

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ
БЕРУВЧИ 16.07.2013 К/В/Т. 13.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ
ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ**

ЦЕОМАШКО НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**БИОЛОГИК ФАОЛ МОДДАЛАР СКРИНИНГИ ВА МОНОКЛОНАЛ
АНТИТАНАЛАР ОЛИШ УЧУН ҲУЖАЙРА КУЛЬТУРАЛАРИДАН
(НОРМАЛ ВА ХАТАРЛИ ТРАНСФОРМАЦИЯЛАНГАН) ФОЙДАЛАНИШ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ ТОШКЕНТ–2016

Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Цеомашко Наталья Евгеньевна

Биологик фаол моддалар скрининги ва моноклонал антитаналар олиш учун хужайра культураларидан (нормал ва хатарли трансформацияланган) фойдаланиш..... 5

Цеомашко Наталья Евгеньевна

Применение культур клеток (нормальных и злокачественно трансформированных) для скрининга биологически активных веществ и получения моноклональных антител..... 33

Tseomashko Natalya Yevgenevna

Using cell cultures (normal and transformed malignantly) for screening biologically active substances and obtaining the monoclonal antibodies..... 63

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works..... 90

**УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013 К/В/Т. 13.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ

ЦЕОМАШКО НАТАЛЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**БИОЛОГИК ФАОЛ МОДДАЛАР СКРИНИНГИ ВА МОНОКЛОНАЛ
АНТИТАНАЛАР ОЛИШ УЧУН ҲУЖАЙРА КУЛЬТУРАЛАРИДАН
(НОРМАЛ ВА ХАТАРЛИ ТРАНСФОРМАЦИЯЛАНГАН)
ФОЙДАЛАНИШ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.5.В69 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган. Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифасига (<http://ss.biochem.uz>) ва “ZiyoNet” таълим ахборот тармоғида ([www. ziynet.uz](http://www.ziynet.uz)) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Азимова Шахноз Садыковна

биология фанлар доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Ахунов Али Ахунович

биология фанлар доктори, профессор

Далимова Сурайё Нугмановна

биология фанлар доктори, профессор

Саитмуратова Огилжон Худайбергеновна

биология фанлар доктори, доцент

Етакчи ташкилот: Тошкент фармацевтика институти

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ҳамда Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги 16.07.2013 К/В/8Т.13.01 рақамли Илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашнинг 2016 йил «__» _____ куни соат__ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел 262 35 40, факс (99871) 262 70 63).

Докторлик диссертацияси билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: 262 35 40, факс (99871) 262 70 63; e-mail: asrarov54@mail.ru)

Автореферат 2016 йил «__» _____ да тарқатилди.

(2016 йил _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси)

А.С. Тўраев,

Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш раиси, к.ф.д., профессор

М.И. Асраров,

Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д., проф.

Д.А. Кадирова,

Фан доктори илмий даражасини берувчи
Илмий кенгаш хузуридаги илмий семинар
раиси, б.ф.д.

КИРИШ (докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Турли ўсмаларга қарши ҳамда бошқа биологик фаолликларга эга бўлган янги бирикмаларни аниқлаш биоорганик кимё, хужайра биологияси ва фармакологиянинг долзарб муаммоларидан биридир. Республикамизнинг бир қанча илмий лабораторияларида кўп йиллар мобайнида систематик тарзда турли фаол бирикмаларини ажратиш ва синтез қилиш, ушбу бирикмаларнинг фармакологик фаоллигини аниқлаш бўйича ишлар амалга ошириб келинган ва ушбу бирикмаларнинг оз қисминигина антиаритмик, холинэстераза, эстроген ва яллиғланишга қарши биологик фаолликлари синалган бўлиб, уларнинг цитотоксик фаоллиги ҳозиргача ўрганилмаган. Кимёвий бирикмалар, доривор воситалар ва тиббиёт жиҳозларини турли хужайра культураларида *in vitro* усулларида цитотоксик фаоллигининг скрининги Халқаро GLP (Good Laboratory Practice) талабларига биноан клиниколди синовларининг таркибига киради. Моддаларнинг *in vitro* текшириш усуллари янги кимёвий бирикмаларнинг дастлабки тадқиқоти учун ҳаражатларни камайтириш ва вақтни тежаш имконини беради.

Дифференцировка, канцерогенез, хужайра ҳаракатчанлиги, пролиферация, наслий маълумотни ўтказиш, генлар экспрессиясини назорат қилиш каби муаммоларни ечишда жаҳон фанида, асосан, хужайра культураларидан фойдаланилади. Шунингдек, хужайра культураси тиббиёт ва қишлоқ хўжалигининг амалий муаммоларни ҳал қилишда катта аҳамиятга эга. Хусусан, асосий амалий вазифаларга вакциналар ва физиологик фаол бирикмаларни саноат миқёсида ишлаб чиқариш, гибридому технологиялари ёрдамида моноклонал антитаналарни олиш, оғир хасталикларни генотерапия ва хужайра терапияси ёрдамида даволаш кабилар киради.

