

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამა:

ბიოლოგია

ნატა ბაკურაძე

**Bacteroides fragilis-ის სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და შესწავლა**

**მათი ფაგოთერაპიული პოტენციალის დადგენის მიზნით**

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

წარმოდგენილი დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნინა ჭანიშვილი

ბიოლ. მეც. დოქტორი

ნუნუ მიცკევიჩი

ბიოლ. მეც. დოქტორი

თბილისი

2023 წელი

Ivane Javakishvili Tbilisi State University

Faculty of Exact and Natural Sciences

Doctoral Program: Biology

**Nata Bakuradze**

**Isolation and Study of Bacteriophages Specific to Bacteroides Fragilis for the  
Evaluation of Their Therapeutic Potential**

The thesis work is performed to obtain a PhD academic degree in Biology

Scientific Supervisor: Nina Chanishvili , PhD

Nunu Mitskevich, PhD

Tbilisi

2023

## აბსტრაქტი

*Bacteroides fragilis* წარმოადგენს მკაცრ ანაერობულ, გრამ-უარყოფით პლეიომორფულ ჩხირს. ის, ძირითადად, გვხვდება ადამიანისა და სხვა ძუძუმწოვრების ნაწლავურ მიკრობიოტაში. მას ადამიანის ნაწლავური მიკრობიომის ჩამოყალიბებასა და ფიზიოლოგიური როლის შესრულებაში უმნიშვნელოვანესი როლი აქვს. *B. fragilis*-ის ენტეროტოქსინის გენის შემცველი შტამით ინფიცირების შემთხვევაში თავდაპირველად ვითარდება საშუალო სიმძიმის დიარეა, ხოლო ქრონიკული მტარებლობის დროს იზრდება სწორი ნაწლავის კარცინომის განვითარების რისკი.

*B. fragilis*-ის მომწიფებელი სისტემიდან პერიტონიუმის ღრუში გადასვლა სხვა ანაერობულ კომენსალებთან ერთად იწვევს მწვავე პერიტონიტსა და აბსცესების ფრომირებას. ასევე, ლოკალური გავრცელების ან/და ბაქტერიემიის შემთხვევაში იწვევს რბილი ქსოვილების ინფექციას ცენტრალური ნერვული სისტემის, გულმკერდის, მუცლისა და მენჯის ღრუს უბნებში. პოსტ-ოპერაციული პერიტონიტი და პერიტონეალური აბსცესი მუცლის ღრუს ოპერაციების შემდგომ საკმაოდ ხშირ გართულებას წარმოადგენს. ნანახია, რომ ეს ინფექციის გამომწვევი მულტიანტენურია, თუმცა ნაჩვენებია, რომ *B. fragilis*-ს წამყვანი როლი უჭირავს ანთებითი პროცესის გამოწვევასა და მისი სიმძიმის განსაზღვრაში.

ზემოთაღნიშნული ინფექციების ანტიბიოტიკოთერაპია, ძირითადად, მეტრონიდაზოლის გამოყენებით მიმდინარეობს. ვინაიდან, დღითიდღე იზრდება მეტრონიდაზოლისა და სხვა ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული *B. fragilis* შტამებით ინფიცირებით შემთხვევების რიცხვი, სხვა ინფექციური დაავადებების მსგავსად, ფაგოთერაპია მნიშვნელოვან და დამაიმედებელ ალტერნატივად გვევლინება. მიუხედავად იმისა, რომ ფაგების სხვადასხვა პათოგენების წინააღმდეგ მკურნალობაში

გამოყენებასთან დაკავშირებით კვლევები და ცნობები ყოველდღიურად მზარდია, *B. fragilis* ის ინფექციების მიმართ ფაგების გამოყენების შესახებ თითქმის არაფერია ცნობილი.

სადოქტორო კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ენტეროტოქსიგენური (ეტბფ) და არაენტეროტოქსიგენური (არა-ეტბფ) *B. fragilis*-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, დახასიათება და თერაპიული პოტენციალის შესწავლა ინ ვიტრო პირობებში, მათი სამომავლოდ ანტიინფექციურ აგენტებად გამოყენების მიზნით

კვლევის ფარგლებში ტრადიციული ბაქტერიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით განხორციელდა სხვადასხვა ასაკისა და სქესის ინდივიდების განავლოვნი ნიმუშებიდან *B. fragilis* -ის იზოლატების გამოყოფა და MALDI –TOF სპექტრომტრიით მათი ზუსტი იდენტიფიკაცია. ციტოტოქსიკურობის ტესტისა და პჯრ მეთოდის გამოყენებით ამ იზოლატებს შორის 4 ენტეროტოქსიგენური შტამი გამოვლინდა. იდენტიფიცირებული იზოლატების მიმართ თბილისისა და გენტის (ბელგია) ჩამდინარე წყლების ნიმუშებიდან გამოიყო სამი ფაგი GEC\_vB\_Bfr\_VA7 (VA7), GEC\_vB\_Bfr\_MTK (MTK), GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 (UZM3). ტრანსმისიულ-ელექტრონული მიკროსკოპიის საშუალებით გამოვლინდა, რომ სამივე ფაგი მორფოლოგიურად წარმოადგენს არაკუმშვადი კუდის მქონე სიფოვირუსს. მათი ბიოლოგიური დახასიათების მიხედვით, სამივე ფაგი განსხვავებულ გამძლეობას იჩენს ტემპერატურისა და მჟავიანობის მიმართ. წარმოადგენილი ფაგებისათვის დამახასიათებელია განვითარების ლითიური ციკლი, ხასიათდებიან მაღალი სპეციფიკურობით და მათი მოქმედების სპექტრი სახეობის შიგნით ვარირებს 48-70% ფარგლებში. განხორციელდა ფაგების გენომის სრული ნუკლოტიდური თანმიმდევრობის ანალიზი, რომლის შედეგადაც დადასტურდა ფაგების ლითიური ბუნება. გენომის შემადგენლობაში არ მოიძებნა ლიზოგენობის განმსაზღვრელი ცილების გენები, როგორცაა ინტეგრაზა და ეგზოგენაზა. ამასთან ერთად, ვნახეთ, რომ ფაგების გენომი არ შეიცავს ვირულენტური ფაქტორების (ტოქსინების, ანტიბიოტიკების მიმართ მდგრადობის ცილების) მაკოდირებელ გენებს, რაც მათ თერაპიაში გამოყენებას მეტად უსაფრთხოს ხდის.

ფაგების ბაქტერიციდული მოქმედებისა და იმუნომოდულაციური თვისებების შესწავლისთვის ინ ვიტრო კვლევა ჩატარდა ადამიანის სწორი ნაწლავის ეპითელიური უჯრედული კულტურის HCT 116-ის გამოყენებით. ენტეროტოქსიგენური შტამით დასნებოვნებული უჯრედული კულტურა დამუშავდა ცალკეული ფაგებითა და მათი ნარევით. ფაგების დამატების შემდეგ მოხდა ბაქტერიული ტიტრის განსაზღვრა მყარ ნიადაგზე გათესვით. ადგლობრივი იმუნოლოგიური ცვლილებების შესასწავლად ELISA მეთოდით საკვლევ და საკონტროლო ჯგუფებში იზომებოდა IL-8 / TNF-  $\alpha$  -ს კონცენტრაციები. ფაგების ბაქტერიციდულ მოქმედებასთან ერთად აღიიშნებოდა IL-8 დონის შემცირებაც, თუმცა კონტროლთან შედარებით TNF-  $\alpha$  -ს, როგორც ანთებითი მედიატორის ცვლილება, არ შეინიშნებოდა. IL-8 კანცეროგენულ პროცესებთან ასოცირდება. მისი გამოყოფა ხელს უწყობს ანგიოგენეზის სტიმულირების გზით სიმსივნის ზრდას. ენტეროტოქსიგენური *B.fragilis* შტამით უჯრედულ კულტურაზე ზემოქმედების შემთხვევაში საკვლევ ჯგუფებში IL-8 შემცირებული გამოყოფა მნიშვნეულად ფაგების პოტენციალზე ამ ინფექციით გამოწვეული სწორი ნაწლავის კარცინომის პრევენციასა ან მკურნალობაში.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ლითიური ბუნების ვირუსებს, რომელთაც აქვთ თერაპიული პოტენციალი *B.fragilis* -ის მიმართ თუმცა, დამატებითი ინ ვივო კვლევების ჩატარება რეკომენდებულია მათი ფარმაკოკინეტიკისა და კომპლექსური მოქმედების შესწავლის მიზნით.

# Abstract

*Bacteroides fragilis* is a gram-negative pleomorphic rod and an obligate anaerobe. It is found mainly in the intestinal lumen of the humans and some other mammals. There it plays a substantial role in the development and the physiological functioning of the gut. Infection with enterotoxin producing *B. fragilis* may primarily lead to mild diarrhea, and the chronic carrier state increases the risk of developing colorectal carcinoma. Mainly, *B. fragilis* causes infections after its dislocation from the gut lumen to the extraintestinal spaces occurring together with other anaerobic microbes. This leads to the development of peritonitis, sepsis, osteomyelitis and abscesses in various internal organs. Postoperative peritonitis and peritoneal abscesses represent the common complications of the abdominal surgical procedures. It is found that aforementioned infections are multi-microbial with *B. fragilis* playing major role in the inflammatory process and determination of its severity.

The antimicrobial therapy of the aforementioned infections mainly includes metronidazole. Considering the tendency of *B. fragilis* expanding resistance against antibiotics, phage therapy is thought to be a promising alternative solution for the refractory infections. Although, studies and reports related to the treatment of the various pathogens with the phages are increasing on daily bases, there are no similar data with regards to *B. fragilis* related disorders.

The aim of the doctorate thesis was to isolate and study bacteriophages active against enterotoxigenic (ETBF) and non-enterotoxigenic (NETBF) *B. fragilis* for the evaluation of their therapeutic application. Within the scopes of the study *Bacteroides* isolates were cultured from

the fecal samples of the individuals of different age. The confirmatory identification of *B. fragilis* isolates were performed by MALDI –TOF spectrometer. Enterotoxin producing strains were identified using cytotoxicity test and conventional PCR.

Using enrichment method three bacteriophages active on the experimental bacterial strains were isolated from the waste waters of Tbilisi (Georgia) and Ghent (Belgium): GEC\_vB\_Bfr\_VA7 (VA7), GEC\_vB\_Bfr\_MTK (MTK), GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 (UZM3). Transmission-Emission Microscopy (TEM) revealed that all three phages represent Siphovirus morphotype with the noncontractile tails. The results of biological characterization show that all phages are stable at various temperature and acidity conditions. The characterized phages represent strictly lytic viruses characterized by the high host specificity with activity covering from 48% to 70% of cultures within the species. The whole genome sequencing was performed which confirmed the lytic nature of the phages. DNA of the tested phages doesn't contain lysogeny determining genes like integrase and exogenase coding genes. In addition, it has been shown that none of the phages contain genes responsible for the virulence factors such as toxins or antibiotic resistance. The studied genetic features indicate towards safety of the abovementioned phages.

To study the bactericidal and immunomodulatory properties of the phages in vitro experiments were performed on the human colon cancer cell culture (HCT 116) model. The cell cultures infected with the ETBF strain were treated with the VA7 and MTK separately and in combination with each other. After the application of phages bacterial count and specific cytokine release was evaluated using bacterial plating technique and ELISA method, respectively. IL-8 and TNF- $\alpha$  levels were selected to be measured in the experimental groups. IL-8 is found to be associated with the tumor development and TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine. The decreased level of IL-8 was found in correlation with the bactericidal activity of the phages. There was no statistically significant changes of the TNF- $\alpha$  release compared to the control. IL-8 is associated with the angiogenesis of the malignant tumors and was also found to be a primary cytokine released in ETBF provoked colon carcinoma. Low levels of IL-8 in an experimental group indicate

that the tested phages might be effectively used for prevention and treatment of the ETBF related colon cancer.

Based on the results of our research we can state that the isolated phages have the properties of the strictly lytic phages and a therapeutic potential to be applied during the treatment of the *B.fragilis* infections. However, additional in vivo studies are recommended to be performed for the evaluation of pharmacokinetics and mechanism of action of these phages.



## სარჩევი :

შესავალი.....	1
თავი 1: ლიტერატურის მიმოხილვა.....	3
1.1. ადამიანის მიკრობიომი .....	3
1.2. ბაქტერიოდესის გვარის სახეობები.....	5
1.3. <i>Bacteroides fragilis</i> როლი ადამიანის ჯანმრთელობასა და დაავადებებში .....	6
1.4. ენტეროტოქსინით გამოწვეული კანცეროგენეზი .....	8
1.5. ნაწლავის ანთებითი დაავადება .....	9
1.6. IL-8 და მისი როლი ეტბფ-ით გამოწვეულ კრკ-ს განვითარებაში .....	11
1.7. სწორი ნაწლავი კიბოს სასიგნალო გზის ცვლილება.....	13
1.8. <i>B.fragilis</i> -ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობა და ანტიბიოტიკორეზისტენტობა.....	14
1.9. ფაგოთერაპია.....	16
1.10. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია.....	20
1.11 ბაქტერიოფაგების იმუნომოდულაციური თვისება.....	21
1.12 ორგანიზმის ცირკულაციაში არსებული ფაგების მიმართ თანდაყოლილი იმუნური პასუხი.....	24
1.13 ფაგებისა და ბაქტერიების კლირენსი .....	26
1.14 ფაგები და შეძენილი იმუნური პასუხი .....	29
1.14.1. ჰუმორული იმუნიტეტი.....	29
1.14.2. TNF- $\alpha$ .....	32
1.14.3. TNF- $\alpha$ -ს როლი სიმსივნის განვითარებაში .....	34
1.14.4. უჯრედული იმუნიტეტი .....	35
1.15. სამი სისტემის ურთიერთკავშირი: ბაქტერია-ბაქტერიოფაგი-ადამიანი.....	37
1.16 <i>Bacteroides fragilis</i> -ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები .....	38
თავი 2 : მეთოდოლოგია.....	40
2.1 კლინიკური მასალიდან <i>B.fragilis</i> -ს იზოლატების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია.....	40
2.1.1. კლინიკური ნიმუშებიდან <i>B.fragilis</i> გამოყოფა სელექტიური ნიადაგების გამოყენებით ....	40
2.1.2. <i>B.fragilis</i> -ის გამოყოფილი იზოლატების მორფოლოგიური იდენტიფიკაცია .....	41
2.1.3. <i>B.fragilis</i> - შტამების იდენტიფიკაცია: ბიოქიმიური მეთოდები.....	41
2.1.3.1 კატალაზური ტესტი: .....	41
2.1.3.2 ინდოლის ტესტი: .....	41
2.1.3.3 მატრიქსთან-ასოცირებული ლაზერული დისორბციულ/მაიონიზირებელი ფრენის სიჩქარის მას-სპექტრომეტრია (MALDI TOF): .....	42
2.2 <i>B.fragilis</i> - ენტეროტოქსიგენური იზოლატების იდენტიფიკაცია: ციტოტოქსიკურობის კვლევა	

და პოლიმერაზულ-ჯაჭვური რეაქცია .....	43
2.2.1 ციტოტოქსიკურობის კვლევა:.....	43
2.2.2 ტოქსიგენურობის გენის დეტექცია პჯრ მეთოდით.....	44
2.3 <i>B.fragilis</i> იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის შესწავლა .....	45
2.4 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით.....	46
2.4.1 <i>B.fragilis</i> ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით .....	46
2.4.2 შტრინხის მეთოდის გამოყენება სამიზნე ბაქტერიულ იზოლატზე ბაქტერიოფაგის მოქმედების დეტექციისთვის.....	46
2.4.3 ბაქტერიოფაგის სუფთა კლონის მიღება - ნეგატიური კოლონიების გაწმენდის მეთოდი ....	47
2.4.4 ბაქტერიოფაგების ე.წ. მასპინძელი შტამის შერჩევა .....	48
2.4.5 “ფისკას” მეთოდით ბაქტერიული იზოლატის ლიზოგენობის შეასწავლა.....	48
2.4.6 ბაქტერიოფაგების გამრავლება და დაგროვება ორმაგი შრის მეთოდის გამოყენებით .....	49
2.4.7 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია .....	50
2.4.8 ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრისა და სპეციფიკურობის განსაზღვრა .....	51
2.4.9 ბაქტერიოფაგის სასიცოცხლო ციკლისა და ზრდის მახასიათებლების შესწავლა.....	51
2.4.10 ფაგების მდგრადობის შესწავლა ტემპერატურისა და მჟავიანობის განსხვავებულ პირობებში.....	53
2.5 ფაგების გენომის შესწავლა .....	54
2.5.1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოყოფა .....	54
2.5.2 ბაქტერიოფაგის გენომის სრული სექვენირება .....	55
2.5.3 გენომის ანოტაცია .....	55
2.5.4. მასპინძელი ბაქტერიული შტამი A7 -ის სრული გენომის სექვენირება.....	56
2.6 ფაგების მოქმედების განსაზღვრა ეტბგ-ით დასნებოვნებულ უჯრედულ კულტურაზე.....	56
2.7 IL-8 -სა და TNF-a -ს დეტექცია უჯრედული კულტურის ზრდის ნიადაგში .....	57
2.8 სტატისტიკური ანალიზი .....	59
<b>თავი 3: მიღებული შედეგები.....</b>	<b>59</b>
3.1. <i>B.fragilis</i> -ის სახეობების იზოლატების გამოყოფა/შეგროვება.....	59
3.2 ენტეროტოქსიგენური შტამების დეტექცია.....	60
3.3 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის შესწავლა. ....	62
3.4. <i>B.fragilis</i> მიმართ აქტიური ფაგების გარემოდან გამოყოფა.....	63
3.5. გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიის დადგენა .....	64
3.6. ფაგების მოქმედების სპექტრის დადგენა.....	65
3.7. ფაგების შერჩეული პატრონი შტამის ლიზოგენობის დადგენა.....	68
3.8 ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლები.....	68
3.8.1. ერთჯერადი გამრავლების ციკლი .....	68
3.8.2. ფაგების მდგრადობის შესწავლა ტემპერატურისა და მჟავიანობის განსხვავებულ პირობებში.....	71
3.9 ბაქტერიოფაგების გენომის დახასიათება .....	74

3.9.1 GEC_vB_Bfr_VA7 გენეტიკური მახასიათებლები .....	77
3.9.2 GEC_vB_Bfr_UZM3 გენეტიკური მახასიათებლები .....	78
3.9.3 GEC_vB_Bfr_MTK გენეტიკური მახასიათებლები .....	79
3.10. ფაგების მოქმედების <i>in vitro</i> კვლევა უჯრედული კულტურის გამოყენებით .....	80
<b>თავი 4: შედეგების განხილვა.....</b>	<b>84</b>
<b>დასკვნები .....</b>	<b>.....</b>
<b>ბიბლიოგრაფია .....</b>	<b>91</b>

## შემოკლებების სია :

**კრკ** - კოლორექტალური კარცინომა

**ბფტ** - ბაქტერიოიდეს ფრაგილისის ტოქსინი

**ეტბფ** - ენტეროტოქსიგენური ბაქტერიოიდეს ფრაგილის

**APC**- Adenomatous Polyposis Coli

**ამრ** - ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული

**ბფჯ** - ბაქტერიოიდეს ფრაგილისის ჯგუფი

**CLSI**- Clinical and Laboratory Standards Institute

**ნად** - ნაწლავის ანთებითი დაავადება

**VEGF** – Vascular Endothelial Growth Factor

**STAT** - Signal Transducer and Activator of Transcription

**TCF** – T cell factor

**MAPK** – Mitogen activated protein kinase

**NF- $\kappa$ B** – Nuclear factor kappa – light chain of activated B-cells

**TLR** – Toll Like Receptor

**PAMPS** – Pathogen Associated Molecular Pattern

**TNF- $\alpha$  / TNFR1** – Tumor Necrosis Factor/ Tumor Necrosis Factor Receptor 1

**PD-1** – Programmed cell death protein 1

# შესავალი

ანაერობული ინფექციები, აბსცესი, სეფსისი, პერიტონიტი და სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომაც კი შესაძლოა გამოწვეული იყოს მიკროორგანიზმით, რომელიც დიდ როლს თამაშობს ნაწლავური იმუნური სისტემის ჩამოყალიბებაში, საკვების მონელებასა და ადამიანის გუნება-განწყობის ცვლილებაში (Wexler 2007). *Bacteroides fragilis* წარმოადგენს პირობით პათოგენს, რომელიც, ძირითადად, გვხვდება მომწელებელი სისტემის სხვადასხვა ღრუ ორგანოში. *Bacteroides* გვარი ნაწლავის სანათურში რამდენიმე სახეობითაა წარმოდგენილი და მათ შორის *B.fragilis* მხოლოდ, 1 %-ს შეადგენს. მიუხედავად ამისა, კლინიკური ნიმუშებიდან ხშირ შემთხვევებში სწორედ, მისი გამოყოფა ხდება და, შესაბამისად, იგი აღნიშნული გვარის ყველაზე პათოგენურ სახეობადაა მიჩნეული (Polk and Kasper 1977).

წლების წინ *B.fragilis*-ით გამოწვეული ინფექციები ადვილად ექვემდებრებოდნენ ანტიბიოტიკებით მკურნალობას. თუმცა, ბოლო ხანებში, ცნობები რეზისტენტული შტამების შესახებ იზრდება (Yekani et al. 2022). ამავდროულად, მატულობს იმ კვლევების რაოდენობა, რომლებიც ადასტურებენ მიკრობიოტის შემადგენელი ბაქტერიების და მათ შორის, *B.fragilis* -ის ენტეროტოქსიგენური შტამების კავშირს კოლორექტალური ადენოკარცინომის განვითარებასთან (Sears 2009). ანტიბიოტიკების ეფექტურად მოქმედების შემთხვევაშიც კი, სხვა ბაქტერიების მიმართ მათი არასელექტიური ბუნების გამო შესაძლოა, განვითარდეს ისეთი გართულებები, როგორცაა დისბაქტერიოზი, რომელიც ნაწლავის ჯანმრთელი მიკრობიომის ჰომეოსტაზური ბალანსის დარღვევას წარმოადგენს ,და შესაბამისად, ფაღარათის, კოლიტის ან საკვები ნივთიერებების შეთვისების შეფერხებას იწვევს. რიგ შემთხვევებში, დისბაქტერიოზი მსუბუქი ფორმით მიმდინარეობს და ხანგრძლივ მკურნალობას არ მოითხოვს, თუმცა ხშირია ანტიბიოტიკოთერაპიით შედეგად გამოწვეული (Meng et al.

2020) ქრონიკული დისბაქტერიოზი, რომლის დროსაც ვერ ხერხდება ნაწლავის მიკრობიომის სრულფასოვანი აღდგენა (Ceballos, Hernández-Camba, and Ramos 2021).

ბაქტერიოფაგების, იგივე ბაქტერიის ვირუსების ინფექციური დაავადებების სამკურნალოდ გამოყენება მოიაზრება, როგორც ანტიბიოტიკოთერაპიის ალტერნატიული საშუალება. ფაგოთერაპიის (ბაქტერიოფაგების მკურნალობის) პრაქტიკა ას წელზე მეტს ითვლის, თუცა ამ დროის განმავლობაში *B.fragilis* - ის მიმართ მოქმედი ფაგების თერაპიაში გამოყენების შესახებ ლიტერატურული ცნობები არ მოიპოვება.

ჩემი სადოქტორო კვლევის საგანს წარმოადგენს თერაპიაში გამოყენების მიზნით *B.fragilis* - ის ბაქტერიოფაგების გარემოდან გამოყოფა და მათი მოქმედების პოტენციალის შესწავლა.

ამისთვის, არსებული სამოქმედო გეგმის მიხედვით პირველ ეტაპზე მოვახდინეთ კლინიკური ნიმუშებიდან *B.fragilis* იზოლატების გამოყოფა და მათი პირობითი და ზუსტი იდენტიფიკაცია. მოლეკლური მეთოდებით მოხდა იდენტიფიცირებული შტამების ენტეროტოქსინის მაკოდირებელი *bft* გენის მტარებლობაზე შემოწმება. ფაგების გამოსაყოფად გამოვიყენეთ ჩამდინარე წყლებსა და კლინიკურ მასალების ნიმუშები. შემდეგ ეტაპზე შევისწავლეთ ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლები. ბაქტერიოფაგიაში გამოყენებული მეთოდებით განვსაზღვრეთ გამოყოფილი ფაგების მოქმედების სპექტრი და მათი მდგრადობა განსხვავებული მჟავიანობისა და ტემპერატურის პირობებში. მოვახდინეთ ფაგების გენეტიკური დახასიათება და მათი შემოწმება ვირულენტური გენების მტარებლობაზე.

სწორი ნაწლავის ეპითელიუმის ხაზი (HTC 116) გამოყენებული იყო ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესასწავლად. უჯრედების დასნებოვნებისთვის შეირჩა ფაგების მიმართ მგრძობიარე ენტეროტოქსიგენური ბაქტერიული შტამი. შემუშავდა უჯრედული კულტურის ინფექციური მოდელი, რომელიც გამოვიყენეთ ფაგების ბაქტერიციდული და იმუნომოდულატორული მოქმედების კვლევისთვის. უჯრედული ექსპერიმენტში ბაქტერიით დასნებოვნებულ და დაუსნებოვნებულ უჯრედებზე ფაგის ზემოქმედებისას

შევისწავლეთ IL-8-სა და TNF- $\alpha$  დონეების. მიღებული მონაცემების დამუშავება მოხდა შესაბამისი სტატისტიკური მეთოდებით.

ჩვენი ვარაუდით კვლევის შედეგად დახასიათებული ფაგები, გაამდიდრებს ფაგოთერაპიაში გამოყენებული ფაგების კოლექციას, და საჭიროების შემთხვევაში, ხელმისაწვდომი იქნება პაციენტებზე გამოყენებისთვის. ასევე, მოხდება *B.fragilis*-ის მიმართ სპეციფიკური ფაგების თაობაზე არსებული სამეცნიერო ცოდნის გაფართოვება.

## თავი 1: ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1. ადამიანის მიკრობიომი

მეჩვიდმეტე საუკუნის მეორე ნახევარში (1665-1683 წლები), რობერტ ჰუკისა და ანტონ ვან ლევენჰუკის მიერ მიკროორგანიზმების აღმოჩენის შემდეგ (Gest 2004), კვლევის ტექნოლოგიების განვითარებასთან ერთად, ცნობილი გახდა, რომ მიკროორგანიზმთა მთელი ეკოსისტემები არსებობს, როგორც ადამიანის გარშემო არსებულ გარემოში, ისევე მის სხეულში (Pascal Andreu et al. 2023). ადამიანის ორგანიზმში არსებული მიკროორგანიზმთა ერთობლიობას სხეულის მიკრობიომი ეწოდება, ხოლო ცალკეული ორგანოთა სისტემებთან ასოცირებულ მიკრობულ ეკოსისტემას მიკრობიოტა (Marchesi and Ravel 2015). ადამიანის მიკრობიომი მისი მუცლად ყოფნის პერიოდში იწყებს ჩამოყალიბების პროცესს და 4-6 წლისთვის უკვე მუდმივ სახეს იძენს (Dominguez-Bello et al. 2019). ადამიანის მიკრობიომის ძირითადი ბიომასა ბაქტერიებზე მოდის და მათი უჯრედული რაოდენობა სხეულისაზე ათჯერ მეტია (Costello et al. 2009). მიკრობიომში შემავალ ბაქტერიებს კომენსალებს უწოდებენ. კომენსალი ბაქტერიები სხვა ორგანიზმთან თანაბინადრობაში იმყოფებიან და ამასთანავე არ ახდენენ მათ დაზიანებას. მიკრობიომი მოიცავს, როგორც კანის მთელ ზედაპირს, სადაც გარემოსთან ექსპოზიცია მაქსიმალურია

ისე, თითქმის ყველა ღრუ ორგანოს ლორწოვან მემბრანას. ნაწლავის სანათური კერძოდ, კი მსხვილი ნაწლავი ყველაზე უხვადაა კოლონიზებული. ნაწლავის მიკრობიოტა, ძირითადად, შედგება შემდეგი გვარის ბაქტერიებისგან: ლაქტობაცილუსი, სტრეპტოკოკი, პრევოტელა, ლაქნოსპირაცეა, რუმინოკოკუსი, ენტერობაქტერი, კლოსტრიდიუმის, აკერმანსიასა და მათ შორის ბაქტერიოიდესის გვარის სახეობებს (Ruan et al. 2020). ნაწლავის მიკრობიოტის ბაქტერიული მრავალფეროვნება ბევრ ეგზოგენურ და ენდოგენურ ფაქტორზეა დამოკიდებული. დაბადების გზიდან დაწყებული (ფიზიოლოგიური თუ საკეისრო კვეთით დაბადება), კვების რაციონი, ანტიბიოტიკების მიღება, ეპითელიური რეცეპტორების გენეტიკური ვარიანტების გეოგრაფიული მდებარეობა გავლენას ახდენს მიკრობიოტის შემადგენლობის საბოლოო შემადგენლობაზე (Ruan et al. 2020), (Thursby and Juge 2017). ბოლო ათწლეულების მანძილზე ჩატარებული კვლევების მიხედვით დადგინდა, რომ ადამიანის მიკრობიომს და, კერძოდ, მომწელებელი სისტემის მიკრობიოტას ორგანიზმისთვის მნიშვნელოვანი ფიზიოლოგიური ფუნქციები აკისრია (Heintz-Buschart and Wilmes 2018). მისი ცალკეული სახეობები საკვები ნივთიერებების ჰიდროლიზურ დაშლას უზრუნველყოფენ და ამგვარად, საჭმლის მონელებაში იღებენ მონაწილეობას (Rothschild et al. 2018). ზოგიერთი მათგანი ვიტამინების წარმოქმნაში და ტოქსიკური ნივთიერებების გაუვნებელყოფას უზრუნველყოფს (Bezirtzoglou and Stavropoulou 2011). მიკრობიოტის ბაქტერიული მრავალფეროვნება ხელს უწყობს იმუნური სისტემის ჯანსაღ მომწიფებას და ალერგიული თუ ავტოიმუნური დაავადებების რისკის შემცირებას (Gomaa 2020).

ასევე, ნაწლავის მიკრობიოტა კონკურენტული კოლონიზაციის გზით აფერხებს ადგილობრივი ინფექციების განვითარებას (L. Lin and Zhang 2017), (Ingrassia, Leplingard, and Darfeuille-Michaud 2005). როგორც მის ჩამოყალიბებაზე, ასევე ადამიანის მიკრობიომის ჰომეოსტაზური ბალანსის დარღვევაზე შესაძლოა ბევრმა ფაქტორმა იმოქმედოს. მათ შორის უმნიშვნელოვანესი ეგზოგენური საფრთხე სწორედ, ანტიბიოტიკების მიღებაა. ანტიბიოტიკი ანტიბაქტერიული საშუალებაა, რომელიც სელექტიურად ტოქსიკურია ბაქტერიული პროკარიოტული უჯრედების მიმართ და არ



მოქმედებს ადამიანის ეუკარიოტულ უჯრედებზე. თუმცა, ნაკლებად ხდება პათოგენური ბაქტერიის წინააღმდეგ მიღებული ანტიბიოტიკების მიერ ადამიანის მიკრობიომში არსებული ე.წ. „კარგი“ ბაქტერიების დაზოგვა (Konstantinidis et al. 2020), (Blanchi, Goret, and Mégraud 2016). ანტიბიოტიკების მოქმედებამ შესაძლოა გამოიწვიოს ეუბიოტური (მიკრობიომის ჟანსალი მდგომარეობა) მთლიანობის დარღვევა, რასაც დისბაქტერიოზი ეწოდება. დისბაქტერიოზის შედეგად ვითარდება ფაღარათი, კოლიტი და ფერხდება სხვადასხვა საკვები ნივთიერებების მონელება და შეთვისება (Meng et al. 2020). გარდა ამისა, შესაძლოა მოხდეს ნაწლავური მიკრობიოტის კომენსალური ბაქტერიების პათოგენური შტამებით კოლონიზაცია/ჩანაცვლება.

## 1.2. ბაქტეროიდების გვარის სახეობები

*B.fragilis* ჯგუფის (ბფჯ) ბაქტერიები პლემორფულ, გრამ-უარყოფით ჩხირებს წარმოადგენენ. მათი უჯრედის ზომა 1.5-6 მკმ-მდე ვარიირებს. უჯრედები არაპიგმენტური, უძრავი და კაპსულურებულია. გამოყოფილი იზოლატები ნაღვლის მიმართ რეზისტენტობით ხასიათდებიან (იზრდებიან 20% ნაღვლის შემცველ ნიადაგზე) (Gajdács, Spengler, and Urbán 2017) (Leber 2016). კატალაზისა და ინდოლის მიმართ აქტივობა ვარიირებს სახეობების მიხედვით. *B.fragilis* -ის იზოლატების უმეტესობა ინდოლ-უარყოფითეები არიან (Wexler 2007).

ბფჯ ბაქტერიები განსაკუთრებულად რეზისტენტულები არიან ანტიბიოტიკების მიმართ, როგორცაა, კანამიცინი [1 000 მკგ], ვანკომიცინი [5 მკგ] და კოლისტინი [10 მკგ], რომელთა გამოყენებაც შესაძლებელია ბაქტერიული იზოლატების პირობითი იდენტიფიკაციისთვის (Leber 2016). *Bacteroides fragilis* წარმოადგენს სწორი ნაწლავის კომენსალურ ბინადარს და მისი მიკრობიოტის მნიშვნელოვანი წევრია. მიუხედავად იმისა, რომ *Bacteroides thetaiotaomicron* -ის კონცენტრაცია 10-ჯერ მეტია ნაწლავის მიკრობიოტაში *B. fragilis*-თან შედარებით, ეს უკანასკნელი მეტი სიხშირით ამოითესება კლინიკური ნიმუშებიდან და შესაბამისად მეტად მოიაზრება როგორც პათოგენი (Wexler

2007). სხვა ბაქტერიოდესის სახეობებისგან განსხვავებით, მისი პათოგენური ბუნება განპირობებულია ისეთი ვირულენტური ფაქტორების მტარებლობითა და ექსპრესიით, როგორცაა ადჰეზიური ცილებისა და კაფსულის სინთეზი, შედარებით მეტი ტოლერანტობა ჟანგბადის მიმართ და ასევე, ზედაპირული სტრუქტურების ანტიგენური ვარიაცია.

### 1.3. *Bacteroides fragilis* როლი ადამიანის ჯანმრთელობასა და დაავადებებში

ადამიანის სხეულის *Bacteroides fragilis*-ით კოლონიზაცია დაბადებისას ხდება და სიცოცხლის პირველივე წელს მუდმივი კოლონიზატორის ადგილს იმკვიდრებს (Chong, Bloomfield, and O'Sullivan 2018).

*Bacteroides fragilis* ინტრააბდომინალური (მუცლის ღრუს) ინფექციების ერთერთი ყველაზე ხშირი გამომწვევია. ნაწლავის ქსოვილოვანი ბარიერის დაზიანების შედეგად მისი მიკრობიომის გავრცელება მიმდებარე ქსოვილებსა და სისხლში იწვევს პოლიმიკრობულ ინფექციას (Jean et al. 2022). ამის გამო, *Bacteroides fragilis* იშვიათად გვევლინება, როგორც ინფექციის ცალკეული გამომწვევი. ჩვეულებრივ, *Bacteroides fragilis* სხვა ანაერობულ ორგანიზმებთან და ენტერობაქტერიაცეას წარმომადგენლებთან ერთად გვხვდება ინფექციურ კერებში. ლორწოვანი ბარიერის დარღვევა განაპირობებს *B.fragilis* მიერ აბსცესებისა და ბაქტერიემიის განვითარებას (Valguarnera and Wardenburg 2020), (Valguarnera and Wardenburg 2020). ასევე, ნანახია, ბაქტერიოდესის სახეობების ჩართულობა ადამიანის სისხლის შედედების შიდა გზის გახანგრძლივებაში. როგორც *B. fragilis*, ისე *B. thetaiotaomicron* ადამიანის შრატში დიდი რაოდენობით ბრადიკინინის გამოყოფას იწვევს, რაც ბაქტერიას საშუალებას აძლევს შედედების პროცესის თავიდან აცილებით ადვილად გავრცელდეს სისხლში (Murphy et al. 2011). *Bacteroides fragilis*-ის ვირულენტური ბუნება ასევე განპირობებულია ენტეროტოქსინის წარმოქმნით. ენტეროტოქსიგენური *Bacteroides fragilis* (ეტბგ) შტამების მიერ წარმოქმნილ *B. fragilis*

ტოქსინი (ბფტ) ან ფრაგილიზინი ეწოდება. ის წარმოადგენს Zn-დამოკიდებულ მეტალოპროტეინას, რომელიც მოქმედებს უჯრედშორისი კავშირების E-კადჰერინის ცილაზე და იწვევს მისი სტრუქტურის რღვევას. ენტეროტოქსინის მოქმედება აღნიშნულია ანთებითი ფალარათის და ნაწლავის ანთებითი დაავადებების პათოგენეზში (Sears 2009), (Basset et al. 2004). ასევე, დადგენილია, კავშირი ეტბფ-სა და კოლორექტალური ადენოკარცინომის (კრკ) განვითარებას შორის. სიმსივნის პროვოცირება სწორედ, ბფტ ტოქსინის მოქმედებით ხდება. კანცეროგენეზის პროცესს ასევე, ხელს უწყობს ბიოფილმის წარმოქმნა. აღწერილია, რომ ადენომატოზური პოლიპოზის კოლი (APC) გენის მუტაციის მატარებელ თაგვებში ეტბფ-ის შტამით მონოკლონიზაცია იწვევდა ფრაგილიზინთან დაკავშირებული ნაწლავის სიმსივნის განვითარებას (S. Wu et al. 2009). აღმოჩნდა, რომ *bft* გენი ჯანმრთელი საკონტროლო ჯგუფიდან მიღებულ ნიმუშებთან შედარებით, უფრო ხშირად ასოცირდება ავთვისებიანი სიმსივნის მქონე პაციენტებისგან მიღებული მსხვილი ნაწლავის ნიმუშებთან. რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ბფტ-თან ექსპოზიცია კიბოს განვითარების რისკ ფაქტორს წარმოადგენს (Boleij et al. 2015).

ბფტ გენი მდებარეობს ბაქტერიის გენომის პათოგენობის კუნძულზე (BFT PAI). ამ უბნის გავრცელება ბაქტერიებს შორის ხდება ჰორიზონტალური გადაცემით (ტრანსმისიით) და უფრო დიდი ზომის კონიუგაციური ტრანსპოზონის (CTn86) ნაწილს წარმოადგენს (Franco 2004). ბფტ E-კადჰერინის გახლეჩვის შედეგად სავარაუდოდ, ააქტიურებს β-კატენინის სასიგნალო გზას, რომელიც მრავალი სიმსივნის ფორმირებისას არის დადგენილი (Garrett 2015). ასევე, ნაჩვენებია, რომ ბფტ-მ შესაძლოა, სიმსივნის წარმოქმნა დიდი რაოდენობით ჟანგბადის რადიკალების გამომუშავებით განაპირობოს, რომლებიც აზიანებენ მასპინძლის უჯრედულ დნმ-ს (Goodwin et al. 2011). ეტბფ შტამები საკმაოდ გავრცელებულია და დაახლოებით 30% -მდე ადამიანები სავარაუდოდ, წარმოადგენენ ასიმპტომურ მტარებლებს (Sears, Geis, and Housseau 2014). ეტბფ-ს გარდა ნაწლავის მიკრობიოტის სხვა წარმომადგენლებიც არიან ჩართული სიმსივნური პროცესების პროვოცირებაში (W.T. Cheng, Kantilal, and Davamani 2020), მაგალითად, *Enterococcus*

*faecalis* (*E. faecalis*) და კოლიბაქტინის წარმომქმნელი *Escherichia coli* (*E. coli*) ეტბფ-ს მსგავსად, იწვევენ მსხვილი ნაწლავის კიბოს. აღსანიშნავია, რომ მათ მიერ სიმსივნის პროვოცირების გზები განსხვავდება.

#### 1.4. ენტეროტოქსინით გამოწვეული კანცეროგენეზი

ზოგბინ დენგის გუნდმა 2016 წელს დისბაქტერიოზსა და კიბოს განვითარებას შორის კავშირი დაადგინა (Deng et al. 2016). ამავდროულად, ჩინელთა სამეცნიერო ჯგუფის მიერ დამტკიცდა, რომ კოლორექტალური კარცინომის (კრკ) განვითარება ასოცირდება ნაწლავის მიკრობული შემადგენლობის დარღვევასთან (Liu et al. 2016). ნაწლავის დისბიოზი ზრდის იმ ბაქტერიული ინფექციების მიმართ მიდრეკილებას, რომლებიც ქრონიკულ ანთებას იწვევენ. ქრონიკული ანთება, კი ნაწლავის სიმსივნის მთავარ არაგენეტიკურ რისკ ფაქტორს წარმოადგენს. ის ცვლის უჯრედულ მიკროგარემოს, ხელს უწყობს გენების მუტაციას, აინჰიბირებს აპოპტოზურ პროცესს და ასტიმულირებს ნეოვასკულარიზაციასა და უჯრედულ პროლიფერაციას, რაც თავის მხრივ, იწვევს პრეკანცერულ მდგომარეობას და საბოლოოდ, მიყვევართ სიმსივნის განვითარებამდე (Brücher and Jamall 2014). ქრონიკული ანთება, ამავე დროს იწვევს გენეტიკურ ცვლილებებს, რომლებიც პირდაპირ მოქმედებს STAT3 გზაზე (ტრანსკრიფციული აქტივაციის გზა) და განაპირობებს კანცეროგენეზს (Yu, Pardoll, and Jove 2009). სიმსივნის განვითარების პროცესი მოიცავს სამ ეტაპს: ინიციაციას, ხელშეწყობას და პროგრესირებას (Klampfer 2011). ინიციაციისა და პროგრესის დროს, მიკრობებისა და სიმსივნური უჯრედების ურთიერთქმედება იწვევს გენეტიკურ ცვლილებებსა და ანთებითი ფაქტორების წარმოქმნას, რომლებიც პასუხისმგებლები არიან ონკოუჯრედების გადარჩენასა და გამრავლებაზე (Whisner and Athena Aktipis 2019). სიმსივნის პროგნოზისას სიმსივნური უჯრედები ასევე ურთიერთქმედებენ ანთებით უჯრედებთან მის მიკროგარემოში. აღნიშნული უჯრედები გამოყოფენ ანთებით-იმუნურ

ფაქტორებს, ციტოკინებს იმუნური უჯრედების მოზიდვისთვის და სტრომული უჯრედების აქტივაციისთვის.

