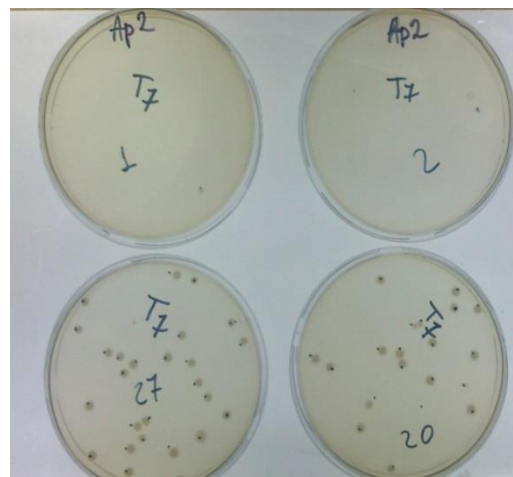
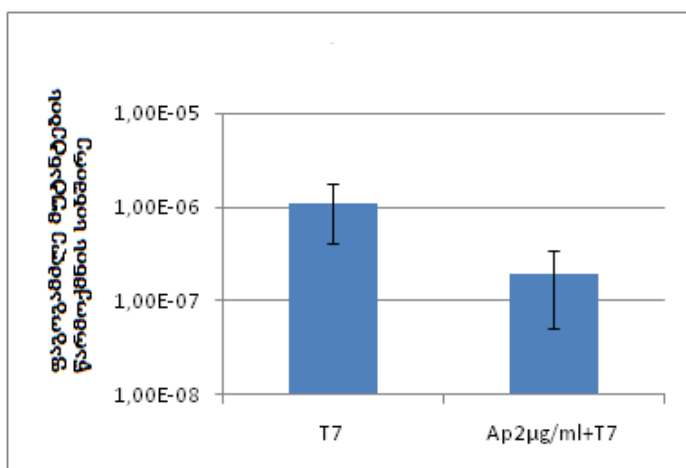


ნახ. 24. ბაქტერიული მუტაგენუზის სიხშირეები (Tet R Frequencies) გამოწვეული T5 ფაგის ($\sim 5 \times 10^3$ pfu/ml), ანტიბიოტიკ ამპიცილინის 1 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ კონცენტრაციების და ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინაციის მოქმედებით. სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის საშუალო მნიშვნელობა.

3.6.2 ანტიბიოტიკების სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის გავლენა ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნაზე

ბაქტერიული კულტურას (დამის კულტურა) ტიტრით 10^7 - 10^8 cfu/ml თანაბრად ვანაწილებდით 1,5%-იანი აგარის შემცველ ფინჯნებზე, რომელიც შეიცავდა 0,2 ml ბაქტერიოფაგს ტიტრით 5×10^8 - 1×10^9 pfu/ml, ან ანტიბიოტიკს სუბ-ლეტალური კონცენტრაციით, ან ფაგსა და ანტიბიოტიკს სუბ-ლეტალური კონცენტრაციით. ფინჯნებს ვათავსებდით თერმოსტატში საინკუნბაციოდ 37°C -ზე 18-20 სთ. შემდეგ ხდებოდა წარმოქმნილი მუტანტების რაოდენობის დათვლა და სიხშირეების გამოთვლა შემდეგი ფორმულით: $F=n/N$, სადაც n- ფაგოგამძლე მუტანტების საშუალო რაოდენობაა, ხოლო N - მიკრობული კულტურის კოლონიების რიცხვი კონტროლში.

ნახ.25-ზე მოცემულია ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირეები T7 ბაქტერიოფაგის შემთხვევაში, შესწავლილია ამპიცილინის სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის გავლენა ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნაზე და ნაჩვენებია სიხშირის შემცირება ანტიბიოტიკის აღებული კონცენტრაციის გამოყენების შემთხვევაში.



ნახ.25. ფაგოგამძლე ბაქტერიული მუტანტების წარმოქმნის სიხშირე. ანტიბიოტიკ ამპიცილინის სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის გავლენა რეზისტენტობის წარმოქმნის სიხშირეზე. (3 დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის საშუალო მნიშვნელობა). სურათზე ნაჩვენებია წარმოქმნილი ფაგოგამძლე მუტანტები LB აგარის და LB+ ამპიცილინი 2µg/ml-ის შემცველ ფინჯნებზე.

3.7 ბაქტერიოფაგებისა და ბეტა-ლაქტამ ანტიბიოტიკის მოქმედების შესწავლა *P.aeruginosa* ბიოფილმების ფორმირებაზე

წარმოდგენილ კვლევაში ბიოფილმების ფორმირებას ვახდენდით 96 უჯრიან მიკროფინჯანზე [133]. ფინჯნის თითოეული უჯრაში შეგვქონდა 100 μ l 100-ჯერ განზავებული ღამის კულტურა. შემდეგ ვახდენდით ფინჯნის 8, ან 24 სთ - იან ინკუბაციას 37 °C ტემპერატურაზე. ფაგის, ანტიბიოტიკის, ან მათი კომბინაციის დამატება ხდებოდა კულტურასთან ერთად, ან 8, 24 სთ - იანი ინკუბაციის შემდეგ. რის შემდეგაც მიკროფინჯანი კვლავ თავსდებოდა საინკუბაციოდ. ფინჯნები შეიცავდა როგორც დადებით, ასევე უარყოფით კონტროლს. ინკუბაციის შემდეგ ფინჯნები ირეცხებოდა ჯერ გამოხდილი წყლით, ხოლო შემდეგ ემატებოდა 0.1 % (V/V) კრისტალური იისფერი. ფინჯნებს ვტოვებდით ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთი და ხდებოდა მათი გარეცხვა გამოხდილი წყლით და გასაშრობად ვათავსებდით ქაღალდზე. შემდეგ ყველა უჯრას ვამატებდით 95 % ეთანოლს და 15 წუთის შემდეგ შთანთქმას ვნახულობდით სპექტროფოტომეტრით 595 ნმ- ზე.

ბაქტერიოფაგების ლიზისური აქტივობა PAO1 ბაქტერიებზე [121].

ჩვენს მიერ გამოყოფილი და გასუფთავებული იქნა ფაგის კლონი (*p.aeruginosa* phage N1) პიოფაგის კოქტეილიდან PAO1 ბაქტერიულ შტამზე. როგორც გამოყოფილი ბაქტერიოფაგი, ასევე, პიობაქტერიოფაგი შევამოწმეთ მათ ლიზისურ აქტივობაზე ფსევდომონას შერჩეული შტამის მიმართ. ინდიკატორული შტამის, ღამის კულტურის, ერთი წვეთს (5×10^8 cfu/ml) მარყუჟის საშუალებით ვავლებდით პეტრის ფინჯანზე დიამეტრის პარალელური შტრიხების სახით [84]. ფინჯნებს ვტოვებდით გასაშრობად ოთახის ტემპერატურაზე (15-20 წთ), რის შემდეგაც შტრიხებს ვამატებდით 0,05 ml საკვლევ ფაგს. წვეთების გაშრობის შემდეგ, ფინჯნებს ვათავსებდით თერმოსტატში 18-24 სთ 37° C-ზე. ფაგის არსებობის შემთხვევაში, ბაქტერიული კულტურაზე აღინიშნებოდა ლიზისური უბნები [127]. ლიზისური აქტივობის სპექტრის განსაზღვრისთვის შემოღებულია შემდეგი აღნიშვნები: +4 - აბსოლუტური ლიზისი (მოქმედების უბანი სრულიად გამჭვირვალეა); +3,+2 - მეორადი ზრდა (მოქმედების უბანზე სუსტად

აღინიშნება მეორეადი ზრდა); +1 - არასრული ლიზისი (ლიზისური უბნები მოცემულია წვრილი წერტილების სახით); 0 - შტამი რეზისტენტულია ფაგისადმი.

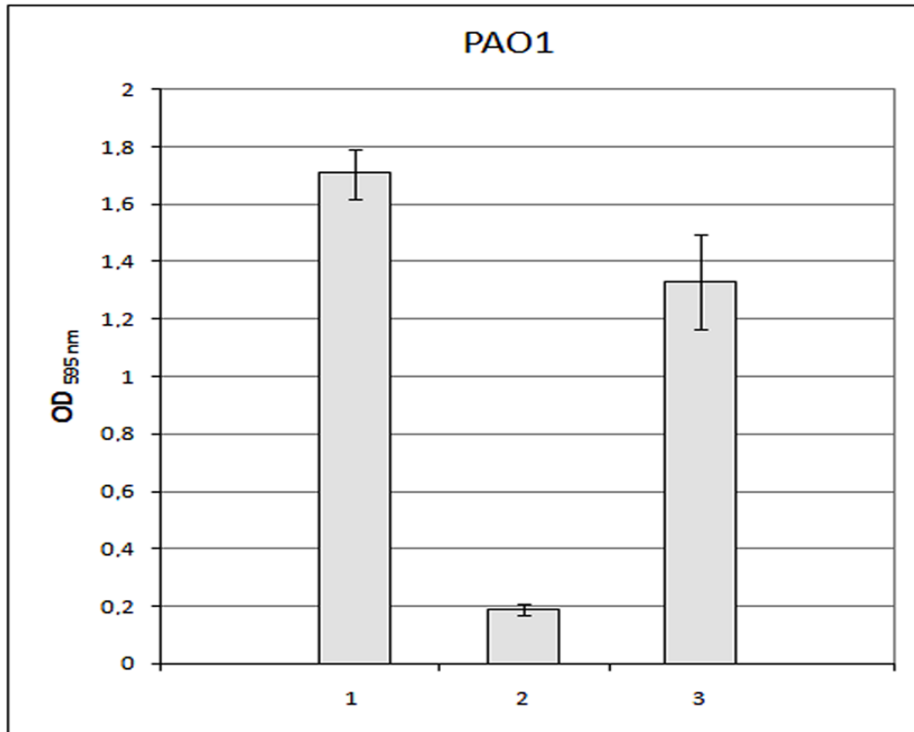
ტესტირებული შტამი იყო მგრძობიარე ორივე შემთხვევაში. ლიზისური აქტივობის სპექტრი მოცემულია ცხრილში N2.

