

## АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (PhD)  
по специальности «8D05104 – Генетика»

**БАКИЕВА СЕРИКА САМИГУЛЛОВИЧА**

### **Конструирование эндолизинов бактериофагов и оценка их эффективности в инактивации бактериальных патогенов осетровых рыб**

**Общая характеристика диссертационной работы.** Работа направлена на исследование антибактериальной активности эндолизинов бактериофагов против бактериальных патогенов являющихся возбудителями болезней осетровых рыб, выращиваемых в условиях установок с замкнутым циклом водоснабжения (УЗВ).

**Актуальность темы исследования.** Выращивание осетровых в аквакультуре является одним из важных действий, направленных на решение проблемы сокращения популяции осетровых видов рыб. Кроме того, производство осетровых в аквакультуре в последние годы значительно возросло из-за высокого спроса на черную икру на мировом рынке. Однако быстрое развитие аквакультуры сопровождается вспышками заболеваний, вызванных бактериальными инфекциями, которые приводят к высокой смертности и катастрофическим экономическим потерям. Наиболее тяжелыми бактериальными заболеваниями у осетровых в аквакультуре являются инфекции, вызываемые бактериями рода *Aeromonas* и *Pseudomonas*, смертность рыб от бактериальных патогенов достигает до 100%.

В Казахстане большинство видов осетровых выращиваются в аквакультуре, и известно, что бактериальные патогены являются основными причинами смертности этих рыб, несмотря на это, на сегодняшний день информация о болезнях и контроле за здоровьем осетровых ограничена. В настоящее время из-за широкого и часто неконтролируемого использования антибиотиков количество бактерий, устойчивых к антибиотикам, резко возросло и является основной причиной заболеваемости и смертности. Это явление может не только привести к неудаче антимикробной терапии, но и вызвать опасения относительно безопасности рыбных продуктов. По этой причине срочно необходимы новые стратегии борьбы с этими лекарственно-устойчивыми патогенами. В качестве одной из этих альтернатив рассматривается терапия бактериофагами. Эксперименты по фаготерапии показали многообещающие результаты в уничтожении нескольких патогенных бактерий в аквакультуре. Однако, эффективность фаговой терапии в аквакультуре зависит от факторов окружающей среды, таких как концентрация соли, pH, температура и т.д. Кроме того, бактерии могут также выработать механизмы резистентности к инфицированию фагами.

В настоящее время эндолизиновая терапия считается очень перспективной альтернативой лечения сложных инфекций. Эндолизины являются ферментами,

кодируемыми фагом, которые обладают пептидогликан-гидролазной активностью и поэтому способны разрушать клеточную стенку бактерий, позволяя фагу покинуть клетку-хозяина после репликации. Получены экспериментальные данные в условиях *in vitro* и *in vivo* демонстрирующие впечатляющую эффективность эндолизинов в лизисе бактериальных клеток, включая бактерии с множественной лекарственной устойчивостью. В отличие от антибиотиков и бактериофагов, бактериальные штаммы не развивают устойчивость к эндолизинам.

За последние десять лет область исследований эндолизинов значительно ускорилась. Некоторые эндолизины, разработанные различными компаниями, включая химерные эндолизины, в первую очередь против грамположительных и грамотрицательных патогенов человека и животных, в настоящее время находятся на стадии доклинических и клинических испытаний. Однако, потенциал эндолизинов в качестве антибактериальных агентов еще не изучен в области аквакультуры, хотя культивируемая рыба, как и другие животные и люди, постоянно находится под угрозой микробных атак.

**Цель исследования.** Определение эффективности применения эндолизинов бактериофагов в инактивации бактериальных патогенов вызывающих заболевания осетровых рыб в условиях индустриальной аквакультуры.

**Задачи исследования:**

1. Физиологическая, биохимическая и молекулярная идентификация патогенных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, выделенных из зараженных осетровых рыб.
2. Клонирование и функциональная экспрессия бхHis-меченых эндолизинов бактериофагов в *E. coli* и очистка рекомбинантных белков.
3. Конструирование химерных эндолизинов с повышенной литической активностью в отношении патогенных бактерий, вызывающих заболевания осетровых рыб в аквакультуре.
4. Характеристика антибактериальной активности *in vitro* и *in vivo* родительских и сконструированных новых химерных эндолизинов.
5. Определение возможности терапии эндолизинами кожных поражений больных *A. baerii*.

**Объекты исследования.** Эндолизины (OBPgp279, Gp110, LysPA26 и их химеры) бактериофагов и патогенные бактерии родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* осетровых рыб.

