

Орынбасар Мадияна Болатжанқызының «Үй мысықтарына арналған COVID-19 инфекциясына қарсы суббірлікті вакцинасын әзірлеу және иммунобиологиялық қасиеттерін зерттеу» тақырыбындағы 8D09101 – «Ветеринариялық медицина» білім беру бағдарламасы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін ұсынылған диссертациялық жұмысына АНДАТПА

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. COVID-19 пандемиясы аясында SARS-CoV-2 вирусының адамнан жануарға, жануардан жануарға және кері трансмиссиясы ғылыми қоғамдастықтың ерекше назарында. Әсіресе үй мысықтарының эпидемиологиялық маңызы зор, себебі олар адаммен тығыз байланыста және вирустық инфекцияға жоғары бейімділік танытады. SARS-CoV-2 вирусы алғаш рет 2019 жылдың соңында анықталып, қысқа уақыт ішінде жаһандық пандемияға айналды. Бастапқыда тек адамдар арасында таралады деп есептелген вирустың зооноздық табиғаты кейінгі зерттеулерде дәлелденіп, оның адамнан жануарға жұғу мүмкіндігі расталды. Үй жануарларының ішінде мысықтар SARS-CoV-2 вирусына ең сезімталдардың бірі болып табылады. Олар вируспен жұқтырылып қана қоймай, оны басқа мысықтарға да бере алады. Мысықтарда инфекция көбінесе симптомсыз немесе жеңіл түрде өтеді, сирек жағдайларда тыныс алу бұзылыстары, тәбеттің төмендеуі және әлсіздік байқалады. Алайда симптомсыз тасымалдау эпидемиологиялық тұрғыдан ерекше қауіпті болып табылады, себебі инфекцияның жасырын таралуына әкеледі. Халықаралық деректер бойынша, мысықтардың репродуктивтік саны (R_0) 3-тен асады, ал вирусты ұзақ мерзім бойы бөліп шығару қабілеті оларды вирустың табиғи ортасына айналдыруы мүмкін. Азия, Еуропа және Америка құрлықтарында мысықтар тұқымдасы өкілдерінің SARS-CoV-2-мен табиғи жолмен ауыру жағдайлары ресми түрде тіркелген. Осыған байланысты, Бір Денсаулық (One Health) тұжырымдамасы шеңберінде үй мысықтарын вакцинациялау пандемияға қарсы кешенді шаралардың ажырамас бөлігі болып табылады. Бұл тәсілдің маңыздылығын халықаралық деңгейдегі ірі эпидемиологиялық зерттеулер де растайды: мысалы, Чилиде 2020–2024 жылдары 1377 мысықтың сарысуын талдау нәтижесінде олардың иммундық жауап ұзақтығы 15 айға дейін сақталатыны анықталған. Қытайдың Ухань қаласында жүргізілген зерттеу SARS-CoV-2 вирусының адамнан үй мысықтарына берілу мүмкіндігін нақты дәлелдеді. Зерттеу барысында 102 мысықтың қан сарысуы сынақтан өткізілді. Нәтижесінде, 15 мысықта (14,7%) SARS-CoV-2-ге қарсы антиденелер анықталды, оның ішінде 11-інде вирусты бейтараптандыратын антиденелердің болуы расталды. Бұл көрсеткіштер мысықтардың вируспен нақты байланыста болғанын және олардың иммундық жүйесінің тиісті жауап қалыптастырғанын көрсетеді.

Осылайша, үй мысықтарын SARS-CoV-2-ден қорғауға арналған қауіпсіз әрі тиімді вакцина әзірлеу – ветеринариялық медицина мен қоғамдық денсаулық сақтаудың өзекті міндеті. Осы міндетті шешуде суббірлікті

вакциналар ерекше орын алады. Суббірлікті вакциналар – вирустың жекелеген ақуыздарын (әдетте S ақуызын) рекомбинантты технологиямен алып, адьювантпен бірге енгізуге негізделген вакцина түрі. Олардың басқа вакцина түрлерімен салыстырғанда бірнеше артықшылықтары бар: қауіпсіздігі жоғары, иммундық жүйесі әлсіз жануарларға қауіпсіз, қайталап енгізуге мүмкіндік береді, сақтау және тасымалдау шарттары қарапайым. Алайда суббірлікті вакциналардың иммуногенділігі тазартылған ақуыздардың иммундық жүйені әлсіз ынталандыруына байланысты төмен болуы мүмкін. Сондықтан вакцинаның иммуногенділігін арттыруда адьюванттардың маңызы зор.