ცხრილი N2. ლიზისური აქტივობის სპექტრი

<i>P.aeruginosa</i> შტამი	ბაქტერიოფაგი	ლიზისური აქტივობა
PAO1	პიობაქტერიოფაგი	3+
	phage N1	4+

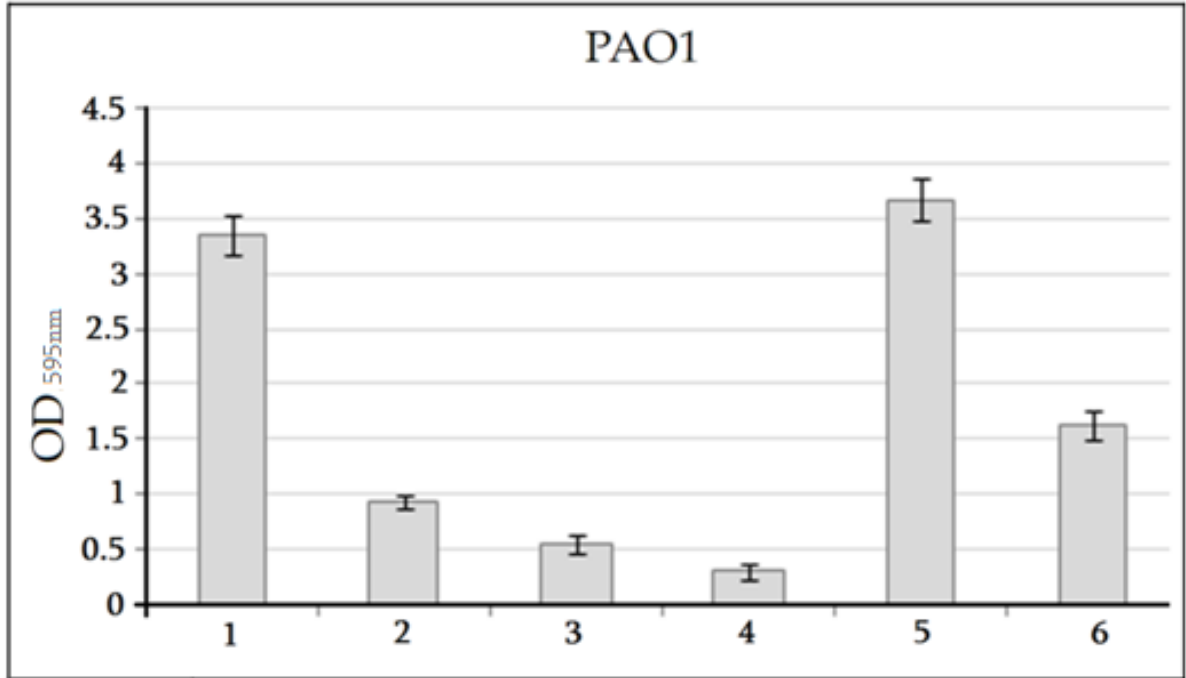
ფაგების მოქმედება ბიოფილმების ფორმირებაზე [121]

შევისწავლეთ ბაქტერიოფაგების, როგორც იზოლირებული, ასევე ფაგის კოქტეილის ზემოქმედება ფსევდომონა აეროგინოზას შერჩეული შტამის მიერ ბიოფილმების ფორმირებაზე. ბიოფილმების ფორმირებას ვაკვირდებოდით 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ. კვლევამ აჩვენა, რომ ფაგის ზემოქმედებით ხდება ბიოფილმების წარმოქმნის მნიშვნელოვანი დათრგუნვა. იხ. ნახ 26.



ნახ. 26. ფაგის კოქტეილისა და გამოყოფილი ფაგის კლონის ეფექტი ბიოფილმების წარმოქმნაზე. 1 - ბიოფილმის კონტროლი ფორმირებული 24 სთ-ის შემდეგ PAO1 შტამის მიერ. 2 - პიოზაქტერიოფაგის ეფექტი ($\sim 3 \times 10^6$ pfu/ml). 3 - გამოყოფილი ფაგის კლონის ეფექტი (phage 1 $\sim 3 \times 10^6$ pfu/ml).

ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების სინერგიული ეფექტი [121] ბეტა-ლაქტამ ანტიბიოტიკისა (იმიპენემი, რომლის MIC (მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია) $\sim 1.5 \mu\text{g/ml}$) და ფაგის კოქტეილის კომბინირებულმა მოქმედებამ გვაჩვენა სინერგიული ეფექტი ბიოფილმების ფორმირებაზე. ბიოფილმების ფორმირებას ვახდენდით 24 სთ ინკუბაციით, შემდეგ ვამატებდით ფაგს და ანტიბიოტიკს შერჩეული კონცენტრაციით და ვაკვირდებოდით ბიოფილმების ფორმირებას შემდეგი 24 სთ ინკუბაციის მერე. იხ. ნახ. 27.



ნახ. 27. სინერგიული ეფექტი: 1 - ბიოფილმის კონტროლი 48სთ ინკუბაციის შემდეგ. 2 - პიობაქტერიოფაგის ეფექტი ბიოფილმის ფორმირებაზე (3×10^6 pfu/ml) . 3 - ფაგისა (3×10^6 pfu/ml) და იმიპენემის ($0,9 \mu\text{g/ml} < \text{MIC}$) ეფექტი. 4 - ფაგისა (3×10^6 pfu/ml) და იმიპენემის ($3,5 \mu\text{g/ml} > \text{MIC}$). 5 - იმიპენემის ეფექტი ($0,9 \mu\text{g/ml} < \text{MIC}$). 6 - იმიპენემის ეფექტი ($3,5 \mu\text{g/ml} > \text{MIC}$).

აღწერილი ექსპერიმენტების მსგავსი კვლევები ჩავატარეთ ასევე კლინიკური შტამების გამოყენებით. კვლევაში გამოყენებული იყო დუსელდორფის ჰეინრიჰ-ჰეინის სახელობის უნივერსიტეტის კლინიკაში (Kinderklinik) გამოყოფილი 11 შტამი. ცხ. 3-ზე მოცემულია pyophage-ის მიმართ შტამების მგრძობელობა - ლიზისური აქტივობის სპექტრი. ყველა შესწავლილმა შტამმა გამოავლინა მგრძობელობა შერჩეული ბაქტერიოფაგის პრეპარატის მიმართ, ასევე შევისწავლეთ ამ შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობაც. ცხ. 4-ზე მოცემულია კლინიკური შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის ტესტირების შედეგი.

ცხრილი N3. ლიზისური აქტივობის სპექტრი

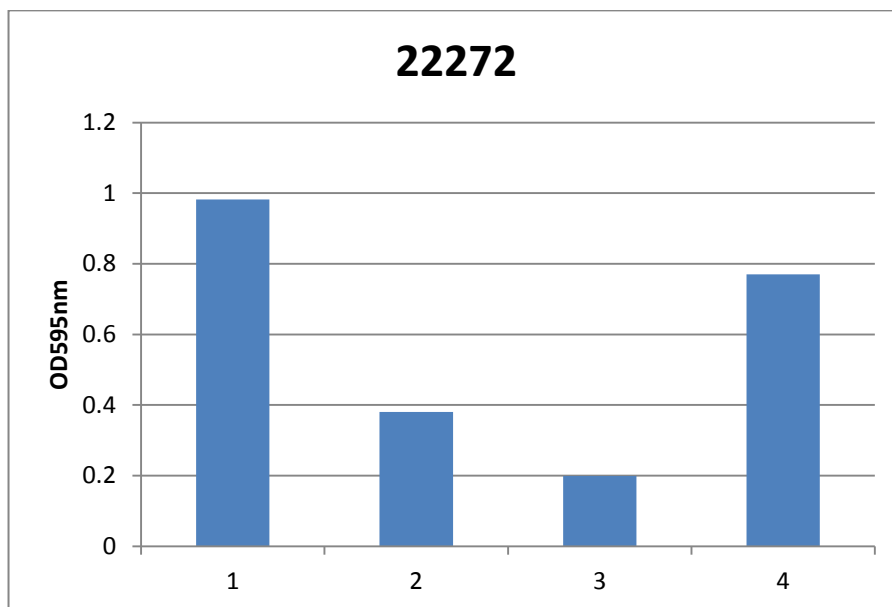
P.aeruginosa	ბაქტერიოფაგი	ლიზისური აქტივობის სპექტრი
22210	Pyophage	3+
22369		3+
22270		1+
22345		1+
27095		4+
27297		2+
22272		1+
8647		4+
8640		2+
8710		2+
8681		1+

ცხრილი N4. კლინიკური შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობა

P.aeruginosa	Antibiotic					
	IPM	MEM	PIP	CAZ	FEP	ATM
N						
22101	S	S	S	S	S	S
22369	S	S	S	S	S	S
22270	R	R	R	R	R	R
22345	S	S	S	S	S	S
27095	S	S	R	R	I	R
27297	S	S	S	S	S	S
22272	S	S	S	S	S	S
8647	S	S	S	S	S	S
8640	S	S	S	S	S	S
8710	S	S	S	S	S	S
8681	R	R	R	R	R	R

22272, 22369, 27097, 8640, 22345 - შტამები და ანტიბიოტიკი იმიპენემი (IPM) შევარჩიეთ ამ შტამების მიერ ბიოფილმების წარმოქმნაზე ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინირებული მოქმედების შესასწავლად. ყველა შესწავლილი შტამის შემთხვევაში მიღებული იყო მსგავსი შედეგი ზემოთ აღწერილი PAO1 ბაქტერიული შტამით ჩატარებული ექსპერიმენტული შედეგისა. მაგ. ნახ. 28-ზე ნაჩვენებია პიობაქტერიოფაგისა და იმიპენემის (IPM) კომბინირებული მოქმედების ეფექტი 22272 კლინიკური შტამის ბიოფილმების ფორმირებაზე, ანტიბიოტიკის გამოყენებული კონცენტრაცია აღემატებოდა MIC მნიშვნელობას (2 µg/ml). ზემოთ აღწერილი პროტოკოლის მიხედვით ბიოფილმების ფორმირებას ვახდენდით 8 სთ და შემდეგ ვამატებდით ფაგსა (3×10^6 pfu/ml) და ანტიბიოტიკს (2,8 µg/ml). ფინჯანს ვტოვებდით 24 სთ თერმოსტატში 37°C-ზე და შემდეგ ვკითხულობდით შედეგს სპექტროფოტომეტრზე.

