Курсовая работа

на тему:

**Исследование фармакокинетики**

**препаратов бактериофагов**

**на примере пятнистого эублефара (*Eublepharis macularius*)**

Выполнили: *Попов Алексей Алексеевич, Мурзякова Надежда Алексеевна,* ученики 10 «Н» класса   
Специализированного учебно-научного центра (факультета) МГУ им. Ломоносова (СУНЦ им. А. Н. Колмогорова)

Научный руководитель: *Андрей Викторович Летаров,*доктор биологических наук,заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН

Москва, СУНЦ МГУ им. Колмогорова

2015 год

Содержание.

Стр.

1. [**Введение. 3**](#_Toc417889470)
2. [**Литературный обзор. 4**](#_Toc417889471)
3. [**Объекты и методы исследования 6**](#_Toc417889472)
4. [**Объекты исследования 6**](#_Toc417889473)
5. [**Оборудование 7**](#_Toc417889474)
6. [**Реактивы 7**](#_Toc417889475)
7. [**Методика работы 8**](#_Toc417889477)
8. [**Математическая обработка результатов 8**](#_Toc417889478)
9. [**Обсуждение результатов экспериментов. 9**](#_Toc417889479)
10. [**Выводы 10**](#_Toc417889480)
11. [**Список литературы. 11**](#_Toc417889481)

Введение.

В настоящее время ведется активная разработка новых противобактерицидных препаратов. Центральное положение в этой области занимает антибиотикотерапия, т.к. является простым и проверенным средством. Однако антибиотикотерапия имеет ряд недостатков, к которым можно отнести грубое воздействие на организм, и, как следствие, большое количество побочных эффектов, таких как снижение иммунитета, дисбактериоз, ухудшение работы печени и почек, астматические приступы и др. По мере увеличения резистентности бактерий вследствие спонтанных мутаций эффективность антибиотиков снижается. К тому же существует целый ряд изначально резистентных (нечувствительных) к антибиотику бактерий. Это объясняется тем, что у данного штамма (вида) микроорганизма изначально отсутствует структура, на которую действует антибиотик.

По мере затухания антибиотикотерапии идет разработка новых методик борьбы с болезнетворными микроорганизмами, появляются и разрабатываются новые подходы к данной проблеме. Одним из них является *фаговая терапия* или *бактериофагия* (от [древнегреческого](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D1%80%D0%B5%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) φᾰγω — «пожираю») – процесс взаимодействия фага с бактериями, который в конечном итоге приводит к лизису (разложению) бактериальной культуры.

Начиная с двадцатых годов двадцатого века и до настоящего времени продолжается активное изучение бактериофагов. Неоспоримо, что использование фагов является более мягким и продуктивным, нежели применение антибиотиков. Однако на данный момент существует ряд проблем, которые в бактериофагии еще не удалось разрешить.

Основной проблемой бактериофагии является недостаточная изученность физиологии бактериофагов, следствием которой становятся нестабильные результаты лекарств, созданных на их основе. К тому же, как выяснилось в ряду работ зарубежных авторов, бактериофаги имеют очень узкую специализацию, часто их потенциально возможным хозяином становится даже не вид, а 1-2 штамма бактерий. Бактериофаги, искусственно занесенные в организм многоклеточного животного, элиминируют (естественными путями выводятся из организма) спустя очень непродолжительное время, практически не повлияв на исходное количество бактерий.

В данном обзоре мы бы хотели заострить свое внимание на последнем пункте. Одной из актуальных проблем бактериофагии является отбор и искусственное выведение бактериофагов, длительное время находящихся внутри организма. Этому во многом препятствуют процессы элиминации бактериофага из организма; его адсорбции на эритроцитах и последующее оседание в печени и селезенке, где он расщепляется; большое количество бактериофага выводится с мочой.

**Целью** нашего исследования стало искусственным методом отобрать бактериофаг, способный длительное время циркулировать в крови рептилий.

Основные **задачи,** поставленные нами перед началом выполнения практической части работы, можно разделить на четыре пункта**:**

1. Провести обзор и анализ литературы на данную тематику;
2. Исследовать кинетику проникновения модельного бактериофага в кровь и его последующую элиминацию при парентеральном введении в организм пятнистого эублефара;
3. Исследовать возможность отбора мутантов бактериофагов, длительное время циркулирующих в крови геккона;
4. При успешном отборе длительно циркулирующего в крови мутанта идентифицировать произошедшие с ним мутации.