Диссертациялық зерттеудің мақсаты. Қауіпсіз, иммуногенді және тиімді үй мысықтарына арналған COVID-19 суббірлікті вакцинасын әзірлеу және иммунобиологиялық қасиеттерін зерттеу.

Зерттеу міндеттері:

1. Вакцина дизайнын әзірлеу және препараттың пилоттық сериясының сапасын зертханалық бақылау;
2. Мысықтарда вакцинаның әртүрлі формуляцияларының иммуногендік және протективті тиімділігін салыстырмалы бағалау және оңтайлы құрамын анықтау;
3. Мысықтардағы вакцинациядан кейінгі иммунитеттің кернеуі мен ұзақтығын бағалау.

Зерттеу әдістері. Зерттеу жұмыстары М.Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығының BSL-3 және ABSL-3 зертханаларында және ҚазҰАЗУ қарасты Халықаралық вакцинология орталығында жүргізілді. Зертханалық жануарларды ұстау және пайдалану жөніндегі институционалдық комитеттің ұсынылған жобаны зерттеуге рұқсаты бар (22.09.2020 жылғы №4 хаттама)

Жұмыста анти-Spike IgG деңгейін ELISA әдісімен анықтау әдістер кешені қолданылды. Барлық талдау әдістерінің ішінде антигенді немесе антиденені анықтауға ферменттерді белгі ретінде қолдануға негізделген иммунологиялық талдау айрықша орын алады. Иммундық талдауда ферменттерді таңба ретінде қолдану мүмкіндігінің себебі – ферменттердің катализдік белсенділігінің жоғары болуы; сәйкес субстраттық жүйе көмегімен фермент концентрациясының ерітіндідегі дәрежесін 10^{-15} М анықтауға мүмкіндік береді.

Алынған барлық сандық деректер GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, АҚШ) бағдарламасында өңделді. Антидене титрлері геометриялық орташа мәндер (GMT) ретінде есептелді.

Қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер:

1. Үй мысықтары арасында SARS-CoV-2 вирусының таралуы мен резервуарының пайда болу қаупі – мысықтардың вирусты жұқтыруға бейімділігі, вирусты ұзақ уақыт бойы шығару қабілеті COVID-19 пандемиясымен «Бір Денсаулық» тұжырымдамасы аясында күресудің маңызды бағыты ретінде үй мысықтарын вакцинациялау қажеттілігін дәлелдейді.

2. Үй мысықтарына арналған COVID-19 инфекциясына қарсы суббірлікті вакцинаның дизайны мен пилоттық сериясының сапасын зертханалық бақылау – вакцинаның қауіпсіздігі, иммуногенділігі және протективті тиімділігі оның құрамына енгізілген антигендер мен адьюванттардың дұрыс таңдалуымен және препараттың пилоттық сериясының сапа көрсеткіштерімен анықталады.

3. Вакцинаның әртүрлі формуляцияларының мысықтардағы иммуногендік және протективті тиімділігі – алғаш рет үй мысықтарына арналған суббірлікті вакцинаның әртүрлі формуляциялары салыстырмалы түрде зерттеліп, олардың иммундық жауап тудыру қабілеті мен вирустан қорғау тиімділігі бағаланады.

Зерттеудің негізгі нәтижелерінің сипаттамасы.

Жүргізілген зерттеу жұмысының барысында үй мысықтарына арналған COVID-19 суббірлікті вакцинасының иммунобиологиялық қасиеті кешенді түрде зерттеліп, келесідей негізгі нәтижелер алынды:

1. SARS-CoV-2 вирусының S ақуызының жасушадан тыс доменіне негізделген рекомбинантты антигенді алу технологиясы әзірленді. S ақуызының жасушадан тыс домені бакуловирустық экспрессиялық жүйеде *Trichoplusia ni* жасушаларын пайдалану арқылы алынып, аффиндік хроматография әдісімен тазартылды. Алынған рекомбинантты ақуыздың сәйкестігі электрофорез, вестерн-блот және масс-спектрометриялық талдау әдістерімен расталды. Ақуыздың тазалық дәрежесі 90%-дан жоғары болды. Рекомбинантты антигеннің ангиотензинді түрлендіруші фермент 2 рецепторымен байланысу қабілетінің сақталуы оның биологиялық белсенділігін растады.

