

Izmēģinājuma projekta netehniskais kopsavilkums

Perspektīvas pret- Laimas slimības vakcīnas pārbaude *In vivo*.

Projekta galvenais mērķis ir noskaidrot uz vīrusiem līdzīgo daļiņu (VLP) platformas izveidotu vakcīnu kandidātu spēju izraisīt specifisku, pret Laimas slimību ierosinātu imūnatbildi un pārbaudīt dzīvajā organismā inducēto antivielu protektivitāti peļu infekcijas medelī *in vivo*.

Spirohetas *Borrelia burgdorferi* (*B.burgdorferi*) ir Laimas slimības ierosinātājas baktērijas gan cilvēkiem, gan dzīvniekiem, un Laimas slimība ir viena no visizplatītākajām ērcu pārnēsātām infekcijas slimībām pasaulē. Eiropā ik gadu ar Laimas slimību saslimst 65 tūkstoši cilvēku, ASV - 300 tūkstoši. Latvijā gadā tiek reģistrēti ap 700 saslimšanas gadījumu. Infekcija notiek ērci iekožot; spirohetas no ērcēm migrē uz zīdītājiem apejot organisma imūnsistēmas aizsardzības mehānisma komplementa sistēmu. Slimības pazīmes sākumā ir apkārtējo audu iekaisumi - migrējošā eritēma, vēlāk- atrīts, kardiīts vai neiroborelioze. Lai gan laicīgi diagnosticējot un izmantojot piemērotas antibiotikas, slimību veiksmīgi var izārstēt, problēma ir precīza diagnozes uzstādīšana, jo ne vienmēr ērces koduma vietā parādās raksturīgais migrējošās eritēmas plankums, bet pārējās izpausmes - paaugstināta temperatūra, nogurums, locītavu sāpes, jušanas traucējumi - var atgādināt kādu reimatoloģisku, neiroloģisku vai citu slimību. Simptomi var būt vājāk vai spēcīgāk izteikti, kas apgrūtina diagnozes savlaicīgu noteikšanu. Pirmā mēneša laikā pēc inficēšanās antivielas asinīs var neuzrādīties, precīzas tās ir tikai pēc viena līdz trim mēnešiem, kad slimība jau progresē.

Pret Laimas slimību vakcīnu attīstību kavē *B.burgdorferi* aktīvais, daudzpusīgais infekcijas ceļš dzīvajā organismā un baktērijas atšķirīgie celmi, kas apgrūtina universālas vakcīnas izstrādi.

Pētījums satur pamatotu ideju par pilnīgi jaunu, inovatīvu vakcīnu izveidi pret Laimas slimību, kuru ierosina borēlijas baktērijas, pielietojot principiāli jaunas bioinženierijas metodes un atziņas. Mūsu pētījumā piedāvāto vakcīnu kandidāti ir vīrusveidīgā daļiņa (VLP), kura kalpo kā universāls epitopu eksponētājs jeb nesējs, kā arī darbojas kā nanokonteiners, kurā var iepildīt zāļu vai imūnsistēmu modulējošas vielas, kas pastiprina un padara efektīvāku antivielu veidošanos. Šādas vīrusveidīgas daļiņas eksponē uz virsmas *B.burgdorferi* imunogēnas sekvences jeb epitopus, nodrošinot specifisku imūno atbildi pret Laimas slimības ierosinātāj baktērijām.

Jaunie vakcīnu kandidāti, tos konstruējot, vispirms ir analizēti teorētiski, izmantojot datora modelēšanu *in silico* (*STITCH3.1, Therapeutic Target Database*), šūnu kultūras testus *In vitro* (šūnu toksicitātes - MTT tests). Plaši pētījumi ir veikti izmantojot izolētus audus, fizikāli ķīmiskās metodes (Western-bloti, Ouchterlouni reakcija u.c), mikrobioloģiskās sistēmas, komerciālas antivielas. Tādējādi jauno, pētāmo zāļu analogu izpēte tika veikta pielietojot testu kultūras un citu bioloģisko materiālu *In vitro* apstākļos ar mērķi pēc iespējas samazināt pētījumus *In vivo*. Tomēr skaidrs, ka bez *In vivo* pētījumiem, izmantojot dzīvnieku organismus kā vienotu veselumu, šādi rezultāti nav pilnīgi un to tālāka pētniecība nav objektīva. Tādējādi tiek noraidītas alternatīvās metodes šādiem pētījumiem, jo cilvēkam izmantojamās jaunās vakcīnu formas, gan kā profilaktisks, gan kā terapijas līdzeklis, nevar tikt nekā citādi raksturoti kā tikai ievadot tos dzīvos organismos, kur secīgi norit visi dzīvo organismu uzturošie, arī infekcijas, procesi un tajos iesaistīto šūnu, orgānu, vielu - limfokīnu, citokīnu un fermentu savstarpējā mijiedarbība.

