



אוניברסיטת תל-אביב

בית הספר למדעי הסביבה וכדור הארץ ע"ש פורטר

עבודת תזה בנושא:

קטילת החיידק *Pseudomonas aeruginosa* המאופיין בזיהומי כוויות , באמצעות
שדות חשמליים.

חיבור זה הוגש כחלק מהדרישות לקבלת התואר

"מוסמך אוניברסיטה" - M. Sc. באוניברסיטת תל-אביב

על ידי: אנדריי איתן רובין- 321991663

העבודה הוכנה בהדרכתם של:

ד"ר אלכסנדר גולברג , בית הספר לסביבה ומדעי כדור הארץ ע"ש פורטר, אוניברסיטת תל
אביב.

פרופ' אליאורה רון, המחלקה למיקרוביולוגיה מולקולרית וביוטכנולוגיה, הפקולטה למדעי
החיים, אוניברסיטת תל אביב.

אוקטובר 2018



" המדע נבנה מעובדות, בדיוק כפי שבית נבנה מלבנים - אבל ערימת עובדות עדיין איננה מדע, כשם שערימת לבנים איננה בית."

הנרי פואנקרה (1854-1912)

מתמטיקאי, פיזיקאי עיוני ופילוסוף של המדע, צרפת.

תודות:

ברצוני להודות לד"ר אלכסנדר גולברג על ההזדמנות להשתתף במחקר חדשני ומרתק מסוגו, על ההכוונה האישית והעמידה על פרטים. אין ספק שבמהלך העבודה המשותפת למדתי ורכשתי המון כלים פרקטיים ואסטרטגיים שקשורים למחקר ואני בטוח שגם בהמשך אסתייע בהם רבות. בנוסף, אני רוצה להודות על ההזדמנות להגיע למעבדת המחקר בבית החולים שריינרס, בוסטון ארה"ב, בו ביצעתי את המחקר בחיות מעבדה ועל החוויה המיוחדת והמלמדת שהייתה לי שם.

תודה לפרופ' אליאורה רון על כך שעזרה לכוון אותי במחקר בתחום המיקרוביולוגיה והבנת המורכבות של מערכות ביולוגיות. היחס החם ויכולת ההקשבה הנחילו בי את הביטחון להעז.

מהנדס המעבדה ד"ר קלמנטי לבקוב שלימד אותי רבות על חשיבה מערכתית ותכנון נכון של מערכות ניסוי ונתן לי כלים רבים מתחום ההנדסה והנדסת החשמל בפרט ליישום אופטימלי של המודלים החשמליים

ד"ר מנג'י וו מבית החולים שריינרס, בוסטון ארה"ב על חודש רווי למידה והכרות עם טכניקות של עבודה בחיות מעבדה.

מנהלת המעבדה רותי גוטליב על התמיכה לאורך הדרך והסיוע בקישור עם מעבדות חברות. מארק פוליקובסקי שעזר רבות בתחילת הדרך ונתן לי את היסודות לעבודה מיקרוביאלית במעבדה

על כל אלו, תודה גדולה לי אליכם.

אנדריי.

תוכן עניינים:

11.....	מבוא	1.
11.....	עור, רקע כללי	1.1
12.....	כוויות, סקירה כללית ומגמות עולמיות	1.2
15.....	מחלות נוזוכומליות (Nosocomial): מחלות שמקורן בבית החולים	1.3
15.....	חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה - מגמות התופעה ודרכי התמודדות	1.4
18.....	מנגנוני האלימות של חיידק <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.5
19.....	חיידקי הפלורה הטבעית של העור ו- <i>Staphylococcus epidermidis</i> כנציג מהקבוצה	1.6
20.....	אלקטרופורזיה PEF-	1.7
22.....	מושגי יסוד בשדה חשמלי ופעילותו על הממברנה החיידקית	1.7.1
25.....	האלקטרודה הקונצנטרית (Concentric single electrode)	1.7.2
26.....	מחולל הפולסים (Pulse generator system)	1.7.3
27.....	השפעת מאפייני התא על תהליך האלקטרופורזיה	1.7.4
27.....	מורפולוגיה	1.7.4.1
28.....	סוג ממברנה	1.7.4.2
28.....	שימוש באנטיביוטיקה לקטילת חיידקים	1.8
29.....	השערת המחקר	2.
30.....	שיטות	3.
30.....	ניסוי ב- <i>In vitro</i>	3.1
30.....	הכנת מצע וגידול החיידקים	3.1.1
31.....	יישום שיטת האלקטרופורזיה:	3.1.2
31.....	מהלך הניסוי	3.1.2.1
32.....	מדידת הזרם החשמלי באמצעות PicoScope	3.1.2.2
32.....	שימוש בפולס גנרטור מסוג BTX ובניית מודל Taguchi	3.1.2.3
33.....	שימוש בפולס גנרטור מסוג-	3.1.2.4
33.....	IGBT- (insulated-gate bipolar transistor)	
34.....	שילוב של שיטת האלקטרופורזיה עם הוספת אנטיביוטיקה	3.1.3
36.....	אנליזות הנתונים-Imaging	3.1.4
36.....	ניתוח סטטיסטי	3.1.5
36.....	ניסוי ב- <i>Ex vivo</i>	3.2
36.....	גידול החיידקים	3.2.1
37.....	מערכת הניסוי ב- <i>Ex vivo</i>	3.2.2
37.....	יישום שיטת האלקטרופורזיה	3.2.3

38.....	אנליזת הנתונים-Imaging	3.2.4
38.....	ניתוח סטטיסטי	3.2.5
38.....	ניסוי ב- <i>In vivo</i>	3.3
38.....	גידול החיידקים	3.3.1
39.....	מערכת הניסוי ב- <i>In vivo</i>	3.3.2
39.....	יישום שיטת האלקטרופורציה	3.3.3
40.....	אנליזת הנתונים-Imaging	3.3.4
41.....	ניתוח סטטיסטי	3.3.5
42.....	תוצאות	4.
42.....	ניסוי ב <i>In-vitro</i>	4.1
42.....	ניסוי כיול על פי Taguchi עם מכשיר ה-BTX	4.1.1
46.....	בחינת הפעילות של מחולל הפולסים IGBT	4.1.2
52.....	השפעת אנטיביוטיקה	4.1.3
57.....	ניסוי ב <i>Ex-vivo</i>	4.2
59.....	ניסוי ב <i>In-vivo</i>	4.3
63.....	דיון ומסקנות	5.
63.....	דיון בתוצאות הניסוי בתנאי <i>In vitro</i>	5.1
63.....	ניסוי Taguchi	5.1.1
63.....	ניסוי IGBT	5.1.2
63.....	ניסוי אנטיביוטיקה	5.1.3
64.....	דיון בתוצאות הניסוי בתנאי <i>Ex vivo</i>	5.2
64.....	דיון בתוצאות הניסוי בתנאי <i>In vivo</i>	5.3
65.....	מחקר להמשך	6.
66.....	ביבליוגרפיה	7.

רשימת איורים:

11	איור 1: מודל עור באדם.....
13	איור 2: היסטולוגיה של עור פצוע וחדירת החיידקים לעומק.....
19	איור 3: מגוון מנגנוני האלימות של החיידק <i>P. aeruginosa</i>
21	איור 4: מודל ממוחשב של ממברנה דו שכבתית בהשפעת שדה חשמלי.....
22	איור 5: חיידקי ה- <i>L. casei</i> לפני (משמאל) ואחרי (ימין) חשיפה לשדה חשמלי (באר של 2µm).....
22	איור 6: מעגל חשמלי בסיסי.....
23	איור 7: פיזור השדה באלקטרודה קונצנטרית (גליל שבמרכזו אלקטרודה פנימית-מחט ובסיסו במגע עם המשטח).....
23	איור 8: סכמת המעגל החשמלי של מערכת הניסוי.....
24	איור 9: פולסים מונו/בי פולריים והשפעתם על תאים.....
26	איור 10: האלקטרודה הקונצנטרית.....
27	איור 11: מורפולוגיית התאים וגודלם-קוקי (כדורי) ומתג.....
27	איור 12: אזורי ההשפעה של שדה חשמלי כתלות בכיוון השדה וצורת התא.....
28	איור 13: השוני בממברנה בין חיידקי גרם חיובי ושלילי.....
	איור 14: מערכת הפיקוסקופ למדידת הזרם החשמלי וקריאת הפולס המתקבל ממחולל הפולסים (מימין-הפרוב שמודד את השדה, משמאל-קופסאת העיבוד שממירה את המדידה לעוצמת הזרם).....
32	איור 15: מחולל הפולסים מסוג BTX 830.....
35	איור 16: מערך ניסוי האנטיביוטיקה בצלחת פטרי.....
38	איור 17: מערכת הדימות Maestro in vivo fluorescence imaging.....
40	איור 18: מערכת הדימות IVIS Lumina (series III).....
41	איור 19: סכמת הניסוי In vivo.....
46	איור 20: קטילת החיידקים בהשפעת השדה החשמלי וגבול ההשפעה שלו (צילום המיקרוסקופ אור x5.6).....
	איור 21: רדיוס העיכוב כפי שהתקבל הטיפולים המשולבים עם ריכוז מיהול אנטיביוטיקה נמוך (1/2) Dil1 (1/2) Dil5 (1/20)-דוגמאות נבחרות.....
53	איור 22: פרגמנט של עור מזוהם בחיידק <i>P. aeruginosa</i> לפני טיפול.....
57	איור 23: פרגמנט של עור מזוהם לאחר הטיפול ב PEF (אזורים מטופלים מסומנים).....
57	איור 24: בחירת ROI-regions of interest במרכז האלקטרודה הקונצנטרית.....

רשימת טבלאות:

13	טבלה 1: דרגות כוויה בעור.....
17	טבלה 2: רשימת חידקים עמידים לאנטיביוטיקה ודחיפות הטיפול בהם.....
20	טבלה 3: רשימה חלקית של חידקי הפלורה הטבעית של העור.....
30	טבלה 4: נוטריונים להכנת 150 מ"ל של המצע ELS.....
34	טבלה 5: פרמטרים בניסוי של מחולל הפולסים מסוג IGBT.....
35	טבלה 6: מהולי מיקס האנטיביוטיקה Penicillin-Streptomycin-Nystatin.....
37	טבלה 7: מערכת הפרמטרים החשמליים בניסוי על עור העוף.....
39	טבלה 8: מערך הפרמטרים לניסוי <i>In vivo</i>
42	טבלה 9: סיכום תוצאות ניסוי Taguchi.....
43	טבלה 10: פלט מעובד של מידת השפעת הפרמטרים על פי Taguchi ודירוג מידת ההשפעה שלהם.....
46	טבלה 11: סיכום תוצאות ניסוי Taguchi.....
51	טבלה 12: פלט ה t-test עבור הניסוי של מחולל הפולסים מסוג IGBT.....
56	טבלה 13: מבחן סטטיסטי t-test של תוצאות הניסוי לטיפול משולב על החיידק <i>P. aeruginosa</i> (n=63).....
56	טבלה 14: תוצאות המבחן הסטטיסטי t-test בניסוי הטיפול המשולב על החיידק <i>S. epidermidis</i> (n=36).....

רשימת גרפים:

גרף 1: אזורי ההשפעה של השדה החשמלי כתלות בעוצמתו (ציר x עוצמת שדה, ציר y אחוז המעטפת הממברנלית המושפע מהשדה) A שדה בי-פולרי, B שדה מונו-פולרי.	25
גרף 2: דעיכה אקספוננציאלית של השדה באלקטרודה קונצנטרית (מחושב)	26
גרף 3: פלט מידת ההשפעה של הפרמטרים על פי ניתוח Taguchi (ציר x-מספר החזרה, מתוך 3.	43
גרף 4: קורלציית הקשר בין אורך הפולס והשדה החשמלי הקריטי	44
גרף 5: קורלציית הקשר בין מספר הפולסים והשדה החשמלי הקריטי	44
גרף 6: קורלציית הקשר בין האינטרוולים והשדה החשמלי הקריטי	45
גרף 7: קורלציית הקשר בין האנרגייה הכללית לבית השדה החשמלי הקריטי	45
גרף 8: עוצמת השדה החשמלי כתלות בפרמטרים משתנים (כללי). מתח קבוע של 1000V.	47
גרף 9: גודל רדיוס העיכוב כתלות בפרמטרים משתנים (כללי). מתח קבוע של 1000V.	48
גרף 10: התפלגות השדה החשמלי הקריטי כתלות במספר הפולסים (בתוך הקבוצות) ובין אורך הפולס (בין הקבוצות)	49
גרף 11: עוצמת השדה החשמלי כתלות בתדירות הפולס ב Hz.	50
גרף 12: קורלציית הקשר בין שדה חשמלי קריטי והאנרגייה הכללית המושקעת בתהליך	51
גרף 13: עוצמת השדה הקריטי כתלות בסוג הטיפול (PEF בלבד, אנטיביוטיקה בלבד והטיפול המשולב) בחיידק <i>P. aeruginosa</i>	53
גרף 14: עוצמת השדה החשמלי הקריטי כתלות בסוג הטיפול (PEF בלבד, אנטיביוטיקה בלבד והטיפול המשולב) בחיידק	54
גרף 15: גרף מסכם של הניסוי לטיפול המשולב בחיידק <i>P. aeruginosa</i> ו <i>S. epidermidis</i>	55
גרף 16: אחוז הירידה של עוצמת השטף כתוצאה מהטיפול ב PEF	58
גרף 17: דינאמיקת השטף (באחוזים) של פצע מזוהם ללא טיפול	60
גרף 18: דינאמיקת השטף (באחוזים) בעכברים מקבוצת ה-500V	61
גרף 19: דינאמיקת השטף (באחוזים) בעכברים מקבוצת ה-700V	62

רשימת משוואות:

משוואה 1: חישוב השדה החשמלי האפקטיבי	24
משוואה 2: חישוב השדה החשמלי	25
משוואה 3: חישוב השדה החשמלי הקריטי	25
משוואה 4: חישוב האנרגייה הכללית במערכת	26

תקציר:

גילוי האנטיביוטיקה פניצילין ע"י אלכסנדר פלמינג בשנת 1928 הווה תפנית דרמטית בעולם הרפואה ועזר להציל מיליוני אנשים מזיהומים שמקורם בחיידקים מחוללי מחלה. הודות למחקר והיצור התעשייתי המסיבי, האנטיביוטיקה הפכה במהרה לתרופה זמינה בעלת שימוש רווח מאד ולעיתים לא מפוקח. כמויות גדולות של אנטיביוטיקה זלגו לסביבה דרך מערכות הביוב ובמהרה, נתגלה כי גם החיידקים למודי הניסיון בעולם משיבים מלחמה. זנים של חיידקים עמידים לאנטיביוטיקות נתגלו ברחבי העולם עם מגמה הולכת וגדלה של אנטיביוטיקות שהפסיקו להיות אפקטיביות כנגדם. מקטעי ה-DNA שמקודדים למנגנוני העמידות נמצאים על יחידה ניידת הקרויה פלסמיד וניתנים להעברה דרך מנגנון הפילי בין זני החיידקים השונים מה שהופך את העמידות לאתגר מורכב עוד יותר. בתגובה לפיתוח העמידות מצד החיידקים הפתוגניים, מדענים סנתזו אנטיביוטיקות מלאכותיות המבוססות על הנגזרות הטבעיות של אנטיביוטות הקיימות, אך במרוץ החימוש הזה, זה רק עניין של זמן עד שהחיידקים יפתחו גם כנגדם מנגנוני עמידות והקרב נראה אבוד מראש. אחד התחומים בהם הבעיה אקוטית במיוחד היא תחום זיהומי הכוויות. חולים שסובלים מכוויות הם חולים עם שטחים גדולים של רקמה חשופה לזיהומים ובהעדר הגנה טובה של העור חולים אלו נוטים לפתח זיהומים חמורים בקלות. חיידק ה- *Pseudomonas aeruginosa* הוא אחד מן החיידקים הנפוצים ביותר, שבודדו מחולים הסובלים מזיהומי כוויות. הודות ליכולת העמידות שלו והשרידות שלו בסביבת בית החולים הוא הפך לאחת מן המטרות המרכזיות בניסיון ההתמודדות עם הזיהומים. על מנת לפתור את בעיית הטיפול בחיידקים העמידים, כדוגמת ה- *Pseudomonas aeruginosa* אנו מציעים שימוש בשיטת האלקטרופורציה. השימוש בשיטת זו יוצר מיקרו-קרעים בממברנה החיידקית וגורמים לליזיס התא.

תחילה, על מנת לכייל את המערכת של המחולל הפולסים נבנה מטריקס טאגוצ'י (שיטה השוואתית הבוחנת את עוצמת ההשפעה של פרמטרים בדידים בתהליך ומגדירה מי מבניהם הוא הפרמטר המשמעותי ביותר למקסום היעילות של תהליך). מטריקס זה בחן את ארבעת הפרמטרים של הפולס: מתח חשמלי, אורך הפולס, מספר הפולסים וההפסקות בין הפולסים (תדירות). על סמך הניסויים גילינו כי הפרמטר של אורך הפולס הוא הפרמטר המשפיע ביותר בטווח המדידות שנבחנו ועל בסיס הניסויים הנ"ל עוצבה מערכת ניסוי חדשה ששמה דגש על הפרמטר של אורך הפולס ויושמה במכשיר שנבנה במעבדה מסוג IGBT. בהמשך, נבחנה היכולת של פעילות סינרגיסטית בין האנטיביוטיקה והאלקטרופורציה, מתוך ההבנה שמרבית מנגנוני ההתנגדות של החיידקים נגד אנטיביוטיקה ממוקמים על גבי הממברנה והיא זו שמהווה את המחסום העיקרי לחדירות האנטיביוטיקה אל תוך חלל התא והציטופלסמה. הרעיון של יצירה מכוונת של "חריצים" בממברנה התאית שיאפשרו השפעה מועילה יותר של אנטיביוטיקה יחד עם האלקטרופורציה כשהשלם עולה על סמוך חלקיו. המערכת נוסתה על 2 מינים של חיידקים, האחד הוא *Pseudomonas aeruginosa* והשני הוא *Staphylococcus epidermidis* כאשר לכל אחד מהם יש מורפולוגיה שונה (פסאודומונאס מתג ואילו הסטפילוקוקוס כדורי) וממברנה שונה (פסאודומונאס גרם שלילי וסטפילוקוקוס גרם חיובי). הודות לשוני בצורה והממברנות נמצא כי בתנאים של pH ניטרלי החיידק *Pseudomonas aeruginosa* נמצא רגיש יותר לטיפול המשולב של אנטיביוטיקה (אל אף שהמיקס האנטיביוטי הכיל רכיבים המכוונים גם נגד גרם שלילי וגם נגד גרם חיובי) ואפילו בריכוזי אנטיביוטיקה נמוכים (המיהול המקסימלי של פי 20), עדיין היה אפקטיבי יותר מאשר כל אחד מהטיפולים בנפרד. התוצאה שהתקבלה מצביעה על היכולת שלנו להתגבר על זיהומים מבלי לחשוף את החיידקים לרמות גבוהות של אנטיביוטיקה, כצעד של משמעת ושימוש נכון באנטיביוטיקה בעתיד ומניעה של פיזור האנטיביוטיקה בסביבה ויצירה של זנים עמידים בהמשך. במהלך החלק הראשון של הניסויים הגענו לערך מינימלי של שדה שעמד על 308.86 V mm^{-1} עבור טיפול של אלקטרופורציה בלבד וערך של 189.65 V mm^{-1} עבור הטיפול המשולב של אלקטרופורציה עם אנטיביוטיקה מהולה. הודות לפעילות המשותפת הצלחנו להוריד את ערך השדה ב 61%.

במקביל לעבודה על הפרמטרים של הפולס החשמלי בוצעה במעבדה תהליך פיתוח של מחולל פולסים מסוג IGBT לצורכי מעבדה ובהמשך לטיפול בחולים פוטנציאליים. בחלק זה המכשיר נוסה לראשונה בתנאי מעבדה וכלל גם שדרוג של מטריקס הפרמטרים על סמך התובנות מניסוי טאגוצ'י. על מנת לבדוק את פיילוט המכשיר בוצעה סידרה

של 14 ניסויים עם 6 חזרות, *In vitro* בהם המכשיר הצליח לחולל את הפולסים בפרמטרים הנדרשים, מה שאפשרו להגיע לערך שדה מינימלי של 82 Vmm^{-1} , עבור טיפול באלקטרופורציה באלקטרודה בודדת בלבד. בעקבות השינויים שבוצעו במכלול הפרמטרים, קוטר העיכוב שנמדד היה המקסימלי שהושג ועמד על 7.8 מ"מ.

אחת מן התכונות המיוחדות של הפסאודומונאס היא היכולת שלו לבצע תהליך של ביולומינסנציה ופלורסנציה באורך גל ספציפי, תכונה חשובה שנמצאת בקורלציה עם כמות החיידקים בדוגמא כתלות בעוצמת השטף. הודות ליכולת הזאת, בשלב השני של הניסויים, המערכת נוסתה על רקמת עור של עוף *Ex vitro* שעברה תהליך של ניקוי לפי פרוטוקול וזוהם עם חיידקי *Pseudomonas aeruginosa* עד ליצירה של ביופילם. לאחר הזיהום על גבי העור בוצע טיפול בפולסים חשמליים באלקטרודה בודדת והמדידות של השטף נעשתה לפני ואחרי הטיפול. בעקבות הטיפול ערך השטף המתקבל יריד ב 25 אחוז (75 אחוז מהאות המקורי שנמדד לפני הטיפול). בגלל שבמערכת זו אין נוכחות של מערכת החיסון לאחד הטיפולים הבודד החיידקים חזרו לשגשג ולאחר 48 שעות נמדדו ערכים של מעל 100 אחוז.

בכדי להקדם צעד נוסף את המערכת לתנאים של מערכת מורכבת בוצע סדרת ניסויים על עכברי מעבדה בכדי לבחון את השפעת הפולס החשמלי על רקמה של עור חי *In vivo*. בניסויים אלו נעשתה כווייה טרמית מכוונת והפצע זוהם ע"י חיידק *Pseudomonas aeruginosa*. מהמעקב שבוצע בשיטה של ביולומינסנציה נראה כי ערך ירידה מקסימלי של 88 אחוז הושגה בטיפול ע"י הפולסים החשמליים. השוני בין אחוזי ההצלחה בטיפול בין רקמה מתה *Ex vivo* לבין רקמה חיה *In vivo* יכול להיות מוסבר הודות לקיום או העדר של מערכת החיסון פעילה. ההנחה היא שמעבר לאפקט הישיר של חיסול החיידקים מקומית, הפולס החשמלי יוצר אינדוקציית מקומית של מערכת החיסון (ע"י כך שהוא עצמו יוצר סוג של נזק) וגיוס של מרכיבי מערכת החיסון שמזהים את המקום כדלקתי ופועלים ביתר שאת על מנת לחסל את החיידקים במקום. על בסיס הידע שנצבר במהלך העבודה הצלחנו להוכיח כי במקרה של זיהומי כוויות בהם החיידק הדומיננטי הוא *Pseudomonas aeruginosa* ניתן להשתמש בשיטת האלקטרופורציה כאלטרנטיבה לשיטות אנטיביוטיות. השימוש המשולב של אנטיביוטיקה ואלקטרופורציה הוכיח את עצמו כשהשיג תוצאות משופרות ביחס לשימוש בכל טכניקה בנפרד ושיפור מטריקס הפרמטרים שבוצע לאחר ביצוע מטריקס טאגוצ'י הבהיר את חשיבות הפרמטרים השונים ומידת השפעתם. יש להמשיך ולחקור את הנושא ולהביא אותו עד ליישום ברמה הקלינית.

חלק מן העבודה המוגשת לעיונכם התקבל לפרסום מדעי:

"Selective inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* with pulsed electric fields and antibiotics." Rubin A.E , Usta O.B, Schloss R, Yarmush M.L, Golberg A. *Advances in Wound Care*.

1. מבוא

1.1 עור, רקע כללי

העור הוא האיבר הגדול ביותר בגוף האדם עם שטח כולל של $1.5-2 \text{ m}^2$ ומהווה 50 אחוז ממשקל גופנו¹.

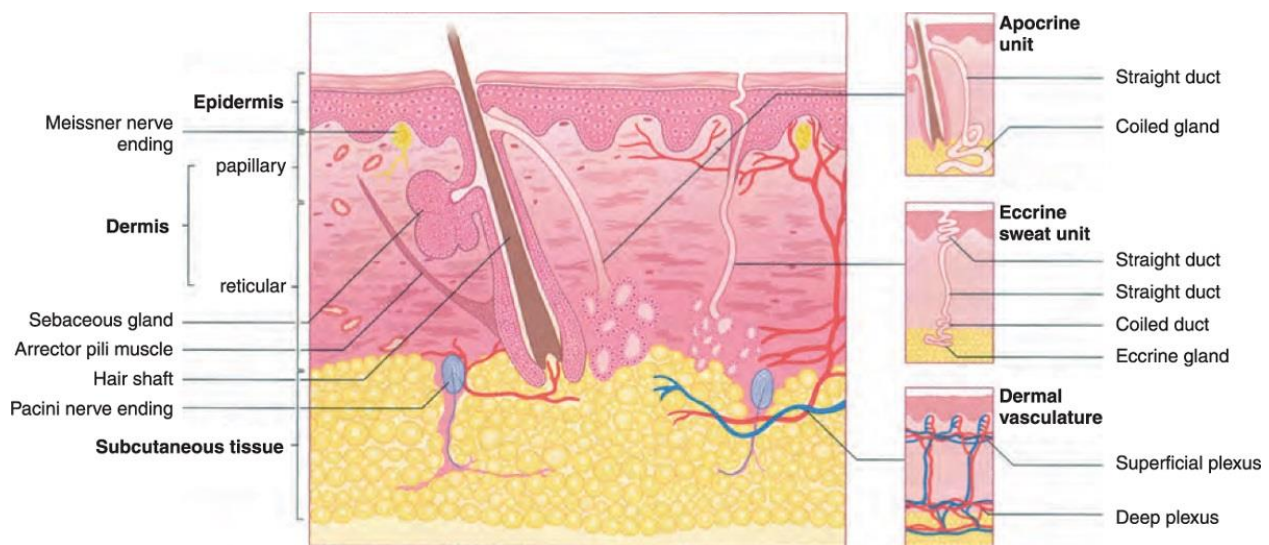
שלושת השכבות של העור הינן (איור מספר 1):

1 אפידרמיס ("מעל" לדרמיס): זוהי שכבת ההגנה הראשונה של העור שמכילה בתוכה 2 סוגים של תאים-קרטינוסיידס (מסנטזים את חלבון הקראטין) ותאים דנדריטים¹. לשכבה זו חשיבות מכרעת ביצירת החציצה בין הפנים לחוץ והיא זו שלמעשה מאפשרת חסימה פיזית מפני חדירתם של פתוגניים אל תוך הגוף.

2. דרמיס: זוהי השכבה המרכזית הבניה מחלבון קראטין, סיבים גמישים ומטריצה חוץ תאית (ECM). עובי השכבה משתנה בהתאם למיקומה בגוף ויכול לנוע בטווח שבין $0.1-1.5 \text{ mm}^1$.

3. הרקמה התת עורית: בסיס העור.

איור 1: מודל עור באדם¹



כאיבר, העור מהווה את אחד האיברים המורכבים והמרתקים בגוף האדם כאשר תפקידו המרכזי הוא להיות החוצץ בין הסביבה הפנימית והחיצונית לגוף ולהוות מערכת הגנה ראשונית מתוך מערך ההגנות במערכת החיסון. מעבר להגנה הפיזית, העור שומר גם על תנאים פיזיולוגיים כמו טמפרטורת הגוף והלחות המאפשרים קיום של הומאוסטאזיס בגוף כולו. שמירת התנאים הללו מתאפשרת אך ורק במצב שבו רקמת העור שלמה ללא פגע ובמקרים של פגיעה בשלמותה מופר גם האיזון של כל הגוף.