Следует отметить, что по мере выполнения практической части исследовательской работы наши задачи могут частично измениться, что связано, в первую очередь, с успехом отбора длительно циркулирующего в крови бактериофага. Поэтому четвертый пункт можно (и, возможно, стоит) рассматривать как подпункт пункта три в случае его успешного выполнения.

Литературный обзор.

**Микробиология** (от греч. *Micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о микроскопически малых существах, невидимых невооруженным глазом. В настоящее время в микробиологии выделяют большое количество разделов, среди которых самыми обширными и распространенными являются [бактериология](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F), микология и [вирусология](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F).

Термин «вирус» впервые был предложен на границе 19-20 века Бейеринком, (от латинского *virus* - «яд») спустя сорок шесть лет после открытия русским ботаником Д.И. Ивановским инфекционного экстракта растений табака, пораженного мозаичной болезнью [7].

Изначально вирус считался вредителем исключительно животных и растений, однако спустя всего 19 лет была опубликована первая статья о вирусе, поражавшем бактериальные клетки (Фредерик Туорт, 1915 год), а еще через два года Ф. д’Эрелль впервые успешно применил вирусы, поражавшие бактерий, в лечении тяжелых заболеваний у человека (1919 год) [5]. Этому ученому, собственно, и принадлежит термин «бактериофаг» (от [др.-греч.](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D1%80%D0%B5%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA) φᾰγω — «пожираю»), объединивший в себе группу вирусов, избирательно атакующих и поражающих бактериальные клетки.

Основную массу бактериофагов составляют вирусы, относящиеся к порядку Caudovirales (от [лат](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B0%D1%82%D0%B8%D0%BD%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D1%8F%D0%B7%D1%8B%D0%BA)инского *cauda* — «[хвост](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A5%D0%B2%D0%BE%D1%81%D1%82)») – [ДНК-содержащи](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D1%81%D0%BE%D0%B4%D0%B5%D1%80%D0%B6%D0%B0%D1%89%D0%B8%D0%B5_%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%8B)е [бактериофаг](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B0%D0%B3%D0%B8)и, [вирионы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%BE%D0%BD) которых имеют икосаэдрическую форму головки и спиральный хвост. Так же, наряду с двуцепочечными ДНК-содержащими бактериофагами значительное значение имеют РНК-содержащие фаги семейства Leviviridae, а так же нитчатые фаги, содержащие однонитевую ДНК [9].

Прежде чем перейти к строению бактериофага, хотелось бы отметить, что из-за огромного разнообразия бактериофагов можно указать лишь общую для большинства из них структуру. Типичная фаговая частица имеет размеры приблизительно от 10 до 200 нм. Основными её структурами являются головка и хвост. Головка фага состоит из капсида – защитной белковой облочки, окружающей сердцевину, где находится генетический материал; хвост представляет собой сложную структуру, состоящую из сократительного чехла, проходящего внутри него стержня, соединяющего головку с базальной пластинкой, от которой отходят шипы базальной пластинки [4].

Жизненные циклы большинства бактериофагов схожи. Свободная вирусная частица вне клетки называется вирионом. Вирион – защищённое состояние вируса, он состоит из нуклеопротеида, в который входит вирусный геном, и капсида. Взаимодействие фага с клеткой хозяина обычно включает в себя несколько стадий:

1. Умеренные и вирулентные бактериофаги на начальных этапах взаимодействия с бактериальной клеткой имеют одинаковый цикл.
2. Адсорбция бактериофага на фагоспецифических рецепторах клетки.
3. Инъекция фаговой нуклеиновой кислоты в клетку хозяина.
4. Совместная репликация фаговой и бактериальной нуклеиновой кислоты.
5. Деление клетки.
6. Далее бактериофаг может развиваться по двум моделям: лизогенный либо литический путь. Умеренные бактериофаги после деления клетки находятся в состоянии профага (Лизогенный путь). Вирулентные бактериофаги развиваются по Литической модели:
7. Нуклеиновая кислота фага направляет синтез ферментов фага, используя для этого белоксинтезирующий аппарат бактерии. Фаг тем или иным способом инактивирует ДНК и РНК хозяина, а ферменты фага совсем расщепляют её; РНК фага «подчиняет» себе клеточный аппарат синтеза белка.
8. Нуклеиновая кислота фага реплицируется и направляет синтез новых белков оболочки. Образуются новые частицы фага в результате спонтанной самосборки белковой оболочки (капсид) вокруг фаговой нуклеиновой кислоты; под контролем РНК фага синтезируется лизоцим.
9. Лизис клетки: клетка лопается под воздействием лизоцима; высвобождается около 200—1000 новых фагов; фаги инфицируют другие бактерии[1].