თავის მხრივ, როგორც ანთებითი ისე, გააქტიურებული სტრომული უჯრედები იწყებენ სხვადასხვა ტიპის ციტოკინების, ქემოკინების, ზრდის ფაქტორებისა თუ პროტეაზული აქტივობის ნივთიერებების გამოყოფას. ეს უკნასკნელნი ხელს უწყობენ სიმსივნური უჯრედების ზრდას, დიფერენციაციასა და გადარჩენას. დამატებით, ციტოკინები ან მიკრობები გენეტიკურ მუტაციებს იწვევენ და ასე, უწყობენ ხელს სიმსივნის განვითარებას (Klampfer 2011). სპეციფიკური გენური მუტაციის დროს უჯრედების გამრავლების სიჩქარე მატულობს და ვითარდება ჰიპერპლაზიური ეპითელური ქსოვილი, რომელიც, მოგვიანებით გარდაიქმნება ადენომად და შემდეგ, ადენოკარცინომად. ორივე ტიპის წარმონაქმნი მოქმედებს სწორი ნაწლავის ეპითელურ უჯრედებზე, ზრდის მათ ტოლერანტობას აპოპტოზის მიმართ და ხდება სახეცვლილი უჯრედების მიერ იმუნური უჯრედებისგან თავის დაღწევა. სუბმუკოზურ გარსში შეღწევის შედეგად, ადენოკარცინომა კარცინომის ფორმას იძენს და ავთვისებიანი უჯრედების ზრდასთან ერთად სიმსივნე ნაწლავის მიდამოში გავრცელებას იწყებს (Brennan and Garrett 2016), (Sears and Garrett 2014). შესაბამისად, კანცეროგენეზი უფრო ეფექტურად მიმდინარეობს.

## 1.5. ნაწლავის ანთებითი დაავადება

ნაწლავის ანთებითი დაავადება (ნად) წარმოადგენს ნაწლავის ქრონიკული ანთების მაგალითს, რომელიც ეტბფ-თან ასოცირდება. პათოგენურ ბაქტერიებს აქვთ ინფექციის ფონზე ანთებისა და კანცეროგენეზის პროვოცირების უნარი და ნად-სა და კრკ-ს შორის კავშირი კარგადაა დადგენილი (Cho et al. 2014). საინტერესოა, რომ ნად-ის მქონე პაციენტები ხასიათდებიან იმუნოგლობულინი (Ig) G ანტისხეულების, ინტერლეიკინ -6 (IL-6), ვასკულარულ-ენდოთელიალური ზრდის ფაქტორისა (VEGF) და სიმსივნურ-ნეკროზული ფაქტორის (TNF) გამოყოფის ზრდით. IgG ანტისხეულები უზრუნველყოფენ

ბაქტერიების კვდომას ნაწლავის სანათურში (Yu, Pardoll, and Jove 2009). ამავდროულად, IL-6 და VEGF მედიატორები STAT3 გზას ააქტიურებენ.

ნად-ის ყველაზე ხშირი მაგალითი წყლულოვანი კოლიტი და კრონის დაავადებაა. ეს ქრონიკული ანთებითი დაავადებები ზრდიან კოლიტთან დაკავშირებულ კრკ-ს რისკს, რომლის განვითარების ალბათობაც დამოკიდებულია მრავალ ფაქტორზე, მათ შორის, ანთების ხანგრძლივობაზე, სიმძიმეზე და ნაწლავის დისბიოსზე (S.C. Wu et al. 2015), (Ullman and Itzkowitz 2011), (Arthur and Jobin 2011). ზემოაღნიშნული პათოლოგიის მქონე პაციენტებში კრკ-ს განვითარების რისკი ჯანმრთელ ინდივიდებთან შედარებით 2-3 ჯერ მაღალია. (Eaden, Abrams, and Mayberry 2001), (Canavan, Abrams, and Mayberry 2006). აღნიშნული დაავადებების მქონე ადამიანებში ნანახია ეტბგ-ს მაღალი კონცენტრაცია ნაწლავებსა და განავალში ჯანმრთელ პოპულაციასთან შედარებით (DeStefano Shields et al. 2016). ეტბგ ასევე, ბიოფილმის წარმოქმნელი პათოგენია. აღწერილია ბიოფილმების როლი e-კადჰერინის შემცირებაში, მისი განაწილების ცვლილებაში ნაწლავის ეპითელურ უჯრედებზე, IL-6 წარმოქმნის სტიმულირებასა და STAT3 გზის აქტივაციაში. ეს მიუთითებს ბიოფილმების კრკ-ს განვითარებასთან კავშირზე (Dejea et al. 2014).

ანთებისგან დამოუკიდებლად, ბგტ E-კადჰერინის დეგრადაციის შედეგად ცვლის ნაწლავის ეპითელური უჯრედების სტრუქტურას და ფუნქციას (Sears and Garrett 2014).

E-კადჰერინი 120-kDa გლიკოპროტეინია, რომელიც ზონულა ადჰერენსის მთავარ სტრუქტურულ პროტეინს წარმოადგენს და ასევე, ცნობილია, როგორც სიმსივნის სუპრესორული ფაქტორი. ეს პროტეინი განაპირობებს ეპითელიალური უჯრედების პოლარობას. ჩვეულებრივ მდგომარეობაში, მისი ექსპრესია უკავშირდება ისეთ უჯრედულ ფუნქციებს, როგორცაა აპოპტოზი და ჰომოტიპიური უჯრედებს შორის ადჰეზია (Wong et al. 2018), (S. Wu et al. 2003). სამწუხაროდ, როცა E-კადჰერინი ურთიერთქმედებს ბგტ-თან, ტოქსინი სწრაფად ახდენს მის დეგრადირებას, მორფოლოგიურ ცვლილებებს და უჯრედების მეტასტაზური პოტენციალის ზრდას. ამავდროულად, e-კადჰერინი ასევე იწვევს  $\beta$ -კათენინის ბირთვში ლოკალიზაციას და T-

უჯრედულ ფაქტორზე დამოკიდებული ტრანსკრიფციული აქტივატორის დაკავშირებას (Purcell et al. 2016), (S. Wu et al. 1998). ეს კავშირი ხელს უწყობს გენების ექსპრესიის რეგულაციასა და ტრანსკრიფციას. დამატებით,  $\beta$ -კათენინი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს WNT (wingless and int) სასიგნალო გზაში, იწვევს უჯრედულ პროლიფერაციას, ეპითელიალურ-მეზენქიმურ გარდაქმნას და ხელს უწყობს პროტონკოგენების ექსპრესიას (Rhee et al. 2009).

პირველადი კოლორექტალური სიმსივნის ცენტრში არსებული უჯრედები წარმოქმნიან  $\beta$ -კათენინსა და E-კადჰერინს. თუმცა, პერიფერიულად ისინი დიდი რაოდენობით ბირთვული  $\beta$ -კათენინის ექსპრესიას ახდენენ, და ამავდროულად e-კათჰერინის კავშირებს კარგავენ (Brabletz et al. 2000).

E-კადჰერინი ასევე უკავშირდება ნაწლავის ეპითელიური უჯრედების F-აქტინის რგოლს. როცა E-კადჰერინის დაშლის ინტენსიურობა მატულობს აპიკალური F-აქტინის მთლიანობა ირღვევა, რაც იწვევს უჯრედის მოცულობის ზრდას და ქლორის გამოყოფას. ქლორის გამოყოფა თავის მხრივ იწვევს უჯრედული და ეპითელიური ბარიერების განვლადობის ზრდას (Remacle, Shiryaev, and Strongin 2014), (S. Wu et al. 2004). ეს პროცესები საფუძვლად უდევს ნაწლავურ ანთებას, ფაღარათისა და სწორი ნაწლავის სიმსივნის განვითარებას.

## 1.6. IL-8 და მისი როლი ეტბფ-ით გამოწვეულ კრკ-ს განვითარებაში

რიგი *in vitro* და *in vivo* კვლევებისა აჩვენებს, რომ ბგტ ზემოქმედების შედეგად, ნაწლავური ეპითელიუმის მიერ ხდება ინტერლეიკინ რვის (IL-8) გამოყოფა (S. Wu et al. 2004), (Hwang et al. 2013).

IL-8 წარმოადგენს ძლიერ ანთებით ქემოკინს და მისი სეკრეცია კრკ უჯრედების მიერ იწვევს რამდენიმე სასიგნალო გზის აქტივაციას, რომლებიც ჩართულები არიან უჯრედის გადარჩენის, ანგიოგენეზისა და მათი მიგრაცია/ინვაზიის პროცესებში. დადგენილია, რომ

ბგტ e-კადჰერინის გახლეჩვის შედეგად ახდენს IL-8 სეკრეციის სტიმულაციას (Hwang et al. 2013). დაშლილი e-კადჰერინი ათავისუფლებს β-კათენინს, რომლის ტრანსლოკაციაც ხდება ბირთვში სადაც, ხორციელდება IL-8-ის TCF (T-cell factor)-დამოკიდებული ტრანსკრიფცია (Lévy et al. 2002); β-კათენინი, თავის მხრივ, გარკვეულ როლს თამაშობს მწვავე ანთების მოდულაციაში, რამაც შესაძლოა, ხელი შეუწყოს ქრონიკული ანთების განვითარებასა და კანცეროგენეზს. β-კათენინის მაღალი კონცენტრაცია ასევე აღწერილია კრკ უჯრედებში ბგტ-ის ზემოქმედების დროს (Sun et al. 2005), (Duan et al. 2007).

IL-8 თავისმხრივ, ასევე ააქტიურებს STAT3-ს (Burger et al. 2005), რომელიც მწვავე ანთების პროცესში არის ჩართული. STAT3-ს აქვს ორგზის მოქმედება: იგი ახდენს უჯრედგარე სიგნალის გადაცემას უხშირესად, ციტოკინების რეცეპტორებიდან პირდაპირი გზით და ასევე, ასრულებს ტრანსკრიფციის ფაქტორის როლს და არეგულირებს დიდი რაოდენობის გენების ექსპრესიას. STAT3-ის მუდმივ ექსპრესიას ონკოგენური მოქმედება აქვს და ქრონიკულ ანთებასა და სიმსივნის განვითარებას უწყობს ხელს (Zhao et al. 2014), ხოლო ბოლო დროის კვლევებით დასტურდება მისი ჩართულობა იმუნური სისტემის ტოლერანტობის განვითარებაში *Helicobacter pylori*-ისა (Kumar et al. 2015) და ეტბგ ინფექციის მიმართ (S. Wu et al. 2009). კავშირი IL-8 და STAT3 (Ning et al. 2019), (Guo et al. 2017), და e-კადჰერინსა და STAT3-ს შორის (C. Zhang et al. 2015), (Xiong et al. 2012) სხვა ტიპის ავთვისებიან სიმსივნეებშიც არის ნანახი, მაგრამ ეტბგ-ით გამოწვეულ კოლორექტალურ ადენოკარცინომაში ამ მოლეკულებს შორის პოტენციური ურთიერთქმედების შესახებ მხოლოდ ახლა ხდება ცნობილი. *In vitro* კვლევების მიხედვით, IL-8 ცილის ექსპრესია გამოწვეულია STAT3-ის აქტივაციით, რომელიც HT-29 და HCT116 უჯრედებში E-კადჰერინის დაშლისგან დამოუკიდებლად აქტიურდება (Purcell, Permain, and Keenan 2022).



## 1.7. სწორი ნაწლავი კიბოს სასიგნალო გზის ცვლილება

სწორი ნაწლავის უჯრედის სასიგნალო გადაცემა ხდება NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells), WNT და MAPK (mitogen-activated protein kinase) გზების მეშვეობით (Purcell et al. 2017; S. Grivennikov et al. 2009).

ნაწლავის ეპითელიურ უჯრედებში, ლორწოვანი შრის ანთების პროვოცირებას ბფტ-ი ახდენს NF- $\kappa$ B გზის სტიმულირებას ჰემოქსიგენაზა -1-ის (HO-1) ექსპრესიისა და ციტოკინების საშუალებით. აღნიშნული გზის აქტივაციით იზრდება ნეოპლაზიური უჯრედების გადარჩენის შანსი აპოპტოზის თავიდან აცილებით, რაც განაპირობებს სიმსივნის განვითარებას (Ko et al. 2016),(Quante et al. 2013).

NF- $\kappa$ B-ს ხანგრძლივი აქტივაცია აძლიერებს აზოტის ოქსიდის სინთაზას, რომელიც L-არგინინს გარდაქმნის აზოტის ოქსიდად. აზოტის ოქსიდი თავისმხრივ, აზიანებს უჯრედულ დნმ-ს (Rhee et al. 2009), (Shaked et al. 2012). WNT სასიგნალო გზა მნიშვნელოვან როლს თამაშობს და უარყოფითად მოქმედებს უჯრედებზე, რაც შემდგომ კანცეროგენეზს განაპირობებს (Schneikert and Behrens 2007). WNT გზის აქტივაციას მოსდევს უჯრედშორისი მტკიცე კავშირების შესუსტება და უჯრედული ადჰეზიის შემცირება. ეს იძლევა საშუალებას, რომ მოხდეს სიმსივნურ უჯრედების მიგრაცია და გავრცელება მეტასტაზების სახით (Mármol et al. 2017).

სპერმინ-ოქსიდაზა არის კატაბოლური ფერმენტი, რომელიც წარმოქმნის ჟანგბადის რადიკალებს (ROS) და მის ჭარბ მოქმედებას ბფტ განაპირობებს (Goodwin et al. 2011). ჩვეულებრივ, ROS მნიშვნელოვანი მედიატორის როლს ასრულებს სხვადასხვა სასიგნალო გზაში და იმუნურ პასუხში, რომელიც ბუნებრივად ბიოლოგიურ სისტემებში წარმოიქმნება. ROS მოიცავს სუპეროქსიდს, ჰიდროქსილის რადიკალებსა და წყალბადის ზეჟანგს. თუმცა, როცა ROS ჭარბი რაოდენობითაა წარმოდგენილი, ის უარყოფითად მოქმედებს რედოქს ჰომეოსტაზზე და იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს. ამის შედეგად, ხდება

უჯრედული კომპონენტების ჟანგვა მათ შორის, უჯრედში არსებული დნმ-ის ლიპიდებისა და ცილების. უჯრედული ჟანგვა იწვევს მის შეუქცევად დაზიანებას. ასევე ROS, მნიშვნელოვან როლს ასრულებს სიმსივნური უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის გაზრდაში (J. Lin, Chuang, and Zuo 2017).

## 1.8. *B.fragilis*-ით გამოწვეული ინფექციების მკურნალობა და ანტიბიოტიკორეზისტენტობა

ბაქტერიოდესის ჯგუფის კომენსალებით და მათ შორის, *B.fragilis*-ით გამოწვეული ინფექციების უმეტესობა ადეკვატური მკურნალობის გარეშე 50%-იანი სიკვდილიანობით ხასიათდება (C.W. Cheng et al. 2009). *B.fragilis* ბოლო ათწლეულებამდე არ ითვლებოდა ანტიბიოტიკორეზისტენტულ პათოგენად თუმცა, უკანასკნელ წლებში, მასთან ასოცირებული ინფექციების წარმატებული მკურნალობა რეზისტენტული შტამების გავრცელების გამო პრობლემატური გახდა (Boyanova, Kolarov, and Mitov 2015).

*B.fragilis* ბეტა-ლაქტამაზას წამოქმნის და შესაბამისად, ბუნებრივად რეზისტენტულია პენიცილინის მიმართ. ცეფოქსიტინს, მოქსიფლოქსაცინსა და კლინდამიცინს აქვთ სუსტი მოქმედება, პიპერაცილინ/თაზობაქტამის, მეროპენემისა და მეტრონიდაზოლის მიმართ კი მაღალი მგრძობელობა აღინიშნება (Takesue et al. 2018). მეტრონიდაზოლი წარმოადგენს პირველი რიგის ანტიბიოტიკს ანაერობული ინფექციების სამკურნალოდ თუმცა, მის მიმართ რეზისტენტობა სხვადასხვა კვლევების მიხედვით 0,5%-დან 7.8%-მდეა გაზრდილი (Ghotaslou et al. 2018). ახალი ანტიბიოტიკის ერაგაციკლინის, ახალი ფლუროციკლინის შესწავლა მოხდა რთული, შერეული (აერობულ/ანაერობული) ინტრაბდომინალური ინფექციების დროს. ერაგაციკლინს ჰქონდა კარგი მოქმედება *in vitro* ანაერობულ პათოგენებზე მათ შორის, ყველა *Bacteroides* და *Parabacteroides* გამოყენებულ შტამზე. აღნიშნული ანტიბიოტიკი 4-8-ჯერ მეტი ეფექტურობით

ხასიათდებოდა ვიდრე ტიგეციკლინი (Goldstein, Citron, and Tyrrell 2018). მეორე ახალი პრეპარატი, თაზობაქტამ/ცეფლოზანია, რომლის ეფექტურობისა და უსაფრთხოების შესწავლა მეტრონიდაზოლთან კომბინაციაში მოხდა. კვლევისას დადებითი შედეგი პაციენტების 95%-ში დაფიქსირდა, რომელთაც *B.fragilis*-ით გამოწვეული მუცლისშიდა ინფექციები აღენიშნებოდათ (Mikamo et al. 2019).

სხვა ანაერობული პათოგენებისგან განსხვავებით, *B.fragilis*-ის ჯგუფის (ბფჯ) ბაქტერიებს ახსიათებთ შედარებით მაღალი ანტიმიკრობული რეზისტენტობა (ამრ) და მისი მექანიზმების მრავალფეროვნება (Wexler 2007). ზოგიერთი მათგანის კოლონიზაცია ჯანმრთელი ორგანიზმის ნაწლავში ხანგრძლივად ხდება და ეს ნაწლავური გარემო შესაძლოა წარმოჩინდეს, როგორც ამრ გენების რეზერვუარი, რითაც სასურველ გარემოს ქმნის ამ გენების გავრცელებისთვის ბფჯ და არა-ბფჯ სახეობებს შორის.

მრავალმა გენეტიკურმა კვლევამ, რომლის მიხედვითაც ბფჯ ორ ტიპად დაიყო, აჩვენა, რომ პირველი ჯგუფის სახეობები შეიცავენ ცეფალოსპორინაზა *cepA* გენს და ზოგადად, მგრძობიარენი არიან პირველი რიგის ბეტა-ლაქტამური ანტიბიოტიკების მიმართ. ამ ჯგუფში შედიან ნაწლავური მიკრობიოტის წარმომადგენლები. მეორე ჯგუფის იზოლატებს აქვთ უნარი შეიძინონ მაღალი დონის რეზისტენტობა კარბაპენემების მიმართ ჩართული სეკვენსების (insertion sequence) საშუალებით, რომელებიც ქრომოსომულ კარბაპენემაზულ *cFIA* გენს ააქტიურებს (Valguarnera and Wardenburg 2020).

რეზისტენტობა მეტრონიდაზოლის მიმართ განპირობებულია სხვადასხვა რთული მექანიზმებით ან მათი კომბინაციით. ასეთია მაგლითად, *nim* გენი, რომელიც სავარაუდოდ, მოძრავ გენეტიკურ ელემენტზე (პლაზმიდა, ბაქტერიოფაგი) მდებარეობს. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ფერმენტს, რომელიც მეტრონიდაზოლის ინაქტივაციას განაპირობებს (Alauzet, Lozniewski, and Marchandin 2019). 2018 წლის ლიტერატურის მიხედვით იმიპენემის მიმართ რეზისტენტული *B. fragilis* შტამის გამოყოფა მოხდა ხორვატიაში (Bogdan et al. 2018).

## 1.9. ფაგოთერაპია

ბაქტერიოფაგებით ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობა მეოცე საუკუნის მეორე ათწლეულიდან ყოფილი საბჭოთა კავშირის რამდენიმე ქვეყანაში და მათ შორის საქართველოშიც მიმდინარეობს (Chanishvili 2012). ფაგოთერაპიას საფუძველი მანამდე ჩაეყარა, სანამ ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა გლობალური ჯანდაცვის პრობლემად იქცეობდა (A.R. Collaborators 2022). ბაქტერიული ინფექციების მკურნალობა პენიცილინის აღმოჩენის შემდეგ კი ანტიბიოტიკების საშუალებით ხდება.

მეოცე საუკუნემდე, ინფექციური დაავადებები წარმოადგენდა სიკვდილიანობის მთავარ მიზეზს. თუმცა, მეოცე საუკუნის შუა პერიოდში მოხდა ანტიბიოტიკების კომერციალიზაცია რამაც, გამოიწვია სიკვდილიანობის მაჩვენებლის მნიშვნელოვანი კლება და აღიარებულ იქნა, როგორც “სამედიცინო სასწაული”. გარდა ამისა, ანტიბიოტიკების არასამედიცინო გამოყენებამ, ასევე მნიშვნელოვანი გავლენა იქონია კაცობრიობის ყოფაზე. მაგალითად, მეორე მსოფლიო ომის დროს, მეცხოველეობაში ანტიბიოტიკები ზრდის ხელშემწყობ ფაქტორად გამოყენებამ გაზარდა ხორც-პროდუქტების წარმოება. დღევანდელ დღეს გამოყენებულ ანტიმიკრობული საშუალებების უმრავლესობა 1940–1960 წლებში იქნა აღმოჩენილი და ეს პერიოდი მოიაზრება, როგორც ანტიბიოტიკების “ოქროს ხანა”. ამ დროს აღმოჩენილი ანტიბიოტიკები და მათი წარმოების სიხშირე იძლეოდა იმის იმედს, რომ ინფექციური დაავადებები მალე ჯანდაცვისათვის სავსებით კონტროლირებადი საკითხი გახდებოდა (M.E. de Kraker, Stewardson, and Harbarth 2016). თუმცა, ამჟამად, ყოველწლიურად, ევროპაში ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტული შტამებით გამოწვეული ინფექციების შვიდასი ათასამდე შემთხვევაა, საიდანაც 33 000-მდე შემთხვევა სიკვდილით სრულდება (Prestinaci, Pezzotti, and Pantosti 2015), და მოითხოვს მილიარდნახევრიანი ღირებულების სამედიცინო მართვას (WHO 2015). მიუხედავად იმისა, რომ 2000-დან 2019 წლამდე ადამიანებში ანტიბიოტიკების მოხმარების სიხშირე

36%-ით გაიზარდა (Naylor et al. 2018), , ძირითადი მოსახლეობის სიკვდილიანობის დაახლოებით 20% ინფექციურ დაავადებებითაა გამოწვეული (Cassini et al. 2019). აღნიშნულ მდგომარეობას ამძიმებს ის ფაქტიც, რომ ნოზოკომიალური (საავადმყოფოში შეძენილი) ინფექციები გახდა ავადობისა და სიკვდილიანობის წამყვანი მიზეზი (Lim et al. 2016). ამან თავის მხრივ, გამოიწვია სტაციონარში დაყოვნების ხანგრძლივობის და სამედიცინო მომსახურების ხარჯების ზრდა (Temkin et al. 2018). ნოზოკომიალური დაავადებების 15%-ზე მეტი მულტირეზისტენტული პათოგენებითაა გამოწვეული, რომელთა წინააღმდეგ ეფექტური სამკურნალო საშუალება არ არსებობს (M.E.A. de Kraker and Lipsitch 2022), (G.D.a.I. Collaborators 2020). უახლოესი მომავალიც საგანგაშოა, რაც გამოჩნდა დიდი ბრიტანეთში ჩატარებულ კვლევაში, რომლის მიხედვითაც 2050 წლისთვის, ანტიბიოტიკორეზისტენტული ინფექციებით წელიწადში დაახლოებით ათ მილიონამდე ადამიანის სიკვდილი იქნება გამოწვეული (Hay et al. 2018). რეზისტენტული პათოგენების მატებას მრავალი მიზეზი აქვს. მათ შორის, ანტიბიოტიკების დანიშვნის მაღალი სიხშირე, თვითმკურნალობის არაეფექტური მართვა, და თერაპიის ნაადრევი დასრულება, და ასევე, საკვები დანამატის სახით მეცხოველეობაში მათი ფართომასშტაბური გამოყენება (Murray et al. 2012). მაგალითად, ამერიკის შეერთებულ შტატებში კვების ინდუსტრიაში გამოყენებული ანტიბიოტიკების 60% ასევე გამოიყენება თერაპიაშიც (Dunachie, Day, and Dolecek 2020). სიტუაციას ართულებს ის ფაქტიც, რომ ერთი მოლეკულის კომერციალიზაციას სჭირდება დაახლოებით, 200 მილიონი აშშ დოლარი (Limmathurotsakul et al. 2019), და ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის განვითარება აფერხებს მათ კლინიკურ გამოყენებას. მეორეს მხრივ, ანტიბიოტიკი შესაძლოა ისეთი ეფექტური იყოს, რომ გამოიყენებოდეს მხოლოდ, როგორც უკანასკნელი თერაპიული საშუალება და არ მოხდეს მისი კომერციალიზაცია ფართო გამოყენებისთვის. მიუხედავად დიდი ძალისხმევისა, ახლადმიღებული ნაერთების უმრავლესობა ან რიბოსომებზე მოქმედებს და ცილების სინთეზს აფერხებს ან უჯრედის კედლის წარმოქმნას ან დნმ გირაზის ინჰიბიციას იწვევს (Rudd et al. 2020). ტრადიციული ანტიბიოტიკური საშუალებების გარდა, არსებობს რამდენიმე ისეთი იმედის მომცემი

აგენტი, როგორცაა ბაქტერიოფაგი, ანტივირულენტური სტრატეგიები, პრობიოტიკები, ვაქცინები, იმუნიტეტის სტიმულაცია, ანტიმიკრობული პეპტიდები, ბიოფილმების საწინააღმდეგო საშუალებები და ანტისხეულები (A.R. Collaborators 2022).

ბაქტერიოფაგებით მკურნალობა (ფაგოთერაპია), რომელიც პირველად დაახლოებით, ასი წლის წინ გამოიყენეს ახალ სიცოცხლეს იძენს და განვითარებული სამყაროს ყურადღების ცენტრში თავიდან ექცევა. ფაგოთერაპიისადმი, გაზრდილი ინტერესი გამოწვეულია ბაქტერიული ინფექციების ეპიდემიური გავრცელებით, რომელთა მიმართ არსებული ანტიბიოტიკები არაეფექტურია მათი მდგრადობის განვითარების გამო. ინტერესის ზრდასთან ერთად უფრო ინტენსიური გახდა ფაგების, როგორც თერაპიული საშუალების კვლევა, მათი ბიოლოგიური, გენეტიკური, იმუნოლოგიური თუ ფარმაკოლოგიური თვისებების შესწავლა. მკურნალობის მეთოდის მაქსიმალური შედეგის მიღწევის მიზნით, ხდება ფაგოთერაპიის ძირითადი ასპექტების ჩამოყალიბება და მათი სტანდარტიზაცია (Pirnay et al. 2018).

ფაგის პრეპარატები სასურველია შეიცავდნენ ლითიური ბუნების ბაქტერიოფაგებს. ვირუსული ნაწილაკები გახსნილი უნდა იყოს ადამიანის ორგანიზმისთვის უვნებელ გამხსნელში (მაგ. ფიზიოლოგიური ხსნარი), რომელიც სრულიად არ შეიცავს ან უსაფრთხო რაოდენობით შეიცავს ბაქტერიული უჯრედის კომპონენტებს და ენდოტოქსინს. თერაპიისთვის შერჩეული პრეპარატი უნდა მოქმედებდეს სამიზნე პათოგენზე და იწვევდეს ორგანიზმში არაპათოგენურ დონემდე მისი კონცენტრაციის შემცირებას. დამატებით, თერაპიული ფაგის მიმართ ბაქტერიული მასპინძელი უჯრედის რეცეპტორის იდენტიფიკაციაც სასურველია რეზისტენტობის განვითარებასთან დაკავშირებული ინფორმაციის მიღების და შესაბამისად, ეფექტური ფაგური კომბინაციების (რამდენიმე ფაგის დანიშვნის) შემუშავების მიზნით (Merabishvili, Pirnay, and De Vos 2018).

ლითიური ფაგით ბაქტერიული უჯრედის ინფიცირების პირველი ეტაპი მასპინძლის ზედაპირზე სპეციფიკურ რეცეპტორზე მისი ადსორბციაა. რეცეპტორები შესაძლოა

წარმოადგენდეს გრამ-დადებითი ან გრამ-უაყოფითი ბაქტერიის უჯრედის კედლის კომპონენტს. ასევე, ფაგი შესაძლოა რეცეპტორად იყენებდეს კაფსულის პოლისაქარიდს, უჯრედის პილის ან შოლტს. კლიტისა და გასაღების პრინციპის მსგავსი კავშირი ფაგსა და ბაქტერიის რეცეპტორს შორის ჩვეულებრივ განაპირობებს ვირუსის მასპინძლის დიაპაზონს. ადსორბციის შემდეგ, ვირუსი ახდენს თავისი გენეტიკური მასალის შეყვანას მასპინძელ უჯრედში. ადამიანის პათოგენებთან ასოცირებული ლითიური ფაგების უმეტესობის გენომი შედგება ორი ან ერთ ჯაჭვიანი დნმ-ისგან (Zhang 2022). დნმ-ის შეყვანის შემდეგ, ვირუსი იყენებს ბაქტერიის მასინთეზირებელ მექანიზმებს საკუთარი გენომისა და ცილოვანი სტრუქტურების გასამრვალებლად და ვირიონების ახალი თაობის წარმოქმნისთვის. რეპლიკაციის პროცესი გრძელდება სანამ არ მოხდება ფაგის სპეციფიკური პროტეინების აქტივაცია, რაც გამოიწვევს უჯრედის ლიზის და შესაბამისად, მასპინძელი ბაქტერიის ეფექტურ კვდომასა და ახალი ვირუსული შთომომავლობის გამონთავისუფლებას მომდევნო სასიცოცხლო ციკლის დასაწყებად.

ლიზისის დრო (ლატენტური პერიოდი) წარმოადგენს დროის ხანგრძლივობას, რომელიც საჭიროა ვირუსის უჯრედშიდა სასიცოცხლო ციკლის შესასრულებლად (Kropinski 2018). სასიცოცხლო ციკლის მიხედვით, არსებობს მეორე ტიპის, ზომიერი იგივე ლიზოგენური ბაქტერიოფაგები, რომელთა თერაპიაში გამოყენებაც არ არის რეკომენდებული. ამას რამდენიმე მიზეზი აქვს. ზომიერი ბუნების ფაგებს აქვთ უნარი მასპინძელი უჯრედის ინფიცირების შემდეგ თავისი გენეტიკური მასალის ინტეგრირება მოახდინოს ბაქტერიულ დნმ-ში რასაც ბაქტერიის ლიზოგენურ კონვერსია ეწოდება. ამ პროცესის დროს არის საშიშროება, რომ ბაქტერიულმა შტამმა შეიძინოს ახალი პათოგენური გენები, რომელსაც ზომიერი ფაგის გენომი შეიცავს. ასეთი ვირულენტური გენები შესაძლოა იყოს ტოქსინის ან ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტობის გენები რაც პათოგენის ვირულენტობას კიდევ უფრო გაზრდის (Monteiro et al. 2019). მიუხედავად იმისა, რომ მიზანშეწონილია ფაგოთერაპიისთვის ლითიური ბუნების ფაგების გამოყენება, ზოგიერთი პათოგენის შემთხვევაში, მხოლოდ ზომიერი ფაგების გამოყოფა ხდება. ასეთია მაგალითად, *Clostridium difficile*, რომლის მიმართ აღმოჩენილია ფაგებიც

მხოლოდ ზომიერია და უალტერნატივობის შემთხვევაში შესაძლოა საჭირო გახდეს მათი თერაპიაში გამოყენება (Fujimoto 2022)

ანალოგიურად, გადაუდებელი შემთხვევების დროსაც გამართლებულია ზომიერი ფაგებით მკურნალობა. ამავდროულად, ეს არ ნიშნავს, რომ ლითიური ფაგების დანიშვნა უპირობოდ მისაღებია. ლითიური ფაგის გენომი შეიძლება შეიცავდეს 50%-ზე მეტ ჰიპოთეტურ გენს, რომელთა ფუნქციაც არაა ცნობილი. ეს გენები შესაძლოა, აკოდირებენ დამხმარე ცილებს, რომლებიც ცვლიან ბაქტერიების ფიზიოლოგიას, თუმცა მათი ზუსტი მოქმედების მექანიზმი ჯერ შესწავლის საგანს წარმოადგენს. აბორტული ინფექციის დროს, როდესაც ხდება ფაგის დნმ-ის შეყვანა უჯრედში და ზოგიერთი გენი ექსპრესირდება, ვირუსული შთამომავლობის წარმოქმნის გარეშე, ბაქტერიულ მასპინძელს შეუძლია იმოქმედოს, როგორც რეზერვუარი უცნობი ფუნქციის უცხო დნმ-ისთვის (Monteiro et al. 2019). ეს ყოველივე გასათვალისწინებელია ფაგების თერაპიისთვის შერჩევის დროს.

## 1.10. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

1966 წლის შემდეგ ბაქტერიოფაგების ტაქსონომიამ დიდი ცვლილება განიცადა, როცა მოხდა მათი პირველი კლასიფიკაციის ჩამოყალიბება.

მიუხედავად იმისა, რომ თავდაპირველად ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ემყარებოდა ისეთ მახასიათებლებს, როგორიცაა გენომის ტიპი (ერთ ან ორ ჯაჭვიანი დნმ ან რნმ), ვირუსული მორფოლოგია და მათი მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედების მოქმედების სპექტრი, ამჟამად, ის მნიშვნელოვნად იცვლება და ძირითადად ემყარება გენომის კლვევით მეთოდებს. ფაგების ტაქსონომიური კლასიფიკაცია ხორციელდება ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომიტეტის მიერ (Taxonomic classification of phage taxa is carried out by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Limmathurotsakul et al. 2019)). აღნიშნულმა კომიტეტმა ჯერ კიდევ 1999 წელს კუდიანი ფაგების სამ ოჯახად 16 გვარად და 30 სახეობად დაჰყო. უკვე 2018 წელს მათი დაჯგუფება მოხდა ხუთ ოჯახად, 26 ქვეოჯახად, 363 გვარად და 1 320 სახეობად .



შესაბამისი გაიდლაინები რომლითაც ხელმძღვანელობს ICTV ისევ განახლდა ფაგების კლასიფიკაციისთვის და მოსალოდნელია, რომ ვირუსული ტაქსონომიის სია კიდევ უფრო გაიზრდება მომდევნო წლებში (Adriaenssens and Brister 2017). ბოლო კლასიფიკაციის მიხედვით, მოკლე კუდიანი და პატარა გენომის (18-27კგ) მქონე ფაგები, რომლებიც ადრე *Podoviridae*-ს ოჯახში შედიოდა ახლა, *Caudoviricetes* ვირუსების კლასს მიეკუთვნება. ამ ოჯახში კი ორჯაჭვიანი დნმ-ის მქონე კუდიანი მორფოლოგიის ფაგები *Caudovirales* რიგში ერთიანდებიან. მიუხედავად იმისა, რომ ვირუსების ეს რიგი ჯერ კიდევ რეკლასიფიკაციას განიცდის ამჟამად, მოიცავს ხუთ ოჯახს:

1. Myoviridae
2. Siphoviridae
3. Podoviridae
4. Ackermannviridae
5. Herelleviridae

*Caudovirales* რიგის წარმომადგენლებში დიდი სხვაობაა კაფსიდის ზომებს შორის და ვარირებს 45-დან 185 ნმ დიამეტრამდე, რაც დიდწილად ვირუსის დნმ-ის ზომაზეა დამოკიდებული (Hua et al. 2017). თუმცა, ამ რიგის ფაგებს მთავარი კაფსიდის პროტეინის ნაკეცი (HK97 fold) მსგავსი აქვთ.

## 1.11 ბაქტერიოფაგების იმუნომოდულაციური თვისება

ბაქტერიოფაგებისა და ადამიანის ორგანიზმს შორის ურთერთქმედება ჯერ კიდევ კარგად შესწავლილი არ არის. ვიცით, რომ ფაგების სამიზნეს მხოლოდ პროკარიოტული, ბაქტერიული უჯრედი წარმოადგენს და ეუკარიოტულ უჯრედზე მათ დესტრუქციული

გავლენა არ აქვთ. თუმცა, ადამიანის სხეულში მოხვედრისას ისინი იწვევენ რიგ ადგილობრივ, თუ სისტემურ იმუნოლოგიურ რეაქციას. პროვოცირებული იმუნური პასუხი განსხვავებულია ფაგის მორფოლოგიის, მათი სამიზნე მასპინძლისა და ტაქსონომიური მახასიათებლების მიხედვით (Van Belleghem et al. 2017). ამრიგად, ჯერ კიდევ არ არის გამოკვეთილი ფაგის ის სტრუქტურები, რომლებიც კონკრეტულ იმუნურ რეაქციაზე არიან პასუხისმგებლები.

ყველაზე კარგად შესწავლილ მექანიზმს, რომლითაც ხდება მიკრობული და ვირუსული სტრუქტურების ამოცნობა, უჯრედების პლაზმურ მემბრანაზე არსებული TLR (Toll-like receptors) რეცეპტორები წარმოადგენს (Kawai and Akira 2011). მათი ფუნქცია პათოგენთან ასოცირებული მოლეკულური თანმიმდევრობების (PAMPs) ამოცნობაა. ასეთ მოლეკულებს წარმოადგენს ფლაგელინი, ლიპოპოლისაქარიდი (LPS) ან დნმ-ის სპეციფიკური ფრაგმენტი. ვირუსული ნუკლეინის მჟავების ამოცნობა TLR9-ით ხდება, რომელიც მათი დნმ-ის დეტექციას ახდენს, ხოლო TLR7 და TLR8 - ერთჯაჭვიანი რნმ-ისა და TLR3 კი - ორჯაჭვიანი რნმ-ისა (Alexopoulos et al. 2010), (Blasius and Beutler 2010), (Shi et al. 2011). აღნიშნული TLR-ები იწვევენ პირველი ტიპის ინტერფერონის სინთეზის სტიმულაციას.

ადამიანის ორგანიზმში შემავალი უხვი მიკრობიომის მნიშვნელოვან ნაწილს ფაგები და ვირუსები იკავებენ. მიკრობიომში შემავალი ვირუსული ორგანიზმები დაბალი ინტენსიურობით და სიმპტომების გამოვლენის გარეშე მუდმივად ახდენენ იმუნური პასუხის სტიმულირებას (Focà et al. 2015), (Foxman and Iwasaki 2011). დუერკოფმა და ჰუფერმა ჩამოაყალიბეს ჰიპოთეზა იმის შესახებ, რომ კომენსალი ვირუსები, შესაძლოა ააქტიურებდნენ თანდაყოლილი იმუნიტეტის ერთ ან რამდენიმე გზას, შესაბამისად, ასტიმულირებდნენ ანტივირუსულ იმუნურ პასუხს და მუდმივ რეჟიმში აინდუცირებდნენ ციტოკინების დაბალი დოზით გამოყოფას. ეს ციტოკინები მოქმედებენ როგორც იმუნურ, ისე არაიმუნურ უჯრედებზე და, შესაძლოა, მუდმივად განაპირობებდნენ ანთებით პროცესს, რითაც პათოგენური ვირუსული ინფექციების

წინააღმდეგ უწყვეტ დაცვას უზრუნველყოფდნენ (Duerkop and Hooper 2013), (Farrar and Schreiber 1993).

ადამიანის ორგანიზმის იმუნურ სისტემასთან ფაგების ურთიერთქმედება ლორწოვან შრეზე მათი მიმაგრებისთავანე იწყება. ორგანიზმის ღრუ ორგანოთა სისტემების (სასუნთქი, მომნელებელი, საშარდე სისტემები) ლორწოვანი გარსი გარეგანი პათოგენების შემოჭრის მნიშვნელოვან იმუნოლოგიურ და ფიზიკურ ბარიერს წარმოადგენს (Linden et al. 2008), (Johansson et al. 2008). ლორწოვანი ზედაპირის ძირითად კომპონენტს გლიკოპროტეინული სტრუქტურა მუცინი წარმოადგენს. მუცინი ხელს უწყობს კომენსალი მიკრობების მიერ ფიზიკური მიმაგრებით ლორწოვანი შრის კოლონიზაციას და ამ ორგანიზმებისთვის საკვები ნივთიერების სახითაც გვევლინება (Schluter and Foster 2012), (Sonnenburg et al. 2005). ნაჩვენებია, რომ ნაწლავის ლორწოვანი ზედაპირი ბაქტერიული პოპულაციის ხშირი და მდგარდი კოლონიზაციისთვის სასურველ გარემოს ქმნის (Martens, Chiang, and Gordon 2008), (Poulsen et al. 1994). ეს ნაწილობრივ, მიკრობების მიერ მუცინის დაშლით არის განპირობებული, მაგრამ ასევე დამოკიდებულია ეპითელიური ქსოვილის მიერ სეკრეტორული ნივთიერებების გამოყოფაზე (Koropatkin, Cameron, and Martens 2012). წარმოქმნილი სეკრეტები მოიცავს სხვადასხვა ანტიმიკრობულ ნივთიერებებს, როგორცაა ალფა-დეფენსინები და RegIIIγ (Salzman et al. 2010), (Vaishnava et al. 2011). როდესაც ლორწოვან გარსში ხდება პათოგენური ბაქტერიების შეღწევა ეს იწვევს ანტიმიკრობული ნივთიერებების გამოყოფას, მუცინის ჰიპერსეკრეციას და მისი გლიკოზილირების ცვლილებას იმ მიზნით, რომ შეფერხდეს მიკრობული მიმაგრება და ინვაზიური პათოგენების თავიდან მოცილება მოხდეს (Gill et al. 2013), (Jentoft 1990), (Schulz et al. 2007).

