

КОНЬЮГИРЛАНГАН АНТИГЕНЛАРНИ ОЛИШДА КСЕНОБИОТИКЛАРДАН Фойдаланиш

Г.А. ДУШАНОВА, К.А. РУЗИЕВ

Самарқанд Давлат Университети, Ўзбекистон Республикаси, Самарқанд

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНЬЮГИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ

Г.А. ДУШАНОВА, К.А. РУЗИЕВ

Самаркандский Государственный Университет, Республика Узбекистан, г. Самарканд

USING XENOBIOTICS FOR CREATE CONJUGATED ANTIGENS

G.A. DUSHANOVA, Q.A. RUZIYEV

Samarkand State University, Republic of Uzbekistan, Samarkand

Конъюгирланган антигенларни яратиш учун тадқиқот ишида ксенобиотик – моноаммоний фосфат сақловчи азот ва фосфор ишлатилди. Тадқиқот натижасига кўра, ксенобиотикнинг оқсил қисми билан қўшилиши ксенобиотикнинг $-NH_2$ гуруҳлар- NH_4 -гуруҳлари ҳисобига вужудга келади.

Калим сўзлар: конъюгираш, антиген, моноаммоний фосфат, ксенобиотик, аммофос, иммуноглобулин G, моноклонал антитаналар.

To create conjugated antigens in research were used nitrogen and phosphorus containing xenobiotics-monoammonium phosphate. The results showed that cross-linking with the xenobiotic protein part is due to the group $-NH_2$, $-NH_4$ - group of xenobiotics.

Key words: conjugated, antigen, monoammonium phosphate, xenobiotic, ammophos, immunoglobulin G, monoclonal antibodies.

Маълумки, моноклонал антитаналар услуги иммун реакциялар ташхисида, хужайравий иммун тизимини аниқлашда, хусусийлиги ва таъсирчанлиги билан ажралиб туради [2]. Шу нуктаи назардан тиббиётда иммунология соҳасида кўпгина хужайралар популяциясини аниқлашда кенг қўлланилади. Ҳозирги кунда моноклонал антитаналар олиш учун бирон аниқ хужайралар популяциясига нисбатан махсус гибридома технологиялари ишлаб чиқилган ва хужайралар дифференциациясига қараб –Т ва –В хужайраларни аниқлашда гибридома хужайраларининг клонлари – махсус моноклонал антитаналар ишлатилади [1,6].

Қишлоқ хўжалигида охириги йилларда кўпгина ксенобиотиклар турлари қўлланилади. Ўтган асрда пахта плантацияларида улар миқдори бир хил туманларда чегарадан ортиқ нормада ишлатилган ва ҳозирда ҳам кўпгина ксенобиотиклар турлари қишлоқ хўжалиги экинлари турларига нисбатан ишлатилмоқда ва тирик организмларда иммун тизим функциясига нисбатан таъсири маълумдир [5,7].

Шу жиҳатдан ксенобиотикларни тирик организмлар иммун тизимига таъсирини тадқиқот қилиш долзарб муаммолардан бири ҳисобланади [4].

Ксенобиотикларга нисбатан иммун тизим хужайраларининг –В хужайраларининг жавоб реакциясини тадқиқот қилиш мақсадида

конъюгирланган (ксенобиотик аммофос + IgG) антигенлардан ҳосил қилишни мақсад қилиб қўйдиқ.

Материал ва услубий қисм: Тадқиқот ишларида асосан азот ва фосфор тутувчи органик ксенобиотиклардан, яъни аммофос- $NH_4H_2PO_4$ (80% гача), $(NH_4)_2HPO_4$ (5%) - $(NH_4)_2SO_4$, аралашмаларидан, фосфатлардан ва Fe, Al таркибий бирикмаларидан фойдаландик.

Ушбу аммофос таркибига оқсил, яъни IgG ни бириктириш қуйидаги босқичларда олиб борилди.

1. Юқори миқдордаги Ig G ни олиш услуги: Бошқа иммуноглобулинлар синфига нисбатан Ig G ни тоза ҳолда ажратиб олиш осондир. IgG ни аммоний сульфат эритмаси билан чўктириб, анионалмашинувчи хроматография қилинади, масалан ДЭАЭ-целлюлоза ёки ДЭАЭ-сефадексларда. Ажратиб олинувчи материал сифатида қон зардоб ишлатилади. IgG иммуноглобулинлар гетероген эритмасидан иборат бўлиб, таснифлари жиҳатидан ҳам бири-бирига ўхшаш бўлади. Бу иммуноглобулинларни анион алмашинувчиларда ажратиш мумкин бўлади, элюент ион кучини ўзгартириш ёрдамида.

