

«Бактериофаг эндолизиндері және олардың бекіре тұқымдас балықтарының бактериялық патогендерін инактивациялау тиімділігін бағалау» тақырыбында «8D05104 – Генетика» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін Бакиев Серик Самигулловичтың диссертациясына

АНДАТПА

Диссертациялық жұмыстың жалпы сипаттамасы. Тұйық жүйелі сумен қамтамасыз ету қондырғылары (ТЖСҚЕК) жағдайында өсірілетін бекіре балықтарының ауруын тудыратын бактериялық қоздырғыштарға қарсы бактериофагтардың эндолизиндерінің бактерияға қарсы белсенділігін зерттеуге бағытталған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Аквакультурада бекіре тұқымдас балықтарды өсіру бекіре балық түрлерінің популяциясының азаю мәселесін шешуге бағытталған маңызды шаралардың бірі болып табылады. Сонымен қатар, соңғы жылдары әлемдік нарықта қара уылдырық сұранысының жоғары болуына байланысты бекіре тұқымдас балықтардың аквакультурасын өндіру айтарлықтай өсті. Алайда, аквакультураның қарқынды дамуы, балықтардың жоғары деңгейде өлуіне және шектен тыс экономикалық шығындарға әкелетін бактериялық инфекциялардан туындаған аурулардың өршуімен үйлесіп отырады. Аквакультурадағы бекіре тұқымдас балықтардың ең ауыр бактериялық ауруларын *Aeromonas* және *Pseudomonas* тұқымдасына жататын патогендер тудырады, осы бактериялар шақыратын ауырулар себебінен балық өлімі 100% дейін жетеді.

Қазақстанда бекіре тұқымдас балықтардың көпшілігі аквакультурада өсіріледі және бұл балықтардың өлімінің негізгі себебі бактериялық қоздырғыштар екені белгілі, дегенмен бекіре тұқымдас балықтардың аурулары мен денсаулығын бақылау туралы ақпарат бүгінгі күнге дейін шектеулі. Қазіргі уақытта антибиотиктерді бақылаусыз және кеңінен қолданылуына байланысты антибиотиктерге төзімді бактериялардың саны күрт өсті және олар ауру мен өлімнің негізгі себебі болып табылады. Бұл құбылыс микробқа қарсы терапияның сәтсіздігіне әкеліп қана қоймай, сонымен қатар балық өнімдерінің қауіпсіздігіне қатысты алаңдаушылық тудыруы мүмкін. Осы себепті антибиотикке төзімді осы патогендермен күресудің жаңа стратегиялары шұғыл қажет. Антибиотиктерге баламалардың бірі ретінде бактериофагтық терапия қарастырылуда. Фаготерапия эксперименттері аквакультурадағы бірнеше патогенді бактерияларды жоюда перспективалы нәтижелерді көрсетті. Алайда, аквакультурадағы фаготерапияның тиімділігі қоршаған орта факторларына байланысты, мысалы, тұз концентрациясы, рН, температура және т.б. Сонымен қатар, бактериялар фаг инфекциясына төзімділік механизмдерін дамыта алады.

Қазіргі уақытта эндолизин терапиясы күрделі инфекцияларды емдеу үшін өте перспективалы балама болып саналады. Эндолизиндер – пептидогликан гидролаза болып табылады, сондықтан олар бактерияның клетка қабырғасын ыдырата алады. *In vitro* және *in vivo* жағдайда алынған эксперименттік деректер

эндолизиндердің бактерияларды, соның ішінде көптеген дәріге төзімді бактерияларды жою бағытында өте тиімді. Антибиотиктер мен бактериофагтардан айырмашылығы, бактерия штаммдары эндолизиндерге төзімділігін дамытпайды.

Соңғы он жылда эндолизинді зерттеу саласы айтарлықтай жеделдеді. Өртүрлі компаниялар әзірлеген бірнеше эндолизиндер, соның ішінде химерлі эндолизиндер, ең алдымен, адамдар мен жануарлардың грам-оң және грам-теріс патогендерге қарсы, қазіргі уақытта клиникаға дейінгі және клиникалық сынақтарда. Балықтар басқа жануарлар мен адамдар сияқты үнемі патогендердің әсерін басынан кешіріп жатқанына қарамастан, эндолизиндердің бактериялық патогендерге қарсы антибактериалды агент ретіндегі потенциалы аквакультура саласында әлі зерттелмеген.