ლორწოვანი შრე ასევე შეიცავს დიდი რაოდენობით მრავალფეროვან ფაგურ პოპულაციას. კვლევებმა აჩვენეს, რომ როგორც ადამიანში ისე სხვადასხვა ცხოველში (თევზში, თაგვში, ქორალში) ლორწოვან ზედაპირზე არსებული ფაგების რაოდენობა 4,4-ჯერ აღემატება იქვე არსებულ ბაქტერიულ უჯრედებს (Barr et al. 2013), (Nguyen-Kim et al. 2015). ლორწოვანზე ფაგების სიუხვე განპირობებულია მათი უნარით წარმოქმნას სუსტი

ბმა მუცინის გლიკოპროტეინთან თავისი კაფსიდის, იმუნოგლობულინის მსგავსი (Ig-like) პროტეინის დომენით. Ig-ის მსგავსი ცილის ფორმა ერთერთი ყველაზე ხშირი და ფართოდ გავრცელებულია ბუნებაში. ის გვხვდება ანტისხეულებსა და T ლიმფოციტების რეცეპტორებზე, სადაც განაპირობებს ადამიანის შემენილ იმუნურ სისტემაში მნიშვნელოვანი კავშირების წარმოქმნას (Halaby and Mornon 1998). Ig-მსგავსი ცილა ყველა ფაგს არ გააჩნია და სრულად სექვენირებული კაუდავირალესის გვარის (ძველი ტაქსონომიით) ფაგების მხოლოდ მეოთხედშია დადგენილი (Fraser, Maxwell, and Davidson 2007), (Fraser et al. 2006). დიდწილად, ეს დომენები ფაგისთვის არ წარმოადგენენ აუცილებლობას ლაბორატორიულ პირობებში, რის გამოც წარმოიშვა ჰიპოთეზა, რომ ისინი, გარკვეულ გარემო პირობებში ეხმარებიან ფაგს ბაქტერიულ უჯრედთან ადსორბციაში (Fraser et al. 2006; McMahon et al. 2005). ფაგები, რომლებიც Ig-მსგავსს დომენს იყენებენ ლორწოვანზე ეფექტურად მისამაგრებლად, დადებით შერჩევას ექვემდებარებიან, რასაც მივყავართ ლორწოვან შრეზე ბაქტერიოფაგის ადჰეზიის (BAM) მოდელთან. BAM მოდელი წარმოადგენს ე.წ. არა მასპინძლის მიერ განპირობებულ იმუნიტეტს (Barr et al. 2015). შესაბამისად, BAM მოდელი მოიაზრება, პათოგენური ბაქტერიების კოლონიზაციის შემაფერხებელ ერთერთ ფაქტორად.

## 1.12 ორგანიზმის ცირკულაციაში არსებული ფაგების მიმართ თანდაყოლილი იმუნური პასუხი

ფაგები დიდი რაოდენობით გვხვდება ადამიანის სისხლში, პერიფერიულ ცირკულაციაში და ქსოვილებში (Hooper, Littman, and Macpherson 2012), (Linden et al. 2008). ფაგების ფარმაკოკინეტიკის კვლევა მათ აქტუალობასთან ერთად გახშირებულია და ნაწილი თერაპიაში გამოყენებადი ფაგებისა კარგადაა დახასიათებული ამ კუთხით. მიუხედავად მიღების გზებისა (პერორალური, ინჰალაციური, ინტრავენური),

მოცირკულირე ფაგები ექვემდებარებიან ორგანიზმიდან განდევნის (clearance) გარკვეულ პრინციპს. მათი სიცოცხლის ხანგრძლივობა მცირდება რამდენიმე დღის განმავლობაში, ყველაზე დიდი კლება (>99%) კი პირველივე საათში ხდება (Martens, Chiang, and Gordon 2008; Salzman et al. 2010).

ფაგები შეყვანისა და ცირკულაციაში გადასვლის შემდეგ, ლაგდება სხვადასხვა ორგანოებში, მათ შორის ყველაზე მაღალი ტიტრით ღვიძლსა და ელენთაში, რაც მიუთითებს ამ ორგანოების მთავარ როლზე ფაგების განდევნის პროცესში. კვლევების მიხედვით, ელენთისა და ღვიძლის მაკროფაგები (კუფფერის უჯრედები) პასუხისმგებლები არიან ფაგების სწრაფ და ეფექტურ ფაგოციტოზზე (Barr 2017). აქტიური ფაგების რაოდენობა ელენთაში ბევრად ჭარბობს მათ კონცენტრაციას ღვიძლში. შესაბამისად, კუფფერის უჯრედები ზოგადად, გაცილებით ეფექტურად ახდენენ ენდოციტოზს და ROS-ის მაღალი დონის შენარჩუნებას ვიდრე ელენთის მაკროფაგები. ამასთან, ნაკლებად ახდენენ პროანთებითი ციტოკინების ექსპრესიას TLR -თან ლიგაციის შედეგად. შთანთქმული ფაგები კი იშლებიან და ინაქტიურდებიან ამ უჯრედების ფაგოლიზოსომებში (Ivanenkov, Felici, and Menon 1999). ფაგის გამოდევნა ორეტაპიანი პროცესია, როცა მათი დიდი ნაწილის სწრაფი ელიმინაცია ხდება 24 საათში, შემდგომ კი დარჩენილი ~1% მოცირკულირე ვირუსისა მომდევნო რამდენიმე დღის განმავლობაში გამოიდევნება (Reynaud et al. 1992).

ანთებამ და ბაქტერიული უჯრედის ნაწილაკების არსებობამ შესაძლოა ფაგების ფარმაკოკინეტიკაზე იმოქმედოს (Weiss et al. 2009). ცირკულაციასა და ქსოვილებში არსებული ფაგების მიმართ იმუნოლოგიური ტოლერანტობა ადვილად ვითარდება. ასევე, პლაცენტასა და თავზურგტვინის სითხეშიც ფაგების მიმართ არ ვითარდება ძლიერი იმუნური რეაქცია, სადაც ისინი საკმაოდ დიდი რაოდენობით ( $10^4$  უჯრე/მლ) არიან წარმოადგენილები (Nguyen et al. 2017; L. Zhang et al. 2017).

ფაგების თერაპიაში გამოყენებისას, მიუხედავად პრეპარატში ბაქტერიული ნარჩნების არსებობისა მსგავს იმუნურ პროფილს ვხედავთ. ეს აჩენს განცდას, რომ არსებობს მექანიზმი, რომელიც ხელს უწყობს დიდი რაოდენობის ფაგების იმუნურ მიმღებლობას.

ეს შესაძლოა იყოს ფაგის კაფსიდური ცილის თავისებურება, რომელიც ამცირებს იმუნურ ამოცნობას. მეორე მიზეზი, ღვიძლისა და ელენთის მიერ ფაგების კლირენსია, რომელიც შეიძლება დაკავშირებული იყოს იმუნური ტოლერანტობის მექანიზმთან ვინაიდან, ორივე ორგანო წარმოადგენს ტოლეროგენული უჯრედების, მაკროფაგებისა და დენდრიტული უჯრედების რეზერვუარს (Tam and Jacques 2014; Lehti et al. 2017). ნაჩვენებია, რომ ენდოგენურ ფაგებს M2 მაკროფაგების დიფერენციაციის სტიმულაციით ტოლეროგენული იმუნური პასუხის გამოწვევა შეუძლიათ (Barfoot et al. 1989).

### 1.13 ფაგებისა და ბაქტერიების კლირენსი (გამოყოფა)

არსებობს ურთიერთ გამომრიცხავი მონაცემები იმის შესახებ, თუ რა როლს ასრულებენ პათოგენის ამომცნობი რეცეპტორები (PRR) ფაგის ამოცნობაში და ასევე, არსებობს კვლევების ურთიერთსაწინააღმდეგო შედეგები ფაგების როლზე ანთებასა და ბაქტერიულ კლირენსზე.

ფაგის ბაზაზე შექმნილი ვაქცინები, რომელშიც გამოიყენება მოდიფიცირებული T4 ან სხვა ტიპის ბაქტერიოფაგი ძირითადად, პროანთებითი ბუნებისაა (Wenger, Turner, and Petricciani 1978).

ზოგიერთ შემთხვევაში ნაჩვენებია, მსგავსი ფაგების მიერ შერეული T ჰელპერების (Th1 და Th2) პასუხის და პროანთებითი ციტოკინების ინდუქცია (Cervený et al. 2002), რომელიც შესაბამება ძლიერ ანტიბაქტერიულ პასუხს. თუმცა, ამ ვაქცინებში ენდოტოქსინის დონე ხშირად არც ისაზღვრება, ხოლო ზოგიერთ კვლევაში იმუნოგენის სახით იყენებენ ბაქტერიულ ლიზატს და არა ფაგის ვირიონს. (Roach et al. 2017). შესაბამისად, ბაქტერიული უჯრედის კომპონენტები სავარაუდოდ, განაპირობებენ პრეპარატის იმუნოგენობას. გამოწვეული ანთებითი რეაქცია, იმაზე მიუთითებს, რომ სავარაუდოდ,

ფაგი თანდაყოლილ იმუნურ პასუხთან ერთად ბაქტერიული პათოგენის ელიმინაციისას სინერგიულად უნდა მოქმედებდეს (Pincus et al. 2015).

ფლურესცენტული ლიზისის სარეპორტე სისტემის გამოყენებით მოხერხდა ლამბდა პროფაგის მიერ *E.coli*-ის უჯრედის დაშლის დეტექცია ROS შემცველ მაკროფაგის ფაგოსომში (Leung and Weitz 2017). ეს მიანიშნებს, რომ ფაგები მაკროფაგებისთვის ბაქტერიის გასანადგურებლად ალტერნატიულ გზას ქმნიან. კორეელმა მეცნიერებმა ფსევდომონას ფაგების მოქმედება ნეიტროპენიის მქონე და ჯანმრთელ თაგვებში შეისწავლეს. ნეიტროპენიის მქონე თაგვებში *P. aeruginosa* ინფექციაზე ფაგოთერაპია არაეფექტური იყო, მაშინ როდესაც ველური ტიპის თაგვებში თერაპიის ეფექტურობა 100%-ს წარმოადგენდა (Tiwari et al. 2011). *In vitro* ფაგების ნეიტროფილებთან თანაკულტივაციისას დადგინდა ფაგების უკეთესი ბაქტერიციდული მოქმედება, ვიდრე ნეიტროფილების გარეშე მათი დამატების შემთხვევაში. აღნიშნული კვლევა მიანიშნებს ნეიტროფილებისა და ფაგების სავარაუდო სინერგიულ მოქმედებაზე.

ლიმფოციტებთან მიმართებაში ჩატარებულმა კვლევამ კი აჩვენა, მათი უმნიშვნელო როლი ბაქტერიულ კლირენსში (Roach et al. 2017). იგივე კვლევაში ექსპერიმენტულ ჯგუფში როცა ნეიტროპენია ერთვოდა ლიმფოციტების ნაკლებობას, მაშინ ფაგოთერაპია ეფექტურობას კარგავდა. ეს მონაცემები კიდევ ერთხელ, ხაზს უსვამს იმას, რომ ფაგების მიერ ბაქტერიული პოპულაციის შემცირება ორგანიზმში დამოკიდებულია იმუნურ სისტემასთან შეთანხმებულ მოქმედებაზე, კერძოდ კი, ნეიტროფილებსა და TLR-ის მიერ სტიმულირებად გზებზე.

ბევრი სხვა კვლევის მიხედვით, ფაგების მიმართ მინიმალური ანთებითი პასუხი ფიქსირდება (Borysowski et al. 2017; Freyberger et al. 2018; Hong et al. 2016) და არ შეინიშნება მათი გავლენა ფაგოციტოზზე (Jończyk-Matysiak et al. 2015). T4 ფაგების დამატების შემდეგ სუფთა და ენდოტოქსინით გააქტიურებულ მონოციტებზე პროანთებითი ციტოკინების აქტივაცია არ ფიქსირდებოდა (Bocian et al. 2016). ROS- ის წარმოქმნა მონოციტებისა და ნეიტროფილების მიერ გასუფთავებული T4 და A3/R ფაგების დამატების შემდეგ ასევე მინიმალური იყო (Borysowski et al. 2010). ადამიანებში, როგორც ენდოგენური

მოცირკულირე ისე, თერაპიული მიზნით მიღებული ფაგების მიმართ ტოლერანტობა მინიმალური ანთებითი პასუხის გამოწვევით ზოგადად კარგად ვითარდება (Zhvania et al. 2017). ამ შემთხვევაშიც არსებობს რიგი ურთიერთსაწინააღმდეგო კვლევითი შედეგებისა, რომლებიც აჩვენებს ფაგების მიერ ბაქტერიული ფაგოციტოზისა და პროანთებითი ციტოკინების წარმოქმნის დათრგუნვას ბაქტერიული ენდოტოქსინის პირობებში (Secor et al. 2017; Sweere et al. 2019; Rice et al. 2009). აღნიშნული ეფექტი ძირითადად, გამოწვეული იყო პირველი ტიპის IFN-ით დომინირებული ანტივირუსული პასუხით, რომელიც თრგუნავდა და ანტაგონისტური ზეგავლენას ახდენდა ბაქტერიულ კლირენსზე (Sweere et al. 2019). T4 და F8 ფაგები ასევე აინჰიბირებდნენ ფაგოციტოზსა და ROS-ის წარმოქმნას *E.coli*-ისთან ექსპოზიციის დროს (Sweere et al. 2019). 2019 წელს აღმოაჩინეს ფაგის ცილა ANKp, რომელიც *E. coli*-ის უჯრედში შეყვანისას საგრძნობლად ამცირებდა პროანთებითი ციტოკინების წარმოქმნას და მაკროფაგების მიერ ANKp მაექსპრესირებელი *E. coli*-ის ფაგოციტოზს (Jahn et al. 2019). ვან ბელეგემის მიერ მოხდა იმ ტრანსკრიფციული ცვლილებების კვლევა (Van Belleghem et al. 2017), რომლებიც გამოწვეული იყო ადამიანის პერიფერიული მონონუკლეარული უჯრედების სტიმულაციით სხვადასხვა *S. aureus* და *P. aeruginosa* ფაგების მიერ ენდოტოქსინის საპასუხოდ.

საერთო ჯამში, ეს კვლევები მიანიშნებს იმაზე, რომ ზოგიერთი ფაგი პირდაპირი გზით ზემოქმედებს ადგილობრივ იმუნურ პასუხზე, რითაც ცვლის ორგანიზმის მოწყვლადობას ბაქტერიული ინფექციის მიმართ (Jahn et al. 2019). ასევე, კვლევის შედეგები საშუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ფაგების მიერ ადგილობრივი იმუნური პასუხის ცვლილება ემსახურება თავიანთი მასპინძელი ბაქტერიის დაცვას (Van Belleghem et al. 2017).

ზემოთ მოყვანილი, ფაგის იმუნოგენურ თვისებებთან დაკავშირებული ურთიერთ საწინააღმდეგო მონაცემები კვლევის შედეგების განზოგადებას ართულებს.

აღსანიშნავია, რომ ერთი და იგივე ფაგი, განსხვავებული კვლევის კონტექსტში შესაძლოა იყოს, როგორც პროანთებითი (Tao et al. 2019; Miernikiewicz et al. 2013) ისე, ანტიანთებითი (Borysowski et al. 2010; Przerwa et al. 2006; Miedzybrodzki et al. 2008). ამით შეგვიძლია



ვივარაუდოთ, რომ ფაგის პრეპარატის სისუფთავე განსაზღვრავს მის მიერ გამოწვეულ იმუნურ პასუხს (Dufour et al. 2016). ამასთან ერთად, ფაგის იმუნომოდულატორულ ეფექტს ნაწილობრივ, განაპირობებს მისი ბიოლოგიური ბუნებაც. არსებობს მონაცემები, რომლებიც მიუთითებს ფაგების მიერ ბაქტერიული ინფექციის მიმართ იმუნური სტატუსის შესუსტებაზე, მაგრამ ნაკლებადაა ცნობილი მათი ზეგავლენის მექანიზმები ანთებითი პროფილის ცვლილებაზე. ერთის მხრივ, ეს შესაძლოა ხდებოდეს მექანიკურად, თუ ფაგების სიმრავლე ინტერფერონის გამოყოფას უწყობს ხელს, რაც ეწინააღმდეგება ბაქტერიულ იმუნურ პასუხს, მაგრამ აძლიერებს სხვა ტიპის ანთებით რეაქციას. საბოლოო ჯამში, დიდწილად, ფაგისა და თანდაყოლილი იმუნური სისტემის ურთიერთქედების კანონზომიერებები ჯერ კიდევ შესწავლის საგანია.

## 1.14 ფაგები და შეძენილი იმუნური პასუხი

შეძენილი იმუნიტეტი სპეციფიკური პათოგენის მიმართ მიზანმიმართულ იმუნურ დაცვას განაპირობებს. ფაგების უნარი დაასტიმულიროს ანტისხეულების წარმოქმნა და T უჯრედების პასუხი, ფაგური ვაქცინების და ფაგოთერაპიის მოქმედებაში დიდ როლს თამაშობს

### 1.14.1. ჰუმორული იმუნიტეტი

ფაგების მიმართ ხდება გამანეიტრალებელი ანტისხეულების წარმოქმნა, რომელიც ხელს უწყობს მათ ათვისებასა და კლირენსს.

ცხოველური მოდელის მიხედვით, ელენთა ჩართულია ჰუმორულ პასუხში მოცირკულირე ფაგების მიმართ (Sullivan et al. 1978) და ფაგოციტები მთავარ როლს თამაშობენ მათ ათვისებასა და წარდგენაში ანტიგენ-წარმდგენი უჯრედების მიერ (APCs) (Gaubin et al. 2003).

სამიზნე პეპტიდების წარდგენა ხდება მთავარი იმუნოპისტოთავსებადობის კომპლექსის პირველი და მეორე ტიპის (MHC-I და MHC-II) გზების მეშვეობით, რაც იწვევს B და T ლიმფოციტების პასუხს in vitro (Gaubin et al. 2003; Wan et al. 2005) და in vivo პირობებში (Xiong et al. 2012; Lotfi et al. 2019). ანტიფაგური ანტისხეულები ძირითადად იმუნოგლობულინი M-ია, თუმცა, IgG და IgA წარმოქმნაც ხდება (Majewska et al. 2019). 2014 წელს, პოლონელი მეცნიერების კვლევამ აჩვენა, რომ ჰეტეროგენური ფაგოთერაპიის შემთხვევებში ფაგების ადგილობრივი აპლიკაცია გაცილებით დიდი რაოდენობის ანტისხეულების გამომუშევას ასტიმულირებს, ვიდრე მათი ორალური გზით მიღება (Łusiak-Szelachowska et al. 2017). შედარებით დიდ დროს ითვლის phiX174 კოლიფაგის მიმართ ადაპტური იმუნური პასუხის კვლევის ისტორია (Smith, Buckley, and Lugar 2014). ჯანმრთელ პაციენტებში პირველადი ინტრავენური მიღების შემდეგ ფაგი phiX174 3–4 დღის განმავლობაში ცირკულირებს. ამ დროის მანძილზე IgM ანტისხეულების დონე იზრდება და 2 კვირაში პიკს აღწევს, ხოლო 6 კვირის შემდეგ, მეორე შეყვანიდან 1 კვირაში, IgG/IgM დონე კიდევ მატულობს (Bearden et al. 2005).

ფაგის საწინააღმდეგო ანტისხეულები, შესაძლოა მოქმედებდნენ, როგორც ფაგების შემბოჭველები ორგანიზმის მიკრობიომის დასაცავად. ანტიფაგური IgA-ს ზრდა ნაჩვენებია T4 განმეორებითი მიღების დროს, რომელიც ფაგს ბიოაქტიურობას უკარგავს (Majewska et al. 2019).

შესაბამისად, ვარაუდობენ, რომ შექმნილი იმუნიტეტი ხელს უშლის ინტრავენური ფაგოთერაპიის ეფექტურ მოქმედებას. მიუხედავად იმისა, რომ ადამიანებში ანტიფაგური ანტისხეულების გარშემო კვლევები მწირია, ერთერთი კვლევა აჩვენებს, რომ ინდივიდების დიდ ნაწილს უკვე აღენიშნებათ ფაგის გამანეიტრალებელი ანტისხეულები, იმ ფაგების მიმართ, რომლებიც ხშირად გამოიყენება თერაპიის დროს

(Kucharewicz-Krukowska and Slopek 1987). ამ მოვლენის შესაძლო მიზეზი, ქრონიკული ინფექციების დიდი ნაწილის გამომწვევი ოპორტუნისტი პათოგენებია, რომლებიც ორგანიზმის ბუნებრივ ბინადრებს წარმოადგენენ და მათი არსებობა ასევე გულისხმობს სხეულში მათ მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გარკვეული კონცენტრაციის არსებობას (Łusiak-Szelachowska et al. 2014; Krag et al. 2006). მიუხედავად აღნიშნული მდოგმარეობისა, ანტისხეულების არსებობის გავლენა ფაგოთერაპიის ეფექტურობაზე უცნობია. 122 პაციენტზე ჩატარდა მკურნალობა, რომლის დროსაც მათ ამღევდნენ სხვადასხვა ფაგებს განსხვავებული ინფექციებისთვის. მკურნალობისას ცხადი კორელაცია ძლიერი ადაპტური პასუხის მქონდე პაციენტებსა და ფაგებით წარმატებულად მკურნალობას შორის არ აღინიშნებოდა (Łusiak-Szelachowska et al. 2014). სისტემური და მუდმივი დაკვირვება პაციენტებში ანტიფაგური ანტისხეულების გამოყოფის დინამიკაზე, რთულად განსახორციელებელი კვლევაა შესაბამისი კონტროლის ნაკლებობის გამო ხოლო, არსებული მონაცემების ინტერპრეტაცია საკმაოდ კომპლექსური პროცესია. გენმოდულიცირებული ფაგები, რომელსაც შეცვლილი აქვთ კაფსიდური ცილა შესაძლოა, მეტად იმუნოგენურები იყვნენ და უფრო სწრაფი კლირენსი ახასიათებდეთ, ვიდრე მათ არამოდულიცირებულ ვარიანტებს (Dabrowska et al. 2007; Dabrowska et al. 2004; Hodyra-Stefaniak et al. 2019). ასევე, გასათვალისწინებელი მიღების გზა: ინტრავენურად შეყვანისას ფაგები მეტად იმუნოგენურები არიან, ვიდრე მომწელებელი სისტემიდან ათვისებისას (Łusiak-Szelachowska et al. 2014).

როგორც ანტისხეულები, ისე კომპლემენტური სისტემა განაპირობებს ფაგების სისხლიდან ელიმენაციას (Sokoloff et al. 2000). დაბროვსკას კვლევითმა ჯგუფმა აღწერა კომპლიმენტის გადამწყვეტი როლი შრატის ანტისხეულებით ფაგის განეიტრალების პროცესში (Dąbrowska et al. 2014). არსებული ინფორმაცია მიანიშნებს, რომ ანტისხეულებისა და კომპლიმენტების მიმაგრება ხელს უწყობს ოფსონიზაციას და ფაგების სისხლიდან გამოდევნას.

### 1.14.2. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  წარმოადგენს მეორე ტიპის ტრანსმემბრანულ ცილას, რომელსაც აქვს სასიგნალო პოტენციალი, როგორც უჯრედის მემბრანაში ინტეგრირებული პროტეინის, ისე მოძრავი ციტოკინური მოლეკულის სახით, რომელიც პროტეოლიზური დაშლის შემდეგ თავისუფლდება (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001; Hehlhans and Pfeffer 2005). TNF რეცეპტორის ორი ტიპი არსებობს: TNFR1, რომელიც სხეულის ყველა უჯრედზე გვხვდება და TNFR2 ძირითადად, ჰემატოპოიეზურ უჯრედებზე ექსპრესირდება.

TNF რეცეპტორების აქტივაცია იწვევს შიდაუჯრედული ადაპტორი ცილების მობილიზაციას, რაც ააქტიურებს მრავალ სასიგნალო ტრანსდუქციის გზებს (Hehlhans and Pfeffer 2005). უჯრედული კონტექსტიდან გამომდინარე TNFR1 აქტივაციამ შეიძლება ორი განსხვავებული შედეგი მოგვცეს. პირველადი გზა, რომელიც ირთვება, ანთეზასა და უჯრედის გადარჩენაში მონაწილე გენების ინდუქციას განაპირობებს (Varfolomeev and Ashkenazi 2004). TNFR1-ზე ლიგანდის მიმაგრება იწვევს რიგი ანთებითი მედიატორებისა და ზრდის ფაქტორების ინდუქციას AP-1 ტრანსკრიფციული ფაქტორებისა ან IKK კინაზის გააქტიურებით, რომლებიც თავის მხრივ ააქტიურებენ NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B-ს აქტივაცია ასევე მნიშვნელოვნად ახდენს აპოპტოზის უარყოფითი რეგულაციის ინდუქციას, მაგალითად, c-FLIPL, Bcl-2 და სუპეროქსიდ დისმუტაზას აქტივაციას. თუ NF- $\kappa$ B-ის აქტივაცია არ არის სრულფასოვანი (მაგ., თუ უჯრედი მეტაბოლურად დასუსტებულია), მაშინ უჯრედში რეაქტიული ჟანგბადის დაგროვების შედეგად, შენარჩუნებული Jun N-ტერმინალური კინაზისა და მიტოქონდრიული გზების კასკადა 8 -ის მეშვეობით აპოპტოზი ირთვება. რადგან აღნიშნული პროცესი დამოკიდებულია NF- $\kappa$ B -ის არასრულ აქტივაციაზე, აპოპტოზი TNF- $\alpha$ -ზე გვიან რეაქციას წარმოადგენს, განსხვავებით სწრაფი აპოპტოზისა, რომელიც გამოწვეულია TNF ოჯახის სხვა წარმომადგენლების მიერ, როგორცაა Fas-L და TRAIL. აპოპტოზის სიგნალი შეიძლება განვითარდეს ორი განსხვავებული კომპონენტის ფორმირებით. პირველი კომპონენტი დისოცირდება TNFR1-გან და ციტოპლაზმაში ქმნის ახალ კომპლექსს, რომელიც ააქტიურებს კვდომის

მეჩნიზმს (Micheau and Tschopp 2003). ეს ციტოპლზმური კომპლექსი ახდენს აპოპტოზის ინიციაციას იმ შემთხვევაში, თუ არ ხდება მისი სათანადოდ დათრგუნვა ანტიაპოპტოზური მოლეკულებით.

TNFR1I რეცეპტორზე ლიგანდების მიმაგრებით ხდება NF-κB, JNK, p38 MAPK, ERK და PI3K გზების აქტივაცია, მაგრამ ამ რეცეპტორის ბიოლოგიური როლი ჯერ სრულად შესწავლილი არ არის. მრავალ პათოლოგიურ მდგომარეობას მათ შორის, სიმსივნეს ახასიათებს დარღვეული ბალანსი ანტიაპოპტოზურ და აპოპტოზურ სასიგნალო გზებს შორის. ამავე დროს, TNF-α კრიტიკულად მნიშვნელოვანია უჯრედული კავშირებისთვის იმუნური დაცვის, ანთებისა და ანგიოგენეზის (სისხლძარღვების წარმოქმნის) პროცესში. TNF/TNFR მოლეკულების ოჯახის სხვა წარმომადგენლების მსგავსად, TNF-α უჯრედშიდა სასიგნალო გზების მოლეკულაა, რომელიც მონაწილეობს როგორც დროებითი, ისე მუდმივი მრავალუჯრედიანი სტრუქტურების ფორმირებაში (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001). ადაპტური იმუნური პასუხის შემთხვევაში TNF-α და მისი პირველი ტიპის რეცეპტორი განაპირობებენ იმუნური უჯრედების არსებული კონტექსტის მიხედვით მათ კოორდინაციასა და პათოგენის მიმართ მაქსიმალურ პასუხს. თაგვებში, რომლებშიც TNF-α -ის გენი ან მისი p55 რეცეპტორი იყო წაშლილი ( TNF-KO და TNFR1-KO) აღინიშნებოდა მძიმე ფორმის დეფექტები ლიმფური კვანძების ფოლკულებსა და გერმინაციული ცენტრების ფორმირებებში (Pasparakis et al. 1997; Kuprash et al. 2005);

TNFR1 T- უჯრედის აქტივაციის კოსტიმულატორს წარმოადგენს და მათი ექსპრესია გააქტიურებული T უჯრედებზე ხდება. ამ კუთხით, ყველაზე მნიშვნელოვანი TNF-α - ის მთავარი როლი თანდაყოლილი იმუნური სისტემის ანთებითი რეაქციების ინიციაციაშია. ბაქტერიული პათოგენებისგან წარმოქმნილი სიგნალი აინდუცირებს TLR რეცეპტორების და NF-κB სასიგნალო გზის მეშვეობით TNF-α-ს გამოყოფას (Akira and Takeda 2004). TNF-α-ს ადრეული წარმოქმნა თვალსაჩინოა მაღალკომპლექსური ბიოლოგიური კასკადის შემდგომ ინიციაციაში, რომელიც მოიცავს ქემოკინებს, ციტოკინებსა და ენდოთელიალურ კავშირებს (adhesions), რომლებიც დაზიანებისა და ანთების ადგილზე

იზიდავენ და ააქტიურებენ ნეიტროფილებს, მაკროფაგებს და ლიმფოციტებს (Locksley, Killeen, and Lenardo 2001). უკვე წარმოქმნილი TNF- $\alpha$ -ს გამონთავისუფლება მოქმედებს როგორც დადებითი ავტოკრინული უკუკავშირი და ააქტიურებს NF- $\kappa$ B-ს, აინდუცირებს მეტ TNF- $\alpha$  და სხვა ციტოკინებს, როგორცაა GM-CSF და IL-8. TNF- $\alpha$ -ს ლოკალური ინექციაც იგივე სურათს იძლევა. ზემოთ ნახსენები TNF-KO და TNFR1-KO თაგვებში ნანახია დასუსტებული კონტაქტური ჰიპერმგრძობელობა გამაღიზიანებლების მიმართ და გაზრდილია მოწყვლადობა მრავალი მიკრობული პათოგენის მიმართ. კვლევების მიხედვით, ვარაუდობენ, რომ ამ გენის დელეციის მქონე თაგვებში TNFR1-ი გადამწყვეტია ისეთი ინფექციების განვითარებაში, როგორცაა ლისტერია, მიკობაქტერია, ტოქსოპლაზმა, ლეიშმანია, ტრიპანოსომა და სალმონელა (Tsenova et al. 1999; Schlüter et al. 2003) 9]. ასევე მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ეფექტური და კონტროლირებადი ანთებითი პასუხისთვის TNF- $\alpha$ -ს გამოყოფა მოხდეს სწორ ადგილას, სწორ დროს და შესაბამის კონტექსტში. მისი გამოყოფა შეიძლება მოხდეს ბევრი სხვადასხვა უჯრედის ტიპის მიერ და მისი პირველი ტიპის რეცეპტორის ექსპრესიაც უხვად გვხვდება. TNF- $\alpha$ -ს სინთეზის შეფერხება ზოგიერთი უჯრედული ტიპისთვის შეიძლება იყოს ერთერთი მექანიზმი, რომლითაც მისი სასარგებლო ფუნქციების კონტროლი ხდება (S.I. Grivennikov et al. 2005). LPS-ის საპასუხოდ TNF- $\alpha$  გამოიყოფა ძირითადად მონოციტებისა და ნეიტროფილების მიერ და შეუცვლელია ლისტერიის წინააღმდეგ გამკლავების დროს. T-უჯრედების მიერ გამოყოფილი TNF- $\alpha$  მნიშვნელოვანია ორგანიზმში მაღალ ბაქტერიულ კონცენტრაციასთან ბრძოლის დროს; პოხიერი უჯრედების მიერ გამოყოფილი TNF- $\alpha$  კი გადამწყვეტი და ადრეული კომპონენტია ალერგიული პასუხის განვითარებაში (S.I. Grivennikov et al. 2005).

### 1.14.3. TNF- $\alpha$ -ს როლი სიმსივნის განვითარებაში

არსებობს ხუთი მთავარი ასპექტი, რომელიც აკავშირებს სიმსივნესა და ანთებას: მრავალი ქრონიკული ანთებითი დაავადება ზრდის სიმსივნის განვითარების რისკს;

სიმსივნე ვითარდება ქრონიკული ანთების ადგილებში; ქრონიკულ ანთებასთან დაკავშირებული მრავალი ტიპის უჯრედი ასევე, აღწერილია წარმოქმნილი სიმსივნის უბნებში; ანთების ქიმიური მედიატორები აღმოჩენილია მრავალი სიმსივნის დროს; ამ მედიატორების გამოყოფის ინჰიბირება აფერხებს სიმსივნის განვითარებას და გავრცელებას, და ასევე არასტეროიდული ანტიანთებითი მედიკამენტების ხანგრძლივი გამოყენება ზოგიერთი სიმსივნით გამოწვეულ სიკვდილიანობას ამცირებს (Balkwill and Mantovani 2001; Balkwill, Charles, and Mantovani 2005). TNF- $\alpha$  სწორედ ერთერთი მთავარი მედიატორია იმ ქემოკინებს შორის, რომელიც ჩართულია ანთებასთან ასოცირებული სიმსივნეების განვითარებაში. უკვე არსებობს მტკიცებულებათა მნიშვნელოვანი რაოდენობა იმის თაობაზე, რომ TNF- $\alpha$  მონაწილეობს ადამიანის სიმსივნის განვითარებაში იმ გზების გამოყენებით, რომლითაც ხდება NF- $\kappa$ B და AP-1 ტრანსკრიფციული ფაქტორების გააქტიურება. მაღალი დოზებით TNF- $\alpha$ -ს გამონთავისუფლება ადგილობრივად ჰემორაგიულ ნეკროზს იწვევს და ამით სიმსივნის სისხლძარღვების სელექტიურ დაზიანებას განაპირობებს. ასევე TNF- $\alpha$ -ს მაღალი კონცენტრაცია T უჯრედული ანტისიმსივნური იმუნიტეტის სტიმულაციას იწვევს (Lejeune 2002). თუმცა, როცა მისი წარმოქმნა სიმსივნურ მიკროგარემოში ხდება, ის მოქმედებს როგორც სიმსივნის ენდოგენური მასტიმულირებელი ფაქტორი (Balkwill 2002).

#### 1.14.4. უჯრედული იმუნიტეტი

ფაგების მიმართ ვითარდება შექმნილი უჯრედული იმუნიტეტიც. ფაგოციტოზისა და ანტიგენწარმდგენი უჯრედების მიერ მათი დაშლის შემდეგ, ფაგის პეპტიდების წარდგენა ხდება MHC მოლეკულების მეშვეობით და შედეგად, B და T უჯრედების აქტივაცია წარმოადგენს უჯრედულ პასუხს ვირუსული ანტიგენის მიმართ *in vitro* (Gaubin et al. 2003; Wan et al. 2005) და *in vivo* მდგომარეობაში (Basu et al. 2018; Lotfi et al. 2019).

ფაგები ასევე ახდენენ CD4+ Th უჯრედული იმუნიტეტის პრაიმინგს. ნანახია Th1 და Th2 უჯრედული პასუხი ფაგების მიერ T უჯრედული ხაზის სტიმულაციისას *in vitro* პირობებში (Cuesta et al. 2006; Ulivieri et al. 2008) და ფაგის ბაზაზე შექმნილი ვაქცინის გამოყენებისას *in vivo* პირობებში (Ulivieri et al. 2008; Iwagami et al. 2017). phiX174 ფაგის კვლევა აჩვენებს, რომ T ჰელპერი გადამწყვეტ როლს თამაშობს B უჯრედის მიერ პირველადი IgM -ის გამოყოფასა და ანტისხეულების IgG-კენ კლასის გადართვაში (class-switching) (Fogelman et al. 2000).

არსებობს მინიშნებები, რომ ენდოგენური ფაგები ასევე, შესაძლოა მონაწილეობდნენ T უჯრედების მომწიფებასა და სიმსივნის საწინააღმდეგო იმუნიტეტის განვითარებაში. ფლუკიგერის ბოლო კვლევაში (Fluckiger et al. 2020) აღწერილია MHC-I მოლეკულისთვის განკუთვნილი, *Enterococcus hirae*-ის პროფაგში კოდირებული ეპიტოპი, რომელიც ააქტიურებს CD8+ T ლიმფოციტებს მისი მსგავსი, სიმსივნესთან შეჭიდული ანტიგენ TMP-ის მიმართ.

ანტისიმსივნურ (ციკლოფოსფამიდი ან ანტი-PD-1-ის ანტისხეულები) თერაპიასთან ერთად, აღნიშნული პროფაგის შემცველი *E. hirae* -თი კოლონიზებულ თაგვებში, ხდებოდა TMP-სპეციფიკური ციტოტოქსიკური T-ლიმფოციტების პასუხის აღძვრა და შედეგად, სიმსივნის ელიმინაცია. ამას გარდა, ადამიანის თირკმელისა და ფილტვის კიბოს მქონე პაციენტებში, ენტეროკოკული პროფაგის არსებობის და TMP ანტიგენის ექსპრესიის შემთხვევაში შეინიშნებოდა PD-1 ბლოკადური თერაპიის (სიმსივნის საწინააღმდეგო თერაპიის ფორმა) ეფექტურობის თანხვედრა. ამ დამაიმედებელი კვლევის შედეგებით, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ სიმსივნის საწინააღმდეგო იმუნიტეტის გააქტიურებაზე, შესაძლოა დადებითი გავლენა ჰქონდეს ფაგომსა და იმუნომოდულაციური თერაპიის კომბინაციას. ეს შედეგები შესაძლოა ასევე იყოს რელევანტური უჯრედული იმუნიტეტისა და მიკრობიომის სხვა ასპექტებთან მიმართებაში. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ PD-1 ბლოკადასთან დაკავშირებული აუტოიმუნური სისტემის მოდულაციაც მსგავსი მიდგომით შეიძლება მოხდეს.



## 1.15. სამი სისტემის ურთიერთკავშირი: ბაქტერია-ბაქტერიოფაგი-ადამიანი

უამრავი ბოლოდროინდელი კვლევა დაეთმო კომენსალი ბაქტერიების გავლენისა და როლის შესწავლას მათი მასპინძელი ორგანიზმის ჯანმრთელობასა და განვითარებაზე. კერძოდ კი, გამოიკვეთა მიკრობიოტის მნიშვნელოვანი გავლენა მასპინძლის იმუნური სისტემის ჩამოყალიბებაზე და მეტაბოლიზმზე. აქედან, მხოლოდ რამდენიმე კვლევაა, რომელიც ამ დინამიკაში ბაქტერიოფაგების ჩართულობაზეა ფოკუსირებული.

ხაზი უნდა გაესვას იმას, რომ ფაგები მოქმედებენ ადამიანის უჯრედებსა და ქსოვილებზე არა მხოლოდ არაპირდაპირად, მათი სამიზნე ბაქტერიებზე ზეგავლენით, არამედ, ასევე, პირდაპირი გზით ცვლიან იმუნურ პასუხს ბაქტერიების მიმართ და მონაწილეობენ გარკვეული ტიპის ჰომეოსტაზის ჩამოყალიბებაში ამ ორ სისტემას შორის.

მაგალითად, ფაგები შესაძლოა ზღუდავდნენ ბაქტერიულ გამრავლებას და გადაზრდას, რითაც ადგილობრივად ამცირებენ ანთებას. მეორეს მხრივ, მასპინძლის იმუნიტეტის პირდაპირი და არაპირდაპირი მოდულაციით ფაგებმა შესაძლოა გამოიწვიონ იმუნური ტოლერანტობა კომენსალი ბაქტერიების მიმართ. შესაბამისად, ამ დისბალანსის დარღვევა, იქნება ეს ეგზოგენური ფაგები, ანტიბიოტიკები თუ სხვა, განაპირობებს მიკრობულ დისბიოზსა და იმუნური ჰომეოსტაზის დარღვევას. ეს თავის მხრივ, შესაძლოა გახდეს იმუნური და მეტაბოლური პრობლემების გამომწვევი.

ეს საკითხი ჯერ ისევ კვლევის პროცესშია და დაგროვებული მონაცემები არაა საკმარისი ზოგადი დებულებების ჩამოსაყალიბებლად. გარდა ამისა, აღნიშნული თემატიკის კვლევის დიზაინი საკმაოდ რთული შესამუშავებელი და შესასრულებელია იმისთვის, რომ *in vivo* პირობების და ადამიანის ორგანიზმის გათვალისწინებით მოხდეს, მათი შედეგების ექსტრაპოლაცია (Popescu et al. 2021).

## 1.16 *Bacteroides fragilis*-ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები

პირველი ცნობები ბაქტერიოდესის ჯგუფის წარმომადგენელი სახეობების მიმართ აქტიური ფაგების გამოყოფის შესახებ თარიღდება 1969 - 1979 წლით (Booth et al. 1979). ზოგადად, ბაქტერიოფაგების პირველი გამოყოფისა და მათი გამოყენების ეპოქის დასაწყისიდან რამდენიმე ათეული წლით გვიან (Chanishvili 2016). ფაგები ჩამდინარე წყლებიდან და კლინიკური ნიმუშებიდან გამოიყვეს, რომელთა უმეტესობა ლითიური ბუნების იყო (Booth et al. 1979). მათი გამოყოფის ერთ-ერთ მთავარ მიზანს, ბაქტერიოდესის სახეობების ერთმანეთისგან გარჩევა წარმოადგენდა, რაც ფაგების მაღალი სპეციფიკურობის შედეგად იყო შესაძლებელი. ამ გვარის წარმომადგენლების ბიოქიმიური იდენტიფიკაცია იმ დროს, რთულად ხდებოდა და მათი ერთმანეთისგან განსხვავება პრობლემას წარმოადგენდა (Booth et al. 1979). გარდა ამისა, იმავე პერიოდში, მკვლევარებმა აჩვენეს, რომ ფაგოტიპირების (ფაგების მგრძობნელობის მიხედვით ბაქტერიის სახეობის დადგენა) საშუალებით, შესაძლებელია ინფექციის მკურნალობისას წარმოქმნილი ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული მუტანტების თავდაპიველი შტამისგან განსხვავება.