העור שלנו מהווה גם סביבת חיים עבור חיידקים ידידותיים לאדם הקרויים ביו-פלורה טבעית/מיקרוביום (microbiome). מרבית הפלורה ממוקמת על גבי השכבה של האפידרמיס ומהווה מגן מפני פתוגניים

על ידי תפיסת כל שטח פני העור שלא מאפשרת התבססות של זנים פתוגניים בגלל התחרות על מקום ומזון². יחסי הגומלין בין הפלורה הטבעית לבין גוף האדם אינם ברורים עד סופם, אך ממחקרים שקיימים בנושא נראה כי לתקשורת המתקיימת בין חיידקי הפלורה הטבעית ומערכת החיסון שלנו ישנו תפקיד מרכזי בעיצוב מערכת החיסון שלנו כשהפלורה הטבעית "מלמדת" את מערכת החיסון הצעירה להבחין בין "טוב ורע"³. מאידך, ניתן לראות כי חיידקי הפלורה הטבעית אינם תמימים לחלוטין וברגע שמזהים פרצה במנגנוני ההגנה של העור הם עלולים להפוך לפתוגניים מסוכנים היכולים לגרום לדלקות חמורות ואף למוות⁴. המאזן העדין שנשמר בין חיידקי הפלורה הטבעית ומערכת החיסון, מספרם של החיידקים והזנים השולטים, מאפשרים את קיום המערכת הסימביוטית הזאת כאשר כל אחד מן הצדדים נהנה מהיתרונות בשיתוף הפעולה⁵.

1.2 כוויות, סקירה כללית ומגמות עולמיות

כוויות היא אחת מן הצורות הנפוצות והמורכבות לטיפול של טראומה בחולה. אדם שנכווה בעורו, בדרגות כוויה מתקדמות (שנייה ומעלה), נזקק לאשפוז מידי על מנת למזער את הנזק ולמנוע הדרדרות במצבו הרפואי⁶. מהנתונים הקיימים במרכז הלאומי למניעת כוויות מדווח מידי שנה על כ 2 מיליון מקרים של שרפות שמסתכמים לכדי 1.2 מיליון מקרים של כוויות טרמיות. מתוך המקרים הנ"ל, 100,000 נזקקים לאשפוז והתערבות רפואית מתקדמת וכ-5000 איש מתים כתוצאה מסיבוכים שנבעו מכוויות⁶. מקורות הכוויה הינם מגוונים ויכולים להיגרם גם מחשיפה לחומרים קורסיביים או ראקטיביים שיכולים לגרום לכוויה כימית, שוק חשמלי שמקורו בהתחשמלות(החשמל זורם במעטפת החיצונית של הגוף וגורם להריכה של העור) ועוד.

שוק אחרי כוויה מתאפיין בסימנים הבאים: (1) עלייה בחדירות הקפילרות, (2) עלייה בלחץ ההידקוסטטי מסביב לנימי הדם, (3) תנועת חלבונים ונוזלים מתוך כלי הדם אל המרווח הבין רקמתי, (4) עלייה בהתנגדות כלי הדם, (5) ירידה בתפוקת הלב, (6) תת נפח הדם - מצב של ירידה בנפח הפלזמה בדם⁷.

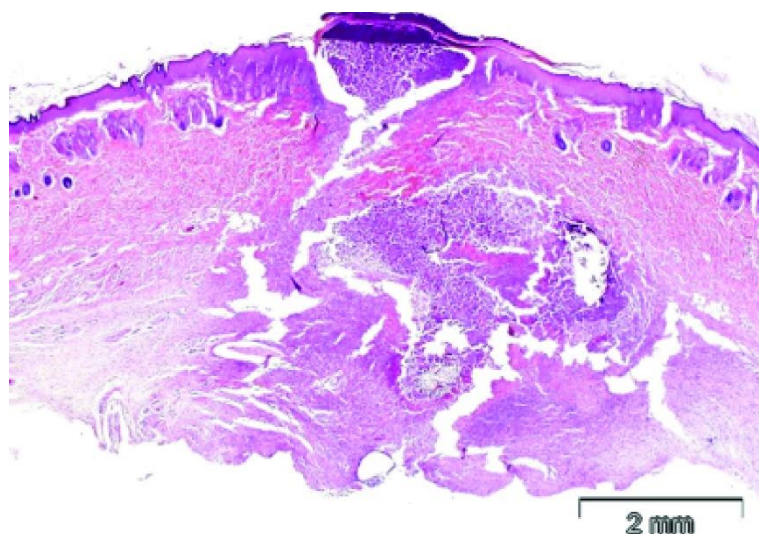
ברמה המולקולרית, חשיפה של רקמה לטמפרטורה מעל 44°C גורמים לאובדן של המבנה השלישוני של חלבוני התא ולהתערערות מבנה התא כולו. התאים מתחילים להתפרק מהמבנה הצפוף והמסודר שבו הם נמצאים ברקמה והמחסום בין החוץ לפנים מופר, אדי המים מתחילים להתאדות באופן מואץ מה שגורם להתייבשות הגוף כולו ובקרת הטמפרטורה נהיית לא אפקטיבית. במקרים של כוויה בשטחים נרחבים של העור השוק שנוצר יכול לגרום לקריסת המערכות ומוות⁸. נהוג לחלק את דרגת הכוויה לארבע רמות על פי צבע עומק ומרקם הכוויה כפי שמתואר בטבלה מספר 1:

טבלה 1: דרגות כוויה בעור⁸

Type	Skin Layer involved	Appearance	Sensation	Healing Time
Superficial (1st-degree)	Epidermis	Red without blisters	Painful	5–10 days
Superficial partial thickness (2nd-degree)	Extends into superficial (papillary) dermis	Skin redness with a clear blister. Blanches with pressure	Very painful	2–3 weeks
Deep partial thickness (2nd-degree)	Extends into deep (reticular) dermis	Yellow or white. Less blanching. Maybe blistering	Pressure and discomfort	3–8 weeks
Full thickness (3rd-degree)	Extends through entire dermis	Stiff and white/brown. No blanching	Painless	Prolonged (months) and incomplete
4th-degree	Extends through the entire skin, and into underlying fat, muscle, and bone	Black; charred with eschar	Painless	Requires excision

המשותף לכל ארבע דרגות הכוויה היא הפגיעה של קרום הדורה וחשיפת הרקמה לזיהומים מהסביבה. בנוסף, עבור כוויות מדרגה שנייה ומעלה ישנה פגיעה אזורית בתפקוד מערכת החיסון, דבר שמספק יתרון נוסף עבור הפתוגניים לחזור ולהתרבות בתוך הרקמה הנקרוטית (איור מספר 2)⁹.

איור 2: היסטולוגיה של עור פצוע וחדירת החיידקים לעומק⁹



למעשה פצעי כוויה פתוחים איבדו חלק ניכר ממנגנוני ההגנה שלהם, מה שהופך אותם למטרה נוחה להתיישבות והתרבות של זנים פתוגניים¹⁰. חיידקים אנאירוביים פקולטיביים כמו: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* וחיידקים סטרפטוקוקוס β המוליטים נמצאו במספר רב מאד של בידודים מכוויות (כ-70% מהזנים המבודדים¹¹). בנוסף לזיהומים של כוויות חיידקים אנאירוביים פתוגניים נמצאים גם בפצעי כוויה כרוניים רבים¹². הודות ליכולת הייחודית של זנים אלו לפתח מבנים הקרויים ביו-פילם (biofilm), עמידותם למערכת החיסון ותנאים סביבתיים הולכת וגדלה, דבר שמאפשר לזנים אלו להמשיך ולהתקיים בצורה אקוטית או כרונית בפצעי כוויות.

הביו-פילם הוא קרום הגנה העשוי מהפולימר EPS (extracellular polysaccharide matrix) השומר על מושבת החיידקים ובמחקרים מהעשורים האחרונים נראה כי חיידקים אלו הם עמידים פי 50-1000 לטיפול באנטיביוטיקה בהשוואה לזנים שלא מייצרים ביו-פילם¹³. תאי מערכת החיסון מתקשים להתגבר על המבנה הזה לא רק בגלל הקושי המכאני בלחדור את המבנה הצפוף אלא גם בזכות העובדה כי חיידקים במבנה ביו-פילם מסנתזים פקטורים מעכבים כנגד הפגוציטים ומסנתזים אנזימים שפוגעים בפעילות התקינה של הפגוציט¹⁴. החשש העיקרי במקרים של טראומה מכוויה היא חדירה של החיידקים הפתוגניים למחזור הדם-ספסיס¹⁵. חדירת החיידקים לדם גורמת להפעלה בעודף של מערכת החיסון, מה שבתורו גורם לשוק אימוני וקריסת המערכות. טיפול בחולים עם אזורים נרחבים של כוויה הוא מורכב מאד. הטיפול בחולים אלו יתרכז במתן תרופות אנטי-אינפלמטוריות בדגש על מעכבי פרוסטגלנדין כמו nonsteroidal anti-inflammatory drug או glucocorticoids¹⁶. יכולת התמרון בין up-regulation (הגברה) של מערכת החיסון על מנת להתמודד עם הזיהום וה downregulation (דיכוי) על מנת למנוע את השוק הספטי הופכת את **תהליך הטיפול לתהליך שכמעט ובלתי אפשרי לשלוט בו**¹⁵. בנוסף לטיפול התרופתי, הכוויה עוברת כיסוי על ידי פדים של גזה על מנת למנוע התיישבות של חיידקים על אזור הפצע ולמנוע אובדן דם. עיקר הבעיה עם הפדים, הוא ההכרח להחליף אותם על בסיס יומיומי, **פרוצדורה שגורמת סבל רב עבור החולים** (פד מזוהם בדם מהווה סביבת מחיה מושלמת עבור חיידקים פתוגניים ותורם ליצירת הביו-פילם)¹⁵.

על פני השטח של הכוויה הטיפול הנפוץ הוא Silverol (קרם המכיל 1% של Silver Sulfadiazine). הפעילות האנטיספטית של הכסף אמורה למנוע את התיישבות הפטגונים על האזור הפגוע, אבל מחקרים של השנים האחרונות מראים כי החיידקים מתחילים לסגל עמידות נגד תרכובות המכילות כסף¹⁷ וטיפול זה הופך ללא אפקטיבי עבורם. כמו בכל תרופה, גם הסילברול היא תרופה עם הגבלות בשימוש והיא אסורה לשימוש לנשים בהריון וחולים עם מחלות כבד וכליות¹⁸. גם הטיפול המקובל באנטיביוטיקה הופך למוגבל, בייחוד עבור חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה שמספרם הולך וגדל בבידודים מפצעי כוויות.

הקצב המואץ של רכישת העמידות בחיידקים ופיתוח מנגנונים המסוגלים להתגבר על הטיפולים הקיימים כיום מעמידים אתגר בפני הצוות המטפל והסתכלות מחודשת על שיטת הטיפול נדרשת.

1.3 מחלות נוזוכומליות (Nosocomial): מחלות שמקורן בבית החולים

זיהום אוויר תוך מבני ומחלות נוזוכומליות (מחלות שמקורן בבית החולים) הוא אחד מהמקורות הראשיים של זיהומים בחולי כוויות¹⁹. פתוגניים שמקורם בבית החולים מוגדרים על ידי שתי תכונות ייחודיות: (1) חיידקים אלו מזוהים באופן ספציפי כחיידקים שמקורם בסביבת בית החולים (בשונה מחיידקים מהסביבה), (2) חיידקים אלו מותאמים לסביבת בית החולים ומסוגלים לשרוד בה לאורך תקופה ממושכת²⁰. החיידקים שנמצאים באוויר בית החולים, מוצאים לעצמם נישות במערכות המיזוג (פילטרים של מערכות המיזוג שאידיאלים ליצירה של ביו-פילם), חשופים לאנטיביוטיקות ומגיבים בהתאם לחשיפה זו (על ידי יצירת עמידות) ותוקפים חולים שמערכות ההגנה שלהם מוחלשות-כדוגמת חולי הכוויות. בארצות הברית לבדה, מוערך הנזק הכלכלי שנגרם כתוצאה מזיהומים אלו ב-88 מיליארד דולר בשנה²¹. בנוסף, ממחקר שנעשה בשנת 2007 הוערך כי מחלות שמקורן בזיהום בבית החולים מהוות 12.2% מכלל התקציבים של משרד הבריאות בארה"ב²¹. **שילוב של המצאות כמות גדולה של חיידקים עמידים במערכת מיזוג סגורה וחולים שמערכת החיסון שלהם נמצאת בתפקוד נמוך עלול להביא לתחלואה רבה בקרב אותם החולים.**

1.4 חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה - מגמות התופעה ודרכי התמודדות

מאז גילוי הפניצילין על ידי אלכסנדר פלמינג ב 1928 האנושות החלה להשתמש באנטיביוטיקה כתרופה האלטרנטיבית בעבור כל מחלה שמקורה בזיהום חיידקי. הצלחת הטיפולים הייתה חסרת תקדים ומיליוני חיים ניצלו בעקבות הגילוי הזה. השימוש המסיבי באנטיביוטיקה בעולם הרפואה, החקלאות והחקלאות הימית יצר ביקוש של 100 טון אנטיביוטיקה בשנה²². חלק ניכר מהאנטיביוטיקה זלג לסביבה ונמהל כך שהחיידקים בסביבה החלו להיחשף לאנטיביוטיקות שלא נחשפו אליהן קודם (או אנטיביוטיקות שנחשפו אליהן בדרך טבעית בריכוזים גבוהים יותר) והחלו להגיב בהתאם על ידי יצירה של מנגנוני עמידות. בחלוף השנים, יותר ויותר זנים עמידים ואפילו מולטי-עמידים (Multi-drug resistant) לאנטיביוטיקה החלו להתפתח. **בטבלה מספר 2**²³, ניתן לראות דוגמא לחיידקים אלו, שהחלו להפוך לבעיה אקוטית בעולם הרפואה כשאר אנטיביוטיקות מסוימות הפכו ללא רלוונטיות והיה צורך בפיתוח נגזרות חדשות של אנטיביוטיקות על מנת להתגבר על חיידקים אלו. גם חיידקי גרם חיובי וגם גרם שלילי החלו לפתח עמידות וצמיחתם נמדדה בכל רחבי העולם²⁴.

ברמה הגנומית, עמידות של חיידקים יכולה להיות תכונה המקודדת על גבי פלסמיד ולרוב אינה מהווה חלק מה core של החיידק, כך שהיא ניתנת להעברה בקלות בין החיידקים. היא כוללת בתוכה קידוד לאנזימים קטבוליים נגד אנטיביוטיקה ומנגנוני "התחמקות" והסתרה של רצפטורים ספציפיים על האפיטופ החיידקי זאת במטרה למנוע את הקישור בין האנטיביוטיקה והחיידק. חלק מהחיידקים אפילו משנים את המסלול המטאבולי שלהם כך שהאנטיביוטיקה מפסיקה לפגוע בהם אפילו אם היא מצליחה לחדור²⁵.

נהוג לחלק את מנגנוני העמידות ל 5 קבוצות עיקריות:

- מוטציה ספונטנית ברצפטור לאנטיביוטיקה²²

על מנת להפוך לעמיד לאנטיביוטיקה, החיידק לאו דווקא חייב לפעול באופן אקטיבי. בגלל הספציפיות הגבוהה בין הרצפטור לבין האנטיביוטיקה, מוטציה ספונטנית ברצפטור לאנטיביוטיקה יכול להביא למצב שהאנטיביוטיקה לא תקשר ולא תוכל להגיע אל אתר המטרה.

- פירוק אנזימטי של אנטיביוטיקה²²

בטבע, החיידקים נחשפים לאנטיביוטיקה באופן תדיר ועל כן פיתחו מנגנוני עמידות גם ללא קשר לאדם. אחד מהמנגנונים הנפוצים לעמידות הנצפה בטבע הוא המנגנון האנטיזמטי. בקבוצה זו ניתן למנות את ה-Aminoglycosides אשר אמונים על שינוי מורפולוגי שגורם לירידה במטען החיובי של אנטיביוטיקות ממשפחת הסטרפטומיצין, אנזימים β lactams היעילים נגד אנטיביוטיקות מקבוצת הפניצילין, ספלוספורין, ספמיצין וקרפנים ששוברים את מבנה הטבעת ופוגעים במבנה המרחבי של המולקולה, דבר המוביל לאינאקטיבציה שלה. חיידקים עם מנגנונים קטבוליים לפירוק הטבעת ה β lactamic הפכו לנפוצים מאד ברחבי העולם והפכו את הטיפול בפניצילין לכמעט ולא יעיל נגד חיידקי גרם שלילי (לדוגמא *S.aureus*)

- רכישת עמידות מחיידקים עמידים²²

כפי שהצגנו, העמידות מקודדת על גבי פלסמיד נייד ועל כן ניתנת להעברה בין זנים עמידים לחבריהם הלא עמידים לאנטיביוטיקה. בעזרת מנגנון הפילי הפלסמידים מועברים לחיידקים הלא עמידים ובכך מחמשים אותם בעוד ועוד עמידויות שלא היו להם קודם.

- עקיפת ההיקשרות עם רצפטור²²

בנוסף לשינוי הרנדומלי, החיידקים יכולים לבצע שינויים מכוונים של רצפטורים לאנטיביוטיקה ובכך למנוע את ההיקשרות הישירה בין האנטיביוטיקה לרצפטור. במקרה של האנטיביוטיקה וונקומיצין שינוי הרצפטור מ-d-Ala d-Ala שהוונקומיצין מזהה ל d-Ala-d-lactic acid שלא מזהה על ידי הוונקומיצין גורם לכך שהאנטיביוטיקה לא מצליחה לבצע קישור לרצפטור ונשארת אינאקטיבית בתא.

- מניעה ישירה או עקיפה של ההיקשרות בין האנטיביוטיקה לבין אברון המטרה²²

ישירה-בחיידקי גרם חיובי: חלבונים ממשפחת ה Tet(M) או Tet(S) שמסונתזים על גבי הפלסמיד בחיידקי גרם חיובי נקשרים בקישור חזק אל הקומפלקס של הריבוזום וגורמים לשינוי במבנה המרחבי שלו. אנטיביוטיקות דוגמאת הטטרציקלין שפועלות על הריבוזום אינן מצליחות להקשר לריבוזום שעבר שינוי מרחבי ועל כן לא מצליחות לפעול עליו.

עקיפה-בחיידקי גרם שלילי: חלבון ממשפחת ה Tet(A) מפעיל משאבות אקטיביות שמוציאות מחוץ לתא את הקומפלקס של טטרציקלין-Mg מחוץ לתא ומונעים את הקישור עם הריבוזום.

כפי שניתן לראות, מנגנוני העמידות של החידקים מגוונים מאוד והיכולת של החידקים לרכוש או לפתח מנגנונים אלו בתגובה לחשיפה לאנטיביוטיקות מהירה הרבה יותר מן היכולת שלנו לפתח נגזרות חדשות של אנטיביוטיקה ולכן במרוץ הזה התוצאות הן די צפויות. בשונה מפאקטורים כימיים/ביולוגיים פיתוח עמידות לפאקטורים פיזיקליים כמו טמפרטורה, לחץ או שדות חשמליים דורשת מהחידק לבצע שינוי דראסטי במבנה שלו וסביר להניח כי יהיו מורכבות יותר לביצוע וידרשו הרבה יותר זמן, אך עדיין אפשריים. כדוגמא ניתן לראות את החידק

Listeria monocytogenes בעמידותה לחום וחומציות²⁶ וחידקים ממשפחת העמידים לחום גם כן²⁷ :
Enterococcus spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp.*,
Campylobacter spp.

טבלה 2: רשימת חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה ודחיפות הטיפול בהם²³

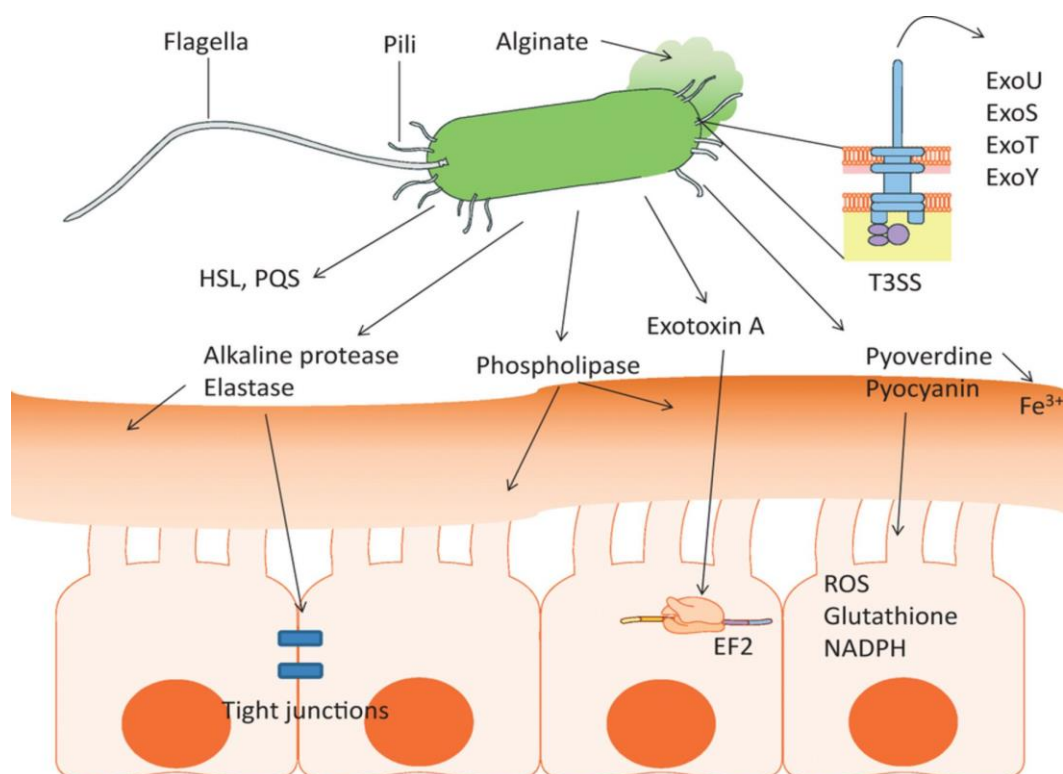
Species	Type of Antibiotic Resistance
Critical*	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem resistant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem resistant
<i>Enterobacteriaceae</i> [†]	Carbapenem resistant Third-generation cephalosporin resistant
High	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin resistant
<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin resistant Vancomycin intermediate and resistant
<i>Helicobacter pylori</i>	Clarithromycin resistant
<i>Campylobacter</i>	Fluoroquinolone resistant
<i>Salmonella spp</i>	Fluoroquinolone resistant
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolone resistant Third-generation cephalosporin resistant
Medium	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin nonsusceptible
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin resistant
<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolone resistant

**Mycobacteria* (including *Mycobacterium tuberculosis*) was not subjected to review for inclusion in this prioritization exercise as it is already a globally established priority for which innovative new treatments are urgently needed.

[†]Enterobacteriaceae include: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, and *Morganella spp*.

1.5 מנגנוני האלימות של חיידק *Pseudomonas aeruginosa*

החיידק *Pseudomonas aeruginosa* הוא חיידק גרם שלילי שגדל באדמה, ביצות ומאגרי מים וכמו כן על גבי צמחים ורקמות של בעלי חיים²⁸. בזכות היכולת שלו להתבסס במגוון כה רחב של נישות סביבתיות הוא מהווה אחת מבין שלושת הזיהומים האפורטניסטים המובילים בבני אדם ובאותה נשימה מהווה חלק ניכר מחיידקי הפלורה הטבעית של העור²⁸. כיום, הוא מהווה מקור משמעותי לבקטרמיה בחולי כוויות, זיהום בדרכי השתן בחולים המשתמשים בקטטר ופנאומוניה שמקורה בזיהום אוויר תוך מבני בית חולים בחולים רספירטורים²⁵. לחיידק מגוון רחב של פקטורי אלימות בהם הוא משתמש על מנת לחדור ולשרוד בסביבת התאים האנימליים כפי שמוצג ב**איור מספר 3**. אחת מהסיבות המרכזיות להתפשטות החיידק היא היכולת הראשונית שלו להיצמד באופן אינטימי אל תאי המאכסן, ליצור ביו-פילם שמאפשר לו הגנה פיזית מפני הסביבה ומגוון רחב של אפקטורים המפעילים מסלולים מטאבולים בתאי המאכסן שאפשריים חדירה אפקטיבית אל התאים הללו. השוטונים (פלגלות) ומערכת הפרשה מספר 4 הינם הפקטורים המרכזיים שמאפשרים לחיידק לבצע את האדהזיה לתאי המאכסן באמצעות: asialoGM2 gangliosides, asialoGM1²⁹. יחד עם הליפופוליסכרידים הפאקטורים הללו תומכים ביכולת של החיידק להיצמד ובהמשך לחדור אל תאי המאכסן²⁹. ברגע שהקישור עם התאים האפיטליאלים נוצר, החיידק מפעיל את מנגנון האלימות הנוסף שלו-מערכת ההפרשה סוג 3 (מעין מחט מולקולרית). בעזרת המחט המולקולרית החיידק חודר את הממברנה של התא האפיטליאלי ומזריק אל הציטופלסמה אפקטורים המשנים את המסלולים המטאבולים בתא, דוגמת מסלול האקטין, לטובת חדירתו פנימה. האפקטורים המוזרקים פועלים על גנים ממשפחת ExoU/S/T/Y וגורמים לפגיעה בהידוק בין תאי האפיתל (באמצעות פגיעה ב-tight junction)²⁹, דבר המסייע לחיידק לחצות את תאי האפיתל הצפופים ולחדור לצד הבסאלי. בנוסף החיידק משתמש בפיובידין על מנת לגנוב מהתא המאכסן מיקרואלמנטים חשובים כדוגמת הברזל ודבר המאפשר מאפשר לחיידקים אלו להתחרות מול חיידקים אחרים באזור²⁹. המעבר שמבצע *P. aeruginosa* מחיידק פלורה טבעית לחיידק פתוגן עדיין לא ברור לחלוטין וישנן מחקרים המסבירים זאת באמצעות הפעלת מנגנון ה quorum sensing במצב של חוסר רגולציה על ידי מערכת החיסון³⁰.



1.6 חיידקי הפלורה הטבעית של העור ו-*Staphylococcus epidermidis*

כנציג מהקבוצה

חיידקי הפלורה הטבעית של העור, הם קבוצה מגוונת של חיידקים הממוקמים בשכבה העליונה של העור ומהווים את אחד האזורים האקטיביים בגוף האדם בו מתקיימת תקשורת זו כיוונים בין חיידקי הפלורה הטבעית ומערכת החיסון של האדם³¹. במחקר שראשיתו בשנות ה 70 נוכחנו לדעת, כי מספרם של תאי החיידקים של הפלורה הטבעית במעי לדוגמא הוא כ 10^{14} תאים והוא גדול יותר ממספר התאים של גופנו אנו³². אם נוסיף לקבוצה זו את חיידקי הפלורה הטבעית מהעור ומאזורים נוספים בגוף, נוכל להבין את תפקידם ההכרחי של החיידקים הללו לקיומנו. משפחות החיידקים המבודדות מעור בריא כוללות בין היתר את (טבלה מספר 3)³¹:

Staphylococcus, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacteria*, *Propionibacterium*, and *Acinetobacter*. *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

מבין המשפחות השונות, נראה כי קבוצת הגרם חיובי היא קבוצת החיידקים השולטת בפלורה הטבעית, כאשר ישנו רק נציג אחד מקבוצת הגרם השלילי, *P. aeruginosa*.

אוכלוסיית החיידקים של הפלורה הטבעית היא אוכלוסייה דינאמית ומשתנה בהתאם למיקום האנטומי של חיידקי העור, כמות החלב והזיעה המופרש על ידי הבלוטות, רמת החומציות, הלחות, הטמפרטורה, האור, מצב בריאותי פיזיולוגי ועוד. מערכת החיסון מווסתת את זני החיידקים על גבי העור, כך שרק חיידקים "טובים" של הביו-פלורה מצליחים לשרוד²⁸. כפי שניתן לראות מטבלה 3 *Staphylococcus epidermidis* הוא חיידק נפוץ מאד בפלג הגוף העליון ומייצג במחקר שלנו את קבוצת הפלורה הטבעית. אם זאת, למרות היותו חיידק נפוץ בפלורה הטבעית, החיידק זוהה לא פעם גם כחיידק פתוגן בפצעי כוויות⁴ ונהוג לקרא לו "accidental pathogen".