**Предмет исследования.** Антибактериальный эффект эндолизинов против бактериальных патогенов осетровых рыб.

**Методы исследования.** При проведении исследований в рамках выполнения диссертационной работы использовались следующие методы: микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические.

**Научная новизна диссертационной работы.** В настоящее время потенциал эндолизинов в качестве антибактериальных агентов еще не изучен в области аквакультуры, хотя культивируемые рыбы, как и другие животные и люди, постоянно находятся под угрозой микробных атак. Представленная работа

направлена на исследования терапевтических потенциалов эндолизинов, представляющих разные типы организации доменов и имеющих различное происхождение. А также, разработку новых эффективных химерных эндолизинов с повышенной литической активностью в отношении грамотрицательных и устойчивых к антибиотикам бактерий, которые являются основной причиной заболеваний осетровых в аквакультуре.

**Теоретическая и практическая ценность работы.** Установлено, что эндолизин Gp110, а также нами сконструированные химерные эндолизины обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении патогенов рода *Aeromonas*. На основе предложенных химерных эндолизинов могут быть разработаны готовые лекарственные средства с высокой антибактериальной активностью, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Создан существенный научно-технический задел для инициации фармацевтической разработки.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. *A. hydrophila* АВ005 и *A. salmonicida* АВ001 являются высоковирулентными штаммами из выделенных и идентифицированных изолятов бактерий, способные вызывать тяжелые заболевания осетровых рыб, характеризующиеся 100% смертностью.

2. Высоковирулентные штаммы *A. hydrophila* АВ005 и *A. salmonicida* АВ001 содержат семь генов из 10 исследованных генов вирулентности.

3. Все выделенные изоляты бактерий характеризуются мультирезистентностью к антибиотикам. Среди исследованных штаммов бактерий штаммы *P. parafulva* АВ004 и *P. protegens* АВ006 устойчивы к 15 из 19 исследованных антибиотиков.

4. Получены рекомбинантные родительские и химерные эндолизины методом микробиологического синтеза с хроматографической очисткой.

5. Рекомбинантные родительские и химерные эндолизины проявляют активность в отношении бактерий рода *Aeromonas*, в том числе обладающих устойчивостью к антибиотикам.

6. Рекомбинантный эндолизин Gp110 и химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) проявили наиболее выраженный антибактериальный эффект против бактерий рода *Aeromonas* в условиях *in vitro* и *in vivo*.

7. Показана эффективность терапии эндолизинами пораженной кожи больных *A. baerii* при аэромонозе.

**Основные результаты исследований и выводы:**

1. Выделены и идентифицированы на основе фенотипических и биохимических свойств шесть культур грамотрицательных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* из больных особей осетровых рыб (*A. baerii*), способные расти в широком температурном диапазоне от 13 до 42 °С, при значении pH среды 5,0–9,0 и концентрации NaCl от 0 до 5%.

2. На основании результатов генотипирования, определения фенотипических и биохимических свойств была определена видовая принадлежность изолятов. Определены следующие виды бактерий: *Aeromonas hydrophila* АВ005 (OK634406, 16S рPHK; ON124027, gyrB), *Aeromonas*

*salmonicida* AB001 (OK634025, 16S pPHK; ON124026, *gyrB*; OQ144653, *rpoD*; OQ144652, *flaA*), *Aeromonas veronii* AB003 (OK634393, 16S pPHK), *Pseudomonas parafulva* AB004 (OK634400, 16S pPHK), *Pseudomonas protegens* AB006 (OK635331, 16S pPHK), все полученные нуклеотидные последовательности включены в базу данных GenBank NCBI.

3. Показано, что штаммы *A. hydrophila* AB005, *A. salmonicida* AB001 и *A. bestiarum* AB002 высоковирулентны, способны вызывать тяжелые заболевания, сопровождающиеся бледностью жабр, обширными кровоизлияниями в различных частях тела, нарушением кровообращения и некрозом внутренних органов у рыб *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *A. baerii* и *A. ruthenus*. Смертность экспериментальных рыб достигает 100%. Менее патогенным оказался штамм *A. veronii* с 30% показателем смертности. В противоположность роду *Aeromonas* выделенные бактерии рода *Pseudomonas* не проявили патогенности.

4. Анализ генов вирулентности в геноме бактерий подтвердил наличие наибольшего количества факторов вирулентности у штаммов *A. hydrophila* AB005 и *A. salmonicida* AB001 по семь генов (*aerB*, *ast*, *pla*, *ahe2*, *nucl*, *gcaT*, *aerA*; *hlyA*, *aerA*, *alt*, *ahpB*, *gcaT*, *pla*, *ahe2*, соответственно) из 10 исследованных, а также шесть генов обнаружено у *A. bestiarum*, изолят *A. veronii* характеризовался наличием лишь 3 генов вирулентности.