როგორც ნახაზიდან ჩანს, ფაგი, ჩვენ შემთხვევაში პოლიკომპონენტური პოლივალენტური თერაპიული პიობაქტერიოფაგი (Pyophage), ანტიბიოტიკთან (IPM) კომბინაციაში კიდევ უფრო ეფექტურად შლის *p.aeruginosa* შტამების მიერ წარმოქმნილ ბიოფილმებს, ვიდრე დამოუკიდებლად. კვლევაში გამოყენებული ანტიბიოტიკი, შერჩეული კონცენტრაციით ბიოფილმების დაშლაზე გავლენას ვერ ახდენს.



ნახ. 28. სინერგიული ეფექტი: 1 - ბიოფილმის კონტროლი 22272 შტამის 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ. 2 - პიობაქტერიოფაგის ეფექტი ბიოფილმის ფორმირებაზე (3×10^6 pfu/ml) . 3 - ფაგისა (3×10^6 pfu/ml) და იმიპენემის ($2,8 \mu\text{g/ml} > \text{MIC}$) ეფექტი. 4 - იმიპენემის ეფექტი ($2,8 \mu\text{g/ml} > \text{MIC}$).

4. მიღებული შედეგების ანალიზი

ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლა თანამედროვე მედიცინის გლობალურ პრობლემას წარმოადგენს, განსაკუთრებით გართულებულია ანტიბიოტიკორეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობა. ანტიბიოტიკორეზისტენტობის საყოველთაო გავრცელება მიოთხოვს ახალი კლასის ანტიბიოტიკების, ან სხვა ანტიმიკრობული აგენტების აღმოჩენას ინფექციური დაავადებების ეფექტური მკურნალობისათვის [9,10]. დღეისათვის რეზისტენტული შტამების მიმართ ბრძოლის ერთ-ერთ ყველაზე ეფექტურ საშუალებად ბაქტერიოფაგებს განიხილავენ. კლასიკური ანტიბიოტიკოთერაპიისაგან განსხვავებით ფაგოტერაპია მიჩნეულია უვნებლად, რამეთუ მათი გამოყენებისას არანაირი სერიოზული გვერდითი მოვლენები არ არის გამოვლენილი [9, 10, 84]. ფაგებთან ერთად არსებული ანტიბიოტიკების გამოყენებას (კომბინაცია: ანტიბიოტიკი+ფაგი) გააჩნია დიდი პერსპექტივა და კვლევის ეს მიმართულება ანტიბიოტიკოთერაპიის ერთ-ერთ ალტერნატიულ საშუალებად შეიძლება იყოს განხილული.

ჩვენ მიერ ჩატარებული სამუშაოს ძირითად მიზანს წარმოადგენდა ბაქტერიების გამრავლებაზე ანტიბიოტიკის და ბაქტერიოფაგის კომბინაციის მოქმედებით გამოწვეული ეფექტების დამზერა, ბაქტერიებისა და ამ ანტიმიკრობული აგენტების ურთიერთქმედების, რეზისტენტულობის მექანიზმების შესწავლა ფიზიკური და ბიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით.

წარმოდგენილ ნაშრომში შევისწავლეთ, თუ როგორ იცვლება ბაქტერიების გამრავლების სიჩქარე, როგორც ბაქტერიების ტიპების მიხედვით, ასევე სხვადასხვა გარემოპირობების და ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების თანაობისას. ჩატარდა ექსპერიმენტები ბაქტერიების გამრავლების სიჩქარის შესასწავლად სხვადასხვა გარე შემოქმედებაზე დამოკიდებულებით, ასევე კომბინირებული შემოქმედების პირობებში.

თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტში, ბიოფიზიკის კათედრაზე აგებულია ხსნარების სიმღვრივის საზომი მგრძნობიარე დანადგარი, რომელიც შექმნილ იქნა სპეციალურად, ბაქტერიების (ზოგადად უჯრედების) გამრავლების პროცესზე უწყვეტ

დროით რეჟიმში დასამზერად. ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა დადგინდეს ექსპერიმენტებში მონაწილე ბაქტერიების გამრავლების სიჩქარის ცვლილებები, რაც გამოწვეული იქნება გარე პარამეტრების, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების, ბაქტერიოფაგების და სხვა ზემოქმედებით ბაქტერიულ კულტურაზე. დანადგარში, სინათლისთვის საკვები გარემო რომ იყოს ერთგვაროვანი, პერისტალტიკური ტუმბო საკვებ სითხეს ამოდრავებს ციკლურ რეჟიმში, ხოლო ბაქტერიების გამრავლებისათვის ხელსაყრელი ტემპერატურატურა საკვების თერმოსტატირებით მიიღწევა (ნახ. 5).

ამრიგად წარმოდგენილი ნაშრომით ჩვენ ვთავაზობთ მიკრობიოლოგებს ბაქტერიების გამრავლებაზე დაკვირვების ბიოფიზიკური მეთოდის გამოყენებას, რომლის მეშვეობითაც შესაძლებელია დამზერილი იყოს უწყვეტ დროის რეჟიმში ბაქტერიების გამრავლების პროცესი. შეგვიძლია შევადაროთ და განვასხვავოთ ბაქტერიოფაგებისა და ანტიბიოტიკების მოქმედების ეფექტები ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე. მეთოდის მუშაობის პრინციპი დამყარებულია მოვლენაზე, რომლის მიხედვითაც ბაქტერიების საკვებში გამრავლების პროცესს თან ახლავს საკვების სიმღვრივის გაზრდა, რომლის დაფიქსირებაც შესაძლებელია საკვებში გასული სინათლის ინტენსივობის გაზომვით.

უწყვეტ დროის რეჟიმში ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე დამზერას გააჩნია ის უპირატესობა, რომ ამ გზით შესაძლებელია დადგენილი იყოს მექანიზმები, რითიც ხასიათდება სხვადასხვა წარმომავლობის ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულების ბაქტერიის მემბრანასთან ურთიერთქმედების ბუნება. ასეთი მიდგომით საინტერესოა გაირკვეს ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე თუ რა გავლენას ახდენს, მაგალითად ანტიბიოტიკები, ისევე როგორც დადგინდეს თუ როგორია ცოცხალი ბაქტერიების და ბაქტერიოფაგების ურთიერთქმედების ადრეული ეტაპების მექანიზმები. ამ ურთიერთქმედებაზეა დამოკიდებული შედეგა თუ არა ფაგით ბაქტერიის ინფიცირების პროცესი, რაც მეტად მნიშვნელოვანია. ჩვენს მიერ შექმნილი ტურბიდიმეტრის მეთოდით, შესაძლებელია მაღალი სიზუსტით განისაზღვროს ხსნარის გამჭვირვალობის ხარისხი, რაც ფაქტობრივად განსაზღვრავს ხსნარში ბაქტერიების

ტიტრს. მნიშვნელოვანი ინფორმაციაა იმის დადგენა თუ როგორ წარიმართება ბაქტერიების გამრავლების პროცესი დროში, როცა იცვლება საკვები არეს შემადგენლობა, ან საკვებ არეში შეტანილი იქნება სხვადასხვა ანტიბაქტერიული აგენტები, მაგალითად ანტიბიოტიკები და ბაქტერიოფაგები.

ტურბიდიმეტრული და სპექტროფოტომეტრული მეთოდების გამოყენებამ საშუალება მოგვცა შეგვესწავლა ბაქტერიების ზრდის დინამიკა და შეგვეფასებინა მათი გამრავლების პროცესების დეტალები. ორივე მეთოდი დამყარებულია დროის მიხედვით ნიმუშის ოპალესცენციის გაზომვაზე. ტურბიდიმეტრული მიდგომა საშუალებას გვაძლევს დავაკვირდეთ ბაქტერიის რეპლიკაციის პროცესს და განვსაზღვროთ მათზე სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური თვისებების მქონე მოლეკულების ზემოქმედება მაღალი სიზუსტით.

უნდა აღინიშნოს ჩვენ მიერ გამოყენებული ტურბიდიმეტრული მეთოდის მნიშვნელოვანი უპირატესობა. ზოგადი მიკრობიოლოგიური - პეტრის ფინჯნებზე მიკრობთა დათესვის მეთოდის გამოყენება მიკრობთა ზრდის ეტაპების მონიტორინგის საშუალებას არ იძლევა, შესაძლოა ვერ მოხერხდეს იმ მნიშვნელოვანი მონაცემების დეტექტირება, რასაც ადგილი აქვს ბაქტერიის ზრდის პროცესში. მაშინ, როცა ტურბიდიმეტრული მეთოდი ბაქტერიის ზრდის ეტაპების დეტალური შესწავლის საშუალებას იძლევა. მაგ. ნახ. 9ბ-ზე ნაჩვენებია ბაქტერია-ანტიბიოტიკის ურთიერთქმედების ტურბიდიმეტრული ჩანაწერი, სადაც მრუდი გვიჩვენებს ანტიბიოტიკის მიმართ ბაქტერიის მგრძობელობას, რაც კლასიკური მიკრობიოლოგიური დათესვის მეთოდით 18 სთ ინკუბაციის შემდეგ შესაძენევი არ იქნებოდა.