טבלה 3: רשימה חלקית של חיידקי הפלורה הטבעית של העור³⁰

<i>S. epidermidis</i>	Upper trunk
<i>S. hominis</i>	Glabrous skin
<i>S. capitis</i>	Head
<i>S. saccharolyticus</i>	Forehead/antecubital
<i>S. saprophyticus</i>	Perineum
<i>M. crococcus luteus</i>	Forearm
<i>Corynebacterium xerosis</i>	Axilla, conjunctiva
<i>C. minutissimum</i>	Intertriginous (e.g., axilla)
<i>C. jeikeium</i>	Intertriginous (e.g., axilla)
<i>P. acnes</i>	Sebaceous gland, forehead
<i>P. granulosum</i>	Sebaceous gland, forehead, axilla
<i>P. avidum</i>	Axilla
<i>Brevibacterium spp.</i>	Axilla, toe webs
<i>Dermabacter spp.</i>	Forearm
<i>Acinetobacter spp.</i>	Dry area
<i>Pityrosporum spp.</i>	Uppermost part of sebaceous gland follicle

Abbreviations: *S. epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*; *S. hominis*, *Staphylococcus hominis*; *S. capitis*, *Staphylococcus capitis*; *S. saccharolyticus*, *Staphylococcus saccharolyticus*; *S. Saprophyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*; *C. minutissimum*, *Corynebacterium minutissimum*; *C. jeikeium*, *Corynebacterium jeikeium*; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; *P. granulosum*, *Propionibacterium granulosum*; *P. avidum*, *Propionibacterium avidum*.

1.7 אלקטרופורציה-PEF

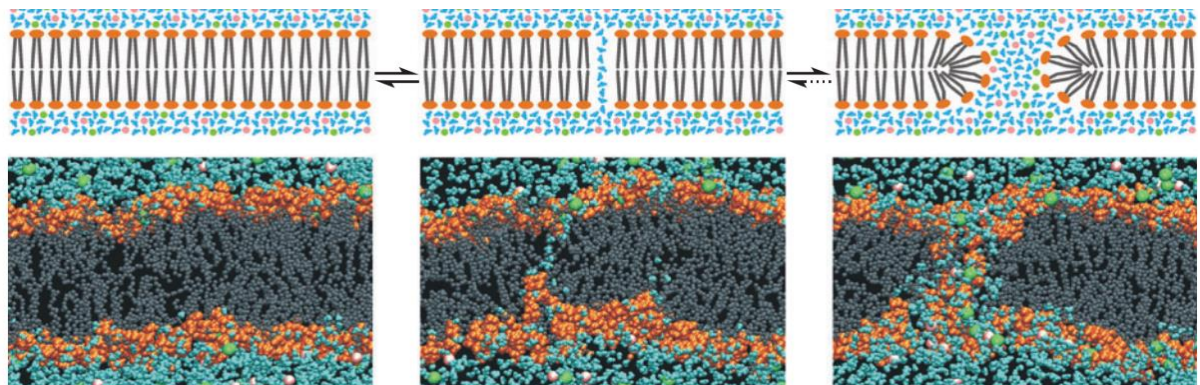
שיטת האלקטרופורציה, PEF-pulse electric field, גורמת לשינוי בחדירות הממברנה התאים (יוצרת בה מיקרו קרעים) ע"י החשיפה של התא לשדה חשמלי גבוה³³. למרות שהמחקר בשדות חשמליים החל כבר לפני 250 שנה³⁴, השימוש בה החל רק בארבעת העשורים האחרונים. שיטת האלקטרופורציה מיושמת בתחומים של תעשיית המזון, פרמצפטיקה ורפואה³¹ ויכול להיות יעיל במיוחד בהתמודדות עם חיידקים עמידים³⁵. מספרם ההולך וגדל של זנים עמידים לאנטיביוטיקה והיכולת המוגבלת שלנו לסנטז אנטיביוטיקות חדשות (55 בין השנים 1980-1999 ורק 13 בין השנים 2000-2014)³² הוא מצב בו נדרשת חשיבה מחודשת וגישה חדשה לפתרון הבעיה, כאשר ה-PEF יכולה להיות אחת מהן.

העיקרון הפיזיקלי על פיו עובד השדה החשמלי הוא יצירת שדה שמשפיע על גופים טעונים והפעלת כוח עליהם. בעקבות השריית השדה החיצוני, הממברנה נחלשת וחלקיקים טעונים-חלקית או בדיפול (כמו מים למשל) שבתוך

הממברנה מרגישים את השדה, פורצים דרך הממברנה ויוצרים גשרי מים. גשרי המים יוצרים סדקים מיקרוסקופיים בתוך הממברנה שגורמים לתוכן התוך תאי להתחיל לנזול החוצה ובסופו של דבר לליזיס התא (איור מספר 4). הודות לתכונה ההידרופובית של הממברנה ששואפת כל הזמן להסגר על עצמה באופן ספונטני, השדה צריך להיות חזק מספיק בכדי לגרום לתא נזק^{36,37}.

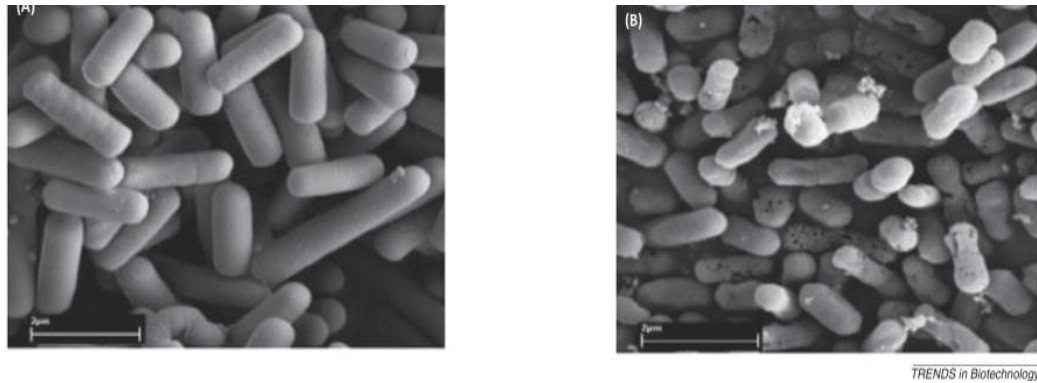
איור מספר 4 ממחיש במודל ממוחשב את יצירת החרירים בממברנה בי פולרית שנחשפת לשדה חשמלי של 4 mVcm^{-1} . בחלק a ניתן לראות את הממברנה כשהיא חשופה לשדה למשך 0 ננו-שניות (ביקורת), b ממברנה שחשופה לשדה במשך 0.15 ננו-שניות ו c ממברנה שחשופה לשדה במשך 50 ננו-שניות. בתמונה הראשונה בהעדר שדה חשמלי הממברנה שומרת על המבנה הנטיבי שלה, בתמונה b מולקולות המים הטעונות בדיפול מתחילות לנוע וגורמות לחירור הממברנה, אך עדיין לא לנזק בלתי הפיך ובחלק c ניתן כבר לראות נזילה של התוכן ותעלה גדולה שנוצרת במרכז הממברנה³⁶.

איור 4: מודל ממוחשב של ממברנה דו שכבתית בהשפעת שדה חשמלי³⁵



בנוסף למודל הממוחשב, באיור מספר 5³⁷ ניתן לראות ניסוי בשדה חשמלי שנעשה על החיידק *L. casei*. חלק a הוא צילום במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של החיידקים לפני החשיפה לשדה וחלק b מראה את החיידקים לאחר השפעת השדה-ניתן לראות בבירור שהחיידקים נראים מנוונים (בהשפעת שדה של 7.5 kV/cm).

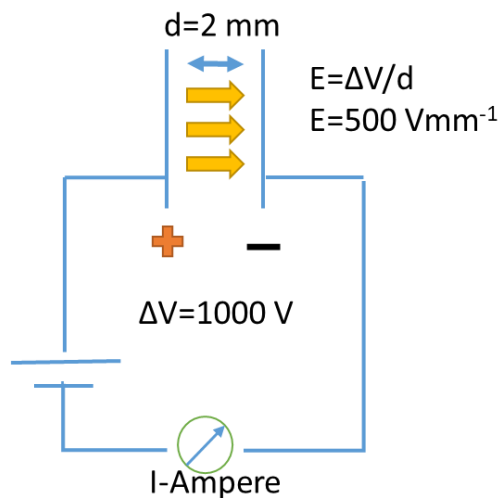
איור 5: חיידקי ה- *L. casei* לפני (משמאל) ואחרי (ימין) חשיפה לשדה חשמלי (באר של $2\mu\text{m}$)³⁶



1.7.1 מושגי יסוד בשדה חשמלי ופעילותו על הממברנה החיידקית

המודל הבסיסי של מעגל חשמלי מודגם באיור מספר 6. האלקטרונים הטעונים שלילית נעים מהאלקטרודה השלילית לאלקטרודה החיובית במהירות שנקבעת על ידי הפרש הפוטנציאלית בין האלקטרודות – המתח החשמלי (המתח החשמלי נמדד ביחידות של וולט). מונח השדה החשמלי מגדיר אזור בו שרוי שדה כתוצאה מהמצאות חלקיק טעון. במודל הפשוט, השדה החשמלי יוגדר כנפח המושפע בין 2 האלקטרודות ועוצמת השדה תחושב כמנה של הפרש הפוטנציאלים חלקי המרחק בין האלקטרודות, כך לדוגמא אם ההפרש פוטנציאלים בין האלקטרודות הוא 1000 V והמרחק בין האלקטרודות הוא 2 מ"מ , עוצמת השדה תהיה במוצע 500 Vmm^{-1} . מונח נוסף הוא הזרם החשמלי I – את הזרם החשמלי במערכת אנו מודדים באמצעות אמפרמטר, שמתרגם את השדה החשמלי לזרם. בשונה מהמודל הבסיסי שהוצג, בניסוי שלנו סוג האלקטרודה היה קונצנטרי (קונוס שבסיסו מעגל) ולכן פיזור השדה באלקטרודה כזאת הוא שונה ומוצג באיור מספר 7.

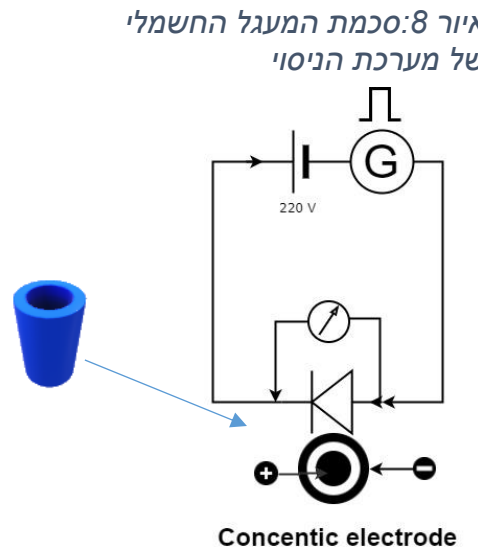
איור 6: מעגל חשמלי בסיסי





על מנת להיות מושפעים מהשדה החשמלי, על היחידה המושפעת להיות טעונה במטען חשמלי. במקרה של הממברנה החיידקית מדובר לרוב בממברנה הטעונה במטען שלילי. בחיידקי גרם חיובי כמו *B. subtilis* ו *S. aureus*, החומצה הטאיכואית יוצרת "מעטפת" הטעונה במטען שלילי³⁸ ואילו בגרם שלילי ההרכב הליפופוליסכארידי של הממברנה הטעון באופן טבעי במטען שלילי נותן לו את התכונה הזאת³⁹. בנוסף בעזרת משאבות ייעודיות החיידקים שואבים מחוץ לתא יונים, כדוגמת Ca^{+2} על מנת ליצור לממברנה פוטנציאל חשמלי וכוח פרוטון-מניע³⁹ שתורם לממברנה להיות יחידה טעונה. מטען הממברנה החיידקים נע בטווח שבין 40-100mV⁴⁰.

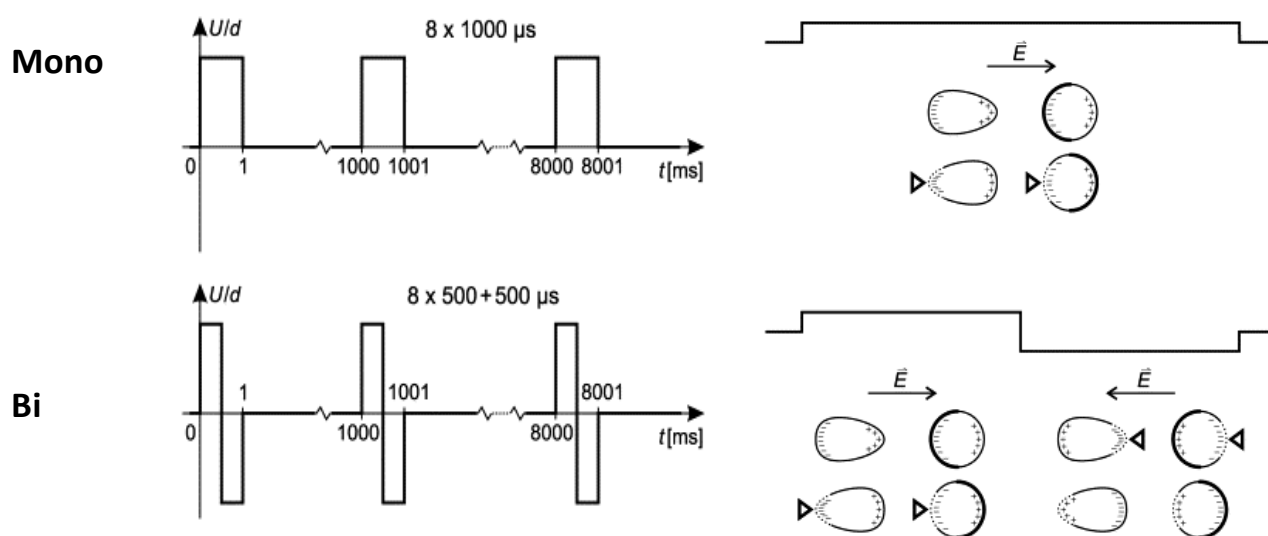
בסדרת הניסויים שלנו השתמשנו במערכת חשמלית כפי שמתואר באיור מספר 8 המורכבת ממקור מתח, מחולל פולסים (G), אלקטרודה קונצנטרית ואמפרמטר.



על מנת להשיג את אפקט האלקטרופורציה ניתן להשתמש בשתי מערכות שונות: מחולל פולסים מונו/בי פולרי. מערכת עם מחולל פולסים מונופולריים (כפי שמוצג באיור מספר 9) היא מערכת פשוטה שבה הפולס שנוצר מכיל פיק אחד והשדה שנוצר משפיע על הממברנה בקוטב אחד בלבד. לעומתו במערכת בי פולרית הפולס שנוצר מכיל

בתוכו 2 פיקים היוצר 2 קטבים. היתרון העיקרי של מערכת בי פולארית היא היכולת להשיג את אותו האפקט עם מתח נמוך משמעותית שמתורגם לעלויות נמוכות יותר ויצירת מכשיר בטיחותי יותר⁴¹.

איור 9: פולסים מונו/בי פולריים והשפעתם על תאים³⁸



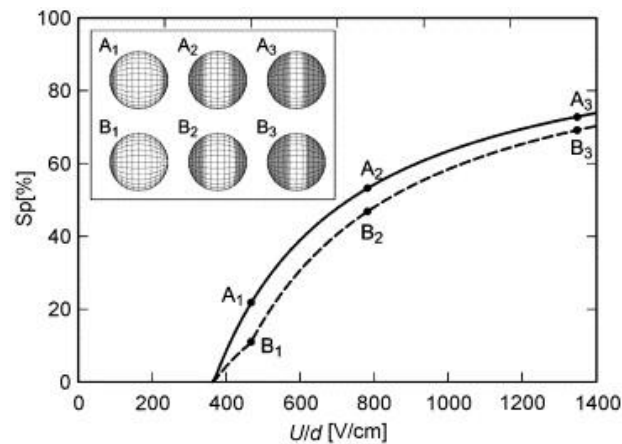
תהליך האלקטרופורציה הוא נושא נחקר מאד בשנים האחרונות והרבה מאד תיאוריות ומודלים מנסים לתאר את התופעה, אחד מהם הוא החוקר Tadej Kotnik. בהתבסס על התיאוריה שלו האזור המושפע על ידי הפולס החשמלי הוא אזור קטן יחסים הממוקם בקצות הממברנה עבור שדות חלשים ומתפשט מהן אל מרכז הממברנה, כפי שמתואר בגרף מספר 1, 3-1 A/B⁴¹ (A שדה בי-פולרי, B-שדה מונו-פולרי). את התופעה, הוא מסביר בעזרת משוואה מספר 1:

$$U_{TI} = f_s ER \cos \varphi$$

משוואה 1: חישוב השדה החשמלי האפקטיבי עבור תאים לא סימטריים³⁸

כאשר f_s משקף את המאפיינים הגאומטריים והחשמליים של התא הנבדק, E עבור השדה החשמלי (Vcm^{-1}), R עבור רדיוס התאים (μm), ו $\cos \varphi$ עבור הזווית בין השדה והנקודה המרכזית בתא.

גרף 1: אזורי ההשפעה של השדה החשמלי כתלות בעוצמתו (ציר x עוצמת שדה, ציר y אחוז המעטפת הממברנלית המושפע מהשדה) שדה A בי-פולרי, שדה B מונו-פולרי.



1.7.2 האלקטרודה הקונצנטרית (Concentric single electrode)

האלקטרודה הקונצנטרית הגלילית (איור מספר 10) שפותחה על ידי Fernand et al (2012) מאפשרת לקבל שדה חשמלי חזק במרכז האלקטרודה שדועך אקספוננציאלית (גרף מספר 2) עם ההתרחקות מהמרכז על פי המשוואה 2.

$$E(r, V) = \frac{\Delta V}{r \ln\left(\frac{R2}{R1}\right)}$$

משוואה 2: חישוב השדה החשמלי בחלל בין 2 אלקטרודות

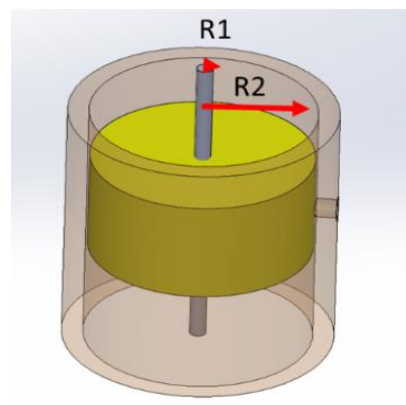
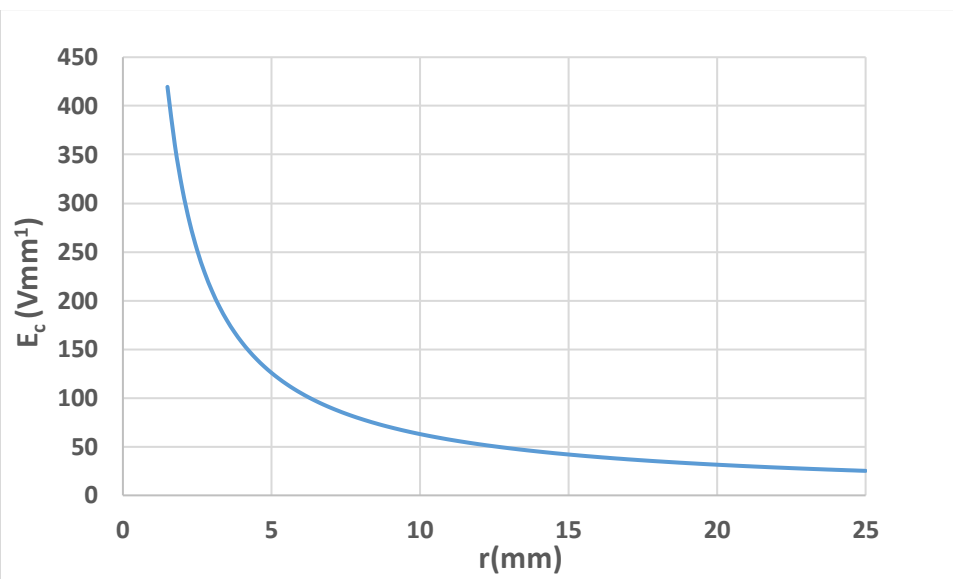
$$E_c(N, t_p, T) = \frac{\Delta V}{r_c \ln\left(\frac{R2}{R1}\right)}$$

משוואה 3: חישוב השדה החשמלי הקריטי (השדה המינימלי הדרוש לקטילת החיידקים)

כאשר E ($V \text{ mm}^{-1}$) מייצג את השדה החשמלית, ΔV עבור הפרש הפוטנציאלי בין האלקטרודות, r רדיוס הנמדד ממרכז האלקטרודה הנימית עד לגבול השדה ($R1$, mm), רדיוס האלקטרודה הפנימית העומד על 0.75 mm ו $R2$ רדיוס האלקטרודה החיצונית העומד על 11.95 mm . r_c^{**} רדיוס הנמדד ממרכז האלקטרודה הפנימית עד לגבול קטילת התאים (mm)

גרף 2: דעיכה אקספוננציאלית של השדה באלקטרודה קונצנטרית (מחושב)

איור 10: האלקטרודה הקונצנטרית



1.7.3 מחולל הפולסים (Pulse generator system)

מחולל הפולסים הוא למעשה המכשיר המחולל את ארבעת הפרמטרים של הפולס (מתח, אורך פולס, מספר פולסים והאינטרוול בין הפולסים) ומייצר פולס בהתאם להגדרות שהגדרנו. בניסוי זה השתמשנו ב-2 דגמים של מחוללי פולסים: הראשון BTX830 (Harvard Apparatus Inc, Holliston MA, USA) והשני מחולל על בסיס IGBT שנבנה במעבדה.

בנוסף לפרמטרים החשמליים המוגדרים התעניינו לבדוק 2 פרמטרים נוספים, עוצמת הזרם החשמלי והאנרגיה החשמלית המושקעת.

עוצמת הזרם (I) שנמדדה על ידי :

Pico-Scope 4224 Oscilloscope with a Pico Current Clamp (60A AC/DC, 20 A mode)

ועבר עיבוד על ידי Pico Software (Pico technologies Inc., UK).

והאנרגיה הכללית (J) המושקעת בתהליך שמתוארת על ידי משוואה מספר 4:

$$J = V \cdot t_p \cdot N \cdot I$$

משוואה 3: חישוב האנרגיה הכללית במערכת ביחידות ג'ול

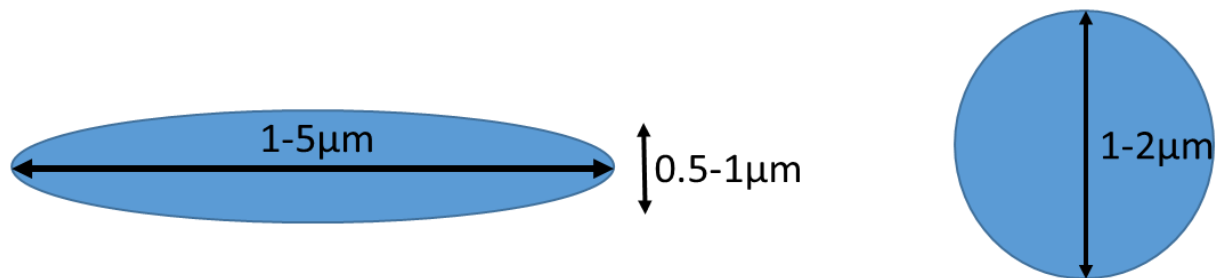
כאשר J מסמל את האנרגיה הכללית המושקעת בתהליך ביחידות של Joule, t_p מסמל את אורך הפולס בשניות, N מסמל את מספר הפולסים ו-I מסמל את עוצמת הזרם ביחידות של Ampere.

1.7.4 השפעת מאפייני התא על תהליך האלקטרופורציה

1.7.4.1 מורפולוגיה

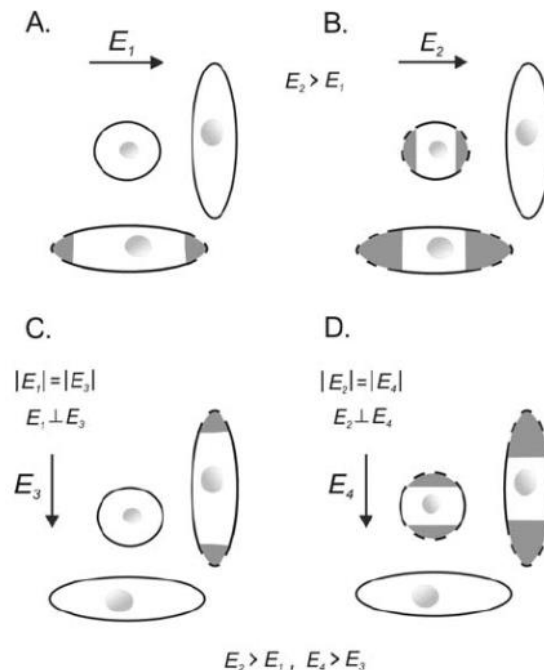
צורת התא של החיידק עשויה להוות גם כן פקטור חשוב בתהליך האלקטרופורציה. באיור מספר 11 מודגמות שתי הצורות שנבדקו במחקר זה. צורת הבצילוס המוערכת 1 עד 5 מיקרומטר באורכה ו 0.5-1 מיקרומטר רוחבה⁴² המיוצג על ידי *P. aeruginosa* וצורת הקוקי העגולה שהקוטר שלה נע בין 1-2 מיקרומטר⁴³ המיוצגת על ידי *S. epidermidis*. תיאורטי, בתאים מוערכים/מתגיים השדה יצליח לחדור עמוק יותר אל תוך התא, מה שעשוי להביל לתוצאות קטילה משופרות בהשוואה לחיידקים בצורת כדור. מודלים תיאורטיים שניסו לבדוק את התופעה הזו מצאו כי חיידקים שצורתם מתג סביר שיושפעו יותר מהשדה החשמלי בזכות אזורי השפעה גדולים יותר בקצות הממברנה כדי שמתואר באיור 12⁴⁴:

איור 11: מורפולוגיית התאים וגודלם-קוקי (כדורי) ומתג



איור 12: אזורי ההשפעה של שדה חשמלי כתלות בכיוון השדה וצורת התא⁴³

M. Kandušer, D. Miklavčič



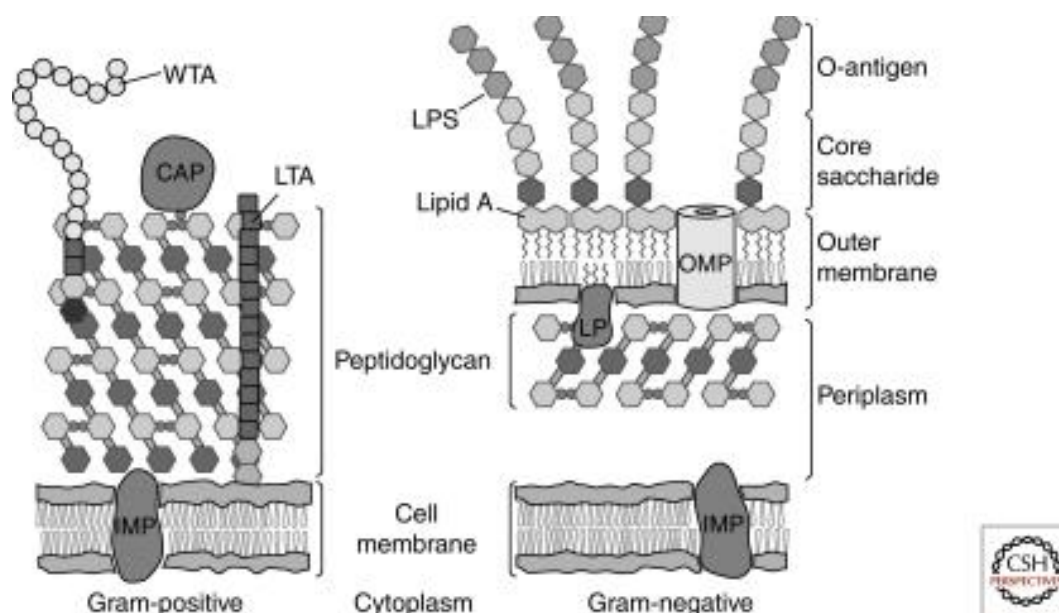
1.7.4.2 סוג ממברנה

סוג הממברנה עשוי גם כן להוות גורם משפיע בתהליך האלקטרופורציה. עובייה של הממברנה, מטענה החשמלי ומתח הפנים שלה⁴⁵ כל אלו עשויים להשפיע על . 2 סוגי הממברנה שנבדקו הינן ממברנה של חיידק גרם חיובי (*S. epidermidis*) וממברנה של חיידק גרם שלילי (*P. aeruginosa*)

חיידק הגרם חיובי מאופיין בממברנה עבה של פפטידוגליקאן, מבנה צפוף וחזק מול חיידקי הגרם שלילי שמאופיינים בממברנה דקה יותר (איור מספר 13)¹⁰. ההנחה היא כי השוני בעובי ומבנה הממברנה יתרום לשוני ברגישות החיידקים לטיפול ב PEF.