Izmēģinājuma projektā paredzēts izmantot 230 peles četros gados.

Dzīvnieki eksperimentā tiks izmantoti apmēram 2 mēnešus. Ierosinot infekciju pelēm ar borēlijas baktērijām, tiks izraisīta artrīta rašanās dzīvnieku kāju (*Tibiotarsal joint*) locītavās. Tomēr nav paredzēts, ka artrīts radīs smagas ciešanas dzīvniekiem, jo infekcija ilgs maksimāli 21 dienu. Pie tam jāņem vērā, ka visām dzīvnieku grupām (izņemot kontroles grupu) tiks veikta vakcinācija ar jaunajiem vakcīnu kandidātiem, kas, paredzams, ievērojami palēninās artrīta veidošanos vai arī novērsīs slimības attīstību

pilnībā. Eksperimentālie dzīvnieki tiks rūpīgi kontrolēti vizuāli tos novērojot, iespējamu sāpju dēļ. Ja tomēr tiks novērots, ka dzīvniekam ir lielākas ciešanas, kā plānots (apātija, svara zudums, nekustīgums, nedabiska ķermeņa poza, svara kritums 10-20% no sākuma svara 24-72h laikā, pakaļkāju locītavu platums palielināts vairāk par 1mm, kas tiks noteikts izmērot locītavas ar digitālo elektronisko bīdmēru), dzīvnieks nekavējoties tiks humāni nogalināts, izmantojot cervikālo dislokāciju.

Eksperimenta laikā tiks veikta 3D attēla iegūšana izmantojot "IVIS Spektrum *In vivo* Imaging System" aparatūru, lai iegūtu pierādījumus *B.burgdorferi* precīzai lokalizācijas un koncentrācijas noteikšanai *In vivo*. 3D attēla iegūšana tiks veikta, izmantojot 2.5% izoflurāna anestēziju. Tā nodrošinās dziļu un efektīvu dzīvnieka iemigšanu procedūras laikā. Asins paraugi tiks ņemti no peles astes vai kājas (*Lateral Saphenous Vein*) vēnas, ne vairāk kā 5-10% no peles kopējā asins cirkulācijas tilpuma, ar intervālu ne mazāku kā 7 dienas. Tiks ievērota stingra kontrole pār dzīvnieku veselību, vizuāli tos novērojot katru eksperimenta dienu vai pat divas reizes dienā. Eksperimentam beidzoties tiks iegūti dzīvnieku orgānu, audu un šūnu paraugi imunoloģisku testu veikšanai.

Procedūru dublēšanās nav iespējama, jo visi pētāmie un pārbaudāmie vakcīnu kandidāti ir absolūti jauni ar inovatīvām gēnu inženierijas metodēm izstrādāti vakcīnu modeļi, kuru analogi nav sastopami nekur citur pasaulē. Lai izvairītos no procedūru dublēšanās, pirms projekta izstrādes ir veikta rūpīga zinātniskās literatūras analīze, apzinot literatūras datu bāzes *Scopus*, *PubMed*, *Sciencedirect*, *GoogleScholar*, *Web of Science* un apzināti maksimāli iespējamie *in vivo* un *in vitro* attiecīgo pētījumu rezultāti, lai nodrošinātu, ka šāda veida eksperimenti vēl nav veikti, taču ir nozīmīgi un varētu nest pienesumu jaunu pret-Laimas slimības vakcīnas izstrādē.

Izmēģinājuma projekta rezultāti dos lielu ieguldījumu jaunu un perspektīvu vakcīnu attīstībai pret tādu infekcijas slimību kā boreliozes jeb Laimas slimība. Tās izplatība gan Eiropā, gan Latvijā joprojām ir ļoti augsta, un līdz ar siltā klimata pastiprināšanos, turpina palielināties, taču efektīvas preventīvas zāles t.i. vakcīnas šīs infekcijas savlaicīgai novēršanai vēl joprojām nav atrastas. Rezultāti apstiprinās jauno perspektīvo vakcīnu kandidātu lietderību to iespējamai tālākai virzībai zinātniskajā pētniecībā un padziļinātiem pētījumiem klīnikā.