Юқорида айтиб ўтилган фикрларга боғлиқ равишда, нормал хужайраларга нисбатан паст захарлиликка эга ва ўсма хужайралари ўсишини ингибирловчи бирикмаларни ҳамда регенератив тиббиёт учун ўсма хужайраларини эмас, балки нормал хужайралар пролиферациясини келтириб

чиқарувчи моддаларни аниқлаш, эритропоэтинга моноклонал антитаналарни ҳосил қилувчи гибридомаларни олиш долзарб саналади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ–1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги ва Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2012 йил 29 мартдаги 91-сон «Тиббиёт муассасаларининг моддий-техника базасини янада мустаҳкамлаш ва фаолиятини ташкил этишни такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва

5

технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи. Ўсма хужайраларини ҳар бир типи учун юқори фаолликка бўлган бирикмаларни аниқлашга ва цитотоксиклигини скрининг қилишга йўналтирилган, шунингдек, захарлиликнинг специфик турларини кенг ассортиментини тадқиқ қилиш, кимёвий бирикмалар ва дори воситаларини клиниколди синовларини *in vitro* усуллари бўйича илмий изланишлар, жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан, Саломатлик Миллий институти (Мэриленд, АҚШ), Ўсма Миллий институти (Роквилле, АҚШ), Патология институти (Сиэтл, АҚШ), Рокфеллер университети (АҚШ), ЖССТ қошидаги ўсмаларни ўрганиш маркази (Брюссель, Бельгия), Цитология институти (Санкт-Петербург, Россия), Биоорганик кимё институти (Ўзбекистон); EURL ECVAM ва ЕРАА (Европа), – JaCVAM (Япония), KoCVAM (Корея), Health Canada (Канада), ICATM (АҚШ), Vitroscreen (Италия) олиб борилмоқда.

Турли хужайра культураларида ўсма хужайраларига танлаб таъсир қилувчи моддаларни *in vitro* усулида аниқлаш бўйича жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: ўсма хужайраларига танлаб таъсир қилувчи, асосан, ўсма хужайраларда мутант оксилларни инактивациясини чакирувчи янги воситалар – винтафолид (Merk&Co, АҚШ), эрлотиниб (Roche, Швейцария), афатиниб (Boehringer ingelheim pharm. Inc., АҚШ), кризотиниб (Pfizer Inc., АҚШ) ва церитиниб (Novartis, АҚШ) каби доривор воситалар ишлаб чиқилган, бевацизунаб (Pfizer Inc., АҚШ) ангиогенезни ингибирлаган; турли антигенларга, шу жумладан, эритропоэтинга ҳам моноклонал антитаналар олинган («Roche», Швейцария, «Протеиновый контур», Россия).

Дунёда *in vitro* усулида кимёвий бирикмалар ва доривор воситаларнинг скринингини ўтказиш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор

йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: онкологияда қўллаш учун ўсма хужайраларини ўсишини тўхтатувчи, танлаб таъсир этувчи моддаларни аниқлаш; регенератив тиббиёт учун нормал хужайралар ўсиши селектив пролифераторларини аниқлаш; цитотоксикликни умумий ва специфик турларини белгилаш; хужайра даражасида бирикмаларнинг таъсир механизмларини исботлаш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. *In vitro* усулларини қўллаб ўсма хужайраларини ингибирловчи бирикмаларни аниқлаш ишлари ўтган асрнинг 70-йиллари охирида R.I.Freshney, T.Mosmann, K.Taylor, G.Taju каби олимлар томонидан ўрганилган. Регенератив тиббиётда хужайра культураларидан фойдаланишни эса улардан олдин P.B.Medawar, J.Rheinwald, H.Green ва бошқалар йўлга қўйган, гибридома технологиялар ривожланиши бўлса 80-йилларда Kohler ва Milstein бошланган. Ҳозирги кунда ушбу йўналишлар жадал ривожланмоқда, масалан, автоматлаштирилган лабораторияларда янги бирикмалар скрининги (Рокфеллерлар университети ва Саломатлик Миллий институти) 96

6

катакчали планшетларда эмас, балки 384, 1536 ёки 3456 катакчали планшетларда HTS (high-throughput screening) деб номланувчи усулда амалга оширилиб, бутун дунёдан олинган бирикмалар ўрганилмоқда (J.Agrestita, X.Zhang, A.Florian).

МДХ давлатларида одам ва ҳайвон хужайра культураларидаги бирикмаларни скрининг қилишда М.Ю.Еропкин, Г.Георгиев, Н.Р.Тафришьян, А.А.Алексеев, В.И.Шумаков, Е.В.Парфенова каби олимлар ютуқларга эришган.

Ўзбекистонда ҳам хужайра культурасидан фойдаланиш ўтган асрнинг охириларида бошланган. Ўша даврнинг 70–80 йилларида Абдукаримов А.А., А.А.Арипджанова, Т.Г.Гулямова, Ш.С.Азимова, О.Петрова, С.Е.Мучник ва бошқаларнинг изланишлари одам эмбрионининг нормал хужайралари ва HeLa хужайраларининг рецептор тизимини ўрганишга бағишланган эди. Ўсимлик моддалари кимёси институтида А.Х.Юлдашев томонидан илк марта ўсмага қарши фаолликка эга винкрестин ва винбластин моддалари ажратиб олинган бўлиб, уларнинг ўсма хужайралари ўсишини ингибирловчи хоссаси бу институтда эмас, балки Венгрияда аниқланди. 2002–2003 йиллардаёқ молекуляр генетика лабораториясида проф. Ш.С.Азимова бошчилигида В гепатитининг сиртки антигенларига моноклонал антитана ҳосил қилувчи гибрид хужайралар олинди. 2005 йилда Биоорганик кимё институтида Н.Н.Кузнецова томонидан сичқонлар меланомаси хужайраларининг янги линияси олиниб, патентланган. Шу йилда Ўсимлик моддалари кимёси институтининг молекуляр генетика лабораториясига верификацияланган ўсма хужайралари (Hela, Hep–2 ва HBL–100) линияси келтирилган. Ҳозирги вақтда молекуляр генетика лабораториясининг хужайра культуралари коллекциялари доимий тарзда хужайраларнинг янги линиялари билан тўлдирилиб келинмоқда ва хужайра культуралари бўйича систематик

тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўсимлик моддалари кимёси институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг № А-10-144 «Одам эритропоэтинига қарши моноклонал антитаналар олиш» (2006–2008), № ФА-Ф3-Т041 «Ген-хужайра биологияси усуллари ёрдамида биологик фаол бирикмаларни олиш ва фармако токсикологик хусусиятларини ўрганиш» (2007–2011) ва № ФА-Ф6-Т198, «Биологик фаол моддаларни хужайра метаболизмига таъсирини ўрганиш» (2012–2016) мавзусидаги фундаментал ва амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади нормал хужайраларга кам захарли бўлиб, ўсма хужайралари ўсишини ингибирлайдиган, ўсма хужайраларига таъсир қилмаган ҳолда нормал хужайралар ўсишини тезлатадиган цитотоксик бирикмаларни аниқлаш ҳамда рекомбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналарни синтез қилувчи гибрид хужайраларни (гибридомалар) олишдан иборат.

