ი. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ელენე ლომაძე

ბაქტერიის ზრდის სიჩქარის დამოკიდებულება სხვადასხვა ბიოლოგიურ და ფიზიკურ ფაქტორებზე

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია ბიოფიზიკის მაგისტრის

აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები:

სრული პროფ. თამაზ მძინარაშვილი

დოქტორანტი ირინე პაპუკაშვილი

თბილისი 2013

I.Javakhishvili Tbilisi Stste University

Faculty of Exact and Natural Sciences

Elene Lomadze

Dependence of Bacterial growth rate on various biological and physical factors

Master's thesis is performed in order to going Biophysics
master's academic degree

Supervisors:

Tamaz Mdzinarashvili Full Profesor

Irine Papukashvili , PhD Student

Tbilisi .2013

ანოტაცია

ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტების საფუძველზე შესაძლებელია გაკეთდეს მეტად მნიშვნელოვანი დასკვნები. კერძოდ, ნაჩვენებია, რომ ბაქტერიის მემბრანაზე ადსორბირდება ასეულობით ფაგური ნაწილაკი, რომლებიც არ ახდენენ ბაქტერიული უჯრედის ინფიცირებას, ვინაიდან ბაქტერიის „იმუნური სისტემა“ იცავს თავს და არ აძლევს ფაგებს საშუალებას მოხდეს ვირუსული დნმ-ის შეჭრა (ეჟექცია) ბაქტერიულ უჯრედში. თუმცა, თუ მოხდა ფაგების დიდი რაოდენობით ადსორბცია მემბრანის რეცეფტორებზე, მაშინ ბაქტერია ვეღარ უწევს წინაამდეგობას ფაგების „შემოტევას“ და ხდება უჯრედის ინფიცირება. ამიტომაც არსებობს ფაგების ე.წ. მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია (მიკ), რომლებიც უნდა ადსორბირდეს ბაქტერიის მემბრანაზე, რათა განხორციელდეს ბაქტერიის ინფიცირება. ხოლო ამ რაოდენობაზე ნაკლები ფაგი ვერ იმოქმედებს ბაქტერიის ცხოველქმედებაზე.

ბუნებრივია, რომ ბაქტერიის მაინფიცირებელი მინამულური ფაგების რიცხვი (მიკ) დამოკიდებული უნდა იყოს სხვა ფიზიკო, ქიმიურ ბიოლოგიურ ფაქტორებზე. ნაშრომში ნაჩვენებია, რომ ზემოთ მოყვანილი მოსაზრებას ადასტურებს ტემპერატურის გავლენა ფაგური კოლონიების წარმოქმნის პროცესზე. ნაჩვენებია, რომ ფიზიოლოგიურ 37^0 ტემპერატურისაგან განსხვავებულ პირობებში იცვლება, როგორც წარმოქმნილი ნეგატიური ფაგური კოლონიების რიცხვი, ასევე მიღებული კოლონიის ზომები.

ნაშრომი ცალსახად ადასტურებს ბიოფიზიკურ მიდგომის აუცილებლობას ბაქტერიის და ფაგის ურთიერთქმედების მექანიზმების დაგენას, რათა ინფექციებთან ბაქტერიოფაგებით ბრძოლა გახდეს უფრო ეფექტური.

Abstract

Important conclusions can be made on the bases of the experiments performed by us. In particular, it is shown that hundreds of phage particles that are adsorbed on bacterial cell membrane do not cause bacterial cell infection, because of bacteria "immune system" which protects microbe and do not allow phages to eject the viral DNA into bacterial cell. However, if the number of phages adsorbed on membrane surface Increases then bacteria is no more able to reveal self-defense mechanisms against phage "attack" and becomes infected. Therefore, there are a minimum number of phages (so-called MIC – minimal inhibitory concentration) which must be existed in the environment around the bacteria for achieving bacterial infection. But if number of phages is less than phage MIC, then it can not affect bacteria lifecycle.

It is clear that the number of phages which is necessary for achieving bacterial cell infection (MIC) should be depended on other physical, chemical, biological factors. The confirmation of this consideration is shown in the presented work – we have studied the influence of temperature on the process of formation of phage plaques. It is shown that at temperature conditions which are different from 37^0C the number of formed phage plaques as well as the sizes of plaques is different.

The work clearly demonstrates the need of biophysical approach to determine the mechanisms of interaction between bacteria and phages in order to effectively fight against bacterial infections with bacteriophages.

ს ა რ ჩ ე ვ ი

შესავალი..... ...6

ნაწილი I. ლიტერატურული მიმოხილვა.....8

თავი 1 . ბაქტერიები…… …….....8

1.1 ზოგადი მიმოხილვა…….....8

1.2 ბაქტერიების გენომი ……..10

1.3 ბაქტერიალური უჯრედის გამრავლება …… 11

1.4 ნაწლავის ჩხირი (E.coli).....12

1.5 მიკროორგანიზმების ტემპერტურული ჯგუფები..... 14

თავი 2. ბაქტერიოფაგები…….. …….....16

2.1 ბაქტერიოფაგის აღმოჩენა და მათი ზოგადი დახასიათება……....16

2.2 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია……...19

ბაქტერუოფაგების ოჯახებისა და გვარების მორფოლოგია

2.2.1 T7 ბაქტერიოფაგი.....23

2.3 ბაქტერიოფაგების ფიზიოლოგია, ბაქტერიული ვირუსების განვითარების 24

ციკლი, ბაქტერიოფაგის და პატრონ უჯრედის ურთიერთქმედება.

2.4. ფაგების გამოყენება სხვადასხვა ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციური

დაავადებების მკურნალობისა და პრევენციისათვის..... 30

ნაწილი II ექსპერიმენტული ნაწილი…….....36

თავი 1. მასალები……....37

თავი 2. მეთოდები……...…..39

თავი.3 საკუთარი კვლევები……....44

დასკვნა..... ...47

გამოყენებული ლიტერატურა.....48

შესავალი

ბაქტერიები~ 3,5 მილიარდი წლის წინ წარმოქმნილი უმცირესი ორგანიზმებია, რომლებსაც უჯრედული სტრუქტურა გააჩნიათ. ცოცხალი სამყარო ბაქტერიების ერთ-ერთი ყველაზე დიდი რიცხვით არის წარმოდგენილი, რომელიც დაახლოებით 10^{31} რიგისაა. ადამიანი ვალდებულია გააღრმავოს კვლევები და დააგროვოს რაც შეიძლება მეტი ინფორმაცია ამ ცოცხალი ობიექტის შესახებ, რათა მომავალში თავიდან იქნას აცილებული ისეთი არასასურველი მოვლენები, რომელიც შესაძლოა კაცობრიობას და მთლიანად ცოცხალ სამყაროს განადგურებითაც დაემუქროს.

დღეისათვის სამედიცინო პრაქტიკაში აღიარება მოიპოვა ისეთმა ეფექტურმა, უვნებელმა და ბუნებრივმა სამკურნალო-პროფილაქტიკურმა საშუალებამ, როგორიცა ბაქტერიოფაგის პრეპარატები სხვადასხვა ეტიოლოგიის ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისა და პრევენციისას.

სრულიად ნათელია, რომ ზოგადად, ნებისმიერ პროცესის განხორციელებისთვის, საჭიროა არსებობდეს შესაბამისი პირობები, რომლის გარეშეც პროცესი ვერ განხორციელდება. ამიტომაც არ არის უცნაური, რომ ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტებში, რომელიც ბაქტერიების გამრავლების პროცესების დამზერაში გამოიხატება, აშკარად ხაზს უსვამს, რომ გარეშე პირობებს აქვს გადამწყვეტი მნიშვნელობა ამ პროცესების მიმდინარეობაში, თუ რამდენად მგრძნობიარენი არიან ცოცხალი უჯრედები, როდესაც ისინი გარე ზემოქმედების ქვეშ იმყოფებიან.

როგორც ავღნიშნეთ, უჯრედი გამრავლების პროცესს იწყებს ბევრი წინასწარ მოსამზადებელი პროცესების გააქტიურებით და საკმარისია ნებისმიერი, ერთი შეხედვით თითქოს უმნიშვნელო ფიზიკო-ქიმიური ხასიათის შემაფერხებელი ზემოქმედება უჯრედზე, რომ გამრავლების პროცესი მთლიანად შეწყდება ან იცვლის ხასიათს.

ინფექციური დაავადებების სამკურნალო პრეპარატებით ეფექტური მკურნალობა უნდა ეფუძნებოდეს ანტიბიოტიკებით ან ზოგიერთი სხვა ანტიმიკრობული პრეპარატებით მიზანმიმართულად პათოგენური მიკროორგანიზმების გამრავლების დათრგუნვას, ისე რომ ადგილი არ ქონდეს ორგანიზმზე ტოქსინების მოქმედებას. ასეთი ტიპის სამკურნალო პრეპარატები მოახდენენ რა ორგანიზმში პათოგენური ბაქტერიების გამრავლების დათრგუნვას მივყავართ ბაქტერიების ბოლომდე განადგურებამდე და ორგანიზმის სრულ განკურნებამდე. ისე რომ ანტიბიოტიკების ეფექტურობა დამოკიდებულია იმაზე თუ როგორ ადვილად მიაღწევს ინფექციის ადგილს და როგორი იქნება მისი კონცენტრაცია, რომელიც უნდა აღემატებოდეს ინფექციის ჩახშობისთვის საჭირო მინიმალურ კონცენტრაციის მნიშვნელობას.

ამოცანის ჩვენი სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა თუ რა გავლენას ახდენს ბაქტერიების ზრდა- განვითარებაზე სხვადასვა ფიზიკური და ბიოლოგიური ფაქტორები. რამდენად ახდენს გავლენას ამ ფაქტორების მოქმედება ბაქტერიების მიკ-ზე (მინიმალური ინჰიბირების კონცენტრაცია). ცდის მიზანს წარმოადგენდას ბაქტერიების ზრდა განვითარებაზე დაკვირვება, ორივე, როგორც ბიოლოგიური ასევე ფიზიკური ფაქტორების ერთდროული მოქმედების დროს . ბიოლოგიურ ფაქტორს წამოადგენს ბაქტერიის ვირუსი - ბაქტერიოფაგი, ხოლო ფიზიკური ფაქტორია სხვადასხვა ტემპერატურული
რეჟიმები.

ნაწილი I

ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. ბაქტერიები

1.1 ზოგადი მიმოხილვა

ბაქტერიები ~ 3,5 მილიარდი წლის წინ წარმოქმნილი უმცირესი ორგანიზმებია, რომლებსაც უჯრედული სტრუქტურა გააჩნიათ. როგორც წესი, პროკარიოტები წარმოდგენილნი არიან ერთეული უჯრედებით, თუმცა ზოგიერთი ბაქტერია ეწებებიან რა ერთმანეთს, ქმნის დამახასიათებელ გროვებს, თუმცა გაერთიანებული უჯრედები რჩებიან ერთმანეთისაგან აბსოლუტურად დამოუკიდებლები.

ბაქტერიები უმარტივესი ორგანიზმებია. მათი ზომები რამდენიმე მიკრომეტრია (~2-5 მკმ) , ხოლო დიამეტრი ~ 0,5-1 მკმ-ია ამგვარად, ბაქტერიულ უჯრედს შეუძლია მოითავსოს საშუალო ზომის 200 გლობულარული ცილის მოლეკულა. აღსანიშნავია ისიც, რომ ამგვარ მოლეკულებს შეუძლით დიფუნდირება წამში დაახლოებით 60 მკმ-ის მანძილზე და შესაბამისად გადაადგილების სპეციალურ მექანიზმებსაც არ საჭიროებს. ბაქტერიული უჯრედი შემოსაზღვრულია ნახევარგამტარი მემბრანით _ პლაზმური მემბრანით ეს უკანასკნელი წარმოადგენს სუნთქვითი ფერმენტების ლოკალიზაციის ადგილს. ზოგიერთი ბაქტერიისათვის კი აღნიშნულ მემბრანაზე ადგილი აქვს ნაკეცი სტრუქტურების (მეზოსომების) და /ან ფოტომასინთეზირებელი მემბრანის ჩაზრდას. მეზოსომები უჯრედული გაყოფის დროს ასოცირდებიან რა დნმ-თან, უზრუნველყოფენ ბაქტერიებში დნმ-ის ორი შვილეული მოლეკულის გაყოფას რეპლიკაციის შემდეგ. ისინი აგრეთვე ხელს უწყობენ ორ შვილეულ უჯრედებს შორის ტიხარის წარმოქმნას. როგორც წესი, ბაქტერიებს დამცველი, ხისტი გარსი გააჩნიათ, რომელსაც უჯრედულ კედელს უწოდებენ. ეს უკანასკნელი იცავს უჯრედს წყლის შეღწევის (ოსმოსის) შემთხვევაში გახლეჩისაგან. ბაქტერიების უჯრედული კედელი შედგება პარალელურად განლაგებული პოლისაქარიდული ჯაჭვისა და მათი დამაკავშირებელი ამინომჟავებისაგან. ხოლო მის

მდგომარეობას მურეინის მოლეკულის არსებობა განაპირობებს. გრამდადებითი ბაქტერიებისათვის უჯრედული კედლის სისქე ~20-80ნმ-მდე მერყეობს, მაშინ, როცა გრამუარყოფითი ბაქტერიებისათვის უჯრედული კედლის სისქე ~2-3ნმ წარმოადგენს. აქვე უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ზოგიერთ ბაქტერიას (გრამუაყოფითი) გააჩნია დამატებითი გარეთა მემბრანა.

ბაქტერიებს არ გააჩნიათ გამოყოფილი ბირთვი.

ბაქტერიალ უჯრედში არ არის გოლჯის აპარატი, ენდოპლაზმური ბადე, მიტოქონდრია.

მიტოქონდიების როლს ასრულებენ მეზოსომები - ციტოპლაზმური მემბრანების ინვაგინაციები (ჩაღრმავებები).

ბაქტერიალ უჯრედში ბევრი რიბოსომებია (70 S).

ბაქტერიალურ უჯრედში არჩევენ:

1) ძირითად ორგანელებს: ა) ნუკლეოტიდი; ბ) ციტოპლაზმა; გ) რიბოსომები;
დ) ციტოპლაზმური მემბრანა; ე) უჯრედის კედელი.

2) დამატებითი ორგანელიბი: ა) სპორები; ბ) კაპსულები; გ) წამწამები; დ) შოლტები

შოლტები მოთავსებულია (E.coli) უჯრედის ერთ-ერთ მხარეს ისინი საკუთარი ღერძის გარშემო ბრუნავენ . უჯრედის მოძრაობას შოლტის მოძრაობის მიმართულება განაპირობებს . ბაქტერიებს გააჩნიათ აგრეთვე ჩხირის მაგვარი გამონაზარდები ფიბრილები, რომელთა საშუალებით ხორციელდება ბაქტერიის მიმაგრება სპეციფიკურ უჯრედებთან.

ბაქტერიები უჯრედის კედლის აგებულების მიხედვით იყოფა ორ ჯგუფად : გრამდადებით და გრამუარყოფითი ბაქტერიები.

გრამდადებითი ბაქტეიები უჯრედის კედლის მურეინის ბადეში შეიცავენ პეპტიდოგლიკანებს (ნახშირწყლები) და ლიპოთეიხოის მჟავას რაც უჯრედულ კედელს შედარებით სქელს ხდის.