מחקרים של השנים האחרונות הראו כי חיידקים גרם חיובי עמידים יותר לטיפול ב PEF ביחס לחיידקי גרם שלילי בתנאים של pH-7⁴⁶. לעומת זאת, בתנאים של pH-4 התוצאה הייתה הפוכה כשחיידקי הגרם שליליים היו עמידים יותר⁴¹. בניסוי שלנו החיידקים יבחנו בתנאים של pH-7.

איור 13: השוני בממברנה בין חיידקי גרם חיובי ושלילי¹⁰



1.8 שימוש באנטיביוטיקה לקטילת חיידקים

בעבודותינו נעשה שימוש במיקס אנטיביוטי:

Penicillin-Streptomycin-Nystatin (Penicillin G Sodium Salt: 10,000 units/mL Streptomycin Sulfate: 10 mg/mL, Nystatin: 1,250 units/mL) provided by Biological industry Israel.

פניצילין G:

אנטיביוטיקה המסונתזת באופן טבעי על ידי החיידק *Penicillium chrysogenum*. אנטיביוטיקה זו גורמת לעיכוב האנזים טרנספפטידאז (trans-peptidase) שמשתתף בתהליך בניית הפפטידוגליקן בחיידקים. האנטיביוטיקה אפקטיבית כנגד חיידקים גרם חיובי ובמקרים מסוימים היא אפקטיבית גם נגד חיידקי גרם שלילי כמו *Leptospira weilii* ו-*Neisseria gonorrhoeae*^{48,47}.
ב *P. aeruginosa*⁴⁹ ו-*S. epidermidis*⁵⁰ נצפתה עמידות עבור פניצילין.

סטרפטומיצין:

אנטיביוטיקה זו מסונתזת על ידי החיידק *Streptomyces griseus* ומעכבת את תהליך סינתזת החלבונים בתא. היא נקשר ליחידה הקטנה של 16S rRNA בריבזום ומונע את הקישור של ה mRNA ליחידה 30S⁵¹. האנטיביוטיקה עובדת הן על חיידקים גרם חיובי והן על גרם שלילי והודות לספציפיות הגבוהה שלה היא אינה פוגעת בתאים אנימליים. בזכות תכונות אלו השימוש בה הוא רחב מאד.⁵²
ב *P. aeruginosa*⁴⁹ ו-*S. epidermidis*⁵³ זוהתה עמידות לאנטיביוטיקה סטרפטומיצין.

ניסטטין:

אנטיביוטיקה המשמשת בטיפול בזיהומים פטרייתיים. האנטיביוטיקה נקשרת לארגוסטרול, מרכיב מרכזי בממברנת הפטרייה ויוצרת בה חורים שגורמים לדליפת יוני K⁺, חמצון התא ולבסוף מוות תא הפטרייה⁵⁴.

2. השערת המחקר

השערת המחקר שלנו היא כי השימוש בשיטת האלקטרופורציה יכולה להוות אלטרנטיבה אפקטיבית עבור חיידקים שמתאפיינים בעמידות לקשת רחבה של אנטיביוטיקות ואינם ניתנים לטיפול בשיטה זו, כאשר חיידק המודל שנבחר לבחון את הייתכנות הינו חיידק ה- *P. aeruginosa*. בשיטה האלקטרופורציה, בשונה מהשיטה האנטיביוטית המקובלת, ניתן לטפל בו זמנית הן בזיהומים שמקורם בחיידקי גרם חיוביים והן גרם שליליים. בנוסף, בהתבסס על הספרות הקיימת בנושא, מרבית מנגנוני העמידות של החיידקים לאנטיביוטיקה ממקומים בחלקה החיצוני של הממברנה (בהם בעיקר רצפטורים קישור ותעלות) וכי במידה ונצליח לחצות את המחסום הממברנה, על ידי יצירה של "נתיבים" באלקטרופורציה, נעלה בצורה משמעותית את יעילות הטיפול באנטיביוטיקה. מטרת העל של המחקר היא לקבוע את מערך הפרמטרים האפקטיביים הנחוצים לקטילה אפקטיבית של חיידקים עמידים ובחינת ההשפעות הסינרגיסטיות בין שיטת האלקטרופורציה ושיטות נוספות.

3. שיטות

3.1 ניסוי ב-In vitro

3.1.1 הכנת מצע וגידול החיידקים

הכנת המצע:

על מנת לבצע את הניסוי במתח גבוהה הוכן מצע מיוחד המתאפיין בריכוז מלחים נמוך-ELS

ELS-Electoporation Low Salt media

תהליך הכנת המצע הוא כדלקמן (עבור נפח של 150 מ"ל):

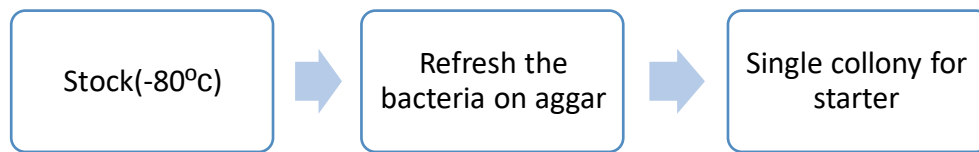
בתוך בקבוק זכוכית של 250 מ"ל, נוסיף 150 מ"ל מים מזוקקים פעמיים. אל תוך הבקבוק נוסיף:

טבלה 4: נוטריינטים להכנת 150 מ"ל של המצע ELS

Nutrient(Company)	Amount
NaCl (Merck)	0.015gr
Bacto-tryptone (ACE MEDIA)	1.5 gr
Yeast extract (BD-extract of autolyzed yeast)	0.75 gr
Agar (Bacteriological agar-ACE MEDIA)	2.25 gr
Glucose (D(+)) GLUCOSE-Sigma-Aldrich)	0.075 gr
HEPES buffer (Sodium salt HEPES buffer-Sigma-Aldrich)	3.58 gr

את מצע שהוכן נעביר סטרליזציה באוטוקלאב במשך 30 דקות בטמפרטורה של 121 מעלות צלזיוס. לאחר קירור מצע, ניצוק 10 מ"ל ממנו אל תוך צלחות אגר 90*15 מ"מ ונשאיר בתוך המנדף עד להתמצקות. מומלץ להשאיר את הצלחות בטמפרטורות החדר יומיים, עד לגיבושן הסופי.

על מנת להכין את המצע לסטארטר (Starter), נבצע את אותה הפרוצדורה ללא הוספת אגר למצע.



תחילה נפשיר את החיידקים - *P. aeruginosa PAO1* מהסטוק הקפוא ונבצע מריחה על גבי צלחת פטרי. את הצלחת יש להכניס לאינקובציה למשך 18 שעות ב 32 מעלות צלסיוס. כעת, כשהחיידקים גדלו, נרים בעזרת מטוש מושבה בודדת של החיידק ונמהל אותה בתוך 2mL של סטארטר בתנועות סיבוביות של המטוש. את הסטארטר המוכן נכניס לאינקובציה בטלטול תחת תנאים של 32 מעלות צלסיוס ו 150 סיבובים לדקה למשך 18 שעות. בנוסף לסטארטר תוכנת לאינקובטור מבחנת ביקורת (Blank) ללא החיידקים לשלילת הזדהמות של מצע על מנת לעבוד עם תמיסה סטנדרטית, נבצע מדידה של ערכי הבליעה של החיידקים כאשר ערך העבודה הרצוי צריך להיות OD-0.2 ו pH-7. את מדידת ערכי הבליעה נבצע בפלטה של

96 wells, transferred bottom(Costar)

ומכשיר ה-Tecan infinite M200 PRO שמכיל ל-אורך גל של 600 ננומטר. בשורה העליונה נעמיס טריפליקט של 100 μ L מצע ללא החיידקים ובשורה התחתונה נעמיס טריפליקט בעל אותו נפח של מצע עם החיידקים, כאשר ערכי הבליעה של מצע ללא החיידקים מוחסר מערך הבליעה של מצע עם החיידקים וערך הדלתא אמור להיות 0.2. מדידת pH בוצעה ע"י מזיגה של 50 μ L הסטארטר על מקלות pH בטווח בין 0-14.

3.1.2 שיטת האלקטרופורציה:

3.1.2.1 מהלך הניסוי

לאחר קביעת ערך הבליעה הרצוי, 100 μ L של תמיסת הסטארטר מוספות למרכז צלחת הפטרי. על מנת לפזר את החיידקים בצורה שווה נשתמש במקל דרגאלסקי, בעזרתו נבצע תנועות סיבוביות של מריחה על גבי הצלחת. במעבר בין צלחת לצלחת נעקר את המקל עם תמיסת אלקוהול 70%. לאחר ייבושן המלא של הצלחות במנדף הביולוגי, נרכיב את המערכת החשמלית, הכוללת את האלקטרודה, אמפרמטר ומחולל הפולסים ונגדיר את הפרמטרים הרצויים במחולל הפולסים (במעבר של האלקטרודה בין הצלחות, נבצע שטיפה באתנול 70% לעיקור).

3.1.2.2 מדידת הזרם החשמלי באמצעות PicoScope

מכשיר ה PicoScope 3000 Series של חברת PicoTechnology הינו מכשיר מדידה של זרם חשמלי במערכות בהם הזרם החשמלי קצר מאוד ובעזרת התוכנה PicoScope6 Software הוא מייצר תצורה גראפית של הפולס שיוצר מחולל הפולסים. המערכת מורכבת משלושה מרכיבים: הפרוב Pico Current Clamp (60A AC/DC, 20 A), הפיקוסקופ והתוכנה הממוחשבת (איור מספר 14).

איור 14: מערכת הפיקוסקופ למדידת הזרם החשמלי וקריאת הפולס המתקבל ממחולל הפולסים (מימין- הפרוב שמודד את השדה, משמאל-קופסאת העיבוד שממירה את המדידה לעוצמת הזרם)



© PicoScope Technology

את הפרוב מלבישים על גבי הקבל האדום (חץ לכיוון הזרם) והלולאה שנמצאת בפרוב ומתרגמת את השדה החשמלי הנוצר בה לזרם חשמלי.

3.1.2.3 שימוש בפולס גנרטור מסוג BTX ובניית מודל Taguchi

פולס גנרטור מסוג BTX 830 (Harvard Apparatus Inc, Holliston MA, USA):

מכשיר מעבדתי (איור מספר 15) המחולל פולסים ע"י 4 פרמטרים דינאמיים שנקבעים ע"י המשתמש. (1) מתח, (2) אורך הפולס, (3) מספר הפולסים, (4) אינטרוולים בין הפולסים. ע"י קביעת מטריקס של ארבעה הפרמטרים נקבעים צורת ועוצמת הפולס המתקבל.

איור 15: מחולל הפולסים מסוג BTX 830



© Harvard Apparatus Inc,
Holliston MA, USA

על מנת לכייל את המערכת ולבדוק איזה שילוב הוא האפקטיבי ביותר בקטילת החיידקים, השתמשנו במודל טאג'וצי (Taguchi). שיטה זו שהומצאה ע"י ג'.טגוצ'י עבור ייעול תהליך הייצור התעשייתי ואומצה גם ע"י המדענים כשיטה סטטיסטית נוחה לביצוע אופטימיזציה של מערכת הניסוי⁵⁵. בניסוי שלנו השתמשנו במערכת L9 עבור 4 פרמטרים נבדקים בשלוש רמות שונות (טבלה מספר 4 ו 5) עבור כל פרמטר. המידע נאסף ורוכז בקובץ Excel(Office365,Microsoft)

טבלה 5: הצגת הפרמטרים הנבדקים ושלוש

הרמות שלהן

Paramiter	Value
(A) Voltage	(1) 1700V
	(2) 1725V
	(3) 1750V
(B) Pulse length	(1) 40 μ s
	(2) 50 μ s
	(3) 60 (μ s)
(C) Pulse interval	(1) 450 ms
	(2) 400 ms
	(3) 450 ms
(D) Pulse numbers	(1) 100
	(2) 150
	(3) 200

טבלה 4: תוכנית מטריקס Taguchi L9 עבור 4 פרמטרים ב 3 דרגות

Experimental trial	Process parameters			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

שימוש בפולס גנרטור מסוג- 3.1.2.4

IGBT- (insulated-gate bipolar transistor)

במקביל לעבודה על המכשיר המעבדתי, פותח במעבדה מחולל פולסים מסוג IGBT על ידי מהנדס המעבדה ד"ר קלמנטי לבקוב. המכשיר שעוצב להתאים לדרישות האלקטרופורציה תוכנן כך שיכל לספק את הנתונים המקסימליים הבאים: מתח 0-1000V, זרם חשמלי של 0-160A, אורך פולס של 5-100 μ s ותדירות שבין 1-10Hz.

על סמך ההבנות שהושגו בחלק הראשון הוחלט ליישם שילוב חדש של הפקטורים הנבדקים. מערך הניסויים שתוכנן מוצג בטבלה מספר 6.

טבלה 5: פרמטרים בניסוי של מחולל הפולסים מסוג IGBT

	V	Pulse numbers	Pulse length (μsec)	Hz
1	1000V	100	200	2
2	1000V	100	250	2
3	1000V	100	300	2
4	1000V	150	200	2
5	1000V	150	250	2
6	1000V	150	300	2
7	1000V	200	200	2
8	1000V	200	250	2
9	1000V	200	300	2
10	1000V	100	200	3
11	1000V	150	250	3
12	1000V	200	300	3
13	1000V	200	300	1
14	1000V	200	300	4

3.1.3 שילוב של שיטת האלקטרופורציה עם הוספת אנטיביוטיקה

בניסוי זה נבחנו החיידקים *Staphylococcus epidermidis* RP62A ו *P aeruginosa* PAO1 על מנת לבחון היתכנות של פעולה סינרגיסטית בין השדה החשמלי והאנטיביוטיקה עוצבה מערכת הניסוי שמשלבת את הטיפולים של PEF ואנטיביוטיקה. בניסוי זה השתמשנו במיקס של האנטיביוטיקות :

Penicillin-Streptomycin-Nystatin

Penicillin (Penicillin G Sodium Salt: 10,000 units/mL); **Streptomycin** (Streptomycin Sulfate: 10 mg/mL); **Nystatin** (1,250 units/mL)- (Biological Industries 03-032-1C, Israel)

על בסיס המיקס הוכנו חמישה מהולים של האנטיביוטיקה כפי שמוצג בטבלה מספר 7:

טבלה 6: מהולי מיקס האנטיביוטיקה Penicillin-Streptomycin-Nystatin

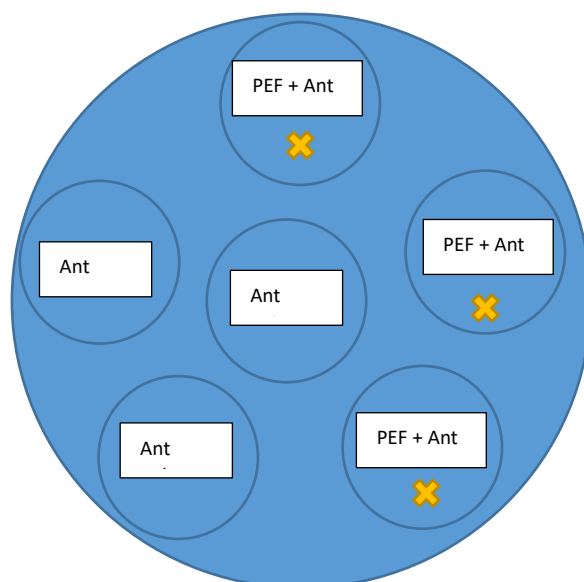
Pen G-5000 units/mL, Strep-5 mg/mL, Nys-625 units/mL	Dilution 1
Pen G-2000 units/mL, Strep-2 mg/mL, Nys-250 units/mL	Dilution 2
Pen G-1000 units/mL, Strep-1 mg/mL, Nys-125 units/mL	Dilution 3
Pen G-666.7 units/mL, Strep-0.67 mg/mL, Nys-83.3 units/mL	Dilution 4
Pen G-500 units/mL, Strep-0.5 mg/mL, Nys-62.5 units/mL	Dilution 5

לאחר מריחת הצלחות בחיידקים, נקראו על ידי האלקטרודה 6 עיגולים, כפי שמתואר באיור מספר 16. על העיגולים הונחה טיפה של $2\mu\text{L}$ מתמיסת האנטיביוטיקה ושלושה מתוך 6 העיגולים סומנו באיקס כך שהקבוצות הניסוי בכל צלחת היו:

- רקע הצלחת בהם נראה שהחיידקים גדלו
- 3 באריות בהם הייתה רק אנטיביוטיקה - ערך העיכוב שלהם חושב כערך אקוויולנטי לשדה חשמלי
- 3 באריות בהם היה טיפול של שדה חשמלי יחד עם אנטיביוטיקה (הבאריות המסומנות באיקס)
- צלחת נפרדת בה הטיפול היה רק בשדה חשמלי ע"פ:

1750 V, 200 Pulses, 60 μs Pulse length, 350 ms Pulse Interval

איור 16: מערך ניסוי האנטיביוטיקה בצלחת פטרי



3.1.4 אנליזת הנתונים - Imaging

לאחר אינקובציה למשך 18 שעות כל בארית של הצלחת צולמה בנפרד, בעזרת Binocular Leica M420 בהגדלה של פי 5.6 בעזרת התוכנה:

uEye Cockpit(IDS Imaging Development Systems GmbH, Germany).

הצילומים הועברו לתוכנה ImageJ (National Institutes of Health (NIH),USA) בה נמדדו הרדיוסים ממרכז האלקטרודה הפנימית אל המעגל החיצוני בו מסתיים בעיכוב. הגדלים, שנמדדו בפיקסלים הועברו לקובץ Excel בו הם עברו המרה לפי היחס $90 \text{ pixels} - 0.2 \text{ mm}$ (היחס נקבע על סמך צילום המרה לפי גודל של נייר מילימטרים ובוצע קודם לכן).

3.1.5 ניתוח סטטיסטי

עבור הניסוי עם מכשיר ה-BTX ומאטריקס טאגוצ'י: הנתונים נאספו בקובץ Excel ונותח סטטיסטית ע"י התוכנה Minitab17 (Minitab, Inc) לקביעת דרגת ההשפעה של כל פרמטר בנפרד - Rating וקביעת הקומבינציה האופטימלית.

עבור ניסוי IGBT:

הנתונים נאספו בקובץ Excel ונותחו סטטיסטית ע"י מבחני T-test ,one tail($\alpha < 0.05$)

עבור ניסוי PEF ואנטיביוטיקה:

הנתונים נאספו בקובץ Excel ונותחו סטטיסטית ע"י מבחני T-test ,one tail($\alpha < 0.05$)

3.2 ניסוי ב- Ex vivo

3.2.1 גידול החיידקים

תחילה נפשיר את החיידקים מהסטוק הקפוא ונבצע מריחה על גבי צלחת פטרי. את הצלחת יש להכניס לאינקובציה למשך 18 שעות ב 32 מעלות צלסיוס. כעת, לאחר שהחיידקים גדלו, נרים בעזרת מטוש מספר מושבות של החיידק ונמהל אותם בתוך 2 מ"ל של סטארטר בתנועות סיבוביות של המטוש. את הסטארטר המוכן נכניס לאינקובציה בטלטול תחת תנאים של 32 מעלות צלסיוס ו 150 סיבובים לדקה למשך שעתיים. בנוסף לסטארטר תוכנס לאינקובטור מבחנת ביקורת (Blank) ללא החיידקים לשלילת הזדהות של מצע.

על מנת לעבוד עם תמיסה סטנדרטית, נבצע מדידה של ערכי הבליעה של החיידקים כאשר ערך העבודה הרצוי צריך להיות OD-0.2 ו pH-7. את מדידת ערכי הבליעה נבצע בפלטה של

Tecan infinite M200 PRO(96 wells,transferred bottom) ומכשיר ה-Tecan

שמוכיל ל-אורך גל של 600 ננומטר. בשורה העליונה נעמיס טריפליקט של $100 \mu\text{L}$ מצע ללא החיידקים ובשורה התחתונה נעמיס טריפליקט בעל אותו נפח של המצע עם החיידקים, כאשר ערכי הבליעה של המצע ללא החיידקים מוחסר מערך הבליעה של המצע עם החיידקים וערך הדלתא אמור להיות 0.2.

מדידת ה pH בוצעה ע"י מזיגה של 50mL הסטארטר על מקלות pH בטווח בין 0-14.

3.2.2 מערכת הניסוי ב-Ex vivo

רקמת העור היא רקמה ייחודית ולא הומוגנית ששונה בתכליתה ממשטח הג'ל עליו בוצעה מערך הניסויים הראשון ולכן, הצעד הבא שלנו היה לעבור למערכת מורכבת המדמה את העור האנושי בצורה אופטימלית יותר. למטרה זו בחרנו להשתמש בעור של עוף שעבר תהליך של ניקוי וטופל ב-PEF.

תהליך ההכנה של העור לניסוי:

על מנת לוודא כי חיידקים אחרים שנמצאים קרוב לוודאי על גבי העור לא יפריעו לתוצאות הניסוי העור נוקה לפי השלבים הבאים:

תחילה, העור נשטף במים מזוקקים שלוש פעמים והועבר לצלחת פטרי סטרילית במנדף ביולוגי. בתוך המנדף, כל צד של העור נחשף במשך 20 דקות לקרינת UV (על מנת להבטיח את קטילת החיידקים על פני העור), נשטף פעם נוספת והועבר לאינקובציה בטלטול עדין, למשך 24 שעות בתוך 1.5 mL תמיסת אנטיביוטיקה בריכוז:

Penicillin-Streptomycin-Nystatin: Biological Industry (Penicillin G Sodium Salt: 10,000 units/mL, Streptomycin Sulfate: 10 mg/mL, Nystatin: 1,250 units/mL)

לאחר ההשריה, העור נשטף פעם נוספת במים מזוקקים בתוך המנדף והושרה 24 שעות בתוך המים המזוקקים על מנת ששאריות האנטיביוטיקה ישטפו ממנו. כעת כשהעור מוכן וללא זיהומים נראים לעין (המים המזוקקים נותרו צלולים ולא הפכו לעכורים), על גבי העור פוזר באופן אחיד 100 μ L של תמיסת הסטרטר עם *P. aeruginosa*. העור גודל כך למשך יומיים עד ליצירת ביופילם⁵⁴.

3.2.3 יישום שיטת האלקטרופורציה

על ידי האלקטרודה הקונצנטרית, 3 חזרות של אלקטרופורציה בוצעו על כל פיסת עור על פי פרמטרים שונים, כפי שמופיעים בטבלה מספר 8 (עור מספר 1 נבחר להיות עור רפרנס ללא טיפול).

טבלה 7: מערכת הפרמטרים החשמליים בניסוי על עור העוף

Experiment number	Voltage	Pulse length(μ s)	Number of pulses	Pulse interval (s)
Skin 2	1000	200	200	0.3
Skin 3	1000	300	200	0.3
Skin 4	1000	300	300	0.3
Skin 5	1000	300	200	0.2

3.2.4 אנליזת הנתונים - Imaging

צילום חתיכות העור בוצע על ידי מכשיר ה-

Maestro in vivo fluorescence imaging of whole small animals (Cambridge Research & Instrumentation, Inc. (CRi), USA.

המכשיר (איור מספר 17) כוון לאורך גל של 445 nm⁵⁶ והדגימה צולמה במספר זמנים: (1) לפני הטיפול ב-PEF, (2) מיד לאחר הטיפול, (3) שעה לאחר הטיפול, (4) 48 שעות אחרי הטיפול. בכך אחת מהפעמים נבדק השטף הכללי (scaled counts/s) ותוצאות המדידה רוכזו בקובץ Excel.

איור 17: מערכת הדימות *Maestro in vivo fluorescence imaging*⁵⁵



3.2.5 ניתוח סטטיסטי

שלוש חזרות של כל אחד מן הפרמטרים בוצעו כל גבי כל פרגמנט עור. תוצאות השטף הכללי מכל אחת מהן נסכמו והומרו לאחוזים כשנקודת הרפרנס הייתה סכום המדידות מעור מספר 1. התוצאות הסופיות אוחדו לגרף שמראה את השתנות הסיגנל בכל אחד מן הדגימות אחרי הטיפול כפונקציה של הזמן.

3.3 ניסוי ב- *In vivo*

3.3.1 גידול החיידקים

חלק זה של העבודה בוצע בשיתוף פעולה עם ד"ר מנג'י וו, מבית החולים שרינרס לילדים, בוסטון, ארה"ב.

סטארטר החיידק *P. aeruginosa* גודל במצע BHI- brain heart infusion יחד עם האנטיביוטיקה קנמיצין בריכוז 50 µg/mL באינקובטור עם טלטול בתנאים של 37 מעלות וטלטול של 100 prm. לאחר אינקובציה של 18 שעות החיידקים נבדקו ל-OD כך שערכי הבליעה אמורים להיות סביב 0.6-0.8 באורך גל של 600 nm (אקוויולנטי ל-10⁸ CFU). תמיסת החיידקים רוכזה בצנטריפוגה ונמהלה ב-PBS.

3.3.2 מערכת הניסוי ב-*In vivo*

במערך הניסויים הבא נראה כיצד שיטת האלקטרופורציה השפיעה בתנאי מעבדה על קצב העלמות הזיהום בכוויה מזוהמת.

בניסוי ה-*in vivo* השתמשנו בעכברות BALB/c מעבדה, בנות 7-8 שבועות שמשקלן היה בין 17-21 גרם. העכברים גודלו בבית החיות של בית החולים כאשר כל עכבר גדל בכלוב נפרד, עם גישה למזון ושתייה ותחת משטר של 12 שעות אור-חושך ביממה. טמפרטורת החדר בה הוחזקו החיות הייתה 21 מעלות ולחות משתנה בין 30%-70%. כל הפרוצדורות שבוצעו בחיות היו מאושרות על ידי הועדה המפקחת של המרכז למחקר בחיות של בית החולים MGH ובהתאם להוראות של ה-NIH.

לפני יצירת הכוויה הצד הדורסלי (גבה האמצעי והתחתון) של החיה גולח על 0 (כך שרק שיערות זעירות נותרו על העור ואפשרו לחיידקים להדבק) ובוצעה הזרקה בטנית של משכך כאבים קטמין (לפי יחס כמות ביחס למשקל גוף). על מנת ליצור את הכוויה הטרמלית, השתמשנו במטיל מתכת מרובע בגודל של 1.2 על 1.2 ס"מ שחומם בתוך אמבט מים עד לבעבוע מואץ של המים במיכל. טמפרטורת המתיל הייתה סביב 95 מעלות. כשהחיה נרדמה, עיניה כוסו בפופרין לשמירה על לחותן והמטיל הוצמד לגב החיה למשך 7 שניות ליצירת הכוויה. לאחר המתנה של 5 דק בהם האזור התקרר, $50 \mu\text{L}$ של סטארטר החיידקים פוזרו בצורה אחידה על שטח הכוויה בעזרת טיפ.

3.3.3 יישום שיטת האלקטרופורציה

העכברים חולקו ל-7 קבוצות, על פי הפרמטרים כפי שמופיעים בטבלה מספר 9 כך שבכל קבוצה היו 2 חיות, סה"כ 15 חיות בניסוי. האלקטרופורציה בוצעה על גבי הכוויה הטרמלית, כך שאזור הכוויה נתפס ע"י אלקטרודה עם קצוות מרובעים שהוצמדו זו לזו (כאשר שכבת העור הכווי נמצא ביניהן) במרחק של 1 ס"מ. בניסוי זה השתמשנו במחולל פולסים מסוג BTX 830.