დღეს დღეობით ითვლება, რომ ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლის ეფექტური საშუალება ანტიბიოტიკებია, თუმცა არსებობენ ისეთი ბაქტერიები, რომლის განადგურება ანტიბიოტიკებით პრაქტიკულად შეუძლებელია. ანტიბიოტიკების ეფექტური მოქმედება დამოკიდებულია იმაზე თუ რამდენად მარტივად მიაღწევს ანტიბიოტიკი ინფექციის კერას და როგორი იქნება მისი კონცენტრაცია, რომელიც უნდა

აღმატებოდეს ინფექციის ჩახშობისთვის საჭირო მინიმალური კონცენტრაციის მნიშვნელობას (MIC). სამკურნალო პრეპარატების ეფექტურობა უნდა ეფუძნებოდეს მიზანმიმართულად პათოგენური მიკროორგანიზმების გამრავლების დათრგუნვას, თანაც ისე რომ ამ პროცესში მინიმალური იყოს ორგანიზმზე ბაქტერიებიდან გამოყოფილი ტოქსინების გავლენა.

ჩვენ მიერ მიღებული შედეგები ხაზგასმით აღნიშნავს უჯრედის ფუნქციონირებაში მემბრანის მნიშვნელობას, კერძოდ ბაქტერიის ზრდის მრუდის ფორმა მნიშვნელოვნად დამოკიდებულია საკვები ბულიონის შემადგენლობაზე, საკვების კონცენტრაციაზე (ნახ 8 ა, ბ, გ). მიღებული შედეგების მიხედვით, ბაქტერიულ საკვებ ბულიონზე ალკოჰოლის დამატება იწვევს ბაქტერიის ზრდის პროცესის შენელებას (ნახ. 8 დ.), ხდება ზრდის მრუდის დროში წანაცვლება სტანდარტულ მრუდთან შედარებით. ჩვენი მოსაზრებით აღნიშნული გამოწვეულია ბაქტერიის ახალ გარემო პირობებთან ადაპტაციის გამო.

იმის მიხედვით, თუ რა სახისაა მემბრანის რეცეპტორებისა და ანტიმიკრობული აგენტების ურთიერთქმედება, უჯრედის საპასუხო რეაქციაც შესაბამისია. წარმოდგენილი შედეგებით გამოვლინდა, რომ უჯრედის საპასუხო რეაქცია განისაზღვრება არა მარტო ანტიმიკრობული აგენტების არსებობით გარემოში, არამედ უჯრედის რეაქცია მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული მათ კონცენტრაციაზე. ექსპერიმენტებმა აჩვენა ორი განსხვავებული ტიპის მოქმედება ბაქტერიულ უჯრედზე, რომელიც გვიჩვენებს უჯრედის რეაქციის დამოკიდებულებას ანტიბაქტერიული აგენტის კონცენტრაციაზე. კერძოდ, თუ ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების (ანტიბიოტიკები, ფაგები) კონცენტრაცია მცირეა (ნაკლების MIC მნიშვნელობაზე), მაშინ ბაქტერია ავლენს მდგრადობას მათი მოქმედების მიმართ (ნახ. 9, 10, 11). ხოლო მაღალი კონცენტრაციის (>MIC) ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების მოქმედების პირობებში, ბაქტერიის გამრავლების პროცესი წყდება. ასევე, მაგ. თუ განვიხილავთ ნახ. 9ა-ზე მოცემული მრუდებს, მცირე რაოდენობით ამპიოქსი (<1მკგ/მლ) ვერავითარ ზეგავლენას ვერ ახდენს რეპლიკაციის პროცესზე, ხოლო თუ ამპიოქსის კონცენტრაცია

2მკგ/მლ-ს აღემატება, ბაქტერიის რეპლიკაცია წყდება (ნახ. 9 ა, მრუდი 3). იგივე შეიძლება ითქვას სხვა ანტიმიკრობული აგენტების ბაქტერიაზე მოქმედების შემთხვევაშიც.

ამრიგად, ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევებზე დაყრდნობით შემუშავებული იქნა ანტიმიკრობული აგენტების ბაქტერიაზე მოქმედების მექანიზმის მოდელი, რომლის მიხედვითაც ბაქტერია გააგრძელებს თუ შეწყვეტს გამრავლებას დამოკიდებულია ანტიმიკრობული აგენტების რიცხვზე, რომლებიც ბაქტერიის მემბრანაზე არსებულ რეცეპტორებთან არის ურთიერთქმედებაში. მოდელის მიხედვით შეიძლება აიხსნას თუ რით არის განპირობებული ანტიბიოტიკის მინიმალური ინჰიბირებული კონცენტრაციის (MIC) მნიშვნელობა. კერძოდ, როდესაც ბაქტერიის მემბრანაზე არსებული რეცეპტორული ადგილების (ან მემბრანაზე არსებული მგრძობიარე ადგილების (MSS)) რიცხვი მინიმალურად იქნება ანტიმიკრობული აგენტებით შევსებული, ე.წ. კრიტიკულ MIC -ის მნიშვნელობაზე მეტად, მაშინ ბაქტერია ვერ მრავლდება, ხოლო თუ ეს რიცხვი კრიტიკულ მნიშვნელობაზე მცირე აღმოჩნდება, მაშინ ბაქტერიაზე გავლენას არ ავლენს ამ ბიოლოგიურად აქტიური პრეპარატის მოქმედება და იგი ჩვეულებრივ განაგრძობს ფუნქციონირებს. ცხადია ამ მოდელში ნაგულისხმებია, რომ თითოეული ანტიმიკრობული აგენტის კონცენტრაციის კრიტიკული მნიშვნელობა დამოკიდებული იქნება ბაქტერიის მემბრანაზე არსებული შესაბამისი რეცეპტორების რიცხვზე.

საინტერესო შედეგები იქნა მიღებული მაღალი ტემპერატურის მოქმედების ეფექტის შესწავლისას *E.coli* ბაქტერიის ზრდაზე უწყვეტი დროით რეჟიმში. ჩვენმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ *E.coli* ბაქტერია 53°C ტემპერატურის პირობებში წყვეტს გამრავლებას. ბაქტერიების კვდომის შემთხვევაში, ტურბიდიმეტრით მიღებულ ჩანაწერზე მრუდი იქნებოდა დროის ღერძის პარალელური, ჩვენ მიერ მიღებულ შედეგში კი ადგილი აქვს მრუდის დახრას სიმღვრივის შემცირების მიმართულებით (ნახ. 12). მიღებული შედეგი შეიძლება აიხსნას ბაქტერიების მიერ თვით-განადგურების მოვლენით, რასაც მოყვება ტიტრის შემცირება. მსგავსად შეიძლება აიხსნას ასევე

ტემპერატურული შოკის მოქმედება ბაქტერიებზე. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ბაქტერიის მემბრანაზე არსებული რეცეპტორები, რომლებიც მგრძნობიარეა გარემოს ტემპერატურის მიმართ, სწრაფად რეაგირებენ ნებისმიერ ტემპერატურულ ცვლილებაზე. გარემოს ტემპერატურის ცვლილების შესახებ ინფორმაცია გადაეცემა უჯრედის შიგნით, იწყება უჯრედის დეჰიდრატაცია და ხდება მასზე საპასუხო რეაქცია. უჯრედის მხრიდან ტემპერატურის ცვლილებაზე საპასუხო რეაქციას სჭირდება გარკვეული დრო (ჩვენი ექსპერიმენტის შემთხვევაში საჭირო არის ნახევარი საათი - ეს დრო საჭიროა იმისათვის, რომ უჯრედმა მოახდინოს თავდაცვითი რეაქციები ტემპერატურულ შოკზე და დაიწყოს რეჰიდრატაცია), რაც დასრულდება როგორც კი გარე მემბრანის რეცეპტორები (თერმული რეცეპტორები) აღიდგენენ მათ პირველად სტრუქტურას. ტემპერატურული შოკის გამეორების შემთხვევაში, ბაქტერიის რეაქციაც და შესაბამისად ტურბიდომეტრული ჩანაწერიც იმეორებს წინა თერმული შოკის შედეგს (ნახ. 12 ბ). ბაქტერებს აქვთ მსგავსი რეაქცია მყავით გამოწვეული შოკის შემთხვევაშიც (ნახ. 13). გარემოში მყავის დამატებისას ბაქტერიის ტიტრი და შესაბამისად მრუდიც იწყებს მკვეთრ შემცირებას დროის მიხედვით. გარემოს მყავიანობის მიმართ მგრძნობიარე რეცეპტორებიც ასევე მოთავსებულია მემბრანის გარე ზედაპირზე და ახდენენ სწრაფ რეაგირებას ნებისმიერ ცვლილებაზე, რის გამოც გარემოში მყავიანობის გაზრდას თან ახლავს ბაქტერიის თითქმის მყისიერი რეაქცია - წყდება ბაქტერიის რეპლიკაცია და იწყება ბაქტერიების დაშლა, რაც გამოიხატება მრუდის მკვეთრი შემცირებით.

განვიხილოთ ბიოლოგიური (გრაციას ორშრიანი აგარის) მეთოდით განსაზღვრული ფაგის ტიტრი. ჩვენ მიერ (სურ. 3) მიღებული ექსპერიმენტული შედეგი ნათლად გვიჩვენებს, რომ პეტრის ფინჯნების გამოყენებით შესაძლოა განიზასღვროს მხოლოდ გარკვეული რიცხვი ნეგატიური კოლონიების წარმომქნელი ფაგებისა და არა რეალური რიცხვი ხსნარში არსებული სიცოცხლისუნარიანი ბაქტერიოფაგებისა. ჩატარებული კვლევებით დავადგინეთ, რომ ბაქტერიოფაგების რეალური რიცხვი რამოდენიმე რიგით მეტია აღნიშნული ბიოლოგიური მეთოდით განსაზღვრულ ფაგის ტიტრთან შედარებით.