Зерттеудің мақсаты. Өнеркәсіптік аквакультура жағдайында бекіре балықтарының ауруын тудыратын бактериялық патогендерді инактивациялауда бактериофаг эндолизиндерін қолданудың тиімділігін анықтау.

Зерттеу міндеттері:

1. Ауруға ұшараған бекіре балықтарынан бөлініп алынған *Aeromonas* және *Pseudomonas* туыстарының патогенді бактерияларын физиологиялық, биохимиялық және молекулалық идентификациялау.

2. *E. coli*-де бхHis-таңбаланған бактериофаг эндолизиндерін клондау және функционалды экспрессиялап, рекомбинантты эндолизиндерді таза күйде бөліп алу.

3. Аквакультурадағы бекіре балықтарының ауруын тудыратын патогенді бактерияларға қатысты литикалық белсенділігі жоғары химерлі эндолизиндерді құрастыру.

4. Ата-аналық және жаңадан құрастырылған химерлі эндолизиндердің *in vitro* және *in vivo* жағдайында бактерияға қарсы белсенділігін сипаттау.

5. Ауруға ұшыраған *A. baerii* тері зақымдануларына эндолизин терапиясын қолданудың мүмкіндігін анықтау.

Зерттеу нысандары. Бактериофагтар эндолизиндері (OBPgp279, Gp110, LysPA26 және олардың химерлері), бекіре балықтарындағы *Aeromonas* және *Pseudomonas* туыстарының патогенді бактериялары.

Зерттеу пәні. Бекіре балықтарының бактериялық қоздырғыштарына эндолизиндердің қарсы әсері.

Зерттеу әдістері. Диссертациялық жұмыс шеңберінде зерттеу жүргізу кезінде келесі әдістер қолданылды: микробиологиялық, биохимиялық, молекулалық-генетикалық.

Диссертациялық жұмыстың ғылыми жаңалығы. Қазіргі уақытта эндолизиндердің бактерияға қарсы агенттер ретіндегі потенциалы аквакультура саласында әлі зерттелмеген. Ұсынылған жұмыс домендік ұйымдасу деңгейлері және шығу тегі әртүрлі эндолизиндердің емдік потенциалын зерттеуге бағытталған. Сондай-ақ аквакультурада бекіре тұқымдас балық ауруларының негізгі себебі болып табылатын грам-теріс және антибиотиктерге төзімді

бактерияларға қарсы литикалық белсенділігі жоғары жаңа тиімді химерлі эндолизиндерді құрастыру.

Зерттеудің теориялық және практикалық маңыздылығы. Gr110 эндолизині, сондай-ақ біз жасаған химерлі эндолизиндер *Aeromonas* туысының қоздырғыштарына қарсы айқын белсенділікке ие екендігі анықталды. Ұсынылған химерлі эндолизиндердің негізінде бактерияға қарсы белсенділігі жоғары препараттар, соның ішінде *Aeromonas* және *Pseudomonas* тектес антибиотиктерге төзімді штаммдарға қарсы жасалуы мүмкін. Фармацевтиканың дамуын бастау үшін айтарлықтай ғылыми-техникалық база жасалды.

Қорғауға ұсынылатын негізгі ережелер:

1. *A. hydrophila* АВ005 және *A. salmonicida* АВ001 бөлініп алынған және идентификацияланған бактерия изоляттарының ішінде бекіре балықтары ауруларының 100% өліммен сипатталатын ауыр түрлерін тудыруға қабілетті жоғары вирулентті штаммдар болып табылады.

2. Вируленттілігі жоғары *A. hydrophila* АВ005 және *A. salmonicida* АВ001 штаммдарында зерттелген 10 вируленттілік гендердің жеті гені анықталды.

3. Бөлініп алынған бактерия изоляттарының барлығының антибиотиктерге төзімділігі өте жоғары. Зерттелген бактерия штаммдарының ішінде *P. parafulva* АВ004 және *P. protegens* АВ006 штаммдары тексерілген 19 антибиотиктің 15-іне төзімді.

4. Хроматографиялық әдіс арқылы рекомбинантты ата-аналық және химерлі эндолизиндер алынды.

5. Рекомбинантты ата-аналық және химерлі эндолизиндер *Aeromonas* түрлеріне, соның ішінде антибиотиктерге төзімділігі бар түрлеріне қарсы белсенділік көрсетеді.