გრამუარყოფიტი ბაქტერიების უჯრედის კედლის მურეინის ბადეში შეიცავენ მარტო პეპტიდოგლიკანებს ამიტომ მათი უჯრედული კედელი შეფარებით თხელია, მათ ასევე გააჩნიათ გარეთა დამატებითი მემბრანა (კაფსულა).[1, 2, 3, 4, 5]

მიკრობიოლოგიაში, მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაცია (მიკ) არის ყველაზე დაბალი კონცენტრაცია ანტიმიკრობების , რომელიც ხელს უშლის მიკროორგანიზმების თვალსაჩინო ზრდას, ღამით ინკუბაციის შემდეგ. მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაცია მნიშვნელოვანია დიაგნოსტიკურ ლაბორატორიაში, მისი გამოყენებით ადასტურებენ მიკროორგანიზმების რეზისტენტულობას ანტიმიკრობული აგენტის მიმართ და ასევე აწარმოებენ ახალი ანტიმიკრობული აგენტების მონიტორინგს. დაბალი მიკის მნიშვნელობა განსაზღვრავს უკეთეს ანტიმიკრობულ აგენტს . მიკ ზოგადად განიხილება, როგორც ძირითადი ლაბორატორიული საზომი ანტიმიკრობული აგენტი აქტივობის ორგანიზმის წინააღმდეგ. [56,57]

1.2 ბაქტერიების გენომი

ბატერიების მემკვიდრული აპარატი წარმოდგენილია ერთი ქრომოსომით, რომელიც წარმოადგენს დნმ-ის მოლეკულას სპირალიზირებულს და რგოლად შეკრულს. ეს რგოლი ერთი წერტილით მიმაგრებულია ციტოპლაზმურ მემბრანას. ბაქტერიალურ ქრომოსომაზე განლაგებულია ცალკეული გენები.

ფუნქციურ ერთეულებს ქრომოსომის გარდა წარმოადგენენ:

1) IS - თანმიმდევრობები;
2) ტრანსპოზონები;
3) პლაზმიდები

IS - თანმიმდევრობები - ეს არის დნმ-ის მოკლე ფრაგმენტები. ისინი არ არიან სტრუქტურული (ცილის მაკოდირებელი) გენების შემცველები და შეიცავენ მხოლოდ იმ გენებს, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ტრანსპოზიციაზე .

ტრანსპოზონები - დნმ-ის მსხვილი მოლეკულებია. გენების გარდა, რომლებიც ტრანსპოზიციზეა პასუხისმგებელი, ისინი კიდევ შეიცავენ სტრუქტურულ გენს. ტრანსპოზონებს აქვს უნარი გადაადგილდეს ქრომოსომის სიგრძეზე. ტრანსპოზონებს შეუძლიათ ქრომოსომის გარეთაც (ავტონომიურად) არსებობა, მაგრამ არ შეუძლიათ ავტონომიურად რეპლიცირება.

პლაზმიდები - დამატებითი არაქრომოსომული მასალაა. იგი წარმოადგენს წრიულ, ორჯაჭვიან დნმ-ის მოლეკულას, რომლის გენები ახდენენ დამატებითი თვისებების კოდირებას, რითაც უჯრედს ანიჭებენ სელექტიურ უპერატესობას. პლაზმიდებს შეუძლიათ ავტონომიურად რეპლიკაცია, ე.ი ქრომოსომისაგან დამოუკიდებლად ან ძალიან მცირე მისი კონტროლის ქვეშ.

1.3 ბაქტერიალური უჯრედის გამრავლება

ბაქტერიები - ძალიან მარტივი ფორმა ცოცხალის , რომელიც შედგება ერთი ცოცხალი უჯრედისგან რეპროდუქცია მიმდენარეობს უჯრედის გაყოფით (მიტოზი). მიაღწია რა სიმწიფეს ბაქტერიული უჯრედი იყოფა ორ ტოლ უჯრედად . თავის მხრივ, თითოეული შვილეული უჯრედი აღწევს სიმწიფეს და ასევე იყოფა ორ თანაბარ უჯრედად . იდეალური პირობების ქვეშ, ბაქტერიული უჯრედის სიმწიფის მდგომარეობას აღწევს და გაყოფას იწყებს არა ნაკლებ 20-30 წუთში. ამ განვითარების განაკვეთით, ერთმა ბაქტერიამ შეიძლება თეორიულად აწარმოოს 34 ტრილიონი შთამომავლები 24 საათის განმავლობაში! საბედნიეროდ, სიცოცხლის ციკლის ბაქტერიების შედარებით მოკლეა და გრძელდება რამდენიმე წუთი ან რამდენიმე საათის განმავლობაში. აქედან გამომდინარე, თუნდაც იდეალური პირობებში , ისინი იმ სიჩქარით და რაოდენობით ვერ გაიზრდებიან.

ბაქტერიების და სხვა მიკროორგანიზმების განვითარების ტემპები და რეპროდუქცია დამოკიდებულია გარემო პირობებთან როგორიც არის : ტემპერატურა, სინათლე, ჟანგბადის თანაობა , ტენიანობა და PH ფაქტორი.

მყარ საკვებ არეზე ბაქტერიები წარმოქმნიან უჯრედების გროვას - კოლონიებს, რომლებიც განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ზომებით, ფორმებით, ზედაპირებით, შეღებვის ხარისხით და სხვა. თხევად არეზე ბაქტერიების ზრდა ხასიათსება საკვებ არეზე აპკის წარმოქმნით, თანაბარი შემღვრევით ან ნალექის წარმოქმნით.[1, 2, 3, 4, 5]

ბაქტერიალური უჯრედის გამრავლების ფაზებია საკვებ არეზე:

1) საწყისი სტაციონალური ფაზა; ეს არის ბაქტერიების რაოდენობა, რომელიც შეტანილია საკვებ არეში და არსებობენ არეში;
2) ლაგ-ფაზა (მოსვენების ფაზა); ხანგრძლივობა 3 -4 სთ, რომლის დროსაც ხდება ბაქტერიების ადაპტაცია საკვებ არეში, იწყება უჯრედების აქტიური ზრდა, მაგრამ აქტიური გამრავლება ჯერ არ ხდება; ამ პერიოდში იზრდება ცილის და რნმ-ის რაოდენობა;
3) პოპულაციაში აქტიურად მიმდინარეობს უჯრედების გამრავლება, თანაც გამრავლება აჭარბებს დაღუპვას;
4) მაქსიმალური სტაციონალური ფაზა; ბაქტერიები აღწევენ მაქსიმალურ კონცენტრაციას, ე.ი. პოპულაციაში არის სიცოცხლის უნარიანი ბაქტერიების მაქსიმალური რაოდენობა; დაღუპული ბაქტერიების რაოდენობა უტოლდება წარმოშობილი ბაქტერიების რაოდენობას; არ ხდება ინდივიდების რიცხვის შემდგომი მატება;
5) დაჩქარებული დაღუპვის ფაზა; დაღუპვის პროცესები აჭარბებენ გამრავლების პროცესებს, რადგანაც ღარიბდება საკვები ნივთიერებები არეში. ადგილი აქვს მეტაბოლიზმის შედეგად წარმოქმნილი ტოქსიური ნივთიერებების დაგროვებას. ამ ფაზას შესაძლებელია თავი ავარიდოთ, თუ გამოყენებული იქნება გამდინარე კულტივირების მეთოდი: საკვები არიდან მუდმივად ხდება მეტაბოლოზმის ნაერთების მოცილება და განახლდება საკვები ნივთიერებები.[1, 2, 3, 4, 5]

1.4 ნაწლავის ჩხირი (E.coli)

Escherichia coli მიეკუთვნება ოჯახს Enterobacteriaceae , E.coli 1,1-1,5X2,0-6,0 მკმ ზომის სწორი ჩხირისებრი , გრამუარყოფითი ბაქტერიებია ,ლაგდება ცალ-ცალკე ან წყვილებად. შტამთა უმრავლესობას გააჩნია კაფსულა ან მიკროკაფსულა. სპორებს არ წარმოქმნიან. ფაკულტატური ანაერობია(ორგანიზმები რომლებიც ენერგიიას გამოიმიშავებენ უჟანგბადოდ) შტამებს რომლებსაც გააჩნიათ შოლტები შეუძლიათ გადაადგილება.[6]

მათი ზრდა შეიძლება სტიმულირდეს ანაერობულ ან აერობულ პირობებში. ზრდის ტემპერატურული ოპტიმუმია 37 °C თუმცა ზოგიერთ შტამს შეუძლია გაზრდა 49 °C.

შტამი ეს არის ბაქრტერიების ჯგუფი ერთი სახეობის შიგნით რომლებიც განსხვავდებიან თვისებებით, ძირითადად განსხვავებები აღმოჩენილია მოლეკულურ დონეზე , თუმცა გამოვლინდება და გავლენას ახდენს ბაქტერიის ფიზიოლოგიაზე და სიცოცხლის ციკლზე . E.coli-ს შტამები სპეციფიკურობით ხასიათდება მასპინძელის არჩევისას, ახალი შტამების წარმოქმნა ხდება სხვადასხვა გენური მუტაციებით . [53,54]

E.coli-ს ყოფენ ლაქტოზის მაფერმეტირებელ და არა მაფერმენტირებელ ბაქტერიებად . ანაერობულ პირობებში E.coli წარმოქმნის ცხოველმოქმედების პროდუქტის სახით ლაქტატს, აცეტატს, ეთანოლს, CO_2 -ს .თუმცა ხშირად ხდება მოლეკულური წყალბადის წარმოქმნა, რომელიც ხელს უშლის ზემოთ ჩამოთვლილი მეტაბოლური პროდუქტების წარმოქმნას ,ამიტომ E.coli ხშირად გვხვდება ისეთ მიკროორგანიზმებთან ერთად რომლებიც წყალბადს მოიხმარენ .

E.coli გვხვდება თბილსისხლიანების ნაწლავების ქვედა ნაწილებში . E.coli-ის ძირითადი შტამპები უვნებელია თუმცა არის გამონაკლისი. E.coli-ს ვირულენტური შტამები ჩვეულებრივ ორგანიზმში არ არის . დავადების განვითარება ხდება მათი ორგანიზმში მოხვედრის შემდეგ სხვადასხვა გზით მაგ. დაბინძურებული სასმელი, საკვები. პათოგენური E.coli- O157:H7 ადამიანებში იწვევს მოწამვლას .უვნებელი შტამპები ადამიანის ნაწლავის ფლორის შემადგენელი კომპონენტები არიან .მათ სარგებლობა მოაქვთ ორგანიზმისთვის მაგ . ასენთეზირებს K ვიტამინს და ასევე ხელს უშლის ნაწლავში პათოგენური მიკროორგანიზმების განვითარებას.

E.coli მარტო ნაწლავის ტრაქტში არ ბინადრობს, მას გარკვეული დროით შეუძლია არსებობა გარამოში , ასევე შესაძლებელია მისი ლაბორატორიულ პირობებში ადვილად გამრავლება, რის გამოც მას ხშირად იკენებენ მიკრობიოლოგიურ კვლევებში. ასევე ბიოტექნოლოგიებში . E.coli ითვლება უნივერსალურ მიკრო ორაგანიზმად რომელიც გამოიყენება სხვა წარმოშობის ცილების სინთეზისთვის ,მასში შეყავთ გენები პლაზმიდების დახმარებით და შემდეგ ხდება ამ გენებით კოდირებული ცილების და ფერმენტების სინთეზი, ასევე ხდება რეკომბინირებული დნმ- ების მიღება, ხოლო მოდიფიცირებული E.coli გამოიყენება ვაქცინების დასამზადებლად.[6]

1.5 მიკროორგანიზმების ტემპერტურული ჯგუფები.

სხვადასხვა მიკროორგანიზმები შეიძლება გაიზარდოს სხვადასხვა ტემპერატურაზე , გარკვეული ბაქტერიები იზრდება დაბალ ტემპერატურასთან ახლოს 0 ° C (+5 ° C), ხოლო სხვები პირიქით იზრდება მაღალი ტემპერატურაზე დაახლოებით (90°C). ამიტომ, მიკროორგანიზმები იყოფა მათი ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მიხედვით სამ ძირითად ჯგუფად - პსიქროფილები (psychrophiles) , მეზოფილები (mesophiles) და თერმოფილები (thermophiles).

Psychrophiles (ამჯობინებს დაბალ ტემპერატურას) - მიკროორგანიზმები, რომლებსაც აქვთ ზრდა ყველაზე დაბალ ტემპერატურაზე 0 ° C - ზე დაბლა.

Mesophiles (ამჯობინებს საშუალო ტემპერატურას) - ორგანიზმების ზრდის მინიმალური ტემპერატურა მაღალია, ვიდრე psychrophiles-ის , ხოლო მაქსიმალური ტემპერატურა დაბალია, ვიდრე thermophiles-ის . მიკროორგანიზმები - mesophiles -ის უმეტესობის ზრდის ტემპერატურა მერყეობს 0-10 ° C - დან 40-45 ° C -მდე

Thermophiles (ურჩევნია მაღალი ტემპერატურია) - მიკროორგანიზმების ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა, ჩვეულებრივ არის 50 ° C-ის ზემოთ.

ზრდის მინიმალური ტემპერატურა - არის ზღვრული ტემპერატურა, რომლის უმნიშვნელოდ შემცირების დროსაც მიკროორგანიზმების ზრდის განაკვეთი (უჯრედების ზრდა 1 საათის განმავლობაში) ახლოსაა ნულოვან მაჩვენებელთან , ანუ პრაქტიკულად ზრდა იწყვიტება . ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა - არის ზღვრული ტემპერატურა, რომლის მცირედ გაზრდა იწვევს მიკროორგანიზმების ზრდის განაკვეთის ნულოვან მნიშვნელობამდე შემცირებას .

ბაქტერიებს მათი ზრდის ტემპეტატურაზე დამოკიდებულების მიხედვით ყოფენ შემდეგ ჯგუფებად: პსიხროფილები (psychrophiles), მეზოფილები (mesophiles), თერმოტოლერანტები (Termotoleranty) , ევრითერმიფილები (Evritermofily), სტენოთერმოფილები (Stenotermofily) , ექსტრემალური თერმოფილები (extremely thermophilic).

თერმოტოლერანტები ხასიათდება მაქსიმალური ზრდის ტემპერატურით 45—48 °C (ბაქტერიებისთვის). თუმცა, ზოგიერთ მეზოფილურ შტამებს შეიძლება ასევე ჰქონდეს ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა 45 °C. ასეთ შემთხვევაში, ტერმოტოლერანტური შტამის

განსხვავება მეზოფილური-სგან შეიძლება ზრდის სიჩქარის ცვლილებით, როცა ხდება მეზოფილური შტამის ბაქტერიების ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის (ჩვეულებრივ 37 °C) უმნიშვნელო მომატება (3—6°) ტემპერატურის ასეთი ცვლილების შემთხვევაში თერმოტოლერანტული მიკროორგანიზმების ზრდის სიჩქარე მნიშვნელოვნად არ იცვლება, ხოლო მეზოფილური შტამები გამრავლების სიჩქარის შემცირება კარგად შესამჩნევი იქნება. ხოლო თუ ორგანიზმი აღმოჩნდება ევრითერმოფილი მის ზრდის სიჩქარე ტემპერატურის მომატებისას 37 -დან 43 °C მდე მკვეთრად გაიზრდება.

ევრითემოფილების ზრდის მინიმალური ტემპერატურა მდებარეობს 37 °C- ზე დაბლა , ხოლო მაქსიმალური ტემპერატურა არის 48°C- ზე მაღლა 70°C- მდე . ამ ჯგუფში შედიან სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფები: ბაქტერიები, საფუარი, სოკოები, წყალმცენარეები.

სტენოთეროფილების დამახასიათებელი ზრდის მინიმალური ტემპერატურა ტოლია 37—40 °C, მაქსიმალური ტემპერატურა მდებარეობს შემდეგ შუალედში 70— 80 °C , ხოლო ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურის ზონაა — 55— 65 °C.

თემოფილური მიკროორგანიზმების უმრავლესობა წამოადგენს ევრითერმოფილურ და თერმოტოლერანტულ ჯგუფებს. ამ ქვე-ჯგუფების ზუსტი დახასიათება საკმაოდ რთულია. განსაკუთრებით კი რთული გასარჩევია თერმოტოლერანტული შტამები, ზოგიერთ მეზოფილური შტამისგან.

უკიდურესად თერმოფილური მიკროორგანიზმები არ იზრდება 40-45°C ქვემოთ, ოპტიმალური ზრდის ტემპერატურის ზონაა - დაახლოებით 80 °C, ხოლო ზრდის მაქსიმალური ტემპერატურა ახლოსაა 93 °C -თან.