ჩვენ მიერ დასახულ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ამოცანას წარმოადგენდა ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების ეფექტების შესწავლა ბაქტერიების ზრდასა და ცხოველყოფილობაზე. როგორც ვირულენტური, ასევე ზომიერი ფაგები იყო გამოყენებული კვლევისთვის, სხვადასხვა კლასის ანტიბიოტიკები შეირჩა, რათა შეგვედარებინა და განგვესხვაებინა დამოუკიდებელი და კომბინაციური მოქმედებები ამ ანტიმიკრობული აგენტებისა ბაქტერიებზე. შევისწავლეთ სხვადასხვა კონცენტრაციების ბაქტერიოფაგებისა და ანტიბიოტიკების ეფექტები, რათა შეგვეჩინა მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციები შემდგომში სინერგიული ეფექტების დასამზერად.

კვლევებით გამოვლინდა ფაგი/ანტიბიოტიკის სინერგიული კომბინაციები (იხ. ცხრილი 1) - ფაგებისა და ანტიბიოტიკების სუბ-ლეტალური კონცენტრაციების გარკვეული კომბინაციები, როლმებიც ეფექტურად თრგუნავს ბაქტერიების ზრდას, მაშინ, როცა ცალკე აღებული მოცემული კონცენტრაციის ანტიმიკრობული აგენტების ეფექტი ბაქტერიის ზრდაზე ან ძალიან სუსტია, ან საერთოდ არ აღინიშნება.

ჩვენ მიერ მიღებული შედეგებიდან (ნახ. 14 - ნახ.16) ბაქტერიების ზრდის მრუდის ხასიათი მიუთითებს ბაქტერიოფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების შედეგად ბაქტერიული კონცენტრაციის მნიშვნელოვან შემცირებაზე. ფაგებისა და ანტიბიოტიკების სინერგია დამზერილი იქნა სხვა მეცნიერების მიერაც, დღეისათვის მსოფლიოში, ევროპასა და ამერიკაში დიდი ინტერესია კვლევის ამ მიმართულებაზე და ბევრი სამეცნიერო ჯგუფი, მათ შორის ჩვენი, მუშაობს ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების ეფექტების შესწავლაზე [135, 136, 137]. ამ ანტიმიკრობული აგენტების კომბინირებული გამოყენება შესაძლოა ერთ-ერთი ყველაზე ეფექტური ალტერნატიული საშუალება იყოს ანტიბიოტიკოთერაპიისა, მულტირეზისტენტული ბაქტერიული შტამებით გამოწვეული ინფექციური დაავადებების წინააღმდეგ.

უნდა აღინიშნოს, რომ ანტიბიოტიკებთან კომბინაციაში სინერგიული ეფექტები შეიძლება დამზერილი იყოს არამარტო ვირულენტური, არამედ ზომიერი ფაგების

გამოყენების დროსაც, კერძოდ ჩვენ კვლევებში სინერგიული ეფექტები ნაჩვენები იქნა HK620 და P1 ზომიერი ფაგების შემთხვევაშიც (ცხრილი 1, ნახ 17. ნახ. 17). მიღებული შედეგი შეიძლება დაკავშირებული იყოს პროფაგის (ბაქტერიულ უჯრედში ინტეგრირებული ფაგის გენომი) აქტივაციასთან გარემოში მცირე რაოდენობის ანტიბიოტიკების დამატებისას. ჩვენი ვარაუდით, ანტიბიოტიკების აღნიშნული კონცენტრაციები წარმოქმნის ბაქტერიისთვის სტერულ გარემოს, რომლის დროსაც ხდება პროფაგის ვირულენტური თვისებების სტიმულაცია, რაც იწვევს ფაგის ინდუქციას - ახალი ვირუსული ნაწილაკების წარმოქმნას. ამგვარად, ანტიბიოტიკის მცირე კონცენტრაციის გავლენით, პროფაგი უფრო დიდი სიხშირით გადის განვითარების ლიზისურ ციკლს, ვიდრე ლიზოგენურს, რასაც თან ახლავს ბაქტერიული უჯრედის ლიზისი.

ტურბიდიმეტრული და სპექტროფოტომეტრული მეთოდებით მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები ნათლად გვიჩვენებს, რომ შემოთავაზებული მიდგომით მცირე დროში შესაძლოა დადგინდეს ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციების მკურნალობის ეფექტური გზები. აღნიშნული მეთოდი ცოცხალი უჯრედების ბიოლოგიური მახასიათებლების შეფასების საშუალებას იძლევა, რაც კლინიკური თვალსაზრისით ძალზედ მნიშვნელოვანი და საჭირო ინფორმაციაა.

იმისათვის, რომ დაგვეხასიათებინა ზემოთ აღწერილი მოდიფიცირებული სპექტროფოტომეტრული მეთოდით მიღებული სინერგიული ეფექტები და დაგვედგინა ამ ეფექტის გამომწვევი მიზეზი, შევისწავლეთ ფაგის ნაწილაკების წარმოქმნა - განვსაზღვრეთ ფაგის ტიტრი მასზე მცირე რაოდენობის ანტიბიოტიკების მოქმედების პირობებში. როგორც ჩვენი კვლევებით ვაჩვენეთ, მიღებული სინერგიული ეფექტი განპირობებულია ფაგის ნაწილაკების წარმოქმნის სტიმულაციით, რაც გამოწვეულია სუბლეტალური კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის მოქმედებით. კერძოდ T5 ფაგის ზრდის შემთხვევაში, თუ საკვებ ბულიონს დამატებული აქვს ბეტა-ლაქტამ ანტიბიოტიკის - ამპიცილინის მცირე კონცენტრაციები (ნახ. 14), ბაქტერიის ფაგით ინფიცირებიდან 16 სთ-ის შემდეგ ფაგის ტიტრი დაახლოებით 1-2 რიგით აღემატება სტანდარტულ

პირობებში (მხოლოდ ბულიონი) გამრავლებული ფაგის ტიტრს. როგორც ვაჩვენეთ, (ცხ. 1) ამპიცილინსა და T5 ფაგს აქვთ სინერგიული ეფექტი *E.coli* ბაქტერიის ზრდაზე, ასევე სინერგიული ეფექტი აქვთ T5-თან სპექტინომიცინსა და ქლორამფენიკოლს. ნახ 14 - ნახ. 16-დან ჩანს, რომ როგორც ამპიცილინის, ასევე მცირე კონცენტრაციის ქლორამფენიკოლისა და სპექტინომიცინის მოქმედებაც T5 ფაგის ტიტრის ზრდას იწვევს. კვლევის ფარგლებში ასევე შევისწავლეთ T5 ფაგის გამრავლება დროის მიხედვით მასზე ანტიბიოტიკ ამპიცილინის მცირე კონცენტრაციების ზემოქმედებისას (ნახ. 22). ინფიცირებიდან 5სთ-ის გასვლის შემდეგ უკვე შესამჩნევია ფაგის ტიტრის მატება ამპიცილინის ზეგავლენით, ხოლო 9 სთ-ის შემდეგ ფაგის ტიტრი ამპიცილინის შემცველ სინჯარებში 1-2 ხარისხით მეტია სტანდარტულ პირობებში გაზრდილ ფაგის ტიტრთან შედარებით. ამ შედეგებიდან გამომდინარე ვფიქრობთ, რომ ფაგი/ანტიბიოტიკის სინერგიული ეფექტი გამოწვეულია ანტიბიოტიკის ზემოქმედების შედეგად ფაგის წარმოქმნის სტიმულაციით. ამის საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ფაგები უფრო ეფექტურად მრავლდება, როცა საკვებ ბულიონს (გარემოს სადაც ფაგი მოქმედებს) დამატებული აქვს მცირე კონცენტრაციით (<MIC) ანტიბიოტიკები.

უფრო ღრმად რომ შეგვესწავლა და დაგვედასტურებინა ბაქტეროფაგებისა და ანტიბიოტიკების ბაქტერიებზე მოქმედებისას გამოვლენილი სინერგიული ეფექტი, გამოვიყენეთ სხვა ბიოფიზიკური მეთოდიც, კერძოდ გამდინარე ციტომეტრია, რომელიც საშუალებას იძლევა განვსაზღვროთ ბაქტერიების კონცენტრაციები და შევისწავლოთ მათზე სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების მოქმედების ეფექტები. ჩვენ მიერ ჩატარებული კვლევებით ფაგებისა და ბაქტერიების სინერგიული ეფექტები ნაჩვენები იქნა ციტომეტრული მეთოდითაც (ნახ. 19 - ნახ. 21),

ჩატარებულ კვლევებში ასევე გამოვიყენეთ ეპი ფლუორესცენტული მიკროსკოპია, რათა შეგვესწავლა თუ რა ზეგავლენას ახდენს ფაგი, ანტიბიოტიკი და მათი ერთობლიობა ბაქტერიული უჯრედების მორფოლოგიაზე. როგორც სურათებიდან ჩანს ანტიბიოტიკის, განსაკუთრებით კი ამპიცილინის სუბ-ლეტალური კონცენტრაციები განაპირობებს ბაქტერიების ფილამენტაციას. შესაძლოა ანტიბიოტიკების მცირე

კონცენტრაციებით ფაგის ნაწილაკების წარმოქმნის სტიმულირებაც ამ მოვლენით აიხსნას. ფაგის გამოყენებული კონცენტრაცია გავლენას არ ახდენს ბაქტერიის მორფოლოგიაზე.