Ознакомившись с общими понятиями, перейдем к бактериофагии. Как уже упоминалось ранее, фаготерапия как отрасль науки впервые заявила о себе в 1919 году, а в конце 30-х – начале 40-х годов почти полностью перестала изучаться и применяться на практике из-за появления и массового распространения антибиотиков. Однако за последние 20 лет из-за увеличивающейся резистентности патогенных микроорганизмов к антибактериальным агентам интерес к фаготерапии существенно возрос [10]. Сейчас ведутся исследования по количеству и разнообразию фагов в микрофлоре животных; влиянию фаговой терапии на популяции бактерий в ЖКТ; воздействию искусственно вводимых фагов на бактерии ЖКТ; кинетике проникновения фагов во внутреннюю среду организма; распределению фаговых препаратов в организме с их последствующей элиминацией; динамике взаимодействия фаг-бактерия в процессе фаговой терапии.

Как известно, подавляющее большинство бактериофагов имеет очень узкую специализацию, адсорбируясь даже не на одном виде, а на 1-2 штаммах бактерий одного и того же вида. В таких случаях, как правило, говорят об узкой специфичности фагов к своим хозяевам. Однако в некоторых случаях бактериофаг может инфицировать клетки не только особей одного вида, но и рода в целом. Одним из объяснений такого поведения фага может быть появление его мутантных форм, изначально не адсорбировавшихся на данных клетках. Сейчас этот аспект поведения фагов активно исследуется, т.к. проблема использования бактериофагом альтернативных хозяев является актуальной и имеет большое экологическое значение в фаговой терапии [2].

Влияние фаговой инфекции на бактерии в желудочно-кишечном тракте пока изучено слабо. На данный момент культуральный метод исследования штаммов бактерий является единственным, с помощью которого можно детально проследить динамику развития фага. Однако, макроорганизм несет в себе множество дополнительных факторов, которые невозможно отследить in vitro. Поэтому разумно предположить, что внутри макроорганизма существуют определенные механизмы, стабилизирующие сосуществование фагов и бактерий. Допустим, сейчас уже отслежено, что увеличение специфичности фага достигается ценой уменьшения его адсорбции [6].

Существует несколько основных способов инъекции бактериофагов во внутреннюю среду организма. Разделяют парентеральный (инъекция в кровяной поток) пероральный ( через оральное отверстие), ректальный (в прямую кишку), интраперитонеальный ( непосредственно в брюшину), и др. типы инъекций, различные по своей динамике элиминации бактериофага в зависимости от типа организма, его физиологического состояния, количества и типа штамма бактерий, которыми он заражен и др [8].

Элиминация бактериофага из кровяного русла происходит достаточно быстро. Большое количество бактериофагов поглощается печенью, селезенкой; существенная доля инъецированного бактериофага выходит с мочой. Сейчас идут эксперименты по отбору фаговых частиц с измененным белковым покрытием, которое позволяет им находиться в организме в десятки раз дольше, нежели их предок [2].

Целью фаговой терапии является выведение штамма вирусов вирулентного типа, лавинообразно поражающим вредоносные бактерии макроорганизма. Однако зачастую выходит, что, прежде чем клетка лизирует под воздействием бактериофага, она еще успевает поделиться, причем несколько раз. Из всех экспериментов и исследований, проведенных на протяжении двадцатого века, можно судить лишь о том, что взаимодействия бактерий и специфичных к ним фагов гораздо сложнее, чем может нам представляться

Объекты и методы исследования

Объекты исследования

**Бактериофаг штамма G7C**

Род T4likevirus, к которому относится штамм G7C - один из самых изученных родов вирусов, бактериофаг, поражающий бактерию E. coli Имеет геномную ДНК порядка 169—170 тысяч пар нуклеотидов, упакованную в икосаэдрическую головку. Вирион также имеет ствол, основание ствола и стволовые отростки — шесть длинных и шесть коротких.

T4 является относительно крупным фагом, имеет диаметр около 90 нм и длину около 200 нм. Фаг T4 использует только литический цикл развития, но не лизогенный. Штамм G7C был взят из коллекции лаборатории вирусов микроорганизмов ИНМИ РАН.