ბუნებასა და ლაბორატორიის პირობებში მიკროორგანიზმები შეიძლება მოექცნენ მაღალი ტემპერატურის ხანმოკლე მომქედების ქვეშ. ასეთი სითბური ზემოქმედების დროს , როგორც წესი უჯრედები არ რეპროდუცირება. ამ არასასურველი ფაქტორის ზემოქმედების შეწყვეტისას მიკროორგანიზმის ზოგიერთ შტამებმა შეიძლება შეინარჩუნოს რეპროდუქციული უნარი (შეუძლია რეპროდუცირება), სხვები ნაკლებად სტაბილურია და იღუპება. მიკროორგანიზმების სხვადასხვა ტემპერატურული ჯგუფების მდგრადობა (პსიქროფილები , მეზოფილები , თერმოტოლერანტები, თერმოფილები) მაღალი ტემპერატურით მოკლევადიანი ზემოქმედების შეწყვეტის შემდეგ , რეპროდუქციული

უნარის დაბრუნება ხასიათდება ტერმინით თერმული სტაბილურობა (თერმორეზისტენტულობა).[7]

თავი 2 . ბაქტერიოფაგები

2.1 ბაქტერიოფაგის აღმოჩენა და მათი ზოგადი დახასიათება

სამედიცინო პრაქტიკაში პოლირეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციების სიმრავლლემ და თანამედროვე მეთოდებით მათთან ბრძოლის სირთულემ აღიარება მოუთანა ისეთ სამკურნალო-პროფილაქტიკურ საშუალებას , როგორიცაა ბაქტერიოფაგის პრეპარატი.

პირველი დაკვირვებები ანტიბაქტერიულ ფენომენზე ეკუთვნის ნიკოლაი გამალეას (1898 წ.), რომელმაც შეამჩნია , რომ ციმბირის წყლულის გამომწვევი ბაცილების ფილტრატი იწვევდა ამ მიკრო ორგანიზმების ახალი კულტურების ლიზის .[8]

ბაქტერიული კულტურების სპონტანური ლიზისის ფენომენზე დაკვირვებები სხვა მეცნიერებსაც ჰქონდათ, მათ შორის 1915წ. ქართველმა მეცნიერმა გ. ელიავამ აღნიშნა *Vibrio cholerae* -ს ბაქტერიების თვითლიზისის მოვლენა. ამ თვალსაზრისით აღსანიშნავია ინგლისელი ბაქტერიოლოგის ფრედერიკ ტუორტის გამოკვლევები, რომელიც სწავლობდა ვირუსების ზრდას სხვადასხვა საკვებ ნიადაგზე. ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას მისი ყურადღება მიიქცია სტაფილოკოკების კოლონიების (რომლითაც ხდებოდა ფინჯნების დაბინძურება) უჩვეულო ''მინისებრმა გარდაქმნამ''. ტუორტმა აღნიშნა , რომ ასეთი კოლონიები კარგავდა გადათესვის უნარს და მათი შეტანა ნორმალურ კოლონიებში იწვევდა უკანასკნელების გარდაქმნას. 1913წ. ჟურნალ The Lancet- ში გამოქვეყნებულ სტატიაში ტუორტი მიუთითებდა, რომ კოლონიების '' მინისებრი გარდაქმნის'' გამომწვევი აგენტები შეიძლება ყოფილიყო უჯრედ-პროდუქტების დამშლელი ფერმენტები ან აგენტები რომლებიც აღიზიანებდა ბაქტერიებს. ეს აღმოჩენა მეცნიერულად დასაბუთებული იქნა კანადელი ბაქტერიოლოგის ფელიქს ჰუბერტ დერელის მიერ, რომელიც მუშაობდა პარიზში, პასტერის ინსტიტუტში. მან 1917 წ. დიზენტერიით დავადებული ავადმყოფის ნაწლავებიდან გამოყო შიგელები, რომლებიც შეიცავდა ბაქტერიების ლიზისის უნარის მქონე პასირებად აგენტს და უწოდა მას ''უჩინარი ბაქტერიული ანტიგონისტი'' ანუ '' ბაქტერიოფაგი'' რაც ' 'ბაქტერიის მშთანთქმელს ნიშნავს.[8][9][10][11]

დერელმა პირველმა შეაფასა სწორად ბაქტერიოფაგის ფენომენის ბიოლოგიური არსი. მან დაასკვნა, რომ ბაქტერიოფაგი წარმოადგენს ბაქტერიების ვირუსს, რომელიც მრავლდება ბაქტერიული უჯრედის შიგნით, რის შედეგადაც ხდება უჯრედის ლიზისი და გარემოში გამოდის კვლავ წარმოქმნილი ვირიონის შთამომავლობა. ბაქტერიოფაგის ფენომენის აღმოჩენამ საფუძველი ჩაუყარა თანამედროვე მოლეკულური ბიოლოგიისა და გენეტიკის განვითარებას. კულტივირების სიმარტივემ , გენერაციია ხანმოკლე პერიოდმა, შთამომავლობის მაღალმა გამოსავალმა და მათი ზუსტი რაოდენობის განსაზღვრის შესაძლებლობამ ბაქტერიოფაგი ხელსაყრელ მოდელად აქცია გენების სტრუქტურის, მუტაგენეზის მოლეკულური მექანიზმების, გენეტიკური კოდის გაშიფვრისა და ორგანიზმების მემკვიდრეობით სტრუქტურებზე რადიაციის გავლენის შესასწავლად.[8,10,12, 11,13]

ბაქტეროფაგის აღმოჩენა იქცა მნიშვნელოვან ეტაპად არა მარტო თეორიული დისციპლინების, არამედ პრაქტიკული ჯანდაცვისა და ვეტერინარიის განვითარებისთვისაც.

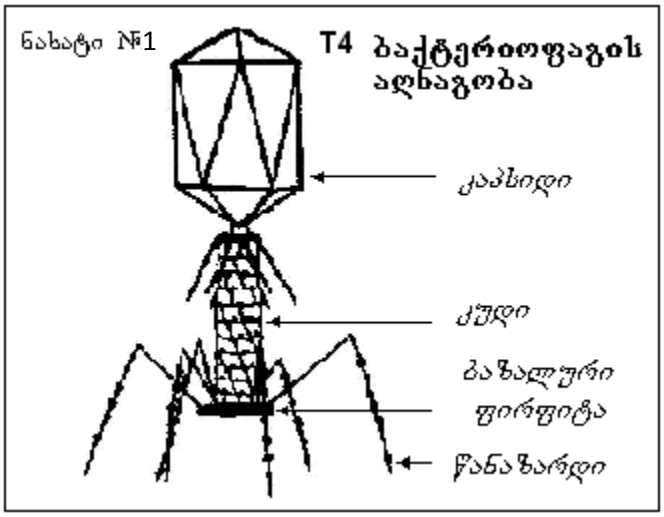
ბაქტერიების ვირუსები -- ბაქტერიოფაგები წარმატებით გამოიყენება ფაგოდიაგნოსტიკის, ფაგოინდიკაციის, ფაგოთერაპიის და ფაგოპროფილაქტიკისთვის.[8,10,14]

ბაქტერიოფაგები შეადგენს ვირუსების ყველაზე ფართო ჯგუფს. მათი გავცელების არეალი განსაკუთრებით მრავალფეროვანია: აღმოჩენილია 100-ზე მეტ ბაქტერიულ გვარში, გავრცელებულია ჰაერში, ნიადაგში, წყალში, განსაკუთრებით ჩამომდინარე - საკანალიზაციო წყლებში , ადამიანის, ცხოველების სხეულის და მცენარეების ზედაპირზე. მრავალი ფაგი გვხვდება ბაქტერიულ პოპულაციასთან ერთად სხეულის ღრუებში, ნაწლავებში და მცოხნელი ცხოველების რუმენში. ფსიქროფილური ფაგები ხშირად გვხვდება გაფუჭებულ, გაყინულ ხორცში და თევზში.[14]

ადამიანის ვირუსებთან შედარებით ბაქტერიოფაგები გამოირჩევა მდგრადობით სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური ზემოქმედების მიმართ. ბაქტერიული ვირუსების უმრავლესობა კარგად უძლემს მაღალ ტემპერატურას (50-60), კარგად იტანს გამოშრობას , გაყინვას და დიდი ხნის განმავლობაში ინახება დაბალ ტემპერატურაზე. 0.5% სულემის ხსნარი, 1% ფენოლის ხსნარი არ ახდენს მათზე გავლენას. ფაგები მდგრადია დეზინფექტანტებისმიმართ (გამონაკლისია ფორმალინი). ულტრაიისფერი სხივები და მაიონიზირებელი რადიაცია იწვევს ბაქტერიოფაგის ინაქტივაციას, დაბალ დოზებში კი მუტაციებს.[8,9,10,15]

ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიური სტრუქტურა:

გარეგნულად ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა მოგვავგონებენ სპერმატოზოიდებსა ან თავკომბალებს. მოფოლოგიურად შესწავლილია დაახლოებით 3500 იზოლატი. ფაგები მორფოლოგიურად არის წანაზარდიანი (კუდიანი), კუბური, ძაფისებრი (filamentous), ან პლეომორფული. ბაქტერიოფაგების უმრავლესობა შედგება ფაგის თავისა და კაფსიდისგან, რომელიც შეიცავს ერთ ან ორძაფიან დნმ-ს ან რნმ-ს და კუდისგან. ზოგიერთ ფაგს კუდი ძალიან პატარა აქვს ან საერთოდ არ აქვს. ფაგის ნაწილაკების ზომები მერყეობს 20-დან 200 ნმ ფარგლებში. ფაგის კაფსიდის საშუალო ზომაა 60-100 ნმ, ხოლო კუდის 100-200 ნმ.[16]



<u>T ფაგების თავი</u> -- კაფსიდი წარმოდგენილია ჰომოგენური ცილოვანი მოლეკულებით, რომლებიც კონსტუირებულია იკოსაედრის სიმეტრიით .მისი ზომები შეადგენს 100 ნმ. თავს აქვს კუბური სიმეტრია , საკმაოდ რიდიგულია და შედგება ცილოვანი გარსისა და მასში მოთავსებული დნმ-ური გენომისგან. ფაგის თავში ცილებისა და დნმ-ს შემცველობა დაახლოებით თანაბარია. ფაგების გენომი წარმოდგენილია სპირალური ორძაფიანი დნმ-ით. თავის შემადგენლობაში შედის ასევე პოლიპეპტიდი , რომელიც ძირითადად ასპარაგინის და გლუტამინის მჟავებისა და ლიზინისგან შედგება. ზოგიერთ ფაგებს (მაგ.T2) კაფსიდის შიგნით გააჩნიათ ე.წ. შინაგანი ცილა, რომელიც შეიცავს პოლიამინებს (სპერმინი და პუტრესცინი) და რომელიც უზრუნველყოფს დნმ-ის მაკრომოლეკულების სუპერპოლარიზაციას.[16] უკანასკნელი მხოლოდ ასეთი სახით შეიძლება მოთავსდეს შედარებით მცირე მოცულობაში. ერთძაფიანი დნმ-ის ან რნმ-ის შემცველი ფაგების რიცხვი

უმნიშვნელოა. ფაგების დნმ-ში აღმოჩენილია უჩვეულო აზოტოვანი ფუძეები. უაიტისა და კონონის მიერ აღმოჩენილი იქნა, რომ T-წყვილი ფაგების დნმ აზოტოვანი ფუძის ციტოზინის მაგივრად შეიცავს 5'ოქსიმეთილციტოზინს, რაც საშუალებას იძლეოდა ბაქტერიული ვირუსის გენომი ბაქტერიული პატრონ-უჯრედისგან დამოუკიდებლად შეესწავლათ. *B.subtilis* ფაგის დნმ შეიცავს აზოტოვან ფუძეს 5'მეთილურაცილს, რომელიც თიმინს ჩაანაცვლებს.[8]

<u>T ფაგების წანაზარდი</u> (კუდი) სიგრძით დაახლოებით 100 ნმ-ია. შეიცავს ღერძს (კონსტრუირებული სპირალური სიმეტრიის ტიპის მიხედვით) და კუმშვად შალითას, რომელიც უერთდება ფაგის საყელოს. ფაგის საყელო ღერძს გარსეკვრის კაფსიდის ახლოს. შალითა წარმოქმნილია 120-140 ცილოვანი მოლეკულით, თითოეული მოლეკულა შეიცავს ერთ მოლეკულა ატფ-სა Ca^{2+} იონებს. ღერძის დისტალურ ნაწილში მოთავსებილია ექვსკუთხა ბაზალური ფირფიტა ექვსი წვეტით (კბილით) და ექვსი წანაზარდით (ფიბრილები). ზოგიერთი T ფაგის (მაგ,T2) წანაზარდის დისტალურ ნაწილში მოთავსებულია ლიზოციმი (ენდილიზინი).[10,17]

2.2 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ბაქტერუოფაგების ოჯახებისა და გვარების მორფოლოგია

ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ემყარება ისეთი კრიტერიუმების შესწავლას, როგორიცაა გენომის სტრუქტურა, ანტიგენური მახასიათებლები, ბაქტერიული ვირუსის და მისი ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია, მოქმედების სპექტრი, ფიზიკო-ქიმიური თვისებები , ბიოლოგიური

თავისებურებანი. ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტი აღიარებს ფაგების 12 ოჯახს და 12 გვარს, ფაგების ოჯახებისა და გვარების დახასიათება
მოცემულია ცხრილში 1 [16]

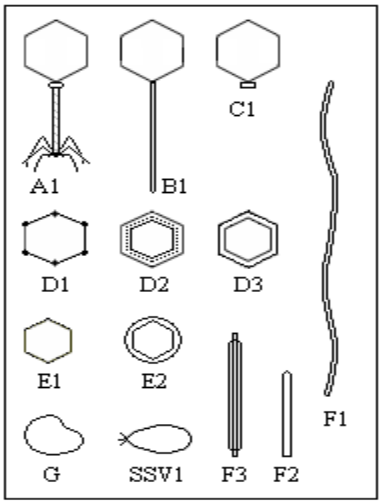
ფაგების რიგი	ნუკლეინის მჟავა	ოჯახი	გვარი	დახასიათება	წარმომადგ-
წანაზარდი-ანი ფაგები	DNA, ds, L	Myoviridae	_	კონტრაქტული კუდი	T4, T2
		Siphoviridae	_	გრძელი, უკუმშავი კუდი	λ
		Podoviridae	_	მოკლე კუდი	T7, P22
კუბური ფაგები	DNA, ss, C	Microviridae	Microvirus	ფართო კაფსომერი	ϕ X174
			Spiromicrovirus		SV4
	DNA, ds, C, S	Corticoviridae	Corticovirus	კომპლექსური კაფსიდი	PM2
	DNA, ds, L	Tectiviridae	Tectivirus	ორმაგი კაფსიდი	PRD1
	RNA, ss, L	Leviviridae	Levivirus		MS2
			Allolevivirus		Qβ
	RNA, ds, L, M	Cystoviridae	Cystovirus	ლიპიდური კონვერტი	ϕ 6
ძაფისებრი ფაგები Filamentous	DNA, ss, C	Inoviridae	Inovirus		fd
			Plectrovirus	მოკლე ფილამენტი	L51
	DNA, ds, L	Lipothrixviridae	Lipothrixvirus	ლიპოპროტეინული კონვერტი	TTV1
პლეომორფული ფაგები	DNA, ds, C, S	Plasmaviridae	Plasmavirus	უკაფსიდო	MVL2
	DNA, ds,C,S	SSV1 ჯგუფი	SSV1 ჯგუფი	ლიმონის ფორმის	SSV1

DNA, ds – ორძაფიანი დნმ, DNA, ss – ერთძაფიანი დნმ , L – ხაზოვანი , C – წრიული/ცირკულარული, M – მულტიფრაგმენტული, S – სუპერსპირალიზებული.

ნახატი №2. ბაქტერიოფაგების ცალკეული გვარების წარმომადგენელთა მორფოლოგიის სქემატური გამოსახულებები:

A1 – Myoviridae ; B1 – Siphoviridae; C1 – Podoviridae;

D1 – Microviridae; D2 – Corticoviridae; D3 – Tectiviridae;



E1 – Leviviridae; E2 – Cystoviridae;

F1 – Inoviridae, genus Inovirus;

F2 - Inoviridae, genus Plectrovirus;

F3 – Lipothrixviridae; G – Plasmaviridae; SSV1 – ჯგუფის.

