

Андатпа

философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алуға арналған диссертацияға
8D05110-Вирусология білім беру бағдарламасы бойынша Хайдаров Сәкен
"SARS-CoV-2 вирусына қарсы препараттардың вирусқа қарсы белсенділігін *in vitro* зерттеу" тақырыбында

Зерттеудің жалпы сипаттамасы: диссертация РТ-ПТР әдістерін, жасушалардың өміршеңдігін анықтауды, вирустық титр мен COVID-19-ға жедел тестті, сондай-ақ гендік өнімнің NSP12 анықтау үшін тиісті праймерлерді пайдалана отырып, Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған SARS-CoV2 қазіргі заманғы штаммдарының биологиялық және молекулалық-генетикалық қасиеттерін зерттеуге арналған. SARS-COV-2 вирусына қарсы препараттардың вирусқа қарсы белсенділігін *in vitro* зерттеу Жасыл маймылдың бүйрек тінінің vero E6 жасушалық культурасында жүргізілді.

Зерттеудің өзектілігі: 2020 жылы COVID-19 пандемиясы бүкіл әлемдегі денсаулық сақтау жүйелерінің өте осалдығын көрсетті. Ең алдымен, вирустық инфекцияның таралу жылдамдығы мен қарқындылығы халықтың көпшілігі төтеп бере алмайтын жоғары вирустық жүктемеге байланысты күрделі мәселе болды. Екіншіден, ауруханаға жатқызу проблемалары: төсек қоры да, дәрі-дәрмектер де пандемияны тиімді ұстау үшін жеткіліксіз болды. Үшіншіден, иммундық жауаптың ауыр жағдайлары денсаулыққа, негізінен адамдардың өкпесіне айтарлықтай зиян келтірді және осы ерекшелікке байланысты ауыр жедел респираторлық синдром деп аталды. Сонымен, Қазақстанда да, бүкіл әлемде де вирустық инфекцияларды тез және сенімді диагностикалау басты мақсат болды.

SARS-COV 2 инфекциясымен байланысты ең маңызды мәселелердің бірі-ақуыздардың өзгеруіне байланысты мутациялардың салыстырмалы түрде жоғары жиілігі және қабылдаушы ағзаның бейімделу механизмдері және популяцияны жұқтыру қарқындылығын сақтаудың ең тиімді жолы жаппай вакцинация және тиімді емдеу әдістерін іздеу болды. Әрине, бұл вирустық инфекцияның табиғатын түбегейлі түсіну бізге болашақта жаңа вирустармен күресудің жағымсыз салдарын азайтуға көмектеседі.

Зерттеу мақсаты: SARS-CoV-2 вирусына қарсы препараттардың вирусқа қарсы белсенділігін *in vitro* зерттеу.

Мақсатқа жету үшін зерттеудің негізгі міндеттері:

1. SARS-CoV-2 вирусының қазақстандық нұсқасының геномының секвенциясы және вирустың маңызды гендерінің сипаттамасы. Вирустық гендердің нуклеотидтер тізбегін салыстырмалы және филогенетикалық талдау;
2. SARS-CoV2 екі штаммының, Қазақстанда оқшаулануы тиіс Альфа нұсқасының мутациясын бастапқы Ухань штаммымен салыстыру арқылы анықтау;

3. Цитоуыттылықты анықтау – төрт вирусқа қарсы препараттың қауіпсіз концентрациясы;
4. Үш үміткер арасында ең тиімді және күшті вирусқа қарсы препаратты анықтау: Рибавирин, Фавипиравир (Фабифлю) және Тенофовир (Тенвир), сондай-ақ жасушаның жоғары өміршеңдігін сақтай отырып, жасушалық уыттылықты барынша азайтатын қауіпсіз концентрациядағы кортикостероид.
5. Ингибирлеу коэффициентін анықтаңыз $IC_{10} \rightarrow IC_{50} \rightarrow IC_{100}$ - Вирусқа қарсы препараттың диапазоны - қолайлы SI (селективтілік индексі) Тенофовир (ТАФ);
6. Қауіпсіз концентрацияда күшті препараттың вирусқа қарсы тиімділігін анықтау үшін жабайы типтегі (WT) тышқандарда клиникаға дейінгі сынақты өткізіңіз және растаңыз.