**Echerechia coli 4s**

Грамотрицательная палочковидная бактерия, широко встречается в нижней части кишечника теплокровных организмов. Большинство штаммов *E. coli* являются безвредными,

Безвредные штаммы являются частью нормальной флоры кишечника человека и животных. Кишечная палочка приносит пользу организму хозяина, например, синтезируя витамин K, а также предотвращая развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике. Штамм Escherichia coli 4s был взят из коллекции лаборатории вирусов микроорганизмов ИНМИ РАН.

**Пятнистый эублефар**

Длина тела составляет от 25 до 30 см, самки немного меньше. Окраска спины жёлтого, серо-жёлтого или серого цвета. Бока светлые, почти белые. На верхней части головы, на губах, спине и хвосте разбросаны мелкие тёмные пятна неправильной формы. Кроме того, на хвосте иногда заметны два-три поперечных кольца сиреневого цвета. Детёныши имеют иной окрас: на светло-сером, почти белом фоне по всему телу и хвосту идут широкие чёрные поперечные кольца.

Для наших исследований использовались животные, содержавшиеся в террариумах школы «Интеллектуал» Данные животные были выбраны нами, так как имеют ряд важных преимуществ, а именно:

1. Относительно большие размеры;
2. В нашем наличии имеется достаточное количество экземпляров;
3. Все особи являются между собой близкими родственниками, т.е. мы имеем гомогенную популяцию гекконов с очень схожим генетическим материалом;
4. Данный вид легко содержится в террариумах, что помогает избежать возможные технические проблемы в ходе эксперимента.

Стоит отметить, что опыты, посвященные фармакокинетике бактериофагов, проводились в основном на классах млекопитающих (лабораторные мыши, лошади, собаки и др.) и птиц (куры). Проводя подобные эксперименты на рептилиях, мы, с одной стороны составим общий план динамики элиминации фага на данном классе, а с другой сравним полученную динамику с другими классами, что (при наличии каких-либо сильных отклонений), позволит нам сделать вывод об особенностях фармакокинетики бактериофагов на данном классе.

Оборудование и инструменты

Термостат, ламинарный шкаф, холодильник, вортекс, центрифуга, шейкер, пипетки автоматические на 20мкл – 2мл, одноразовые носики для автоматических пипеток, эпендорфы 1,5мл, 2мл, одноразовые пробирки, одноразовые шприцы, чашки Петри, пробирки стеклянные, спиртовки, бактериальные петли.

Реактивы

Agar, east extract, tryptoon, NaCl, вода дистиллированная.

Методика работы

Для выращивания E. coli использовали среду LB следующего состава: East extract 5г, tryptoon 5г, NaCl 4г, Н2О до литра

Для получения лизатов фагов 3-4 мл жидкой среды LB инокулировали культурой со свежей чашки и инкубировали в шейкере – инкубаторе при 37оС и интенсивной аэрации (250 об/мин) в течение 2 ч. После этого заражали культуру единичной бляшкой фага и выращивали в течение ночи. После этого добавляли каплю (ок 50 мкл) хлороформа, встряхивали на вортексе 30 с. и центрифугировали 2 мин при 13 000 об/мин в настольной центрифуге. Супернатант переносили в новую пробирку.

Титрование фагов осуществляли двуслойным методом (по Грациа): для установления титра фага накануне заготовили чашки Петри с 1,5-1,6% нижним агаром, после в пробирки с 2- 2,5 мл мягкого (0,7%) питательного агара, засеяли индикаторный штамм бактерий в жидкой среде. Перед опытом бульонную к-ру бактерий довели до плотности 5x108 клеток/мл, а из исследуемой фаговой суспензии изготовили 10-кратные разведения (10-1 -10-6) на нижнем агаре или буферном р-ре. Затем расплавили мягкий агар, охладили его до 48°С, внесли в него 0,1 мл бульонной к-ры бактерий и 1 мл одного из разведении исследуемого фага. Содержимое пробирки перемешивают и немедля выливают на поверхность 1,5% агара, осторожным покачиванием чашки Петри равномерно распределили мягкий агар по поверхности плотного. Так поступили с несколькими разведениями. Количество разведении зависит от предполагаемой концентрации фаговых частиц в исследуемой суспензии. Чашки инкубируют в термостате при 37°С в течение 16-18 ч, после чего подсчитывали число колоний в тех чашках, где их количество находится в пределах 50 - 250. Число колоний умножают на фактор разведения и получают титр фага. Для большей объективности результатов каждое разведение фага засевали на 2 чашки.