A. წანაზარდიანი ფაგები

წანაზარდიანი (კუდიანი) ფაგები იყოფა სამ ოჯახად:

A.1 **Myoviridae** : ფაგები, რომლებსაც აქვთ გრძელი კომპლექსური კუდი, რომელიც შედგება ცენტრალური ღერძისგან (არხისგან) და შეკუმშვის უნარის მქონე შალითისგან (ამ ოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების 26 %). ტიპიური წარმომადგენლებია T2, T4, T6 ფაგები და სხვ.

A.2 **Siphoviridae:** ფაგები გრძელი მოქნილი კუდით, რომლის შალითას არ გააჩნია შეკუმშვის უნარი (ამ ოჯახში გაერთიანებულია კუდიანი ფაგების 59%). ტიპიური წარმომადგენლებია T1, T5, ლამბდა ფაგები და სხვ.

A.3 **Podoviridae** : ფაგები მოკლე კუდით (კუდიანი ფაგების 15 %.) . ტიპიური წარმომადგენლებია T3, T7 და სხვა

Myoviridae ოჯახში 3 მორფოლოგიური ტიპია გაერთიანებული:

პირველ მორფოლოგიურ ტიპს შედის ფაგი-T4 რომლის კაფსიდი სწორ იკოსაედრს წარმოადგენს, ამ მორფოლოგიის ფაგებს ბაზალური ფირფიტა არ აქვთ, უმეტესობა ზომიერი ფაგებია.

მეორე მორფოლოგიურ ტიპს განეკუთვნება შემდეგი ფაგები: 16,24,44,109,352,1214,F8,M4. ფაგების თავი იკოსაედრს ან ოქტასაედრს წარმოადგენს. შალითის დისტალურ ნაწილში მოთავსებულია ბაზალური ფირფიტა, რომლიდანაც 6 ან მეტი ფიბრილი გამოდის სიგრძით 40-70 ნმ.

მესამე მორფოლოგიურ ტიპს მიკუთვნება შემდეგი ფაგები: 31.68,COL21. ფაგის კაფსიდი სწორ იკოსაედრს წარმოადგენს, კუდი შედგება ყელის, საყელოს, ღერძის , კუმშვადი შალითის და ფიბრილებისგან. ყელი მოკლეა და მთლიანად იფარება საყელოთი. მათ ბაზალური ფირფიტა არ გააჩნიათ.

Siphoviridae ოჯახში 3 მორფოლოგიური ტიპია გაერთიანებული. პირველ ტიპში შედის ფაგი ფ10 კაფსიდი სწორ იკოსაედრს წარმოადგენს ზომით 60 ნმ-ია. მას გააჩნია მოქნილი კუდი რომლის სიგრძე 119-120 ნმ-ია ბოლოში ბაზალური ფირფიტაა მოთავსებული საიდანაც გამოდის ფიბრილები. მეორე მორფოლოგიურ ტიპს მიეკუთვნება M6 ფაგი, რომლის თავი წაგრძელებულია, კაფსომერები სფერული ფორმისაა .კუდის სიგრძე 139.2 ნმ-ია ფაგს არ გააჩნია ბაზალლური ფირფიტა, კუდი ბოლოვდება ფიბრილებით. მესამე მორფოლოგიურ ტიპს ეკუთვნის ფაგი 1214. მისი ვირიონის კაფსიდი წაგრძელებულია ზომით 98.2X64.2 ნმ. არაკონტაქტური კუდის სიგრძე 119 ნმ-ია, კუდი ბოლოვდება ფიბრილრბით.

Podoviridae -ს ოჯახში გაერთიანებულია 2 მორფოლოგიური ტიპი .პირველ მორფოლოგიურ ტიპს მიკუთვნება ფაგი 119X, მას აქვს სწორი იკოსაედრის ფორმის კაფსიდი და 13-34 ნმ სიგრძის მოკლე კუდი. ვირიონის მთლიანი სიგრძეა 69-95 ნმ.

მეორე მორფოლოგიურ ტიპს მიკუთვნება ფაგი 73 კაფსიდი სწორი იკოსაედრია, კუდის ირგვლივ განლაგებულია ფიბრილები, რომლებიც კაფსომერიდან გამოდის და იტოტება.[16]

B. კუბური ფაგები

კუბური ფორმის ფაგების კაფსიდი არის იკოსაედრა ან წაგრძელებული ფორმის. ახასიათებს სპირალური სიმეტრია. განარჩევენ დნმ-ს და რნმ-ს შემცველ ფაგებს. კუბურ ფაგებს შორის გვხვდება რნმ-ს შემცველი P. aeruginosa ფაგები

კუბური რნმ-ს შემცველი ფაგები

B.1 ოჯახი Leviviridae ამ ოჯახს წარმომადგენელთა უმრავლესობა პლაზმიდ-სპეციური კოლიფაგებია. რომლებიც ადსორბირდება F და sex pili-ებზე. ვირუსული ნაწილაკები 24 ნმ

დიამეტრის მქონე და 32 კაფსომერისგან შემდგარ უგარსო იკოსაედრს წარმოადგენს. გენეტიკური მასალა ერთძაფიანი ხაზოვანი რნმ-ით არის წარმოდგენილი (RNA, ss, L). ამ ოჯახშიშედის P. aeruginosa -ს ფაგებიდან 7S და PP7. სეროლოგიური და სხვა კრიტერიუმებით ოჯახი იყოფა ორ გვარად:

ა) გვარი Levivirus წარმომადგენლები MS2 და R17

ბ) გვარი Alloevivirus

B.2. ოჯახი Cystiviridae, გვარი Cystovirus წარმომადგენელი P. aeruginosa -ს ფაგი . იგი უნიკალურია რამდენიმე თვალსაზრისით .ეს არის ერთადერთი ფაგი , რომელიც შეიცავს ორძაფიან რნმ-ს და რნმ-პოლიმერაზას და ერთადერთი ვირუსია ,რომელსაც აქვს დოდეკაედრა კაფსიდი. მისი რნმ დანაწევრებულია და შედგება სამი მოლეკულისგან.[16]

C. .ძაფისებრი ფაგები- ფილამენტოსები

C.1. ოჯახი Inoviridae - ამ ოჯახში შედის ორ გვარი რომლებიც განსხვავდება მასპინძლის დიაპაზონით, აქვთ ერთნაირი რეპლიკაციის უნარი და ფაგოგენეზისი. მიუხედავად იმისა, რომ ლიპიდებს არ შეიცავენ ამ ოჯახის ვირუსები ქლოროფორმ-მგრძნობიარეა. შეიცავს ერთძაფიან ხაზოვან დნმ-ს(DNA, ss, L)

ა) გვარი შედგება 31 ფაგისგან, რომლებიც მოფოლოგიურად არის გრძელი, რიგიდული ან ფლექსიური, მგრძნობიარეა ბგერითი რხევებისადმი ბევრი მათგანი პლაზმიდ-სპეციფიურია. ტიპიურ ი წარმომადგენელია fd ფაგი.

ბ) გვარი Plectrovirus შედგება 16 იზოლატისგან. მათი ძაფები მოკლე, სწორი ღერძია . ამ ოჯახს მიეკუთნება Pf1 ფაგი.[16]

2.2.1 T7 ბაქტერიოფაგი

T7 ბაქტერიოფაგი აღმოჩენილი იქნა 1945 წ . T7 აინფიცირებს E.coli- ს ბაქტერიის შტამების უმრავლესობას . T7 წარმოადგენს დნმ ვირუსს სიცოცხლის ლითიური ციკლით. T7 ხასიათდება კომპლექსური სიმეტრიით. მას აქვს სფერისებრი კაფსულა დიამეტრით 55 ნმ და ასევე კაფსიდთან მიმაგრებული კუდი რომლის დიამეტრია 19 ნმ , ხოლო სიგრძე 28.5 ნმ. კაფსიდში მოთავსებულია ფაგის გენომი , რომელიც წარმოადგენს 40 kbp იან დნმ- ს , რომელშიც კოდირებულია 55 ცილა.

სიცოცხლის ციკლი, დრო ინფექციიდან პატრონ უჯრედის ლიზისამდე და ახალი თაობის გამონთავისუფლებამდე , T7 ფაგისთვის არის 17 წუთი 37˚C-ზე. თავდაპირველად T7 შეიცნობს E.coli -ის უჯრედის ზედაპირზე სპეციფიურ რეცეპტორებს და ემაგრება კედლის ზედაპირს ფიბრილების მეშვეობით . T7 -ის ზოგიერთ შტამში ფიბრილების ნაცვლად გვხვდება კუდის ' წვეტი' რომელიც შლის O ან K- ანტიგენებს უჯრედის ზედაპირზე. ადსორბციის პროცესიის დროს მსგავსი ლიზოცოები ხსნის ბაქტერიული უჯრედის კედლის პეპტოგლიკანურ შრეს, რომლის მეშვეობითაც ხორციელდება ვირუსილი დნმ-ის გადატანა ბაქტერიულ უჯრედში . რადგანაც T7 ფაგის კუდი არის მოკლე და მსხვილი იგი ვერ ახერხებს უჯრედის კედლის ბოლომდე განჭოლვას, იმისთვის რომ მოხდეს გენეტიკური მასალის გადატანა, ვირიონის ცილებს პირველ რიგში უწევთ არხის გაკეთება ფაგის კუდიდან ბაქტერიული უჯრედის ციტოპლაზმამდე. დნმ-თან ერთად პატრონ უჯრედში ასევე გადადის ცილები რომლებიც საჭიროა ვირუსული გენომის რეპლიკაციის დასაწყებად და თრგუნავს ბაქტერიულ გენომს. ფაგის ლითიური ციკლი ოპტიმალურ პირობებში მიმდინარეობს დაახლოებით წუთი და ერთი ლიზისის დროს ხდება 100 ერთეული ახლად დასინთეზირებული ფაგის გამონთავისუფლება.[49,50,51,52]

თავი 2.3 ბაქტერიოფაგების ფიზიოლოგია, ბაქტერიული ვირუსების განვითარების ციკლი, ბაქტერიოფაგის და პატრონ უჯრედის ურთიერთქმედება.

ბაქტერიოფაგის ურთიერთქმედება პატრონ -უჯრედთან მკაცრად სპეციფიკურია, ანუ ბაქტერიულ ვირუსებს აქვს უნარი მოახდინოს ინფიცირება მხოლოდ გარკვეული სახეობის ბაქტერიისა. არსებობს ბაქტერიოფაგების განვითარების ორი ციკლი: 1.ლიზისური და 2. ზომიერი. ინფექციიის საბოლოო შედეგის მიხედვით ფაგები იყოფა რამდენიმე ჯგუფად 1. ჭეშმარიტი ვირულენტური ფაგები, 2. ზომიერი ფაგები, 3 .ფაგები განვითარების უწყვეტი ციკლით, 4.ფაგები რომლებიც შედის ფსევდოლიზოგენურ ურთიერთობაში უჯრედთან.[9,12]

ბაქტერიული ვირუსების განვითარების ლიზისურ ციკლს სხვაგვარად უწოდებენ ვეგეტატიურ ან პროდუქტიულ ციკლს, რომლის დროსაც ინფექციური პროცესის შედეგი მხოლოდ ერთია - ბაქტერიული უჯრედის ლიზისი, ფაგის შთამომავლობის გამონთავისუფლებით. განვითარების ლიზისურ ციკლს ყოველთვის გადის ჭეშმარიტად ვირულენტური ფაგები. ლიზისურ ციკლში გამოყოფენ შემდეგ სტადიებს : 1. ადსორბცია; 2. ფაგის ინექცია - ვირუსული დნმ-ის შეჭრა;

3.ფაგის რეპროდუქცია; 4. ვირუსის ახალი თაობის პოპულაციის გამოსვლა ბაქტერიული უჯრედიდან- გამონთავისუფლება.[8,9,10,11]

<u>ბაქტერიოფაგის ადსორბცია პატრონ-უჯრედზე</u> ხორციელდება სპეციფიური ზედაპირული სტრუქტურების - რეცეპტორების საშუალებით, რომლებიც ძირითადად ლოკალიზებულია უჯრედის კედელში. რეცეპტორები ქიმიური შემადგენლობის მიხედვით განსხვავებულია მაგ. ფაგები T2 და T6 ადსორბირდება რეცეპტორებზე , რომლებიც განლაგებულია უჯრედის კედლის ლიპოპროტეინულ შრეში. ხოლო ფაგები T3, T4 და T7 ადსორბირდება ლიპოპოლისაქარულ რეცეპტორებზე. [8,9,10,]ბაქტერიულ უჯრედებზე, რომლებიც მოკლებულია უჯრედის კედელს (პროტოპლასტები,L-ფორმები), გაქტერიო ფაგი არ ადსორბირდება. ზოგიერთი ფაგი ადსორბირდება შოლტებზე, F-ილებზე, კაფსულაზე ან პლაზმურ მემბრანაზე. ზოგჯერ ინექციიისათვის გამოიყენება უჯრედის ბუნებრივი ფორმები, რომლებიც მონაწილეობს ბაქტერიული უჯრედის გარემოსთან ნივთიერებათა ცვლაში. მუტაციების დროს რომელსაც თან ახლავს ბაქტერიული რეცეპტორების ცვლილება უჯრედი კარგავს ფაგის ადსორბციიც უნარს და იძენს რეზისტენტულობას მათ მიმართ.

ბაქტერიოფაგის ადსორბცია პატრონ-უჯრედზე სპეციფიური რეცეპტორების გარდა დამოკიდებულია გარემოს ფიზიკო-ქიმიურ თვისებებზე, ბაქტერიული უჯრედის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე, ფაგის ბუნებაზე.

სხვადასხვა ფაგის ადსორბციისთვის სპეციფიკური რეცეპტორების რიცხვი სხვადასხვაა. ბაქტერიული უჯრედის კედელზე შესაძლებელია 200-3000 ვირუსული ნაწილაკის ადსორბირება [9,10,]

<u>ფაგის ინექცია -ვირუსული დნმ-ის შეჭრა.</u> ფაგის ადსორბციის შემდეგ, უჯრედის კედლის შემადგენლობაში არსებული თუთიის იონები იწვევს ფაგის კუდის დისტალური ნაწილის ბოჩკოების გაგლეჯას, გამონთავისუფლებული ბაზალური ფირფიტა კუდის დისტალურ ნაწილში მოთავსებული ფერმენტ ენდოლიზინის (ლიზოციმი) გამოყოფით ახდენს ბაქტერიული უჯრედის კედლის მიმდებარე ფრაგმენტის ლიზირებას. ამავდროულად შალითაში გამონთავისუფლებული Ca^{2+} იონები იწვევს ატფ-აზას აქტივირებას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს შალითის შეკუმშვას და უჯრედში ციტოპლაზმური მემბრანის გავლით კუდის ღერძის შეჭრას. ამის შემდეგ ადგილი აქვს უჯრედის ციტოპლაზმაში ვირუსული დნმ-ის მაკრომოლეკულების სწრაფ გადასვლას ძაფის ფორმის სახით (ელექტროსტატისტიკური ძალების გავლენით).