טבלה 8: מערך הפרמטרים לניסוי *In vivo*

Number	V	Pulse Length	Pulse Numbers	Pulse Interval	Number of mice tasted
1	0	0	0	0	2
2	500	160	200	1	2
3	500	180	200	1	2
4	500	200	100	1	2
5	700	30	100	1	2
6	700	40	100	1	2
7	700	50	100	1	2

3.3.4 אנליזת הנתונים - Imaging

הודות ליכולת של החיידק לייצר אור בתהליך ביולומינסנציה⁵⁷, בוצע מעקב אחר ההשתנות בצפיפות האור המוחזרת מהדוגמא. לפני הצילום העכברים הורדמו במיקס של קסילן וקטמין.

לצילום נבחר המכשיר (PerkinElmer, IVIS Lumina (series III) (USA) **איור מספר 18**. למכשיר נבחר מוד סופר פוטונים מוחזרים (כתוצאה מהאקסיטציה באורך הגל המתאים) החיה מוקמה במרכז הלוח שחור עם פוקוס על אזור הכוויה. הדטקטור של המצלמה קלט את הפרוטונים ועל ידי עיבוד גרפי הציג סקאלה של צפיפות פוטונים, כאשר הצפיפות הגבוהה סומנה באדום והצפיפות הקטנה בכחול (באר עם סקאלט הצפיפויות מוצג בצד התמונה). אנליזת המידע בוצעה בעזרת Living Image® 4.5.2.

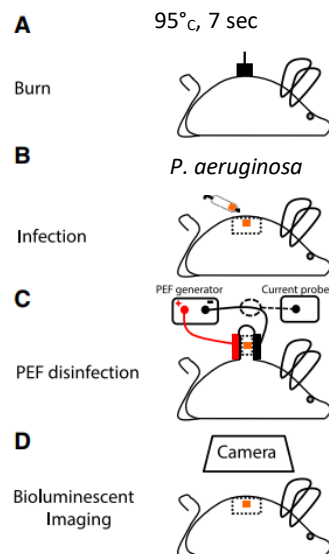
המעקב אחרי החיות בוצע לפי פרקי הזמן הבאים: (0) - t לפני הטיפול, (1) - t מיד לאחר הטיפול, (2) - t שלוש שעות אחרי הטיפול, (4) - t 48 שעות אחרי, (5) - t ביום השלישי לאחר הטיפול, (6) - t ביום הרביעי אחרי הטיפול.

איור 18: מערכת הדימות IVIS Lumina (series III)



באיור מספר 19 ניתן לראות את הסכמה שמסכמת את הניסוי כפי שבוצע⁵⁸.

איור 19: סכמת הניסוי *in vivo*⁴⁸



3.3.5 ניתוח סטטיסטי

המידע נאסף בקובץ Excel ועובד כך שעבור כל עכבר השטף ביום הראשון הווה את הרפרנס (100%) והנקודות האחרות הושוו אליו ליצירת ערך ירידה בשטף באחוזים. הניתוח בוצע בנפרד עבור כל אחד משני העכברים שהיו בכל קבוצת טיפול והערכים הממוצעים מוצגים בגרף בחלק התוצאות.

4. תוצאות

4.1 ניסוי ב *In-vitro*

4.1.1 ניסוי כיול על פי Taguchi עם מכשיר ה-BTX

השלב הראשון במערך הניסויים שלנו היה לכייל את המערכת ולמצוא את הקומבינציה האופטימלית שתביא לערך E_c הנמוך ביותר. **בטבלה מספר 10** מוצגים תוצאות החלק הראשון של העבודה על פי מטריקס Taguchi. על פי תוצאות אלו ניתן לראות כי מערך הניסויים השלישי, עם ערך של $E_c - 295.3 \text{ Vmm}^{-1}$ הוא ערך השדה הנמוך ביותר בהשוואה לשאר הקומבינציות, למעשה הוא קטן יותר ב 139% מהערך הכי גדול של ה- E_c בניסוי הראשון וקטן ב 53% מהערך השני המינימלי של ה- E_c שהושג בניסוי ה-9. הפערים הגדולים ההלו מצביעים על חשיבות המכרעת של בחירת קומבינציית הפרמטרים הנכונה על מנת להגיע לתוצאה האופטימלית בניסוי. נזכיר שפונקציית השדה החשמלי היא פונקציה הפוכה לאפקטיביות המערכת, ככל שהקטילה תקרה בשדה נמוך יותר כל הניסוי היה אפקטיבי יותר.

טבלה 9: סיכום תוצאות ניסוי Taguchi

Experiment number	Voltage on R1	Pulse Length (μs)	Number of pulses	Pulse Interval (ms)	$E_c \text{ (Vmm}^{-1}\text{)}$
1	1700	40	100	450	705.7 $\pm$ 65.4
2	1700	50	150	400	552.7 $\pm$ 35.6
3	1700	60	200	350	295.3 $\pm$ 35.3
4	1725	40	150	350	593.1 $\pm$ 52.5
5	1725	50	200	450	478.2 $\pm$ 38.5
6	1725	60	100	400	527.4 $\pm$ 40.4
7	1750	40	200	400	520.9 $\pm$ 34.1
8	1750	50	100	350	581.8 $\pm$ 43.8
9	1750	60	150	450	452.9 $\pm$ 49.1

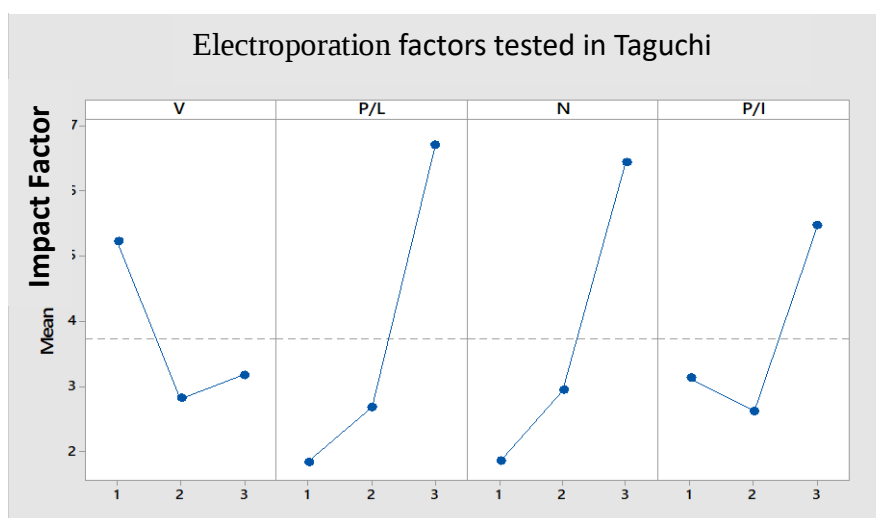
בנוסף לבחירת הקומבינציה, המטריקס בחן כל פרמטר בנפרד כאשר את הניתוח הסטטיסטי של הפרמטרים ניתן לראות בגרף מספר 3 ו **טבלה מספר 11**. על פי הגרף ניתן לראות כי 2 הפרמטרים בעלי ההשפעה החשובה ביותר, במסגרת התחום שבדקנו, הינם הפרמטר של אורך הפולס (P/L) עם השיפוע החד ביותר מבין הפרמטרים הנבדקים ומיד אחריו הפרמטר של מספר הפולסים. **בטבלה מספר 11** אף ניתן לראות את הערכים המדידים של עוצמת ההשפעה של כל אחד מבין הפקטורים הנבדקים, כאשר הפקטור של אורך הפולס מדורג ראשון עם ערך השפעה של 4.86 ואחריו ערך ההשפעה של מספר הפולסים, המדורג שני עם ערך השפעה של 4.58. בהפרש ניכר מהם

ניתן לראות את השפעת המתח החשמלי והאינטרוול בין הפולסים. כעת בבואנו לתכנן את מערכי הניסוי הבאים אנו יודעים מי הם הפרמטרים המשפיעים, אותם ננסה להעלות בתמורה להורדה של ערך הפרמטרים המשפיעים פחות.

טבלה 10: פלט מעובד של מידת השפעת הפרמטרים על פי Taguchi ודירוג מידת ההשפעה שלהם

P/I	N	P/L	V	Level
3.119	1.844	1.836	5.218	1
2.621	2.939	2.676	2.814	2
5.465	6.422	6.692	3.172	3
2.844	4.578	4.856	2.403	Delta
3	2	1	4	Rank

גרף 3: פלט מידת ההשפעה של הפרמטרים על פי ניתוח Taguchi (ציר x- מספר החזרה, מתוך 3).

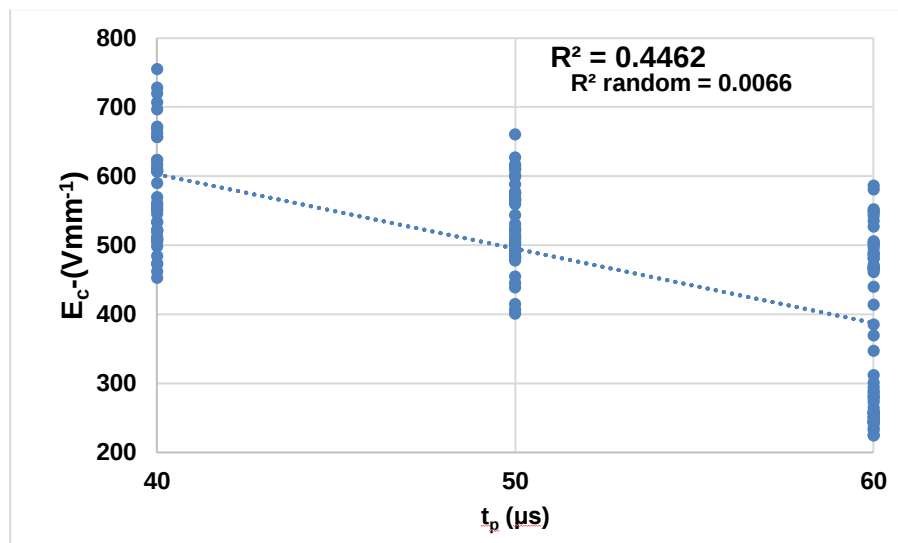


בנוסף לבדיקה של הקומבינציות השונות והשפעת הפרמטרים הבדידים, נבדקה המגמה בתוך קבוצת הפרמטרים כאשר כל אחד מבין 4 הפרמטרים של הפולס נבדק ב 3 רמות השפעה⁵⁹. הפרמטר הראשון שנבדק (**גרף מספר 4**) הינו השפעת משך הפולס ונראה כי ישנה קורלציה ישירה בין משך הפולס לבין הירידה בערך השדה, התופעה מוסברת בקרוב ל 45% מהמקרים, כזכור זהו הפרמטר שנמצא המשפיע ביותר על פי הניתוח של Taguchi. הפרמטר השני שנבדק הוא מספר הפולסים (**גרף מספר 5**) בו ניתן לראות את הקורלציה בין מספר הפולסים העולה והירידה בשדה החשמלי הקריטי ומוסבר ב 44% מהמקרים. הגרף השלישי (**גרף מספר 6**) מראה את הקשר בין ירידה באינטרוול בין הפולסים והירידה בשדה החשמלי הקריטי. כאן ניתן לראות כי בטווח שנבחר ישנו קשר חלש בין 2 המשנים הללו, כאשר רק 11% אחוז מהתוצאות מסבירות את התופעה. הפרמטר הרביעי של הזרם החשמלי שדורג במקום הרביעי לפי המטריקס נמצא לא משפיע בטווח שנבחר. בגרף ברביעי (**גרף מספר 7**)

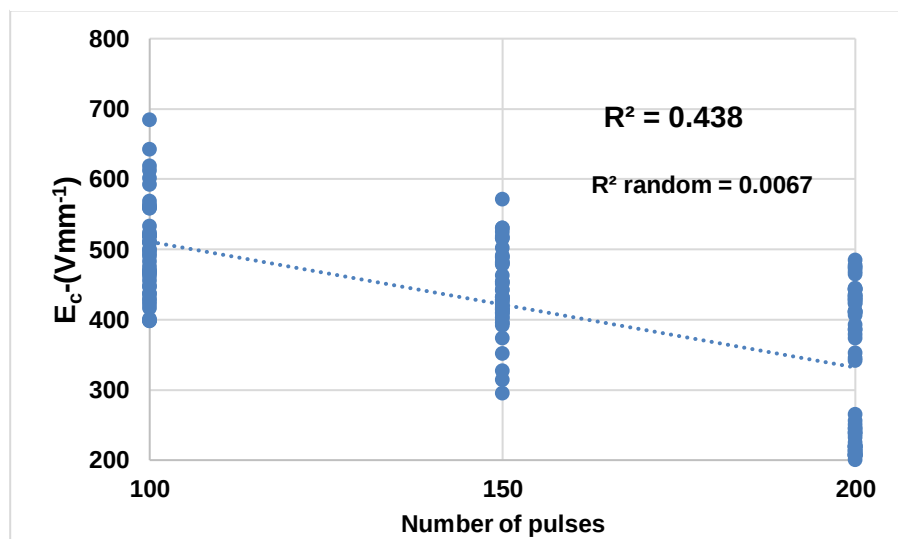
מוצג הקשר בין האנרגיה בג'ואל, המושקעת בתהליך לבין השדה החשמלי הקריטי. באופן הגיוני ישנה הלימה בין כמות האנרגיה המושקעת

בתהליך לבין אפקט הקטילה, כשתוצאות מסבירות 72% מהמקרים. בנוסף, על מנת לשלול אפקט רנדומלי, תוכנן קוד להרצה רנדומלית של התוצאות ב MATLAB, שכלל עשרת אלפים הרצות כשבסיום קיבלנו ערך מסביר רנדומלי. כפי שניתן לראות עבור כל המשתנים הערך הזה הוא נמוך מאוד, מכאן ניתן לשלול את האפקט הרנדומלי. 12-16 חזרות בוצעו בעבור כל קומבינציה על מנת להבטיח חוזק סטטיסטי ומובהקות התוצאה.

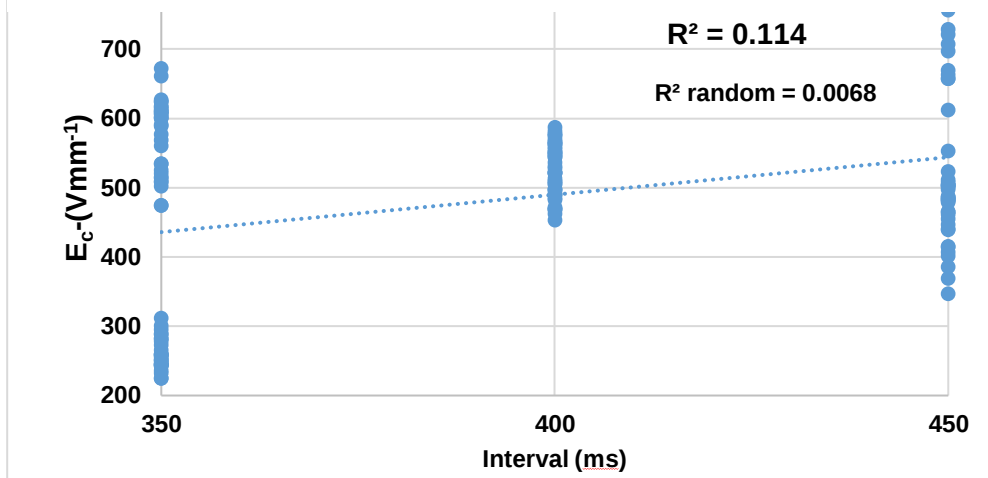
גרף 4: קורלציית הקשר בין אורך הפולס והשדה החשמלי הקריטי



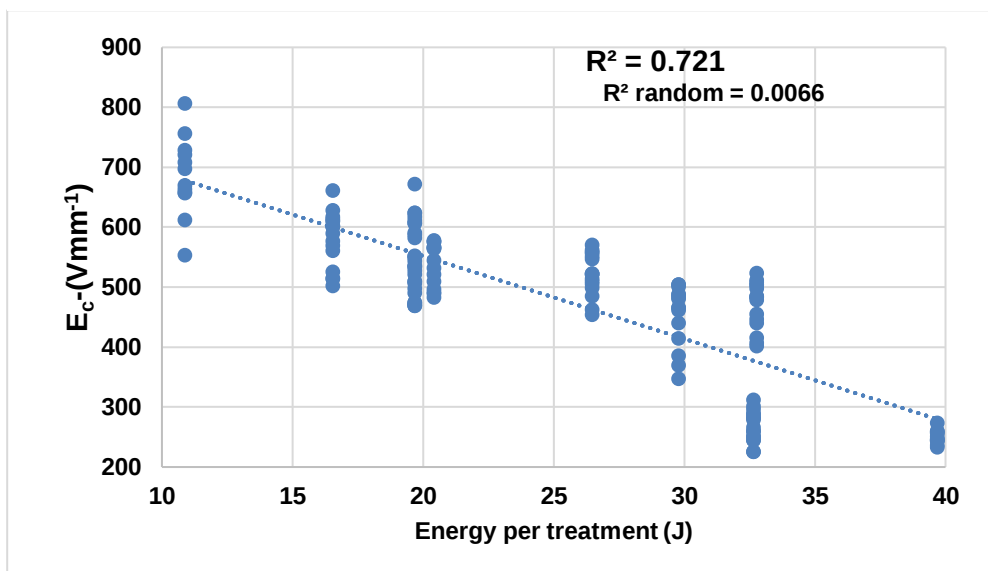
גרף 5: קורלציית הקשר בין מספר הפולסים והשדה החשמלי הקריטי



גרף 6 : קורלציית הקשר בין האינטרוולים והשדה החשמלי הקריטי



גרף 7 : קורלציית הקשר בין האנרגייה הכללית לבית השדה החשמלי הקריטי



4.1.2 בחינת הפעילות של מחולל הפולסים IGBT

חלק זה של הניסוי כלל בתוכו 2 מטרות עיקריות. הראשונה, בחינת המכשיר החדש בתנאי מעבדה והאם אכן מצליח לעמוד בציפיות הנדרשות ולחולל את הפולס הרצוי. השנייה הייתה בחינה של סט פרמטרים חדשים, המתבסס על המסקנות מן החלק הראשון של העבודה. ריכוז תוצאות הניסויים עם המחולל IGBT מוצגות בטבלה 12. ניתן לראות כי הורדת המתח החשמלי מ-1750 ל-1000 וולט (הפקטור הכי פחות משפיע על פי Taguchi) והעלאה של הפקטורים אורך הפולס (הפקטור המשקיע ביותר על פי Taguchi) הביאה לירידה חדה ביותר בערך ה- E_c . אם במערך הראשון הצלחנו להשיג תוצאה של שדה מינימלי של 295 Vmm^{-1} , במערך החדש הצלחנו להגיע לערך מינימלי של 82 Vmm^{-1} (ירידה של 360 אחוזים) בעבור הקונפורמציה של:

1000 V, 200 pulses, 300 μs pulse length, 4 Hz.

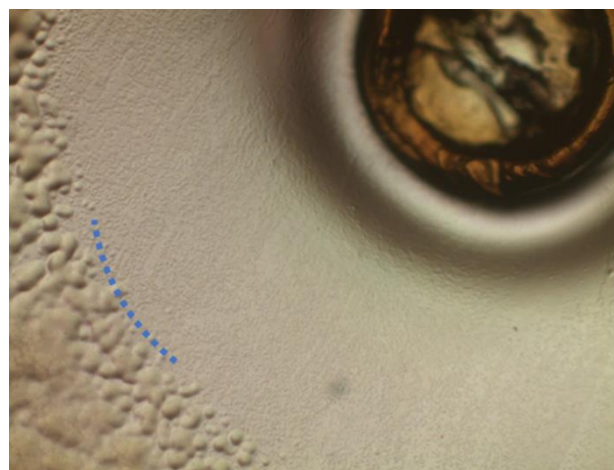
גם קוטר העיכוב (איור מספר 20) גדל באופן משמעותי כאשר ערך העיכוב המקסימלי הגיע ל- 37.35 mm^2 .

באיור מספר 20 מוצגת התמונה המתקבלת אחרי הטיפול ב PEF כאשר העיגול האמצעי הוא האלקטרודה הפנימית, השטח השקוף הוא השטח בו השדה פעם וקטל את החיידקים והקו הכחול מסמל את גבול השדה הקריטי. הרדיוס נמדד ממרכז האלקטרודה הפנימית אל עבר גבול הקטילה של השדה.

טבלה 11: סיכום תוצאות ניסוי Taguchi

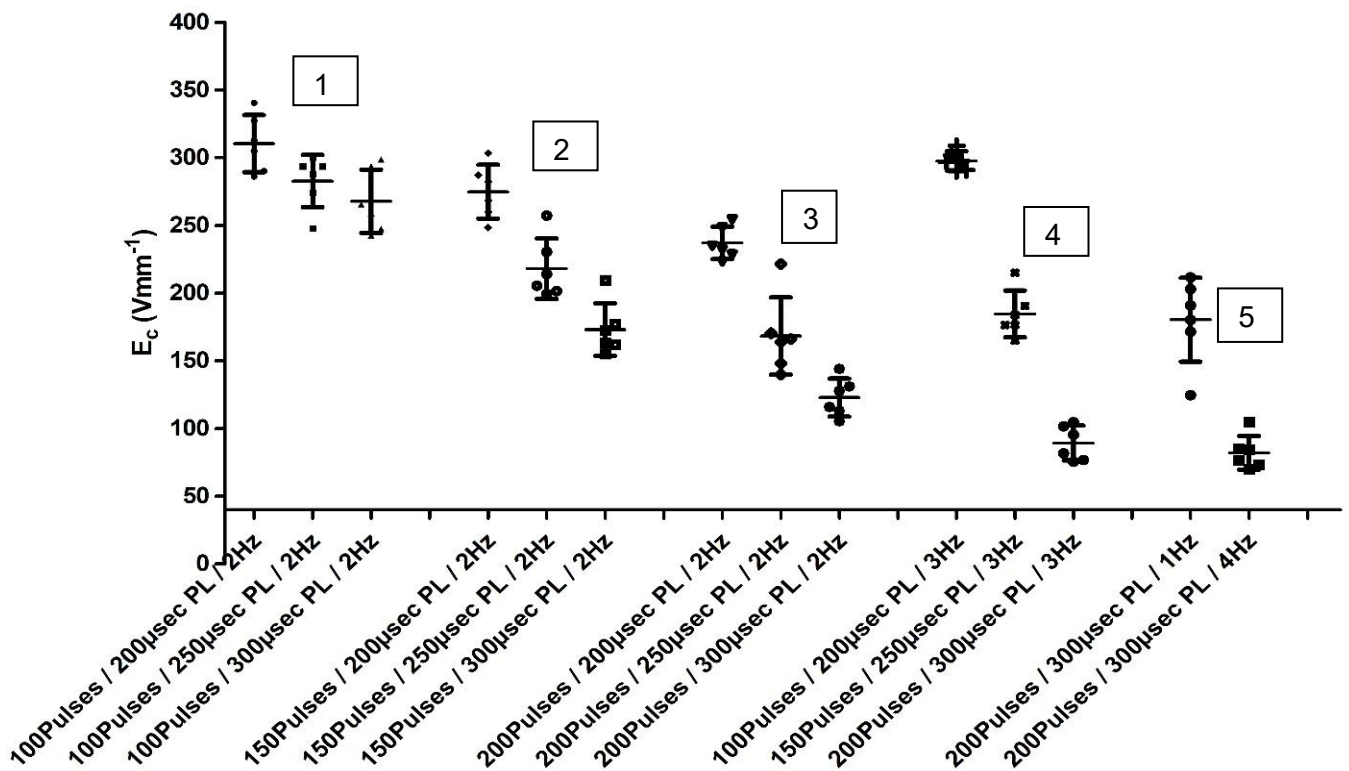
איור 20: קטילת החיידקים בהשפעת השדה החשמלי וגבול ההשפעה שלו (צילום המיקרוסקופ אור $\times 5.6$)

Experiment		Area	
number	$r_c(\text{mm})$	(mm^2)	$E_c(\text{Vmm}^{-1})$
1	0.99	9.75	310.36
2	1.09	10.71	282.77
3	1.15	11.33	267.83
4	1.12	11.02	274.88
5	1.41	13.94	218.04
6	1.78	17.59	173.06
7	1.29	12.74	237.05
8	1.86	18.29	168.29
9	2.51	24.79	122.91
10	1.03	10.13	297.64
11	1.67	16.45	184.57
12	3.48	34.36	89.28
13	1.74	17.22	180.33
14	3.78	37.35	82.11



מגמות ההשפעה של הפרמטרים השונים על ערך השדה- E_c מוצגות בגרף 8. במקבץ הראשון הפרמטר המשתנה הוא אורך הפולס והוא נע בטווח בין $200-300 \mu s$ כאשר שאר הפרמטרים קבועים ועומדים על 100 פולסים בתדירות של 2 Hz. ניתן לראות בבירור את המגמה כי העלייה באורך הפולס מביאה לירידה קונסיסטנטית בערך ה- E_c . גם במקבץ השני הפרמטר המשתנה הוא אורך הפולס הנע בטווח בין $200-300 \mu s$ כאשר שאר הפרמטרים נשארים קבועים: 150 פולסים בתדירות של 2 Hz. גם כאן נצפת מגמה וזהה כאשר העלאת אורך הפולס מביאה לצניחה בערך ה- E_c . המקבץ השלישי גם הוא מקבץ שמציג את השינוי באורך הפולס בטווח בין $200-300 \mu s$ עם פרמטר קבוע של 200 פולסים בתדירות 2 Hz. פעם נוספת נצפת אותה מגמה וניתן להגיד כי המקבצים הללו מחזקים את ההשערה כי הפרמטר של אורך הפולס הוא פרמטר מכריע. במקבץ הרביעי שני הפרמטרים של אורך הפולס ומספר הפולסים משתנים יחד בסדר עולה בין 100-200 פולסים ו אורך הפולס הנע בטווח בין $200-300 \mu s$. בשונה משלושת המקבצים האחרים, הגדילה של 2 הפרמטרים בו זמנית מביא לקצב ירידה חד יותר בערכי ה- E_c אל מתחת לרץ המאה. מקבץ 5 הוא מקבץ השלמה שבוצע למעך המקורי ובא לבחון את השפעת העלייה בתדירות הפולס על ערך ה- E_c .

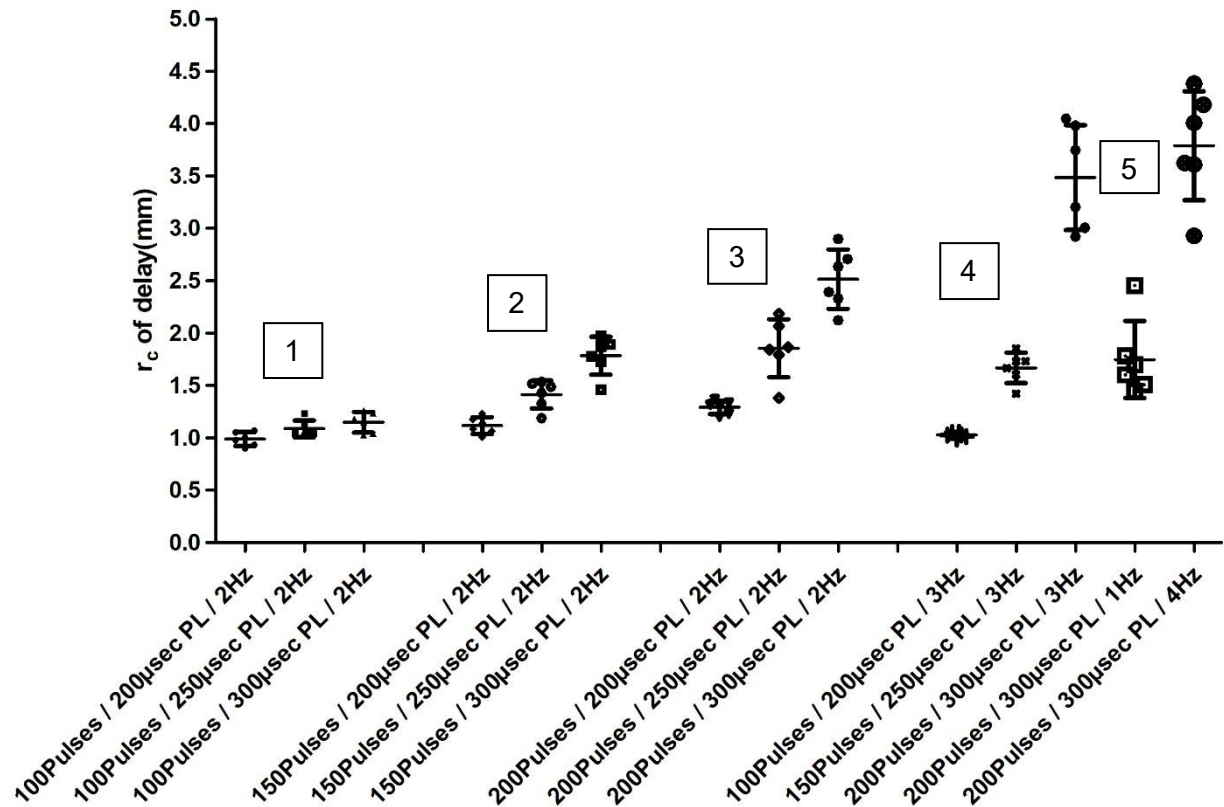
גרף 8: עוצמת השדה החשמלי כתלות בפרמטרים משתנים (כללי). מתח קבוע של 1000V.