როგორც უკვე ნაჩვენებია, ანტიბიოტიკის სუბ-ლეტალური კონცენტრაციები იწვევს ბაქტერიულ მუტაგენეზს [134], ამიტომ კვლევის ფარგლებში მიზნად დავისახეთ და ჩვენი კვლევის ერთ-ერთ ამოცანას წარმოადგენდა შეგვესწავლა რა ეფექტი ექნებოდა ფაგისა და ანტიბიოტიკების სუბ-ლეტალური კონცენტრაციების ზემოქმედებას ბაქტერიულ მუტაგენეზზე. როგორც ჩვენი შედეგებიდან (ნახ 23, ნახ 24) ჩანს, ბაქტერიების მიერ რეზისტენტობის შექმნა მნიშვნელოვნად მცირდება ფაგებისა და სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის ანტიბიოტიკების კომბინირებული მოქმედების დროს, ანტიბიოტიკების სუბ-ლეტალური კონცენტრაციების დამოუკიდებლად მოქმედებასთან შედარებით, ასევე უნდა აღინიშნოს ფაგოგამძლე მუტანტების წარმოქმნის სიხშირის შემცირებაც სუბ-ლეტალური კონცენტრაციის ანტიბიოტიკის საკვებ ნიადაგზე დამატების შემდეგ (ნახ. 25). მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანი ინფორმაციაა მიკრობის მიერ ანტიბიოტიკორეზისტენტობის შექმნისა და გავრცელების პრობლემის გადასაჭრელად.

ნაშრომში ასევე წარმოდგენილია ფაგებისა და ანტიბიოტიკების ერთობლივი ზემოქმედება ბაქტერიების ბიოფილმების ფორმირებასა და მათ დაშლაზე. როგორც ცნობილია, *P. aeruginosa* არის პირობით პათოგენური ბაქტერია, რომელიც გამოირჩევა მაღალი ბუნებრივი და შექმნილი რეზისტენტობის უნარით ანტიბაქტერიული პრეპარატების მიმართ. ეს მიკროორგანიზმები ადვილად კოლონიზდებიან სამედიცინო ხელსაწყოებზე და ქმნიან ბიოფილმებს და ამგვარად სერიოზულ საფრთხეს უქმნიან ნოზოკომიალური ინფექციების განვითარებას [29-32]. ჩვენი კვლევის ერთ ერთ მნიშვნელოვანი ამოცანა იყო შეგვესწავლა *P. aeruginosa*-ს მიერ წარმოქმნილ ბიოფილმებზე ანტიბიოტიკისა და ფაგის კომბინირებული მოქმედება. უნდა აღინიშნოს, რომ კვლევაში გამოყენებული 11 კლინიკური შტამის ტესტირებამ ფაგომგრძნობელობასა და ანტიბიოტიკომგრძნობელობაზე (ცხ. 3, ცხ. 4), აჩვენა, რომ ყველა ტესტირებული

შტამი მგრძობიარეა პიოზაქტერიოფაგის მიმართ, მაშინ, როცა შტამების ნაწილი იყო რეზისტენტული *P.aeruginosa* ბაქტერიებით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობისთვის ფართოდ გამოყენებული ანტიბიოტიკის მიმართ. ფაგის კოქტეილიდან - პიოზაქტერიოფაგიდან გამოვყავით მონოფაგი და შევისწავლეთ, როგორც მონოფაგის ასევე პიოფაგის (რომელიც შეიცავს *P. aeruginosa* ფაგის რამდენიმე კლონს) კომბინირებული მოქმედების ეფექტი *P. aeruginosa* ბიოფილმების წარმოქმნაზე. კვლევებით ვაჩვენეთ, რომ მონოფაგს, მიუხედავად მაღალი ლიზისური აქტივობისა (ცხრილი 2), არ ქონდა უნარი მოეხდინა მნიშვნელოვანი ეფექტი *P.aeruginosa* ბიოფილმების დაშლაზე (ნახ. 26), მაშინ როცა ფაგის კოქტეილმა - პიოფაგმა აჩვენა ძლიერი ეფექტი ბიოფილმების დაშლაზე. ეს შედეგი შეიძლება აიხსნას ბიოფილმების შიგნით ფაგორეზისტენტული მუტანტების წარმოქმნით, ისე რომ მონოფაგი ვეღარ ახდენს გავლენას მის ზრდაზე. ხოლო ფაგის კოქტეილის შემთხვევაში, მუტაციების წარმოქმნას ფაგის სხვადასხვა კომპონენტის მიმართ სჭირდება უფრო მეტი დრო, ვიდრე მონოფაგის მიმართ, შედეგად პოლიკომპონენტური ფაგი ახორციელებს ბიოფილმების დაშლაზე მნიშვნელოვან ზემოქმედებას. ჩვენ მიერ მიღებული შედეგებით ნაჩვენები იქნა, რომ ფაგისა და ანტიბიოტიკის კომბინირებული მოქმედებას, აქვს სინერგიული მოქმედება ბაქტერიების, ჩვენს შემთხვევაში *P.aeruginosa*-ს მიერ წარმოქმნილ ბიოფილმების დაშლაზე. ნახ. 27, ნახ. 28 -დან ჩანს, რომ ანტიბიოტიკის კონცენტრაციებს, რომლებიც მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციის მიდამოშია, არ აქვს ეფექტი ბიოფილმების დაშლაზე, მაშინ როცა ფაგთან კომბინაციაში უფრო ეფექტურად ამცირებს ბიოფილმების წარმოქმნას და იწვევს მის დაშლას, ვიდრე ფაგის კოქტეილი დამოუკიდებლად.

ჩვენი კვლევები ადასტურებს ფაგოთერაპიის მნიშვნელოვან უპირატესობას მუკოიდური შტამებით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობისას, ანტიბიოტიკოთერაპიასთან შედარებით. ფაგებისა და ანტიბიოტიკების კომბინირებულ გამოყენებას კი შეიძლება ჰქონდეს კიდევ უფრო ძლიერი ეფექტი იმ მწვავე

დაავადებების მკურნალობისას, რომელიც ასოცირებულია ბიოფილმების წარმომქმნასთან.

ამრიგად, სინერგიის შემთხვევაში ანტიბიოტიკების თერაპიული დოზები შესაძლებელია შემცირდეს, ეს კი ამ აგენტების მიერ გამოწვეული ზოგიერთი არასასურველი გვერდითი მოვლენების თავიდან არიდების საშუალებას მოგვცემს. ჩვენ მიერ მიღებული შედეგები და ასევე სხვა მეცნიერების მიერ გამოქვეყნებული სამეცნიერო-კვლევითი შრომები [135, 136, 137] ანტიბიოტიკებისა და ფაგების კომბინაციური გამოყენების პერსპექტივაზე მეტყველებს ბაქტერიული ინფექციების ეფექტური მკურნალობისათვის.

დასკვნები:

1. ჩვენს მიერ შექმნილი იქნა ტურბიდიმეტრი, რომლის მეშვეობით შესაძლებელი გახდა მოგვეხდინა ბაქტერიის გამრავლების პროცესის მონიტორინგი უწყვეტ დროით რეჟიმში. ამით შესაძლებელი გახდა დაგვედგინა ის კანონზომიერებები რითიც ხასიათდება ისეთი გარე ფაქტორების ზემოქმედება ბაქტერიების გამრავლების პროცესზე როგორებიცაა ბაქტერიების საკვების კონცენტრაცია, ალკოჰოლი, ანტიბიოტიკები, ბაქტერიოფაგები, მჟავიანობა, ტემპერატურა.
2. ჩვენი კვლევებით დადგენილ იქნა, რომ ხსნარში ბაქტერიოფაგების რეალური რიცხვი რამდენიმე რიგით აღემატება კლასიკური ბიოლოგიური მეთოდით (გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდი) განსაზღვრულ ფაგების ტიტრს.
3. მოდიფიცირებული სპექტროფოტომეტრული მეთოდის გამოყენებით განსაზღვრული იქნა *E.coli* ბაქტერიებისთვის ფაგების (T4, T5, T7, DDVI, Pyophage, HK620, P1) და ანტიბიოტიკების (Ampiox, Ampicillin, Gentamicin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Kanamycin, Spectinomycin) ე.წ. მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციები (MIC).
4. შემოთავაზებულია მოდელი თუ რით არის განპირობებული ბაქტერიაზე მოქმედებისას ანტიმიკრობული აგენტების მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაციის (MIC) მნიშვნელობები. მოდელის მიხედვით სანამ არ მოხდება ანტიბაქტერიული აგენტების მიერ ბაქტერიული უჯრედის მემბრანაზე არსებული მათი რეცეპტორული საიტების მინიმალური რიცხვით შევსება, მანამდე ანტიბაქტერიულ აგენტებს არ გააჩნიათ ბაქტერიულ უჯრედის ფუნქციონირებაზე არავითარი ზეგავლენა.
5. მოდიფიცირებული სპექტროსკოპული მეთოდის გამოყენებით დავადგინეთ, რომ ფაგისა და ანტიბიოტიკის ნარევის (მაგ. T5 და Ampicillin-ის კოქტეილი) ზემოქმედებას ბაქტერიების ზრდის პროცესზე ახასიათებს სინერგიული მოქმედება. რაც იმას ნიშნავს, რომ კოქტეილში შემავალი თითოეული კომპონენტის კონცენტრაცია MIC-ზე მცირეა, მაგრამ ანტიბიოტიკებისა და ბაქტერიოფაგების ნარევი იწვევს ბაქტერიების ზრდის პროცესის ინჰიბირებას.