1.1. Аммоний сульфат ёрдамида чўктириш: 100 мл қорамол қон зардобига 50 мл тўйинган аммоний сульфат эритмаси солинади. Чўкма центрифуга қилиш ёрдамида олиб ташланади. 50 мл дистилланган сув қўшилади ва

25 мл туйинган аммоний сульфат қўшилиб, яна чўкма ҳосил қилинади. Чўктириш худди шундай 4-5 маротаба қайтарилади. Олинган эритма филтр қилинади. Кейинчалик олинган эритма диализ қилинади. Бир хил ҳолларда диализ 40% тузни ишлатган ҳолда қўлланилади, чунки эритма чиқиши тезлашади, лекин оксил тозалик даражасига таъсир қилади.

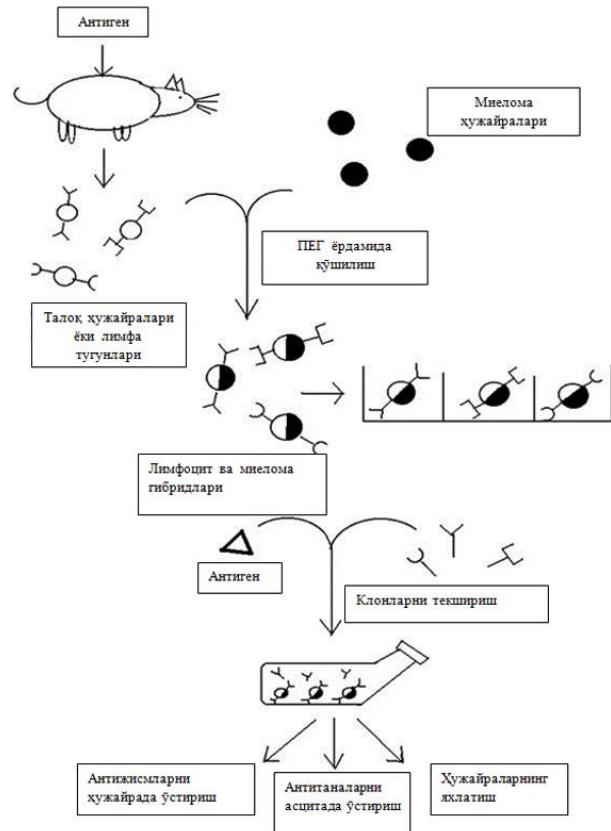
2. Конъюгирланган антигенларни олиш технологияси: Гаптен (ксенобиотик-аммофос) + оксил IgG конъюгатлари гаптенга нисбатан антитаналарни олишда қўлланилади, яъни ксенобиотикга нисбатан. Бугунги кунда гаптенга нисбатан оксил-ташувчининг бириктирилишининг бир қанча услублари мавжуддир. Бундай мақсадларда кўпинча ароматик бирикмалардан диазот бирикмалар маҳсулотлари ишлатилади. Масалан, оксил таркибидаги 2,4 –динитрофенилли ёки 2,4,6-динитрофенилли гуруҳлар сульфонатлар ёрдамида ҳосил қилиниши мумкин. Шу нуқтаи назардан ксенобиотик-конъюгатларини ҳосил қилишда, бифункционал реагентлар қўлланилади, масалан карбодиимидлар ёки диизоцианитлар пептидларни ва нуклеотидларнинг оксил билан бирикмасини ҳосил қилади. Диизоцианитлар эркин аминогруппалар билан реакцияга киришиш қобилиятига эгадир. Шу нуқтаи назардан толуол 2,4-диизоцианит кўп ишлатилади, изоцианит гуруҳлари турли хил реакцион қобилиятга эгадир. Толуол 2,4-диизоцианит рекцияси икки босқичда ўтказилади: биринчи босқичда диизоцианит пептидга ўланади, кейин эса ҳосил бўлган ортикча лиганд олиб ташланади ва пептид-оксилга ўланилади. Нишонланган антитаналар антигенларни аниқлашда, цитокимёвий таҳлилда ишлатилади. Фермент билан нишонланган антитаналар эса, иммунофермент таҳлилда қўлланилади.

2.1. Аммофос-оксил конъюгатларини ҳосил қилиш технологияси: Ушбу лаборатория таҳлили учун қорамол глобулини ёки IgG, моноаммонийфосфат, динитрофенол, калий карбонат, хроматография қоғозлари керак бўлади.

50 мл дистилланган сувга 1,0 г IgG ва 1,0 г калий карбонат солинади. Кейинчалик 1,0 г аммофос қўшилади. Инкубация 37 ҳароратда эритма доимий аралаштириб турган ҳолда ўтказилади. 24 соат давомида 25 ҳароратда инкубация ўтказилганда, 50-60 функционал гуруҳ битта иммуноглобулин молекуласига қўшилгани аниқланган.