בנוסף לניסויים שבוצעו ב 2/3 Hz ביצענו השלמה של 1/4Hz. גם כאן נצפתה ירידה חדה ערכי השדה במעבר מ- 1 Hz ל 4 Hz ועל החלק של השפעת התדירות נדון בהמשך.

מגמה דומה נצפתה בגרף שמתאר את העלייה ברדיוס העיכוב בעקבות השינוי בפרמטרים השונים (גרף מספר 9), הגדלת אורך הפולס, מספר הפולסים והתדירות הביאו לעלייה בערך רדיוס העיכוב.

גרף 9: גודל רדיוס העיכוב כתלות בפרמטרים משתנים (כללי). מתח קבוע של 1000V.



בגרף מספר 10 וטבלה 13 המציגה את המבחן הסטטיסטי שבוצע לניסויים, ניתן לראות בצורה השוואתית את השינוי המתרחש לאורך הניסוי.

בעבור הניסוי בו אורך הפולס היה קבוע על $200 \mu\text{s}$ ומספר הפולסים עולה בו מ-100 ל-150, תדירות של 2 Hz, נצפת ירידה של השדה החשמלי מ $310.36 \pm 21.14 \text{ Vmm}^{-1}$ ל $274.89 \pm 19.92 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.007$. באופן דומה שטח העיכוב גדל מ- 9.75 mm^2 ל 11.02 mm^2 .

בעבור אורך פולס של $200 \mu\text{s}$ שמספר הפולסים עולה בו מ-150 ל-200, תדירות של 2 Hz, נצפתה ירידה של השדה החשמלי לערך של $237.06 \pm 12.06 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.000$ ושטח עיכוב של 12.74 mm^2 .

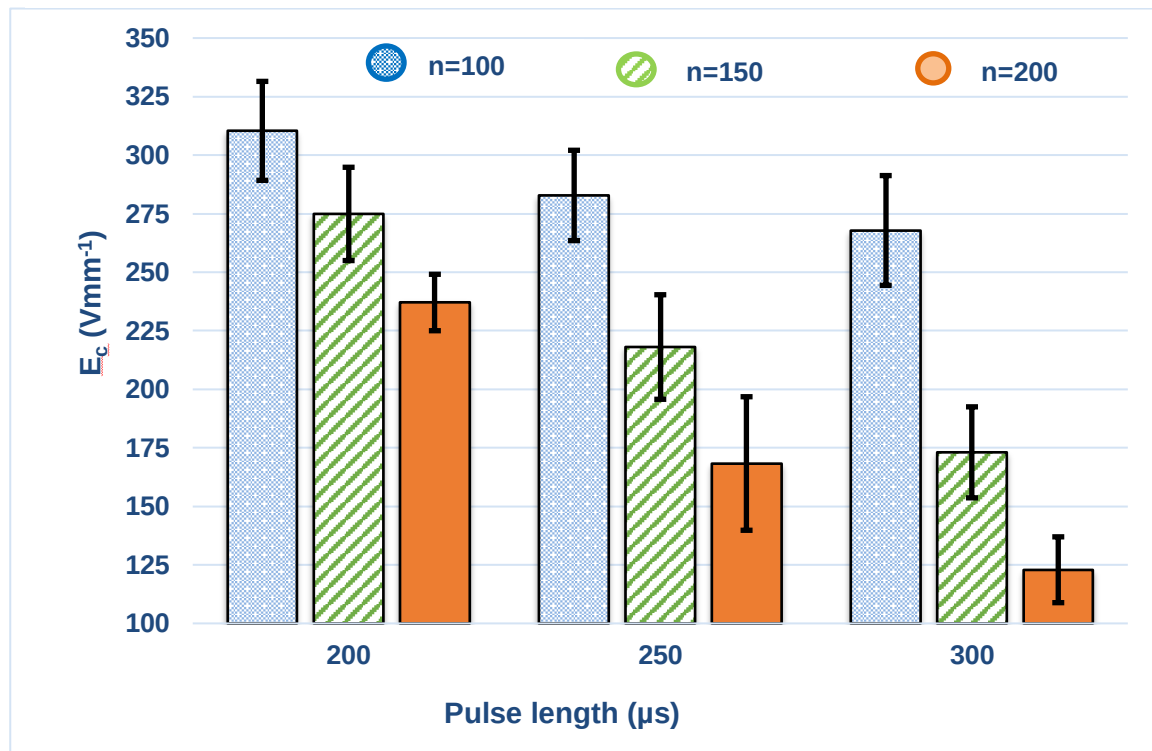
בעבור הניסוי בו אורך הפולס היה קבוע על $250 \mu\text{s}$ ומספר הפולסים עולה בו מ-100 ל-150, תדירות של 2 Hz, נצפת ירידה של השדה החשמלי מ $282.78 \pm 19.29 \text{ Vmm}^{-1}$ ל $218.04 \pm 22.33 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.000$. באופן דומה שטח העיכוב גדל מ- 10.71 mm^2 ל 13.94 mm^2 .

בעבור אורך פולס של $250 \mu\text{s}$ שמספר הפולסים עולה בו מ-150 ל-200, תדירות של 2 Hz, נצפתה ירידה של השדה החשמלי לערך של $168.30 \pm 28.52 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.004$ ושטח עיכוב של 18.29 mm^2 .

בעבור הניסוי בו אורך הפולס היה קבוע על $300 \mu s$ ומספר הפולסים עולה בו מ-100 ל-150, תדירות של 2 Hz, נצפתה ירידה של השדה החשמלי מ $267.83 \pm 23.44 \text{ Vmm}^{-1}$ ל $173.07 \pm 19.43 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.000$. באופן דומה שטח העיכוב גדל מ-11.33 ל 17.59 mm^2 .

בעבור אורך פולס של $300 \mu s$ שמספר הפולסים עולה בו מ-150 ל-200, תדירות של 2 Hz, נצפתה ירידה של השדה החשמלי לערך של $122.91 \pm 14.06 \text{ Vmm}^{-1}$ עם מובהקות של $p\text{-value } 0.000$ ושטח עיכוב של 24.79 mm^2 .

גרף 10: התפלגות השדה החשמלי הקריטי כתלות במספר הפולסים (בתוך הקבוצות) ובין אורך הפולס (בין הקבוצות)



בגרף מספר 11 וטבלה 13 המציגה את המבחן הסטטיסטי שבוצע לניסויים, ניתן לראות בצורה השוואתית את השינוי שמתרחש לאורך הניסוי בתוצאה מהגדלת התדירות. בעוד הפרמטר של התדירות משנה, שאר הפרמטרים נותרים קבועים ועובדים על מתח של 1000 V, 200 פולסים ואורך פולס של $300 \mu s$.

עבור הניסוי שתדירותו היא 1 Hz ערך השדה הממוצע המחושב היה 180.33 Vmm^{-1} ושטח העיכוב היה 17.16 mm^2 . נבחר בניסוי זה כניסוי רפרנס.

עבור הניסוי שתדירותו היא 2 Hz ערך השדה הממוצע המחושב היה 122.91 Vmm^{-1} ושטח העיכוב היה 24.75 mm^2 . בהשוואה לניסוי הראשון ישנה ירידה של 47% עם מובהקות של $p\text{-value } 0.001$.

עבור הניסוי שתדירותו היא 3 Hz ערך השדה הממוצע המחושב היה 89 Vmm^{-1} ושטח העיכוב היה 34.31 mm^2 . בהשוואה לניסוי הראשון ישנה ירידה של 38% עם מובהקות של $p\text{-value } 0.000$.

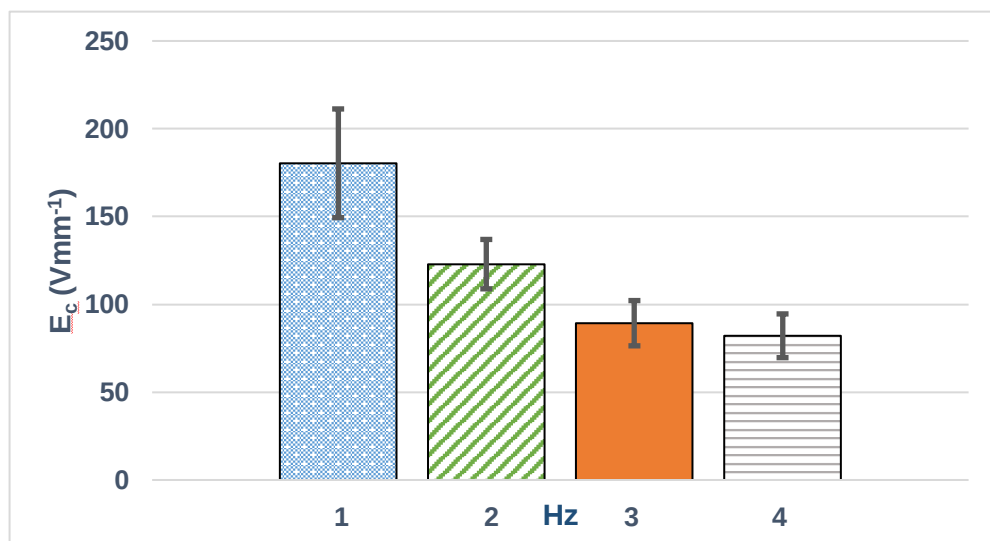
עבור הניסוי שתדירותו היא 4 Hz ערך השדה הממוצע המחושב היה 82 Vmm^{-1} ושטח העיכוב היה 37.3 mm^2 .
בהשוואה לניסוי הראשון ישנה ירידה של 9% עם מובהקות של p-value 0.000

במבחן t שבוצע עבור כל המשתנים נראה כי כל התוצאות היו מובהקות, פרט לתוצאות של ניסוי:

1-10, 2-3, 2-4, 2-10, 3-4, 5-13, 6-8, 6-11, 6-13, 8-11, 8-13, 11-13, 12-14

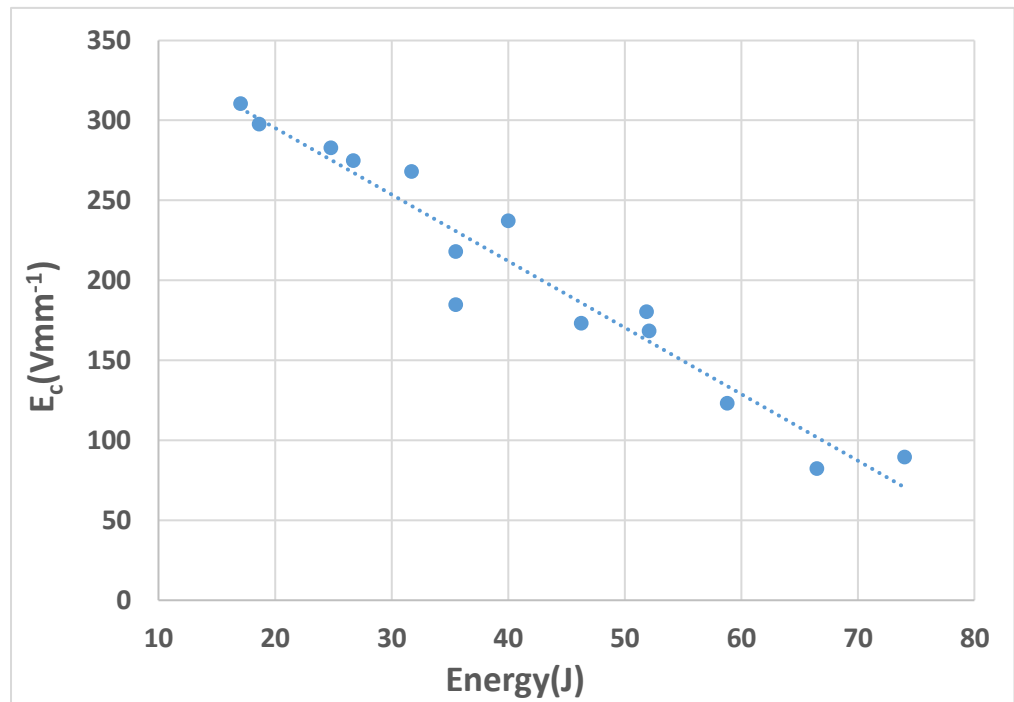
גרף 11: עוצמת השדה החשמלי כתלות בתדירות הפולס ב Hz

1000 V, 300 μs pulse length, 200 pulses



בנוסף, קורלציה בין האנרגיה המושקעת בתהליך לבין ערך השדה הקריטי (**גרף מספר 12**) מראות יחס הפוך כאשר השקעה קטנה של אנרגיה תביא לערך שדה חשמלי גבוהה ואילו השקעה של אנרגיה גבוהה בתהליך תביא לירידה משמעותית בערך השדה החשמלי הקריטי⁶⁰. יחס זה מוסבר בצורה מובהקת על ידי התוצאות כאשר 93% מהתוצאות הולמות את הקורלציה.

גרף 12: קורלציית הקשר בין שדה חשמלי קריטי והאנרגיה הכללית המושקעת בתהליך



טבלה 12: פלט ה t-test עבור הניסוי של מחולל הפולסים מסוג IGBT

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.020													
3	0.004	0.128												
4	0.007	0.251	0.293											
5	0.000	0.000	0.002	0.000										
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002									
7	0.000	0.000	0.008	0.000	0.048	0.000								
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.371	0.000							
9	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003						
10	0.096	0.053	0.007	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.152	0.000	0.130	0.000	0.000				
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000			
13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.018	0.318	0.001	0.250	0.001	0.000	0.388	0.000		
14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.175	0.000	

4.1.3 השפעת אנטיביוטיקה

מערך הניסויים הבא, המשלב בתוכו את השימוש ב-PEF והאנטיביוטיקה על החיידק *P. aeruginosa* ו *S. epidermidis* בא לבחון 2 דברים עיקריים. הראשון הוא הבחינה של יכולת העבודה המשותפת של השדה החשמלי עם האנטיביוטיקה כאשר 2 הטיפולים יחד יגבירו האחד את השני בסניגריזם. המטרה השנייה היא לבחון את ההבדל בעמידות לטיפול של זני חיידקים ממשפחת הגרם חיוביים והגרם שליליים המיוצגים ע"י 2 החיידקים שהוזכרו.

P. aeruginosa מייצג את החיידקים ממשפחת הגרם שלילי ו *S. epidermidis* את הגרם החיובי. על מנת לבדוק את האפקט הסינרגיסטי הוכן ניסוי ובו 5 מהולים של מיקס האנטיביוטיקה פניצילין-סטרפטומיצין-ניסטטין. כפי שניתן לראות באיור מספר 20, שישה עיגולים המייצגים שש חזרות של הניסוי בוצעו בכל צלחת פטרי, כאשר שלוש מתוכם הם טיפול המשלב PEF יחד עם אנטיביוטיקה ו 3 עיגולים שבהם נעשה שימוש באנטיביוטיקה בלבד והם היו קבוצת ביקורת. הפרמטרים שיושמו בטיפול הנ"ל התבססו על הקומבינציה האופטימלית ביותר לפי Taguchi: 1750 V, 200 pulses, 60 μ s pulse length, 350 ms pulse interval. בגרף מספר 13 מוצג ריכוז התוצאות כפי שהתקבלו עבור החיידק *P. aeruginosa*. ניתן לראות כי הגרף הכחול מסמן את הערך הממוצע שהתקבל מטיפול ב PEF בלבד וערכו עומד על 308 Vmm^{-1} . לעומתו, הטיפול באנטיביוטיקה בלבד, בריכוז הגבוה ביותר-Dil 1 הניב ערך אקוויולנטי של 189.65 V mm^{-1} ואילו הטיפול המשולב של PEF יחד עם האנטיביוטיקה מביא לשדה של 155.67 V mm^{-1} . ניתן לראות כי הטיפול המשולב היה אפקטיבי יותר ב 99% מהטיפול ב PEF בלבד ו ב 22% אפקטיבי יותר מהטיפול באנטיביוטיקה בלבד.

עבור הטיפול המשלב עם המיהול השני (Dil 2) ערך ה E_c שהתקבל היה 203.53 V mm^{-1} והיה אפקטיבי יותר ב 51% מהטיפול ב PEF בלבד ו ב 78% אפקטיבי יותר מהטיפול באנטיביוטיקה בלבד במיהול הזה-
 362.99 V mm^{-1} .

עבור הטיפול המשלב עם המיהול השלישי (Dil 3) ערך ה E_c שהתקבל היה 219.07 V mm^{-1} והיה אפקטיבי ב 41% מהטיפול ב PEF בלבד ו ב 123% אפקטיבי יותר מהטיפול באנטיביוטיקה בלבד במיהול הזה-
 488.93 V mm^{-1} .

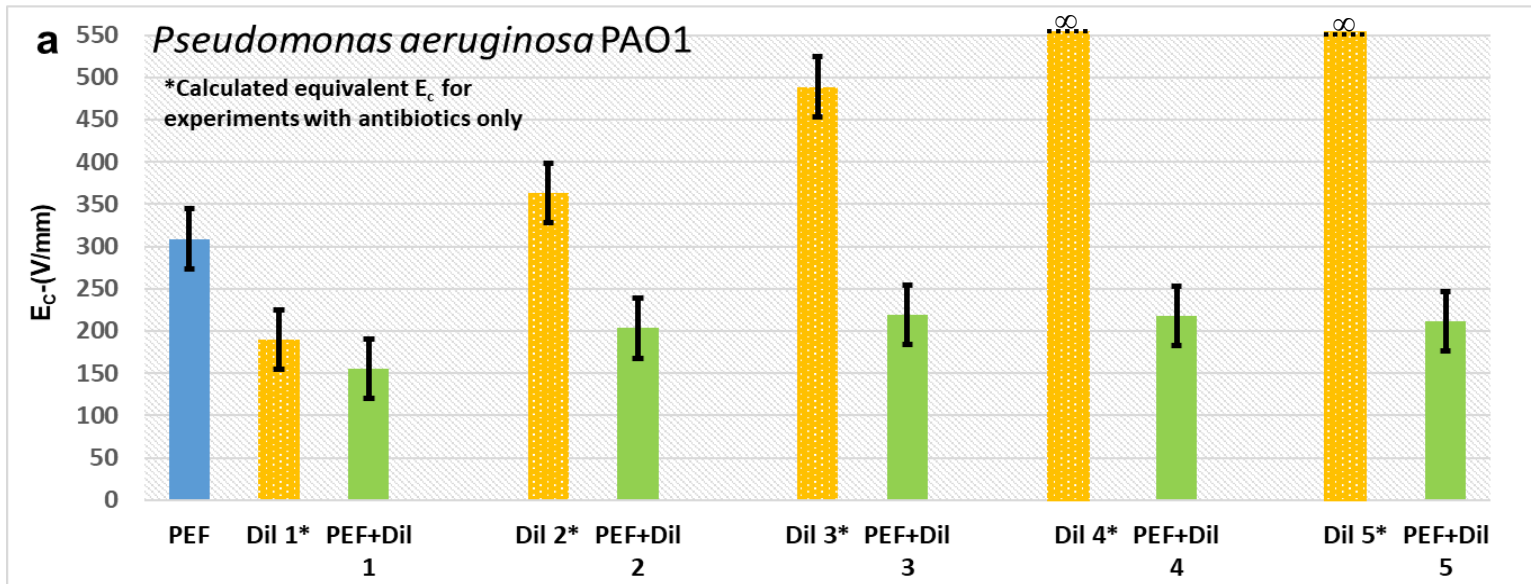
עבור הטיפול המשלב עם המיהול הרביעי (Dil 4) ערך ה E_c שהתקבל היה 217.78 V mm^{-1} והיה אפקטיבי ב 40% מהטיפול ב PEF בלבד. במיהול הנוכחי לא הייתה השפעה של האנטיביוטיקה בלבד והערך האקוויולנטי של השדה בטיפול זה היה אינסוף.

עבור הטיפול המשלב עם המיהול החמישי (Dil 5) ערך ה E_c שהתקבל היה 211.34 V mm^{-1} והיה אפקטיבי ב 46% מהטיפול ב PEF בלבד. במיהול הנוכחי לא הייתה השפעה של האנטיביוטיקה בלבד והערך האקוויולנטי של השדה בטיפול זה היה אינסוף.

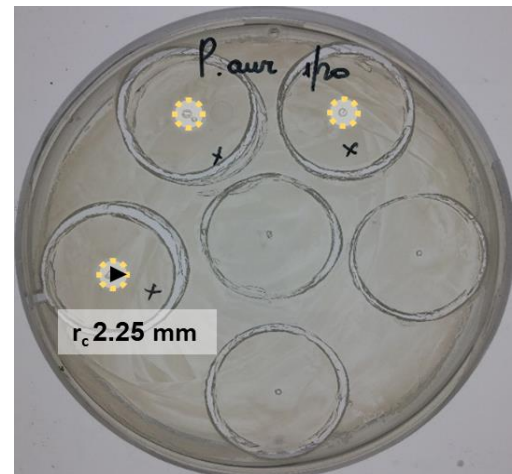
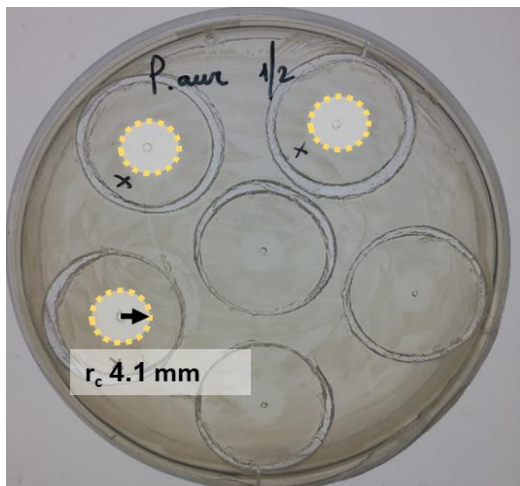
ניתן לראות כי אחרי המיהול השלישי (כולל) ישנה סטגנציה וערך השדה שמתקבל קבוע לאורך המהולים 3-5. במבחן ה T שנמצא בטבלה 14 ניתן לראות כי לא נמצאו הבדלים מובהקים (ברמת מובהקות של 0.05) בין המהולים הללו.

באיור 21 ניתן לראות ויזואלית את ההבדלים ברדיוס העיכוב בין הטיפול במיהול הגבוהה ביותר Dil 1-1/2 לבין המיהול הגבוהה ביותר Dil 5-1/20.

גרף 13: עוצמת השדה הקריטי כתלות בסוג הטיפול (PEF בלבד, אנטיביוטיקה בלבד, והטיפול המשולב) בחיידק *P. aeruginosa*



איור 21: רדיוס העיכוב כפי שהתקבל הטיפולים המשולבים עם ריכוז מיהול אנטיביוטיקה נמוך Dil 1 (1/2) והמיהול המקסימלי Dil 5 (1/20) - דוגמאות נבחרות



מערך ניסוי זה נוסה גם על החיידק *S. epidermidis* (גרף מספר 14).

עבור הטיפול ב PEF בלבד ערך ה E_c שהושג עמד על 378.41 V mm^{-1} . הטיפול האנטיביוטי לבדו לא היה אפקטיבי עבור החיידק.

הטיפול המשולב של PEF והאנטיביוטיקה במיהול Dil 1 הוריד את השדה לערך של 348.51 V mm^{-1} המהווה ירידה של 9%.

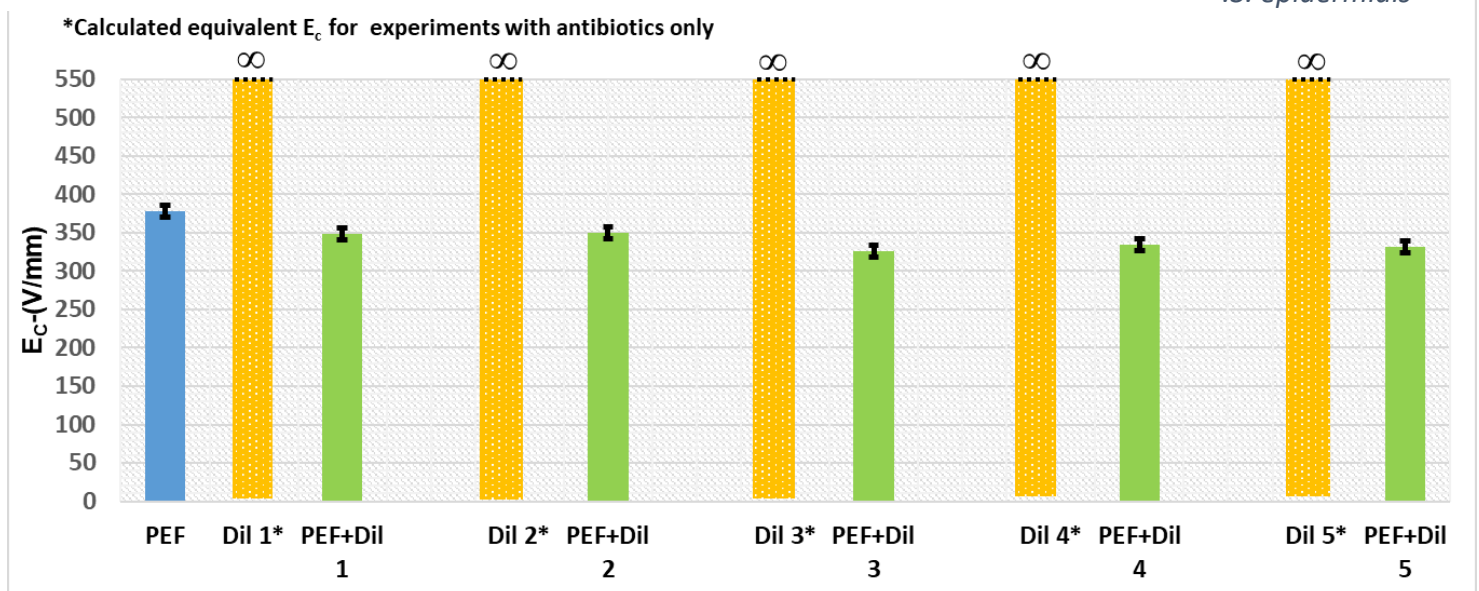
הטיפול המשולב של PEF והאנטיביוטיקה במיהול Dil 2 הוריד את השדה לערך של 350.12 V mm^{-1} המהווה ירידה של 8%.

הטיפול המשולב של PEF והאנטיביוטיקה במיהול Dil 3 הוריד את השדה לערך של 325.67 V mm^{-1} המהווה ירידה של 16%.

הטיפול המשולב של PEF והאנטיביוטיקה במיהול Dil 4 הוריד את השדה לערך של 334.04 V mm^{-1} המהווה ירידה של 13%.

הטיפול המשולב של PEF והאנטיביוטיקה במיהול Dil 5 הוריד את השדה לערך של 331.10 V mm^{-1} המהווה ירידה של 14%. כלל תוצאות המהולים היו חופפות בערכי סטיית התקן שלהן ולכן לא היו שונות בצורה מובהקת.

גרף 14: עוצמת השדה החשמלי הקריטי כתלות בסוג הטיפול (PEF בלבד, אנטיביוטיקה בלבד והטיפול המשולב) בחיידק *S. epidermidis*.