Зерттеу нысандары мен материалдары: SARS-CoV-2/human/KAZ / B1.1/2021 штаммы: вирус титерінен тірі вирус, оның enflab геномы, атап айтқанда nsr12 генінің өнімі және vero E6 жасуша желісі.

Зерттеу әдістері: зерттеу биологиялық-молекулалық, генетикалық, жасушалық-биотехнологиялық, микробиологиялық және фармацевтикалық әдістерді қолданды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы:

Қазақстандық SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 қарсы таблетка препаратының вирусқа қарсы белсенділігінің тиімділігі туралы үш сатылы диссертациялық зерттеу, Альфа нұсқасының оқшауланған және сипатталған штаммы және Қытайдан алынған түпнұсқа Tenvir (TAF) материалы арқылы Ухань штаммы бойынша MTT сынағы. Вирусқа қарсы препараттардың цитотоксикалық және жасуша өміршеңдігін талдау - Қазақстанда *in vitro* екі колориметриялық әдістерді, ССК8 және МТТ әдістерін қолдана отырып, вирусқа қарсы препараттың оңтайлы концентрациясын (CC50) анықтау. Дәрілік заттардың үш таблетка түрі қосымша тежеу белсенділігін көрсетті: 50 мкг/мл концентрацияда $IC_{10} = 0,174$ мкМ, $IC_{50} = 1,74$ мкМ және $IC_{100} = 174$ мкМ бар Тенофовир (TDF және TAF). Рибавирин: $IC_{10} = 2$ мкМ, $IC_{50} = 7$ мкМ және $IC_{80-90} = 205$ мкМ 50 мкг/мл., Фавипиравир: $IC_{10} = 1,65$ мкМ, $IC_{37} = 318$ мкМ, 50 мкг/мл. Дексаметазон кез келген концентрацияда немесе көлемде тежеу қасиеттерін көрсетпеді. Үш таблеткадағы вирусқа қарсы препараттардың тиімділігі мен цитоуыттылығын (CC50/IC50) салыстыру, оң селективтілік индексі (SI мәні) бар вирусқа қарсы препаратты анықтау және ССК8 талдау сынамасын талдау. Үш таблетка препаратының (белсенді агенттердің) вирусқа қарсы белсенділігі: SARS-CoV2 вирусына сезімтал және рұқсат етілген Vero E6 жасушалық желісіндегі Рибавирин, Тенофовир және Фавипиравир – вирустық репликация үшін өлімге әкелетін мутагенезді тудыратын RdRP тежелуі, бұл кезде MOI: 210-ға дейін жеткілікті вирустық жүктеме айтарлықтай жоғары вирустық жүктеме MOI: 210-ға дейін жеткілікті. цитопатиялық әсер 24 сағат ішінде (вирустық жүктемені төмендету потенциалы 200 есе артады). RdRP (РНҚ-тәуелді РНҚ полимераза) генінің (NSP12-құрылымдық емес ақуыздар) молекулалық-генетикалық

сипаттамасы және оның SARS-CoV-2/адам/KAZ/B1.1/2021 штаммының «генетикалық консерватизмі», бастапқы Ухань штаммымен салыстырғанда альфа нұсқасы; Вирусқа қарсы белсенділік Tenvir TAF (Oldrich таза концентрациясы) көмегімен 25 мг/мл бастапқы концентрациядан 10 мкг/мл ерітіндіде расталды. Барлық үш вирусқа қарсы препараттар RdRP белсенділігіне бағытталған, бұл вирустың көбеюін қиындатады.

Зерттеудің теориялық және практикалық маңыздылығы:

Үш даулы вирусқа қарсы препараттың және бір гормоналды (стероидты) препараттың *in vitro* тиімділігі туралы нақты түсінік. Осы препараттардың қайсысы тек практикалық, яғни клиникалық әсерді көрсетіп қана қоймай, сонымен қатар COVID-19 емдеу стратегияларында қауіпсіз дозаны анықтау үшін. Пандемия кезінде Қазақстан SARS-COV 2 вирусының биологиялық табиғатын нашар түсінуіне байланысты коронавирустан кейінгі зардаптары бар және тіпті өліммен аяқталатын жұқтырған пациенттерде COVID-19 прогрессиясының көптеген түрлі жағдайларына және асқыну кезеңдеріне тап болды. Бұл зерттеудің мақсаты-COVID-19 емдеу туралы ғана емес, сонымен қатар болашақта ұқсас вирустық инфекция жағдайлары туралы жақсы түсінік беру.