6. სპექტროფოტომეტრული მეთოდით დავადგინეთ, რომ *P.aeruginosa*-ს ბიოფილმების ფორმირებაზე და მის დაშლაზე კომპლექსური ფაგის (Pyophage) და Imipenem ანტიბიოტიკის კომბინირებულმა მოქმედებამ გამოავლინა სინერგიული ეფექტი, რაც იმაში გამოიხატა, რომ ფაგის და ანტიბიოტიკის კომბინირებული ზემოქმედების შედეგად ბაქტერიების მიერ ბიოფილმების წარმოქმნის პროცესი შეწყდა.
7. კვლევებით დავადგინეთ კანონზომიერება, რაც იმაში გამოიხატება, რომ თუ ბაქტერიოფაგების გამრავლებისას (მაგ. T5) საკვებ ბულიონში შეტანილი იქნება მცირე კონცენტრაციის ანტიბიოტიკი (<MIC, მაგ. Ampicillin), მაშინ ბაქტერიოფაგის გამრავლების შედეგად მიღებული საბოლოო ტიტრის მნიშვნელობა რამდენიმე რიგით აღემატება სტანდარტულ პირობებში (სუფთა საკვებ ბულიონში) გამრავლებულ ფაგების ტიტრს.
8. ნაჩვენები იქნა, რომ ბაქტერიის რეზისტენტობა მნიშვნელოვნად შემცირებულია თუ იგი იმყოფება ანტიბიოტიკების და ფაგების ნარევის გარემოცვაში, მაშინ როცა ბაქტერიების მიერ რეზისტენტობის შექმნა გაადვილებულია კოქტეილის ცალკეული კომპონენტის მოქმედებით.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Howie J. (1986). Penicillin: 1929-40. *Br Med J (Clin Res Ed)*. Jul 19; 293(6540): 158–159;
2. Guo Y, Wang J, Niu G, Shui W, Sun Y, Zhou H, Zhang Y, Yang C, Lou Z, Rao Z. (2011). A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein Cell*. 2(5):384-94;
3. Koirala KD, Thapa SD (2011). Antibiotic resistance and the future. *JAMA*. 305(22):2293;
4. Svava F, Rankin (2011). The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. *BMC Evol Biol*. May19;11(1):130;
5. Velvadapu V, Paul T, Wagh B, Klepacki D, Guvench O, Mackerell A Jr, Andrade RB. (2011). Desmethyl Macrolide Analogues to Address Antibiotic Resistance: Total Synthesis and Biological Evaluation of 4, 8,10-Tridesmethyl Telithromycin, *ACS Med Chem Lett*. (1):68-72;
6. Burke A. Cunha (2001). Antibiotic side effects. Volume 85, Issue 1, Pages 149–185;
7. Bajaj P, Prematta MJ, Ghaffari G, (2011). A sixty-five-year-old man with rash, fever, and generalized weakness. *Allergy Asthma Proc*. 32(1):e1-3;
8. Okayasu S, Matsuura K, Kondoh Y, Tsuruta E, Takashima E, Suzuki M, Nagai T, Yasuda K, Itoh Y , (2011). A survey on diarrhea and convenience of intake associated with a single-dose extended release formulation of azithromycin. *Pharmazie*. 66(3):226- 9;
9. Sulakvelidze Alexander, Alavidze Zemphira, and Morris J. Glenn, Jr (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(3): 649–659;
10. Abedon Stephan T., Kuhl Sarah j., Blasdel Bob G., and Kutter Elisabeth Martin. (2011). Phage treatment of human infections *Bacteriophage* 1:2, 66-85;
11. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*. (2008) Oct;11(5):393-400;
12. Chanishvili Nina. (2009). A literature review of the practical application of bacteriophage research. Eliava institute of bacteriophage, microbiology and virology, Tbilisi, Georgia;

13. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, Balloy V, Touqui L, (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 201(7):1096-104;
14. Carlton M Richard. (1999). Phage Therapy: Past History and Future Prospects; *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 47, 267–274;
15. Schopf JW (1994). Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91 (15): 6735–42;
16. DeLong EF, Pace NR (2001). "Environmental diversity of bacteria and archaea". *Syst Biol.* 50 (4): 470–8;
17. Matthew B. Stott¹ and Michael W. Taylo. (2016). Microbial ecology research in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 40(1): 12-28;
18. Aislabie J, Deslippe JR (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. In Dymond JR ed. *Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends.* Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand;
19. Ignacio Belda, Javier Ruiz, et al. (2017) Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*, 22(2). pii: E189;
20. Sharpe M. (1979). Lactic acid bacteria in the dairy industry. *International journal of dairy industry.* Volume 32, Issue 1 Pages 9–18;
21. Huan Fang, Jie Kang et al. (2017). Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives *Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives.* *Microbial Cell Factories* 16(1):15;
22. Wang G1, Raaijmakers JM. (2004). Antibiotics production by bacterial agents and its role in biological control. *The journal of applied ecology.* 15(6):1100-4;
23. Neus Ferrer-Miralles and Antonio Villaverde. (2013). Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact.* 12: 113;
24. Babar Hassan, M. Asghar et al. (2003) Isolation and Screening of Amino Acids Producing Bacteria from Milk. *Biotechnology*, 2:18-29;
25. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95 (12): 6578–83.

26. Bacterial cell division and the septal ring. D. S. Weiss. *Molecular Microbiology* (2004) vol. 54, pp. 588-597;
27. Solveig Fossum, Elliott Crooke, and Kirsten Skarstad. (2007) Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 26(21): 4514–4522;
28. Barber T. et al. (1994). *Mycobacteriosis and Nocardiosis in the Immunocompromised Host. Clinical Approach to Infection in the Compromised Host (Third Edition)*, Plenum Medical Book Company, New York;
29. López, Daniel, Vlamakis Hera, Kolter Roberto (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2 (7): a000398;
30. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology.* 2 (2): 95–108;
31. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology.* 54: 49–79;
32. Antonio Finelli, Claude V. Gallant, Keith Jarvi. (2003). Use of In-Biofilm Expression Technology To Identify Genes Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J Bacteriol.* 2003 May; 185(9): 2700–2710;
33. Romling U et al. (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* 272: 541– 561;
34. Rehm Bernd H. A, McDougald Diane et al. (2008). *Pseudomonas aeruginosa: A Model for Biofilm Formation.* Chapter 9;
35. Feng, Peter, et al., (2002). Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, *Bacteriological Analytical Manual* (8th Ed.);
36. Singleton P (1999). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* (5th ed.). Wiley. pp. 444–454;
37. Vogt RL, Dippold L (2005). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002. *Public Health Reports.* 120 (2): 174–8;

38. Eisenstein Barry and Zaleznik Dori, (2000). Enterobacteriaceae. Mandell, Douglas, & Bennett's Principles and practice of infectious diseases, Fifth Edition, Chap. 206, pp. 2294-2310;
39. Frenzen Paul D., et al., (2005). Economic Cost of Illness due to Escherichia coli O157 Infections in the United States, Journal of food protection, Vol. 68, pp. 2623-2630;
40. Bell, B.P., et al., (1994). A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. Journal of american medical association, Vol. 272, pp. 1349-1353;
41. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 308 (5728): 1635–8;
42. Bentley R, Meganathan R (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Microbiological Reviews. 46 (3): 241–80;
43. Hudault S, Guignot J, Servin AL (2001). Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection. Gut. 49 (1): 47–55;
44. Reid G, Howard J, Gan BS (2001). Can bacterial interference prevent infection?. Trends in Microbiology. 9 (9): 424–428;
45. Suvarna K., D. Stevenson, et al. (1998). Menaquinone (Vitamin K2) Biosynthesis: Localization and Characterization of the menA Gene from Escherichia coli. J. Bacteriol. vol. 180 no.10 pp.2782-2787;
46. Fux CA, Shirliff M, Stoodley P, Costerton JW (2005). Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis?. Trends Microbiol. 13 (2): 58–63;
47. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P (1998). Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. J. Bacteriol. 180 (9): 2442–9;
48. Lederberg, Joshua; E.L. Tatum (1946). Gene recombination in E. coli. Nature. 158 (4016): 558;
49. Xavier Gomis-Rüth, Miquel Coll (2006). Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. Current Opinion in Structural Biology. 16 (6): 744–752;
50. The Phage Course – Origins. Cold Spring Harbor Laboratory. (2006);

51. Benzer, Seymour (1961). On the topography of the genetic fine structure. PNAS. 47 (3): 403–15;
52. Lim JY et al., (2010) A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010 Jan; 20(1): 5–14.;
53. Griffin, Patricia and Tauxe, Robert, (1991) The Epidemiology of Infections Caused by Escherichia coli O157:H7, Other Enterohemorrhagic E. coli, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome, Epidemiological review, Vol. 13, pp. 60-98;
54. Furtado GH, Gales AC, Perdiz LB, Santos AF, Medeiros EA. Prevalence and clinical outcomes of episodes of ventilator-associated pneumonia caused by SPM-1-producing and non-producing imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Rev Soc Bras Med Trop. 2011 Oct;44(5):604-6;
55. Kuwabara M, Kusano N, Shimizu E, Shimizu W, Kobayashi K, Koda S, Doi M, Sugai M, Kumon H. (2011). Epidemiology and drug susceptibility of Pseudomonas aeruginosa strains isolated in the Chugoku region of Japan. Infection Forum in the Chugoku Region. Jpn J Antibiot.64(2):97-108;
56. Blanco C, Núñez MX. (2010). Endophthalmitis by Pseudomonas aeruginosa. After penetrating keratoplasty, case report with an epidemiological investigation. Biomedica. 30(3):327-31;
57. Li X-Z., Ma D., Livermore D.M. et al. (1994) Role of efflux pumps in intrinsic resistance of Pseudomonas aeruginosa: active efflux as a contributing factor to betalactam resistance. J. Antimicrob.Agents and Chemotherapy. 38 (8) : 1742-1752;
58. Hirsch Elizabeth B, H Tam Vincent. (2010) Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. 10(4): 441–451;
59. Narten M, Rosin N, Schobert M, Tielen P. (2011). Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Urinary Tract Isolates and Influence of Urinary Tract Conditions on Antibiotic Tolerance. Curr Microbiol, 64(1):7-16;