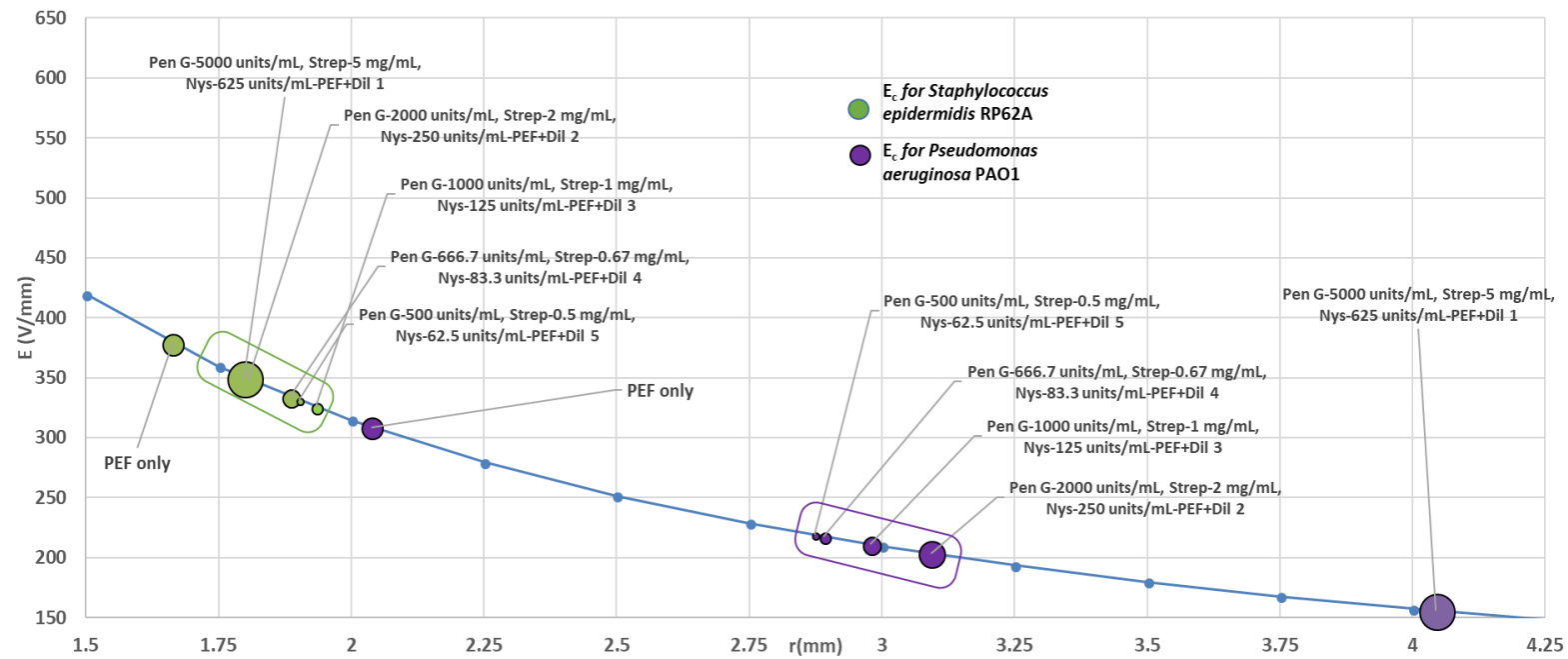


ככלל ניתן לומר שעבור שני החיידקים, ניכר כי ישנה ירידה בערכי ה E_c בטיפול המשולב של ה PEF יחד עם האנטיביוטיקה. היכולת של שני הטיפולים ליצור אפקט סינרגיסטי תועיל בהורדת ריכוזי האנטיביוטיקה הנצרכים ומהווה אלטרנטיבה אפקטיבית עבור זנים עמידים.

כאמור החלק השני בא לבחון את השוני ביעילות הטיפול בין חיידקי גרם שליליים וגרם חיוביים. ניתן לראות כי הטיפול בפולסים החשמליים בלבד, היה אפקטיבי הרבה יותר ב *P. aeruginosa* ב 23% לעומת הטיפול ב *S. epidermidis* מה שיכול להעיד כי בתנאי הניסוי הנוכחיים חיידקי הגרם שליליים (הנפוצים יותר בפצעי כוויות) יהיו רגישים יותר לטיפול באלקטרופורציה. חיידקי ה *P. aeruginosa* נמצאו ב כ 25% בדודים מפצעי הכוויות לעומת 7% בלבד של

⁶¹. גרף מספר 15 מסכם את תוצאות הניסוי ומציג את ההשוואה בין הזנים *P. aeruginosa* ו *S. epidermidis*, כשאר הזן בירוק נמצא בצידו השמאלי של הגרף עם ערכי E_c גבוהים ורדיוס עיכוב קטן, בניגוד לאגף הימני של הגרף עם ערכי E_c נמוכים משמעותית ורדיוס עיכוב גדולים. גם ההשפעה ההדרגתית של המהולים מודגמת טוב בחיידק *P. aeruginosa* כשאר עלייה בריכוז האנטיביוטיקה (מיוצגת ע"י הגדלה של העיגול) בטיפול המשולב מביאה לירידה בערך השדה הקריטי.

גרף 15: גרף מסכם של הניסוי לטיפול המשולב בחיידק *S. epidermidis* ו *P. aeruginosa*



טבלה 13: מבחן סטטיסטי t-test של תוצאות הניסוי לטיפול משולב על החיידק *P. aeruginosa* (n=63)

E _c /p-value	PEF alone	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	PEF+Dil 1	PEF+Dil 2	PEF+Dil 3	PEF+Dil 4	PEF+Dil 5
PEF alone	308.86 V mm ⁻¹ p-0.000										
Dil 1	p-0.000	*189.65 V mm ⁻¹									
Dil 2	p-0.004	p-0.000	*362.99V mm ⁻¹								
Dil 3	p-0.025	p-0.003	p-0.015	*488.93V mm ⁻¹							
Dil 4	**∞ p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	**∞						
Dil 5	**∞ p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	--	**∞					
PEF+Dil 1	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	155.67 V mm ⁻¹				
PEF+Dil 2	p-0.000	p-0.022	p-0.000	p-0.002	p-0.000	p-0.000	p-0.000	203.53 V mm ⁻¹			
PEF+Dil 3	p-0.000	p-0.022	p-0.000	p-0.002	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.013	219.07 V mm ⁻¹		
PEF+Dil 4	p-0.001	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.002	p-0.112	p-0.282	217.78 V mm ⁻¹	
PEF+Dil 5	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.022	p-0.062	p-0.118	211.34V mm ⁻¹

טבלה 14: תוצאות המבחן הסטטיסטי t-test בניסוי הטיפול המשולב על החיידק *S. epidermidis* (n=36)

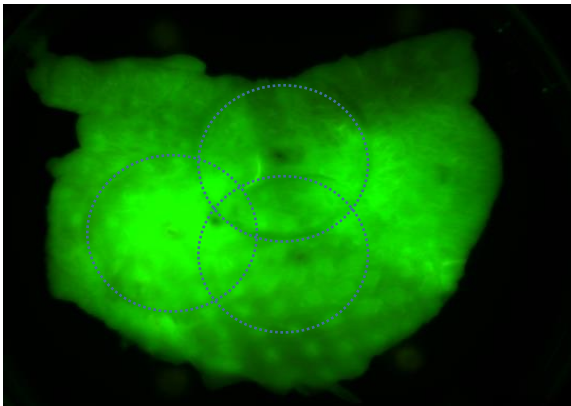
E _c /p-value	PEF alone	Dil 1	Dil 2	Dil 3	Dil 4	Dil 5	PEF+Dil 1	PEF+Dil 2	PEF+Dil 3	PEF+Dil 4	PEF+Dil 5
PEF alone	378.41 V mm ⁻¹ p-0.000										
Dil 1	p-0.000	*∞									
Dil 2	p-0.000	--	*∞								
Dil 3	p-0.000	--	--	*∞							
Dil 4	p-0.000	--	--	--	*∞						
Dil 5	p-0.000	--	--	--	--	*∞					
PEF+Dil 1	p-0.020	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	348.51 V mm ⁻¹				
PEF+Dil 2	p-0.010	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.438	350.12 V mm ⁻¹			
PEF+Dil 3	p-0.001	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p- 0.025	p- 0.033	325.67 V mm ⁻¹		
PEF+Dil 4	p-0.003	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p- 0.013	p- 0.039	p- 0.226	334.04 V mm ⁻¹	
PEF+Dil 5	p-0.006	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p-0.000	p- 0.039	p- 0.024	p- 0.355	p- 0.281	331.10 V mm ⁻¹

- 1700 Volt, a pulse duration of 60 μs, the interval between a pulse of 350 ms, number of pulses: 200
- -- no value
- * Equivalent to EC
- **∞ no delay effects
- Dil1: Pen G-5000 units/ml, Strep-5 mg/mL, Nys-625 units/mL ,Dil2: Pen G-2000 units/ml, Strep-2 mg/mL, Nys-250 units/mL, Dil3: Pen G-1000 units/ml, Strep-1 mg/mL, Nys-125 units/mL, Dil4: Pen G-666.7 units/ml, Strep-0.67 mg/mL, Nys-83.3 units/mL, Dil5: Pen G-500 units/ml, Strep-0.5 mg/mL, Nys-62.5 units/mL

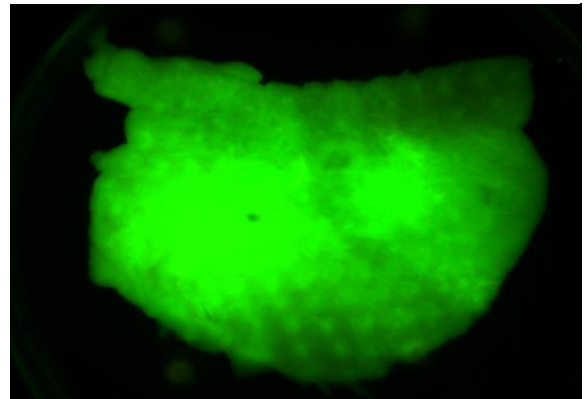
4.2 ניסוי ב-Ex-vivo

במערך הניסוי הנ"ל שיטת האלקטרופורציה בשימוש עם האלקטרודה הקונצנטרית יושמה על גבי משטח של עור עוף שעבר טיפול לסטרליזציה וזוהם באופן מכוון ע"י החיידק *P. aeruginosa*. דוגמת העור הראשונה הייתה הרפרנס שלנו בגלל תכונת העור עצמו לזרוח תחת UV ושטף האור שהתקבל מדוגמת העור הזאת נוקה מהדוגמאות האחרות, כך שמרבית הפוטונים שנקלטו היו במקורם מהחיידק. באיורים 22 עד 24 ניתן לראות איך מיושמת השיטה על עור העוף, כאשר בחלק הראשון דוגמת העור לפני הטיפול ב-PEF (איור מספר 22) וניתן לראות את אזור הזהירה החזק במרכז. באיור 23 העור אחרי הטיפול ב-PEF כאשר האזור שבו הייתה האלקטרודה הקונצנטרית מקווקו. באיור 24 ניתן לראות את ההתמקדות שלנו ב-ROF (Regions of interest) באזור שמסביב לאלקטרודה הפנימית, בו הייתה הפעילות האפקטיבית של השדה.

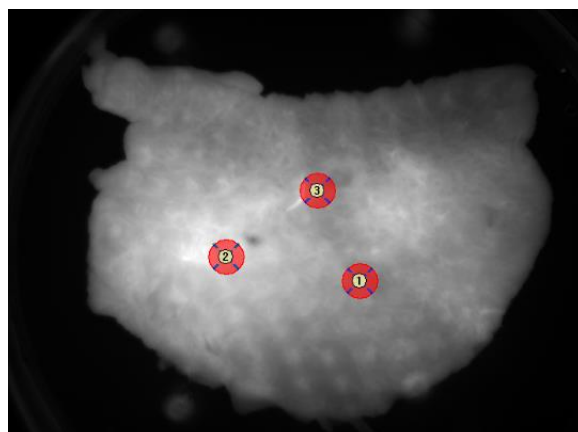
איור 23: פרגמנט של עור מזוהם לאחר הטיפול ב-PEF (אזורים מטופלים מסומנים)



איור 22: פרגמנט של עור מזוהם בחיידק *P. aeruginosa* לפני טיפול



איור 24: בחירת ROI-regions of interest במרכז האלקטרודה הקונצנטרית

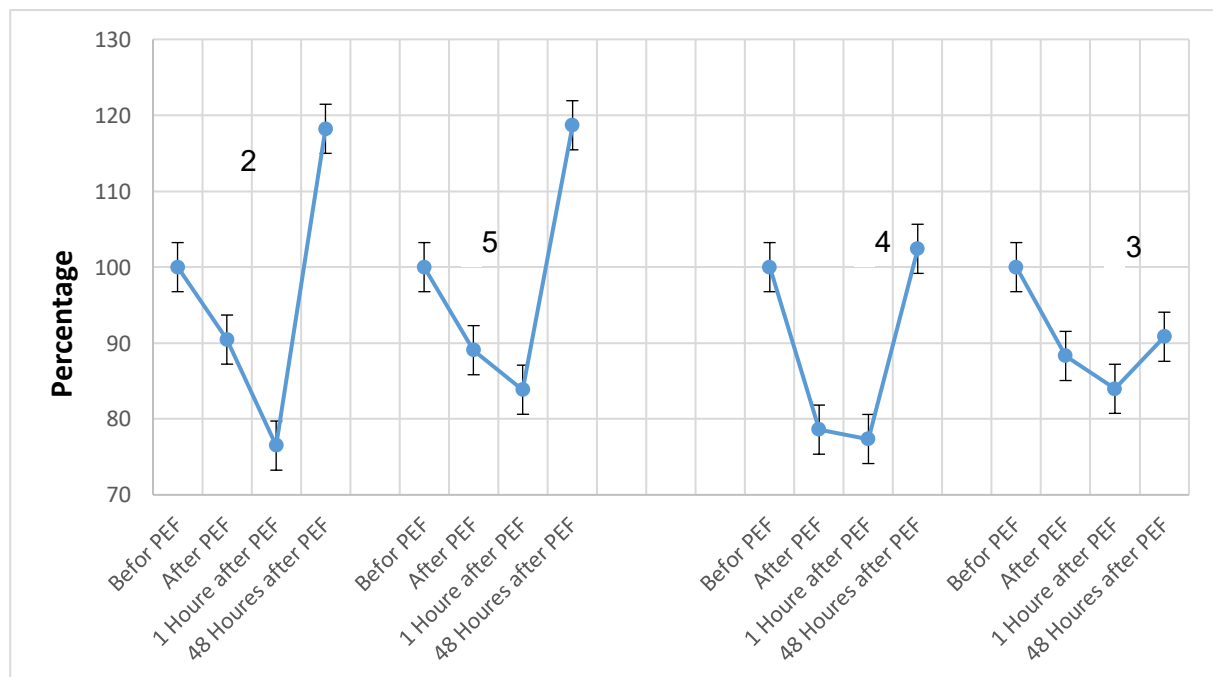


תוצאות הניסוי מופיעות בגרף 16 כאשר ניתן לראות בבירור כי אחרי הטיפול ה PEF ישנה ירידה בערכי השטף המתקבל. בגלל שההנחה היא שבחלק מהמקרים האלקטרופורציה לא תגרום לנזק מידי אלה תשרה קסקדה של תגובות שיביאו בסופו של דבר לאפופטוזיס תאי, הדוגמאות צולמו פעם נוספת אחרי שעה ואכן נראה כי שעה אחרי הטיפול עדיין קיימת ירידה בערכי השטף. תופעה מעניינת נוספת מתרחשת בצילום הדוגמאות אחרי 48 שעות, בהם ניתן לראות עליה מחודשת בערך השטף בדוגמאות הנבדקות. את העלייה הדראסטית ניתן להסביר בחוסר קיום של מערכת חיסון מתפקדת בדוגמאות העור מהעוף, מה שיאפשר לחיידקים ששרדו בדוגמא להמשיך ולהתבסס אחרי הטיפול באלקטרופורציה. דוגמת העור מספר 2 הראתה את הערך המקסימלי של הירידה, כאשר לאחר הטיפול ב PEF השטף ירד ל 90% מהשטף ההתחלתי ולאחר שעה ל75%, ירידה של 25%.

עבור דוגמת העור ה 5 הירידה הייתה ב 15% מ 100% ל 85% מהערך ההתחלתי והיא תופסת את המקום השלישי. הדוגמאות 2 ו 5 מזכירות בפרופיל שלהן אחת את השנייה כאשר ישנה ירידה מתונה בחלק הראשון וירידה חזקה נוספת בחלק השני שעה לאחר ה PEF .

דוגמא 4 מראה ירידה של 23% מהערך ההתחלתי ומתמקמת במקום השני ודוגמא 3 מתמקמת במקום האחרון עם ירידה של 15% מהשטף ההתחלתי. דוגמא 4 ושלוש גם כן מזכירות האחת את השנייה מבחינת המגמה שהן מקיימות בהן דפוס של ירידה בשטף שעה אחרי ה PEF היא מינורית. מכאן, ניתן להסיק כי האפקטים שהושגו בעור מספר 2 ו 4 אומנם לא שונים בהרבה אך מנגנון הפעולה של הפולס בדוגמאות הללו היה שונה, כאשר בדוגמא 2 הפולס כנראה הצליח להשרות אפקט של קסקדה אפופטוטית.

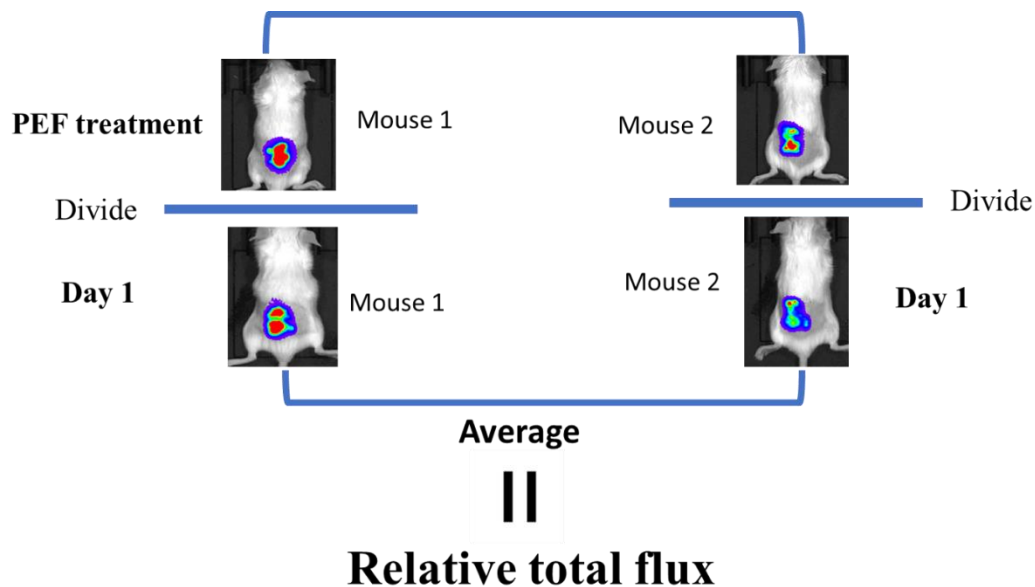
גרף 16: אחוז הירידה של עוצמת השטף כתוצאה מהטיפול ב PEF



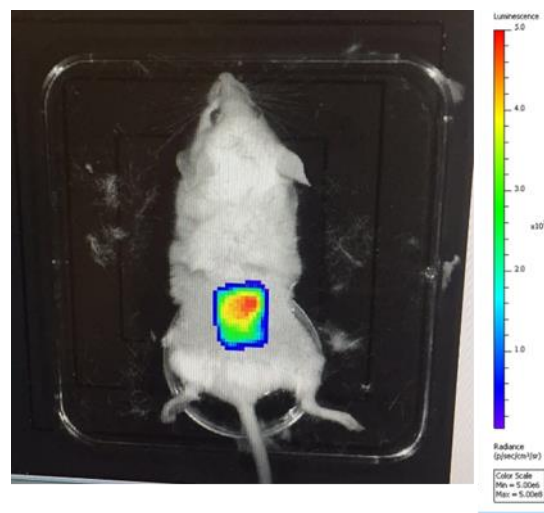
4.3 ניסוי ב In-vivo

בחלק זה חולקו חיות המעבדה ל 7 קבוצות כאשר בכל אחת מהן 2 חזרות (3 עכברים בקבוצת הביקורת). שיטת החישוב עבור הערך הממוצע מודגמת באיור 25. ביצוע האנליזה מודגם באיור מספר 26, עם בר צידי שמצביע על עוצמת השטף.

איור 25: סכמת חישוב של השטף היחסי לאחר הטיפול בשדה חשמלי בעכברים (עוצמת השטף אחרי הטיפול ביחס לעוצמתו לפני הטיפול בכל עכבר)



איור 26: אנליזה העכבר ב Living Image® 4.5.2



לאחר הטיפול בחומר המטשטש, העכבר נתפס על ידי האלקטרודה (איור מספר 27) ומיד לאחר הטיפול הוכנס לדימות. אחרי קבלת התמונה העכברים הוחזרו להתאוששות על גבי משטח מחומם ל 37°C.

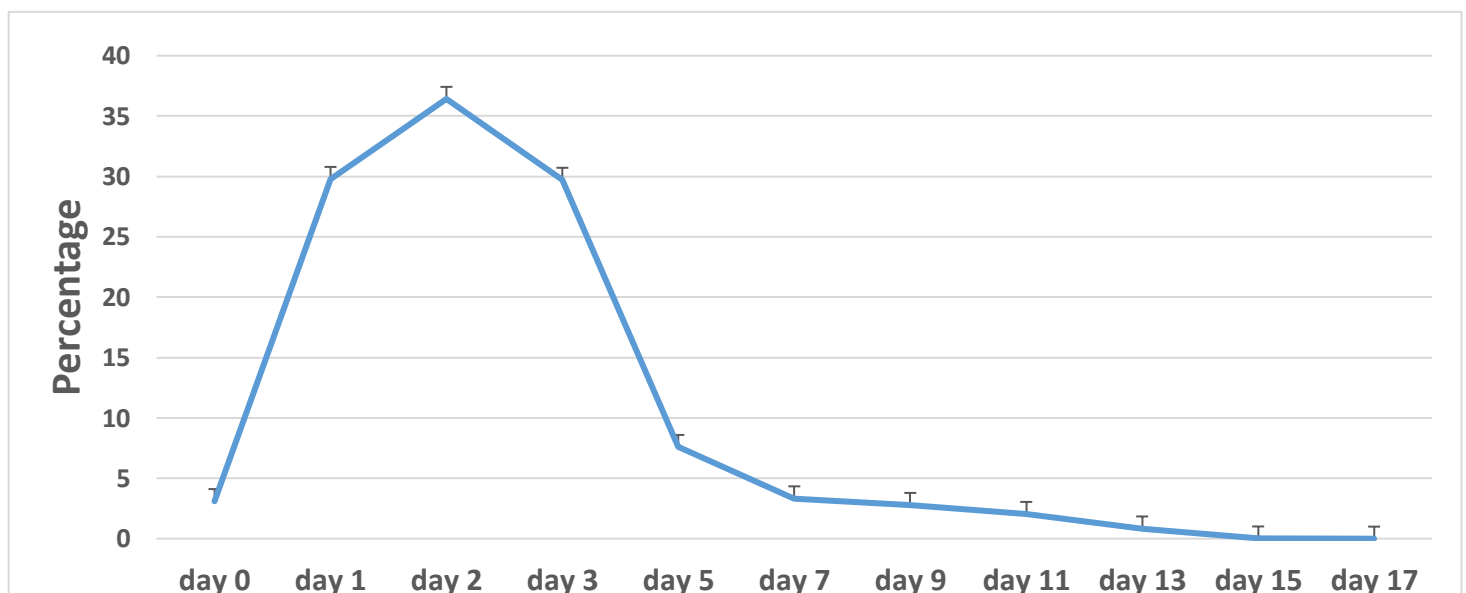
*במהלך הניסוי אנו מדווחים כי עכבר אחד מקבוצת הביקורת מת בתוצאה משוק טרמי, כל שאר החיות שרדו עד שהומתו בסיום המדידות ביום הרביעי - הפולס החשמלי לא נמצא כגורם מוות בתנאים שנוסו.

איור 27: עכבר מורדם במהלך הטיפול ב PEF באמצעות אלקטרודות מלקחיים



על פי המחקר הפרלימינרי שנעשה במעבדה בארה"ב ניתן לראות כי נקודת המקסימום של השטף מתרחשת ביום השני לאחר הזיהום ולאחריה חלה ירידה עד לריפוי מלא לאחר כ- 17 ימים (גרף מספר 17).

גרף 17: דינאמיקת השטף (באחוזים) של פצע מזוהם ללא טיפול



מקבץ הניסויים הראשון שמוצג הוא קבוצת ה- 500V (גרף מספר 18)

הניסוי של 500V/180 μ s length/200pulses/1 s interval הראה ירידה של 31% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

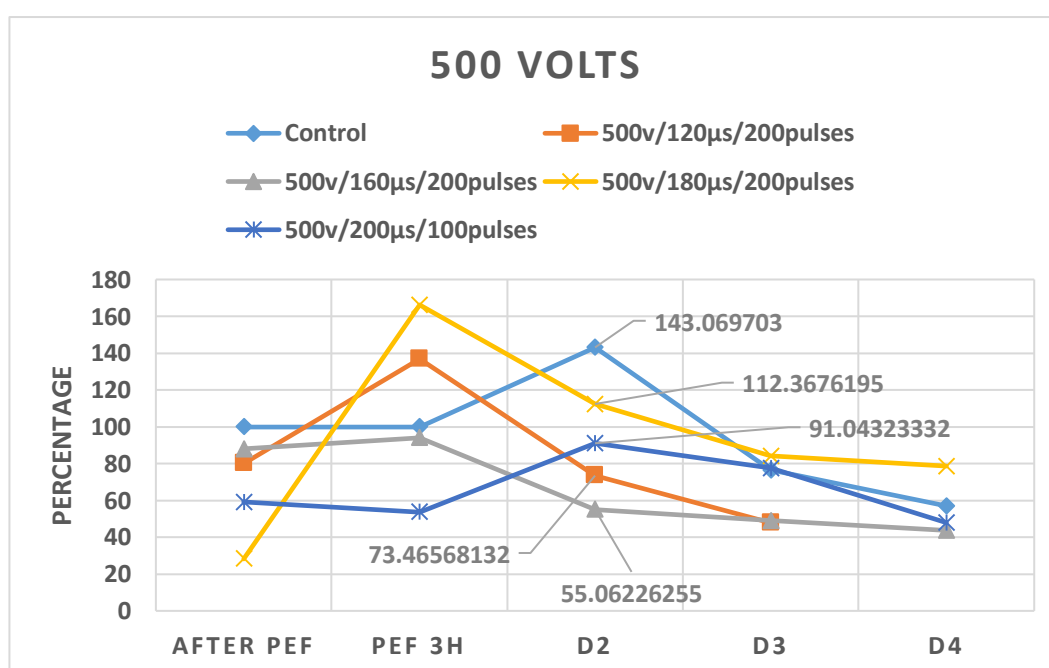
הניסוי של 500V/200 μ s length/100pulses/1 s interval הראה ירידה של 52% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

הניסוי של 500V/120 μ s length/200pulses/1 s interval הראה ירידה של 69% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

הניסוי של 500V/160 μ s length/200pulses/1 s interval הראה ירידה של 88% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

כפי שניתן לראות, הפער בין קבוצות הטיפול לבין קבוצת הביקורת נשמר גם ביום השלישי כשביום הרביעי פער זה מצטמצם משמעותית.