Эксперимент по определению кинетики элиминации фагов проводили следующим образом: животным вводили подкожно 108 Б.О.Е. (бляшкообразующих единиц) фага в 100 мкл физ. раствора (NaCl 9 г., Вода до 1 л) с помощью инсулинового шприца. Через заданные промежутки времени отбирали такими же шприцами кровь из хвостовой вены. Объем образцов крови варьировал от 10 до 30 мкл. Полученный образец крови сразу же разбавляли в 200 мкл стерильного физиологического раствора. Перед титрованием пробы тщательно встряхивали на вортексе и центрифугировали 2 мин при 13 000 об/мин. Числа, полученные нами в результате титрования используем для определения количества оставшегося циркулировать фага. С крайней точки производили отбор бляшек для дальнейшего воспроизведения, используя бактериальную петлю.

Далее добавляем отобранные на предыдущем шаге бляшки в пробирки с 5 мл бактериальной суспензии. Оставляем пробирки на 20 часов в качалке. После этого полученный лизат переливаем в эпендорфы 2мл и центрифугируем. Автоматической пипеткой отбираем жидкую фракцию из них (бульонную культуру фагов) в отдельные пробирки. В бульонной культуре бактерио

Математическая обработка результатов

Полученные в результате проведения эксперимента данные подвергались общей математической обработке. Математическая обработка данных проводилась с помощью пакета Microsoft Excel.

Обсуждение результатов экспериментов.

Наше исследование подразумевало отбор длительно циркулирующих мутантов бактериофагов в большом количестве повторностей и параллельное изучение особенностей циркуляции бактериофагов в крови гекконов. Для этого мы пользовались простейшими методиками, представленными нами ранее. Всего было проведено 5 повторений эксперимента. Хочется заметить, что в нашей работе велика доля погрешности. Она может составлять до 7% от всей кривой вследствие малого размера подборки (до 4 животных).

Кривые графиков выражают отношение данной концентрации фага к нулевой.

В первых экспериментах было обнаружено, что концентрация крови в крови гекконов быстро повышается после инъекции и достигает пика через 10 мин. Однако затем происходит быстрая элиминация фагов, максимальная длительность их циркуляции на данном этапе крайне мала. Она составляла всего 6 часов. По истечении этого времени бактериофаг наблюдался лишь в следовых концентрациях. При этом уменьшение численности фага происходило практически по графику натурального логарифма. (Рис. 1) Далее нами был произведён отбор фагов из двух последних чашек (11 и 5 бляшек) и последующее их размножение. На основе них был получен препарат G7Cv1, который использовался для последующей инокуляции гекконов. На данном этапе сильной дифференцировки бактериофагов внутри штамма обнаружено не было.

После второй инъекции бактериофага в организм геккона не было получено сильного увеличения длительности его циркуляции. Поэтому график его элиминации не представлен в работе. Но нами было выявлено то, что распространение фага по организму геккона происходит достаточно быстро (до 3 минут) вследствие его небольших размеров.

Третья инъекция бактериофага дала интересные результаты. Для неё использовался опять же бактериофаг G7Cv1. И во-первых длительность его циркуляции увеличилась до 12 часов, что само собой доказывает состоятельность нашей методики и возможность искусственного отбора долгоживущих мутантов бактериофагов. Также были выявленны две морфы фагов: фаги, которые быстро снизили свою численность, но продолжили выявляться в крови достаточно долго (G7Cv2.1), и фаги, которые повышали свою численность после инъекции, а потом элиминировали с нормальной скоростью (G7Cv2.2) (Рис. 2). Мы провели их отбор и в дальнейших экспериментах использовали обе эти морфы фагов.

Четвёртая инъекция показала нам, что различия между морфами G7Cv2.1 и G7Cv2.2 достаточно малозаметны при увеличении длительности циркуляции почти в полтора раза (Рис. 3). Максимальная длительность циркуляции определена не была вследствие того, что интервал времени, за который мы ожидали полную элиминацию фага, оказался слишком мал. Однако с крайней точки всё же был произведён отбор долгоживущих мутантов (G7Cv3.1 и G7Cv3.2) для использования их в дальнейших экспериментах.

Пятая инъекция бактериофагов дала ещё более интересные результаты. В ходе эксперимента было использовано четверо животных, недавно вышедших из спячки. Их организм всё ещё находился при температуре 20 °C вместе с двумя животными, температура тела которых была в привычном диапазоне 36-37°C. В ходе высевания образцов крови, отобранных у гекконов, было выявлено то, что длительность циркуляции бактериофага в крови животных, выведенных из спячки, была в разы больше, чем длительность циркуляции в крови гекконов при нормальной температуре. Также было произведено сравнение новых фаговых препаратов с изначальным, было показано то, что скорость элиминации на начальных точках больше у новых препаратов, но с течением времени эти кривые сглаживаются и пересекают кривую изначального препарата. Максимальная длительность циркуляции находится в области двух дней (Рис. 4).