2. Үй мысықтарына арналған SARS-CoV-2 инфекциясына қарсы суббірлікті вакцинаның тәжірибелік формуляциялары әзірленіп, олардың негізгі сапа көрсеткіштері анықталды. Вакциналық үлгілердің құрамына 5 мкг рекомбинантты S ақуызының жасушадан тыс домені және ESSAI O/W 1849102 май-суда типті эмульсиялық адьюванты немесе Alhydrogel® 2% алюминий гидроксиді негізіндегі адьювант енгізілді. Дайын вакциналық үлгілердің стерильдігі расталды. Эндотоксин мөлшері 2 эндотоксин бірлігінен/мл-ден төмен, ал қалдық ДНҚ мөлшері 50 нг/мл-ден төмен болды.

3. Вакцинаның иммуногендік белсенділігі. Вакцинаның иммуногендік белсенділігіне адьюванттардың айқын әсері анықталып, оңтайлы формуляция таңдалды. Вакцинаны 14 күн аралықпен екі рет бұлшықет ішіне енгізгеннен кейін ESSAI O/W 1849102 адьюванты бар формуляцияда S ақуызына қарсы иммуноглобулин G антиденелерінің геометриялық орташа титрі 97 420 құрады. Бұл көрсеткіш Alhydrogel® 2% адьюванты бар формуляциямен салыстырғанда шамамен 2 есе, ал адьювантсыз антиген тобымен салыстырғанда шамамен 7 есе жоғары болды. D614G нұсқасына қарсы бейтараптандырушы антиденелердің геометриялық орташа титрі ESSAI O/W 1849102 формуляциясында 945, Alhydrogel® 2% тобында 450, ал адьювантсыз антиген тобында 220 болды. Delta нұсқасына қарсы ESSAI O/W 1849102 адьюванты бар вакцинаны алған мысықтардың барлығында

бейтараптандырушы антиденелер анықталып, олардың геометриялық орташа титрі 315 құрады. Alhydrogel® 2% тобында бұл көрсеткіш 150, ал адьювантсыз антиген тобында 106 болды. Осы нәтижелер негізінде 5 мкг S ақуызының жасушадан тыс домені мен ESSAI O/W 1849102 май-суда типті эмульсиялық адьюванты негізіндегі композиция NARUVAX-C19 (pets) вакцинасының иммуногендік көрсеткіштері бойынша оңтайлы тәжірибелік формуляциясы ретінде таңдалды.

4. Протективті тиімділік. Бақылаулы жұқтыру тәжірибесінде адьювантталған суббірлікті вакциналардың протективтік әсері, сондай-ақ олардың үй мысықтарындағы қауіпсіздігі анықталды. SARS-CoV-2 вирусын интраназальды жұқтырғаннан кейін ESSAI O/W 1849102 және Alhydrogel® 2% адьюванттары бар вакциналық топтардың өкпе және жүрек тіндерінен инфекциялық вирус бөлініп алынбады. ESSAI O/W 1849102 адьюванты бар формуляцияда зерттелген тіндердегі вирустық жүктеменің ең төмен деңгейі анықталды. Бұл формуляция төменгі тыныс жолдары мен жүрек тіндеріндегі вирустың репликациясын тиімді шектеумен сипатталды. Вакцинациядан кейін клиникалық тұрғыдан маңызды жағымсыз реакциялар байқалмады.

5. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде үй мысықтарындағы SARS-CoV-2 инфекциясының арнайы профилактикасына арналған рекомбинантты суббірлікті вакцина формуляциясын әзірлеудің ғылыми-тәжірибелік негізі қалыптастырылды. Зерттеу нәтижелері 5 мкг S ақуызының жасушадан тыс домені мен ESSAI O/W 1849102 май-суда типті эмульсиялық адьюванты негізіндегі NARUVAX-C19 (pets) вакцина кандидатының жоғары иммуногендік қасиетін, SARS-CoV-2 вирусының бастапқы және Delta нұсқаларына қарсы бейтараптандырушы иммундық жауап қалыптастыру қабілетін және тәжірибелік жағдайда протективтік әсерін көрсетті. Алынған нәтижелер вакцинаның иммундық қорғанысының ұзақтығын, ұзақ мерзімді қауіпсіздігін, вирустың берілуіне әсерін және өндірістік масштабта алу мүмкіндігін одан әрі зерттеуге негіз болады. Вакцинаны алу тәсілі Қазақстан Республикасының №35485 патентімен қорғалған.