גרף 18: דינאמיקת השטף (באחוזים) בעכברים מקבוצת ה-500V



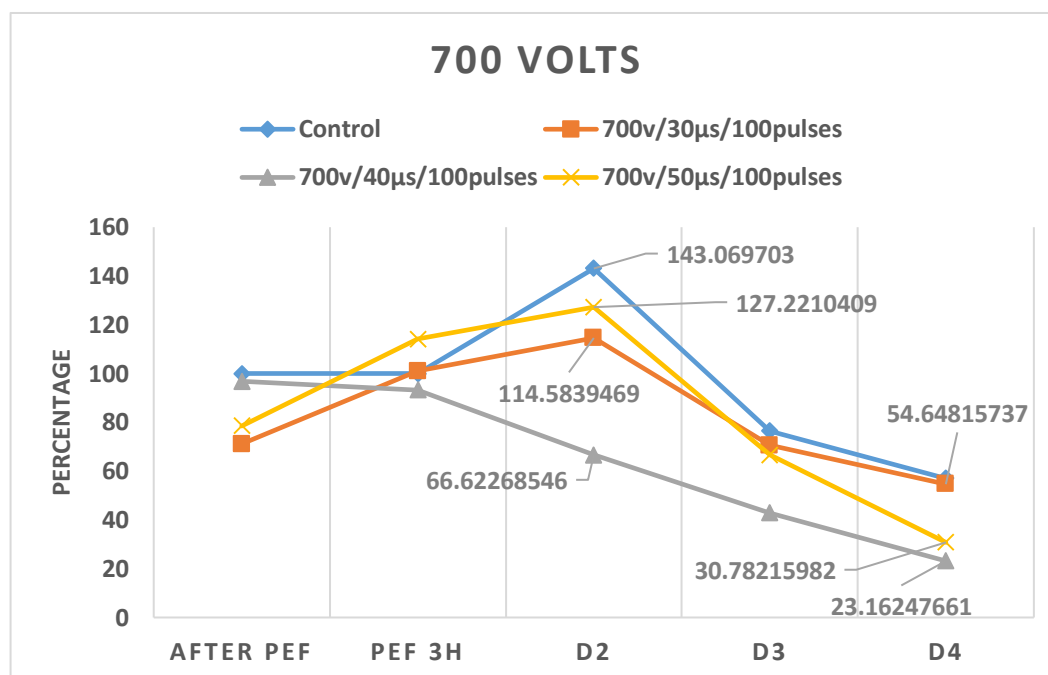
מקבץ הניסויים הראשון שמוצג הוא קבוצת ה-700V (גרף מספר 19)

הניסוי של 700V/50 μ s length/100pulses/1 s interval הראה ירידה של 16% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

הניסוי של 700V/30 μ s length/100pulses/1 s interval הראה ירידה של 29% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

הניסוי של 700V/40 μ s length/100pulses/1 s interval הראה ירידה של 76% ביחס לקבוצת הביקורת ביום השני של הטיפול.

גרף 19: דינאמיקת השטף (באחוזים) בעכברים מקבוצת ה-700V



הטיפול האפקטיבי ביותר היה על פי הפרמטרים של 500V/160µs length/200 pulses/1s pulse interval עם ההפרש המקסימלי של 88% ביחס לקבוצת הביקורת. המחקר הראשוני שנעשה מראה כי שיטת האלקטרופורציה יעילה בתנאי המעבדה לטיפול בזיהומי כוויות ויכולה לשמש אלטרנטיבה לקטילה של זנים עמידים.

5. דיון ומסקנות

5.1 דיון בתוצאות הניסוי בתנאי *In vitro*

5.1.1 ניסוי Taguchi

ניסויי ה-Taguchi הווה למעשה את בסיס הידע בתחום האלקטרופורציה. על מנת להבין את מידת ההשפעה של כל פרמטר בנפרד והשילוב של הפרמטרים שמהווים את הקומבינציה האופטימלית. במערכת שלנו נבדקו ארבעת הפרמטרים של הפולס בהם: מתח, אורך הפולס, מספר הפולסים והאינטרוול בין הפולס. על פי התוצאות ראינו כי הפרמטר של אורך הפולס נקבע כפרמטר המשפיע ביותר ואילו המתח נקבע כפרמטר המשפיע הכי פחות. ערך ה- E_c המינימלי שהושג בניסויים הללו הוא 295 Vmm^{-1} . על בסיס המסקנות שהתקבלו מן החלק הזה גיבשנו קונפורמציות ניסוי חדשות שיושמו בחלק הבא.

5.1.2 IGBT ניסוי

הניסוי במחולל הפולסים מסוג IGBT בא למעשה לבחון 2 נושאים עיקריים. הראשון בהם הוא בחינת כשירות המערכת לפעול בתנאי מעבדה ולהצליח לחולל את הפולסים לפי הפרמטרים שהוגדרו והנושא השני הוא בחינת פרמטרים חדשים שגובשו על בסיס המסקנות מ-Taguchi. המתח (כשאמור היה הפרמטר הכי פחות משפיע) הורד ל- 1000 V ולאילו הפרמטר של אורך הפולס (המשפיע ביותר) הועלה ל- $300 \mu\text{s}$. שילוב הפרמטרים החדש תרם לירידה משמעותית של ערך ה- E_c , כאשר הערך המינימלי המחושב היה 82 Vmm^{-1} עם שטח עיכוב של 37.35 mm^2 . על בסיס הידע הזה, ניתן להמשיך ולייעל את המערכת ובבואנו לבנות מערכת מורכבת, המכילה מספר רב של אלקטרודות, הידע של קוטר העיכוב והשדה החשמלי יכול לסייע בתכנון ומיקום האלקטרודות במרחב. בנוסף, במהלך הרצת המערכת אותרו נקודות אותן נרצה לשפר ולייעל והיו קריטיות בשלבים הבאים של שדרוג המערכת ויצירת הדור הבא שלה.

5.1.3 ניסוי אנטיביוטיקה

בניסוי השלישי, שהתבסס גם הוא על התוצאות של Taguchi הכיל בתוכו 2 מטרות גם כן. הראשונה, הייתה בחינת הפעילות המשותפת של אנטיביוטיקה והשדה החשמלי. הנחת העבודה הייתה שבעזרת הפעילות המשותפת של השדה החשמלי עם האנטיביוטיקה נוכל להגיע לערכי E_c נמוכים ביחס לערך ה- E_c של כל טיפול בנפרד. תוצאות ההשוואה עבור החיידק *P. aeruginosa* הראה כי הטיפול המשולב בריכוז האנטיביוטיקה הגבוהה Dil 1 הביא לירידה בערך השדה מ- 308 Vmm^{-1} עבור הטיפול של PEF בלבד ו- 189 Vmm^{-1} עבור הטיפול באנטיביוטיקה בלבד ל- 155 Vmm^{-1} עבור הטיפול המשולב. עבור החיידק *S. epidermidis* גם כן נצפתה ירידה בערך השדה כאשר הטיפול ב PEF בלבד עמד על 378 Vmm^{-1} והטיפול המשולב של השדה יחד עם האנטיביוטיקה עמד על 348 Vmm^{-1} . המטרה השנייה הייתה מבחן השוואתי בין 2 חיידקים המייצגים 2 קבוצות חיידקים שונות, האחד *P. aeruginosa* מייצג את חיידקי הגרם שלילי ואילו החיידק *S. epidermidis* מייצג את חיידקי הגרם חיובי. כפי שניתן לראות מהתוצאות,

P. aeruginosa היה רגיש יותר הן לטיפול ב PEF והן לטיפול המשולב (ב 23% רגיש יותר לטיפול ב PEF ו ב 125% לטיפול המשולב). יש להמשיך לבחון את המערכת הן על חיידקים פתוגניים נוספים ממשפחות אלו על מנת להבין טוב יותר את השוני בתגובה לשדות חשמליים והן לעשות את המודל במערכת מורכבת יותר כמו מודל בחיות.

5.2 דיון בתוצאות הניסוי בתנאי *Ex vivo*

בחלק זה של העבודה התמקדנו בעבודה על משטח שמבחינת הטופוגרפיה והתכונות הפיזיקליות שלו מדמה בצורה טובה את עור האדם. עבור הניסוי הזה השתמשנו בעור עוף, שעבר תהליך עיקור וניקוי על פי פרוטוקול וזהם באופן מכוון על ידי החיידק *P. aeruginosa*. בשונה מעור האדם, עור העוף אינו מכיל בלוטות זיעה, הוא דק יותר מהעור שלנו ומתוח יותר⁶². למרות השוני הפיזי והשונות בהרכב המיקרוביאלי והיוראלי⁶³ של עור העוף מעור האדם, הוא מהווה כלי יעיל המדמה את עור האדם ומודל זה נחקר רבות. הודות לתכונה הייחודית של החיידק לזהור ב UV ביצענו דימות של אזורים מטופלים בשדה החשמלי בפרגמנטים של העור הנבדק והממצאים הראו כי ערך הירידה המקסימלי של שטף הפוטונים נמדד בדוגמא מספר 2 ועמד על 25%. במהלך הניסוי הזה אפינו 2 צורות של ירידה בשטף כפי שהוצגו בפרק התוצאות, התצורה הראשונה שהתאפיינה בירידה חדה שנמשכה גם שעה לאחר הטיפול ב PEF ויכולה להיות מוסברת, ככל הנראה, על ידי יצירת שוק בתא החיידק והפעלת קסקדת אפופטוזיס והתצורה השנייה שהתאפיינה בירידה חדה בערך השטף שכמעט ולא השתנתה במדידות לאחר שעה. המדידה שבוצעה אחרי 48 שעות הראתה צמיחה מחודשת של החיידקים ובהעדר מערכת חיסון מתפקדת ברקמה היו צפויות. המסקנה שלנו מפרק זה היא שטיפול בודד אינו מספיק בכדי לחסל את כלל החיידקים אבל אפקטיבי בהורדת עומס הפתוגניים באזור הנפגע. נציע כי הטיפול ב PEF יתבצע מספר פעמים ויעזור למערכת החיסון להתגבר על הזיהום בקצב מהיר יותר. על בסיס מודל עור העוף הצלחנו לאפיין אלמנטים שונים בטיפול בעקבות המעבר לעבודה ב *Ex vivo* אותם ניישן במערכים העתידיים.

5.3 דיון בתוצאות הניסוי בתנאי *In vivo*

חלק זה סוגר למעשה את העבודה ומאפשר לנו לבחון את המערכת על רקמה חיה בחיית מעבדה. בשונה מהניסוי ב *Ex vivo* הניסוי ב *In vivo* מביא אתו יתרונות רבים המאפשרים לדמות בצורה המיטבית את המתרחש. קיומה של מערכת החיסון המתפקדת עוזרת לנו לבחון את דינאמיות הטיפול לאורך זמן עד להעלמות הזיהום באופן סופי. בניסוי הפרלמינרי ד"ר מג'י הראתה כי במחזור ההחלמה מהזיהום, נקודת השיא הינה ביום השני (ככל הנראה הזמן הנדרש למערכת החיסון להגיב) ולאחריה חלה ירידה בריכוז החיידקים בכוויה. על סמך מידע זה רצינו לבחון את השינוי בקצב ירידת השטף כתוצאה מהטיפול ב PEF. 2 קבוצות ניסוי, של 500 V ו 700V הושוו זו לזו במערך ניסויים שכלל 7 קבוצות נבדקות וקבוצת ביקורת. על סמך התוצאות ערך הירידה המקסימלי שנפצה בקבוצת ה 500 V היה 88% ובקבוצת ה 700 V ערך הירידה המקסימלי עמד על 76% בהשוואה לקבוצת הביקורת ביום השני. בעזרת המחקר הראשוני הנ"ל הצלחנו להוכיח כי הטיפול עובד גם בחיות מעבדה, ממוקד ואינו פוגע באיברים חיוניים (בפרמטרים הנבדקים) וערכי הירידה הדראסטים ביחס לקבוצת הביקורת מראים כי הפולס החשמלי מסייע רבות בהורדת עומס המזהמים ומקל על מערכת החיסון להתגבר על הזיהום במקום הכוויה.

יש להמשיך ולחקור את המערכת *In vivo* ולשלב את הטיפול ב PEF יחד עם טיפולים נוספים כדוגמת האנטיביוטיקה לבחינת האפקט הסינרגיסטי של פולס-אנטיביוטיקה-מערכת חיסון.

6. מחקר להמשך

לאחר סיום המחקר, הפקנו לקחים רבים אודות השימוש בשדה החשמלי כקוטל אפקטיבי של חיידקים פתוגניים. יש להמשיך ולשדרג את מערך הפרמטרים של השדה להשגת היעילות המקסימלית וזאת מבלי להיכנס לתחום האפקט הטרמלי שיכול להיות מושג בגלל הערכה גדולה מידי של אורך הפולס. כפי שציינתי, להערכתי על מנת לייעל את הטיפול יש לפתח מטריצה שתכלול מספר רק של אלקטרודות שכל אחת מהן תספק שדה אופטימלי אזורי שיעזרו לבצע כיסוי מיטבי של השטח המזוהם. טיפול יחיד ב PEF אומנם מוריד את עומס המזהמים אך אינו אפקטיבי לאורך זמן ועל כן בניסויים יש לתת דגש על חזרתיות של הטיפול בכדי להשיג הפרש משמעותי יותר בזמן ההחלמה.

הקומבינציה של השדה החשמלי יחד עם האנטיביוטיקה הוכיחה את עצמה כמוצלחת ועל כן יש להמשיך ולבחון את השילוב של PEF יחד עם טכניקות נוספות כדוגמת ננו-חלקיקים ואנטיביוטיקות נוספות.

יש להמשיך לבדוק את המערכת על נציגים נוספים של קבוצת הגרם שלילי וחיובי על מנת לקבל משקל סטטיסטי חזק יותר עבור קביעת הרגישות התגובה בטיפול ב PEF.

צורת האלקטרודה הנוכחית אינה אופטימלית ומושפעת רבות מן המרווח בין האלקטרודות. בניית אלקטרודה שמרחקים בין הצד השלילי לחיובי יהיו קטנים יותר, יוריד משמעותית את השדה הקריטי הדרוש. כמו כן, צורת ההנחה של האלקטרודה, הן הקונצנטרית והן המרובעת לא נוחות וצריך לתת דגש לעובדה שהאלקטרודה אמורה להיות יותר פלאסטית וגמישה מתוח מחשבה שאפשר יהיה להניח אותה גם באזורים לא ישרים.

במהלך החלק האחרון עלתה ההשערה כי בנוסף לאפקט הישיר של הורדת עומס המזהמים, ה PEF יכול לגרום לאפקטים משניים באזור הכוויה ולבצע סטימולציה מקומית של מערכת החיסון, יש להמשיך ולחקור נושא זה בהתאם לטכניקות המקובלות.

7. ביבליוגרפיה:

1. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc.* 2011;3(4):203-213. doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98.
2. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:244. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2537>.
3. Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121-141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.
4. Otto M. Staphylococcus epidermidis—the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-567. doi:10.1038/nrmicro2182.Staphylococcus.
5. Fredricks DN. Microbial Ecology of Human Skin in Health and Disease. *J Investig Dermatology Symp Proc.* 2001;6(3):167-169. doi:<https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00039.x>.
6. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):403-434. doi:10.1128/CMR.19.2.403.
7. Pham TN, Cancio LC, Gibran NS. American Burn Association Practice Guidelines Burn Shock Resuscitation. *J Burn Care Res.* 2008;29(1):257-266. doi:10.1097/BCR.0b013e31815f3876.
8. Tintinalli J, Stapczynski J, Ma OJ, Cline D, Cydulka R, Meckler G. *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide, Seventh Edition (Book and DVD)*. Mcgraw-hill; 2010. <https://books.google.co.il/books?id=uqBrswEACAAJ>.
9. Safa B, Belson A, Meschter C, et al. In Vivo Efficacy Study Showing Comparative Advantage of Bacterial Infection Prevention with Zip-type Skin Closure Device vs. Subcuticular Sutures. *Cureus.* 2018;10(8). doi:10.7759/cureus.3102.
10. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414.
11. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing Colonisation Contamination. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17(February):91-96. doi:10.1097/01.qco.0000124361.27345.d4.

12. Wall IB, Davies CE, Hill KE, et al. Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *Wound Repair Regen.* 2002;10(6):346-353. doi:10.1046/j.1524-475X.2002.t01-1-10602.x.
13. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret a. The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1771. doi:10.1111/1469-0691.12651.
14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science (80-).* 1999;284(5418):1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
15. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, et al. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. *Crit Care.* 2015;19(1):1-12. doi:10.1186/s13054-015-0961-2.
16. Franz MG, Steed DL, Robson MC. Optimizing Healing of the Acute Wound by Minimizing Complications. *Curr Probl Surg.* 2007;44(11):691-763. doi:https://doi.org/10.1067/j.cpsurg.2007.07.001.
17. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2-3):341-353. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00047-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00047-0).
18. Sulfadiazine S. No Title. 2008:11-12.
19. CW W, RB K. The airborne component of wound contamination and infection. *Arch Surg.* 1973;107(4):588-595. doi:10.1001/archsurg.1973.01350220066014.
20. Dancer SJ. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect.* 2009;73(4):378-385. doi:10.1016/j.jhin.2009.03.030.
21. Lobdell KW, Stamou S, Sanchez JA. Hospital-Acquired Infections. *Surg Clin North Am.* 2012;92(1):65-77. doi:10.1016/j.suc.2011.11.003.
22. Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. 2009. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.

23. Tacconelli E, Magrini N, Carmeli Y, et al. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery And Development Of New Antibiotics. *World Heal Organ*. 2017;(PPL):7. doi:10.1016/S1473-3099(09)70222-1.
24. Magiorakos a, Srinivasan A, Carey RB, et al. Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*. 2011;18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
25. Wright GD, Sutherland AD. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):260-267. doi:https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004.
26. DOYLE ME, MAZZOTTA AS, WANG TIM, WISEMAN DW, SCOTT VN. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 2001;64(3):410-429. doi:10.4315/0362-028X-64.3.410.
27. Sörqvist S. Heat Resistance in Liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. *Acta Vet Scand*. 2003;44(1):1. doi:10.1186/1751-0147-44-1.
28. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959-964. doi:10.1038/35023079.
29. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;67(3):159-173. doi:10.1111/2049-632X.12033.
30. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(1):56-60. doi:10.1016/S1369-5274(03)00008-0.
31. COLEMAN WP. *Handbook of Cosmetic Science and Technology, 3rd Edition*. Vol 36.; 2010. doi:10.1111/j.1524-4725.2009.01444.x.
32. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu Rev Microbiol*. 1977;31(1):107-133. doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.000543.
33. HUA Y-Y, WANG X-S, ZHANG YU, YAO C-G, ZHANG X-M, XIONG Z-A. Intense picosecond pulsed electric fields induce apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway in HeLa cells. *Mol Med Rep*. 2012;5(4):981-987.

doi:10.3892/mmr.2012.780.

34. Yarmush ML, Golberg A, Serša G, Kotnik T, Miklavčič D. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;16(1):295-320. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-104622.
35. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T A peer-reviewed J Formul Manag.* 2015;40(4):277-283. doi:Article.
36. Kotnik T. *Lightning-Triggered Electroporation and Electrofusion as Possible Contributors to Natural Horizontal Gene Transfer.* Vol 10.; 2013. doi:10.1016/j.plrev.2013.05.001.
37. Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2015;33(8):480-488. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.002.
38. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:10.1146/annurev-micro-092412-155620. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155620.
39. Seelig J, Macdonald PM, Scherer PG. Phospholipid Head Groups as Sensors of Electric Charge in Membranes. *Biochemistry.* 1987;26(24):7535-7541. doi:10.1021/bi00398a001.
40. Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(4):832-836.
41. Kotnik T, Mir LM, Flsar K, Puc M, Miklavcic D. Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part I. Increased efficiency of permeabilization. *Bioelectrochemistry.* 2001;54:83-90.
42. Bédard E, Prévost M, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen.* 2016;5(6):937-956. doi:10.1002/mbo3.391.
43. Nilsson M, Frykberg L, Flock J-I, Pei L, Lindberg M, Guss B. A Fibrinogen-Binding Protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 1998;66(6):2666-2673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108254/>.

44. Kanduser M, Miklavcic D. *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials.*; 2009. doi:10.1007/978-0-387-79374-0.
45. Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J.* 1991;60(2):297-306. doi:10.1016/S0006-3495(91)82054-9.
46. García D, Gómez N, Mañas P, Condón S, Raso J, Pagán R. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium ph and the intensity of the treatment investigated. *J Appl Microbiol.* 2005;99(1):94-104. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02611.x.
47. Yocum RR, Rasmussen JR, Strominger JL. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 1980;255(9):3977-3986.
48. Name P, Number P, Number CAS, et al. Penicillin G. 2011:1-7.
49. Lambert PA. Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002;95(41):S22-26.
50. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, et al. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials.* 2005;26(33):6530-6535. doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.031.
51. Son D, Le NT, Pannacciulli N, et al. NIH Public Access. 2007;86(3):573-579. doi:10.1109/TMI.2012.2196707.Separate.
52. Introduction to the Cell Culture Laboratory. In: *A Manual for Primary Human Cell Culture.* ; :11-22. doi:10.1142/9789812834782_0002.
53. Archer GL, Tenenbaum MJ. Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients undergoing cardiac surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;17(0066-4804 SB-IM):269-272.
54. Hammond SM. 3 Biological Activity of Polyene Antibiotics. In: Ellis GP, West GB, eds. Vol 14. *Progress in Medicinal Chemistry.* Elsevier; 1977:105-179. doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70148-6.

55. Fei NC, Mehat NM, Kamaruddin S. Practical Applications of Taguchi Method for Optimization of Processing Parameters for Plastic Injection Moulding: A Retrospective Review. *ISRN Ind Eng.* 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/462174.
56. MaestroTM. MaestroTM In-Vivo Fluorescence Imaging System User ' s Manual for Maestro 2 . 2. 2006;(August).
57. Thorn RMS, Nelson SM, Greenman J. Use of a Bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* Strain within an In Vitro Microbiological System, as a Model of Wound Infection, To Assess the Antimicrobial Efficacy of Wound Dressings by Monitoring Light Production . *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3217-3224. doi:10.1128/AAC.00302-07.
58. Golberg A, Broelsch GF, Vecchio D, et al. *Eradication of Multidrug-Resistant A. Baumannii in Burn Wounds by Antiseptic Pulsed Electric Field.* *Technology* 2, 153-160 (2014). doi:10.1142/S2339547814500101.
59. Golberg A, Villiger M, Khan S, et al. Preventing Scars after Injury with Partial Irreversible Electroporation. *J Invest Dermatol.* 2016;136(11). doi:10.1016/j.jid.2016.06.620.
60. Chen GY, Conner AJ, Wang J, Fautrier AG, Field RJ. Energy dissipation as a key factor for electroporation of protoplasts. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol.* 1998;10(3):209-216. doi:10.1007/BF02740840.
61. Giacometti a, Cirioni O, Schimizzi a M, et al. Epidemiology and Microbiology of Surgical Wound Infections Epidemiology and Microbiology of Surgical Wound Infections. 2000;38(2):918-922.
62. Damerow G. The chicken Health handbook. 1994:487.
63. Denesvre C, Dumarest M, Rémy S, Gourichon D, Eloit M. Chicken skin virome analyzed by high-throughput sequencing shows a composition highly different from human skin. *Virus Genes.* 2015. doi:10.1007/s11262-015-1231-8.

Abstract:

The discovery of antibiotic Penicillin by A.Fleming in 1928 was a significant medical tool that helped save millions of human lives from bacterial infectious diseases. Thanks to the tremendous industrial production of the drugs, it became a frequent and available treatment to all. The industrial process helped to produce massive amounts of the drugs which were used by people in high doses with no limitation, and eventually reached our water reservoirs (through sewerage). Environmental bacteria exposed to those drugs start to modify their defense mechanisms until they become drug resistant or even multidrug resistant-MDR. Those bacteria became resistant to antibiotics and had a unique ability of transference (DNA resistance fraction-plasmids) of this resistance using a pili mechanism. To compete and kill those resistant bacteria, scientist synthesized a new derivative of known antibiotic, but it is only a matter of time till the bacteria will become resistant against them as well. Patients with large areas of the inactivated immune system, like burn injury patients, often suffer from contamination with multi-drug resistant bacteria. Nowadays the conventional treatment method of the bacterial disinfection based on an antibiotic, become less effective against MDR, additionally a to the fact that in the last 10-15 years more and more multi-drug resistant bacteria species being discovered and isolated. To solve the contamination problem, we suggest using the PEF (Pulse Electric Field) method in which the electric field, makes microscopic holes in the cell membrane cause a cell leak and cell lysis at the end. The PEF method can be used with other technics like antibiotics or antiseptic nanoparticles and provides a significant advance thanks to the use of a combination of 2 methods compare to a single one.

To optimize the PEF parameters, we suggest a system with Low Salt media and the single co-centric electrode. Based on our method, L9 (four groups with three levels) Taguchi matrix was designed to test four parameters of the generated pulse: Voltage, Pulse length, Number of pulses and Pulse interval (Frequency). Based on the matrix, we discovered that the parameter of the pulse length was the most important in the limits of our conditions. According to our knowledge that most of the antibiotics defense machinery of the bacteria are located on the outer membrane to avoid the penetration of the antibiotic into the cytosol, the next step was to test the PEF (that induces damages on the membrane) together with antibiotic and to study their synergistic effects.

The results were unequivocal: the combination of PEF and antibiotic was more effective than each treatment separately -the whole was greater than the sum of its parts. Another part of the study was to test the morphological and membranal differences between Gram-positive and Negative bacteria. The representative of the Gram-negative group was the *P. aeruginosa* with a rod (Bacillus) shape, and the *S. epidermidis* was the representative of Gram-positive Coccus group. During our experiments, we discovered that (under conditions of pH=7) the Gram-negative *P. aeruginosa* was more sensitive to the PEF and antibiotic treatment compared to the *S. epidermidis* (the antibiotic mix we use was

against both Gram groups). When we use a low concentration of antibiotic, we can avoid the unnecessary leakage of the antibiotics to the environment and slow-down future development of new multi-drug resistant (MDR) species.

We also set to develop a new pulse generator device, based on IGBT for laboratory and future clinical uses. To test the device a matrix of parameters was tested, based on the conclusions of the first part.

The lowest field required for bacteria inactivation using the newly developed was $E_c 89 \text{ Vmm}^{-1}$ and most significant area of delay in the experiments was achieved (34.36 mm^2) for a single needle electrode.

One of the individual characters of the *P. aeruginosa* is the ability to provide bioluminescence and fluorescence signal in a unique wavelength spectrum. This kind of signal can be translated to the bacterial density on the surface. Using this phenomenon, the next step of the experiment based on the fluorescence signal from chicken skin contaminated by *P. aeruginosa*. The contaminated skin areas treated with PEF had shown a signal reduction of maximum 25 % (75% of the original signal) compare to the signal before the PEF which was the reference point (100%). After the treatment, the bacteria were imaged again after 48 hours. At this point, we could see that the bacteria had grown once again on the dead skin with no activity of the immune system.

To make one more step forward to emulate real conditions of living cell tissue, an experiment with laboratory mice took place. In the beginning, the thermal injury made, and contamination of *P. aeruginosa* spread on the area of the injury. Imaging of the mice done on the second day, and when we compared it to the control group, we could see a reduction of maximum 88%, of the total flux signal. The tremendous differences between the PEF of chicken skin and *in vivo* experiment can be explained by the secondary effect caused by an electric field. During the electroporation, additionally, to the bacteria disinfection effect, PEF can locally stimulate the immune system by causing minor damage to the skin surface and recruit the immune system compounds to the contaminated area.

Gratitude

- I would like to thank Dr. Alex Golberg for supervising this project and the opportunity to take place in such an innovative and exciting project. According to work together, I got many tools of the practical and strategical way of researching what will probably assist my work a lot in the future.
Special thank for the opportunity to work in Shriners Hospitals for Children, MGH and have that experience.
- Thank Prof. Eliora Ron for the supervising my work and helps much understanding of the microbiological field, the diversity, and complexity of the biological system and having the patient and attention to the details.
- Dr. Klimentiy Levkov that teach me a lot about the systemic way of thinking based on huge experience. For the more deeply understanding in the electric field and optimization of the parameter matrix.
- Dr. Mengjie Wu, Shriner Hospital, Boston, USA, for the collaboration and the successful work on the animal model.
- Laboratory manager Ruth Gotlive for helping during the work.
- Mark Polikovsky for the help in the beginning and explanation of the principles of microbiological work.



Science is built of facts the way a house is built of bricks: but an accumulation of facts is no more science than a pile of bricks is a house”

Henri Poincaré(1854-1912)

Mathematician, Physicist and Science philosophe, France.



Tel Aviv University

Porter School of Environment and Earth Sciences

Disinfection of common wound pathogen *Pseudomonas aeruginosa* using high voltage pulse electric fields

This paper submitted as the thesis for the M.Sc. degree

By: Andrey Ethan Rubin (321991663)

This study supervision by:

**Dr. Alexander Golberg, Porter School of Environmental and Earth Sciences,
TAU.**

**Prof. Eliora Ron School of Molecular Cell Biology & Biotechnology, Faculty of
Life Sciences, TAU.**

October 2018