მოგვიანებით ჩატარებული კვლევების მიხედვით აღმოჩნდა, რომ *B.fragilis* ფაგების დეტექცია სხვადასხვა დანიშნულების წყლებში, შესაძლოა გამოიყენებოდეს ამ წყლების ადამიანური ფეკალური კონტამინაციის დასადგენად (Jofre et al. 2014).

*Escherichia coli*-ის, *Pseudomonas aeruginosa*-ს ან *Enterococcus* -ის წარმომადგენლების მიმართ აქტიური ფაგებისგან განსხვავებით, *B.fragilis* ფაგების გარემოდან თუ კლინიკური ნიმუშებიდან გამოყოფა არ არის მარტივი. *B.fragilis* მის მიერ გამოწვეული დაავადებები იმდენად ხშირი არ არის, როგორც ნოზოკომიალური ან საზოგადოებრივი ინფექციები, და ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა და ეპიდემიური სახის გავრცელება აქამდე საგანგაშო არ იყო. შესაბამისად, მათთან ბრძოლის საკითხი ალტერნატიული საშუალებით (მაგ. ფაგებით) დღემდე, ფართოდ არ დამდგარა. ეს უნდა იყოს სავარაუდო

მიზეზი, იმისა, თუ რატომ არ ხდებოდა ბოლო დრომდე ბაქტერიოდესის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების, როგორც თერაპიული საშუალების ინტენსიური გამოყოფა და კვლევა.

თუმცა, ბოლო პერიოდში, გახშირებულმა ცნობებმა *B.fragilis*-ის რეზისტენტული ინფექციური ფორმების შესახებ (Ghotaslou et al. 2018) და ასევე, ენტეროტოქსიგენური შტამების მტარებლობის კოლორექტალურ კარცინომასთან კორელაციის დადგენამ წარმოშვა იმის საჭიროება, რომ დაწყებულიყო ამ სახეობაზე მოქმედი ფაგების შესწავლა მათი თერაპიულად გამოყენების მიზნით.

აქამდე გამოყოფილი და წყლის დაბინძურების დეტექციისთვის გამოყენებული *B.fragilis*-ის ფაგები კარგადაა დახასიათებული, როგორც ბიოლოგიურად, ისე გენეტიკურად. თუმცა, მათი კლინიკური დანიშნულებით გამოყენების შემთხვევები არ არის აღწერილი.

ჩემი სადოქტორო ნაშრომის მიზანი სწორედ, *B.fragilis*-ის კლინიკური იზოლატების მიმართ მოქმედი ფაგების გამოყოფასა და მათ ბიოლოგიურ და გენეტიკურ დახასიათებას წარმოადგენდა.

სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ფაგების თერაპიული პოტენციალის შესწავლა სწორი ნაწლავის ეპითელური უჯრედული კულტურის გამოყენებით განხორციელდა.

## თავი 2 : მეთოდოლოგია

### 2.1 კლინიკური მასალიდან *B.fragilis* -ს იზოლატების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია

#### 2.1.1. კლინიკური ნიმუშებიდან *B.fragilis* გამოყოფა სელექტიური ნიადაგის გამოყენებით

*B.fragilis* იზოლატების გამოსაყოფად 2-დან 70 წლამდე ასაკის ინდივიდების განავლის მასალის ერთი გრამის ათჯერადი განზავებების შედეგად მიღებული ათასჯერადი (-3) და ასი ათასჯერადი (-5) განზავებები გაითესა ბაქტეროიდესის სასელექციო ნიადაგზე (ბაქტეროიდესის ნალველ-ესკულინის მყავრი ნიადაგი, 10%-იანი ხარის ნალველის მარილების შემცველობით) (Wexler 2007). ბაქტერიის გასაზრდელად საჭირო ანაერობული გარემო შეიქმნა ერთჯერადი ანაერობული პაკეტების ინოკულირებულ ბაქტერიულ კულტურასთან ერთად ჰერმეტიკული იზოლაციის კონტეინერში მოთავსებით (BD). ინკუბაცია მოხდა 24-72 საათის განმავლობაში, 37° C, 10% CO<sub>2</sub> ატმოსფეროზე.

## 2.1.2. *B.fragilis* -ის გამოყოფილი იზოლატების მორფოლოგიური იდენტიფიკაცია

სელექციურ ნიადაგზე გაზრდილი შავი ფერის 1-3 მმ დიამეტრის კოლონიები გრამის წესის მიხედვით შევლბეთ მათი გრამ-უარყოფითობისა და ბაცილარული ფორმის შესამოწმებლად.

## 2.1.3. *B.fragilis* - შტამების იდენტიფიკაცია: ბიოქიმიური მეთოდები

### 2.1.3.1 კატალაზური ტესტი:

სელექციურ ნიადაგზე გაზრდილი შავი ფერის 1-3 მმ დიამეტრის კოლონიები ინოკულირდა BHI ბულიონში და 37° C -ზე ანაერობულად 24 -48 სთ. ინკუბაციის შემდეგ გაითესა BHI მყარ ნიადაგზე და კოლონიების გასაზრდელად მსგავს პირობებში მოხდა ინკუბაცია. მიღებული გამჭვირვალე ფერის ორი - სამი კოლონია ფიზიოლოგიური ხსნარის ერთ წვეთში ცალცალკე დავიტანეთ სასაგნე მინაზე და დავამატეთ 3% წყალბადის ზეჟანგი ბაქტერიული კატალაზური მოქმედების (ბუმტუკების წარმოქმნის) შესამოწმებლად (Wexler 2007).

### 2.1.3.2 ინდოლის ტესტი:

ინდოლის ტესტის მეშვეობით ხდება ფერმენტ ტრიფტოფანაზას დეტექცია, რომელიც ენტერობაქტერიების უმეტესობას გააჩნია. აღნიშნული ცდის დროს ხდება ტრიფტოფანის ინდოლად გარდაქმნა. *B.fragilis* ტრიფტოფანაზა არ გააჩნია და უარყოფით პასუხს იძლევა. ინდოლის ტესტი საშუალებას გვაძლავს *B.fragilis* -ის გარჩევას სხვა ნაწლავური გრამ-უარყოფითი ბაცილებისგან. ინდოლის ტესტის დროს სტერილურ სინჯარაში თავსდება 4 მლ ტრიფტოფანის შემცველი ბულიონი, რომელსაც ემატება ახლად გაზრდილი ბაქტერიული კულტურა 30-50 მკლ, ან მყარ ნიადაგზე გაზრდილი ერთი კოლონია. ინოკულატის ინკუბაცია ხდება 24-48 სთ, 37° C -სა და 10% CO<sub>2</sub> ატმოსფეროზე (მკაცრი

ანაერობების შემთხვევაში). ინკუბაციის შემდეგ, ემატება 0.5 მლ კოვაკის რეაქტივი (ამილის ალკოჰოლში გახსნილი ჰიდროქლორის მჟავა და p-დიმეთილამინობენზალდეჰიდი). დამატებიდან რამდენიმე წუთი ვაკვირდებით წითლად შეფერილი წრის წარმოქმნას, რაც დადებით პასუხს წარმოადგენს (Citron et al. 1990).

#### 2.1.3.3 მატრიქსთან-ასოცირებული ლაზერული დისორბციულ/მაიონიზირებელი ფრენის სიჩქარის მასსპექტრომეტრია (MALDI TOF):

MALDI TOF წარმოადგენს მაღალი გამტარუნარიანობის მქონე ტექნოლოგიას. MALDI TOF -ის მექანიზმი ეფუძნება მიკრობული უჯრედის ცილების „თითის ანაბეჭდის“ შედარებას მასში ინტეგრირებულ, უკვე ცნობილ მონაცემთა ბაზის სპექტრთან. ამისთვის, კომერციულად ხელმისაწვდომი სხვადასხვა ალგორითმები გამოიყენება. ბოლო რამდენიმე წლის განმავლობაში ეს ინსტრუმენტი უკეთ იქნა შესწავლილი და გამოყენებული მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციასა და ტიპირებაში. MALDI-TOF MS მოიხსენიება, როგორც "რბილი" იონიზაციის ტექნიკა, რადგან ის მინიმალურად ან საერთოდ არ იწვევს ფრაგმენტაციას და საშუალებას აძლევს ანალიტების მოლეკულური იონების იდენტიფიცირებას ბიოპოლიმერების რთულ ნარევეებშიც კი (Tsuchida, Umemura, and Nakayama 2020). BHI მყარ ნიადაგზე თითოეული ბაქტერიული იზოლატის ახლად გაზრდილი კოლონიის ნაცხი წვრილი, სტერილური კბილის ჩხირის წვერით დაიტანება 5-10 მკლ გამხსნელში (ციანო-4-ჰიდროქსისინამიკური მჟავა (CHCA) (5 მგ/მლ) 50:48:2 აცეტონიტრილში (ACN): წყალი: ტრიფლუროაცეტატის (TFA) მატრიქსის ხსნარი) უჟანგავი მეტალის მასალის ფირფიტაზე. დატანილი ნაცხის ჰაერზე გაშრობის შემდეგ ფირფიტა წამკითხველ აპარატში თავსდება (Alcalá et al. 2021).

## 2.2 *B.fragilis* - ენტეროტოქსიგენური იზოლატების იდენტიფიკაცია: ციტოტოქსიკურობის კვლევა და პოლიმერაზულ-ჯაჭვური რეაქცია

### 2.2.1 ციტოტოქსიკურობის კვლევა:

*B.fragilis*-ის იზოლატების ენტეროტოქსინის შემცველობაზე კვლევა ციტოტოქსიკურობის ტესტის გამოყენებით განხორციელდა. 18 საცდელი ბაქტერიული იზოლატი გავზარდეთ 24-36 საათის განმავლობაში ანაერობულად, 37 °C ტემპერატურაზე BHI ბულიონში (ჰემინისა და ვიტამინ K -ის დანამატით). მიღებული ნაზარდი დაცენტრიფუგირდა 6 000 გ-ზე და გაიფილტრა 0.45 მკმ დიამეტრის ფორების მქონე ფილტრით.

ექვსფოსოიან პლანშეტებზე მსხვილი ნაწლავის კარცინომის უჯრედული ხაზის HCT 116 (Human cell carcinoma) კულტივაცია RPMI საკვებ არეში მოხდა. RPMI შეიცავდა 10% ინაქტივირებული ხბოს შრატსა და პნეიცილინ/ სტრეპტომიცინს 0.5/1 მლ-ს (100მლ ზრდის არეზე). უჯრედების ზრდა მიმდინარეობდა 90%-ზე მეტი კონფლუენტობის მიღწევამდე. გაზრდილი უჯრედები გაირეცხა ორჯერ 1 მლ PBS ბუფერით და დაემატა ახლად მომზადებული, იგივე შემცველობის 3 მლ RPMI უჯრედული ნიადაგი. ამასთან ერთად, ნიადაგში დაემატა თითო ფოსოში 300 მკლ ცალკეული ბაქტერიული იზოლატის ზემოთ აღნიშნული ფილტრატი. უჯრედების ინკუბაცია მოხდა 2-4 სთ-ის განმავლობაში, 37 °C-ზე, 5% CO<sub>2</sub> -ის პირობებში. ინკუბაციის შემდეგ, განხორციელდა ციტოპათიური პროცესის დეტექციისთვის უჯრედებზე მიკროსკოპით დაკვირვება (Pantosti et al. 1994).

## 2.2.2 ტოქსიგენურობის გენის დეტექცია პჯრ მეთოდით

ბაქტერიული ოზლატების იდენტიფიკაციის შემდეგ მათი ენტეროტოქსიგენურობა ხარისხობრივი პჯრ მეთოდის გამოყენებით შევისწვლეთ. კვლევის სამიზნეს წარმოადგენს *bft* ენტეროტოქსინის მაკოდირებელი გენი. ტესტისთვის *B. fragilis* -ის 30 ოზოლატი შეირჩა. აქედან 22 გამოყოფილი იყო კლინიკური (განავლის) ნიმუშებიდან, ხოლო რვა შტამი გენტის უნივერსიტეტის ბაქტერიოლოგიური ლაბორატორიის შტამების კოლექციიდან უსასყიდლოდ გადმოგვეცა. ტუტე ლიზისური მეთოდის გამოყენებით მოხდა ბაქტერიული დნმის გამოყოფა. ახლად გაზრდილი ბაქტერიული კოლონიის ნახევარი განზავდა 20 მკლ ტუტე ლიზისურ ბუფერში (0.25% SDS, 0.05 N NaOH) და 15 წთ-ის განმავლობაში 95 °C ზე მოხდა სუსპენზიის ინკუბაცია. შემდეგ, აღნიშნული სუსპენზიის ცენტრიფუგირება მოხდა 6 000 x *g* 5 წმ და 180 მკლ ულტრადისტილირებული წყალი დაემატა სინჯარაში. ნიმუშები ისევ დავცენტრიფუგირეთ 5 წთ იგივე სიჩქარეზე ზედმეტი ნაწილაკების მოსაშორებლად. მიღებული სუპერნატანტის შენახვა მოხდა მინიმუმ 30 წთ-ის განმავლობაში -20 °C -ზე კვლევის შემდგომი ეტაპების განხორციელებამდე. პჯრ რეაქციის მეთოდით *bft* გენის ყველა სუბტიპის იდენტიფიკაციისთვის შეირჩა შემდეგი პრაიმერები: F:(5'-3') GGATACATCAGCTGGGTTGTAG და R:(5'-3') GCGAACTCGGTTTATGCAGTGCGAAC (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), რომლის შედეგად მიიღება 296 ფწ პჯრ პროდუქტი. მასტერმიქსი დამზადდა FastStart™ მაღალი სიზუსტის პჯრ სისტემით (Roche, Basel, Switzerland), მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით (Odamaki et al. 2012). პჯრ ციკლური პირობები იყო: 15 წუთი 95 °C -ზე ინკუბაცია, 35 დენატურაციის ციკლი 95 °C 30 წმ-ს განმავლობაში, 30 წმ ანილინგი 55 °C და 30 წმ გახანგრძლივების ფაზა 72 °C-ზე, საბოლოო 2 წუთი გახანგრძლივების ფაზით 72 °C-ზე. მიღებული ამპლიკონები დატანილ იქნა ეთიდიუმ ბრომიდიან TAE (ტრისის ტუტე, აცეტატი და EDTA) ბუფერში ჩაყალიბებულ 1,5% აგაროზის გელის ფოსოებში და გაეშვა 1სთ 150v გარბენით 1000 კვ კიბის თანაობით (Aitchison, Frizelle, and Keenan 2016).



## 2.3 *B.fragilis* იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის შესწავლა

ჩვენთვის საინტერესო იყო *B.fragilis* მიერ გამოწვეული ინფექციების დროს გამოყენებული ანტიბიოტიკების მიმართ ჩვენს მიერ გამოყოფილი იზოლატების მგრძობელობის შესწავლა. კირბი-ბაუერის მეთოდი (დისკ დიფუზიის მეთოდი) იქნა გამოყენებული ბაქტერიული იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობის გამოსავლენად (Cobo et al. 2020). ექსპერიმენტისთვის შეირჩა შემდეგი ანტიბიოტიკები:

1. მეტრონიდაზოლი ( MTZ ) 5 მკგ
2. კლინდამიცინი ( CD ) 2მკგ
3. იმიპენემი ( IMI ) 10 მკგ
4. ცეფოქსიტინი ( FOX ) 30 მკგ
5. ცეფოტეტანი (CTT) 30მკგ
6. მეროპემენი ( MRP )10 მკგ
7. ქლორამფენიკოლი ( C ) 30მკგ
8. ლევოფლოქსაცინი (LEV) 5მკგ
9. ამპიცილინი/სულბაქტამი ( AMS ) 20მკგ
10. პიპერაცილინი ( PRL ) 30 მკგ

აღნიშნული მეთოდისთვის პეტრის ფინჯანზე მოთავსებული მიულერ-ჰილტონის აგარზე (Mueller-Hinton agar) ნაცხის ასაღები ზამბის ჩხირის გამოყენებით 24 საათიანი ბულიონის ნაზარდიდან ხდება თითოეული ბაქტერიული ჰომოგენური იზოლატის ინოკულაცია. სველი ინოკულატის 10-15 წუთში, ოთახის ტემპერატურაზე, სტერილურ პირობებში შემრობის შემდეგ, დავიტანთ ჩვენთვის საინტერესო, განსაზღვრული კონცენტრაციის ანტიბიოტიკებით გაჟღენთილი ქალაღდის დისკებს. ექსპერიმენტული მასალის ინკუბაცია ხდება 24 სთ განმავლობაში 37 °C ანაერობულ პირობებში. ინკუბაციის დროს, ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობიარე ბაქტერიების ზრდა ფერხდება დისკების გარშემო დიფუნდირებული ანტიბიოტიკების გამო და წარმოიქმნა ე.წ. “ინჰიბიციური

ზონები”. ამ ზონების დიამეტრი იზომება და მიღებული შედეგების ინტერპრეტაცია კლინიკური და ლაბორატორიული სტანდარტების ინსტიტუტის (CLSI) კრიტერიუმების გამოყენებით ხდება. ამ კრიტერიუმების მიხედვით ბაქტერიული იზოლატი კლასიფიცირება როგორც, რეზისტენტული (R), შუალედური (I) და მგრძობიარე (S) .

## 2.4 ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით

### 2.4.1 *B.fragilis* ბაქტერიოფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით

*B.fragilis*, ეტბუ და არა-ეტბუ იდენტიფიცირებული შტამები გამოყენებულ იქნა როგორც სამიზნე შტამები ფაგების გარემოდან გამოსაყოფად. ამისთვის შეგროვდა მტკვრის, კუს ტბის, ლისის ტბის, დიღმის და ვარკეთილის ჩამდინარე წყლები. ასევე, გამოყენებულ იქნა ის კლინიკური განავლოვანი ნიმუშები, რომლებიდანაც მოხდა ბაქტერიული იზოლატების გამოყოფა.

გარემოდან ფაგების იზოლაცია ე.წ. გამდიდრების მეთოდით ხდება. წყლის ნიმუშის 9 მლ-ს ემატება 1 მლ ათჯერადი კონცენტრაციის BHI (1%იანი ჰემინითა და ვიტამინი K-ით გამდიდრებული) და 3 მლ სამიზნე ბაქტერიული იზოლატი. ნარევის ინკუბაცია ხდება ანაერობულად 24-72 საათი, 37°C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ, ნარევი ცენტრიფუგირდება 6000 გ-ზე და მიღებულ სუპერნატანტი იფილტრებს 0,22 მკმ დიამეტრის ფორის მქონე ფილტრის გამოყენებით. ფილტრატი ინახება შემდგომი გამოყენებისთვის მაცივარში, +4 °C -ზე (García-Aljaro, Muniesa, and Jofre 2018).

### 2.4.2 შტრიხის მეთოდის გამოყენება სამიზნე ბაქტერიულ იზოლატზე ბაქტერიოფაგის მოქმედების დეტექციისთვის

ფილტრატში სამიზნე ბაქტერიის მიმართ აქტიური ფაგის ვირიონების არსებობის აღმოსაჩენად ბულიონში ახლად გაზრდილი კულტურის ათი მიკროლიტრი განაწილდა

შტრიხის სახით მყარ ნიადაგზე და გამრობის შემდეგ დავაწვეთეთ 10 მკლ ფილტრატი. ფინჯნების ინკუბაცია მოხდა 24-72 სთ ანაერობულად, 37 °C-ზე. ინკუბაციის შემდეგ, ბაქტერიული კულტურის გათესვის ადგილზე ფაგის მოქმედება ფასდება ლიზისური უბნების გაჩენით (Mirzaei and Nilsson 2015).

### 2.4.3 ბაქტერიოფაგის სუფთა კლონის მიღება - ნეგატიური კოლონიების გაწმენდის მეთოდი

ბაქტერიოფაგის სუფთა გენეტიკური კლონის მისაღებად საჭიროა ფაგისა და ბაქტერიის მყარ ნიადაგზე ორმაგი შრის მეთოდით გათესვის შედეგად მიღებული უარყოფითი კოლონიების გაწმენდის სამიდან ხუთ ციკლამდე ჩატარება. ამ მეთოდს ბაქტერიოფაგების კლონირებასაც უწოდებენ (Azeredo at al., 2018). კლონირების დროს სავარაუდო ფაგის შემცველი ფილტრატის ბულიონში (BHI) მომზადებული სერიული განზავებებიდან (10<sup>-1</sup> დან 10<sup>-5</sup> -მდე) 1 მლ გადავიტანეთ სტერილურ სინჯარაში, სადაც დაემატა 10<sup>8</sup> კწე/მლ ტიტრის მქონე 0.1 მლ ბაქტერიული კულტურა, რომელზეც გამოვლინდა ფაგის აქტივობა. მიღებული ნარევი დაყოვნდა 5-10 წთ ფაგების ბაქტერიულ უჯრედებზე მაქსიმალური ადსორბციისთვის. შემდეგ დაემატა დაახლოებით გაღობილი დაახლოვებით 45°C-50°C-მდე გაციებული 3 მლ 0,6 %- იანი, ე.წ. ნახევრად თხევადი აგარი (BHI) და სწრაფი, წამიერი ვორტექსირების შემდეგ, ნაზავი გადავიტანეთ 1,8% აგარიან BHI ნიადაგზე. ფინჯნები გამრობის შემდეგ (≈15-20წთ) მოვათავსეთ თერმოსტატში 37°C- ზე, ანაერობულ პირობებში 24-48 სთ. ინკუბაციის შემდეგ მიღებული ნეგატიური კოლონიებიდან მოხდა ერთი, ცალკეული კოლონიის შერჩევა, რომელიც ამოვჭერთ პასტერის პიპეტის წვერით ან ავტომატური პიპეტის სტერილური წვერით, შევიტანეთ 1მლ თხევად საკვებ არეში და დავაყოვნეთ 30 წთ - 2 სთ ის განმავლობაში 37°C- ზე. ინკუბაციის შემდეგ ფაგური კოლონიის შემცველი ნარევი გავფილტრეთ 0,45 მკმ ფორის ზომის ფილტრში. მიღებული ფილტრატი ისევ სერიულად გავაზავეთ და ანალოგიური მეთოდით წარვმართეთ კლონირების მომდევნო ციკლები სანამ არ მივიღეთ ერთნაირი მორფოლოგიის, ზომისა

და გამჭვირვალობის მქონე ფაგური კოლონიები, რაც მიანიშნებს იმაზე, რომ ფაგების ნარევიდან გამოვყავით ერთი ფაგური კლონი და მინიმუმამდე შევამცირეთ კონცენტრატში ჰეტეროგენული ფაგების არსებობა. აღსანიშნავია, რომ ზოგიერთ ფაგს კოლონიის პოლიმორფიზმი ახასიათებს და ერთი მორფოლოგიის მქონე კოლონიების მიღება შეუძლებელი ხდება.

#### 2.4.4 ბაქტერიოფაგების ე.წ. მასპინძელი შტამის შერჩევა

სუფთა კლონის მიღების შემდეგ, თერაპიული თუ ექსპერიმენტალური გამოყენებისთვის საჭიროა ფაგის გამრავლება. გამრავლებისთვის უნდა შევარჩიოთ ე.წ. პატრონი ბაქტერიული შტამი. ამისთვის, შტრიხების მეთოდით გამოვლენილი ფაგის მიმართ მგრძობიარე შტამებზე ხდება ორმაგი შრის მეთოდით საკვლევი ფაგის ტიტრის განსაზღვრა. ხდება იმ შტამის შერჩევა, რომელზეც ფაგი ყველაზე მაღალ ტიტრს იძლევა. შერჩეული შტამი არ უნდა იყოს ლიზოგენური (მისი გენომი არ უნდა შეიცავდეს ზომიერ ფაგს) და სასურველია არ შეიცავდეს ანტიბიოტიკორეზისტენტობისა და ტოქსინების მაკოდირებელ გენებს. ზემოთაღნიშნული თვისებების გამოსარიცხათ, რეკომენდებულია შერჩეული პატრონი შტამის გენომის სრული სექვენირება.

#### 2.4.5 “ფისკას” მეთოდით ბაქტერიული იზოლატის ლიზოგენობის შეასწავლა.

პროფაგების გამოვლენა საკვლევ ბაქტერიულ იზოლატში არამოლეკულური მეთოდით ხდება სწორედ “ფისკას” მეთოდის გამოყენებით (Roy T. Fisk, 1942) და გულისხმობს ე.წ. დაძველებული შტამის ფილტრატის „დაწვეთებას“ საცდელ ან ინდიკატორ შტამზე, რომლის შედეგადაც პროფაგების არსებობის შემთხვევაში შესაძლოა მოხდეს სპონტანური ინდუქციით მიღებული ფაგების გამოვლენა. საკვლევ ბაქტერიულ

კულტურას ზრდიან თხევად საკვებ არეში, 37°C -ზე 24-48 სთ ანაერობულად. ინკუბაციის შემდეგ ახდენენ ე.წ. ბულიონური კულტურის დამველებას, 4 ° C -ზე 10 – 14 დღის მანძილზე დაყოვნებით. დამველებული კულტურების სუპერნატანტი იფილტრება 0,45 მკმ ზომის მემბრანულ ფილტრებში. ფილტრატს აწვეთებენ 1,8% აგარიან პეტრის ფინჯნებზე დატანილი ინდიკატორული შტამების ე.წ. შტრიხებზე, სკრინინგის შტრიხის მეთოდის - „spot test“-ის პრინციპით. წვეთების გაშრობის შემდეგ ფინჯნების ინკუბაცია ხდება 37 °C -ზე, ანაერობულად, 24-36 სთ - ის მანძილზე. პროფაგის გამოვლენის შემთხვევაში საკვლევი შტამის შტრიხულ ნაზარდზე ვლინდება ლიზისური ზონები. ლიზისური აქტივობის არარსებობის შემთხვევაში ვარაუდობენ, რომ საკვლევ შტამს არ გააჩნია ლიზოგენური ბუნება და არ შეიცავს პროფაგებს.

#### 2.4.6 ბაქტერიოფაგების გამრავლება და დაგროვება ორმაგი შრის მეთოდის გამოყენებით

კლონირებული, გასუფთავებული ბაქტერიოფაგის ბიოლოგიური თუ გენეტიკური მახასიათებლების შესწავლისთვის საჭიროა მისი გამრავლება. ფაგის გამრავლებისა და მისი კონცენტრატის დასამზადებლად გამოვიყენეთ ორშრიანი აგარის მეთოდი.

ორშრიანი აგარის მეთოდი, იგივე გრაციას მეთოდით (GRATIA, 1936) ხდება ფაგის ნაწილაკების რაოდენობის ანუ ტიტრის განსაზღვრა 1 მლ საკვლევ ლიზატში. ამისთვის, საკვლევი ფაგის ლიზატი ზავდება 10 ჯერადად ( $10^{-1}$ დან  $10^{-10}$ მდე), თითოეული განზავებიდან ფაგის 1 მლ გადააქვთ სტერილურ სინჯარაში, სადაც მას ემატება  $10^8$  კწე/მლ ტიტრის მქონე სატეტსო ბაქტერიული კულტურის 0.1 მლ გამლღვალი და 45°C -მდე გამთბარი 3-5 მლ 0,6 %-იანი, ე.წ. ნახევრადმყარი BHI ნიადაგი. სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნაზავი დაიტანება 1,8 % აგარიან პეტრის ფინჯანზე. ფინჯნების გაშრობის შემდეგ ( $\approx 30$ წთ) ისინი თავსდება თერმოსტატში 37°C- ზე, შედეგების ანალიზი 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ხდება. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება აქტიური ფაგური ნაწილაკების ანუ ნეგატიური კოლონიების წარმომქმნელი ერთეულების

რაოდენობით მოცემულ განზავებაში. მისი გამოთვლა 1 მლ საკვლევ ლიზატში ხდება შემდეგი ფორმულის მეშვეობით:

ნეგატიური კოლონიების რიცხვი X 10 X განზავების მაჩვენებელი = ნკწე/მლ (ნეგატიური კოლონიის წარმომქმნელი ერთეული/მლ)

ფაგის გამრავლებისა და კონცენტრატის მისაღებად უნდა შეირჩეს ფაგის ის განზავება, რომელიც ორშრიანი აგარის მეთოდით ე.წ. „ბადეს“ იძლევა, და ნეგატიური კოლონიების ერთმანეთზე გარდამავალ ქსელს ქმნის. ორშრიანი აგარის ზედა შრეზე, სადაც ხდება „ბადის“ ფორმირება დაიტანება 1 მლ სტერილური ბულიონი, ინკუბირდება 1 სთ მაცივარში 0-4 °C-ზე და შემდეგ ფითხის დახმარებით ხდება ბულიონიანი ზედა შრის აშრეება და საცენტრიფუგო სინჯარაში გადატანა. ცენტრიფუგირება ხდება 6 000 გ 30 წთ განმავლობაში. შემდგომ, სუპერნატანტი იფილტრება 0.22µm მემბრანული ფილტრის გამოყენებით. ფილტრატის ტიტრი განისაზღვრება ისევ გრაციას მეთოდით და სასურველი ტიტრის მიღების შემთხვევაში ინახება მაცივარში 0-4°C-ზე შემდგომ გამოყენებამდე (Adams 1958 ), (Azeredo et al., 2018).

#### 2.4.7 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია

ელექტრონული მიკროსკოპირების მეთოდი ბაქტერიოფაგის ვირიონის მორფოლოგიის შესასწავლად და კლასიფიკაციისთვის ტარდება. საკვლევ ფაგების კლონირების შემდეგ მისი  $1 \times 10^{9-10}$  ნკწე/მლ კონცენტრატის 5მკლ დაიტანება პიოლოფორმით დაფარულ ბადეზე, ირეცხება ბიდისტილირებული წყლით, ემატება 1%-იანი ურანილის აცეტატის 2 წვეთი და შრება ჰაერზე. მომზადებული სინჯების დათვალიერება განხორციელდა ელექტრონული მიკროსკოპით JEOL JEM 1400 TEM ში 80kV-ზე (M. R. Clokie & Kropinski, 2009).

#### 2.4.8 ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრისა, დათესვის ეფექტურობისა და სპეციფიკურობის განსაზღვრა

ბაქტერიოფაგის მოქმედების სპექტრი გულისხმობს კონკრეტული სახეობის ბაქტერიული შტამების რაოდენობას რომლებზეც კონკრეტულ ფაგს აქვს ლითიური მოქმედება. ფაგის ბიოლოგიური თვისებების შესწავლისას, მისი მოქმედების სპექტრი განისაზღვრება ლაბორატორიის ფარგლებში არსებული ბაქტერიული შტამების ე.წ. ტესტ-კულტურების წინასწარ შერჩეული ნაკრების გამოყენებით (Azeredo et al., 2018). ფაგის აქტივობისა და მოქმედების სპექტრის შესწავლისათვის გამოყენებულ იქნა შტრიხების მეთოდი (§ 2.4.2). აღნიშნული კვლევისთვის გამოვიყენეთ 18 *B.fragilis*-ის იზოლატი, ექვსი *B.vulgatus*, ორი *B.thetaiotaomicron* და 4 *Parabacteroides* -ის სახეობები (Mirzaei and Nilsson 2015). შტრიხის მეთოდით გამოვლენილი მგრძობიარე შტამები გამოვიყენეთ ფაგების დათესვის ეფექტურობის შესასწავლად. ბაქტერიოფაგის დათესვის ეფექტურობით ისაზღვრება საკვლევი ფაგის ტიტრი და გამრავლების უნარი არა მასპინძელ შტამებზე. ფაგი ორმაგი შრის მეთოდით (§ 2.4.6. ) იტიტრება სამიზნე ბაქტერიულ იზოლატზე. მიღებული შედეგი იყოფა მასპინძელ იზოლატზე ფაგის არსებულ ტიტრზე (Bakuradze et al. 2018) .

#### 2.4.9 ბაქტერიოფაგის სასიცოცხლო ციკლისა და ზრდის მახასიათებლების შესწავლა

ბაქტერიოფაგის ზრდის ძირითადი მახასიათებლები მისი უჯრედზე ადსორბციის დრო, ლატენტური პერიოდი, ეკლიფსის პერიოდი, გამოსავლიანობის ოდენობა (უჯრედშიდა გამრავლების შედეგად წარმოქმნილი ფაგების ნაწილაკების რიცხვი) და ერთჯერადი გამრავლების ციკლის პერიოდი.

პატრონი ბაქტერიის უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარე ფაგისა და ბაქტერიის კონცენტრაციის პროპორციულია და იგი დამოკიდებულია ტემპერატურაზე, საკვები არის სიბლანტეზე და ბაქტერიების ტიტრსა და სიცოცხლისუნარიანობაზე. მნიშვნელოვანია ფაგის კონცენტრაცია. მიღებულია, რომ ინფექციის მრავლობითობა (MOI) ერთზე ნაკლები უნდა იყოს, რათა თითოეულ ფაგურ ნაწილაკს მიეცეს საშუალება დააინფიციროს პატრონი უჯრედები. ეს უზრუნველყოფს „უჯრედში შეღწევის გარეშე ლიზის“ (“lysis from without”) ფენომენის თავიდან აცილებას (Hyman and Abedon 2009). ბაქტერიოფაგის პატრონი უჯრედზე ადსორბციის პროცესის შესასწავლად ვადგენთ არაადსორბირებული ფაგებისა და/ან ინფიცირებული ბაქტერიული უჯრედების რაოდენობას. არაადსორბირებული ფაგების რაოდენობის განსაზღვრისათვის ბაქტერიულ სუსპენზიასა და საკვლევი ფაგს ინფექციის მრავლობითობა შეადგენდეს 10:1. აღნიშნული სუსპენზია თავსდება 37 °C-ზე, წყლის აბაზანაში და დროის სხვადასხვა ინტერვალში - 0წთ, 5წთ, 10წთ, 15წთ, და 20 წთ - ხდება სინჯების აღება (0.1მლ) და გადატანა 9.9 მლ ბულიონისა 0.04 მლ ქლოროფორმის ნარევიში, სინჯარას შენჯღრევის შემდეგ 10 წთ ყოვნილება ყინულის აბაზანაში. შემდეგ ხდება თითოეული სინჯის 100-ჯერადი და 1000-ჯერადი განზავება და პეტრის ფინჯნებზე გადატანა გრაციას ორშრიანი მეთოდის გამოყენებით. პარალელურად მზადდება კონტროლი, იდგმება როგორც ფაგის, ისე ბაქტერიის კონტროლები. ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში 37 °C-ზე, შედეგების აღრიცხვა და ანალიზი ხდება 18-24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ. ერთი ფაგის ერთ ბაქტერიულ უჯრედზე ადსორბცია გამოითვლება შემდეგი განტოლებით:

$$k = 2.3/Bt \times \log P_0/P \quad 64$$

სადაც k ადსორბციის სიჩქარის კონსტანტაა (მლ/წთ), B - ბაქტერიების კონცენტრაცია, t - დრო, რომლის განმავლობაშიც ფაგის საწყისი ტიტრი P<sub>0</sub> მცირდება ფაგის საბოლოო P ტიტრამდე.

ბაქტერიოფაგის ადსორბციის დადგენის შემდეგ შესაძლებელია ლატენტური პერიოდისა და გამოსავლიანობის განსაზღვრა ერთჯერადი გამრავლების ციკლის მრუდის აგებით. შემდგომი ცდის მიმდინარეობა შემდეგნაირია: თხევად საკვებ არეში ასჯერადად



განზავებული ე.წ. 18 სთ-იანი კულტურა თავსდება 37 °C-ზე წყლის აბაზანაში, ბაქტერიის ზრდის ექსპონენციალურ ფაზის ( $3-5 \times 10^8$  კწე/მლ) მიღწევამდე. შემდეგ ხდება საკვლევი ფაგის დამატება ( $1 \times 10^7$  ნკწე/მლ ) იმ რაოდენობით, რომ ინფექციის მრავლობითობა შეადგენდეს 0,1. ნარევი კვლავ თავსდება 37 °C-ზე წყლის აბაზანაში, შემდეგ მზადდება ე.წ. „განზავებული კულტურა“, საწყისი ნარევიდან 0.1 მლ გადაიტანება 9.9 მლ თხევად საკვებ არეში, ხოლო ამ ნარევიდან ისევ 0.1 მლ გადაიტანება 2,5 მლ თხევად საკვებ არეში ე.წ. ბულიონში. „განზავებული კულტურა“ იდგმება წყლის აბაზანაში და იწყება სინჯების აღება დროის 10 წუთიანი ინტერვალებით, 2 საათის განმავლობაში. ფაგის ტიტრის განსაზღვრა ხორციელდება გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით, რისთვისაც თითოეული სინჯი ზავდება 1:4, 1:10, 1:100 და 1:1000. 37 °C-ზე 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ხდება შედეგების აღრიცხვა და მრუდის აგება. ნეგატიური კოლონიების რაოდენობის მიხედვით დგინდება ლატენტური პერიოდი და ფაგის გამოსავლიანობა (Kropinski 2018). გამოიყენება შემდეგი ფორმულა: ერთჯერადი გამრავლების მრუდის ზედა პლატოს საშუალო მაჩვენებელს გამოკლებული ლატენტური პერიოდის მაჩვენებლების საშუალო.

#### 2.4.10 ფაგების მდგრადობის შესწავლა ტემპერატურისა და მჟავიანობის განსხვავებულ პირობებში.

სხვადასხვა გარემო პირობების (ტემპერატურისა და pH) მიმართ ფაგის მდგრადობის შესწავლა მოხდა სამივე ფაგის შემთხვევაში. კონკრეტული პირობები შეირჩა მათი თერაპიაში გამოყენების შესაძლებლობის პრინციპით.

ტემპერატურის შემთხვევაში შვიდი მაჩვენებელი იქნა გამოყენებული : 4 °C, 25 °C, 36°C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, და 80 °C , რომელზეც მოხდა  $10^8$  ტიტრის ფაგების ინკუბაცია და 2, 4 და 6 სთ-ზე და მათი ტიტრის ცვლილების დუპლიკატებად გაზომვა ორშრიანი აგარი მეთოდის გამოყენებით. მჟავიანობის შემთხვევაში, ფაგები ტიტრით  $10^8$  დაყოვნდა 3, 5, 7,

9 და 11 pH-ზე. ფაგური ნაწილაკების კონცენტრაციის ცვლილება, ორმაგი შრის მეთოდით გამოვლინდა 2, 4 და 6 სთ-ში (Tariq et al. 2020).

## 2.5 ფაგების გენომის შესწავლა

### 2.5.1 ბაქტერიოფაგის დნმ-ის გამოყოფა

ცენტრიფუგირებით კონცენტრირებული, ფაგები ტიტრით  $3 \times 10^{10}$  კწე/მლ საჭიროა ვირუსული დნმ-ის გამოსაყოფად. ფაგების დნმ-ის ექსტრაქციისთვის გამოყენებულ იქნა ფენოლ/ქლოროფორმით დეპროტეინიზაციის მეთოდი (Sambrook and Russell 2001).

ფაგის სუსპენზია  $37^{\circ}\text{C}$ -ზე 1 სთ განმავლობაში მუშავდება DNase და RNase ფერმენტებით (საბოლოო კონცენტრაცია 10-10 მკგ/მლ). შემდეგ ემატება საწყისი მოცულობის 1/10 ლიზისური ბუფერი (1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8.0) და ინკუბაცია ხდება ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში.

სინჯების სრული დეპროტეინიზაციისათვის ტარდება სამი თანმიმდევრული ექსტრაქცია თანაბარი მოცულობის ქიმიური რეაგენტით: 1) ფენოლი (pH 8.0); 2) ფენოლი/ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტის ნარევი (25/24/1 თანაფარდობით) და 3) ქლოროფორმი/იზოამილის სპირტი (24/1 თანაფარდობით). ექსტრაქციის სამივე ეტაპის შემდეგ, სინჯები ცენტრიფუგირდება 10 წუთის განმავლობაში 10.000 გ რეჟიმში და გროვდება დნმ-ის შემცველი ნალექზედა ფრაქცია. ექსტრაქციის ბოლო საფეხურის სუპერნატანტს ემატება მოცულობის 1/50 ოდენობის 5 M NaCl-ის ხსნარი, 2 მოცულობა ეთილის სპირტი (96 %) და თავსდება  $-20^{\circ}\text{C}$ -ზე დნმ-ის მაქსიმალური პრეციპიტაციისათვის, რის შემდეგაც კვლავ ცენტრიფუგირდება (10 წუთი, 10.000 გ). გამოლექილ დნმ-ს ემატება 1 მლ 70 %-იან ეთანოლი, ცენტრიფუგირდება იგივე რეჟიმში, ოთახის ტემპერატურაზე გაშრობის შემდეგ ხდება სუსპენდირება TE ბუფერში (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0). პრეპარატები ინახება

4°C ტემპერატურაზე. პრეპარატებში დნმ-ის კონცენტრაციის შეფასებისათვის გამოყენებულია გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი და ფლუორომეტრის (Qubit 2.0) მონაცემები.

ფაგების VA7 და UZM3-ის დნმ-ის გამოსაყოფად გამოყენებული იყო the UltraClean™ Microbial დნმ-ის საიზოლაციო ნაკრები (MO BIO Laboratories Inc., Solana Beach, CA, USA) და MagCore® Viral Nucleic Acid Kit.

## 2.5.2 ბაქტერიოფაგის გენომის სრული სექვენირება

ფაგების დნმ-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის სრული ანალიზი განხორციელდა Illumina MiSeq™ პლატფორმის გამოყენებით.