5. Показано, что наиболее устойчивыми к антибиотикам среди исследованных штаммов бактерий оказались штаммы *P. parafulva* AB004 и *P. protegens* AB006 проявившие резистентность к 15 из 19 исследованных антибиотиков. Самой меньшей резистентностью к антибиотикам характеризовались штаммы *A. hydrophila* AB005, *A. salmonicida* AB001 и *A. bestiarum* AB002, для этих изолятов 9 антибиотиков оказались чувствительными.

6. Клонированы гены эндолизинов бактериофагов Gp110, OBPgp279 и LysPA26, а также гены 4 новых химерных эндолизинов. Проведена функциональная экспрессия генов с гистидиновым концом в *E. coli* и аффинная очистка рекомбинантных эндолизинов. С использованием клеточных стенок штамма *A. hydrophila* AB005 в качестве субстрата, установлены пептидогликан-гидролизующие активности очищенных рекомбинантных эндолизинов.

7. Gp110, OBPgp279 и LysPA26 рекомбинантные эндолизины показали широкий, но разнообразный спектр бактерицидной активности в зависимости от используемых видов патогенов. Все три эндолизина показали повышенную активность против *A. veronii*. Сравнительно низкая активность всех ферментов наблюдалась в отношении *A. salmonicida*. Антибактериальная активность в отношении грамположительной бактерий *S. aureus* не наблюдалась.

8. Наиболее выраженный эффект наблюдался для Gp110. Результаты, полученные *in vitro*, были подтверждены результатами анализов *in vivo*, поскольку выживаемость инфицированных *O. niloticus* была выше при обработке *O. niloticus* эндолизином Gp110, чем при обработке только OBPgp279 или LysPA26.

9. Химерные эндолизины Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD), OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) показали высокую

эффективность в отношении видов бактерий рода *Aeromonas*. Среди химер, новый химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) показал более высокую противомикробную активность, чем его исходный эндолизин LysPA26.

10. Терапевтические испытания эндолизинов на модели нильской тилляпии показали, что рекомбинантные эндолизины Gp110 и Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) обеспечивают 100% выживаемость инфицированных *O. niloticus*. Определена возможность терапии эндолизинами пораженной кожи больных *A. baerii* при аэромонозе. Показано, что процент закрытия ран у рыб, обработанных Gp110, составляет 41,8% на 6-й день, 79% на 12-й день и 95,7% на 25-й день соответственно. Полученные результаты указывают на то, что Gp110 и Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) являются многообещающими кандидатами для разработки терапевтических средств против инфекции *Aeromonas* в аквакультуре.

**Личный вклад автора.** Автором проводился отбор больных особей осетровых рыб в карантинные бассейны, сбор биологических материалов для выделения бактерий, идентификация бактериальных патогенов, определение патогенности выделенных изолятов, подача полученных сведений изолятов бактерий в базу данных NCBI, клонирование, получение конструкций и очистка белков эндолизинов, анализ антибактериальной активности эндолизинов в условиях *in vitro* и *in vivo*, написание тезисов и научных статей, написание диссертационной работы согласно установленному плану согласованному с научными консультантами.

**Связь с планом основных научных работ.** Диссертационная работы была выполнена в рамках проекта грантового финансирования КН МНВО (МОН) РК на 2021-2023 годы AP09259735 «Разработка и оценка химерных эндолизинов бактериофагов для борьбы с множественно лекарственно-устойчивыми грамотрицательными патогенами осетровых рыб».

**Апробация работ.** Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях: Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби элемеі» (2020-2023 гг., Алматы, Казахстан); VIII International conference "Modern biotechnology for science and practice" (22-23 April 2021, St. Petersburg, Russia); The 5<sup>th</sup> Symposium on EuroAsia Biodiversity (1-3 July 2021, Mugla, Turkey; Almaty, Kazakhstan).

**Публикации.** Основное содержание диссертации отражено в 14 печатных работах в том числе 3 статьи в изданиях, входящие в первый (Q1) и второй (Q2) квартили базы данных Scopus; 3 статьи в журналах входящих в перечень КОКСНВО МНВО РК; 8 тезисов в материалах международных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, выводы, список использованной литературы и приложения. Диссертация изложена на 166 страницах компьютерного текста, оформленного с соблюдением необходимых стандартов, включает 12 таблиц, 64 рисунков. Список использованной литературы содержит 333 источника.