6. Рекомбинантты эндолизин Gr110 және химерлі эндолизин Gr110 (CWBD) / LysPA26 (CD) *in vitro* және *in vivo* жағдайында *Aeromonas* түрлеріне қарсы жоғары деңгейде белсенділік көрсетті.

7. Аэромоназбен ауыратын *A. baerii* балығының зақымдалған терісіне эндолизин терапиясының тиімділігі көрсетілді.

Негізгі зерттеу нәтижелері мен қорытындылары:

1. Ауру бекіре балықтарының дараларынан 13-тен 42 °С-қа дейінгі температура диапазонында, орта рН-ы 5,0–9,0 шамасында және 0-ден 5%-ға дейінгі NaCl концентрациясында өсуге қабілетті *Aeromonas* және *Pseudomonas* туыстарының алты грамтеріс бактерия дақылдар фенотиптік және биохимиялық қасиеттерінің негізінде бөлініп алынды және идентификацияланды.

2. Генотиптік, фенотиптік және биохимиялық қасиеттерін анықтау нәтижелері негізінде изоляттардың түрі идентификацияланды. Келесі бактерия түрлері анықталды: *A. hydrophila* АВ005 (OK634406, 16S рРНҚ; ON124027, *gyrB*), *A. salmonicida* АВ001 (OK634025, 16S рРНҚ; ON124026, *gyrB*; OQ144653, *rpoD*; OQ144652, *flaA*), *A. veronii* АВ003 (OK634393, 16S рРНҚ), *P. parafulva* АВ004 (OK634400, 16S рРНҚ), *P. protegens* АВ006 (OK635331, 16S рРНҚ), барлық алынған нуклеотидтер тізбегі GenBank NCBI дерекқорына енгізілген.

3. *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *A. baerii* және *A. ruthenus* балықтарын моделдік жүйе түрінде пайдаланып, *A. hydrophila* АВ005, *A. salmonicida* АВ001 және *A. bestiarum* АВ002 штаммдары балықтардың қан айналымы бұзылыстары мен ішкі мүшелерінің некрозын, дененің әртүрлі бөліктеріндегі қан кетулерін тудыратын аса қауіпті патоген екені анықталды. Тәжірибелік балықтардың өлу көрсеткіші 100%-ға жетеді. *A. veronii* штаммының патогенділігі төмен болып шықты, өлім көрсеткіші 30%. *Aeromonas* тұқымдастарына қарағанда, *Pseudomonas* туысының бактериялары патогенділік танытпады.

4. Бактерия геномындағы вируленттілік гендерін талдау *A. hydrophila* АВ005 және *A. salmonicida* АВ001 штаммдарында вируленттілік факторларының ең көп мөлшерінің болуын растады, әрқайсысында жеті геннен анықталды (*aerB*, *ast*, *pla*, *ahe2*, *nucl*, *gcaT*, *aerA*; *hlyA*, *aerA*, *alt*, *ahpB*, *gcaT*, *pla*, *ahe2* тиісінше). *A. bestiarum* штаммында алты ген, ал *A. veronii* изолятында тек 3 вирулентті гендер айқындалды.

5. Зерттелген бактерия штаммдарының ішінде антибиотиктерге ең төзімдісі тексерілген 19 антибиотиктің 15-іне төзімділік танытқан *P. parafulva* АВ004 және *P. protegens* АВ006 штаммдары екені көрсетілді. *A. hydrophila* АВ005, *A. salmonicida* АВ001 және *A. bestiarum* АВ002 штаммдар антибиотиктерге ең аз төзімділігімен сипатталды және осы штаммдар 9 түрлі антибиотиктерге сезімтал болды.

6. Бактериофагтардың Gp110, OBPgp279 және LysPA26 эндолизиндерінің гендері, оған қоса төрт жаңа химерлік эндолизиндердің гендері клондалынды. *E. coli*-де гистидинмен таңбаланған гендердің функционалды экспрессиясы жүзеге асырылып, рекомбинантты эндолизиндер аффинді хроматография арқылы таза күйде бөлініп алынды. Субстрат ретінде *A. hydrophila* АВ005 штаммының клетка қабығын пайдалану арқылы, рекомбинантты эндолизиндердің пептидогликан гидролаза екені анықталды.