7

Тадқиқотнинг вазифалари.

Ўсма хужайраларини ингибиторларини аниқлаш бўйича:

экстрактлар ва индивидуал бирикмаларни хатарли трансформацияланган хужайраларнинг (Hela – бачадон бўйни ўсмаси, Нер-2 – ҳикилдоқ ўсмаси ва HBL-100 – сут безлари ўсмаси) хужайра моделларида таъсирини аниқлаш;

бирикмалар скрининги учун одам фибробластлари ва каламуш гепатоцитлари нормал хужайралари культураларини олиш; нормал хужайраларнинг (фибробластлар ва гепатоцитлар) хужайра моделларида экстрактлар ва индивидуал бирикмалар таъсирини ўрганиш. Регенератив тиббиёт учун нормал хужайралар пролифераторларини аниқлаш бўйича:

фибробластлар ва кератиноцитларнинг хужайра культураларини ажратиб, улар асосида тўқима-муҳандислик конструкцияларини яратиш; одам ва қуён фибробластларнинг хужайра культураларига флавоноидлар ва фитостероидларнинг таъсирини аниқлаш; аниқланган хужайралар пролифераторлар ва тўқима-муҳандислик конструкцияларини *in vivo* шароитларида куйган яраларнинг битиш жараёнига таъсирини аниқлаш.

Эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар (МКАТ-ЭПО) ҳосил қилувчи гибрид хужайраларни олиш бўйича:

BALB/с линияси сичқонларини рекомбинант эритропоэтин билан иммунизация қилиш схемасини ишлаб чиқиш;

сичқон миеломаси Х63Ag8,653 хужайраларини рекомбинант эритропоэтин билан иммунизацияланган BALB/с линия сичқонларнинг спленоцитлари билан туташтириш;

МКАТ-ЭПО гибридом-продуцентларининг селекцияси, скрининги ва

уларни клонлаштириш;

рекомбинант эритропоэтинга моноклонал антитаналарни препаратив миқдорда олиш учун истиқболли клонларни танлаб олиш ва тавсифлаш, асцит ажратиб олиш;

рекомбинант эритропоэтинга моноклонал антитаналарни олиш ва тозалаш;

МКАТ-ЭПОдан фойдаланган ҳолда аффинли хроматография услуги билан плацентар қондан табиий эритропоэтинни ажратиб олиш ва тозалаш.

Тадқиқот объекти сифатида фибробластлар, кератиноцитлар ва гепатоцитларининг ҳужайра культуралари, Hela – бачадон бўйни ўсма ҳужайралар, Нер–2 – ҳиқилдоқ ўсмаси ва HBL–100 – сут беzi ўсмасининг ҳужайра культуралари, терининг дермал эквиваленти, экстрактлари, табиий ва индивидуал бирикмалар (тропан қатор алкалоидлари, фенил- ва феноксисирка кислоталари, фенилгидразин ва норфлуорокурарин ҳосилалари, фитостероидлар, флавоноидлар), IIIA даражадаги термик куйишли экспериментал ҳайвонлар, BALB/с линия сичқонлар, сичқон миеломаси X63Ag8.653 ҳужайралари танланган.

8

Тадқиқот предмети - цитотоксик, пролифератив ва метаболик фаолликлари, куйган яралар регенерацияси, гибрид ҳужайралар эритропоэтинга моноклонал антитаналар ҳосил қилиш қобиляти ва олинган моноклонал антитаналарни имуносорбент сифатида қўллаш имкониятлари.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотда биоорганик кимё (оксилни бўлиш, миқдори ва сифатини аниқлаш, спектрофотометрик, электрофорез усуллари), ҳужайра биологияси ва инженерияси (бирламчи ҳужайра культуралари ва гибридом олиш услублари), биокимё услублари (колориметрик услублар – МТТ, нейтрал-кизил, ЛДГ-тест), имунокимёвий (Уохтерлони, ИФА) услублардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

бир қатор биологик фаол бирикмалар ва экстрактларнинг янги фармакологик фаолликлари аниқланган;

Convolvulus туркум ўсимликлари, *Vinca major* ва *Arundo donax* ўсимликларидан ҳамда *Vinca* туркуми ўсимликларида паразит яшовчи эндофит-замбуруғлардан олинган экстрактлар ўсма ҳужайраларининг селектив цитотоксик фаолликка эгаллиги исботланган;

Convolvulus туркум ўсимликларидан олинадиган конвольвин алкалоидининг ҳосиласи ҳиқилдоқ ўсмаси ҳужайралари ўсишини ингибирлаб, айна вақтда бачадон ва сут безлари ўсма ҳужайралари ўсишини ингибирламайдиган ҳамда нормал ҳужайраларга қарши паст цитотоксиклик намоён қилувчи, танлаб таъсир қилувчи бирикма – N-бензил конвольвин аниқланган;

ўсма ҳужайралари ўсишини селектив ингибирлайдиган бирикмалар – n-Cl-ацетилфенилсирка кислота, n-Cl-феноксисирка кислота ва фенилгидразон