Вирусқа қарсы әсерлер vero E6 жасуша үлгісінде көрсетілді, сонымен қатар барлық төрт препараттың цитотоксикалық сипаттамалары бағаланды және расталды. SARS-CoV-2/human/Kaz/B1.1/2021 штаммында вирустық геномдағы құрылымдық емес ақуыз аймақтары анықталды және сандық түрде анықталды және олардың биологиялық "консервативті" табиғаты расталды.

Қорғауға ұсынылатын қағидалары:

1) SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 штаммы, Альфа нұсқасы – ORF1a NSP1-11 (протеаза аймағы) және ORF1b NSP12-16 (вирустық РНҚ репликация аймағы) вирустық репликацияға жауапты вирустық штамм болып табылатын бүкіл ORF1ab-ға бағытталған вирусқа қарсы зерттеу тақырыбы. геномдық РНҚ, сондай-ақ вириондардың соңғы жиналуын реттейтін субгеномдық РНҚ үшін.

2) Тенофовир (SARS-CoV-2/адам/KAZ/B1.1/2021 қарсы TDF таблеткасы, WAF (түпнұсқа нұсқасы) және TAF strain нұсқасы) арқылы 12 шұңқырлы талдауда RdRP (РНҚ-тәуелді РНҚ полимеразасы 2 немесе одан төмен MOI-де (хост жасушасына екі вирустық бөлшек) анықталады) күшті тежелуі. Тенофовир, Фавипиравир, Рибавирин және Дексаметазонның таблетка үшін қауіпсіз концентрациялары MOI 2 цитотоксикалық емес вирустық жүктемесі бар жасуша өміршеңдігін қолдауы керек (бір хост жасушадан екі зақымдалмаған вирустық бөлшектерге немесе бляшкалар түзетін бірліктерге (PFU/ml) 200 мкл вирус, көлемі 1 жасуша)00.

3) ССК8 және МТТ жасушаларын санау әдістері төрт таңдалған дәрілік заттың: Тенофовир, Фавипиравир, Рибавирин және Дексаметазон үшін пролиферациясының жоғары өсу профилі бар сенімді Vero E6 жасушаларында шынайы цитотоксикалық және вирусқа қарсы талдауларды көрсетеді.

4) Тенвир (Тенофовир-TDF және TAF) вирус жұқтырған Веро жасушаларында жинақталуын тежеу үшін таңдалған төртеуі арасында тиімді вирусқа қарсы препарат болып табылады, MOI 2 немесе одан төмен салыстырмалы жоғары вирустық жүктеме кезінде жасушалардың өміршеңдігінің жоғары жылдамдығымен 100% ең жоғары $\log_2$ мәніне қол жеткізеді. Қытайдағы *in vivo* клиникаға дейінгі зерттеулер MOI4 → MOI2 вирустық жүктемесінің төмендеуін көрсетті.

Зерттеудің негізгі нәтижелері және қорытынды:

1) SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 штаммының, Альфа нұсқасының бүкіл геномы реттелген. SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 штаммы, сондай-ақ Альфа нұсқа штамы ретінде белгілі, Еуропада 2021 жылы пайда болды және филогенетикалық ағаштың бастапқы нүктесі ретінде қызмет етеді. Бұл тармақ еуропалық штаммдармен тығыз байланысты (А-С қосымшасы).

2) SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain/2021 және SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 штаммдарының Ухань-Ху-1 SARS-CoV-2 анықтамалық тізбегімен салыстырғандағы мутациялары. Менің диссертациямда тек ORF1b сегменті маңызды болды. Ол SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, Альфа нұсқа штаммында вирусқа қарсы тұрақтылықты тудыруы мүмкін маңызды мутацияларды анықтаған жоқ.