## 2.5.3 გენომის ანოტაცია

სექვენირების შედეგად მიღებული გენომის ჯაჭვის თანმიმდევრობები დამუშავდა შემდეგი პროგრამებით: რიდების ტრიმინგისთვის - Trimmomatic, აწყობისთვის - SPAdes და MEGA X. აწყობილი გენომი დალაგდა BLASTn ის ბაზაში არსებულ *B.fragilis*-ის ყველაზე ახლოს მდგომი ფაგების გენომის მიხედვით ViPTree ანალიზის შედეგად. ფაგების ტაქსონომიის დასადგენად VIRIDIC იქნა გამოყენებული, რომელიც ითვლის ვირუსის ინტერგენომურ დისტანციას. შემდეგ, VA7 გენომის ანოტაცია მოხდა RASTtk-პროგრამის გამოყენებით და ხელით შემოწმდა BLASTp-ის მეშვეობით. ტრნმ-ების იდენტიფიკაცია tRNAscan-SE v2.0. -ით განხორციელდა. გენომების ვიზუალიზაცია კი მოხდა EasyFig და Geneious პროგრამაში (Tariq et al. 2020). სამივე ბაქტერიოფაგის გენომი აიტვირთა Genbank-ოს მონაცემთა ბაზაში, როგორც GEC\_vB\_Bfr\_VA7 (VA7), GEC\_vB\_Bfr\_MTK (MTK), GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 (UZM3).

#### 2.5.4. მასპინძელი ბაქტერიული შტამი A7 -ის სრული გენომის სექვენირება.

გამოყოფილი ფაგების გენომის მათი მასპინძელი ბაქტერიული შტამის დნმ-თან შედარების მიზნით კომერციული ლიზისური ბუფერში მოხდა ექსპონენციალურ ფაზაში გაზრდილი ბაქტერიული კულტურის გახსნა და სექვენირებისა და ანოტაციისთვის ბირმინგჰემში, კერძო კომპანია „MicrobesNG“-ში გაიგზავნა.

### 2.6 ფაგების მოქმედების განსაზღვრა ეტბფ-ით დასნებოვნებულ უჯრედულ კულტურაზე

HCT 116 უჯრედული კულტურის ინფექციური მოდელი ETBF-ის მიმართ მოქმედი ფაგების *in vitro* შესწავლისთვის უჯრედული კულტურის გამოყენებით შეირჩა ადამიანის მსხვილი ნაწლავის კარცინომის უჯრედული კულტურის ხაზი (HCT 116). კვლევისთვის მოხდა ხან მირზას ჯგუფის მიერ შემუშავებული მეთოდის ადაპტირება (Khan Mirzaei et al). უჯრედები ითესება 6-ფოსოიან ფინჯნებში 10% FCS/DMEM უანტიბიოტიკო ზრდის ნიადაგის გამოყენებით. >95% კონფლუენტობის მიღწევის შემდეგ უჯრედები ირეცხება 2-3 ჯერ PBS ბუფერით და ემატება 3 მლ შერჩეული ეტბფ (E3) შტამის კულტურა, რომელიც თავის მხრივ, მზადდება ახლად გაზრდილი ბულიონიდან ზემოთნახსენებული უჯრედული ზრდის არეში ბაქტერიის  $10^8$  კწე/მლ ტიტრამდე განზავებით. სუფთა კონტროლი (blank control) მოიცავს 3 მლ სტერილურ 10% FCS/DMEM ნიადაგს ბაქტერიული კულტურის გარეშე.

ბაქტერიული უჯრედების მიმაგრებისთვის უჯრედული კულტურის ინოკულუმთან ერთად დაყოვნება ხდება 3 საათით  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  ატმოსფეროზე. ინკუბაციის შემდეგ, უჯრედები ირეცხება ორჯერ 1 მლ PBS ბუფერით, მოტივტივე (მიუმაგრებელი) ბაქტერიული უჯრედების მოსაცილებლად. შემდეგ, 3 მლ 10% FCS/DMEM-ის ნიადაგში განზავებული ფაგური ლიზატი (საბოლოო ტიტრი  $10^7$  უკწე/მლ) ემატება უჯრედულ კულტურას (სურ. 1). იგივე პირობებში 3 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ხდება

ჩამორეცხილი არის გამოცალკეება და შენახვა  $-80^{\circ}\text{C}$ -ზე მოგვიანებით ციტოკინების (IL-8) კონცენტრაციის გასაზომად. ფაგების ბაქტერიციდული მოქმედების შესაფასებლად ხდება უჯრედული კულტურის ჩამოხსნა ფოსოების ფსკერიდან 1 მლ 0.1% -იანი Tween 20-ის გამოყენებით, რომელიც ემატება უჯრედებს და იდგმევა 5 წთ ინკუბაციაზე  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . ინკუბაციის შემდეგ ფოსოებში შეტივტივებული უჯრედები ზავდება ათჯერადად BHI ბულიონში და 100 მკლ დაიტანება BHI მყარ ნიადაგზე ბაქტერიული კონცენტრაციის გამოსათვლელად.

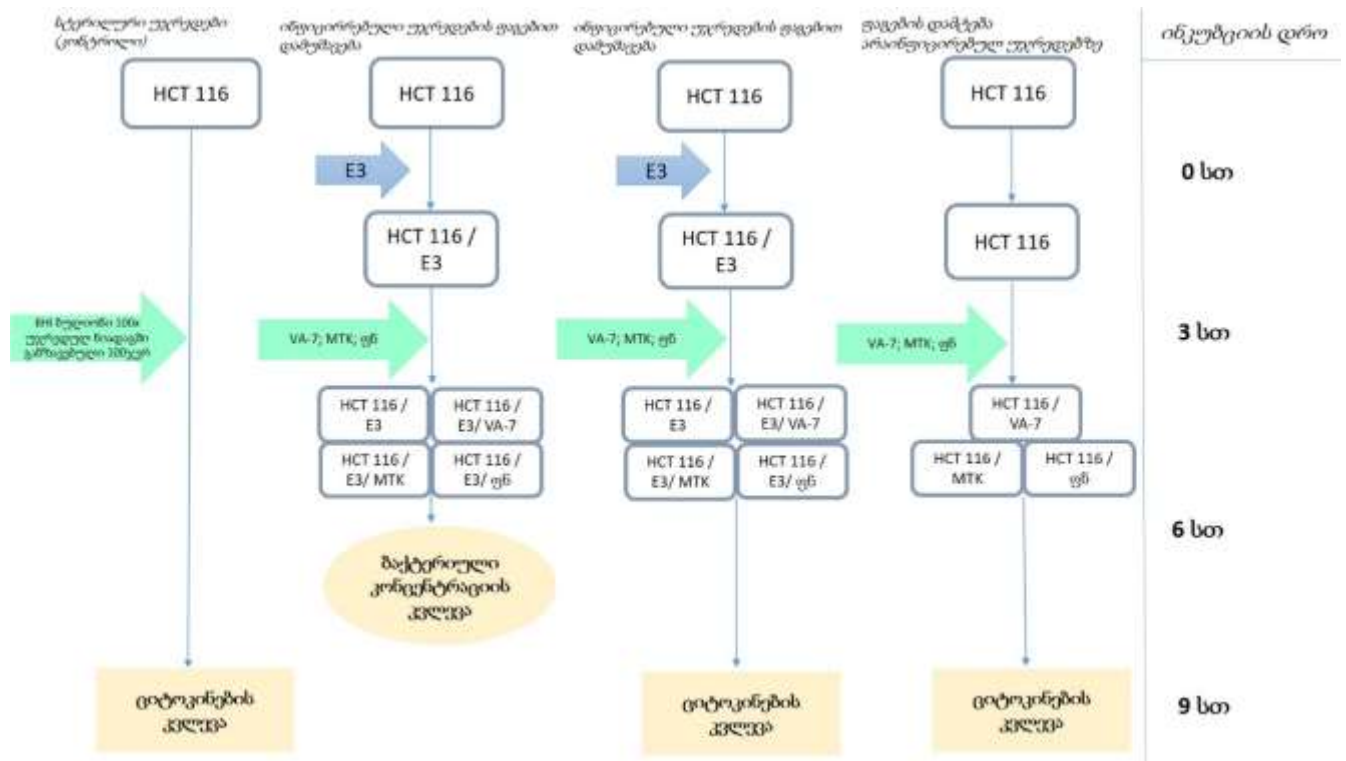
## 2.7 IL-8 -სა და TNF-a -ს დეტექცია უჯრედული კულტურის ზრდის ნიადაგში

ექსპერიმენტის შედეგად შეგროვებული უჯრედულ ნიადაგში IL-8 ის გაზომვა მოხდა სენდვიჩისებრი ELISA ნაკრების გამოყენებით მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით. (Abcam, Cambridge, UK). ნაკრებში შემავალი ყველა რეაქტივი უნდა ოთახის ტემპერატურას გაუთანაბრდეს ( $18 - 25^{\circ}\text{C}$ ) მათ გამოყენებამდე. საჭირო სტანდარტები და კონტროლები იდგმევა დუბლიკატებად. სტანდარტის 100 მკლ და უჯრედული კულტურის საკვლევი სუპერნატანტები ნაწლდება 96 ფოსოიანი პლანშეტის ფოსოებში. თავზე მჭიდროდ ეფარება წებოვანი აპკი და ხდება პლანშეტის ინკუბაცია 2.5 საათით ოთახის ტემპერატურაზე ან  $4^{\circ}\text{C}$  -ზე მთელი ღამით დაბლი სიჩქარის სანჯღრეველაზე. ამის შემდეგ, ფოსოებიდან იღვრება საკვები არე ნიმუშები და სტანდარტი და ფოსოები ირეცხება ოთხჯერ სარეცხი ბუფერით (300 მკლ). მნიშვნელოვანია ყოველი გარეცხვის შემდეგ სითხე საფუძვლიანად იქნეს ამოღებული ფოსოებიდან. რეცხვის ბოლო საფეხურის შემდეგ, პლანშეტი ამობრუნებულ მდგომარეობაში კარგად იფერთხება სუფთა ხელსახოცზე.

ფოსოებში ემატება 100 მკლ ბიოტინილებული IL-8-ს სადეტექციო ანტისხეულები, ხდება პლანშეტის ინკუბაცია ერთი საათით ოთახის ტემპერატურაზე, ნელი სიჩქარით

შენჯღრევით. შემდეგ, ფოსოებში არსებული სითხე იღვრება და ფოსოები კვლავ იგივე მეთოდით ირეცხება. ფოსოებში ემატება 100 მკლ HRP-სტრეპტავიდინის ხსნარი და ყოვანდობა ოთახის ტემპერატურაზე 45 წუთის განმავლობაში ნელი შენჯღრევით.

ხსნარი ამჯერადაც იღვრება და მეორდება რეცხვის საფეხური. ფოსოებს ემატება 100 მკლ TMB ერთსაფეხურანი სუბსტრატის რეაქტივი და ინკუბირდება 30 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე სიბნელეში და ნელი შენჯღრევით. ბოლოს, ყველა ფოსოში ემატება 50 მკლ დამასრულებელი ხსნარი (Stop Solution). შედეგების წაკითხვა უნდა მოხდეს რეაქციის დასრულებისთანავე 450 ნმ-ზე.



სურათი 1. ინფექციური უჯრედული ექსპერიმენტის სქემა: E3- ენტეროტოქსიგენური შტამი; ფნ - ფაგების ნარევი

## 2.8 სტატისტიკური ანალიზი

კურსკალ-ვალისის ტესტი გამოვიყენეთ ბაქტერიული უჯრედების კონცენტრაციის სხვაობის დასაადგენად, ხოლო ერთგზის ანოვა და პოსტ-ჰოკისა და ლევენის ტესტით IL-8-ისა და TNF- $\alpha$  გამოყოფის სტატისტიკურად სარწმუნო სხვაობების დადგენისთვის. გრაფიკებში მოცემული ცდომილების ხაზები მონაცემთა საშუალოს 95%-იან ნდობის ინტერვალს ასახვს. სტატისტიკური სხვაობა მნიშვნელოვანი იყო როცა  $p < 0.05$ .

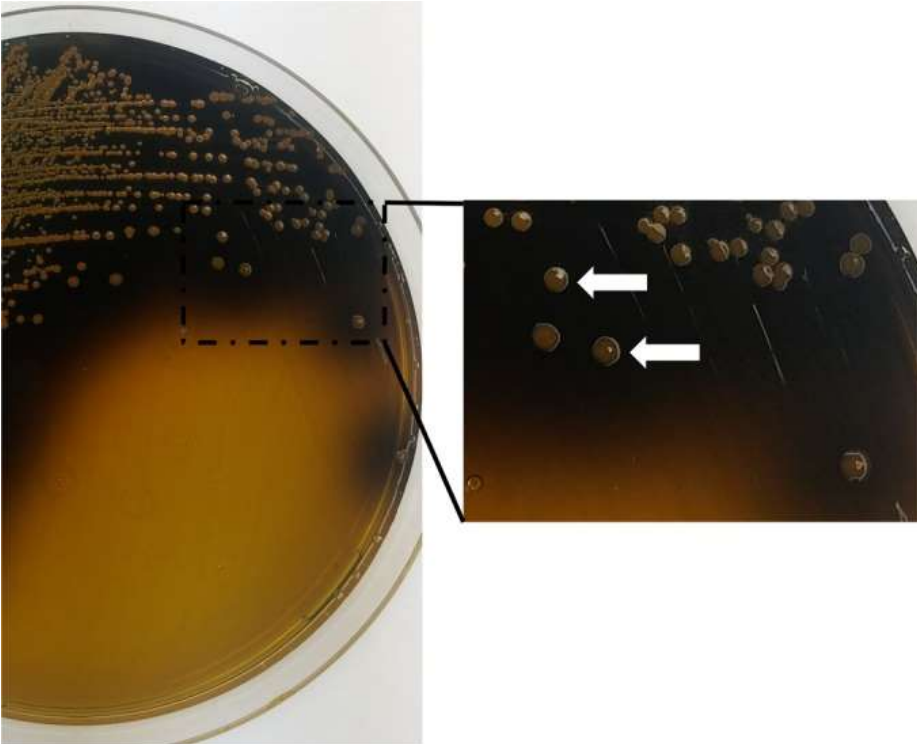
## თავი 3: მიღებული შედეგები

სადოქტორო კვლევის შედეგად მოხდა *B.fragilis* მიმართ აქტიური სამი ბაქტერიოფაგის გარემოდან გამოყოფა. ფაგების ბიოლოგიური და გენეტიკური მახასიათებლების შესწავლა შესაბამისი მიკრობიოლოგიური და მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით განხორციელდა. მათი თერაპიული პოტენციალის კვლევა იმ ვიტრო პირობებში, ადამიანის უჯრედული კულტურის გამოყენებით განხორციელდა.

### 3.1. *B.fragilis*-ის სახეობების იზოლატების გამოყოფა/შეგროვება

კლინიკური ნიმუშების სელექტიური ნიადაგზე გათესვის შედეგად მივიღეთ 1-2მმ ზომის მოშავო-მონაცრისფრო კოლონიები (სურ. 2). კოლონიების ნაცხის გრამის წესით შეღებვის შედეგად მიღებული გრამ-უარყოფითი ჩხირებისა და კოკობაცილების მქონე იზოლატების შემდგომი დახასიათება მოხდა ბიოქიმიური ანალიზით. ბიოქიმიური ტესტებით იდენტიფიკაციისას შევარჩიეთ კატალაზა-უარყოფითი და ინდოლ-ვარიანტური იზოლატები. 27 სავარაუდო *B.fragilis* იზოლატის შერჩევის შემდეგ მათი მასსპექტრომეტრიით (MALDI-TOF) ზუსტი სახეობრივი იდენტიფიკაციის მიხედვით,

მათგან 18 აღმოჩნდა *B.fragilis* -ის წარმომადგენელი, 6 *B. vulgatus* და 3 *Parabacteroides distasonis* სახეობების კულტურები.



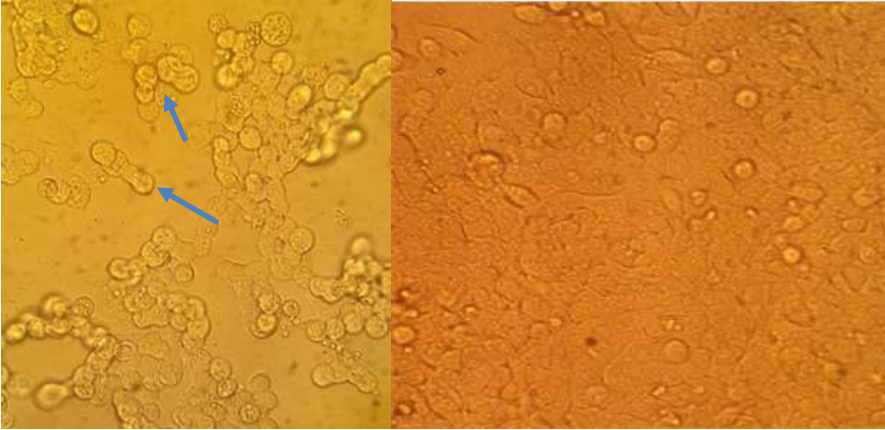
სურათი 2. BBE ნიადაგზე გაზრილლი *B.fragilis* იზოლატის ნაცრისფერი 1 მმ-მდე ზომის კოლონიები

### 3.2 ენტეროტოქსიგენური შტამების დეტექცია

ბაქტერიულ იზოლატებს შორის ენტეროტოქსიგენური ბუნების იდენტიფიკაციისთვის ჩატარებულმა ციტოტოქსიკურობისა და პჯრ კვლევამ გამოავლინა 4 პათოგენური შტამი (E1, E3, S10 და 33). ციტოტოქსიკური უჯრედული ტესტის შემთხვევაში დადებით პასუხად მიღებულ იქნა 3-4 საათის ინკუბაციის შემდეგ, მომრგვალებული, ერთმანეთისგან დაშორებული უჯრედები (სურ 3). მიღებული სურათი შესაძლოა განპირობებული იყოს ენტეროტოქსინის მოქმედების შედეგად E-კადჰერინის შემცველი უჯრედშორისი კავშირების რღვევით. პოლიმერაზულ-ჯაჭვური რეაქციით მიღებული 296



ფუნჯის ფრაგმენტის გელ-ელექტროფორზით დეტექციის მეშვეობით მოხდა იმავე 4 იზოლატის ენტეროტოქსიგენურობის ზუსტი იდენტიფიკაცია (სურ. 4).



**სურათი 3.** *B. fragilis* იზოლატებში ენტეროტოქსიგენურობის განსაზღვრა ციტოტოქსიგენურობის ტესტით.

**მარცხნივ** - ტოქსინის მოქმედების შედეგად მომრგვლებული, ერთმანეთს დაცილებული უჯრედები. **მარჯვნივ** - ჯანმრთელი უჯრედები (კონტროლი).



**სურათი 4.** *B. fragilis* იზოლატებში *bft* გენის დეტექცია PCR მეთოდით. გელ-ელექტროფორეზის შედეგი. 296 ფუნჯის ფრაგმენტი მოჩანს E1, E3, S10 და 33 შტამის ნიმუშებზე.

### 3.3 ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის შესწავლა.

თვრამეტი საკვლევი ბაქტერიული იზოლატის (მათ შორის, სტანდარტული შტამი (ATCC 25285) ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობა შემოწმდა 10 ანტიბიოტიკზე. ყველა იზოლატი სრულად მგრძობიარე აღმოჩნდა შერჩეული ანტიბიოტიკების მიმართ (ცხრილი 1).

	MTZ 5	PRL 30	AMS 20	LEV 5	C 30	MRP 10	CTT 30	FOX 30	IMI 10	CD 2
A5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC25285	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

ცხრილი 1. *B.fragilis*-ის იდენტიფიცირებული იზოლატების ანტიბიოტიკების მიმართ

### 3.4. *B.fragilis* მიმართ აქტიური ფაგების გარემოდან გამოყოფა

ეტბფ და არა-ეტბფ იზოლატები გამოვიყენეთ ჩამდინარე წყლებიდან ბაქტერიოფაგების გამოსაყოფად.

10-მდე ნიმუშიდან ფაგის გამოყოფის მცდელობის შედეგად მივიღეთ სამი ფაგი VA7, MTK და UZ-1. ადაპტაციის მიზნით UZ-1 ფაგის კლონირება და გამრავლება მოხდა ბელგიიდან მოწოდებულ *B.fragilis* -ის კლინიკურ შტამზე. მიღებული კლონი UZM3 შევისწავლეთ იმავე მეთოდებით, რაც გარემოდან გამოყოფილი ფაგების შემთხვევაში გამოვიყენეთ (ცხრილი 2).

ფაგი	გამოყოფის ადგილი	წყარო	მასპ. შტამი	უარყოფითი კოლონიის მორფოლოგია	ვირიონის ზომები		ვირიონის მორფოტიპი
					კაფსიდი	კუდი	
VA-7	თბილისი, საქართველო	ჩამდინარე წყალი	A7	Ø 2 მმ, გამჭვრვალე, ერთგვაროვანი კიდეებით	60 ნმ	100 ნმ	სიფოვირუსი
MTK	თბილისი, საქართველო	მტკვარი	A7	Ø 2,5 მმ, გამჭვრვალე, ერთგვაროვანი კიდეებით	42 ნმ	116 ნმ	სიფოვირუსი
UZ-1	გენტი, ბელგია	ჩამდინარე წყალი	69	Ø 1,5 მმ, გამჭვრვალე, ერთგვაროვანი კიდეებით	54 ნმ	266 ნმ	სიფოვირუსი
UZM3	თბილისი, საქართველო	UZ-1-ის ადაპტირებული ფაგი ა	UZ-10	Ø 1 მმ, ბუნდოვანი, ერთგვაროვანი კიდეებით	65 ნმ	139 ნმ	სიფოვირუსი

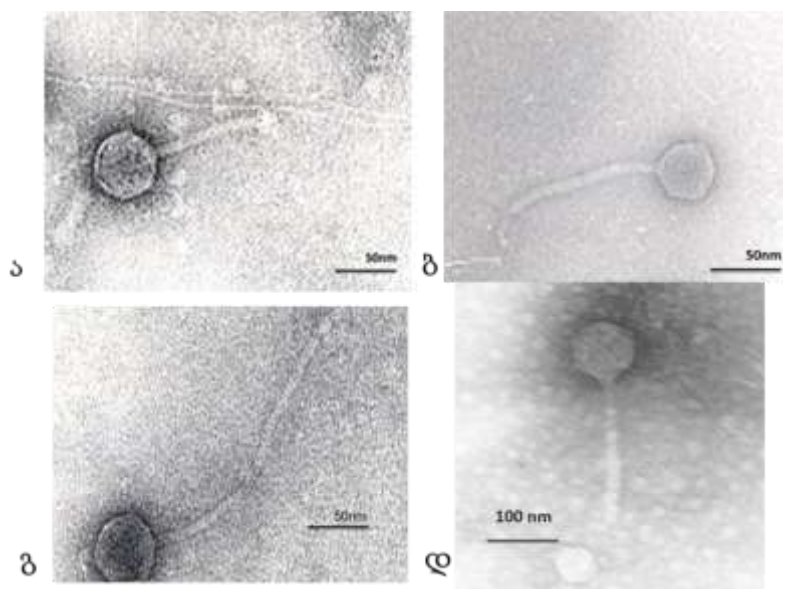
ცხრილი 2. *B.fragilis* -ის მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები და მათი ვირიონის მორფოლოგიური მახასიათებლები.

### 3.5. გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების ვირიონები მორფოლოგიის დადგენა

ტრანსმისიულ-ემისიური მიკროსკოპიის შედეგად მიღებული გამოსახულებების მიხედვით, ყველა გამოყოფილი ბაქტერიოფაგი სიფოვირუსის მორფოტიპს მიეკუთვნება (5). მათ ახასიათებთ იკოსაედრული თავის ფორმა და არაკუმშვადი გრძელი კუდი (ცხრილი 2). უარყოფითი კოლონიების მორფოლოგიაც მსგავსია, 1-2 მმ დიამეტრის კოლონიები, ერთგვაროვანი კიდეებით, რომელთა გამჭვირვალობა შესაძლოა ვარირებდეს მასპინძელი ბაქტერიული შტამის მიხედვით, თუმცა A7-ზე სამივეს გამჭვირვალე კოლონიები ახასიათებთ (სურ 5).



სურათი 5. ფაგების მიერ წარმოქმნილი უარყოფითი კოლონიების მორფოლოგია. მარცხნიდან მარჯვნივ: MTK, UZM3, VA7



**სურათი 6.** ფაგების ვირიონების მოფოლოგიის ტემ გამოსახულება:  
 ა) VA7; ბ) MTK; გ) UZ-1; დ) UZM3 . (გადიდება: x 230 000 – 250 000)

### 3.6. ფაგების მოქმედების სპექტრის დადგენა

ფაგების მოქმედების სპექტრი განისაზღვრა სპოტ ტესტის (შტრიხის მეთოდის) გამოყენებით. მიღებული შედეგების მიხედვით VA7-სა და MTK-ს აღმოაჩნდა გაცილებით ფართო მოქმედების არეალი სახეობის შიგნით, ვიდრე UZ-1 სა და UZM3-ს როგორც ეტბფ, ისე არა-ეტბფ იზოლატებზე (ცხრილი 3). არცერთი ფაგი არ მოქმედებდა ბაქტერიოდესის გვარის სხვა სახეობის ბაქტერიებზე, რაც ვიწრო სახეობრივ სპეციფიკურობაზე მიუთითებს (ცხრილი 3).

მიუხედავად იმისა, რომ შტრიხის მეთოდის მიხედვით MTK-ის მოქმედების არეალი უფრო ფართე იყო, დათესვის ეფექტურობის მიხედვით, VA7 მეტ ბაქტერიულ იზოლატზე მრავლდება (ცხრილი 4). ფაგი UZ-1 ვიწრო მოქმედების სპექტრით ხასიათდებოდა და მისი ტიტრის  $10^6$  -ზე მეტად გაზრდა ვერ მოხერხდა. ამის გამო, მისი შემდგომი დახასიათება ვეღარ განხორციელდა.

ცხრილი 3. გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრი.

ფაგი	<i>B.fragilis</i> იზოლატებზე მოქმედება	სხვა <i>Bacteroides</i> სახეობები
VA7	10/18	0/12
UZ-1	4/18	0/12
MTK	17/18	0/12
UZM3	8/18	0/12

	VA7	MTK	UZM3
A5	0,001	0,000007	0,1
A6	0,2	0,000001	0,3
A7	H	0,000001	H
S1	R	0,000001	0,000001
S2	0,03	0,02	0,02
S3	0,1	0,1	0,1
S6	0,00001	0,000001	R
S10	R	0,000001	0,000001
S16	R	0,00001	0,002
E1	R	0,002	R
E3	0,1	0,001	0,003
E6	1	1	1
E8	R	R	R
33	0,01	0,000001	0,02
M3	0,1	R	R
69	R	0,000001	R
Uz-10	R	R	R

**ცხრილი 4.** ფაგების დათესვის ეფექტურობა მგრძობიარე *B.fragilis* იზოლატებზე. R-ლითიური მოქმედება არ აღინიშნება, H - მასპინძელი შტამი

### 3.7. ფაგებისადმი შერჩეული პატრონი შტამის ლიზოგენობის დადგენა

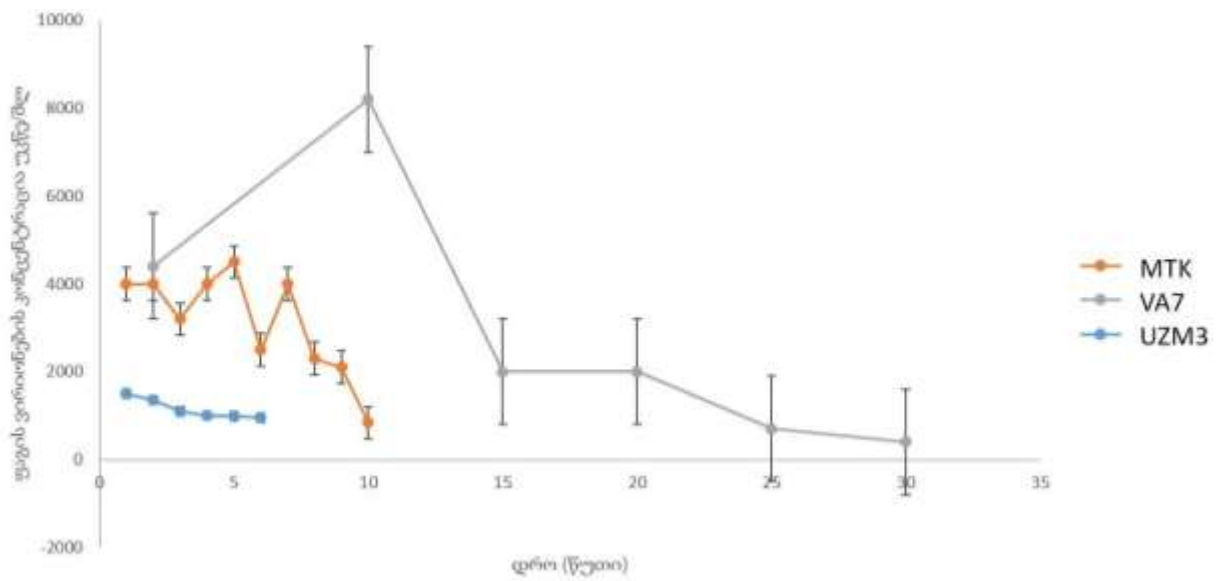
„ფისკას“ მეთოდის გამოყენების შედეგად შერჩეულ შტამებს შორის (A7,69,UZ-10) ლიზოგენია არ გამოვლენილა. ასევე, Genious-ის პროგრამის გამოყენებით მოხდა სამივე ფაგისა (VA7, MTK, UZM3) და მასპინძელი შტამის A7-ის გენომების ერთმანეთთან შედარება მათი მსგავსების დადგენის მიზნით. შედარების შედეგად მსგავსება გენომებს შორის არ გამოვლინდა. შესაბამისად, გამოკვლეული იზოლატები ფაგებისთვის სასურველ მასპინძელ შტამებად გამოვიყენეთ მათი გამრავლებისა და შემდგომი შესწავლისთვის. ამავდროულად, დავადგინეთ, რომ A7 შტამზე გამოყოფილი ფაგები მის მიმართ ლიზოგენიას არ ავითარებენ.

### 3.8 ფაგების ბიოლოგიური მახასიათებლები

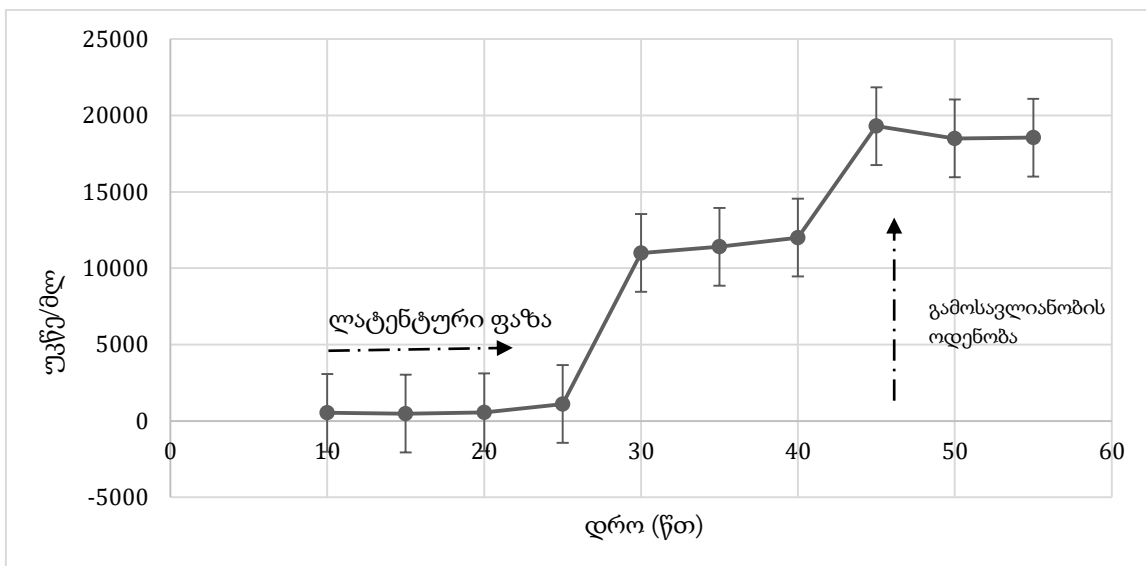
#### 3.8.1. ფაგების ადსორბცია და ერთჯერადი გამრავლების ციკლი

ბიოლოგიური მახასიათებლისთვის შევისწავლეთ სამივე ფაგის ერთჯერადი ზრის მრუდი. შედეგების მიხედვით, ფაგების ვირიონების მაქსიმალური ადსორბციის დრო ერთმანეთისგან განსხვავდება. VA7-ის ადსორბცია 30წთ-მდე გრძელდება, MTK 15 წთ, ხოლო UZM3-ის 2-5 წთ (სურ 6). VA7 -ს ახასიათებს 20 წუთიანი ლატენტური პერიოდი, და ადსორბციიდან 30 წუთში გამოსავლიანობის ოდენობა დაახლოებით 25 ვირიონია ერთ უჯრედზე (სურ. 7). ფაგი UZM3-ის ლატენტური პერიოდი VA7-თან შედარებით უფრო მოკლე, თორმეტი წუთია და გამოსავლიანობა დაახლოებით 30 ვირიონს შეადგენს (სურ. 7). MTK-ს ლატენტური პერიოდი 25 წუთი გრძელდება და ინფექციის შემდგომი გამოსავლიანობა 22-25 ვირიონია.

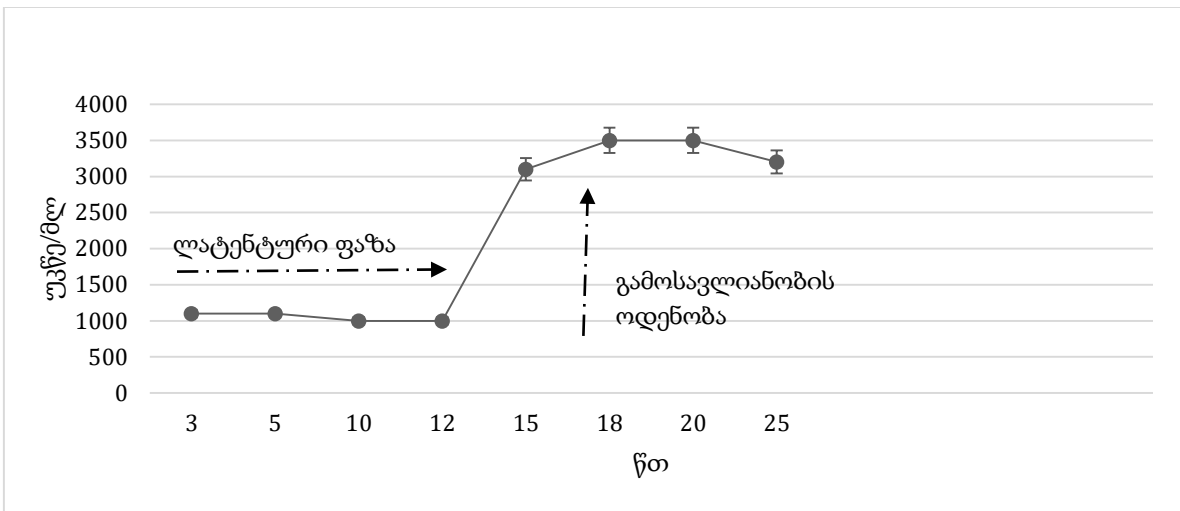




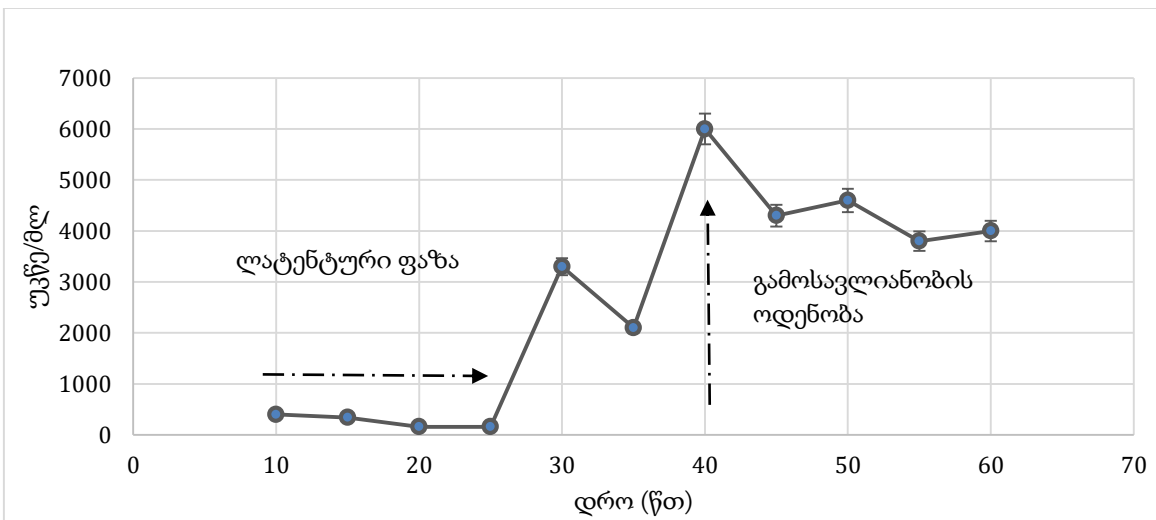
სურათი 6. *B. fragilis*-ის სამი ფაგის ვირონების ადსორბცია.



სურათი 7. VA7 ფაგის ერთჯერადი გამრავლების ციკლი.



სურათი 8. UZM3 ფაგის ერთჯერადი გამრავლების მრუდი.

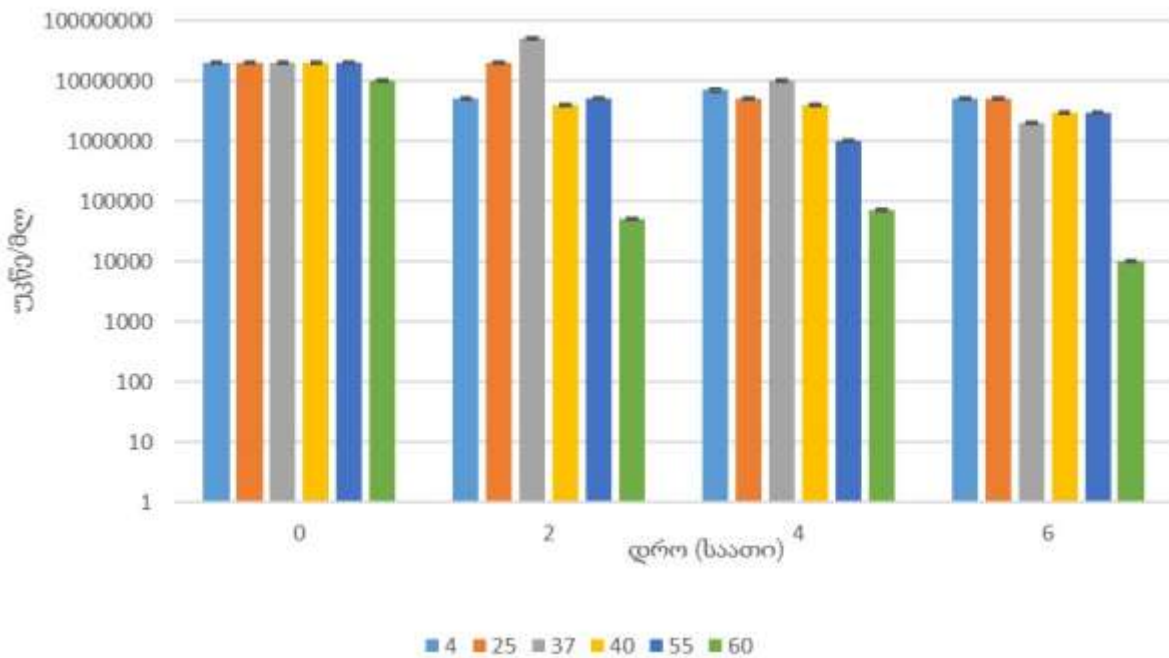


სურათი 9. MTK ფაგის ერთჯერადი გამრავლების მრუდი.

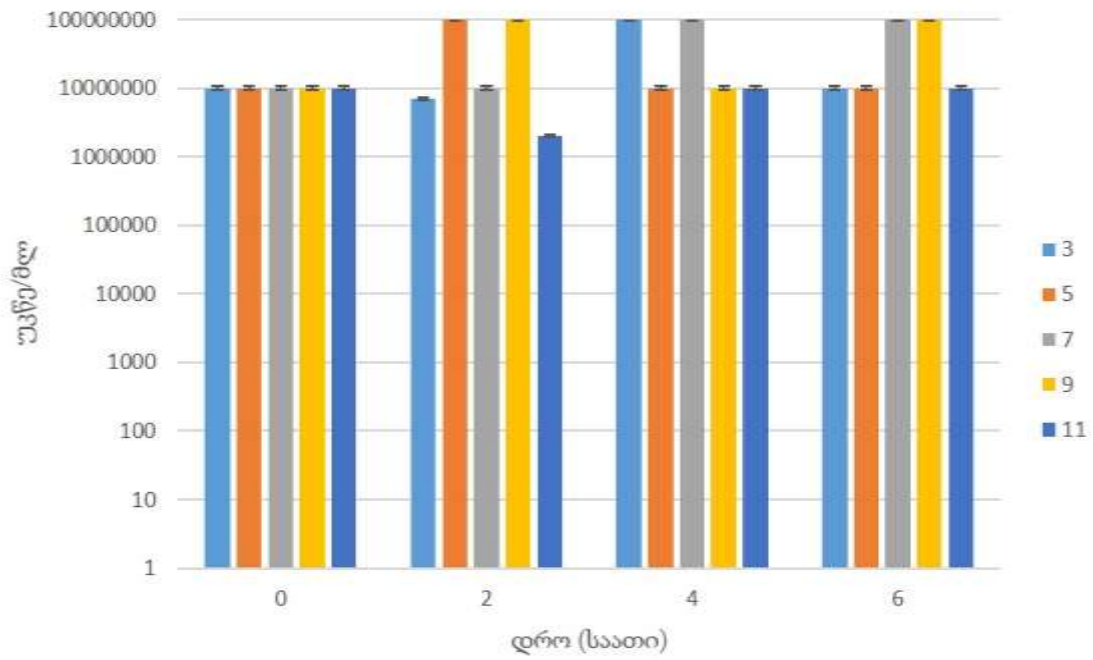
3.8.2. ფაგების მდგრადობის შესწავლა ტემპერატურისა და მჟავიანობის განსხვავებულ პირობებში.