норфлуорокурарин йодметилати аниқланган;

хлорсакловчи алкалоидлар, хусусан, конвольвин ва винканин ҳосилаларининг танламай таъсир қилувчи юқори цитотоксик фаоллигининг Цисплатин препаратига тенг даражада таъсир қилиши аниқланган;

мезенхимал хужайралар культураларини олиш услуби ишлаб чиқилган; экдистерон фитоэкдистероиди тери хужайралари – фибробластлар ва кератиноцитлар пролиферациясини ошириши ҳамда ҳиқилдоқ, сут безлари ва бачадон ўсма хужайраларининг пролиферациясини чақирмаслиги аниқлаган; экдистерон аллофибробластлар билан биргаликда аутоэпидермоцитлар пролиферацияси ва тўқима эпителизациясининг ортишига олиб келиши исботланган, бу эса куйган яраларни даволашда уларни қўллаш мумкинлиги кўрсатади;

рекомбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар ҳосил қилувчи гибридома-продуцентлар олинган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси қуйидагилардан иборат: мезенхимал хужайралар культурасини олишнинг оптимал усуллари ишлаб чиқилган;

экстрактлар ва индивидуал бирикмалар скрининги олиб борилиб, улар орасидан ўсма хужайралари учун селектив ингибиторлар ва тери хужайралари пролифераторлари аниқланган;

9

бирикмаларнинг биологик фаоллиги ва заҳарлилик дозалари аниқланган;

ША даражали куйишларни даволаш учун самарали усул ишлаб чиқилган;

эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар ҳосил қилувчи гибридом-продуцентлар олинган;

эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар асосида табиий ва рекомбинант эритропоэтин олинган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги ишда қўлланган замонавий аналитик ва статистик усуллар, олинган натижаларни мутахассислар томонидан тасдиқланганлиги ва тадқиқот ишлари натижаларини амалда қўлланилиши ҳамда олинган натижаларни республика ва халқаро илмий конференцияларда муҳокама қилиниши, рецензия қилинувчи илмий нашрларда чоп этилиши ва олинган патентлар билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижалари, шубҳасиз, фундаментал ва амалий аҳамиятга эга, чунки кўплаб экстракт ва индивидуал бирикмалар орасидан танлаб олинган хужайралар ўсишининг фаол ингибиторлари ҳамда пролифераторлари ушбу йўналишларда уларнинг таъсир механизмлари борасида чуқур изланишлар истиқболини очади.

Халқаро талабларга жавоб берувчи (*GLP*) биологик фаол моддаларни, доривор воситаларининг клиниколди скрининги *in vitro* усуллари йўлга қўйилган бўлиб, улар ёрдамида тез ва кам харажат билан янги бирикмалар ва препаратларнинг цитотоксиклиги аниқланади. Ушбу усуллар билан аниқланган

паст цитотоксикликка эга ҳамда ўсма хужайраларини ингибирловчи экстрактлар ва индивидуал бирикмалар ўсмаларга қарши воситалар сифатида *in vivo* синовлари учун таклиф қилинган. Ишлаб чиқилган тери хужайраларининг культураларини олиш усули ва тўқима-муҳандислик конструкциясини куйган яралар терапиясида қўллаш эпителизациясини сезиларли тезлаштиради.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Биологик фаол бирикмаларнинг цитотоксиклигини аниқлаш учун ўтказилган скрининг ва моноклонал антитаналар олиниши бўйича олинган илмий натижалар асосида:

гибрид хужайраларининг истиқболли иккита субклони ажратиб олинган ва унга Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтиро патенти олинган (№ IAP 02943, 16.12.2002). Илмий-тадқиқот натижасида реокмбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар олинган;

N-бензил конвольвин алкалоидининг янги биологик хоссаси аниқланган ва ихтирога патент билан ҳимоя қилинган (№ IAP 04965, 16.02.2012). Илмий тадқиқот натижасида ушбу бирикма нормал хужайраларга цитотоксик таъсир қилмаганлиги сабабли ҳақиқат ўсма хужайралари ўсишининг селектив ингибитори сифатида тавсия қилинган.

«Ўзстандарт» агентлигидан давлатлараро стандартга мувофиқ келувчи тиббиёт жиҳозлари ва доривор воситаларнинг цитотоксиклигини аниқлаш

10

мақсадида Синов марказидан аккредитация гувоҳномаси (№UZ.AMT.07.MAI.220) олинган.

«Доривор воситалар, тиббий жиҳозлар, косметик воситалар, кимёвий бирикмалар, пестицидлар ва ветеринария воситалари цитотоксиклигини баҳолаш» услубий кўрсатмаси тасдиқланган (ЎЗР ССВ Фан ва ўқув юртлари бош бошқармаси, № 8Н-Р/18, 02.03.2016 й.).

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 10 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, Ёш олимлар конференцияларида (Тошкент, 2004, 2009, 2010, 2011, 2012) каби республика, Халқаро биотехнология съездида (Пушино, РФ, 2006), 7- ва 10- Chem. of Natur. Comp. (Тошкент, 2007, 2013), 3- Ed. Plant Res and the Bioact. Ingrid. (Хитой, 2012), 11- Ed. Plant Res. and the Bioact. Ing. (Туркия, 2015) сингари халқаро илмий амалий конференцияларда маъруза кўринишида баён этилган ҳамда апробациядан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 28 та илмий иш чоп этилган, улардан 2 та ихтиро патенти, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 14 та мақола, жумладан, 11 та маҳаллий ва 3 та Халқаро журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Тиббиёт, биология ва кимё фанларининг илмий ва амалий вазифаларини ечишда хужайра культураларини қўллашнинг замонавий масалалари**» деб номланган биринчи бобида хужайра культураси, уларни ўстириш ва қўллаш усулари, ўсимлик экстрактлари ва индивидуал бирикмаларни хужайраларнинг турли культураларидаги цитотоксик фаолликлари, хужайра ўсиши пролифераторлари ва ингибиторларини аниқлаш усуллари ва замонавий ўсмаларга қарши препаратлар ҳақида умумий маълумотлар берилган. Бундан ташқари, регенератив тиббиётда хужайра культурасидан фойдаланиш бўйича тадқиқотлар ва маълумотлар келтирилган. Айрим бўлинмалар гибридома технологиялари ҳамда эритропозетин гормони асосидаги препаратларга

бағишланган.