3) Тенофовирдің цитоуыттылығы үшін қауіпсіз концентрациясы анықталды - 50 мкг/мл немесе TDF және TAF үшін 174 мкМ (10 нМ TDF қарағанда әлдеқайда қауіпсіз) - IC100 үшін. Сонымен қатар, SARS-CoV-2 инфекциясы контекстінде MTT және CCK8 жасушаларының өміршеңдігін талдау арқылы тенофовир, фавипиравир, рибавирин және дексаметазонды бағалау олардың ықтимал вирусқа қарсы тиімділігі мен цитотоксиктігі туралы маңызды ақпаратты береді. Митохондриялық белсенділікті (MTT) және жасушалық дегидрогеназаларды (CCK8) өлшейтін бұл талдаулар *in vitro*, әсіресе Vero E6 немесе басқа сезімтал жасуша линиялары сияқты модельдерде дәрілердің жасуша өміршеңдігіне және вирусқа қарсы белсенділігіне әсерін сандық бағалау үшін сенімді негіз береді.

4) Тенвир (Тенофовир) – таңдалған үшеуінің ішінде ең тиімді және күшті вирусқа қарсы препарат; Дегенмен, бұл ең қауіпсіз емес. Дәл және дұрыс қолдану COVID-19-ның аурудың жеңіл және орташа сатыларына өтуін оңай тегістей алады. Тенвир (Тенофовир) – SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, Альфа нұсқа штаммына қарсы таңдалған төрттіктің ішінен күшті вирусқа қарсы препарат және оның цитопатиялық оңтайлы вирустық жүктемесі MOI 2-де анықталды. Тенвирдің (TDF) EC50 экспозициясы вертотоксикалық жасушалардың жоғары болуына байланысты анықталмады⁶; біз тек 50 мкг/мл-де ECmax/ICmax алдық. Шамамен бағалау Tenvir таблеткаларының (TDF) 0,5 мкг/мл немесе 1,74 мкМ EC50 құрайды.

5) IC10 → IC50 → IC100 тяжелу коэффициенті бастапқы және таза TAF қолайлы SI (селективтілік индексі) болған Қытайда ғана анықталды.

6) Жабайы типтегі тышқандардағы клиникаға дейінгі сынақтар 50 мкг/мл концентрацияда ТАФ вирусқа қарсы тиімділігін растады.

Автордың диссертацияда сипатталған нәтижелерге қосқан үлесі: зерттелетін мәселе бойынша әдеби деректерді талдау, зерттеудің мақсаттары мен міндеттерін қою, эксперименттік зерттеулер жүргізу, алынған нәтижелерді талдау және статистикалық өңдеу, сондай-ақ диссертация жазу автордың өз бетінше орындалды.

Зерттеуді апробациялау: зерттеу нәтижелері мен диссертацияның негізгі принциптері келесі халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда ұсынылды және талқыланды:

- Заманауи ғылыми технологиялар " (9-10 ақпан 2023 ж.). Стокгольм, Швеция, 2023 ж
- Вирусология, COVID-19 жұқпалы ауруы бойынша 3-ші халықаралық конференция, 24-25 қазан 2022 ж., Дубай, БАӘ
- 1-ші Халықаралық ғылыми конференция материалдары, 26-27 қаңтар 2023 ж., Варшава, Польша
- "ASFEN Forum, жаңа буын-2024" II Халықаралық форумы, 6-7 маусым 2024 ж., Алматы, Қазақстан

Жарияланымдар: диссертацияның негізгі нәтижесі 9 жарияланған жұмыс, оның ішінде Web of Science немесе Scopus дерекқорларында индекстелетін рецензияланатын халықаралық ғылыми журналдардағы 2 мақала, Қазақстан Республикасы Білім және ғылым саласындағы бақылау комитетінің тізіміндегі 2 мақала және халықаралық конференцияларда жарияланған 5 тезис болып табылады.

Диссертацияның құрылымы: Диссертацияда 138 бет компьютерлік мәтін, шартты белгілер мен аббревиатуралар, сонымен қатар кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және пайдаланылған әдебиеттер тізімі, барлығы 115 жазба бар. Жұмыста жеті кесте, алты математикалық формула, 50 сурет, бес қосымша және бір монография бар.