აღსანიშნავია , რომ ბაქტერიულ ციტოპლაზმაში შედის მხოლოდ ფაგის ნუკლეინის მჯავა, ხოლო კაფსიდის ცილები რჩება გარეთ. ფაგი ϕX174-ის ერთძაფიანი დნმ , ასევე ძაფისებრი ფაგების (fd) დნმ უჯრედში შედის კაფსიდის ცილასთან ერთად.[8,10]

<u>ფაგის რეპროდუქცია -</u> ვირუსული ნუკლეინის მჯავებისა და კაფსიდის ცილების სინთაზი .ბაქტერიულ უჯრედში შეჭრის შემდეგ ფაგი დნმ ''ქრება'', გადადის ე.წ. ლატენტურ მდგომარეობაში. ამ დროს ფაგის ნაწილეკაბის აღმოჩენა უჯრედში შეუძლებელია. დროის მინიმალური პერიოდი, რომელიც საჭიროა უჯრედში პირველი მომწიფებული ფაგის ნაწილაკის წარმოქმნისათვის (განსხვავებული სხვადასხვა ფაგებისათვის) იწოდება ფარულ პერიოდად, ეკლიფსად.[10,12] ბაქტერიული ვირუსის უჯრედშიდა განვითარება ხორციელდება თანმიმდევრული ექსპრესიით, თავდაპირველად ადრეული, შემდგომ კი გვიანი გენებისა. ვირუსი იწყებს უჯრედის გენეტიკურ მართვას; ფაგის დნმ თრგუნავს უჯრედულ სინთეზურ პროცესებს და იწვევს ვირუსსპეციფიკური ნაწილაკების სინთეზის ინდუცირებას. ადგილი აქვს ფაგის ცილების სინთეზს და ნუკლეინის მჯავების რეპლიკაციას.[8,10,11]

<u>ფაგის ცილების სინთეზი-უჯრედული</u> რნმ-პოლიმერაზა ახდენს ვირუსული დნმ-ის ტრანსკრიფციას მ-რნმ-ში რომელიც ბაქტერიული რიბოსომებით ტრანსლირდება ფაგის ადრეულ ცილებად: რნმ-პოლიმერაზად და ცილებად რომლებიც სხვადასხვა მექანიზმის მეშვეობით თრგუნავს ბაქტერიული გენების ექსპრესიას. ვირუსული რნმ-პოლიმერაზა განაპირობებს ფაგის ''გვიანი'' ცილების ტრანსკრიფციას (მაგ. გარსისი ცილები და ენდოლიზინი) რომელიც აუცილებელია ფაგის შთამომავლობის მორფოგენეზისათვის (ზოგიერთი ბაქტერიული ვირუსი შლის პატროუჯრედის ქრომოსომებს ნუკლეოტიდებამდე რათა გამოიყენოს ისინი საკუთარი ნუკლეინია მჯავების სინთეზისათვის)

<u>ნუკლეინის მჯავების რეპლიკაცია</u> ხორციელდება კვლავ სინთეზირებული ვირუსული დნმ-პოლიმერაზას საშუალებით, რომელიც აწარმოებს ვირუსული ნუკლეინის მჯავების მრავლობით ასლებს.

ვირუსული დნმ-ის სპეციალური აფინური უბნები იწვევს ფაგების თავების წინამორბედების თაბმოყრის ინდუცირებას ნუკლეინის მჯავების აგრეგატების ირგვლივ. ფაგის ოჯახების უმრავლესობაში ამ სტატიაზე ხდება ნუკლეინის მჟავების შესვლა შექმნილ კაფსიდში და დნმ-ის შემცველი ფაგის თავის წარმოქმნა. დანარჩენ ფაგებში ნუკლეინის მჯავების გარშემო ხორციელდება კაფსიდის კონსტრუირება. შევსებული ფაგები შემდგომ ურთიერთქმედებს კუდის ნაწილებთან - წარმოიქმნება ფუნქციონალური ფაგი. ახალი ფაგების თავმოყრას

უჯრედში ეწოდება ფაგის მომწიფება. ფაგის ინექციიდან ფაგების ახალი შთამომავლობის გამონთავისუფლებამდე დროის ინტერვალს ეწოდება ლატენტური პერიოდი. ლატენტური პერიოდი დამოკიდებულია მასპინძლის ფიზიოლოგიაზე და მერყეობს 20-წთ-დან 30-40 სთ-მდე.

ლატენტური პერიოდის დასრულების შემდგომადგილი აქვს ინფიცირებული ბაქტერიული უჯრედის ლიზისს და ფაგის შთამომავლობის, ახალი შვილეული პოპოპულაციების გამონთავისუფლებას.[9,13]

<u>ფაგის შვილეული პოპულაციების გამონთავისუფლება.</u> ფაგის შთამომავლობის წარმოქმნის შემდეგ (10-200 ნაწილაკი ერთი ინფიცირებული უჯრედიდან) ხდება პატრონ-უჯრედის ლიზისი და ვირუსის შვილეული პოპულაციის გამონთავისუფლება. ფაგით დაინფიცირებული ბაქტერიის ლიზისში მონაწილეობს სხვადასხვა ფაქტორი: ფაგის ლიზოცომი, უჯრედშიდა წვენის მომატება, აუტოლიზინები,. როგორც ჩანს, ბაქტერიული ვირუსი იწვევს აუტოლიზინების წარმოქმნის სტიმულაციას, რადგან ახდენს მექანიზმების ბლოკირებას , რომლებიც არეგულირებს მათ სინთეზს. სხადასხვა ფაგის შვილეულ პოპულაციებში ვირიონების რაოდენობა მეტ-ნაკლებად მუდმივია და იწოდება, როგორც ფაგის მოსავლიანობა ანუ ფაგის გამოსავალი.

მყარ საკვებ ნიადაგზე, რომელზეც ბაქტერიული უჯრედები 'გაზონის' სახით არის გათესილი, ბაქტერიოფაგების გამრავლებას თან ახლავს ბაქტერიების ლიზისი და გამჭირვალე ზონების ე.წ. 'სტერილური ლაქები''-ს ანუ ბაქტერიოფაგების 'ნეგატიური კოლონიების წარმოქმნა. აღსანიშნავია , რომ სხვადასხვა ფაგებს მკაცრად განსაზღვრული ზომებისა და ფორმების ნეგატიური კოლონიები ახასიათებთ (მაგ. ვარსკვლავის ფორმის ნეგატიური კოლონიები დამახასიათებელია დიზენტერიის ფაგებისთვის).

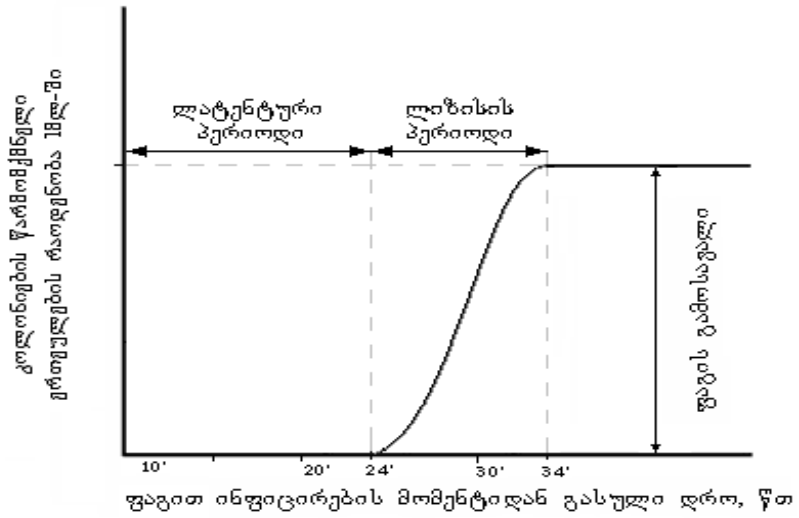
ბაქტერიოფაგების განვითარების ლიზისური ციკლის შეაწავლის თვალსაჩინო მაგალითია ელისისა და დელბრიუკის მიერ მოწოდებული ფაგის გამრავლების ერთჯერადი ციკლის ცდა. ერთჯერადი ციკლის შესწავლის მეთოდიკა საშუალებას იძლევა განისაზღვროს ბაქტერიული ვირუსის ორი მნიშვნელოვანი მახასიათებელი : 1. ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების ლატენტური პერიოდი და 2. ბაქტერიოფაგის გამოსავალი - ფაგის ნაწილაკების საშუალო ''მოსავალი'' ერთი ინფიცირებულ პატრონ -უჯრედიდან.

ფაგის გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლის კლასიკურ მაგალითს წარმოადგენს თ4 ფაგის e.coli- ს უჯრედზე გამრავლების ერთჯერადი ციკლის მრუდი (გრაფიკი 1).

როგორც 1 გრაფიკიდან ჩანს ფაგით უჯრედის ინფიცირებიდან 24 წთ-ის განმავლობაში ნეგატიური კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების რაოდენობა უცვლელი რჩება. ეს საწყისი ინტერვალი რომლის განმავლობაში არ ხდება ინფექციური ტიტრის ზრდა, იწოდება ლატენტურ პერიოდად. 24 წთ-ის შემდგომ ნეგატიური კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების რიცხვი კულტურაში იწყებს სწრაფ მატებას, რაც გრძელდება 10 წუთის განმავლობაში, რომლის შემდეგაც ინფექციური მატება არ აღინიშნება. დროის ინტერვალს რომლის განმავლობაში ადგილი აქვს ნეგატიური კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების რიცხობრივ მატებას ეწოდება ლიზისის პერიოდი (T4 ფაგის შემთხვევაში გრძელდება 10 წთ.)ფაგის საბოლოო ტიტირის საწყის ტიტრთან შედარებას ფაგის გამოსავალს უწოდებენ.

(T4 ფაგის გამოსავალი უტოლდება 100) [11]

გრაფიკი №1. T4 ფაგის გამრავლების ერთჯერადი ციკლის მრუდი



სურათი 1

უახლესი ელექტრონული მიკროსკოპით გადაგებულ ფოტოზე ნათლად ნაჩვენებია (სურ. 1) რომ ბევრი ბაქტერიოფაგების შეიძლება ადსორბირდერს ერთი ბაქტერიულ უჯრედზე დაახლოებით რამდენიმე ასეული (200-300 ფაგი ერთ ბაქტერიაზე) სურათიდან ასევე ჩანს რომ ერთი ფაგი აკეთებს ინფიცირებას.[59]

<u>ფაგის ნათელი (ნეგატიური) კოლონიები .</u>

ფაგის ნათელი კოლონიები წარმოიქმნება ფაგის მიერ ბაქტერიის ლიზისს და შთამომავლოვის გამონთავისუფლებისას. როცა ხდება ერთი უჯრედის ინფიცირება ფაგის მიერ. მისი ლიზისის შედეგად გამონთავისუფლებული ფაგების შთამომავლობა განიბნევა

მეზობელ ბაქტერიულ უჯრედებზე და ახდენს მათ ინფიცირებას, მათი ლიზისის შედეგად წარმოქმნილი ფაგების შთამომავლობა აინფიცირებს კიდევ სხვა მეზობელ ბაქტერიებს , რომლებიც თავისთავად განიცდიან ლიზისს და ასე შემდეგ, ამ პროცესის შედეგს წარმოადგენს სწორედ ნათელი კოლონიების გაჩენა.

ნათელი კოლონიის მორფოლოგია დამოკიდებულია ფაგის სახეობაზე, მასპინძელ უჯრედზე და მათი ზრდის გარემოებებზე. ჩვეულებრივ ფაგის უნფიცირებას იკვლევენ მყარი აგარის (1.5%) საკვებ არეზე , რადგან ის ხელს უწყობს ფაგის სწრაფ გავრცელებას . ფაგის ნათელი კოლონიების ზომა პროპორციულია ადსორბციის ეფექტურობის, ლატენტური პერიოდის ხანგრძლივობის . ფაგის ნათელი კოლონიების ზომის მრავალფეროვნება ასევე დამოკიდებულია იმაზე თუ ბაქტერიის ზრდის რომელ ფაზაში ხდება ფაგებით ინფიცირება. გამრავლების ადრეულ ფაზაში მყოფ ბაქტერიაზე ადსორბცირებული ფაგი უფრო დიდი ნათელ კოლონიას გვაძლევს, ვიდრე გვიან ფაზეზე ადსორბირებული ფაგი. სუფთა ნათელი კოლონია მიიღება თუ მასპინძელი უჯრედი სრულიად მგრძნობიარეა ბაქტეიოფაგის მიმართ. ხშირად ფაგის სუფთა ნათელი კოლონია ნაპირებში არის დაბინდული, რადგან ნათელი კოლონიის ნაპირებში განლაგებული უჯრედების ლიზისი სრულად არ არის დამთავრებული. თუ პატონ უჯრედი ნაწილობრივ რეზისტენტულია ფაგის მიმართ, მაშინ მიიღება ერთფეროვნად დაბურული კოლონიები. (მაგალითად თუ ბაქტერიული უჯრედის 10% გადაურჩება ფაგით დაინფიცირებას)[55]

2.4. ფაგების გამოყენება სხვადასხვა ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციური დაავადებების მკურნალობისა და პრევენციისათვის

მედიცინაში ანტიბიოტიკორეზისტენტული მიკროორგანიზმებით გამოწვეული ინფექციების სიმრავლემ და თანამედროვე მეთოდებით მათთან ბრძოლის სირთულემ აღიარება მოუტანა ისეთ ეფექტურ და უვნებელ სამკურნალო-პროფილაქტიკურ საშუალებებს, როგორიცაა ბაქტერიოფაგის პრეპარატები [41].

ფაგოთერაპია აღმოცენდა ბაქტერიოფაგების აღმოჩენისთანავე და დღემდე წარმატებულად გამოიყენებოდა ზოგიერთ ქვეყანაში, მათ შორის საქართველოში, რუსეთსა და პოლონეთში. ანტიბიოტიკების ერის დადგომისთანავე ფაგოთერაპია დასავლეთში მივიწყებული იქნა, მაგრამ 1980-იანი წლებიდან სიცოცხლისათვის საშიში, ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიული ინფექციების მატებამ და გავრცელებამ, ასევე მათი ახალი ფორმების წარმოქმნის შესაძლებლობამ

ახლებურად გააშუქა ბაქტერიოფაგების გამოყენების პერსპექტივა, როგორც ანტიბიოტიკების ალტერნატიული საშუალებისა სხვადასხვა ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისა და პროფილაქტიკისთვის [38]. დღეისათვის დასავლეთში ნამდვილი ბუმია ამ მიმართულებით, იქმნება ფაგოთერაპიული კომპანიები, ტარდება ბაქტერიოფაგების აქტიური რეკლამირება [37].

ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემების თანახმად განვითარებულ ქვეყნებში ინფექციური დაავადებებით იღუპება 20 მლნ ადამიანი ყოველწლიურად. ამ სნეულებათა ეტიოლოგიაში წამყვანი როლი ეკუთვნის ანტიბიოტიკორეზისტენტულ მიკროორგანიზმებს. ამიტომ დღეისათვის მთელი მსოფლიოს მედიკოსების ყურადღებას იქცევს ბიოლოგიური, ეფექტური, უვნებელი პრეპარატები – ბაქტრეიოფაგები, როგორც ანტიბიოტიკების ალტერნატიული საშუალება.

ბაქტერიოფაგების – "ბაქტერიების მშთანთქმელის" აღმოჩენისათანავე 1917 წ. დერელის მიერ მოწოდებული იყო ჰიპოთეზა მათი ბაქტერიული დაავადებების სამკურნალოდ გამოყენების შესახებ. 1918 წ. დერელის მიერ გამოქვეყნებულ სტატიაში გამოთქმული იყო აზრი ბაქტერიოფაგების წარმატებული გამოყენების შესახებ დიზენტერიით დაავადებულ ავადმყოფებში და ბაქტერიოფაგებით გამოწვეული შემდგომი იმუნიტეტის განვითარების შესახებ [40].

1921 წ. ბრაინოგმა და მეისინმა პირველად აღწერეს სტაფილოკოკური ეტიოლოგიის კანის დაავადებების წარმატებული მკურნალობა სტაფილოკოკური ბაქტერიფაგების გამოყენებით [36].

1923 წ. საქართველოში, დერელისა და გ. ელიავას ერთობლივი ძალისხმევით დაარსდა ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის (ბმვ) ინსტიტუტი. ქ.თბილისის გ. ელიავას სახელობის ბმვ ინსტიტუტში ბაქტერიული პათოგენების საწინააღმდეგო მრავალი ფაგი იქნა გამოყოფილი და შესწავლილი, რომელიც ყოფილ საბჭოთა კავშირის მაშტაბით ფართოდ გამოიყენებოდა სხვადასხვა ბაქტერიული ეტიოლოგიის ინფექციური პროცესების პროფილაქტიკისა და მკურნალობისათვის. მსგავსი სამუშაოები წარმატებულად ტარდებოდა პოლონეთსა და რუსეთში. გ. ელიავას სახელობის ბმვ ინსტიტუტში ჩატარებული გამოკვლევები, მხოლოდ ახლახან გამოქვეყნდა ინგლისურ ენაზე, რამაც მსოფლიოს დაინტერესება გამოიწვია [41].