60. Assael BM. (2011). Aztreonam inhalation solution for suppressive treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 9(11):967-73;
61. Покровский В.Н., Поздеев О.К. (1998) Медицинская микробиология, Геотар, Моск;
62. Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. (1983) Микробиология, Медицина, Москва;
63. Poole K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.*2:65;
64. Wesam, A. Hassanein. (2009). Molecular Identification of Antibiotics Resistant *pseudomonas Aeruginosa* Wt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3): 2144-2153;
65. Olson KM, Starks CM, Williams RB, O'Neil-Johnson M, Huang Z, Ellis M, Reilly JE, Eldridge GR. (2011). Novel Pentadecenyl Tetrazole Enhances Susceptibility of MRSA Biofilms to Gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(8):3691-5;
66. Gupta V. (2008). Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs.* 17(2):131-43;
67. Clewell DB. (2011). Tales of conjugation and sex pheromones: A plasmid and enterococcal odyssey. *Mob Genet Elements.* 1(1):38-54;
68. Poyart C, Celli J, Trieu-Cuot P. (1995). Conjugative transposition of Tn916-related elements from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(2):500-6;
69. Whittle G, Shoemaker NB, Salyers AA. (2002). The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2044-54;
70. Friedrich Widdel. (2007) Theory and Measurement of Bacterial Growth, Grundpraktikum Mikrobiologie, 4. Sem. Universität Bremen;
71. Fankhauser, David B. (2016). Bacterial Growth Curve. University of Cincinnati Clermont College;

72. Twort, F. W. (1915). An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet*. 186 (4814): 1241–1243;
73. Twort, F. W. (1921). The Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet*. 198 (5108): 204–223;
74. D'Herelle F. (2007). On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol*. 158(7):553-4;
75. Summers (1999) Bacteriophage discovered. Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. New Haven, Conn., Yale University Press: 47-59;
76. Calendar Richard. (2006). *The Bacteriophages*. Second edition;
77. Kutter Elizabeth, Sulakvelidze Alexander. (2005). *Bacteriophages: biology and applications*. 1st Edition, CRC press;
78. Duckworth (1976). Who discovered bacteriophage?. *Bacteriol Rev* 40(4): 793-802;
79. Martha RJ Clokie, Andrew D Millard, Andrey V Letarov, and Shaun Heaphy. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*. 1(1): 31–45;
80. Hatfull Graham F. (2015) Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. *J Virol*. 89(16): 8107–8110;
81. Ackermann HW. (2009) Phage Classification and Characterization. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*, vol 501. pp 127-140;
82. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T et al. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases *J. Infect. Chemother*. 11:211-9;
83. Weinbauer MG. (2004). Ecology of prokaryotic viruses *FEMS Microbiol. Rev*. 28:127-81;
84. Adams M. (1959) *Bacteriophages*. Interscience publishers, New York;
85. Стент Г. (1965) Молекулярная биология вирусов бактерий. Мир, Москва;
86. Siang Yong Tan, Yvonne Tatsumura, (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. Jul; 56(7): 366–367.

87. Bennett Joan W. et al. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. Volume 49, 2001, Pages 163-184;
88. Hugh, TB (2002). Howard Florey, Alexander Fleming and the fairy tale of penicillin. The Medical Journal of Australia. 177 (1): 52–53; author 53 53;
89. Cruickshank, Robert (1955). Sir Alexander Fleming, F.R.S. Nature. 175 (4459): 663;
90. Jon Clardy et al. (2009). The natural history of antibiotics. Curr Biol. 19(11): R437–R441;
91. Waksman Selman A. and Geiger Walton B. J Bacteriol. The Nature of the Antibiotic Substances Produced by *Aspergillus fumigatus* (1944) 47(4): 391–397;
92. Mahajan GB, Balachandran L. (2012) Antibacterial agents from actinomycetes - a review. Front Biosci (Elite Ed). 1;4:240-53;
93. Okolo E. N. (1990) Health research design and methodology. Collage of pharmacy and pharmaceutical sciences, Florida;
94. Gonzalez-Estrada, A; Radojicic, C (2015). Penicillin allergy: A practical guide for clinicians. Cleveland Clinic journal of medicine. 82 (5): 295–300;
95. Jonson Herbert C, et al. (1946). Effects of antibiotic substances on the central nervous system. Arch NeurPsych. 56(2):184-197;
96. Chloramphenicol. (2015) The American Society of Health-System Pharmacists;
97. Tetracycline. (2016) The American Society of Health-System Pharmacists;
98. Henry RJ (1943). The Mode of Action of Sulfonamides. Bacteriological Reviews. 7 (4): 175–262;
99. Rodríguez-Tudela J. L., Barchiesi F. et al (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Volume 9, Issue 8, pp. 1-8;
100. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. 3(2):163-75;
101. Shafi M S. (1975). Determination of antimicrobial MIC by paper diffusion method. J Clin Pathol. Dec; 28(12): 989–992;

102. Bragg R et al. (2014). Bacteriophages as potential treatment option for antibiotic resistant bacteria. *Adv Exp Med Biol.* 807:97-110;
103. Chanishvili N. (2012). Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches *Adv. Virus Res.* 83:3-40;
104. Deresinski S. (2009). Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas *Clin. Infect. Dis.* 48:1096-101;
105. Housby JN, Mann NH. (2009). Phage therapy *Drug Discov. Today* 14:536-40;
106. Kutateladze M, Adamia R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics *Trends Biotechnol.* 28:591-5;
107. Kutter E, De VD, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L et al. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:69-86;
108. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T et al. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases *J. Infect. Chemother.* 11:211-9;
109. Панченков Н.Р. (1981) Метод прерывистого длительного орошения ожоговых ран бактериофагами. *Клин.Хирург.* N3, с.35-37;
110. Самсыгина Г.А. (1985) Гнойно-воспалительные заболевания новорожденных. Автореф. док.мед.наук;
111. Цулукидзе А.П. (1942). Лечение анаэробной инфекции бактериофагом. Фаготерапия ранений в условиях эвакогоспиталя. Материалы I хирургической клиники Тбилисского института усовершенствования врачей. Тб.;
112. Freund J.I. (1947). Some aspects of active immunization. *J. Ann. Rev. Microb.* 1, p.291-308;
113. Merrill CR., Scholl D and Sankar L. (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2(6):489-97
114. Golkar Zhabiz, Bagasra Omar, Pace Donald Gene. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries*; 8(2):129-136;
115. თ.მძინარაშვილი. (2012). აბსორბციული სპექტროფოტომეტრია ბიოფიზიკაში, უნივერსიტეტის გამომცემლობა;

116. Rumbo, Toni A.; Schultz, Emeric; Borland, Michael G.; Pugh, Michael Eugene (2013). Applied Spectrophotometry: Analysis of a Biochemical Mixture. *Biochemistry and Molecular Biology Education*: 41(4):242-50;
117. Cortez, C, Szepaniuk, A., Gomes da Silva, L. (2010). Exploring Proteins Purification Techniques Animations as Tools for the Biochemistry Teaching.. *Journal of Biochemistry Education*, 8(2);
118. Seinfeld and Pandis, *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New Jersey (2006), Chapter 15.1;
119. Mdzinarashvili T. Papukashvili I. Partskhaladze T. Shengelia N. Khvedelidze M. (2013). Study of Environmental and Antimicrobial Agents Impact on Features of Bacterial Growth. *Cell Biochem Biophys*. Vol. 66, no 3, pp 759-764;
120. Mdzinarashvili T, Papukashvili I, Shengelia N. Khvedelidze M. (2014) Features of Membrane Receptors in Bacterial Multiplication Process and Necessary Conditions for Phage Infection of Bacteria. *Curr Microbiol* vol. 69, no 6, pp. 858–865;
121. Papukashvili I, Lomadze E, Mdzinarashvili T. (2016). The Action of Bacteriophages and β -Lactam Antibiotic on *P. aeruginosa* Biofilm Formation *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp 91-96;
122. Givan AL. (1992). *Flow Cytometry: First Principles*. New York, NY: John Wiley & Sons;
123. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV, eds (1993). *Clinical Flow Cytometry: Principles and Application*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins;
124. Owens MA, Loken MR. (1995). *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping*. New York, NY: Wiley-Liss;.
125. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. (1990). *Flow Cytometry and Sorting*. 2nd ed. New York, NY: Wiley-Liss;.
126. Spring KR, Davidson MW. (2008). *Introduction to Fluorescence Microscopy*. Nikon Microscopy;
127. Garbe J., Wesche A., Bunk B., Kazmierczak M., Selezska K. et al (2010) Characterization of JG024, a *pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiol*. 10:301;
128. Kutalik, Z., Razaz, M., & Baranyi, J. (2004). Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *Journal of Theoretical Biology*, 232, 283–297;

129. Raspaud, E., Forth, T., Sañó-Joser, C., Tavares, P., & Frutos, M. (2007). A kinetic analysis of DNA ejection from tailed phages revealing the prerequisite activation energy. *Biophysical Journal*, 93, 3999–4005;
130. Braun, V., & Hantke, K. (1977). Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems, In J. L. Reissig (Ed.), *Microbial Interactions (Receptors and Recognition, Series B) 3*, 101–137.;
131. Lettelier, L., Boulange, P., Plancon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and uptake. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1228–1339;
132. Rakhuba, D., Kolomiets, E., Dey, E., & Novik, G. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage absorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59, 145–155;
133. Sundell K., Wiklund T. (2011). Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish. Dis.* 34 (5): 373-83;
134. Gutierrez A., Laureti L. et al. (2013). β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nature Communications* 4, Article number: 1610;
135. Comeau M. A.; Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM (2007) Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE* 2(8): e799;
136. Kirby E. A. (2012). Synergistic Action of Gentamicin and Bacteriophage in a Continuous Culture Population of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7(11): e51017;
137. Lu TK, Collins JJ. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(12):4629-34;