ვინიდან ფაგების სამომავლო გამოყენება არა მხოლოდ თერაპიას გულისხმობს, არამედ შესაძლებელია ისინი გამოყენებული იქნეს ასევე სხვადასხვა სამედიცინო ინსტრუმენტების პროფილაქტიკური მიზნით დასამუშავებლად სხვა დეზინფექციის საშუალებებთან ერთად. შესაბამისად, ფაგების მდგრადობის შესწავლა ტემპერატურის და pH ცვლილების მიმართ მნიშვნელოვანია. ამგვრად, 6 საათის განმავლობაში, სხვადასხვა ტემპერატურულ რეჟიმზე ფაგების სტაბილობის განსაზღვრის შედეგად დადგინდა, რომ VA7 უფრო ხანგრძლივად და მაღალ ტემპერატურაზე (55 °C) ინარჩუნებს ტიტრს MTK და UZM3 თან შედარებით. თუმცა, სამივე ფაგის ტიტრი 37 °C-ზე 6 საათის პერიოდში მეტნაკლებად სტაბილურია (სურ. 10ა, 11ა, 12ა).

მჟავიანობის ცვლილების მიმართაც სამივე ფაგი საკმაოდ სტაბილური აღმოჩნდა როგორც ტუტე ისე, მჟავე გარემოში პირველი 6 საათის განმავლობაში (სურ. 10ბ, 11ბ, 12ბ).

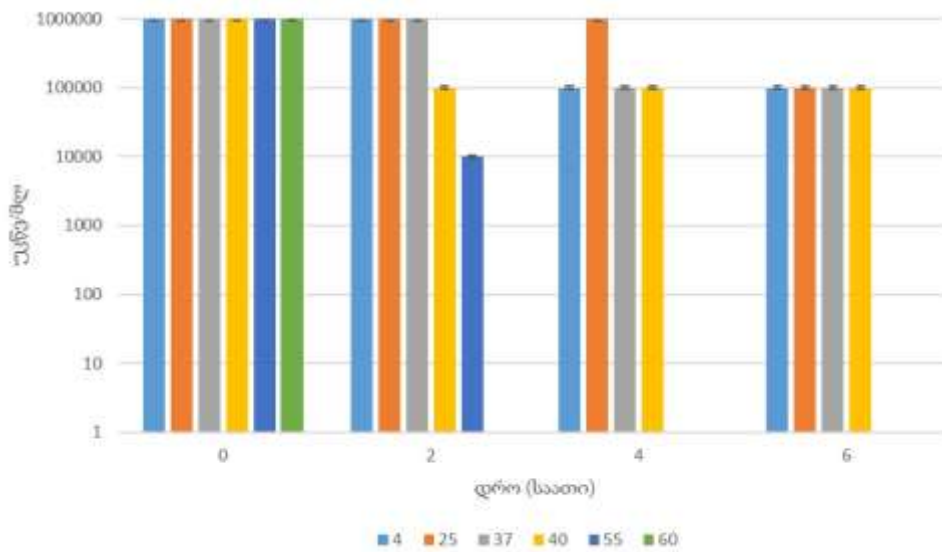


ა)

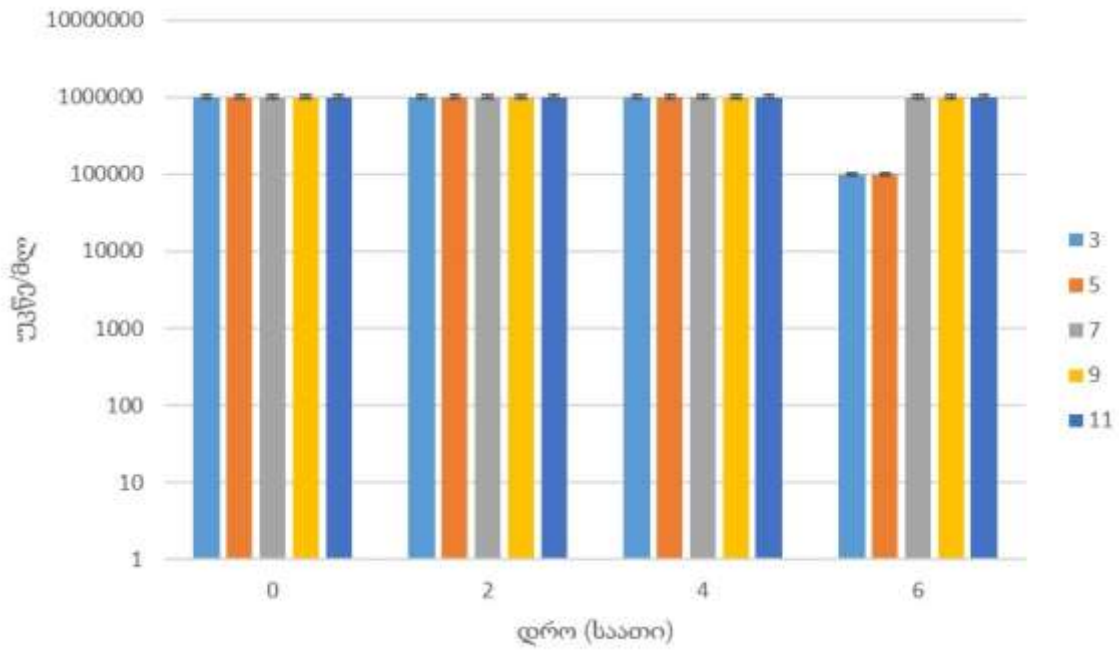


ბ)

**სურათი 10.** ფაგი VA7 -ის სტაბილობა განსხვავებულ ა) ტემპერატურასა და ბ) pH-ზე



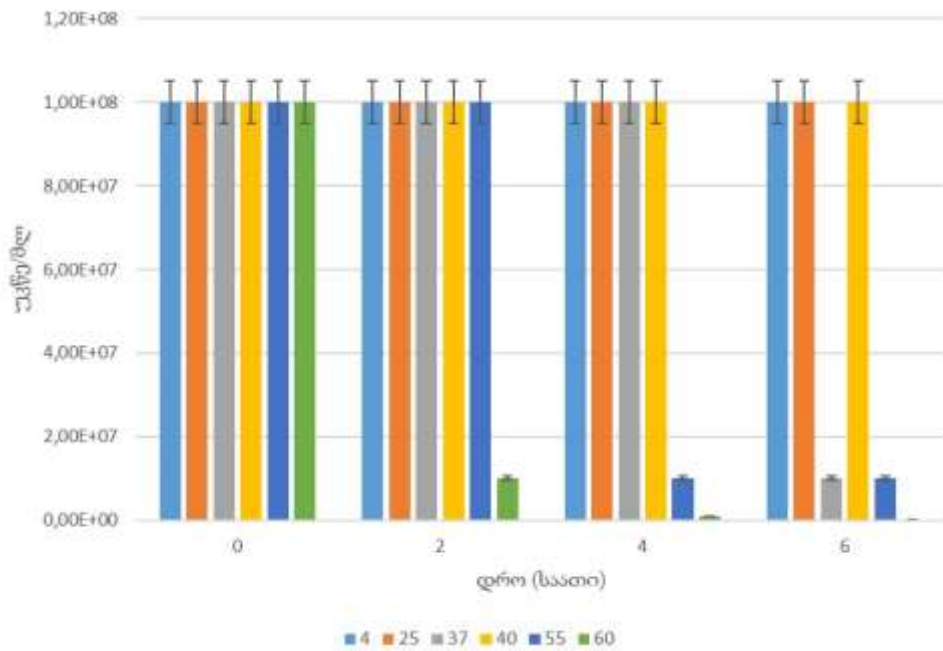
ა)



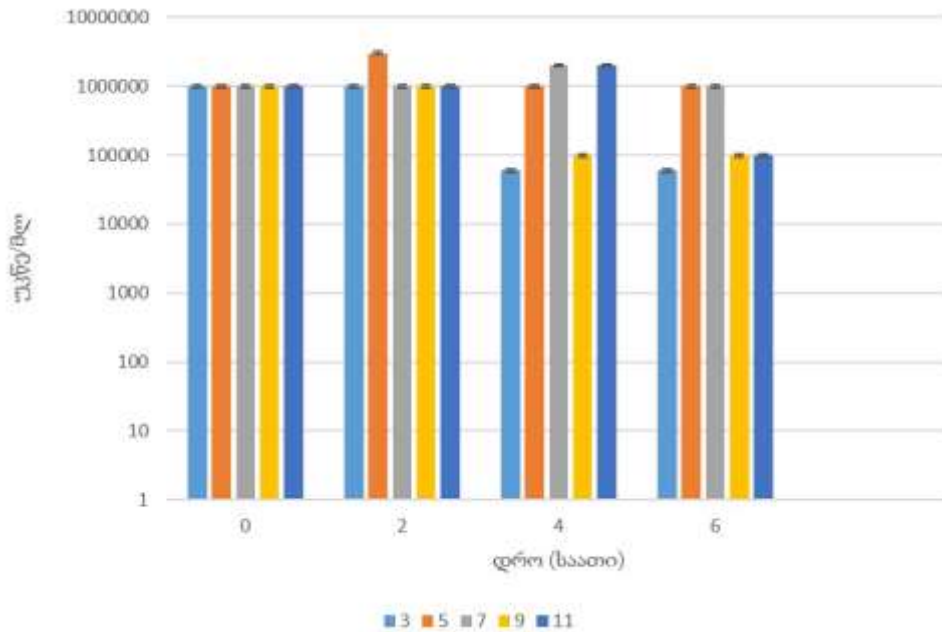
ბ)

**სურათი 11.** ფაგი MTK -ის სტაბილობა განსხვავებულ

ა) ტემპერატურისა და ბ) მჟავიანობის პირობებში



ა)



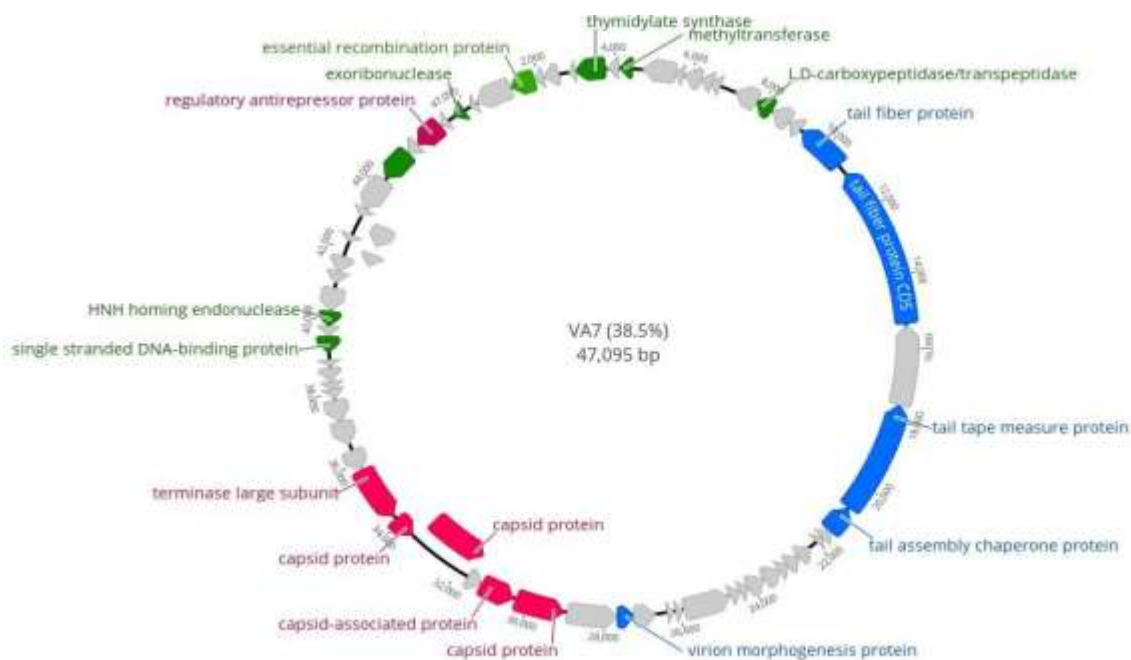
ბ

**სურათი 12.** ფაგი UZM3-ის სტაბილობა განსხვავებულ ა) ტემპერატურისა და ბ) მუჯიანობის პირობებში

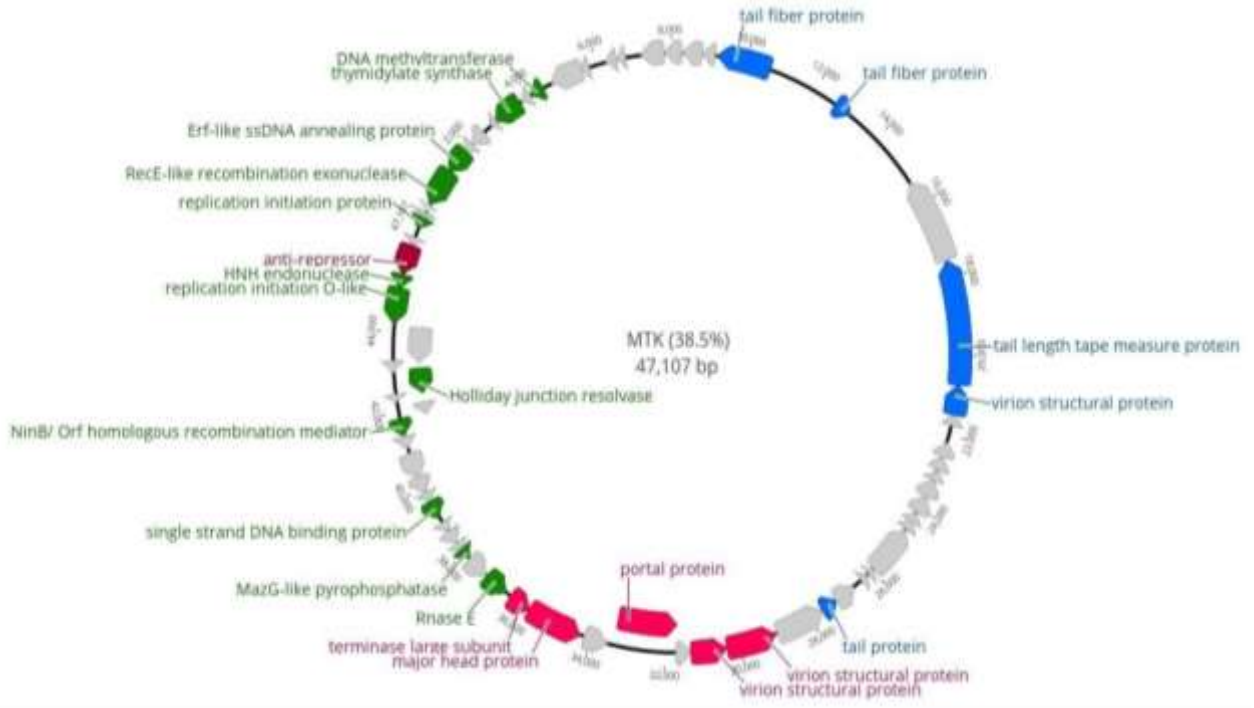
### 3.9 ბაქტერიოფაგების გენომის დახასიათება

ბაქტერიოფაგების დნმის ექსტრაქციით მიღებული დნმ-ები დასექვენირდა და მათი გენომური ანალიზის შედეგად შევისწავლეთ მათი გენომური მახასიათებლები (ცხრილი 5) დადგინდა, რომ ფაგები VA7, MTK და UZM3 წარმოადგენს ორმაგჯაჭვანი დნმ-ის მქონე სიფოვირუსებს. სამივე ფაგი არ შეიცავს ლიზოგენიის განმაპირობებელ გენებს, როგორცაა ეგზოგენაზა და ინტეგრაზა, თუმცა, MTK და UZM3-ის გენომში მოხდა ანტი-რეპრესორის მაკოდირებელი გენის დეტექცია, რომელიც ვირუსის ლიზოგენურ ციკლში მოქმედ ფაქტორად მოიაზრება. ამავდროულად, არცერთი ფაგის დნმ-ში არ აღმოჩნდა ბაქტერიული ვირულენტობის განმსაზღვრელი გენები (ტოქსინების,

ანტიბიოტიკორეზისტენტობის მაკოდირებელი გენები). ფილოგენეზური ანალიზის შედეგად მიღებული ევოლუციური ხის მიხედვით, UZM3, MTK და VA7 წარმოადგენენ *Caudoviricetes* კლასის არაკლასიფიცირებული გვარის ფაგებს, რომელთა გენომის მსგავსება NCBI-ის ბაზაში არსებულ სხვა კლასიფიცირებულ ბაქტერიოდესის ფაგებთან 95%-ზე ნაკლებია. MTK და VA7 100 %-იანი მსგავსება აქვთ ერთმანეთთან და მხოლოდ ორი ორფით განსხვავდებიან. ასეთი მსგავსება მათ ერთი ახალი სახეობის ქვეშ აერთიანებს, რომელიც ჯერ დარეგისტრირების პროცესშია. UZM3-ის მსგავსება MTK და VA7-თან 81 % და 79 % -ია, შესაბამისად. 95% -ზე ნაკლები მსგავსების შემთხვევაში, ვირუსების ტაქსონომიის საერთაშორისო კომისიის (ICTV) მიხედვით იმას ნიშნავს, რომ ის განსხვავებული გვარისა და სახეობის წარმომადგენელია. ორივე შემთხვევაში ფაგები ახალ გვარსა და სახეობებს წარმოადგენენ, რომელთა დარეგისტრირებაც უახლოეს მომავალში იგეგმება. დახასიათებული ფაგების გენომური მახასიათებლები მე-4-ე ცხრილშია მოცემული.

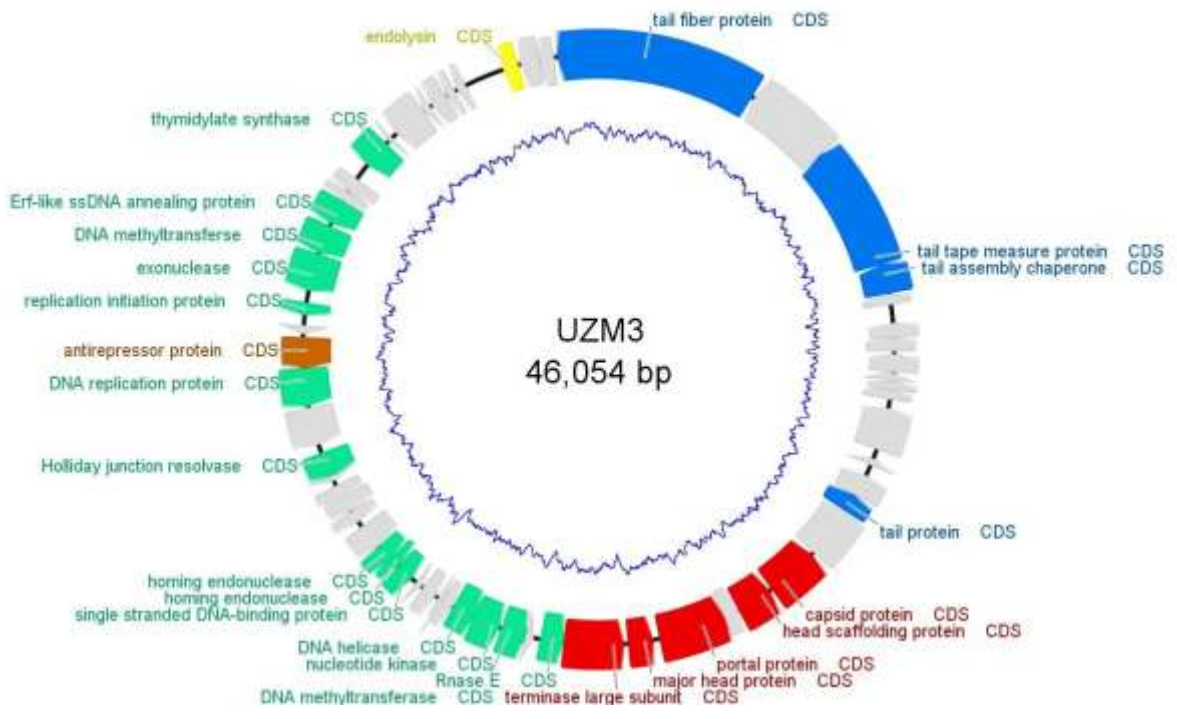


სურათი 13. ფაგი VA7-ის გენომის რუკა: მწვანე- დნმ/რნმ-ის მეტაბოლიზმი; ლურჯი/წითელი- სტრუქტურული ცილები; ყვითელი - ლიზისური ფერმენტები; შინდისფერი- მარეგულირებელი ცილები -, ნაცრისფერი- ჰიპოთეტური გენები



სურათი 14. ფაგი MTK-ის გენომის რუკა: მწვანე- დნმ/რნმ-ის მეტაბოლიზმი; ლურჯი/წითელი- სტრუქტურული ცილები; ყვითელი - ლიზისური ფერმენტები; შინდისფერი- მარეგულირებელი ცილები -, ნაცრისფერი- ჰიპოთეტური გენები





სურათი 15. ფაგი UZM3-ის გენომის რუკა: ფაგი VA7-ის გენომის რუკა: მწვანე- დნმ/რნმ-ის მეტაბოლიზმი; ლურჯი/წითელი- სტრუქტურული ცილები; ყვითელი - ლიზისური ფერმენტები; ყავისფერი - მარეგულირებელი ცილები -, ნაცრისფერი- ჰიპოთეტური გენები

### 3.9.1 GEC\_vB\_Bfr\_VA7 გენეტიკური მახასიათებლები

გენეტიკური დახასიათების შედეგად დადგინდა, რომ ფაგი VA7 არის ორჯაჭვიანი დნმის მქონდე ვირუსი. დნმ-ი შედგება 47,095 ფუძე-წყვილისგან (ფწ). მისი გუანინ-ციტოზინის (GC) შემცველობა 38,53%-ია. ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მიხედვით დადგინდა 96.65 %-იანი მსგავსება ბაქტეროიდესის ფაგთან B-124-14, 94.66%-იანი მსგავსება vB\_BfrS\_23-თან და 94.58% B40-8-თან, რომლებიც დღემდე წყლის დაბინძურების სადეტექციოდ არის გამოყენებული. ასევე, VA7-ს 100% მსგავსება აქვს ფაგ

MTK-თნ. ეს ექვსი ფაგი ქმნის ექვს ახალ სახეობას ერთი გვარის ქვეშ (არაკლასიფიცირებული *Caudoviricetes*).

გენომის ანოტაციამ აჩვენა 67 მაკოდირებელი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა (ORF) და ტრნმ-ის არარსებობა.

ანოტირებული გენომი ხელმისაწვდომია NCBI-ის ბაზაზე, Genbank-ის საიდენტიფიკაციო ნომრით MW916539.

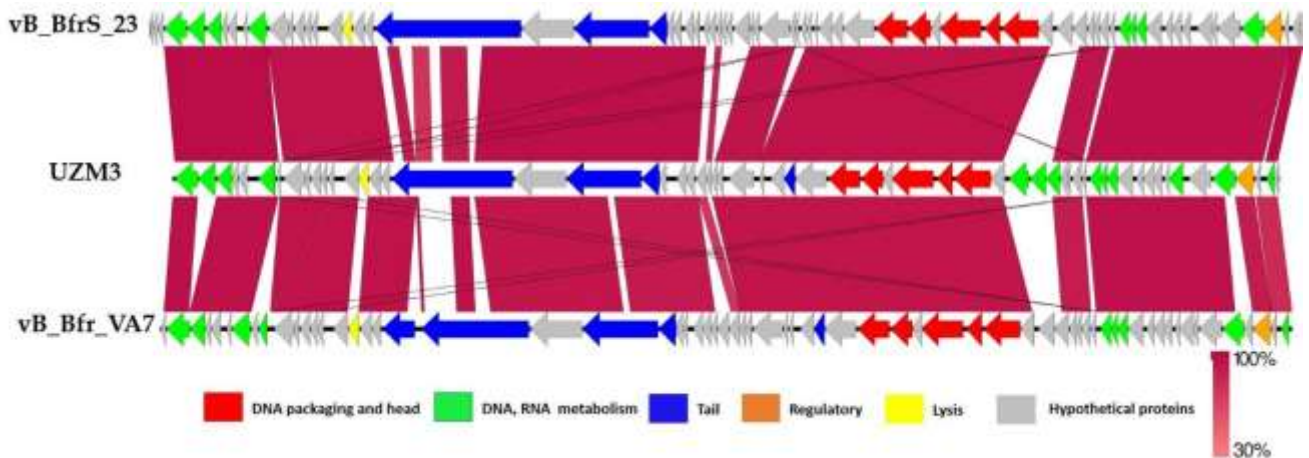
VA7 არ შეიცავს ლიზოგენობის განმსაზღვრელ ან ჩვენთვის ცნობილ რომელიმე ტოქსინისა და ანტიბიოტიკორეზისტენტობის მაკოდირებელ გენებს. 67 ORF-დან მაკოდირებელი გენები ნაწილდება შემდეგნაირად: დნმ-ის შეფუთვისა და თავის მორფოგენეზის მოდული (5 ORFs); კუდის მორფოგენეზის მოდული (5 ORFs); დნმისა და რნმის მეტაბოლიზმის მოდული (19 ORFs) და ერთი მარეგულირებელი გენი (სურ 13). თუმცა გენების 72% -ის ფუნქცია უცნობია, აღნიშნულ მონაცემებზე დაყრდნობით შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ფაგი VA7 მკაცრად ლითიურ ფაგს წარმოადგენს და მისი გამოყენება თერაპიაში უსაფრთხოა.

### 3.9.2 GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 გენეტიკური მახასიათებლები

ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის ანალიზმა აჩვენა, რომ ფაგი UZM3-ის გენომი შედგება 46, 054 ფწ-გან გუანოზინ-ციტოზინის 38.89%-იანი შემადგენლობით. 41,772 ფწ ქმნის 61 ORF-ს. 61-დან 25 ORF ფუნქციურად ანოტირდა და დაჯგუფდა შემდეგნაირად: (1) დნმ-ის შეფუთვისა და თავის მორფოგენეზის მოდული (5 ORFs); (2) კუდის მორფოგენეზის მოდული (4 ORFs); (3) უჯრედის ლიზისის გენი (1 ORF); (4) დნმისა და რნმის მეტაბოლიზმის მოდული (13 ORFs) და მარეგულირებელი გენი წარმოდგენილი ერთი ORF-ით. Blast ნუკლეოტიდური მსგავსების საძიებო სისტემის მიხედვით UZM3 ყველაზე ახლო მსგავსება აქვს *B.fragilis* შემდეგ ფაგებთან :

vB\_BfrS\_23 (89% query coverage) (GenBank საიდენტიფიკაციო ნომრით: MT630433)  
GEC\_vB\_Bfr\_VA7.

კვლევა აჩვენებს, რომ საშუალო ნუკლეოტიდური იდენტობა (ANI) UZM3-სა და მის მსგავს ფაგებს შორის 95% -ზე ნაკლებია ( vB\_BfrS\_23 – 84% და GEC\_vB\_Bfr\_VA7 - 79%). შედეგების მიხედვით, ფაგი UZM3 ახალი, განსხვავებული გვარის წარმომდგენელია. UZM3, vB\_BfrS\_23 და GEC\_vB\_Bfr\_VA7 ფაგების გენომის წრფივი შედარება სურათ 16-ზე არის გამოსახული. UZM3-ისა და აღნიშნული მსგავსი ფაგების ვირუსული პროტეომული ხის მეშვეობით ჩანს მათი ჰომოლოგია ერთმანეთის მიმართ (სურათი 16).



**სურათი 16.** ფაგების GEC\_vB\_Bfr\_UZM3, vB\_BfrS\_23, და GEC\_vB\_Bfr\_VA7 გენომების შედარებითი ანალიზი. გენები შეფერილია ფუნქციების მიხედვით: რეგულაცია- ყავისფერი, კუდი- ლურჯი; თავი და შეფუთვა - წითელი; დნმ/რნმ მეტაბოლიზმი - მწვანე; ლიზისი - ყვითელი; ჰიპოთეტური ცილები - ნაცრისფერი.

### 3.9.3 GEC\_vB\_Bfr\_MTK გენეტიკური მახასიათებლები

ფაგ MTK-ის 47,107 ფუძეწყვილისგან შემდგარი დნმ-ი შეიცავს 67 ORF-ს საიდანაც, 5 ORF დნმ-ის შეფუთვისა და თავის მორფოგენეზის მოდულს ქმნის, 5 ORF კუდის მორფოგენეზის მოდულს. დნმისა და რნმის მეტაბოლიზმის მოდული 12 ORF-თაა წარმოდგენილი. ერთი ORF წარმოადგენს გენების ექსპრესიის მარეგულირებელ ცილას

(სურ 15). როგორც პარაგრაფ 3.8.1-შია მოყვანილი ფაგი MTK-ს აქვს 100 % მსგავსება ფაგ VA7-თან რაც მათ ერთი სახეობის ქვეშ აერთიანებთ. ასპროცენტური მსგავსების მიუხედავად, მათ აქვთ არამსგავსი კუდის სტრუქტურული ცილა, რომელიც შესაძლოა განაპირობებდეს ორი. ერთი სახეობის ფაგის მცირედით განსხვავებულ ბიოლოგიურ მახასიათებლებს.

ფაგი	ფუძეწყვილების რაოდენობა	გუანოზინ-ციტოზინის პროცენტი	ORF-ების რაოდენობა
VA7	47,095	38,53%	67
MTK	47107	38,50%	67
UZM3	41,772	38.89%	61

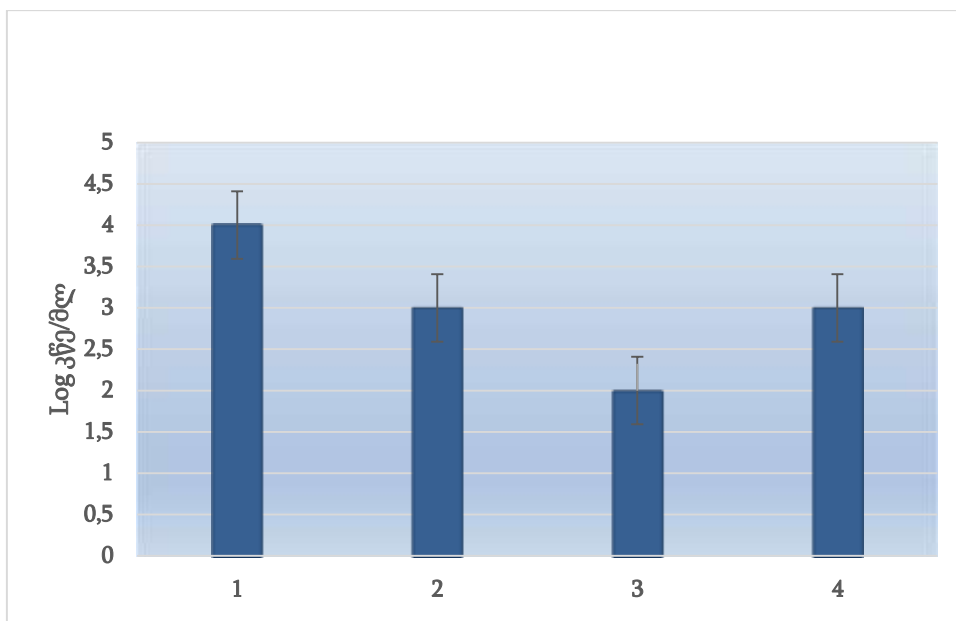
**ცხრილი 5.** ფაგების გენომის სრული სექვენსის შედეგად მიღებული მონაცემები

### 3.10. ფაგების მოქმედების in vitro კვლევა უჯრედული კულტურის გამოყენებით

უჯრედული ინფექციური მოდელის მეშვეობით შევისწავლეთ შერჩეული ფაგების თერაპიული მოქმედების პოტენციალი, როგორც ცალკეული ისე, მათი ერთად გამოყენების შემთხვევაში.

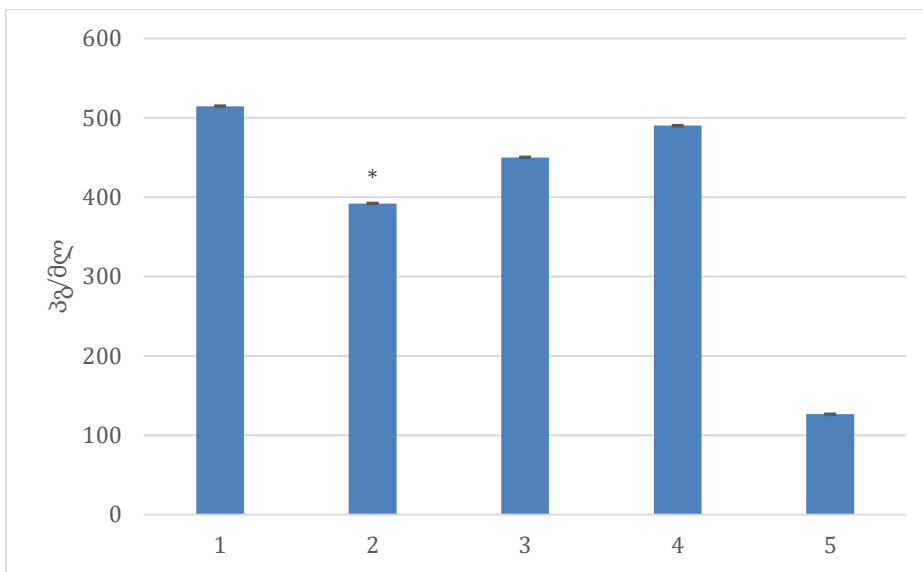
სწორი ნაწლავის ეპითელური უჯრედული კულტურის ეტბგ შტამით დასნებოვნებისა და ფაგების დამუშავების შემდეგ, დადგინდა , რომ ბაქტერიული კონცენტრაცია VA7 და MTK ფაგების მოქმედების შედეგად, კონტროლთან შედარებით ორი და ერთი ათობითი

ლოგარითმით იყო შემცირებული. ფაგების ნარევის დამატების შემთხვევაში, ბაქტერიული ტიტრის კლება MTK-ის მოქმედების მსგავსი იყო, ანუ მხოლოდ ერთი ათობითი ლოგარითმით შემცირებული (სურ. 17). ეს შესაძლოა ფაგების ანტაგონისტური ურთიერთქმედებით იყოს გამოწვეული.



**სურათი 17.** ბაქტერიული ტიტრის ცვლილებების ფაგების ზემოქმედების შედეგად E3 ბაქტერიული კულტურა (1), E3+MTK (2), E3+VA7 (3), E3+VA7+MTK (4)

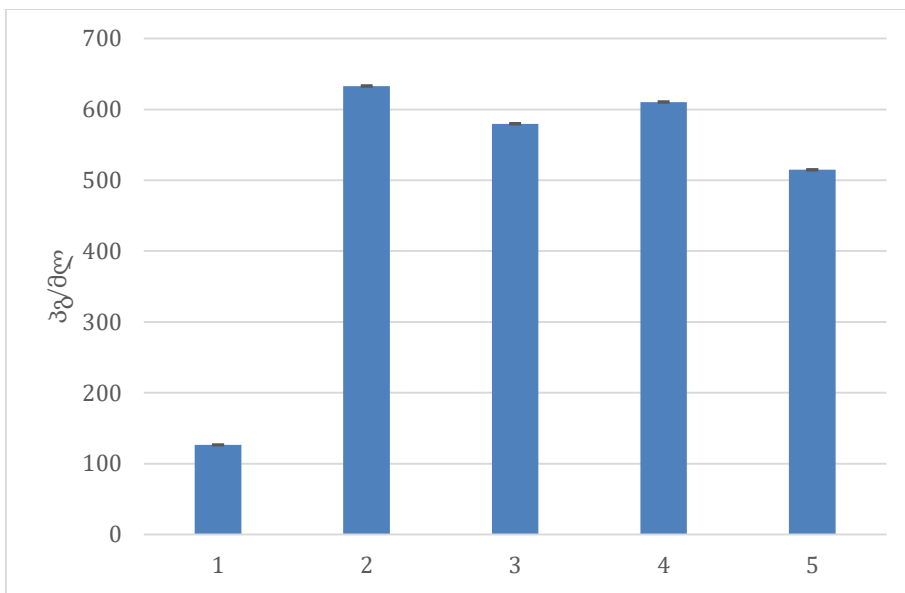
გამოყოფილი IL-8-ის დონე ინფიცირებულ უჯრედულ კულტურასთან შედარებით, სტატისტიკური მნიშვნელობით ( $p=0,05$ ;  $0,01$ ) შემცირებული იყო, როგორც VA7, ისე MTK ფაგების დამატების შემდეგ. რაც შეეხება მათი ნარევის ეფექტს, ამ შემთხვევაში IL-8-ის კონცენტრაცია მცირდებოდა, თუმცა არასტატისტიკურად სარწმუნო სხვაობით (სურ 18), რაც ასევე შესაძლოა, ფაგური ანტაგონიზმის მიზეზით იყოს გამოწვეული.



**სურათი 18.** IL-8 მაჩვენებლების ცვლილება ინფიცირებულ უჯრედულ კულტურაზე ფაგების ზემოქმედების შედეგად E3 (1), E3+VA7 (2), E3+MTK (3), E3+VA7+MTK (4), უჯრედული კულტურა(5)

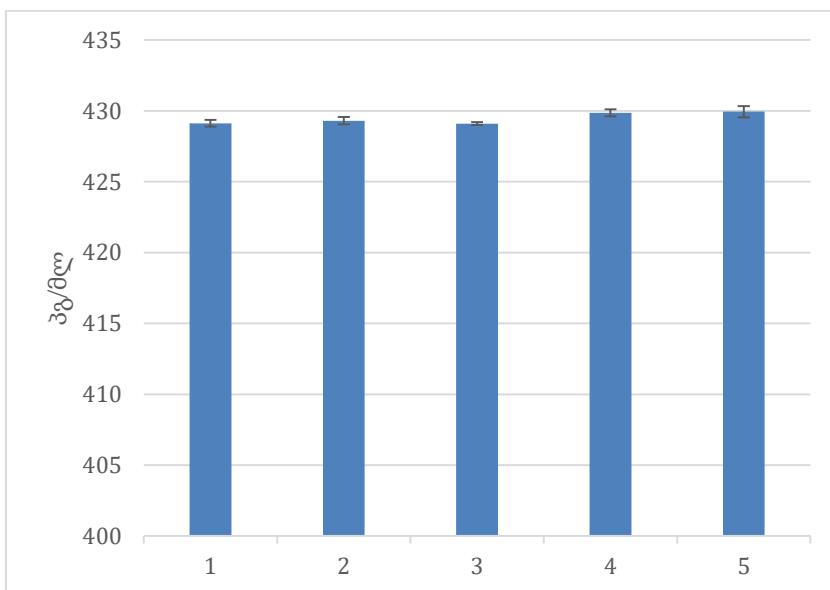
\*  $P < 0,05$

საინტერესო შედეგები მივიღეთ არაინფიცირებულ უჯრედებზე ფაგების დამატების დროს. ამ შემთხვევაში, IL-8 დონე მომატებული იყო, როგორც სტერილური უჯრედების ჯგუფში ისე, უჯრედული კულტურის ეტბგ შტამით დაინფიცირებულ საკონტროლო ჯგუფის მონაცემთან შედარებით (სურ 19).

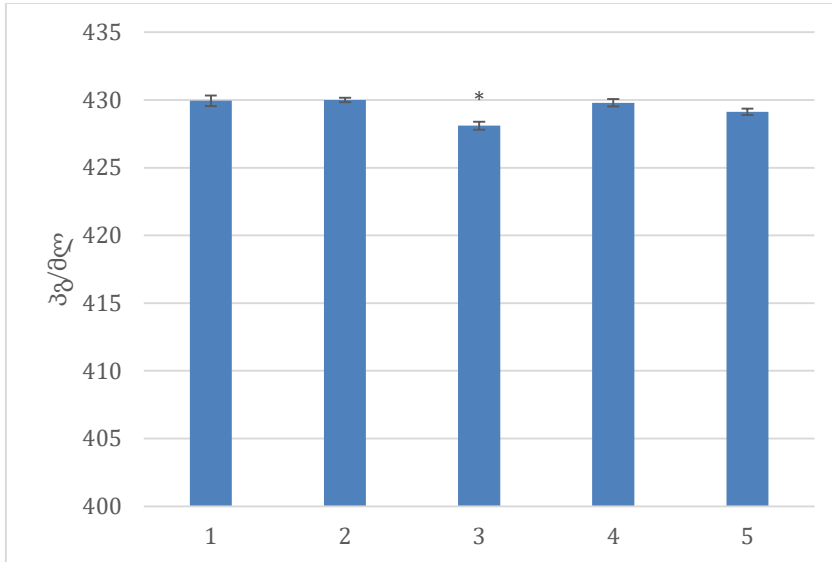


**სურათი 19.** IL-8 მაჩვენებლების ცვლილება არაინფიცირებულ უჯრედულ კულტურაზე ფაგების ზემოქმედების შედეგად უჯრედული კულტურა (1), VA7 (2), MTK (3), VA7+MTK (4), E3 (5)

TNF- $\alpha$ -ის შემთხვევაში, სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილება არ შეინიშნებოდა ინფიცირებულ და ფაგებით დამუშავებულ ჯგუფებს შორის. სტერილურ უჯრედებზე ფაგების დამატების შემდეგ კი, TNF- $\alpha$ -ის სტატისტიკურად სარწმუნო გამოყოფის შემცირება მივიღეთ მხოლოდ MTK-ის შემთხვევაში (სურ 20).