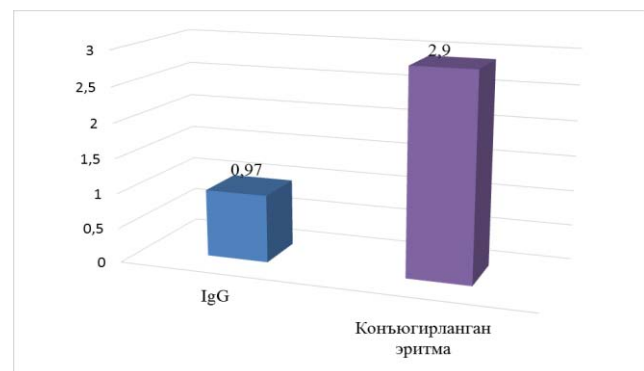
Ҳосил бўлган конъюгат СФ (Mindray) да текширилиб кўрган назорат варианты сифатида тоза иммуноглобулин эритмаси келтирилган.

Тадқиқот натижалари: Эритмалар СФ-Mindray да тадқиқот қилинганда, назорат варианты ва конъюгирланган эритмалар 630 нм тўлқин узунлигида қуйидаги натижаларга эга бўлган. Олинган тадқиқотлар натижалари 1-расмда келтирилган.



1-расм. Моноклонал антитаналар олишнинг умумий схемаси.

Ҳосил бўлган конъюгат 630 нм тўлқин узунлигида юқори кўрсаткичларга эга бўлган (2-расм). Конъюгирланган эритмалардан лаборатория сичқонларига иммунизация ўтказилди. Бунинг учун бир вақтнинг ўзиде 3 та лаборатория сичқони қўлланилади. 0,1-0,9 мг конъюгирланган антигенлар.



2-расм. Конъюгирланиш даражаси

Конъюгат таъсирида В-лимфоцитлар фаоллашиш даражаси

Иммунизация кунлари	1 кун 0,1 мг	4 ҳафтадан сўнг 0,5 мг	8 ҳафтадан сўнг 0,5 мг
В- Лимфоцитлар % миқдори	14,3±0,4	18,8±0,1*	16,7±0,3
IgG, mg/g	120,1±0,2	148,1±13,4	138,3±10,8

* $p \geq 0,005$, 1 вариантга нисбатан ишончлилиқ даражаси

Иммунологик кўрсаткичлардан ҳужайравий кўрсаткич, В-Лимфоцитлар % миқдори ЕАС-РОК (Jondal) услубида аниқланди. Иммуноглобулинлар миқдори Манчини иммунодиффузия услубида аниқланган.

Иммунизация ўтказиш шароитлари: биринчи иммунизацияни 0,1 мг конъюгирланган антиген билан ўтказилади. Инъекция тери остига юборилади. Кейинги иммунизация 4 ҳафтадан сўнг 0,5мг конъюгирланган антиген ёрдамида ўтказилди. Учинчи босқич 8 ҳафтада ўтказилди.

Жадвалда келтирилган маълумотларга асосан, иммунизация 4 ҳафтасида В-лимфоцитлар ва миқдори энг юқори кўрсаткичга эга бўлган, яъни генетик детерминирланган иммун жавоб реакцияси кузатилган.

Адабиётлар:

1. Будчанов Ю.И. Моноклональные антитела. Тверь.-2012-22 с.
2. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. «Научные основы экибиотехнологии» Москва «Мир» 2006
3. Wang J., Urban L, Bojanic D. Maximising use of in vitro ADMET tools topredict in vivo bioavailability and safety. // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. - 2007. - V.3 № 5. - P.641 - 665.
4. Chohan K.K., Paine S.W., Waters N.J. Quantitative structure activityrelationships in drug metabolism. // Current topics in medicinal chemistry. - 2006. V.6№ 15,-P.1569-1578.
5. Mie Y., Suzuki M., Komatsu Y.. //

Electrochemically driven drugmetabolism by membranes containing human cytochrome P450. - 2009. - V.131 № 19. -P.6646-6647.

6. Schuster D., Steindl T.M., Langer T. Predicting drug metabolism induction insilico. // Current topics in medicinal chemistry. - 2006. - V.6 № 15. - P. 1627-1640.

7. Terflloth L., Bienfait B., Gasteiger J. Ligand-based models for the isoformspecificity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 substrates. // Journal of chemical information and modeling. - 2007. - V.47 № 4. - P. 1688-1701.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ

Г.А. ДУШАНОВА, К.А. РУЗИЕВ

Самаркандский Государственный Университет,
Республика Узбекистан, г. Самарканд

Для создания конъюгированных антигенов в исследовательской работе были использованы азот и фосфор содержащие ксенобиотик - моноаммоний фосфат. Результаты исследований показали, что сшивка ксенобиотика с белковой частью происходит за счет $-NH_2$ группы- NH_4 -группы ксенобиотика.

Ключевые слова: конъюгирование, антиген, моноаммоний фосфат, ксенобиотик, аммофос, иммуноглобулин G, моноклональные антитела.