7. Gp110, OBPgp279 және LysPA26 рекомбинантты эндолизиндер патогендердің жататын түрлеріне байланысты әртүрлі бактериоцидтік белсенділік көрсетті. Барлық үш эндолизин *A. veronii* штаммына қатысты жоғары белсенділік көрсетті. *A. salmonicida* штаммына қарсы барлық ферменттердің белсенділігі салыстырмалы түрде төмен болды. Ал, грам-позитивті *S. aureus* бактериясына қатысты ешқандай белсенділік көрсетпеді.

8. Ең айқын әсер Gp110 үшін байқалды. *In vitro* жағдайында алынған нәтижелер *in vivo* талдауларының нәтижелерімен расталды. Gp110 эндолизин патогенмен инфекцияланған *O. niloticus* балығының толығымен тірі қалуын қамтамасыз етті. OBPgp279 және LysPA26 эндолизиндерінің балық ауыруын емдеудігі әсері, Gp110 эндолизинімен салыстырғанда төмен болды.

9. Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD), OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) химерлі эндолизиндер *Aeromonas* тектес бактерия түрлеріне қарсы жоғары белсенділік көрсетті. Химерлік эндолизиндер арасында, жаңа Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) химерлі эндолизиннің аналық эндолизин LysPA26-ға қарағанда микробқа қарсы белсенділігі жоғары болды.

10. Нил тиялия ұлгісінде Gr110 және Gr110 (CWBD) / LysPA26 (CD) рекомбинантты эндолизиндер патогенмен инфекцияланған *O. niloticus* балықтарының 100%-ға тірі қалуын қамтамасыз етті. Аэромоназбен ауырған *A. baerii* балықтарының зақымдалған терісіне эндолизин терапиясының эффективтілігі анықталды. Gr110-мен өңделген балықтардың жарасының жабылу пайызы сәйкесінше 6-шы күні 41,8%, 12-ші күні 79% және 25-ші күні 95,7% болды. Біздің нәтижелеріміз Gr110 және Gr110 (CWBD) / LysPA26 (CD) аквакультурадағы *Aeromonas* инфекциясына қарсы терапияны дамытуға перспективті екенін көрсетеді.

Автордың жеке үлесі. Автор ауру бекіре тұқымдас балықтарды карантиндік резервуарларға іріктеуді, бактерияларды оқшаулау үшін биологиялық материалдарды жинауды, бактериялық қоздырғыштарды анықтауды, оқшауланған изоляттардың патогенділігін анықтауды, бактериялық изоляттар туралы алынған ақпаратты NCBI деректер базасына беруді, клондау, эндолизин белоктарының конструкцияларын алу және тазарту, *in vitro* және *in vivo* жағдайында эндолизиндердің бактерияға қарсы белсенділігін талдау, тезистер мен ғылыми мақалалар жазу, ғылыми кеңесшілермен келісілген белгіленген жоспар бойынша диссертация жазу жұмыстарын жүргізді.

Негізгі ғылыми жұмыс жоспарымен байланысы. Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитетінің 2021-2023 жылдарға арналған гранттық қаржыландыру жобасы аясында AP09259735 «Бекіре балықтарының көптік-дәріге төзімді грам-теріс патогендерімен күресу үшін бактериофагтардың химерлі эндолизиндерін құрастыру және олардың эффективтілігін бағалау».

Жұмыстардың апробациясы. Диссертациялық жұмыстың материалдары келесі конференцияларда баяндалып, талқыланды: «Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2020-2023 жж., Алматы, Қазақстан); VIII International conference "Modern biotechnology for science and practice" (22-23 April 2021, St. Petersburg, Russia); The 5th Symposium on EuroAsia Biodiversity (1-3 July 2021, Mugla, Turkey; Almaty, Kazakhstan).

Басылымдар. Диссертацияның негізгі мазмұны 14 жарияланған жұмыста, оның ішінде 3 мақала Scopus дерекқорының бірінші (Q1) және екінші (Q2) квантильдеріне жататын жарияланымдарда; Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым және жоғары білім саласындағы сапаны қамтамасыз ету комитетінің тізіміне енгізілген журналдарда 3 мақала, халықаралық конференция материалдарында 8 тезис жарық көрген.

Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертация кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, зерттеу материалдары мен әдістерінен, өз зерттеулерінің нәтижелерінен, қорытындылардан, пайдаланылған әдебиеттер тізімінен және қосымшалардан тұрады. Диссертация компьютерлік мәтіннің 166 бетінде ұсынылған, талап етілетін стандарттарға сәйкес құрастырылған, 12 кесте, 64 сурет кіреді. Пайдаланылған әдебиеттер тізімінде 333 дереккөз бар.