**სურათი 20.** TNF- $\alpha$  მაჩვენებლების ცვლილება ინფიცირებულ უჯრედულ კულტურაზე ფაგების ზემოქმედების შედეგად E3 (1), E3+VA7 (2), E3+MTK (3), E3+VA7+MTK (4), უჯრედული კულტურა (5)



**სურათი 21.** TNF- $\alpha$  მაჩვენებლების ცვლილება არაინფიცირებულ უჯრედულ კულტურაზე ფაგების ზემოქმედების შედეგად უჯრედული კულტურა (1), VA7 (2), MTK (3), VA7+MTK (4), E3 (5). \*  $P < 0,05$

## თავი 4: შედეგების განხილვა

ფაგების თერაპიაში გამოყენების მიმართ მზარდი ინტერესი ანტიბიოტიკორეზისტენტული პათოგენებით გამოწვეული სიკვდილიანობის საგანგაშო მაჩვენებლებითაა განპირობებული. ფაგოთერაპიას მოიაზრებენ, როგორც პერსონალიზებული მედიცინის ერთ-ერთ ახლადგანვითარებად განშტოებას. (Schooley et al. 2017), (Sulakvelidze 2005). შესაბამისად, ბაქტერიოფაგებზე მოთხოვნა ყოველდღიურად იზრდება. ავადობის ხშირი გამომწვევების მიმართ, რომელთაც მაღალი ანტიმიკრობული მდგრადობა ახასიათებთ (*Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*)



ფაგების გამოყოფა შედარებით ადვილად ხდება და მათი თერაპიაში გამოყენებისთვის მსოფლიოს მასშტაბით მრავალი კოლექციაა შექმნილი. მეორეს მხრივ, ისეთ პათოგენს, როგორცაა *B. fragilis* არ გააჩნია ანტიბიოტიკორეზისტენტობის მაღალი სიხშირე და შესაბამისად, მათ მიმართ მოქმედი ფაგების სამკურნალო მიზნით გამოყოფა, გავრცელებულ პრაქტიკას არ წარმოადგენს. თუმცა, ბოლო ათწლეულში, ცნობები *B. fragilis*-ით გამოწვეული ინფექციების თაობაზე გაზრდილია. მათი მკურნალობა რიგ შემთხვევებში გაიდლაინებით გათვალისწინებული მედიკამენტებით ვერ ხერხდება (Gao et al. 2019), (Bogdan et al. 2018), (Jasemi et al. 2021).

აღსანიშნავია, რომ *B. fragilis*-ის სპეციფიკური ფაგების თერაპიაში მოხმარების თაობაზე პუბლიკაციები არ მოიპოვება. აქამდე, მათი გამოყენების ნიშად წყლის განავლოვანი დაბინძურების დეტექცია და სადუზინფექციო საშუალებების ეფექტურობის შემოწმება მოიაზრებოდა მათი მაღალსპეციფიკურობისა და გარემო პირობების მიმართ განსაკუთრებული მდგრადობის გამო (Leclerc et al. 2000), (Pintó et al. 1991). ამ ფაგების ერთი ჯგუფი, რომელთა მასპინძელი შტამია HSP40 მათი რაოდენობა ჩამდინარე წყლებში შედარებით დაბალია და ზოგიერთ გეოგრაფიულ ტერიტორიებზე საერთოდ არ არიან გავრცელებულნი. *B. fragilis* HSP40 ფაგები სიფოვირუსული მორფოლოგიის არიან მოქნილი არა-კუმშვადი კუდებითა და 60 ნმ-დიამეტრის მქონე კაფსიდით, სადაც მოთავსებულია ორჯაჭვიანი დნმ-ი. ფაგების მეორე ჯგუფის მასპინძელი შტამია *B. fragilis* RYC2056 (Queralt et al. 2003) აღნიშნული ჯგუფი მოიცავს ორჯაჭვიანი დნმ-ის მქონე განსხვავებული მორფოტიპის ფაგების უფრო ფართო სპექტრს. ისინი გვხვდებიან ადამიანისა და სხვა ცხოველების ფეკალურ მასებში. ამ ფაგების რაოდენობა ჩამდინარე წყლებში, როგორც წესი, გაცილებით მაღალია ვიდრე *B. fragilis* HSP40 შტამის მიმართ აქტიური ფაგებისა (Queralt et al. 2003). თუმცა, ფაგები ყოველთვის არ წარმოადგენენ ფეკალური კონტამინაციის მონიტორინგის სანდო საშუალებას, განსაკუთრებით განსხვავებულ გეოგრაფიულ ტერიტორიებზე. ასე მაგალითად, ის ფაგები, რომლითაც წარმატებით ხდებოდა ფეკალური კონტამინაციის დადგენა გაერთიანებულ სამეფოსა და

ესპანეთში, გაცილებით არაეფექტური იყო მათი გამოყენება ამერიკის შეერთებული შტატების ტერიტორიაზე (Leclerc et al. 2000).

სადოქტორო კვლევის ფარგლებში განხორციელდა ოთხი *B. fragilis* ბაქტერიოფაგის გამოყოფა და აქედან, მოხდა სამი მათგანის არა მხოლოდ ბიოლოგიური, მორფოლოგიური და გენეტიკური დახასიათება არამედ, მათი თერაპიული პოტენციალის შესწავლა in vitro პირობებში, ადამიანის უჯრედული კულტურის გამოყენებით. ეს უკანასკნელი მოიაზრებს ფაგების ბაქტერიციდული მოქმედებისა და იმუნოგენური პროფილის განსაზღვრას. მსგავსი კვლევები ჩატარებულია სხვადასხვა ფაგებზე, რომლებიც გამოიყო ფართოდ გავრცელებული ანტიბიოტიკების მიმართ მდგრადი პათოგენებისთვის. თუმცა, *B. fragilis* -ის სპეციფიკური ფაგების ამგვარი შესწავლის თაობაზე ცნობები არ მოიპოვება.

სამეცნიერო პროექტის ფარგლებში მოხდა გელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, ვირუსოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის კვლევითი ინსტიტუტის ფაგების კოლექციის გამდიდრება *B. fragilis* -ის მიმართ აქტიური სამი ფაგით. გარდა ამისა, ამავე ინსტიტუტის ბაქტერიულ კოლექციას შეემატა *B. fragilis* 18 ბაქტერიული იზოლატი, 6 *B. vulgatus* და 3 *Parabacteroides distasonis* სახეობის იზოლატები, რომელთა ზუსტი იდენტიფიკაციაც MULDI TOF სპექტრომეტრით მოხდა.

აღნიშნული 18 *B. fragilis* -ის იზოლატიდან საქართველოში გამოყოფილი ორი ფაგის (VA7, MTK) იზოლაცია და გამრავლება შტამ A7-ზე განხორციელდა, რის გამოც ამ შტამის გენომის სრული სექვენირება მოვახდინეთ. 18 იზოლატის ენტეროტიქსიგენურობაზე შემოწმებისას ვნახეთ, რომ *bft* გენის მტარებლობა მხოლოდ 4-ს აღმოაჩნდა, რაც ლიტერატურაში მოცემული სტატისტიკურ სიხშირეს ემთხვევა (10-20%) (Sears et al. 2008). ყველა იზოლატის გამოყენება მოხდა ჩამდინარე წყლებისა და განავლოვანი მასალიდან ფაგების გამოსაყოფად. 2 ფაგი (VA7, MTK) გამოიყო ვარკეთილისა და მტკვრის წყლებიდან, ხოლო UZ-1 გამოიყო გენტის (ბელგია) ჩამდინარე წყლიდან გენტის უნივერსიტეტის კოლექციში არსებულ *B. fragilis* -ის შტამზე (Bakuradze et al. 2018). UZ-1-ის ადაპტაცია მოხდა სხვა, კლინიკურ შტამზე, რომელიც ამოითესა ოსტეომიელიტით

დაავადებული პაციენტის აბსცესის ნიმუშიდან. ადაპტაციის შედეგად მივიღეთ კლონი UZM3, რომლის შესწავლაც განვაგრძეთ მისი დახასიათების მიზნით. მიღებული ფაგებიდან, UZ-1 -ის გამრავლება კვლევებისთვის საჭირო კონცენტრაციის მისაღწევად ( $10^8$ - $10^{10}$ ) ვერ მოხერხდა და შესაბამისად, მხოლოდ მისი კლონის - UZM3-ის დახასიათება განხორციელდა (Bakuradze et al. 2023) ფაგების მორფოლოგიურმა და ბიოლოგიურმა დახასიათებამ აჩვენა, რომ VA7, MTK და UZM3 წარმოადგენენ სიფოვირუსებს. სამივე მათგანი სტაბილურია ტემპერატურისა და მჟავიანობის სხვადასხვა პირობებში, რაც დამახასიათებელია აქამდე შესწავლილი ბაქტეროიდების ფაგებისთვის (Durán et al. 2003). ფაგების მოქმედების სპექტრი ვარირებს 45-70 % -ის ფარგლებში, თუმცა გამოყენებული ბაქტერიული იზოლატების რაოდენობა არ არის საკმარისი უფრო ზუსტი შედეგის მისაღებად. გენომის სრული სექვენსის ანალიზის მიხედვით, არცერთი მათგანი არ შეიცავს ტოქსინებისა და ანტიბიოტიკების მიმართ მდგრადობის მაკოდირებელ გენებს. აღნიშნული გენების არარსებობა დადებით მახასიათებლად ითვლება ფაგების თერაპიაში გამოყენებისთვის. გარდა ამისა, მოხდა ფაგების ვირულენტობის განსაზღვრა, როგორც ლიზოგენიის შესწავლით ფისკას მეთოდით ისე, გენომური ანალიზის გამოყენებით. ფისკას მეთოდით ლიზოგენია არ გამოვლენილა არცერთი მასპინძელი შტამის შემთხვევაში, და არც ფაგების გენომში მოიძებნა აღნიშნული თვისების განმსაზღვრელი ისეთი გენები, როგორცაა ინტეგრაზა ან ექსიზიონაზა. მიუხედავად იმისა, რომ პროფაგის მოქმედებაში მონაწილე ანტი-რეპრესორული ცილის დეტექცია სამივე ფაგის გენომში აღმოჩნდა და ეს უკანასკნელი შესაძლოა მიუთითებდეს ზომიერი ფაგების ბუნებაზე, ბიოლოგიური კვლევების დროს, ფაგების ლიზოგენია არ გამოვლენილა. ფაგოთერაპიაში ლითიური ფაგების გამოყენებას ენიჭება უპირატესობა, თუმცა სინთეზური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდოლოგიის მეშვეობით უკვე შესაძლებელია ლიზოგენური ფაგების გენური მოდიფიკაცია მათი სამკურნალოდ გამოყენებისთვის. ამის შედეგად, ხდება მათი ანტიბაქტერიული თვისებების გაძლიერება და ვირულენტური გენების ამოჭრა რათა ფაგები მეტად უსაფრთხო ფორმით იქნენ გამოყენებულნი. ასეთი სტრატეგია შესაძლოა წარმატებული აღმოჩნდეს ისეთი მკაცრი

ანაერობული პათოგენებისთვის, როგორცაა *Clostridium defficile* (Monteiro et al. 2019). როგორც *B.fragilis*, ისე *C.defficile* მიმართ აქტიური ლითიური ფაგების გამოყოფა არ არის მარტივი მეტიც, უკანასკნელისთვის, აქამდე გამოყოფილი სპეციფიკური ფაგები ძირითადად, ლიზოგენური ბუნებისაა (Heuler, Fortier, and Sun 2021). *C.defficile* ბაქტერიოდესისგან განსხვავებით გაცილებით მძიმე ფორმის ანტიბიოტიკორეზისტენტულ ინფექციას იწვევს და მის მიმართ თერაპიული საშუალების პოვნა ჯანდაცვის მაღალი ინტერესის საგანია (Heuler, Fortier, and Sun 2021). ამის გამო, არსებული ლიზოგენური ფაგების გენომის მოდიფიკაცია და შემდგომ, მათი თერაპიაში გამოყენება მოიაზრება.

საქართველოს წყლებიდან გამოყოფილი ფაგების VA7 და MTK უჯრედულ კულტურაზე თერაპიული თვისებების კვლევამ აჩვენა, რომ VA7-ს გააჩნია შედარებით მაღალი ანტიბაქტერიული მოქმედება ვიდრე MTK -ს, ხოლო მათი კომბინირებული გამოყენება VA7-ის მოქმედებას ასუსტებს და მათ ანტაგონისტურ აქტივობაზე მიანიშნებს. ფაგებს შორის ანტაგონიზმი და სხვა ფორმის ურთიერთქმედება მათი კომბინირებული ე.წ. კოქტეილების დანიშვნისას მნიშვნელოვანი ფაქტორია, რომელიც ფაგოთერაპიის სამკურნალო ეფექტს ცვლის და ფაგების დანიშვნამდე უნდა იქნეს გამოკვლეული (Merabishvili, Pirnay, and De Vos 2018).

უჯრედული კვლევის შედეგად ვნახეთ, რომ სიმსივნის წარმოქმნასთან ასოცირებული ციტოკინის, IL-8-ს გამოყოფა ფაგებით დამუშავებულ ინფიცირებულ უჯრედულ კულტურებში კონტროლთან შედარებით შემცირებული იყო, თუმცა ანთებით TNF-a-ზე სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი გავლენა არ გამოვლენილა.

ფაგი UZM3-ის კლინიკური გამოყენება მოხდა ფსევდომონასა და სტაფილოკოკის ფაგებთან ერთად მულტიპათოგენური ოსტეომიელიტის სამკურნალოდ. მიუხედავად იმისა, რომ დადებითი შედეგის მიღწევა ვერ მოხერხდა, ასევე არ გამოვლენილა გვერდითი მოვლენები (Bakurdze et al. 2023). მკურნალობა სადოქტორო კვლევის ნაწილს არ წარმოადგენდა რის გამოც, თერაპიული მსვლელობის დეტალები თეზისში აღწერილი არ არის.

როგორც აღინიშნა, ბაქტერიოდესის სახეობების მიმართ აქტიური ფაგების თერაპიული პოტენციალის ინ ვიტრო და მითუმეტეს, ინ ვივო შესწავლის თაობაზე მონაცემები არ იძებნება. ჩვენს მიერ მიღებული კვლევების მიხედვით, VA7-ს ისევე, როგორც MTK-ს გააჩნიათ თერაპიული ფაგისთვის საჭირო თვისებები. ასპროცენტიანი გენეტიკური მსგავსების მიუხედავად, ისინი განსხვავდებიან ბიოლოგიური თვისებებით და პირველის ბაქტერიციდული ეფექტი აღემატება მეორესას. იმდუნომოდულაციური ცვლილება (რაც დადასტურდა) IL-8-ის შემთხვევაში შესაძლოა, სწორედ ფაგების ანტიმიკრობულ მოქმედებასთან იყოს შეჭიდული. ვინაიდან, სხვადასხვა ინ ვივო კვლევის მიხედვით, IL-8 -ის დონე ეტბგ ტოქსინის გამოყოფასთან ერთად მატულობს (Purcell, Permain, and Keenan 2022; Sun et al. 2005). ჩვენს მიერ ჩატარებულ უჯრედულ ექსპერიმენტში ფაგებით დამუშავებულ ინფიცირებულ საკვლევ ჯგუფებში სავარაუდოდ, ფაგების მიერ ბაქტერიული კონცენტრაციის შემცირებამ განპირობა ეტბგ ტოქსინის კლება და შესაბამისად, IL-8 ის დაბალი გამოყოფა დადებით კონტროლთან შედარებით (DeStefano Shields et al. 2016). 2016 წელს გამოქვეყნებულმა კვლევამ, რომლის დროსაც შეისწავლეს ანტიბიოტიკი ცეფოქსიტინის მოქმედების შედეგად ეტბგ-თან ასოცირებული ნეოპლაზიური წარმონაქმნების რეგრესი ეტბგ შტამით დასნებოვნებულ თაგვებში (DeStefano Shields et al. 2016) დაადასტურა, რომ სწორედ, ბაქტერიული კონცენტრაციის კლებასთან ერთად ხდება ნეოპლაზიის განვითარების შეფერხება და პრევენცია. ამავე კვლევამ აჩვენა, რომ IL-17A, რომელიც Th-17 ლიმფოციტების მიერ გამოიყოფა და წარმოადგენს პროანთებით ციტოკინს და მჭიდროდაა შეჭიდული აღნიშნული სიმსივნის განვითარებასთან (Yao et al. 2016). ნაჩვენებია, რომ NF-κB და p42/44MAPK გზების აქტივაციით, IL-17A ასტიმულირებს IL-8 გამოყოფას (Yao et al. 2016). IL-8 სიმსივნის განვითარებისას მის ანგიოგენეზს (სისხლძარღვების წარმოქმნას) განაპირობებს.

განხილულიდან გამომდინარე, ჩვენი ვარაუდით, IL-8-ის გამოყოფა შესაძლოა ხდებოდეს, როგორც პირდაპირ ტოქსინის საპასუხოდ, ისე არაპირდაპირი გზით IL-17A - ის ანთებითი პროცესის დროს წარმოქმნის შედეგად. შესაბამისად, ორივე მედიატორის

გამოყოფა, ან ტოქსინის ან მისი წარმომქმნელი პათოგენის მიმართ ხდება და ამ უკანასკნელის კონცენტრაციის შემცირებამ უნდა გამოიწვიოს სიმსივნის განვითარების შეფერხება ან პრევენცია.

სადოქტორო კვლევის ფარგლებში ინ ვიტრო ცდებით დადგინდა, რომ ეტბფ და არა-ეტბფ შტამების წინააღმდეგ გამოყოფილი სამი ლითიური ფაგი VA7, MTK და UZM3 უსაფრთხოა არასასურველი გენების ჰორიზონტალური გავრცელების თვალსაზრისით და შესაძლოა წარმატებულად მოხდეს მათი გამოყენება ფაგოთერაპიული მიზნით. VA7-სა და MTK-ს აქვთ პოტენციური ბაქტერიული კონცენტრაციის შემცირების გზით მოახდინონ ეტბფ-ით გამოწვეული სწორი ნაწლავის კარცინომის პრევენცია და გამოყენებულ იქნან, როგორც სიმსივნის საწინააღმდეგო ერთგვარი დამხმარე საშუალება. ამისთვის, საჭიროა შესაბამისი კომპლექსური პრეკლინიკური და კლინიკური კვლევებით ამ ჰიპოთეზის დადასტურება.

## დასკვნები

სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი *B.fragilis* -ის მიმართ აქტიური ბაქტეოფაგები წარმოადგენენ მაღალი სპეციფიკურობისა და მდგრადობის მქონე ლითიურ ფაგებს, არ შეიცავენ ვირულენობის განმაპირობებელ გენებს, მოქმედებენ როგორც ენტეროპათოგენურ, ისე არაენტეროპათოგენურ *B.fragilis* -ის შტამებზე და შესაძლებელია უსაფრთხოდ იქნენ გამოყენებულები აღნიშნული პათოგენის მიერ გამოწვეული ინფექციების სამკურნალოდ.

გენეტიკური თვალსაზრისით, გამოყოფილი ფაგები უნიკალურნი არიან და ერთ, აქამდე უცნობ კლასტერად ერთიანდებიან, რაც ახალი ტაქსონომიური ერთეულის რეგისტრირების წინაპირობაა.

გენეტიკურად და ბიოლოგიურად მონათესავე ფაგების ერთობლივი ე.წ. კოქტეილების გამოყენების დროს აღინიშნება კომპონენტებს შორის ანტაგონიზმის მოვლენა, რომელიც თავს იჩენს არა მხოლოდ ბაქტერიული კულტურაზე ზემოქმედების ეფექტის შემცირებით, არამედ იმუნომოდულატორული ფუნქციის დაქვეითების სახითაც. ეს დაკვირვება უფრო ღრმა შესწავლას მოითხოვს ფაგების ნარეგების შედგენის დროს.

## ბიბლიოგრაფია

- Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Appendix: Methods of Study of Bacterial Viruses. An Interscience Reprint. Interscience Publishers.
- Adriaenssens, E., and J. R. Brister. 2017. "How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide." *Viruses* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/v9040070>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368359>.
- Aitchison, A., F. A. Frizelle, and J. I. Keenan. 2016. "PCR Detection of the *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene Relies on Robust Primer Design." *J Clin Microbiol* 54 (1): 239-40. <https://doi.org/10.1128/JCM.02785-15>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26491187>.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 4 (7): 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229469>.
- Alauzet, C., A. Lozniewski, and H. Marchandin. 2019. "Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review." *Anaerobe* 55: 40-53. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30316817>.
- Alcalá, L., M. Marín, A. Ruiz, L. Quiroga, M. Zamora-Cintas, M. A. Fernández-Chico, P. Muñoz, and B. Rodríguez-Sánchez. 2021. "Identifying Anaerobic Bacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Four-Year Experience." *Front Cell Infect Microbiol* 11: 521014. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.521014>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33968791>.

- Alexopoulos, L. G., J. Saez-Rodriguez, B. D. Cosgrove, D. A. Lauffenburger, and P. K. Sorger. 2010. "Networks inferred from biochemical data reveal profound differences in toll-like receptor and inflammatory signaling between normal and transformed hepatocytes." *Mol Cell Proteomics* 9 (9): 1849-65. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000406>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460255>.
- Arthur, J. C., and C. Jobin. 2011. "The struggle within: microbial influences on colorectal cancer." *Inflamm Bowel Dis* 17 (1): 396-409. <https://doi.org/10.1002/ibd.21354>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848537>.
- Bakuradze, N., K. Makalatia, M. Merabishvili, L. Togoshvili, and N. Chanishvili. 2018. "SELECTION OF THE ACTIVE PHAGES AGAINST B.FRAGILIS FOR FURTHER STUDY OF THRAPEUTIC PERPECTIVES." *Georgian Med News* (285): 111-116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30702082>.
- Bakuradze, Nata, Maia Merabishvili, Ia Kusradze, Pieter-Jan Ceysens, Jolien Onsea, Willem-Jan Metsemakers, Nino Grzelishvili, Guliko Natroshvili, Tamar Tatrishvili, Davit Lazvliashvili, Nunu Mitskevich, Jean-Paul Pirnay, and Nina Chanishvili. 2023. "Characterization of a Bacteriophage GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 Active against *Bacteroides fragilis*" *Viruses* 15, no. 5: 1042. <https://doi.org/10.3390/v15051042><https://doi.org/10.3390/v15051042>
- Balkwill, F. 2002. "Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?" *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (2): 135-41. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(01\)00020-x](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(01)00020-x). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900989>.
- Balkwill, F., K. A. Charles, and A. Mantovani. 2005. "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." *Cancer Cell* 7 (3): 211-7. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.013>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766659>.
- Balkwill, F., and A. Mantovani. 2001. "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357 (9255): 539-45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684>.
- Barfoot, R., S. Denham, L. A. Gyure, J. G. Hall, S. M. Hobbs, L. E. Jackson, and D. Robertson. 1989. "Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph." *Immunology* 68 (2): 233-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2807381>.
- Barr, J. J. 2017. "A bacteriophages journey through the human body." *Immunol Rev* 279 (1): 106-122. <https://doi.org/10.1111/imr.12565>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28856733>.
- Barr, J. J., R. Auro, M. Furlan, K. L. Whiteson, M. L. Erb, J. Pogliano, A. Stotland, R. Wolkowicz, A. S. Cutting, K. S. Doran, P. Salamon, M. Youle, and F. Rohwer. 2013. "Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (26): 10771-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690590>.
- Barr, J. J., R. Auro, N. Sam-Soon, S. Kassegne, G. Peters, N. Bonilla, M. Hatay, S. Mourtada, B. Bailey, M. Youle, B. Felts, A. Baljon, J. Nulton, P. Salamon, and F. Rohwer. 2015. "Subdiffusive motion of bacteriophage in mucosal surfaces increases the frequency of bacterial encounters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (44): 13675-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508355112>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483471>.
- Basset, C., J. Holton, A. Bazeos, D. Vaira, and S. Bloom. 2004. "Are Helicobacter species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease?" *Dig Dis Sci* 49 (9): 1425-32. <https://doi.org/10.1023/b:ddas.0000042241.13489.88>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481314>.
- Basu, R., L. Zhai, A. Contreras, and E. Tumban. 2018. "Immunization with phage virus-like particles displaying Zika virus potential B-cell epitopes neutralizes Zika virus infection of monkey kidney cells." *Vaccine* 36 (10): 1256-1264. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.056>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29395533>.
- Bearden, C. M., A. Agarwal, B. K. Book, C. A. Vieira, R. A. Sidner, H. D. Ochs, M. Young, and M. D. Pescovitz. 2005. "Rituximab inhibits the in vivo primary and secondary antibody response to a neoantigen,



- bacteriophage phiX174." *Am J Transplant* 5 (1): 50-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2003.00646.x>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15636611>.
- Bezirtzoglou, E., and E. Stavropoulou. 2011. "Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora." *Anaerobe* 17 (6): 369-74. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.010>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515397>.
- Blanchi, J., J. Goret, and F. Mégraud. 2016. "Clostridium difficile Infection: A Model for Disruption of the Gut Microbiota Equilibrium." *Dig Dis* 34 (3): 217-20. <https://doi.org/10.1159/000443355>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27028327>.
- Blasius, A. L., and B. Beutler. 2010. "Intracellular toll-like receptors." *Immunity* 32 (3): 305-15. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.012>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346772>.
- Bocian, K., J. Borysowski, M. Zarzycki, P. Wierzbicki, D. Kłosowska, B. Weber-Dąbrowska, G. Korczak-Kowalska, and A. Górski. 2016. "LPS-Activated Monocytes Are Unresponsive to T4 Phage and T4-Generated Escherichia coli Lysate." *Front Microbiol* 7: 1356. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01356>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27630621>.
- Bogdan, M., L. Perić, K. Ördög, D. Vuković, E. Urbán, and J. Sóki. 2018. "The first characterized carbapenem-resistant Bacteroides fragilis strain from Croatia and the case study for it." *Acta Microbiol Immunol Hung* 65 (3): 317-323. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.024>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29651861>.
- Boleij, A., E. M. Hechenbleikner, A. C. Goodwin, R. Badani, E. M. Stein, M. G. Lazarev, B. Ellis, K. C. Carroll, E. Albesiano, E. C. Wick, E. A. Platz, D. M. Pardoll, and C. L. Sears. 2015. "The Bacteroides fragilis toxin gene is prevalent in the colon mucosa of colorectal cancer patients." *Clin Infect Dis* 60 (2): 208-15. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu787>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305284>.
- Booth, S. J., R. L. Van Tassell, J. L. Johnson, and T. D. Wilkins. 1979. "Bacteriophages of Bacteroides." *Rev Infect Dis* 1 (2): 325-36. <https://doi.org/10.1093/clinids/1.2.325>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/398578>.
- Borysowski, J., R. Międzybrodzki, P. Wierzbicki, D. Kłosowska, G. Korczak-Kowalska, B. Weber-Dąbrowska, and A. Górski. 2017. "A3R Phage and Staphylococcus aureus Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation." *Viruses* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/v9020036>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28230780>.
- Borysowski, J., P. Wierzbicki, D. Kłosowska, G. Korczak-Kowalska, B. Weber-Dabrowska, and A. Górski. 2010. "The effects of T4 and A3/R phage preparations on whole-blood monocyte and neutrophil respiratory burst." *Viral Immunol* 23 (5): 541-4. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0001>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883168>.
- Boyanova, L., R. Kolarov, and I. Mitov. 2015. "Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades." *Anaerobe* 31: 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.004>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875330>.
- Brabletz, T., A. Jung, S. Dag, S. Reu, and T. Kirchner. 2000. "[beta-Catenin induces invasive growth by activating matrix metalloproteinases in colorectal carcinoma]." *Verh Dtsch Ges Pathol* 84: 175-81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11217438>.
- Brennan, C. A., and W. S. Garrett. 2016. "Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer." *Annu Rev Microbiol* 70: 395-411. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095513>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27607555>.
- Brücher, B. L., and I. S. Jamall. 2014. "Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm." *BMC Cancer* 14: 331. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-331>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885752>.

- Burger, M., T. Hartmann, J. A. Burger, and I. Schraufstatter. 2005. "KSHV-GPCR and CXCR2 transforming capacity and angiogenic responses are mediated through a JAK2-STAT3-dependent pathway." *Oncogene* 24 (12): 2067-75. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208442>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688008>.
- Canavan, C., K. R. Abrams, and J. Mayberry. 2006. "Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease." *Aliment Pharmacol Ther* 23 (8): 1097-104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02854.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611269>.
- Cassini, A., L. D. Högberg, D. Plachouras, A. Quattrocchi, A. Hoxha, G. S. Simonsen, M. Colomb-Cotinat, M. E. Kretzschmar, B. Devleeschauwer, M. Cecchini, D. A. Ouakrim, T. C. Oliveira, M. J. Struelens, C. Suetens, D. L. Monnet, and Burden of AMR Collaborative Group. 2019. "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis." *Lancet Infect Dis* 19 (1): 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30409683>.
- Ceballos, D., A. Hernández-Camba, and L. Ramos. 2021. "Diet and microbiome in the beginning of the sequence of gut inflammation." *World J Clin Cases* 9 (36): 11122-11147. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i36.11122>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35071544>.
- Cervený, K. E., A. DePaola, D. H. Duckworth, and P. A. Gulig. 2002. "Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice." *Infect Immun* 70 (11): 6251-62. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6251-6262.2002>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379704>.
- Chanishvili, N. 2012. "Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches." *Adv Virus Res* 83: 3-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748807>.
- . 2016. "Bacteriophages as Therapeutic and Prophylactic Means: Summary of the Soviet and Post Soviet Experiences." *Curr Drug Deliv* 13 (3): 309-23. <https://doi.org/10.2174/156720181303160520193946>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090515>.
- Cheng, C. W., H. S. Lin, J. J. Ye, C. C. Yang, P. C. Chiang, T. S. Wu, and M. H. Lee. 2009. "Clinical significance of and outcomes for *Bacteroides fragilis* bacteremia." *J Microbiol Immunol Infect* 42 (3): 243-50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812858>.
- Cheng, W. T., H. K. Kantilal, and F. Davamani. 2020. "The Mechanism of." *Malays J Med Sci* 27 (4): 9-21. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.4.2>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32863742>.
- Cho, M., J. Carter, S. Harari, and Z. Pei. 2014. "The interrelationships of the gut microbiome and inflammation in colorectal carcinogenesis." *Clin Lab Med* 34 (4): 699-710. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.002>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25439270>.
- Chong, C. Y. L., F. H. Bloomfield, and J. M. O'Sullivan. 2018. "Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates." *Nutrients* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/nu10030274>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29495552>.
- Citron, D. M., E. J. Baron, S. M. Finegold, and E. J. Goldstein. 1990. "Short prerduced anaerobically sterilized (PRAS) biochemical scheme for identification of clinical isolates of bile-resistant *Bacteroides* species." *J Clin Microbiol* 28 (10): 2220-3. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.10.2220-2223.1990>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2229345>.
- Cobo, F., J. Borrego, E. Gómez, I. Casanovas, E. Calatrava, C. Foronda, and J. M. Navarro-Marí. 2020. "Clinical Findings and Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated in Bloodstream Infections." *Antibiotics (Basel)* 9 (6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060345>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32575377>.

- Collaborators, Antimicrobial Resistance. 2022. "Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis." *Lancet* 399 (10325): 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35065702>.
- Collaborators, GBD 2019 Diseases and Injuries. 2020. "Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019." *Lancet* 396 (10258): 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33069326>.
- Costello, E. K., C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, and R. Knight. 2009. "Bacterial community variation in human body habitats across space and time." *Science* 326 (5960): 1694-7. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892944>.
- Cuesta, A. M., E. Suárez, M. Larsen, K. B. Jensen, L. Sanz, M. Compte, P. Kristensen, and L. Alvarez-Vallina. 2006. "Enhancement of DNA vaccine potency through linkage of antigen to filamentous bacteriophage coat protein III domain I." *Immunology* 117 (4): 502-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02325.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556264>.
- Dabrowska, K., A. Opolski, J. Wietrzyk, K. Switala-Jelen, J. Godlewska, J. Boratynski, D. Syper, B. Weber-Dabrowska, and A. Gorski. 2004. "Anticancer activity of bacteriophage T4 and its mutant HAP1 in mouse experimental tumour models." *Anticancer Res* 24 (6): 3991-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736444>.
- Dabrowska, K., M. Zembala, J. Boratynski, K. Switala-Jelen, J. Wietrzyk, A. Opolski, K. Szczauraska, M. Kujawa, J. Godlewska, and A. Gorski. 2007. "Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals." *Arch Microbiol* 187 (6): 489-98. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0216-y>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294171>.
- de Kraker, M. E. A., and M. Lipsitch. 2022. "Burden of Antimicrobial Resistance: Compared to What?" *Epidemiol Rev* 43 (1): 53-64. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxab001>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33710259>.
- de Kraker, M. E., A. J. Stewardson, and S. Harbarth. 2016. "Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?" *PLoS Med* 13 (11): e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27898664>.
- Dejea, C. M., P. Fathi, J. M. Craig, A. Boleij, R. Taddese, A. L. Geis, X. Wu, C. E. DeStefano Shields, E. M. Hechenbleikner, D. L. Huso, R. A. Anders, F. M. Giardiello, E. C. Wick, H. Wang, S. Wu, D. M. Pardoll, F. Housseau, and C. L. Sears. 2018. "Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria." *Science* 359 (6375): 592-597. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29420293>.
- Dejea, C. M., E. C. Wick, E. M. Hechenbleikner, J. R. White, J. L. Mark Welch, B. J. Rossetti, S. N. Peterson, E. C. Snosrud, G. G. Borisy, M. Lazarev, E. Stein, J. Vadivelu, A. C. Roslani, A. A. Malik, J. W. Wanyiri, K. L. Goh, I. Thevambiga, K. Fu, F. Wan, N. Llosa, F. Housseau, K. Romans, X. Wu, F. M. McAllister, S. Wu, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, D. M. Pardoll, and C. L. Sears. 2014. "Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (51): 18321-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406199111>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489084>.
- Deng, Z., J. Mu, M. Tseng, B. Wattenberg, X. Zhuang, N. K. Egilmez, Q. Wang, L. Zhang, J. Norris, H. Guo, J. Yan, B. Haribabu, D. Miller, and H. G. Zhang. 2016. "Corrigendum: Enterobacteria-secreted particles induce production of exosome-like S1P-containing particles by intestinal epithelium to drive Th17-mediated tumorigenesis." *Nat Commun* 7: 11348. <https://doi.org/10.1038/ncomms11348>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27063505>.

- DeStefano Shields, C. E., S. W. Van Meerbeke, F. Housseau, H. Wang, D. L. Huso, R. A. Casero, H. M. O'Hagan, and C. L. Sears. 2016. "Reduction of Murine Colon Tumorigenesis Driven by Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Using Cefoxitin Treatment." *J Infect Dis* 214 (1): 122-9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw069>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908749>.
- Dominguez-Bello, M. G., F. Godoy-Vitorino, R. Knight, and M. J. Blaser. 2019. "Role of the microbiome in human development." *Gut* 68 (6): 1108-1114. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30670574>.
- Duan, Y., A. P. Liao, S. Kuppireddi, Z. Ye, M. J. Ciancio, and J. Sun. 2007. "beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation." *Lab Invest* 87 (6): 613-24. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700545>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384665>.
- Durán, A. E., M. Muniesa, L. Mocé-Llivina, C. Campos, J. Jofre, and F. Lucena. 2003. "Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination." *J Appl Microbiol* 95 (1):29-37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807451>.
- Duerkop, B. A., and L. V. Hooper. 2013. "Resident viruses and their interactions with the immune system." *Nat Immunol* 14 (7): 654-9. <https://doi.org/10.1038/ni.2614>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778792>.
- Dufour, N., M. Henry, J. D. Ricard, and L. Debarbieux. 2016. "Commentary: Morphologically Distinct *Escherichia coli* Bacteriophages Differ in Their Efficacy and Ability to Stimulate Cytokine Release In Vitro." *Front Microbiol* 7: 1029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01029>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443304>.
- Dunachie, S. J., N. P. Day, and C. Dolecek. 2020. "The challenges of estimating the human global burden of disease of antimicrobial resistant bacteria." *Curr Opin Microbiol* 57: 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.09.013>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33147565>.
- Durán, A. E., M. Muniesa, L. Mocé-Llivina, C. Campos, J. Jofre, and F. Lucena. 2003. "Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination." *J Appl Microbiol* 95 (1): 29-37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807451>.
- Dąbrowska, K., P. Miernikiewicz, A. Piotrowicz, K. Hodyra, B. Owczarek, D. Lecion, Z. Kaźmierczak, A. Letarov, and A. Górski. 2014. "Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface." *J Virol* 88 (21): 12551-7. <https://doi.org/10.1128/JVI.02043-14>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142581>.
- Eaden, J. A., K. R. Abrams, and J. F. Mayberry. 2001. "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." *Gut* 48 (4): 526-35. <https://doi.org/10.1136/gut.48.4.526>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247898>.
- Farrar, M. A., and R. D. Schreiber. 1993. "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." *Annu Rev Immunol* 11: 571-611. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.003035>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8476573>.
- Fluckiger, A., R. Daillère, M. Sassi, B. S. Sixt, P. Liu, F. Loos, C. Richard, C. Rabu, M. T. Alou, A. G. Goubet, F. Lemaitre, G. Ferrere, L. Derosa, C. P. M. Duong, M. Messaoudene, A. Gagné, P. Joubert, L. De Sordi, L. Debarbieux, S. Simon, C. M. Scarlata, M. Ayyoub, B. Palermo, F. Facciolo, R. Boidot, R. Wheeler, I. G. Boneca, Z. Sztupinszki, K. Papp, I. Csabai, E. Pasolli, N. Segata, C. Lopez-Otin, Z. Szallasi, F. Andre, V. Iebba, V. Quiniou, D. Klatzmann, J. Boukhalil, S. Khelaifia, D. Raoult, L. Albiges, B. Escudier, A. Eggermont, F. Mami-Chouaib, P. Nistico, F. Ghiringhelli, B. Routy, N. Labarrière, V. Cattoir, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2020. "Cross-reactivity between tumor MHC class I-restricted antigens and an

- enterococcal bacteriophage." *Science* 369 (6506): 936-942. <https://doi.org/10.1126/science.aax0701>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32820119>.
- Focà, A., M. C. Liberto, A. Quirino, N. Marascio, E. Zicca, and G. Pavia. 2015. "Gut inflammation and immunity: what is the role of the human gut virome?" *Mediators Inflamm* 2015: 326032. <https://doi.org/10.1155/2015/326032>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944980>.
- Fogelman, I., V. Davey, H. D. Ochs, M. Elashoff, M. B. Feinberg, J. Mican, J. P. Siegel, M. Sneller, and H. C. Lane. 2000. "Evaluation of CD4+ T cell function In vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization." *J Infect Dis* 182 (2): 435-41. <https://doi.org/10.1086/315739>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915073>.
- Foxman, E. F., and A. Iwasaki. 2011. "Genome-virome interactions: examining the role of common viral infections in complex disease." *Nat Rev Microbiol* 9 (4): 254-64. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2541>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407242>.
- Franco, A. A. 2004. "The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island is contained in a putative novel conjugative transposon." *J Bacteriol* 186 (18): 6077-92. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6077-6092.2004>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342577>.
- Fraser, J. S., K. L. Maxwell, and A. R. Davidson. 2007. "Immunoglobulin-like domains on bacteriophage: weapons of modest damage?" *Curr Opin Microbiol* 10 (4): 382-7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.018>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765600>.
- Fraser, J. S., Z. Yu, K. L. Maxwell, and A. R. Davidson. 2006. "Ig-like domains on bacteriophages: a tale of promiscuity and deceit." *J Mol Biol* 359 (2): 496-507. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.043>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631788>.
- Freyberger, H. R., Y. He, A. L. Roth, M. P. Nikolich, and A. A. Filippov. 2018. "Effects of." *Viruses* 10 (11).  
<https://doi.org/10.3390/v10110617>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30413044>.
- Gajdács, M., G. Spengler, and E. Urbán. 2017. "Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology?" *Antibiotics (Basel)* 6 (4).  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics6040025>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29112122>.
- Gao, Q., S. Wu, T. Xu, X. Zhao, H. Huang, and F. Hu. 2019. "Emergence of carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* in China." *Int J Antimicrob Agents* 53 (6): 859-863.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.017>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30831235>.
- García-Aljaro, C., M. Muniesa, and J. Jofre. 2018. "Isolation of Bacteriophages of the Anaerobic Bacteria *Bacteroides*." *Methods Mol Biol* 1693: 11-22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_2).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119428>.
- Garrett, W. S. 2015. "Cancer and the microbiota." *Science* 348 (6230): 80-6.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaa4972>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838377>.
- Gaubin, M., C. Fanutti, Z. Mishal, A. Durrbach, P. De Berardinis, R. Sartorius, G. Del Pozzo, J. Guardiola, R. N. Perham, and D. Piatier-Tonneau. 2003. "Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments." *DNA Cell Biol* 22 (1): 11-8. <https://doi.org/10.1089/104454903321112451>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12590733>.
- Gest, H. 2004. "The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society." *Notes Rec R Soc Lond* 58 (2): 187-201. <https://doi.org/10.1098/rsnr.2004.0055>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15209075>.
- Ghotaslou, R., H. Bannazadeh Baghi, N. Alizadeh, M. Yekani, S. Arbabi, and M. Y. Memar. 2018. "Mechanisms of *Bacteroides fragilis* resistance to metronidazole." *Infect Genet Evol* 64: 156-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.020>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29936037>.