Диссертациянинг **“Ишда қўлланилган материаллар, шароитлар ва биоорганик кимё, биотехнология ва ҳужайра биологиясининг усуллари»** деб номланган иккинчи бобида тадқиқот изланишлари бажарилишида фойдаланилган материаллар ва усуллар, хусусан, биоорганик кимё (оксилни микдорий ва сифат аниқлаш учун гелъфилтрация, иммуналмашинув ва аффин хроматография, спектрофотометрия, электрофорез ва бошқа усуллари), ҳужайра биологияси ва инженерияси (бирламчи ҳужайра культураларини, гибридом ва тўқима-муҳандислик конструкцияларини олиш услублари), биокимёвий (колориметрик услублар – МТТ, нейтрал-кизил, ЛДГ-тест), иммунокимёвий (Уохтерлони, ИФА) услублардан фойдаланилган.

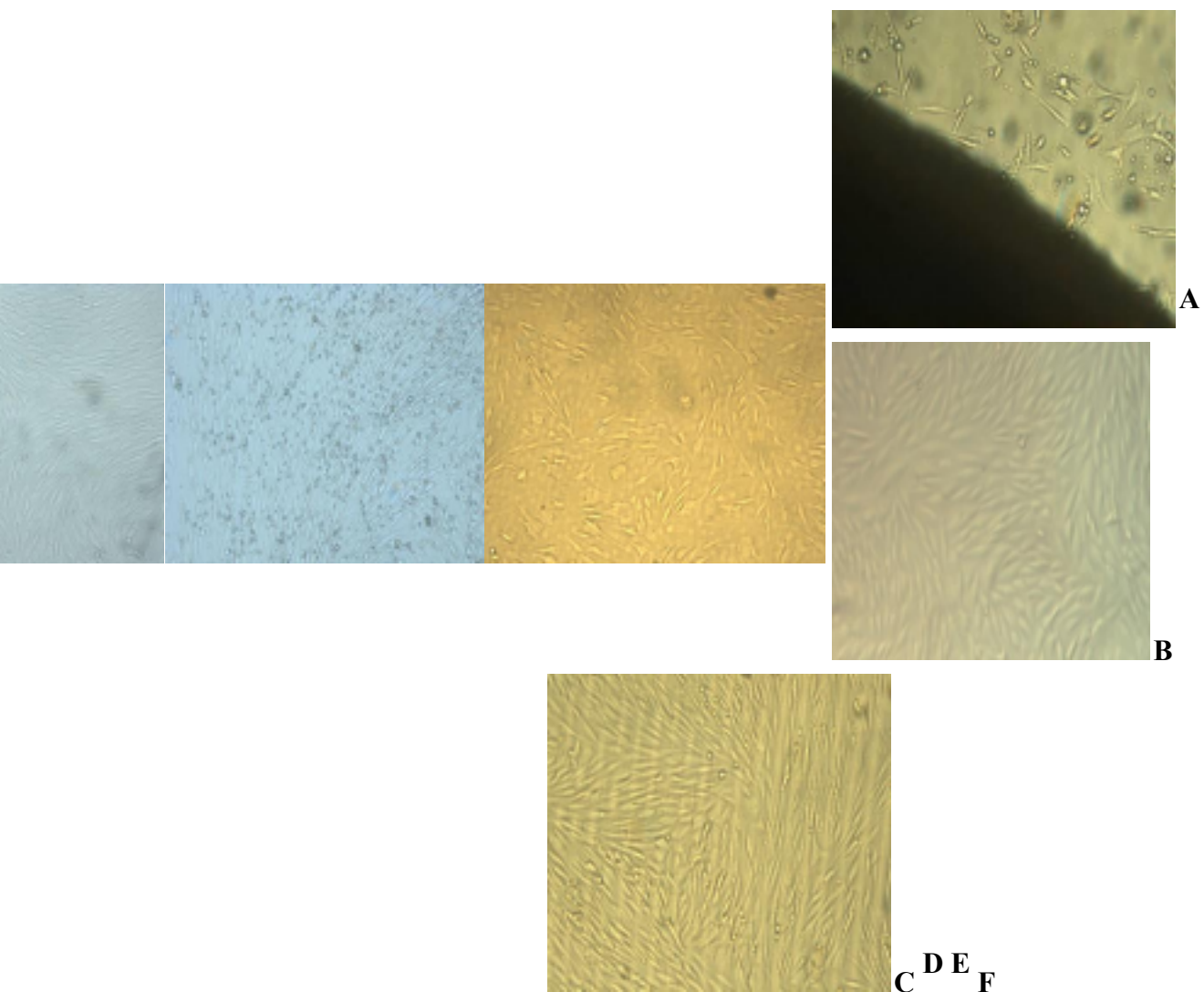
Диссертациянинг **«Экстрактлар ва индивидуал бирикмаларнинг цитотоксик ва пролифератив фаолликларини аниқлаш»** деб номланган учинчи бобида нормал ва хатарли трансформацияланган ҳужайралар культураларини ўстириш ва олиш натижалари ҳамда мазкур культураларда экстрактлар, индивидуал бирикмаларни цитотоксик ва пролифератив фаолликларини скрининг қилиш натижалари, регенератив тиббиётда ҳужайра культураларидан фойдаланиш бўйича изланишлар муҳокама қилинган.