წლების განმავლობაში და დღემდე ბაქტერიოფაგების თერაპიული პრეპარატები წარმატებულად გამოიყენება ისეთი ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობისა და პრევენციისათვის, როგორიცაა ზედაპირული და ღრმა დერმატოზები (დერმატიტები), ჭრილობათა და დამწვრობის შემდგომ

განვითარებული ინფექციები, ნოზოკომიალური ინფექციები, ბაქტერიული სეფსისები და სხვა [26,31,34].

არსებობს თერაპიული ბაქტერიოფაგების გამოყენების სხვადასხვა მეთოდები, რომელიც განისაზღვრება ინფექციური პროცესის ხასიათით [21]. რიგი მკვლევარების აზრით, თერაპიული ბაქტერიოფაგების გამოყენების სწორი მეთოდის შერჩევას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება ინფექციური დაავადებების ეფექტური მკურნალობისათვის [43,45].

ზედაპირული ინფექციების სამკურნალოდ ბაქტერიოფაგის პრეპარატები გამოიყენება ადგილობრივად – ხდება ინფიცირებული ჭრილობების ფაგებით დამუშავება (მობანის მეთოდი), ფაგის სახვევებისა და კომპრესების გამოყენება. აბსცესების დროს ადგილი აქვს შიგთავსის გამოსვლის შემდგომ დაზიანების კერაში ფაგის შეყვანას და დრენაჟის დადგმას. ცნობილია, ბაქტერიოფაგების გამოყენება სანთლების სახით. ფაგების კანქვეშა გამოყენების მეთოდს მიმართავენ ოსტეომიელიტების, კანის ღრმა დაზიანებების დროს. უროგენიტალური ინფექციების დროს ფაგების შეყვანა ორგანიზმში ხორციელდება კათეტერის საშუალებით. ფაგის აეროზოლით ინგალაცია ნაჩვენებია ზემო სასუნთქი გზების ინფექციური დაავადებების დროს. კლინიცისტების აზრით, ფაგების ინტრავენური გამოყენება რეკომენდირებულია მხოლოდ სასიცოცხლო ჩვენების მიხედვით – სეფსისების დროს, იმის გათვალისწინებით, რომ შესაძლებელია ტოქსიკური შოკისა და შემდგომი ალერგიული რეაქციების განვითარება. განსაკუთრებით აღსანიშნავია, ფაგების გამოყენების პერ-ორალური მეთოდი, რომელიც ხანგრძლივი დროის განმავლობაში წარმატებულად გამოიყენება ნაწლავური ინფექციების სამკურნალოდ. უკანასკნელ ხანებში, თითქმის საერთო აზრია, რომ პერ-ორალურად მიღებული ფაგები სწრაფად ხვდება სისხლსა და ორგანიზმის დანარჩენ სითხეებში, მათ შორის შარდში [46]. აქედან გამომდინარე, ზოგიერთ შემთხვევაში შესაძლებელია მერილის დაპატენტებული მეთოდისათვის [42] გვერდის ავლა, რომელიც ფაგების ხანგრძლივი დროით სისხლში ცირკულირებისთვის ითვალისწინებს ფაგების კაფსიდების მოდიფიკაციას. ფაგების პერ-ორალური მეთოდის გამოყენებისას საკმარისია სხვადასხვა თერაპიული ფაგების მუტანტების სერიების გადარჩევა, რომლებმაც გაიარეს პაციენტის ორგანიზმში. კლინიცისტების დაკვირვებით ფაგის გამოყენების ეს მეთოდი იმდენად ეფექტურია, რომ შესაძლებელია სასიცოცხლო ჩვენებების მიხედვით ინტრავენური მეთოდის პერ-ორალური მეთოდით ჩანაცვლება [12, 34].

ლიტერატურაში არსებობს მრავალი მონაცემი, რომლებიც ადასტურებს ბაქტერიოფაგების ეფექტურ გამოყენებას თერაპიული მიზნით, სხვადასხვა ეტიოლოგიის ბაქტერიული ინფექციების დროს [31,39].

1947 წ. კოკინმა აღწერა ჯარისკაცებში აიროვანი განგრენის სამკურნალოდ შტაპჰყლოცოცცუს და შტრეპტოცოცცუს ანაერობული ფაგების წარმატებული გამოყენება. 767 შემთხვევიდან მხოლოდ 18.8% დამთავრდა ლეტალურად. საკონტროლო ჯგუფში, სადაც არ იქნა გამოყენებული ბაქტერიოფაგები და გამოიყენებოდა ქიმიური სამკურნალო პრეპარატები – სიკვდიალიანობამ შეადგინა 42.2% [39].

ბაქტერიოფაგები ეფექტურად გამოიყენებოდა ინტესტინალური ინფექციების სამკურნალოდ. ქრონიკული დიზენტერიით დაავადებული პაციენტების ფაგით მკურნალობის წარმატებული შედეგები შესწავლილი იქნა ვლასოვისა და არტემენკოს მიერ. “ფაგი-ვაქცინა”-ს კომბინირებული პრეპარატის მშრალი აბებით მკურნალობის შემდეგ პაციენტების 86.7% სრულად გამოჯანმრთელდა [39]

ჩირქოვან-ანთებითი დაავადებების სამკურნალოდ კომბინირებული ფაგების ეფექტური გამოყენების შესახებ მრავალი მონაცემი არსებობს. სხვადასხვა ანთებითი პროცესების (პერიტონიტი, ოსტეომიელიტი, ფილტვების აბსცესი, ბრონქოექტაზია და სხვა) გამომწვევი ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული შტამების მიმართ კომბინირებული ფაგების – დიფაგის (სტაფილო-პროტეუსი) და პიოფაგის (ხუთ კომპონენტიანი - სტრეპტო-სტაფილო-პროტეუსი-კოლი-ფსევდომონა) [დამზადებული ქ. თბილისის გ. ელიავას სახ. ბმვ ინსტიტუტში] კლინიკაში გამოყენების შედეგად სტაფილოკოკური ინფექციები შემცირდა – 97%-ით, პროტეუსით გამოწვეული ინფექციები – 86%-ით, ხოლო სტრეპტოკოკული ინფექციები – 98%-ით, რაც შეეხება შერეული ფორმის ინფექციებს, ისინი საერთოდ აღარ აღინიშნებოდა ფაგოთერაპიის შემდგომ [30].

სლოპეკის და მისი თანაავტორების მონაცემებით ქრონიკული ჩირქოვანი ინფექციების დროს თერაპიული ბაქტერიოფაგების გამოყენების შედეგად პაციენტების გამოჯანმრთელება აღინიშნებოდა – 93.5% [44].

ე.ვ. ერმაკოვი და თანაავტორები [23] აღწერენ მწვავე და გახანგრძლივებული პნევმონიების (თანმხლები ჩირქოვანი ბრონქიტებით). ეფექტურ მკურნალობას სტაფილოკოკური, სტრეპტოკოკური, ნაწლავის და ლურჯ-მწვანე ჩხირების, პროტეუსის სპეციფიური თერაპიული ბაქტერიოფაგების საშუალებით.

პროსკუროვის მონაცემების მიხედვით [27] ქოლეცისტიტების, ენტეროკოლიტების, პერიტონიტების, დამწვრობითი და ჭრილობათა ინფექციების დროს თერაპიული სტაფილოფაგის გამოყენებისას 148 ავადმყოფიდან გამოჯანმრთელება აღინიშნებოდა 81%-ში.

აღსანიშნავია, მრავლობითი ანტიბიოტიკორეზისტენტობის მქონე P. აერუგინოსა-ს სპეციფიური, პოლივალენტური ფსევდომონადური ფაგის სამკურნალო-პროფილაქტიკური პრეპარატის ეფექტური გამოყენება ქირურგიული ინფექციების დროს. ფსევდომონადური ფაგის თერაპიული ეფექტი 67.1%-88%-ს შეადგენდა .

ბაქტერიოფაგები პროფილაქტიკის მიზნით ყოფილ საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში ინტენსიურად გამოიყენებიდა, განსაკუთებით ისეთ დაწესებულებებში, როგორიცაა სკოლები, საბავშვო ბაღები, სამხედრო ნაწილები და სხვა [39]

მრავალწლიანი გამოკვლევების საფუძველზე დადგენილი იქნა, რომ დიზენტერიის ერთადერთ პროფილაქტიკურ საშუალებას წარმოადგენდა დიზენტერიის მშრალი ბაქტერიოფაგი [24,29,32,33]. დიზენტერიის მშრალი ბაქტერიოფაგის (დამზადებული თბილისის გ. ელიავას სახ. ბმვ ინსტიტუტში) პროფილაქტიკის მიზნით მასობრივი გამოყენებისას, დიზენტერიით დავადების შემთხვევები შემცირდა 73.7%-ით.

არსებობს მრავალი ლიტერატურული მონაცემი, რომელიც ადასტურებს მუცლის ტიფის გავრცელების კერებში ბაქტერიოფაგების ეფექტურ გამოყენებას პროფილაქტიკური მიზნით [19,20,22,25]. 1965-1967 წლებში ჩატარებული ეპიდემიოლოგიური კვლევის მასალებზე დაყრდნობით დაავადებები აღინიშნებოდა მხოლოდ 0.67%-ში [28].

საავადმყოფოს შიდა ინფექციების შესამცირებლად ნაჩვენებია საავადმყოფოს გარემოს სანაცია ბაქტერიოფაგების საშუალებით, განსაკუთრებით რეანიმაციულ და საოპერაციო განყოფილებებში.

ცნობილია მრავალი მონაცემი იმის შესახებ, რომ საავადმყოფოს შიდა გარემოს ფაგებით დამუშავებისას 48-72 სთ-ის განმავლობაში ხდება შტაპჰყლოცოცცუს და Pსეუდომონას ბაქტერიების გაუვნებელყოფა [35].

ქ. თბილსის ბავშვთა რესპუბლიკურ კლინიკაში ჩატარებული გამოკვლევების შედეგად დადგინდა ფაგის პრეპარატების წარმატებული გამოყენება საავადმყოფოში ინსტრუმენტების, საგნების, კედლების დასამუშავებლად .

მნიშვნელოვანია, რომ რიგი ეპიდემიოლოგიური კვლევების პროცესში ბაქტერიოფაგები, წარმოადგენს რა ეკოსისტემის განუყოფელ ნაწილს, ახდენს მარეგულირებელ გავლენას ბაქტერიების სახეობრივ და რაოდენობრივ შემადგენლობაზე ბიოცენოზში.[12]

ბაქტერიოფაგების მაღალი სპეციფიურობა განსაზღვრავს მათ პრაქტიკულ გამოყენებას ბაქტერიების იდენტიფიკაციისათვის და მათი ინდიკაციისათვის გარემოში. ეპიდემიოლოგიური კვლევებისათვის ფართოდ გამოიყენებოდა ბაქტერიების ფაგოტიპირება – მათი სახეობისშიდა დიფერენცირება ფაგოტიპის (ფაგოვარის) დასადგენად – ეს მეთოდი ინფექციის გამოწვევის ზუსტი დიაგნოსტიკისა და ინფექციის წყაროს დადგენის შესაძლებლობას იძლევა.

ბაქტერიოფაგების თერაპიული პრეპარატების სამკურნალო-პროფილაქტიკური მიზნით ეფექტური გამოყენების მრავალწლიანი პრაქტიკული მონაცემების საფუძვლზე, ლოგიკურია ის ინტერესი, რასაც მსოფლიო მედიკოსები იჩენენ ფაგოთერაპიის, როგორც ანტიბიოტიკოთერაპიის ალტერნატიული საშუალებების მიმართ [41], სხვადასხვა ეტიოლოგიის ინფექციური დაავადებების პროფილაქტიკისა და პრევენციისათვის.

ქ.თბილისის გ. ელიავას სახელობის ბ.მ.ვ. ინსტიტუტი ამჟამად მჭიდროდ თანამშრომლობს ამერიკულ კომპანია – Iნტრალყტყხ-თან, რომელიც დაარსდა მარილენდის შტატის უნივერსიტეტის კლინიკასთან. ერთობლივი თანამშრომლობით შეიქმნა პრეპარატი PჰაგეBიოDერმ (ფაგობიოდერმი). Pპრეპარატი “ფაგობიოდერმი” წარმოადგენს უნიკალურ სინთეზურ პოლიმერულ მასალას შეუღლებულს ბაქტერიოფაგის კომპლექსთან, ანტიბიოტიკებთან, პროტეოლიზურ ფერმენტსა და ტკივილგამაყუჩებელ საშუალებებთან, ხასიათდება განსაკუთრებული მოქმედების ბაქტერიოციდული და ტკივილ გამაყუჩებელი თვისებებით, სხვადასხვა წარმოშობის ძნელად შეხორცებად წყლულებსა და ჭრილობებზე[18]

ნაწილი II

ექსპერიმენტული ნაწილი

თავი 1. მასალები

1.1 ბაქტერიული შტამები. მუშაობის პროცესში გამოყენებული იქნა E.coli ბაქტერიის შემდეგი შტამები:

- Coli.c
- K12 - MG1655

1.2 ბაქტერიული შტამების ფაგომგრძნობიარობის დასადგენად გამოყენებილი იქნა შემდეგი ფაგები:

- T7, T4, T5.

1.3. კულტურებზე მუშაობისას გამოყენებული საკვები ნიადაგები:

LB ბულიონი და LB აგარი:

- ✓ ბულიონის შემადგენლობა:
- დისტილირებული წყალი - 1 ლ
- NaCl – 10გრ
- ტრიპტონი - 5გრ
- Yeast extract (საფუარა) – 10 გრ

- ✓ 0.7 % და 1.5 % აგარი
- ✓ ენდო 1.5% აგარი

1.4 მუშაობის პროცესში გამოყენებული ხსნარები:

1. 96%-იანი სპირტი
2. ქლოროფორმის ხსნარი
3. 5%-იანი კარბოლის ხსნარი
4. 4.9%-იანი ქლორის შემცველი ხსნარი (ACE)

თავი 2. მეთოდები

პროექტში დასახული მიზნის მისაღწევად გამოყენებული იქნა შემდეგი მეთოდები:

2.1 'Spot test' წერტილოვანი ტესტირების მეთოდი'. 'ბაქტერიოფაგების გამოვლენა მყარ საკვებ არეზე. [61]

ინდიკატორული შტამების ბულიონიანი კულტურის 0.2 მლ ერევა 2.5 მლ ნახევრად თხიერ (0.7%) აგარს და გადააქვთ პეტრის ფინჯნებზე, რომლებზეც წინასწარ შემოხაზული უნდა იყოს 1 სმ-ის დიამეტრის წრეები. აგარის გამკვრივების შემდეგ (20 წთ) საკვლევი ფილტრატების 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8} განზავებებიდან 0.01 მლ მოცულობით აწვეთებენ შემოხაზულ წრეებში. შემდგომ ხდება ფინჯნების ინკუბირება თერმოსტატში 37^{0}C-ზე 18-24 სთ-ის განმავლობაში. ფაგის არსებობის შემთხვევაში ბაქტერიულ ნაზარდზე აღინიშნება ლიზისური უბნების არსებობა. „spot test" საშუალებას იძლევა განისაზღვროს გამოსაკვლევი ფილტრატის აქტიურობის ხარისხი.

2.2 ბაქტერიოფაგის კონცენტრირება ორფენოვანი აგარის მეთოდით [49]

ფაგს ტიტრავენ 10^{-5}-10^{-6} მდე.თითეულ განზავებაზე იღებენ ოთხ-ოთხ ფინჯანს. ბაქტერია/ფაგი/0.7% აგარი განთავსდება ფინჯნებში ჩამოსხმულ 1.5% აგარის ზედაპირზე.ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში 37^{0}C -ზე 18-20 საათის განმავლობაში ინკუპაციის შემდეგ თითოეულ ფინჯანზე შეაქვთ 5-5 მლ ბულიონი. აჩერებენ 10-15 წუთს შემდეგ რბილ ფენას აცილებენ მინის წკირით გადააქვთ საერთო ჭურჭელში და პერიოდულად ურევენ 30 წუთის განმავლობაში. აცენტრიფუგირებენ 4000-5000 ბრ/წ 20-30 წუთს .სუპერნანტი იფილტრება და გადააქვთ სტერილურ ჭურჭელში. მიკრობთა ზრდის დასათრგუნად უმატებენ ქლოროფორმს (0.1 ქლოროფორმი 10 მლ სითხეზე).