- Gill, D. J., K. M. Tham, J. Chia, S. C. Wang, C. Steentoft, H. Clausen, E. A. Bard-Chapeau, and F. A. Bard. 2013. "Initiation of GalNAc-type O-glycosylation in the endoplasmic reticulum promotes cancer cell invasiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (34): E3152-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305269110>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912186>.
- Goldstein, E. J. C., D. M. Citron, and K. L. Tyrrell. 2018. "In vitro activity of eravacycline and comparator antimicrobials against 143 recent strains of Bacteroides and Parabacteroides species." *Anaerobe* 52: 122-124. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.016>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30018028>.
- Gomaa, E. Z. 2020. "Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review." *Antonie Van Leeuwenhoek* 113 (12): 2019-2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33136284>.
- Goodwin, A. C., C. E. Destefano Shields, S. Wu, D. L. Huso, X. Wu, T. R. Murray-Stewart, A. Hacker-Prietz, S. Rabizadeh, P. M. Woster, C. L. Sears, and R. A. Casero. 2011. "Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic Bacteroides fragilis-induced colon tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (37): 15354-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010203108>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876161>.
- Grivennikov, S. I., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, A. A. Kruglov, B. I. Marakusha, A. N. Shakhov, T. Murakami, L. N. Drutskaya, I. Förster, B. E. Clausen, L. Tessarollo, B. Ryffel, D. V. Kuprash, and S. A. Nedospasov. 2005. "Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects." *Immunity* 22 (1): 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.11.016>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664162>.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann, and M. Karin. 2009. "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer Cell* 15 (2): 103-13. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185845>.
- Guo, Y., Y. Zang, L. Lv, F. Cai, T. Qian, G. Zhang, and Q. Feng. 2017. "IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF- $\kappa$ B pathway in prostate cancer." *Mol Med Rep* 16 (6): 9035-9042. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7747>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29039490>.
- Halaby, D. M., and J. P. Mornon. 1998. "The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity." *J Mol Evol* 46 (4): 389-400. <https://doi.org/10.1007/pl00006318>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9541533>.
- Hay, S. I., P. C. Rao, C. Dolecek, N. P. J. Day, A. Stergachis, A. D. Lopez, and C. J. L. Murray. 2018. "Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance." *BMC Med* 16 (1): 78. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1073-z>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29860943>.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." *Immunology* 115 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819693>.
- Heintz-Buschart, A., and P. Wilmes. 2018. "Human Gut Microbiome: Function Matters." *Trends Microbiol* 26 (7): 563-574. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.002>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29173869>.
- Heuler, J., L. C. Fortier, and X. Sun. 2021. "Clostridioides difficile phage biology and application." *FEMS Microbiol Rev* 45 (5). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab012>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33580957>.
- Hodyra-Stefaniak, K., K. Lahutta, J. Majewska, Z. Kaźmierczak, D. Lecion, M. Harhala, W. Kęska, B. Owczarek, E. Jończyk-Matysiak, A. Kłopot, P. Miernikiewicz, D. Kula, A. Górski, and K. Dąbrowska. 2019. "Bacteriophages engineered to display foreign peptides may become short-circulating phages." *Microb Biotechnol* 12 (4): 730-741. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13414>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037835>.

- Hong, Y., J. Thimmapuram, J. Zhang, C. K. Collings, K. Bhide, K. Schmidt, and P. D. Ebner. 2016. "The impact of orally administered phages on host immune response and surrounding microbial communities." *Bacteriophage* 6 (3): e1211066. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1211066>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27738553>.
- Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. 2012. "Interactions between the microbiota and the immune system." *Science* 336 (6086): 1268-73. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674334>.
- Hua, J., A. Huet, C. A. Lopez, K. Toropova, W. H. Pope, R. L. Duda, R. W. Hendrix, and J. F. Conway. 2017. "Capsids and Genomes of Jumbo-Sized Bacteriophages Reveal the Evolutionary Reach of the HK97 Fold." *mBio* 8 (5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01579-17>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29042498>.
- Hwang, S., S. Y. Gwon, M. S. Kim, S. Lee, and K. J. Rhee. 2013. "Bacteroides fragilis Toxin Induces IL-8 Secretion in HT29/C1 Cells through Disruption of E-cadherin Junctions." *Immune Netw* 13 (5): 213-7. <https://doi.org/10.4110/in.2013.13.5.213>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24198747>.
- Hyman, P., and S. T. Abedon. 2009. "Practical methods for determining phage growth parameters." *Methods Mol Biol* 501: 175-202. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_18). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066822>.
- Ingrassia, I., A. Leplingard, and A. Darfeuille-Michaud. 2005. "Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells." *Appl Environ Microbiol* 71 (6): 2880-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2880-2887.2005>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932981>.
- Ivanenkov, V., F. Felici, and A. G. Menon. 1999. "Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 1448 (3): 450-62. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(98\)00162-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(98)00162-1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990297>.
- Iwagami, Y., S. Casulli, K. Nagaoka, M. Kim, R. I. Carlson, K. Ogawa, M. S. Lebowitz, S. Fuller, B. Biswas, S. Stewart, X. Dong, H. Ghanbari, and J. R. Wands. 2017. "Lambda phage-based vaccine induces antitumor immunity in hepatocellular carcinoma." *Heliyon* 3 (9): e00407. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00407>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28971150>.
- Jahn, M. T., K. Arkhipova, S. M. Markert, C. Stigloher, T. Lachnit, L. Pita, A. Kupczok, M. Ribes, S. T. Stengel, P. Rosenstiel, B. E. Dutilh, and U. Hentschel. 2019. "A Phage Protein Aids Bacterial Symbionts in Eukaryote Immune Evasion." *Cell Host Microbe* 26 (4): 542-550.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.019>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31561965>.
- Jasemi, S., M. Emaneini, Z. Ahmadinejad, M. S. Fazeli, L. A. Sechi, F. Sadeghpour Heravi, and M. M. Feizabadi. 2021. "Antibiotic resistance pattern of Bacteroides fragilis isolated from clinical and colorectal specimens." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 20 (1):27. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00435-w>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33892721>.
- Jean, S., M. J. Wallace, G. Dantas, and C. D. Burnham. 2022. "Time for Some Group Therapy: Update on Identification, Antimicrobial Resistance, Taxonomy, and Clinical Significance of the Bacteroides fragilis Group." *J Clin Microbiol* 60 (9): e0236120. <https://doi.org/10.1128/jcm.02361-20>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35700139>.
- Jentoft, N. 1990. "Why are proteins O-glycosylated?" *Trends Biochem Sci* 15 (8): 291-4. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90014-3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204153>.
- Jofre, J., A. R. Blanch, F. Lucena, and M. Muniesa. 2014. "Bacteriophages infecting Bacteroides as a marker for microbial source tracking." *Water Res* 55: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.006>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583570>.

- Johansson, M. E., M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson. 2008. "The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (39): 15064-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806221>.
- Jończyk-Matysiak, E., M. Łusiak-Szelachowska, M. Kłak, B. Bubak, R. Międzybrodzki, B. Weber-Dąbrowska, M. Żaczek, W. Fortuna, P. Rogóż, S. Letkiewicz, K. Szufnarowski, and A. Górski. 2015. "The Effect of Bacteriophage Preparations on Intracellular Killing of Bacteria by Phagocytes." *J Immunol Res* 2015: 482863. <https://doi.org/10.1155/2015/482863>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26783541>.
- Kawai, T., and S. Akira. 2011. "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* 34 (5): 637-50. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616434>.
- Klumper, L. 2011. "Cytokines, inflammation and colon cancer." *Curr Cancer Drug Targets* 11 (4): 451-64. <https://doi.org/10.2174/156800911795538066>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247378>.
- Ko, S. H., da J Rho, J. I. Jeon, Y. J. Kim, H. A. Woo, Y. K. Lee, and J. M. Kim. 2016. "Bacteroides fragilis Enterotoxin Upregulates Heme Oxygenase-1 in Intestinal Epithelial Cells via a Mitogen-Activated Protein Kinase- and NF- $\kappa$ B-Dependent Pathway, Leading to Modulation of Apoptosis." *Infect Immun* 84 (9): 2541-54. <https://doi.org/10.1128/IAI.00191-16>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27324483>.
- Konstantinidis, T., C. Tsigalou, A. Karvelas, E. Stavropoulou, C. Voidarou, and E. Bezirtzoglou. 2020. "Effects of Antibiotics upon the Gut Microbiome: A Review of the Literature." *Biomedicines* 8 (11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110502>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33207631>.
- Koropatkin, N. M., E. A. Cameron, and E. C. Martens. 2012. "How glycan metabolism shapes the human gut microbiota." *Nat Rev Microbiol* 10 (5): 323-35. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491358>.
- Krag, D. N., G. S. Shukla, G. P. Shen, S. Pero, T. Ashikaga, S. Fuller, D. L. Weaver, S. Burdette-Radoux, and C. Thomas. 2006. "Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries." *Cancer Res* 66 (15): 7724-33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4441>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885375>.
- Kropinski, A. M. 2018. "Practical Advice on the One-Step Growth Curve." *Methods Mol Biol* 1681: 41-47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29134585>.
- Kucharewicz-Krukowska, A., and S. Slopek. 1987. "Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 35 (5): 553-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3455646>.
- Kumar, S., N. Kumari, R. D. Mittal, S. Mohindra, and U. C. Ghoshal. 2015. "Association between pro-(IL-8) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine variants and their serum levels and H. pylori-related gastric carcinogenesis in northern India." *Meta Gene* 6: 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.07.008>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380815>.
- Kuprash, D. V., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, E. P. Koroleva, M. S. Drutskaya, A. A. Kruglov, A. N. Shakhov, E. Southon, W. J. Murphy, L. Tessarollo, S. I. Grivennikov, and S. A. Nedospasov. 2005. "Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches." *Eur J Immunol* 35 (5): 1592-600. <https://doi.org/10.1002/eji.200526119>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15832287>.
- Leclerc, H., S. Edberg, V. Pierzo, and J. M. Delattre. 2000. "Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters." *J Appl Microbiol* 88 (1): 5-21. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00949.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735238>.



- Lehti, T. A., M. I. Pajunen, M. S. Skog, and J. Finne. 2017. "Internalization of a polysialic acid-binding Escherichia coli bacteriophage into eukaryotic neuroblastoma cells." *Nat Commun* 8 (1): 1915. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02057-3>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29203765>.
- Lejeune, F. J. 2002. "Clinical use of TNF revisited: improving penetration of anti-cancer agents by increasing vascular permeability." *J Clin Invest* 110 (4): 433-5. <https://doi.org/10.1172/JCI16493>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12189235>.
- Leung, C. Y. J., and J. S. Weitz. 2017. "Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system." *J Theor Biol* 429: 241-252. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.037>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28668337>.
- Lim, C., E. Takahashi, M. Hongsuwan, V. Wuthiekanun, V. Thamlikitkul, S. Hinjoy, N. P. Day, S. J. Peacock, and D. Limmathurotsakul. 2016. "Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country." *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.18082>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27599374>.
- Limmathurotsakul, D., S. Dunachie, K. Fukuda, N. A. Feasey, I. N. Okeke, A. H. Holmes, C. E. Moore, C. Dolecek, H. R. van Doorn, N. Shetty, A. D. Lopez, S. J. Peacock, and Surveillance and Epidemiology of Drug Resistant Infections Consortium (SEDRIC). 2019. "Improving the estimation of the global burden of antimicrobial resistant infections." *Lancet Infect Dis* 19 (11): e392-e398. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30276-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30276-2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31427174>.
- Lin, J., C. C. Chuang, and L. Zuo. 2017. "Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets." *Oncotarget* 8 (10): 17328-17346. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14461>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061475>.
- Lin, L., and J. Zhang. 2017. "Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases." *BMC Immunol* 18 (1): 2. <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0187-3>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061847>.
- Linden, S. K., P. Sutton, N. G. Karlsson, V. Korolik, and M. A. McGuckin. 2008. "Mucins in the mucosal barrier to infection." *Mucosal Immunol* 1 (3): 183-97. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.5>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079178>.
- Liu, D., X. Y. Jiang, L. S. Zhou, J. H. Song, and X. Zhang. 2016. "Effects of Probiotics on Intestinal Mucosa Barrier in Patients With Colorectal Cancer after Operation: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Medicine (Baltimore)* 95 (15): e3342. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003342>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27082589>.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104 (4): 487-501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00237-9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239407>.
- Lotfi, Z., M. Golchin, A. Khalili-Yazdi, and M. Khalili. 2019. "Immunological properties of the SLLTEVET epitope of Influenza A virus in multiple display on filamentous M13 phage." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 65: 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.05.004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31300131>.
- Lévy, L., C. Neuveut, C. A. Renard, P. Charneau, S. Branchereau, F. Gauthier, J. T. Van Nhieu, D. Cherqui, A. F. Petit-Bertron, D. Mathieu, and M. A. Buendia. 2002. "Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4." *J Biol Chem* 277 (44): 42386-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207418200>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12200448>.
- Majewska, J., Z. Kaźmierczak, K. Lahutta, D. Lecion, A. Szymczak, P. Miernikiewicz, J. Drapała, M. Harhala, K. Marek-Bukowiec, N. Jędruchniewicz, B. Owczarek, A. Górski, and K. Dąbrowska. 2019. "Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered." *Front*

- Immunol* 10: 2607. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02607>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31803179>.
- Marchesi, J. R., and J. Ravel. 2015. "The vocabulary of microbiome research: a proposal." *Microbiome* 3: 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229597>.
- Martens, E. C., H. C. Chiang, and J. I. Gordon. 2008. "Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont." *Cell Host Microbe* 4 (5): 447-57. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.007>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996345>.
- McMahon, S. A., J. L. Miller, J. A. Lawton, D. E. Kerkow, A. Hodes, M. A. Marti-Renom, S. Doulatov, E. Narayanan, A. Sali, J. F. Miller, and P. Ghosh. 2005. "The C-type lectin fold as an evolutionary solution for massive sequence variation." *Nat Struct Mol Biol* 12 (10): 886-92. <https://doi.org/10.1038/nsmb992>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170324>.
- Meng, X., G. Zhang, H. Cao, D. Yu, X. Fang, W. M. de Vos, and H. Wu. 2020. "Gut dysbacteriosis and intestinal disease: mechanism and treatment." *J Appl Microbiol* 129 (4): 787-805. <https://doi.org/10.1111/jam.14661>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32277534>.
- Merabishvili, M., J. P. Pirnay, and D. De Vos. 2018. "Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail." *Methods Mol Biol* 1693: 99-110. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119435>.
- Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114 (2): 181-90. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00521-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00521-x). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887920>.
- Miedzybrodzki, R., K. Switala-Jelen, W. Fortuna, B. Weber-Dabrowska, A. Przerwa, M. Lusiak-Szelachowska, K. Dabrowska, A. Kurzepa, J. Boratynski, D. Syper, G. Pozniak, C. Lugowski, and A. Gorski. 2008. "Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes." *Virus Res* 131 (2): 233-42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.013>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996972>.
- Miernikiewicz, P., K. Dąbrowska, A. Piotrowicz, B. Owczarek, J. Wojas-Turek, J. Kicielińska, J. Rossowska, E. Pajtasz-Piasecka, K. Hodyra, K. Macegoniuk, K. Rzewucka, A. Kopciuch, T. Majka, A. Letarov, E. Kulikov, H. Maciejewski, and A. Górski. 2013. "T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production." *PLoS One* 8 (8): e71036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071036>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23976975>.
- Mikamo, H., K. Monden, Y. Miyasaka, T. Horiuchi, G. Fujimoto, T. Fukuhara, T. Yoshinari, E. G. Rhee, and T. Shizuya. 2019. "The efficacy and safety of tazobactam/ceftolozane in combination with metronidazole in Japanese patients with complicated intra-abdominal infections." *J Infect Chemother* 25 (2): 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.10.012>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30528561>.
- Mirzaei, M. K., and A. S. Nilsson. 2015. "Correction: Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy." *PLoS One* 10 (5): 27 (4): 368-378. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30466900>.
- Murphy, E. C., M. Mörgelin, J. C. Cooney, and I. M. Frick. 2011. "Interaction of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* with the kallikrein-kinin system." *Microbiology (Reading)* 157 (Pt 7): 2094-2105. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046862-0>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527472>.
- Murray, C. J., M. Ezzati, A. D. Flaxman, S. Lim, R. Lozano, C. Michaud, M. Naghavi, J. A. Salomon, K. Shibuya, T. Vos, D. Wikler, and A. D. Lopez. 2012. "GBD 2010: design, definitions, and metrics." *Lancet* 380 (9859):

- 2063-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61899-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61899-6).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245602>.
- Mármol, I., C. Sánchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, and M. J. Rodríguez Yoldi. 2017. "Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer." *Int J Mol Sci* 18 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106826>.
- Monteiro, R., D. P. Pires, A. R. Costa, and J. Azeredo. 2019. "Phage Therapy: Going Temperate?" *Trends Microbiol* 27 (4): 368-378. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30466900>.
- Naylor, N. R., R. Atun, N. Zhu, K. Kulasabanathan, S. Silva, A. Chatterjee, G. M. Knight, and J. V. Robotham. 2018. "Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review." *Antimicrob Resist Infect Control* 7: 58. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0336-y>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713465>.
- Nguyen, S., K. Baker, B. S. Padman, R. Patwa, R. A. Dunstan, T. A. Weston, K. Schlosser, B. Bailey, T. Lithgow, M. Lazarou, A. Luque, F. Rohwer, R. S. Blumberg, and J. J. Barr. 2017. "Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers." *mBio* 8 (6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29162715>.
- Nguyen-Kim, H., Y. Bettarel, T. Bouvier, C. Bouvier, H. Doan-Nhu, L. Nguyen-Ngoc, T. Nguyen-Thanh, H. Tran-Quang, and J. Brune. 2015. "Coral Mucus Is a Hot Spot for Viral Infections." *Appl Environ Microbiol* 81 (17): 5773-83. <https://doi.org/10.1128/AEM.00542-15>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092456>.
- Ning, Y., W. Feng, X. Cao, K. Ren, M. Quan, A. Chen, C. Xu, Y. Qiu, J. Cao, X. Li, and X. Luo. 2019. "Genistein inhibits stemness of SKOV3 cells induced by macrophages co-cultured with ovarian cancer stem-like cells through IL-8/STAT3 axis." *J Exp Clin Cancer Res* 38 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1010-1>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30646963>.
- Odamaki, T., H. Sugahara, S. Yonezawa, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, S. Tanabe, T. Tominaga, H. Togashi, Y. Benno, and J. Z. Xiao. 2012. "Effect of the oral intake of yogurt containing Bifidobacterium longum BB536 on the cell numbers of enterotoxigenic Bacteroides fragilis in microbiota." *Anaerobe* 18 (1): 14-8. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138361>
- Palit, P., R. Das, M. A. Haque, S. Nuzhat, S. S. Khan, T. J. Siddiqua, M. Mahfuz, A. S. G. Faruque, and T. Ahmed. 2022. "Risk Factors for Enterotoxigenic Bacteroides fragilis Infection and Association with Environmental Enteric Dysfunction and Linear Growth in Children: Results from the MAL-ED Study." *Am J Trop Med Hyg* 106 (3): 915-922. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0780>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35100563>.
- Pantosti, A., M. Cerquetti, R. Colangeli, and F. D'Ambrosio. 1994. "Detection of intestinal and extra-intestinal strains of enterotoxigenic Bacteroides fragilis by the HT-29 cytotoxicity assay." *J Med Microbiol* 41 (3): 191-6. <https://doi.org/10.1099/00222615-41-3-191>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8064839>.
- Pascal Andreu, V., H. E. Augustijn, L. Chen, A. Zhernakova, J. Fu, M. A. Fischbach, D. Dodd, and M. H. Medema. 2023. "gutSMASH predicts specialized primary metabolic pathways from the human gut microbiota." *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01675-1>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36782070>.
- Pasparakis, M., L. Alexopoulou, M. Grell, K. Pfizenmaier, H. Bluethmann, and G. Kollias. 1997. "Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (12): 6319-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6319>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177215>.

- Pincus, N. B., J. D. Reckhow, D. Saleem, M. L. Jammeh, S. K. Datta, and I. A. Myles. 2015. "Strain Specific Phage Treatment for Staphylococcus aureus Infection Is Influenced by Host Immunity and Site of Infection." *PLoS One* 10 (4): e0124280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124280>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909449>.
- Pintó, R. M., F. X. Abad, R. M. Roca, J. M. Riera, and A. Bosch. 1991. "The use of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* as indicators of the efficiency of virucidal products." *FEMS Microbiol Lett* 66 (1): 61-5. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90421-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90421-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1936937>.
- Pirnay, J. P., G. Verbeken, P. J. Ceysens, I. Huys, D. De Vos, C. Ameloot, and A. Fauconnier. 2018. "The Magistral Phage." *Viruses* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/v10020064>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29415431>.
- Polk, B. F., and D. L. Kasper. 1977. "Bacteroides fragilis subspecies in clinical isolates." *Ann Intern Med* 86 (5): 569-71. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-86-5-569>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/322563>.
- Popescu, M., J. D. Van Belleghem, A. Khosravi, and P. L. Bollyky. 2021. "Bacteriophages and the Immune System." *Annu Rev Virol* 8 (1): 415-435. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-074551>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34014761>.
- Poulsen, L. K., F. Lan, C. S. Kristensen, P. Hobolth, S. Molin, and K. A. Krogh. 1994. "Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization." *Infect Immun* 62 (11): 5191-4. <https://doi.org/10.1128/iai.62.11.5191-5194.1994>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927805>.
- Prestinaci, F., P. Pezzotti, and A. Pantosti. 2015. "Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon." *Pathog Glob Health* 109 (7): 309-18. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343252>.
- Przerwa, A., M. Zimecki, K. Swiata-Jeleń, K. Dabrowska, E. Krawczyk, M. Łuczak, B. Weber-Dabrowska, D. Syper, R. Miedzybrodzki, and A. Górski. 2006. "Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions." *Med Microbiol Immunol* 195 (3): 143-50. <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0011-4>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447074>.
- Purcell, R. V., J. Pearson, A. Aitchison, L. Dixon, F. A. Frizelle, and J. I. Keenan. 2017. "Colonization with enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is associated with early-stage colorectal neoplasia." *PLoS One* 12 (2): e0171602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171602>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28151975>.
- Purcell, R. V., J. Pearson, F. A. Frizelle, and J. I. Keenan. 2016. "Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*." *Sci Rep* 6: 34554. <https://doi.org/10.1038/srep34554>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686415>.
- Purcell, R. V., J. Permain, and J. I. Keenan. 2022. "Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* activates IL-8 expression through Stat3 in colorectal cancer cells." *Gut Pathog* 14 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s13099-022-00489-x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35468857>.
- Quante, M., J. Varga, T. C. Wang, and F. R. Greten. 2013. "The gastrointestinal tumor microenvironment." *Gastroenterology* 145 (1): 63-78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.052>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583733>.
- Queralt, N., J. Jofre, R. Araujo, and M. Muniesa. 2003. "Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* strain HSP40 and strain RYC2056." *Curr Microbiol* 46 (3): 163-8. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3813-7>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12567237>.
- Remacle, A. G., S. A. Shiryaev, and A. Y. Strongin. 2014. "Distinct interactions with cellular E-cadherin of the two virulent metalloproteinases encoded by a *Bacteroides fragilis* pathogenicity island." *PLoS One* 9 (11):

- e113896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113896>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411788>.
- Reynaud, A., L. Cloastre, J. Bernard, H. Laveran, H. W. Ackermann, D. Licois, and B. Joly. 1992. "Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy." *Vet Microbiol* 30 (2-3): 203-12. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90114-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90114-9).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1532681>.
- Rhee, K. J., S. Wu, X. Wu, D. L. Huso, B. Karim, A. A. Franco, S. Rabizadeh, J. E. Golub, L. E. Mathews, J. Shin, R. B. Sartor, D. Golenbock, A. R. Hamad, C. M. Gan, F. Housseau, and C. L. Sears. 2009. "Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice." *Infect Immun* 77 (4): 1708-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00814-08>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188353>.
- Rice, S. A., C. H. Tan, P. J. Mikkelsen, V. Kung, J. Woo, M. Tay, A. Hauser, D. McDougald, J. S. Webb, and S. Kjelleberg. 2009. "The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage." *ISME J* 3 (3): 271-82. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.109>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19005496>.
- Roach, D. R., C. Y. Leung, M. Henry, E. Morello, D. Singh, J. P. Di Santo, J. S. Weitz, and L. Debarbieux. 2017. "Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen." *Cell Host Microbe* 22 (1): 38-47.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704651>.
- Rothschild, D., O. Weissbrod, E. Barkan, A. Kurilshikov, T. Korem, D. Zeevi, P. I. Costea, A. Godneva, I. N. Kalka, N. Bar, S. Shilo, D. Lador, A. V. Vila, N. Zmora, M. Pevsner-Fischer, D. Israeli, N. Kosower, G. Malka, B. C. Wolf, T. Avnit-Sagi, M. Lotan-Pompan, A. Weinberger, Z. Halpern, S. Carmi, J. Fu, C. Wijmenga, A. Zhernakova, E. Elinav, and E. Segal. 2018. "Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota." *Nature* 555 (7695): 210-215. <https://doi.org/10.1038/nature25973>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489753>.
- Ruan, W., M. A. Engevik, J. K. Spinler, and J. Versalovic. 2020. "Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration." *Dig Dis Sci* 65 (3): 695-705. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32067143>.
- Rudd, K. E., S. C. Johnson, K. M. Agesa, K. A. Shackelford, D. Tsoi, D. R. Kievlan, D. V. Colombara, K. S. Ikuta, N. Kissoon, S. Finfer, C. Fleischmann-Struzek, F. R. Machado, K. K. Reinhart, K. Rowan, C. W. Seymour, R. S. Watson, T. E. West, F. Marinho, S. I. Hay, R. Lozano, A. D. Lopez, D. C. Angus, C. J. L. Murray, and M. Naghavi. 2020. "Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study." *Lancet* 395 (10219): 200-211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31954465>.
- Salzman, N. H., K. Hung, D. Haribhai, H. Chu, J. Karlsson-Sjöberg, E. Amir, P. Tegatz, M. Barman, M. Hayward, D. Eastwood, M. Stoel, Y. Zhou, E. Sodergren, G. M. Weinstock, C. L. Bevins, C. B. Williams, and N. A. Bos. 2010. "Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology." *Nat Immunol* 11 (1): 76-83. <https://doi.org/10.1038/ni.1825>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855381>.
- Schluter, J., and K. R. Foster. 2012. "The evolution of mutualism in gut microbiota via host epithelial selection." *PLoS Biol* 10 (11): e1001424. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001424>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23185130>.
- Schlüter, D., L. Y. Kwok, S. Lütjen, S. Soltek, S. Hoffmann, H. Körner, and M. Deckert. 2003. "Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system." *J Immunol* 170

- (12): 6172-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6172>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794148>.
- Schneikert, J., and J. Behrens. 2007. "The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development." *Gut* 56 (3): 417-25. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.093310>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840506>.
- Schulz, B. L., A. J. Sloane, L. J. Robinson, S. S. Prasad, R. A. Lindner, M. Robinson, P. T. Bye, D. W. Nielson, J. L. Harry, N. H. Packer, and N. G. Karlsson. 2007. "Glycosylation of sputum mucins is altered in cystic fibrosis patients." *Glycobiology* 17 (7): 698-712. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm036>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392389>.
- Sears, C. L. 2009. "Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes." *Clin Microbiol Rev* 22 (2): 349-69, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-08>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366918>.
- Sears, C. L., and W. S. Garrett. 2014. "Microbes, microbiota, and colon cancer." *Cell Host Microbe* 15 (3): 317-28. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629338>.
- Sears, C. L., A. L. Geis, and F. Housseau. 2014. "*Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis." *J Clin Invest* 124 (10): 4166-72. <https://doi.org/10.1172/JCI72334>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105360>.
- Sears, C. L., S. Islam, A. Saha, M. Arjumand, N. H. Alam, A. S. Faruque, M. A. Salam, J. Shin, D. Hecht, A. Weintraub, R. B. Sack, and F. Qadri. 2008. "Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea." *Clin Infect Dis* 47 (6): 797-803. <https://doi.org/10.1086/591130>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680416>.
- Secor, P. R., L. A. Michaels, K. S. Smigiel, M. G. Rohani, L. K. Jennings, K. B. Hisert, A. Arrigoni, K. R. Braun, T. P. Birkland, Y. Lai, T. S. Hallstrand, P. L. Bollyky, P. K. Singh, and W. C. Parks. 2017. "Filamentous Bacteriophage Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Alters the Inflammatory Response and Promotes Noninvasive Infection In Vivo." *Infect Immun* 85 (1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00648-16>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27795361>.
- Shaked, H., L. J. Hofseth, A. Chumanevich, A. A. Chumanevich, J. Wang, Y. Wang, K. Taniguchi, M. Guma, S. Shenouda, H. Clevers, C. C. Harris, and M. Karin. 2012. "Chronic epithelial NF- $\kappa$ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (35): 14007-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211509109>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893683>.
- Shi, Z., Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu, and D. Zhang. 2011. "A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus." *J Biol Chem* 286 (6): 4517-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.159590>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131352>.
- Schooley, R. T., B. Biswas, J. J. Gill, A. Hernandez-Morales, J. Lancaster, L. Lessor, J. J. Barr, S. L. Reed, F. Rohwer, S. Benler, A. M. Segall, R. Taplitz, D. M. Smith, K. Kerr, M. Kumaraswamy, V. Nizet, L. Lin, M. D. McCauley, S. A. Strathdee, C. A. Benson, R. K. Pope, B. M. Leroux, A. C. Picel, A. J. Mateczun, K. E. Cilwa, J. M. Regeimbal, L. A. Estrella, D. M. Wolfe, M. S. Henry, J. Quinones, S. Salka, K. A. Bishop-Lilly, R. Young, and T. Hamilton. 2017. "Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection." *Antimicrob Agents Chemother* 61 (10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28807909>.
- Smith, L. L., R. Buckley, and P. Lugar. 2014. "Diagnostic Immunization with Bacteriophage  $\Phi$ X 174 in Patients with Common Variable Immunodeficiency/Hypogammaglobulinemia." *Front Immunol* 5: 410. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00410>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25221555>.

- Sokoloff, A. V., I. Bock, G. Zhang, M. G. Sebestyén, and J. A. Wolff. 2000. "The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display." *Mol Ther* 2 (2): 131-9. <https://doi.org/10.1006/mthe.2000.0110>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10947940>.
- Sonnenburg, J. L., J. Xu, D. D. Leip, C. H. Chen, B. P. Westover, J. Weatherford, J. D. Buhler, and J. I. Gordon. 2005. "Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont." *Science* 307 (5717): 1955-9. <https://doi.org/10.1126/science.1109051>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790854>.
- Sullivan, J. L., H. D. Ochs, G. Schiffman, M. R. Hammerschlag, J. Miser, E. Vichinsky, and R. J. Wedgwood. 1978. "Immune response after splenectomy." *Lancet* 1 (8057): 178-81. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90612-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90612-8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/74605>.
- Sun, J., M. E. Hobert, Y. Duan, A. S. Rao, T. C. He, E. B. Chang, and J. L. Madara. 2005. "Crosstalk between NF-kappaB and beta-catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289 (1): G129-37. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00515.2004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790758>.
- Sulakvelidze, A. 2005. "Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections." *Drug Discov Today* 10 (12): 807-9. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03441-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03441-0). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970258>.
- Sweere, J. M., J. D. Van Belleghem, H. Ishak, M. S. Bach, M. Popescu, V. Sunkari, G. Kaber, R. Manasherob, G. A. Suh, X. Cao, C. R. de Vries, D. N. Lam, P. L. Marshall, M. Birukova, E. Katznelson, D. V. Lazzareschi, S. Balaji, S. G. Keswani, T. R. Hawn, P. R. Secor, and P. L. Bollyky. 2019. "Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection." *Science* 363 (6434). <https://doi.org/10.1126/science.aat9691>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30923196>.
- Takesue, Y., S. Kusachi, H. Mikamo, J. Sato, A. Watanabe, H. Kiyota, S. Iwata, M. Kaku, H. Hanaki, Y. Sumiyama, Y. Kitagawa, K. Nakajima, T. Ueda, M. Uchino, T. Mizuguchi, Y. Ambo, M. Konosu, K. Ishibashi, A. Matsuda, K. Hase, Y. Harihara, K. Okabayashi, S. Seki, T. Hara, K. Matsui, Y. Matsuo, M. Kobayashi, S. Kubo, K. Uchiyama, J. Shimizu, R. Kawabata, H. Ohge, S. Akagi, M. Oka, T. Wakatsuki, K. Suzuki, K. Okamoto, and K. Yanagihara. 2018. "Antimicrobial susceptibility of common pathogens isolated from postoperative intra-abdominal infections in Japan." *J Infect Chemother* 24 (5): 330-340. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.02.011>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29555391>.
- Tam, J. C., and D. A. Jacques. 2014. "Intracellular immunity: finding the enemy within--how cells recognize and respond to intracellular pathogens." *J Leukoc Biol* 96 (2): 233-44. <https://doi.org/10.1189/jlb.4RI0214-090R>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899588>.
- Tao, P., J. Zhu, M. Mahalingam, H. Batra, and V. B. Rao. 2019. "Bacteriophage T4 nanoparticles for vaccine delivery against infectious diseases." *Adv Drug Deliv Rev* 145: 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.025>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29981801>.
- Tariq, M. A., F. Newberry, R. Haagmans, C. Booth, T. Wileman, L. Hoyles, M. R. J. Clokie, J. Ebdon, and S. R. Carding. 2020. "Genome Characterization of a Novel Wastewater." *Front Microbiol* 11: 583378. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583378>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33193224>.
- Temkin, E., N. Fallach, J. Almagor, B. P. Gladstone, E. Tacconelli, Y. Carmeli, and DRIVE-AB Consortium. 2018. "Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in 2014: a modelling study." *Lancet Glob Health* 6 (9): e969-e979. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30278-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30278-X). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30103998>.
- Thursby, E., and N. Juge. 2017. "Introduction to the human gut microbiota." *Biochem J* 474 (11): 1823-1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512250>.

- Tiwari, B. R., S. Kim, M. Rahman, and J. Kim. 2011. "Antibacterial efficacy of lytic *Pseudomonas* bacteriophage in normal and neutropenic mice models." *J Microbiol* 49 (6): 994-9. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1512-4>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203564>.
- Tsenova, L., A. Bergtold, V. H. Freedman, R. A. Young, and G. Kaplan. 1999. "Tumor necrosis factor alpha is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10): 5657-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5657>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318940>.
- Tsuchida, S., H. Umemura, and T. Nakayama. 2020. "Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology." *Molecules* 25 (20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204775>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33080897>.
- Ulivieri, C., A. Citro, F. Ivaldi, D. Mascolo, R. Ghittoni, D. Fanigliulo, F. Manca, C. T. Baldari, G. Li Pira, and G. Del Pozzo. 2008. "Antigenic properties of HCMV peptides displayed by filamentous bacteriophages vs. synthetic peptides." *Immunol Lett* 119 (1-2): 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.04.004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538862>.
- Ullman, T. A., and S. H. Itzkowitz. 2011. "Intestinal inflammation and cancer." *Gastroenterology* 140 (6): 1807-16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.057>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530747>.
- Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland, and L. V. Hooper. 2011. "The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." *Science* 334 (6053): 255-8. <https://doi.org/10.1126/science.1209791>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998396>.
- Valguarnera, E., and J. B. Wardenburg. 2020. "Good Gone Bad: One Toxin Away From Disease for *Bacteroides fragilis*." *J Mol Biol* 432 (4): 765-785. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.003>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31857085>.
- Van Bellegheem, J. D., F. Clement, M. Merabishvili, R. Lavigne, and M. Vaneechoutte. 2017. "Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages." *Sci Rep* 7 (1): 8004. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08336-9>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808331>.
- Varfolomeev, E. E., and A. Ashkenazi. 2004. "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" *Cell* 116 (4): 491-7. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00166-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00166-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14980217>.
- Wan, Y., Y. Wu, J. Zhou, L. Zou, Y. Liang, J. Zhao, Z. Jia, J. Engberg, J. Bian, and W. Zhou. 2005. "Cross-presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments." *Eur J Immunol* 35 (7): 2041-50. <https://doi.org/10.1002/eji.200425322>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15940671>.
- Weiss, M., E. Denou, A. Bruttin, R. Serra-Moreno, M. L. Dillmann, and H. Brüssow. 2009. "In vivo replication of T4 and T7 bacteriophages in germ-free mice colonized with *Escherichia coli*." *Virology* 393 (1): 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.020>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699505>.
- Wenger, S. L., J. H. Turner, and J. C. Petricciani. 1978. "The cytogenetic, proliferative and viability effects of four bacteriophages on human lymphocytes." *In Vitro* 14 (6): 543-9. <https://doi.org/10.1007/BF02616097>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/680773>.
- Wexler, H. M. 2007. "Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty." *Clin Microbiol Rev* 20 (4): 593-621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934076>.
- Whisner, C. M., and C. Athena Aktipis. 2019. "The Role of the Microbiome in Cancer Initiation and Progression: How Microbes and Cancer Cells Utilize Excess Energy and Promote One Another's Growth." *Curr Nutr*



- Rep* 8 (1): 42-51. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0257-2>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30758778>.
- Wong, S. H. M., C. M. Fang, L. H. Chuah, C. O. Leong, and S. C. Ngai. 2018. "E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications." *Crit Rev Oncol Hematol* 121: 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279096>.
- Wu, S. C., W. T. Chen, C. H. Muo, T. W. Ke, C. W. Fang, and F. C. Sung. 2015. "Association between appendectomy and subsequent colorectal cancer development: an Asian population study." *PLoS One* 10 (2): e0118411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118411>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25710790>.
- Wu, S., K. C. Lim, J. Huang, R. F. Saidi, and C. L. Sears. 1998. "Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (25): 14979-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14979>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844001>.
- Wu, S., P. J. Morin, D. Maouyo, and C. L. Sears. 2003. "Bacteroides fragilis enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation." *Gastroenterology* 124 (2): 392-400. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50047>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12557145>.
- Wu, S., J. Powell, N. Mathioudakis, S. Kane, E. Fernandez, and C. L. Sears. 2004. "Bacteroides fragilis enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor-kappaB pathway." *Infect Immun* 72 (10): 5832-9. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5832-5839.2004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15385484>.
- Wu, S., K. J. Rhee, E. Albesiano, S. Rabizadeh, X. Wu, H. R. Yen, D. L. Huso, F. L. Brancati, E. Wick, F. McAllister, F. Housseau, D. M. Pardoll, and C. L. Sears. 2009. "A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses." *Nat Med* 15 (9): 1016-22. <https://doi.org/10.1038/nm.2015>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701202>.
- Xiong, H., J. Hong, W. Du, Y. W. Lin, L. L. Ren, Y. C. Wang, W. Y. Su, J. L. Wang, Y. Cui, Z. H. Wang, and J. Y. Fang. 2012. "Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition." *J Biol Chem* 287 (8): 5819-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295964>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22205702>.
- Yao, M., G. Brummer, D. Acevedo, and N. Cheng. 2016. "Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity." *Adv Cancer Res* 132: 265-367. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.05.005>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27613135>.
- Wexler, H. M. 2007. "Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty." *Clin Microbiol Rev* 20 (4): 593-621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934076>.
- Yekani, M., M. A. Rezaee, S. Beheshtirouy, H. B. Baghi, A. Bazmani, A. Farzinazar, M. Y. Memar, and J. S6ki. 2022. "Carbapenem resistance in Bacteroides fragilis: A review of molecular mechanisms." *Anaerobe* 76: 102606. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102606>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35738484>.
- Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove. 2009. "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." *Nat Rev Cancer* 9 (11): 798-809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851315>.
- Zhang, C., F. Guo, G. Xu, J. Ma, and F. Shao. 2015. "STAT3 cooperates with Twist to mediate epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells." *Oncol Rep* 33 (4): 1872-82. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3783>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653024>.
- Zhang, L., L. Sun, R. Wei, Q. Gao, T. He, C. Xu, X. Liu, and R. Wang. 2017. "Intracellular Staphylococcus aureus Control by Virulent Bacteriophages within MAC-T Bovine Mammary Epithelial Cells." *Antimicrob Agents*

*Chemother* 61 (2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01990-16>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27919889>.

Zhao, J., Y. Dong, W. Kang, M. Y. Go, J. H. Tong, E. K. Ng, P. W. Chiu, A. S. Cheng, K. F. To, J. J. Sung, and J. Yu. 2014. "Helicobacter pylori-induced STAT3 activation and signalling network in gastric cancer." *Oncoscience* 1 (6): 468-475. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.62>.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594045>.

Zhvania, P., N. S. Hoyle, L. Nadareishvili, D. Nizharadze, and M. Kutateladze. 2017. "Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome." *Front Med (Lausanne)* 4: 94. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00094>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28717637>.

#### გამოქვეყნებული ლიტერატურა:

1. Bakuradze, N., K. Makalatia, M. Merabishvili, L. Togoshvili, and N. Chanishvili. 2018. "SELECTION OF THE ACTIVE PHAGES AGAINST B.FRAGILIS FOR FURTHER STUDY OF THRAPEUTIC PERPECTIVES." *Georgian Med News* (285): 111-116.
2. Bakuradze, N., Merabishvili, M., Makalatia, K., Kakabadze, E., Grdzelishvili, N., Wagemans, J., Lood, C., Chachua, I., Vaneechoutte, M., Lavigne, R., Pirnay, J. P., Abiatari, I., & Chanishvili, N. (2021). In Vitro Evaluation of the Therapeutic Potential of Phage VA7 against Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Infection. *Viruses*, 13(10), 2044. <https://doi.org/10.3390/v13102044>
3. Bakuradze, Nata, Maia Merabishvili, Ia Kusradze, Pieter-Jan Ceyskens, Jolien Onsea, W J Metsemakers, Nino Grdzelishvili, Guliko Natroshvili, Tamar Tatrishvili, Davit Lazvliashvili, Nunu Mitskevich, Jean-Paul Pirnay and Nina Chanishvili. "Characterization of a Bacteriophage GEC\_vB\_Bfr\_UZM3 Active against *Bacteroides fragilis*." *Viruses* (2023): n. pag.