Изланишларда эксплант ноферментатив усули билан олинган фибробласт, кератиноцит ва гепатоцитлар нормал ҳужайраларининг культураларидан фойдаланилган. Бунда мазкур усул ўстириш факторларига (EGF – ўсишнинг эпидермал фактори, FGF – фибробластларнинг ўсиш фактори ва ҳк.) ва матрица оксилларига (I ва III типдаги коллагенлар,

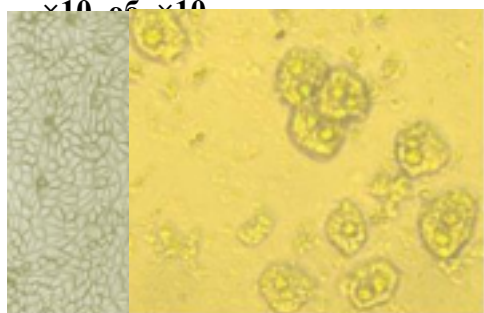
12

эластин, ва бошқ.) бой фибробластларни конфлюент культурасининг супернатанти билан кондициялаш йўли билан мақбуллаштирилди. Ҳужайра культуралари олишнинг оптималлаштирган услубимизнинг асосий ютуқлари дифференциация босқичидаги пролифератив фаол ва яшовчан ҳужайралар пули олинади ва шу билан бирга фидер қатлами ва қатор, қимматбаҳо қўшимчаларга эҳтиёж қолмайди. Ушбу услуб тежамкор ва юқори унумли бўлиб Хейфлик лимитидан йироқ, ҳужайралардан таркиб топган моноқават бир ёшли нормал ҳужайралар культураси олинади ва бу ўз ўрнида регенератив тиббиёт учун муҳим.

Шундай тарзда фибробласт ҳужайра культуралари – одам, қуён, сичқон, каламуш ва уларнинг эмбрионларининг (1-расм) ФХКлари, одам ва қуён терисининг кератиноцитларининг бирламчи культураси – КБК (2-расм), каламушларнинг гепатоцилари культураси - КГК (2-расм) олинган.



1-расм. Фибробластлар хужайралари культуралари: А – одам дермасининг экспланти, ўстиришнинг 3-суткаси; В – одам фибробластлари моноқавати, 10-сутка; С – қуён фибробластларини моноқавати, 10- сутка; D – каламуш дермаси фибробластлари, 10- сутка; E – каламуш эмбриони фибробластлари, ўстиришнинг 10-суткаси; F – сичқон фибробластлари, 10-сутка; ок. $\times 10^{-6}$ $\times 5 \times 10^{-6}$



AB

**2-расм. 20 кунлик одам КБК (А) ва 3 кунлик гепатоцитларнинг
культураси (В), ок. ×10, об. ×40.**

13

Олинган культуларларнинг морфологик тадқиқоти КБК – эпителийсимон хужайралар билан ФБК - фибробластсимон хужайраларидан иборат, гепатоцит хужайралар эса 1-2 йирик ядроли бўлиб, адабиёт маълумотларига тўлиқ мос келади. Олинган хужайра культуралари кимёвий бирикмалар, дори воситалари ва тиббиёт жиҳозларини клиник олди *in vitro* скрининги учун ҳамда косметология ва регенератив тиббиёт учун ҳам маъқул келади.

Экстрактлар ва индивидуал бирикмаларни цитотоксик, пролифератив ва бошқа фаолликларга скрининг учун РФА цитология институтининг хужайра культуралари банкidan олиб келинган Hela - бачадон бўйни ўсимтаси, HEp-2 - ҳиқилдоқ ўсимтаси ва HBL-100 - сут безлари ўсимтасининг верификацияланган линияларидан фойдаланилган. Ўсимта хужайраларидаги тадқиқотлар З.С.Хашимова, Е.О.Терентьева билан биргаликда олиб борилди.

Шу билан бирга бирикмалар скрининги хужайралар нормал культураларида ҳам олиб борилди. ФХҚдан 5-7 пассаждарда, ГБК 1 пассажда, конфлюэнтлик 80% ни ташкил этганга қўлланилди. Хужайраларнинг метаболик ҳолати скрининги қуйидаги кўрсаткичлар бўйича аниқланган: 1) митохондриял дегидрогеназаларни Мосман тест - МТТ-тестида митохондриял дегидрогеназаларнинг умумий фаоллигини пасайиши; 2) лизосомал функцияга коррекцияланувчи қизил витал бўёғи эндоцитозини камайиши - нейтрал-қизил тест; 3) хужайра мембранасини шикастланиш маркери сифатида ишлатиладиган (ЛДГ-тест) лактатдегидрогеназанинг цитозол ферменти инкубация муҳитида фаоллашиши. Цитотоксиклик фаоллигини аниқлашда солиштириш препаратлари сифатида - «Цисплатин–Тева» (Pharmachemie, B.V., Голландия) ишлатилди. Назорат сифатида ўстириш муҳитига киритилган интакт хужайралардан фойдаланилган.

ЎЗР ФА ЎМКИда *Vinca* туркум ўсимликларидан олинган экстрактлар цитотоксик таъсири скрининг қилинди. Маълумки ушбу туркум ўсимликлари таркибида винкаалкалоидлар мавжуд бўлиб улар ўсимтага қарши фаоллик намоён қилади (R.Berges, 2014, V.Rai, 2014). Мисол учун, тиббиётда қўлланилаётган «Винкрестин» ва «Винбластин» препаратлари винка алкалоидларга мансуб. Шу сабабли *V. major* ўсимлигининг ер устки қисми ва илдизининг экстрактларининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди (1-жадвал).