2.3 ტიტრაცია გრაციას მეთოდით [49]

იღებენ სინჯარებს სტერილური 4.5-4.5 მლ ხორც-პეპტონიანი ბულიონით . პირველ სინჯარაში შეაქვთ გამოსაკვლები ფაგის 0.5 მლ , ურევენ გულდასმით. შემდეგ პირველი სინჯარიდან 0.5 მლ გადააქვთ მეორე სინჯარაში , მეორედან მესამეში და ა.შ. ამრიგად ყოველ მომდევნო სინჯარაში იღებენ ფაგის კორპუსკულების 10-ჯერ შემცირებას. თითოეული განზავების მოსამზადებლად

იღებენ ახალ გრადუირებულ პიპედს. (განზავება აპელმანის მეთოდით [49]) შემდეგ ახალ სინჯარებში ცალ-ცალკე გადააქვთ სხვადასხვა განზავების ფაგის 1 მლ უმატებენ 0.1 მლ 18 საათიან ეტალონურ კულტურას ამას ასხამენ 2.5 მლ გამღვალ და 46 გრადუსზე გაციებულ 0.7% აგარს , აურევენ და თანაბარი ფენის სახით ანაწილებენ პეტრი ფინჯნებზე წინასწარ ჩამოსხმულ 1.5% აგარის ზედაპირზე.

ოთახის ტემპერატურაზე აჩერებენ 15-20 წუთი , მერე გადააქვთ თერმოსტატში 37 გრადუსზე. შედეგებს აღნიშნავენ ინკუბაციიიდან 18-24 საათის შემდეგ. ბაქტერიები საკვებ ნივთიერებებს იღებენ მკვრივი 1.5% აგარიდან და მრავლდებიან რბილი ა გარის ფენაში თანაბარი, წვრილი კოლონიების სახით და ქმნიან დაბურულ ფონს, რომელზედაც კარგად ჩანს ბაქტერიოფაგის გამრავლების შედეგად წარმოქმნილი კოლონიები-სტერილური ლაქები (ნეგატიური კოლონიები). ფაგის ტიტირს საზღვრავენ ნეგატიური კოლონიების დათვლით , მაგ .ფინჯანში რომელიც შეესაბამება ფაგის 10^{-6} ხარისხში განზავებას . ჩამოყალიბდა 20 ნეგატიური კოლონია ე.ი ფაგის ტიტირი უდრის $20X10^{-6}$ ან $2X10^{-7}$.

2.4. ნეგატიური კოლონიების წარმოქმნა სხვადასხვა ტემპერატურაზე (მეთოდის აღწერა)

1მლ მოცულობის სხვადასხვა განზავების ბაქტერიოფაგს ემატებოდა 0.1 მლ 18 საათიანი ბაქტერიული კულტურა და გადაგვქონდა პეტრის ფინჯნებზე გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით, ისე რომ ოპტიმალურ ტემპერატურაზე (37^0C) ფინჯანზე ნეგატიური კოლონიების თვლადი რაოდენობა მივიღოთ. ფინჯნები თავსდებოდა თერმოსტატებში ჩვენს მიერ შერჩეულ ტემპერატურებზე და 18-24 საათის შემეგ ვაკვირდებოდით მიღებული ნეგატიური კოლონიების რაოდენობას და მორფოლოგიას.

თავი.3 საკუთარი კვლევები

იმის დასადგენად თუ რა გავლენას ახდენს ბაქტერიის მიკ-ზე ფაგით ინფიცირებისას გარე ფაქტორები, კერძოდ კი ტემპერატურა გადავწყვიტეთ ჩაგვეტარებინა შემდეგი ექსპერიმენტი.

- დავადგინოთ ოპტიმალურ ტემპერატურაზე 37^0 შერჩეელი ფაგის ნეგატიური კოლონიების ზომები და რაოდენობა წინასწარ შერჩეულ განზავებაზე.

- გამოვიკვლიოთ ფაგი და ბაქტერიული უჯრედის ურთიერთქმედების მექანიზმები ოპტიმალურ ტემპერატურაზე დაბალ ტემპერატურებზე
- გამოვიკვლიოთ ფაგი და ბაქტერიული უჯრედის ურთიერთქმედების მექანიზმები ოპტიმალურ ტემპერატურაზე მაღალ ტემპერატურებზე .

ბაქტერიის ზრდის დაკვირვებისთვის სხვადასხვა ტემპარატურული რეჯიმში ფაგის მოქმედების თანაობისას, ექსპერიმენტისთვის 'spot test' შედეგად შერჩეული იქნა T7 ბაქტერიოფაგი და E.coli -ის შტამი K12 MG1655.

ცდისთვის ავიღეთ წინასწარ დაკონცენტრირებული ფაგი T7 და წინა ღამით მომზადებული ბაქტერია MG1655 (ღამის კულტურა). T7 ფაგი განვაზავეთ აპელმანის მეთოდით 10^{-10} განზავებამდე. ცდისთვის ავიღე 10^{-8} და 10^{-9} განზავებები, რათა შედეგები ყოფილიყო თვალსაჩინო . 10^{-8} განზავებიდან 1-1 მლ ფაგი გადავიტანე სინჯარებში , შემდეგ ამ სინჯარებს დავუმატე ბაქტერიის 0.1 მლ , შემდეგ სინჯარებს დავუმატე გამღვალი 0.7 % -იანი აგარი, რომელიც დამატებამდე გავაგრილე დაახლოებით 45^0C-მდე . ნარევი ფაგი/ბაქტერია/0.7% აგარი შენჯღრევის შემდეგ, თხელის ფენის სახით თანაბრად გავანაწილე პეტრის ფინჯნებზე, რომლებზეც წინა დღით ჩამოვასხი 1.5 % მყარი აგარი. ფინჯნებზე დავაწერე შესაბამისი ინფორმაცია და შევალაგე თერმოსტატებში შემდეგ ტემპერატურებზე: 20^0C, 37^0C, 42 ^{0}C, 48 ^{0}C ასევე გავაკეთე 10^{-9} განზავებისთვის . 24 საათის შემდეგ გამოვიღე ფინჯნები თერმოსტატებიდან და ავღრიცხე ნეგატიური კოლონიების რაოდენობა, ზომები და ფორმები. შემდეგ ყველა ფინჯანი შევაწყე 37^0C იან თერმოსტატში ე.ი სახვადასვა ტემპერატურული რეჯიმიდან ისევ მოვათავსე ზრდის ოპტიმალურ პირობებში და გავაჩერე კიდევ 24 საათის განმავლობაში. შემდეგ გამოვიღე ფინჯნბი და ავღრიცხე მიღებული შედეგები, რომლებიც მოცემულია ცხრილში 2.

შემდეგ ცდა ჩავატარეთ შემდეგ ტემპერატურებზე 20^0C, 37^0C, 45^0C, 50^0C, 56^0C ცდისთვის ავიღეთ წინასწარ დაკონცენტრირებული ფაგი T7 და წინა ღამით მომზადებული ბაქტერია MG1655 (ღამის კულტურა). T7 ფაგი განვაზავეთ აპელმანის მეთოდით 10^{-10} განზავებამდე. ცდისთვის ავიღეთ 10^{-9} განზავებები, რათა შედეგები ყოფილიყო თვალსაჩინო . 10^{-9} განზავებიდან 1-1 მლ ფაგი გადავიტანე სინჯარებში , შემდეგ ამ სინჯარებს დავუმატე

ბაქტერიის 0.1 მლ , შემდეგ სინჯარებს დავუმატე გამღვალი 0.7 % -იანი აგარი, რომელიც დამატებამდე გავაგრილე დაახლოებით 45^{0}C-მდე . ნარევი ფაგი/ბაქტერია/0.7% აგარი შენჯღრევის შემდეგ, თხელის ფენის სახით თანაბრად გავანაწილე პეტრის ფინჯნებზე, რომლებზეც წინა დღით ჩამოვასხი 1.5 % მყარი აგარი. ფინჯნებზე დავაწერე შესაბამისი ინფორმაცია და შევალაგეთ თერმოსტატებში შემდეგ ტემპერატურებზე: 20^{0}C, 37^{0}C, 45 ^{0}C, 50 ^{0}C 56^{0}C. 24 საათის შემდეგ გამოვიღე ფინჯნები თერმოსტატებიდან და ავღრიცხე ნეგატიური კოლონიების რაოდენობა, ზომები და ფორმები. შემდეგ ყველა ფინჯანი შევაწყე 37^{0}C იან თერმოსტატში ე.ი სახვადასვა ტემპერატურული რეჯიმიდან ისევ მოვათავსე ზრდის ოპტიმალურ პირობებში და გავაჩერე კიდევ 24 საათის განმავლობაში. შემდეგ გამოვიღე ფინჯნბი და ავღრიცხე მიღებული შედეგები, რომლებიც მოცემულია ცხრილში 3.

უნდა აღინიშნოს, რომ 50 და 56^{0}C -იანი ფინჯნები როგორც პირველი 24 საათის განმავლობაში, ასევე მათი 37 -ზე გადატანის და იქ 24 საათის განმავლობაში გაჩერების შემდეგ იყო სრულიად გამჭირვალე ე.ი არც ერთ შეთხვევაში არ გვქონია არანაირი ბაქტერიული ზრდა .

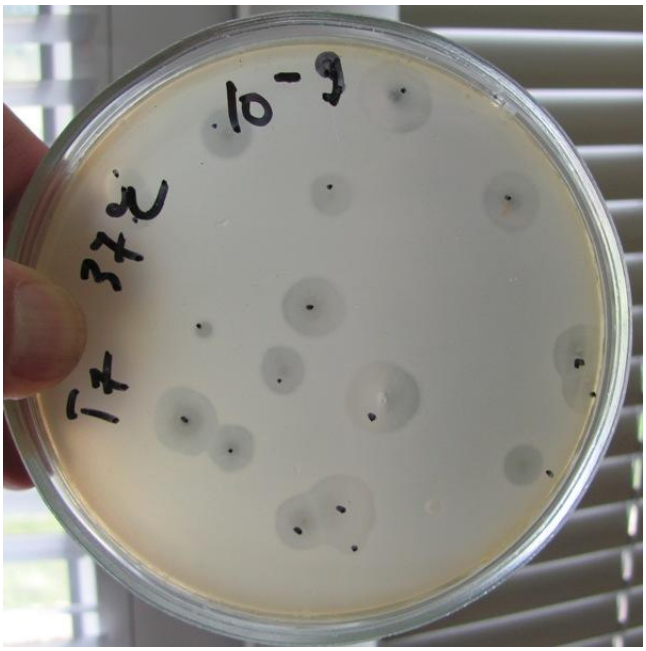
შემდეგ ცდა ჩავატარეთ შემდეგ დაბალ ტემპერატურებზე 6^{0}C, 23^{0}C, 37^{0}C. ამაჯამად ცდისთვის მყარ საკვებად გამოვიყენეთ როგორც ჩვეულებრივი ასევე ენდო აგარი , როგორც განსხვავებული საკვები არე . შემდეგ ცდა ჩავატარეთ შემდეგ ტემპერატურებზე 6^{0}C, 23^{0}C, 37^{0}C, ცდისთვის ავიღეთ წინასწარ დაკონცენტრირებული ფაგი T7 და წინა ღამით მომზადებული ბაქტერია MG1655 (ღამის კულტურა). T7 ფაგი განვაზავეთ აპელმანის მეთოდით 10 $^{-10}$ განზავებამდე. ცდისთვის ავიღეთ 10 $^{-9}$ განზავებები, რათა შედეგები ყოფილიყო თვალსაჩინო . 10 $^{-9}$ განზავებიდან 1-1 მლ ფაგი გადავიტანე სინჯარებში , შემდეგ ამ სინჯარებს დავუმატე ბაქტერიის 0.1 მლ , შემდეგ სინჯარებს დავუმატე გამღვალი 0.7 % -იანი აგარი, რომელიც დამატებამდე გავაგრილე დაახლოებით 45^{0}C-მდე . ნარევი ფაგი/ბაქტერია/0.7% აგარი შენჯღრევის შემდეგ, თხელის ფენის სახით თანაბრად გავანაწილე პეტრის ფინჯნებზე, რომლებზეც წინა დღით ჩამოვასხი 1.5 % მყარი აგარი. ფინჯნებზე დავაწერე შესაბამისი ინფორმაცია და შევალაგეთ თერმოსტატებში შემდეგ ტემპერატურებზე: 6^{0}C, 23^{0}C, 37^{0}C, . 24 საათის შემდეგ გამოვიღე ფინჯნები თერმოსტატებიდან და ავღრიცხე ნეგატიური კოლონიების რაოდენობა, ზომები და ფორმები. შემდეგ ყველა ფინჯანი შევაწყე

37^0C იან თერმოსტატში ე.ი სახვადასვა ტემპერატურული რეჯიმიდან ისევ მოვათავსე ზრდის ოპტიმალურ პირობებში და გავაჩერე კიდევ 24 საათის განმავლობაში. შემდეგ გამოვიღე ფინჯნბი და ავღრიცხე მიღებული შედეგები.

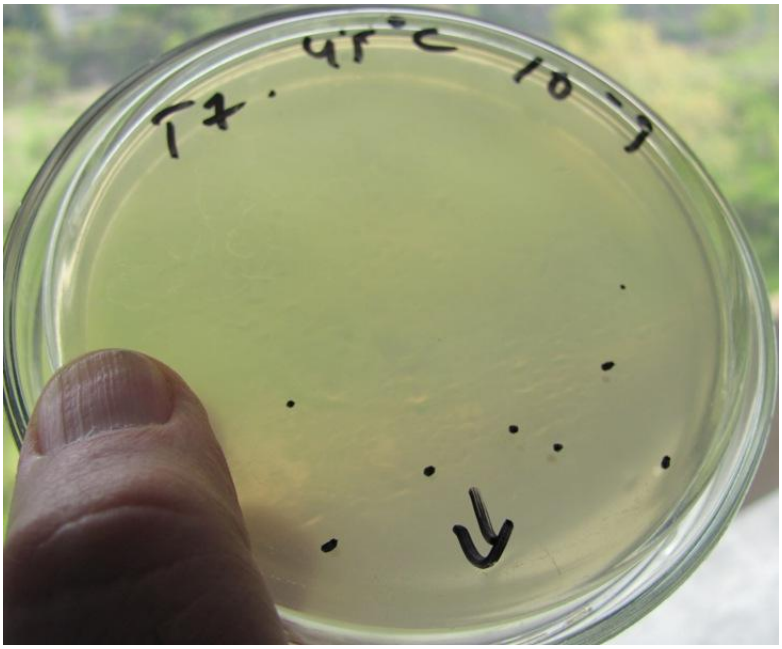
ცდის პირველ ნაწილში 6^0 - იან პინჯნებზე საერთოდ არ გვქონია ზრდა ხოლო 23^0-ზე ინკუბირებულ ფინჯნებზე კოლონიების რაოდენობა და ზომები შემცირდა 37^0 ოპტიმალურ ტემპერათურასთან შედარებით . ასევე ჩვეულებრივ აგართან შედარებით ენდო აგარიან ფინჯნებზე უფრო ნაკლები ზომის ნეგატიური კოლონიები მივიღეთ.შედეგები მოცემულია ცხრილებში 4 და 5.