Таким образом нам удалось произвести искусственный отбор бактериофагов, длительность циркуляции которых превышает длительность циркуляции изначального бактериофага в 8 раз. (Рис. 5) Наши бактериофаги имеют различия в динамике циркуляции. Штаммы vn.1 быстро уменьшают свою численность, но потом могут долго выявляться в крови гекконов в малых концентрациях. Штаммы vn.2 уменьшают свою численность гораздо медленнее, но в конце концов приходят к тем же количественным значениям, что и из первого штамма. Конечно же второй морфотип бактериофагов будет на практике предпочтительнее для лечения тяжёлых бактериальных заболеваний, фаги же первого морфотипа могут применяться для профилактики таких заболеваний.

Также, основываясь на результатах пятого эксперимента, можно сказать, что длительность циркуляции бактериофага во многом зависит от физиологического состояния организма геккона. Отличие пресмыкающихся от ранее изученных классов животных заключается в возможности изменения их температуры тела. От неё же во многом зависит и скорость элиминации бактериофагов. Так при увеличении температуры тела геккона наблюдается ускорение элиминации бактериофага, вследствие повышения активности имунной системы. При уменьшении температуры геккона наблюдается обратная тенденция (Рис. 6).

Замечено, что гекконы, на которых неделей ранее проводились эксперименты, проявляют большую элиминационную активность, чем иные животные. Возможно, это уходит корнями к формированию у них естественного приобретённого иммунитета к фаговым препаратам несмотря на то, что они не причиняют никакого вреда организму ящериц. (Рис. 7) Однако, такая реакция бывала только, если предварительно гекконам были введены большие концентрации фаговых препаратов (порядка 1012 БЕ/мл). Иммунитет затухает спустя пару недель.

Сейчас проводятся последние эксперименты с бактериофагом на гекконах. В дальнейшем, при получении положительных результатов, мы планируем произвести точечное секвенирование белков капсида фага, отвечающих за его элиминацию, для выявления мутаций, произошедших с ними. Также планируется произвести эксперименты с использованием данного бактериофага на млекопитающих для сравнения изменения скорости элиминации мутантов на данном классе.

Выводы

1. Скорость элиминации бактериофага из крови геккона зависит от температуры его тела. При больших температурах достигается меньшая длительность циркуляции бактериофага. И, наоборот, при уменьшении температуры тела геккона наблюдается увеличение длительности его циркуляции;
2. Организм геккона вырабатывает естественный приобретённый иммунитет к фаговым частицам;
3. Фаговые препараты достаточно быстро разносятся по всей кровеносной системе геккона (меньше 3 минут);
4. Нам удалось, используя методику искусственного отбора фага, получить разновидность, способную длительно циркулировать в организме животного;
5. Для лучшей оценки динамики элиминации фага необходимо ещё большое количество экспериментов в разных условиях

Список литературы.

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология. Иммунология. Вирусология. М. : Мед. информ. агентство, 2005;
2. Летаров А. В., Голомидова А. К., Тарасян К. К. Экологические основы рациональной фаговой терапии: Acta Naturae, 2010. – Т. 2. – №. 1. – С. 66-79;
3. Лысак В.Н. Микробиология. Мн.: Изд-во БГУ, 2007;
4. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология: В 3-х т. М.: Мир, 1990–2005;
5. Dimmocd N.J., Easton, Andrew J., Leppard, Keith. Introduction to Modern Virology: Blackwell Science, 2001;
6. Kutter E. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics: Evergreen State College, Olympia, 1997;
7. d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C.:Ac. Sciences, t. CLXV, 10 ‬septembre 1917;
8. Increased the level of serotonin: Eric J. Nestler, Steven E. Hyman, and Robert C. Malenka, Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, 2nd ed. New York: McGraw-Hill Companies, Medical Pub. Division, 2008;
9. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL et al. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 17;
10. Pirisi A. Phage therapy - advantages over antibiotics?: The Lancet. – 2000. – Т. 356. – №. 9239. – С. 1418.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Рисунок 1

Рисунок 2

Рисунок 3

Рисунок 4

Рисунок 5

Рисунок 6

Рисунок 7