1-жадвал

Экстрактларнинг цитотоксик фаоллиги, хужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m$, $n = 9$)

Намуна, мкг/мл	HeLa		HEp-2		ФБК	
	100	10	100	10	100	10
<i>V. major</i> ер устки	71±2,9*	30±2,2	77±3,04*	43±2,49	40±0,5*	19±0,1
<i>V. major</i> илдизи	73±5,61*	50±4,38*	67±4,09*	5±0,05	30,4±0,1	0
Цисплатин –Тева	97,5±2,4	70±2,31*	89±0,28*	51±1,2 *	100±9,5*	72±3,1*
Назорат	0	0	0	0	0	0

Изоҳ: назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,05$; *- назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,01$

14

Ўрганилган экстрактлар орасида энг кучли цитотоксик фаолликни *Vinca major* илдизидан олинган экстракт намоён қилиши аниқланди (жадв. 1). Ушбу экстракт 10 мкг/мл концентрациясида бачадон бўйни ўсимтасини нормал хужайраларни нобуд қилмасдан ингибирлаши кейинги *in vivo* тадқиқот усуллар учун қизиқиш ўйғотмоқда.

Олинган маълумотларга асосан *Vinca* туркум ўсимликларида паразитловчи эндофит замбуруғлар экстрактларини скрининг қилишни мақсад қилдик. Шундай қилиб ЎЗР ФА Микробиология институтида (Т.Г.Гулямова раҳбарлиги остида) олинган *Vinca minor* ва *Vinca erecta* ўсимликларида паразитловчи *Solerotium sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Acremonium sp* и *Aspergillius tureus* штамм замбуруғларининг 8 хил экстрактининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди. Ушбу экстрактларда винкаалкалоидлар мавжуд бўлиб ўсимта хужайраларининг ўсишини ингибирлаши мумкин (2-жадвал).

2-жадвал

Замбуруғлар экстрактларнинг цитотоксик фаоллиги, хужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m$, $n = 9$)

Экстрактлар мкг/мл	HeLa			HEp-2			HBL-100			ПКГ	
	100	10	1	100	10	1	100	10	1	10	1
<i>Solerotium sp V. minor</i> барг	51±6,2	20,5±0,2	0±0,1*	43±1,8	30,5±0,3	21±0,6	73,5±8,8	47±1,6	29±0,9	40±4,9	12±2,0
<i>Penicillium V. minor</i> поя	24±0,4	19,5±2,1	6±0,1*	64±3,3	61±6,8	28±0,1	72±7,6	43±4,2	40±2,5	32±3,7	9±0,9

Acremonium <i>V. minor</i> барг	37,5 ±1,5	6,0 ±0,3	0	36± 1,2	5± 0,1*	3± 0,2*	53± 1,3	27± 1,0	25± 0,6	20± 3,2	8± 1,5
Alternaria <i>sp V. minor</i> барг	82± 8,6	6,5± 0,6	1± 0,1*	36± 0,9	26± 1,9	11± 0,1	91± 7,5	47± 3,8	32± 3,2	76± 9,5	54± 6,2
Aspergillus <i>tureus V. erecta</i>	51± 4,2	44± 3,6	9± 0,1*	53± 4,9	45,5 ±3,1	32± 0,9	56± 3,1	54± 3,1	49± 3,0	34± 3,1	12± 2,2
Penicillium <i>V. erecta</i> илдиз	36± 2,5	6,0± 0,1*	0	27± 0,6	20± 0,9	8±0, 1*	54± 2,4	50± 5,3	32± 1,2	29± 4,5	13± 2,9
Penicillium <i>V. erecta</i> барг	72,5 ±8,2	48± 4,6	39± 1,3	90± 9,7	39± 1,2	37,5 ±1,2	79± 9,8	53,5 ±4,7	45± 3,2	24± 3,8	16± 2,5
Alternaria <i>sp V. erecta</i> барг	54,5 ±2,5	28,5 ±2,2	13± 0,2	47,5 ±2,8	27± 0,8	13± 0,1	66± 5,2	64± 5,1	48± 2,8	50± 5,7	19± 2,7
Цисплатин Тева	99± 2,6	78± 1,9	32± 2,6	99,5 ±1,8	60± 1,6	41± 0,9	93± 4,9	76± 2,9	49± 0,3	100± 5,9	49± 3,3
Назорат	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Изоҳ: назоратдан шубҳасиз фарқи $P < 0,05$; *- назоратдан шубҳасиз фарқи $P < 0,01$; назорат сифатида интакт ҳужайралардан фойдаланилган.

2 жадвалдан кўриниб турибдики, қуйи концентрациялардаги (1-10 мкг/мл) ўсимта ҳужайлари культураларида энг юқори ингибирловчи фаолликни *Alternaria sp барг (V. erecta)*, *Penicillium sp барг (V. erecta)* *Aspergillus tureus* илдиз (*V. erecta*) ва *Penicillium sp* поя (*V. minor*) экстрактлари намоён қилди. Бу экстрактлар ўсимтага қарши препаратлар билан солиштирганда гепатоцитлар нормал ҳужайраларига қарши қуйи цитотоксик фаолликни кўрсатди. Олинган экстрактлардан танлаб таъсир қилиш хусусиятига фақат *Alternaria sp барг (V. erecta)* экстракти намоён

15

қилган. Чунки HBL-100 – сут безлари ўсимтаси ҳужайраларида культуралар ўсишини ингибирловчи хусусият юқори бўлди. *Vinca erecta* ўсимлигининг баргида паразитловчи *Alternaria sp* замбуруғ экстракти танлаб таъсир қилувчи фаолликка эгаллиги сабабли кейинги ихтисослаштирилган *in vivo* тадқиқотларга тавсия этилди.