როგორც ცდებიდან მივიგეთ ტემპერატურის გაზრდასთან ერთად (37^0, 42^0, 45^0) ნეგატიური კოლონიების რიცხვი და ზომები ნელ-ნელა შემცირდა, თუმცა არანაირი ცვლილებები არ დაფიქსირებულია მათი შემდეგი 37^0 -ზე 24 საათიანი ინკუბირების შედეგად . სურათი 2 და 3

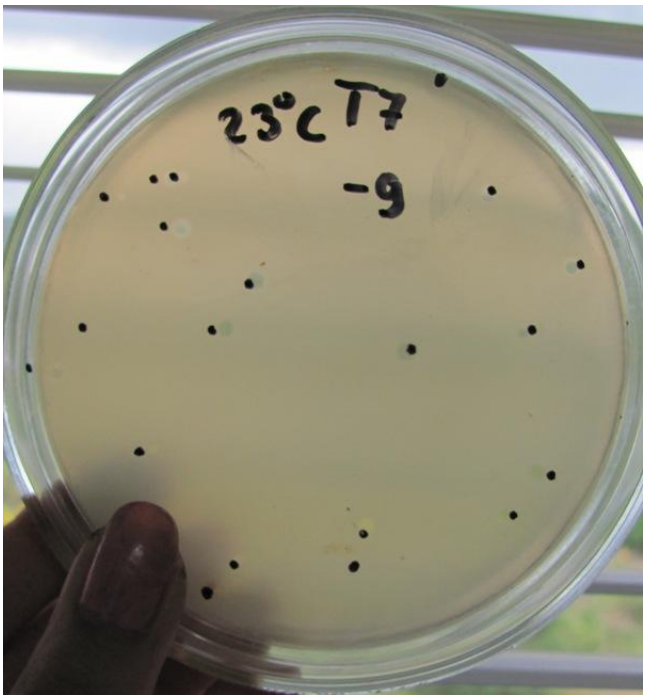
რაც შეეხება 20 ^{0}Cდა 23 ^{0}C- ს ამ შემთხვევაშიც თავდაპირველად მივიღეთ ეტალონურ, 37 ^{0}-ს თან შედარებით ცოტა რაოდენობის და მცირე ზომების ნეგატიური კოლონიები , თუმცა მათი შემდეგი 37 ^{0}-ზე 24 საათიანი ინკუბირების შემდეგ მივიღეთ კოლონიების როგორც ზომებში ასევე რაოდენობრივი მატება . სურათი 4 და 5



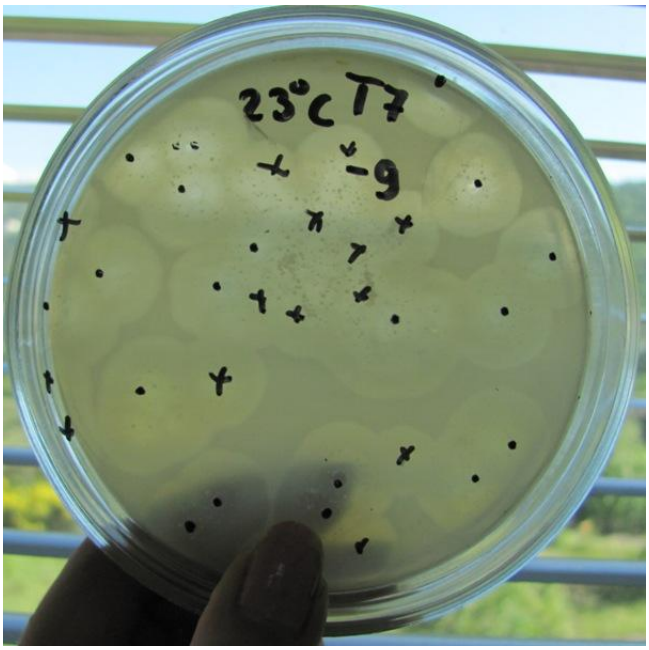
სურათი 2 .ნეგატიური კოლონიები 37^{0}-ზე



სურათი 3..ნეგატიური კოლონიები -45^{0}ზე



სურათი 4 ნეგატიური კოლონიები -23 ^{0}ზე



სურათი 5

(X ით აღნიშნულია მომატებული კოლონიები.)

ცხრილები

ცხრილი 2

ფაგი	ბაქტერია (შტამი)	განზავება	ტემპერატურა ^0C	ნეგატიური კოლონიები			
				24 საათი		24 სთ. 37^0 -ზე	
				რაოდ.	ზომები	რაოდ.	ზომები
T7	E.coli MG1655	10-8	20^0	9	0.5-1მმ. ნათ .კოლონიები	33	2-7 მმ. კოლონიები ნატ. ცენტრით
			37^0	81	5-7-10 მმ. კოლონიები ნატ. ცენტრით	იგივე	იგივე
			42^0	53	3-5-7 მმ. კოლონიები ნატ. ცენტრით	იგივე	იგივე
			48^0	22	0.5-1 მმ. ნათ .კოლონიები	იგივე	იგივე
		10-9	20^0	-	-	1	0.4მმ. ნათ .კოლონიები
			37^0	4	5-7-10 მმ. კოლონიები ნატ. ცენტრით	იგივე	იგივე
			42^0	5	3-5-7 მმ. კოლონიები ნატ. ცენტრით	იგივე	იგივე
			48^0	3	0.5-1 მმ. ნათ .კოლონიები	იგივე	იგივე

ცხრილი 3

ფაგი	ბაქტერია (შტამი)	განზავება	ტემპერატურა ^{0}C	ნეგატიური კოლონიები			
				24 საათი		24 სთ. 37^0 -ზე	
				რაოდ.	ზომები	რაოდ.	ზომები
T7	E.coli MG1655	10-9	20^0	4	0.1-1.2მმ. ნათ. კოლონიები	11	6-10-13მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრი
			37^0	18	5-7-10მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრით	იგივე	იგივე
			45^0	9	1-2 მმ. ნათ. კოლონიები	იგივე	იგივე
			50^0	-	-	-	-
			56^0	-	-	-	-

ცხრილი 4

ბაქტერია (შტამი)	განზავება	ტემპერატურა ^0C	ნეგატიური კოლონიები			
			24 საათი		24 სთ. 37^0 -ზე	
			რაოდ.	ზომები	რაოდ.	ზომები
E.coli MG1655	10-9	6^0	-	-	42	10-13-16 მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრით
		23^0	20	1-2-3მმ. ნათ.კოლონიები	35	10-14-17 მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრით
		37^0	65	5-7-10 მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრით	იგივე	იგივე

ცხრილი 5

ფაგი	ბაქტერია (შტამი)	განზავება	ტემპერატურა ^0C	ნეგატიური კოლონიები			
				24 საათი		24 სთ. 37^0 -ზე	
				რაოდ.	ზომები	რაოდ.	ზომები
T7	E.coli MG1655	10-9	6^0	-	-	30	3-6 მმ. კოლონიები ნათ.ცენტრით
			23^0	13	2-3 მმ. ნათ.კოლონიები		
			37^0	60	3-5 მმ. ნათ.კოლონიები	იგივე	იგივე

დასკვნები

1. ნაჩვენებია, რომ ბაქტერიის ფაგით ინფიცირების მექანიზმები მნიშვნელოვნად რეგურილდება გარე ფაქტორების ზემოქმედებით. ამ უკანასკნელს მიეკუთვნება ტემპერატურა, საკვები არე, pH ფაქტორი და სხვა.
2. დადგინდა რომ 37^0 ზე დაბალ ტემპერატურებზე ნეგატიური კოლონიების რიცხვი და ზომები მცირდება ხოლო მათი ოპტიმალურ პირობებში დაბრუნებისას ხდება ზომების და რაოდენობის მომატება.
3. ბაქტერიოფაგის ნეგატიური კოლონიების ზომები და ფორმები მცირდება 37^0 -ზე მაღალ ტემპერატურებზე , თუმცა მათი ოპტიმალურ პირობებში დაბრუნებისას არ ხდება ზომების და რაოდენობის მომატება.
4. მიღებული ექსპერიმენტის შედეგების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ სხვადასხვა ტემპერაურულ რეჯიმში იცვლება ან ინფიცირებისთვის აუცილებელი ფაგების რაოდენობა, რომლებიც ადსორბირდება ბაქტერიული უჯრედის მემბრანაზე ან იცვლება უჯრედში სინთეზირებული შვილეული ფაგების რიცხვი ან ორივე ერთად.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Свенсон К,. Уэбстер П. «Клетка». Изд. Мир. М 1980г.
2. Альбертс Б.,. Брей Д и др. «Молекулярная биология клетки» Изд. Мир. М 1986г.
3. r. solomonia ,,bioqimia", 2000, Tbilisi
4. Тейлор Д. ,. Грин Н , Стаут У. , «Биология» М. Мир. 2001г.
5. Рис Э. , Стернберг М. . «Введение в молекулярную биологию». От клеток к атомам.
    a. Изд. Мир. 2002г
6. Покровский В.Н., Поздеев О.К. (1998) Медицинская микробиология, «Геотар», Моск.
7. Тахтаджян А. Л., Федоров А.А.. 1974 Жизнь растений: в 6-ти томах.
8. Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. (1983) Микробиология, «Медицина», Москва.
9. Адамс М. (1961) Бактериофаги. «Изд. Иностранной литературы», Москва
10. Покровский В.Н., Поздеев О.К. (1998) Медицинская микробиология, «Геотар», Моск.
11. Стент Г. (1965) Молекулярная биология вирусов бактерий. «Мир», Москва
12. Крылов В.Н. (2001) Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, организация. Генетика, т.37, №7, с.869-887
13. Ackerman H.W. and Dubow M.S. (1987) Viruses of procaryotes, v.2, p.174, CRC Press, Boca
14. Ration, FL.
15. Ackerman H.W. and Dubow M.S. (1987) Viruses of procaryotes, v.1, p.1-16.
16. Ackerman H.W. (1992) Bacteriophages. Enciclopedia of microbiology,. v.1. p.201-211.
17. Ackerman H.W. and Bertiaume Laurenr. (1995) Atlas of viruses diagrams. CRC Press, Boca Ration, New York, London, Tokyo.
18. Тихоненко А.С. (1968) Ультраструктура вирусов бактерии, Москва, «Наука»
19. a.meifariani, z.alaviZe "baqteriofagi, fagoTerapia-fagoprofilaqtika", Tbilisi 2006w gv. 151-154
20. Александров М.Б., Дьякова А.А., Рахельсон Э.А. и др. (1941) Сов.медицина, №7, с.13
21. Антадзе В.С., Зарафиди Э.Н., и др. (1958) Труды Тбил.НИИ вакцин и сывороток, т.3, с.26.
22. Бочоришвили Т.В. (1985) Клиническая оценка эффективности различных методов иммунотерапии и внутренной фаготерапии генерализованных форм стафилококковой инфекции. Автореф. к.мед.наук. Тбилиси.
23. Гнутенко М.П., Тагамлицкая Р.Л., (1948) ж. Микробиол. №4. с.75

24. Ермаков Е.В., Новоженнннок В.Г., Киримов В.А., Алексеева Ю.В., (1984) Об эффективности бактериофагов в лечении неспецифических заболевании легких (по данным клинико-иммунологических и бронхоскопических исследований). Сщветская медицина, №2, с.37-39.
25. Каган М.Н., Кузнецова Е.В., Телешевская Э.А. и др. (1964) ж. Микробиология, №7 с.99.
26. Карпов С.П. (1957) в кн: Бактериофагия. Тбилиси, , с.297.
27. Панченков Н.Р. (1981) Метод прерывистого длительного орошения ожоговых ран бактериофагами. Клин.Хирург. №3, с.35-37

28. Проскуров В.А. (1970) Применение стафилококкового бактериофага с лечебной и профилактической целью. Микробиол. №2 с.104-107
29. Райхштат Г.Н. Шапиро Р.Ф., и др. (1965) ж. Микробиол. №8, с.124
30. Райхштат Г.Н., Шапиро А.А., Лейкина Р.Ф. (1965) ж. Микробиол. №8, с.139.
31. Саканделидзе В.М., Мейпариани А.Н., (1974) Применение комбинированных фагов при гнойно-воспалительных заболеваниях. ЖМЭЙ №6, с.135-136
32. Самсыгина Г.А. (1985) Гнойно-воспалительные заболевания новорожденных. Автореф. док.мед.наук, М.
33. Тополянская С.Н., Белова Н.Д., Пухнаревич А.Ф. и др. (1965) ж. Микробиол. №9, с.124
34. Фролова Н.Н., Черкес Ф.К. (1965) ж. Микробиол. №3, с.122.
35. Цулукидзе А.П. Лечение анаэробной инфекции бактериофагом. Фаготерапия ранений в условиях эвакогоспиталя. Материалы I чирургической клиники Тбилиского института усовершенствования врачей. Тб. 1942.
36. Alavidze Z. et al., (1988) Use of specific bacteriophage in the prophylaxy of intrahjspital infections caused by P. aeruginosa. In abstracts. All-Soviet Union Conference Modern Biology at the service of public health. Kiev, Ukraine.

37. Bruynoghe R., Maisin J. (1921) Essais therapeutigues aumoyen du bacteriophage du Staphylocoque. C.R.Soc.Biologic, 85, p.1120-1121.
38. Carl R., Merril C., Dean Scholl and Sankar L. et al. (2003) The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, v.2

39. Carlton R.M. (1999) Phage therapy: Past history and future prospects. J. Arch.Immunol.Ther.Exper. 47, 267-274.
40. Chanishvili N.; Chanishvili T.; Tediashvili M.; Barow P. (2001) Phage and their application against drug resistant bacteria. J. Chemical tecnology and biotechnology. 76:689-699. Society of chemical Industry.
41. D'Herelle F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. C.R. Acad.Sci. v.165, p.373-375.
42. Lorch A. (1999) Bacteriophages: An alternative to antibiotics? Biotechnology and development monitor. #39 p.14-17
43. Meril C.R., Bis was B., Carlton R. et al. (1996) Long circulating bacteriophages as antibacterial agents. Proc.Nat.Acad.Sci.USA v.93, p.3188-3192
44. Nicolle P. (1979) A propos de la therapeutique par les bacteriophage. Bull.Acad.Nat.Med.163.N1 pp.58-60
45. Slopek S., Durlakova I., Weber-Dabrowska B., Kucharewich-Krukowska A., Dabrowski M., Basikilvier R. (1983) Results of bacteriophage treatment of supparative bacterial infections. General evaluation of the results. Arch.Immun.Ther.Exp. (Wroclaw) 31, #3, 267-291
46. Vieu I.F. Guillerment F., Minck R., Nicolle P. (1979) Donnees actualles sur les applications Therapeutiques des bateriophages. Bull.Acad.Nat.Med.163 pp. 61-66
47. Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Slopek S. et al. (1987) Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. Arch.Immunol.Ther.Exptl. v.35, p.563-568.
48. Weber-Dabrowska B., Mulczyk M., Gorski A. (2000) Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our Institute experience. J.Arch.Immun.Exptl. 48,547.
49. მ.ნათიძე.თ.ჭანიშვილი.გ,გომარელი (1989) ბაქტერიოფაგი
50. Heineman, R. H.; Bull, J. J. (2007). "Testing Optimality with Experimental Evolution: Lysis Time in a Bacteriophage"
51. d'Herelle, F. (1926). The Bacteriophage and Its Behavior. Baltimore, MD: Williams & Wilkins
52. Molineux, I. J. (2006). Chapter 20: The T7 group. In: The Bacteriophages (R. Calendar, ed.), pp. 277. Oxford University Press, Oxford.
53. Dunn,J.J. and Studier,F.W.'Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and thelocations of T7 genetic element J. Mol. Biol. 166 (4), 477-535 (1983) (T7)

54. Feng P, Weagant S, Grant, M . Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual (8th ed.)(недоступная ссылка — история). FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition (1 сентября 2002). Проверено 25 января 2007.
55. Thompson, Andrea. E. coli Thrives in Beach Sands, Live Science (4 июня 2007). Проверено 3

Lawrence, J.G. and Ochman, H. (1998) Molecular archaeology of the Escherichia coli genome

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9413-9417кабря 2007.

56. http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage/plaques.html

57. Andrews, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 (Suppl. 1):5-16, (2001). PMID 11420333.
58. ^ Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH (2003) Susceptibility Test Methods: General

Considerations. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Yolken. Manual of Clinical

Microbiology. 8th Ed. Washington. American Society of Clinical Microbiology. p 1103 ISBN 1-

55581-255-4

59. G. Stent. Molecular biology of bacterial viruses. W.H. Freeman and Co., London, 1963.
60. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская. Микробиология. ст.123
61. Carlson R., Miller E. «Bacteriophage T4. General Procedures