Алынған нәтижелердің жаңалығы мен маңыздылығының негіздемесі. Алғаш рет үй мысықтарына арналған COVID-19 инфекциясына қарсы суббірлікті вакцинасы шығарылды. Үй мысықтарына арналған SARS-CoV-2 суббірлікті вакцинасының технологиясы әзірленді. Алғаш рет мысықтардағы вакцинаның әртүрлі формуляциясының иммуногенділігі мен протективті тиімділігі туралы мәліметтер алынды. Үй мысықтарында суббірлікті вакцинаның әртүрлі адьюванттық формуляцияларының иммуногендігі мен протективті тиімділігі салыстырмалы түрде бағаланды. Зерттеу нәтижесінде мысықтар үшін оңтайлы адьювант түрі анықталып, оның иммундық жауапты күшейту механизмдері сипатталды.

Ет қоректілер және басқа ауруға бейім жануарларда SARS-CoV-2 инфекциясын арнайы алдын алу үшін суббірлік адьювантты вакцинаны алу тәсілі. Қазақстан Республикасы Әділет министрлігінің «Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМҚ. Өнертабысқа патент № 35485, 04.02.2022.

Ғылымның даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі. Диссертациялық жұмыс «Нанобөлшектерге негізделген SARS-CoV-2 интраназальды вакцинасының жаңа платформасы: жануарлардың зертханалық модельдерінің дизайнын жасау және сынау» ғылыми жобасы аясында орындалды. Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Ғылым комитеті қаржыландырды (грант № AP09259609).

Жобаның мақсаты мен диссертацияның мазмұны арасындағы байланыс: жобада нанобөлшектерге негізделген интраназальды вакцина платформасы әзірленсе, диссертацияда суббірлікті вакцинаның иммунобиологиялық қасиеттері зерттелді – бұл екі бағыт бір-бірін толықтырып, вакциналық иммунитетті жан-жақты зерттеуге мүмкіндік берді; жоба аясындағы зерттеулер ҚР М.Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығының BSL – 3 және ABSL – 3 зертханаларында жүргізіліп, жоғары деңгейдегі биологиялық қауіпсіздік талаптары сақталды; жобаның нәтижелері диссертациядағы вакцинаның протективті тиімділігін бағалауға негіз болды.

Докторанттың әрбір жарияланымды дайындауға қосқан үлесінің сипаттамасы. Докторант диссертациялық зерттеудің барлық кезеңдеріне, оның ішінде ғылыми тұжырымдаманы қалыптастыруға, зертханалық эксперименттерді жоспарлау мен жүргізуге, деректерді жинау мен талдауға, нәтижелерді статистикалық өңдеуге, алынған мәліметтерді интерпретациялауға, сондай-ақ ғылыми жарияланымдарды дайындау мен рәсімдеуге тікелей қатысты. Докторант BSL-3 және ABSL-3 зертханаларында жұмыс істеу бойынша қауіпсіздік техникасының нұсқаулықтарын меңгеріп, тиісті сертификаттарға ие болды. Зерттеу барысында докторант халықаралық ғылыми әдебиеттерге жан-жақты шолу жасап, 114 атаудан тұратын библиографиялық тізімді құрастырды.

Диссертация тақырыбы бойынша:

– Scopus және Web of Science мәліметтер базасында тіркелген халықаралық Frontiers in Veterinary Science журналында (Q1) -1 мақала.

– Ет қоректілер және басқа ауруға бейім жануарларда SARS-CoV-2 инфекциясын арнайы алдын алу үшін суббірлік адъювантты вакцинаны алу тәсілі бойынша Өнертабысқа патент № 35485 алынды.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертация 109 беттен, және кіріспеден, әдебиетке шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, өзіндік зерттеу нәтижелерінен, қорытындыдан, пайдаланылған әдебиеттер тізімінен және 5 қосымшалардан тұрады. Жұмыста 14 кесте мен 10 сурет берілген. Пайдаланылған әдебиеттер тізімі 114 атаудан тұрады.