Сўнг ЎЗР ФА ЎМКИда (С.Ф. Арипова раҳбарлиги остида) Cragg – канцеролитик ўсимликлар рўйхатига кирувчи ўсимликлар алкалоидлари йиғиндиларининг цитотоксик фаоллиги скрининг қилинди.

C. krauseanus, *Buxus sempervirens* ўсимликлари ва *Arundo donax* илдиз

алкалоидлар йиғиндисининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди (3-жадвал).

3-жадвал

Алкалоидлар йиғиндисининг цитотоксик фаоллиги, хужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m$, $n = 9$)

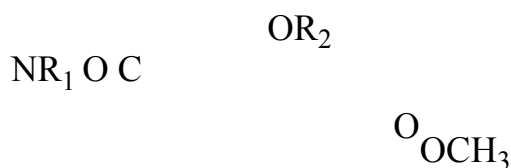
Намуна мкг/мл	HeLa		HEp-2		ФБК	
	100	10	100	10	100	10
<i>A. donax</i> илдизи АЙ	100±3,54	43±2,35*	100±6,72	55±2,53	39±1,5*	0
<i>C. krauseanus</i> АЙ	46,5±2,7	7±0,8*	60,8±3,9	43,6±0,5	100±9,3*	0
<i>B. sempervirens</i> АЙ	99,4±5,5	17±1,05*	97,8±7,7	4,2±0,03	100±11,2	36±2,4*
Цисплатин –Тева	97,5±2,4	70±2,31*	89±0,28*	51±1,2 *	100±9,5*	72±3,1*
Назорат	0	0	0	0	0	0

Изоҳ: назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,05$; *- назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,01$

Arundo donax илдизи ва *C. krauseanus* алкалоидлар йиғиндилари ўрганилган намуналар ичида юқори цитотоксик фаоллигини намоён қилиб нормал хужайраларга таъсир ўтказмай ўсимта хужайраларини ингибирлаши аниқланди. Бунда *Convolvulus* туркум ўсимликларининг АЙ 10 мкг/мл концентрациясида ҳиқилдоқ ўсимтасини 50% ингибирлаб бошқа ўрганилаётган хужайраларга таъсир ўтказмаслиги кузатилди. Шу сабабли бу алкалоидлар йиғиндиси *in vivo* тадқиқотларга тавсия қилинмоқда.

Convolvulus туркумига мансуб ўсимликлардан (*C. subhirsutus*, *C. krauseanus*, *C. pseudocanthabrica*) ЎЗР ФА ЎМКИда (С.Ф.Арипова раҳбарлиги остида) тропан алкалоидлари ажратиб олинган ва уларнинг кимёвий ҳосилалари олиниб цитотоксик фаолликлари ўрганилди.

Тўртта алкалоид: конвольвин (1), конволидин (2), конволинин (3) ва филлальбин (4) *Convolvulus* туркум ўсимликларидан ажратиб олинган. N бензил конвольвин (5) ва N-хлорацетил конвольвин (6) – конвольвинни синтетик ҳосилалари.



1. $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ 2. $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$ 3. $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, $R_2 = \text{CH}_3$ 4. $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$ 5. $R_1 = \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$, $R_2 = \text{CH}_3$ 6. $R_1 = \text{COCH}_2\text{Cl}$, $R_2 = \text{CH}_3$

Барча бирикмалар тузилиш жиҳатидан тропан скелетига эга бўлиб (8-азабициклооктан), тропин аминоспирти ва вератр кислотасининг (конвольвин, конволинин) ёки ванилин кислотасининг (конволидин) мураккаб эфирлари сифатида фақат азот атомидаги ўриндошлари билан фарқланади.

Алкалоидларнинг дастлабки скрининги турли концентрацияларда тўрт хил хужайраларда – HeLa, HEp-2, ФБК ва ГБК 100 мкг/мл концентрациясида олиб борилган (4-жадвал).

4-жадвал

Моддаларнинг 100 мкг/мл концентрациясида цитотоксик фаоллиги, хужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи, % ($M \pm m$, $n = 9$)

Моддалар	HeLa	HEp-2	ФБК	ГБК
<i>Конвольвин</i>	83,0 $\pm$ 0,12	99,1 $\pm$ 0,24	100 $\pm$ 0,17	100 $\pm$ 0,25
<i>N-бензил конвольвин</i>	90,3 $\pm$ 0,22	100 $\pm$ 0,23	100 $\pm$ 0,28	100 $\pm$ 0,71
<i>Конволинин</i>	35,0 $\pm$ 0,12	79,0 $\pm$ 0,32	65,5 $\pm$ 0,31	89 $\pm$ 4,2
<i>Конволидин</i>	27,0 $\pm$ 0,35	20,0 $\pm$ 0,12	100 $\pm$ 0,41	98 $\pm$ 2,5
<i>N-хлорацетил конвольвин</i>	100 $\pm$ 0,24	98 $\pm$ 0,11	100 $\pm$ 0,13	100 $\pm$ 2,4
<i>Филлальбин</i>	44 $\pm$ 0,15	15 $\pm$ 0,2	0	14 $\pm$ 1,2
<i>Цисплатин-Тева</i>	100 $\pm$ 0,2	100 $\pm$ 1,5	100 $\pm$ 0,5	100 $\pm$ 2,5
<i>Назорат</i>	0	0	0	0

Изоҳ: назоратдан шубҳасиз фарқи $P < 0,05$.

4 жадвалдан кўриниб турибдики, нормал ва ўсимта хужайраларига нисбатан юқори цитотоксикликни конвольвин $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$ (1) ҳамда унинг ҳосилалари: N-бензил конвольвин $R_1 = CH_2-C_6H_5$, $R_2 = CH_3$ (5), N хлорацетил конвольвин $R_1 = COCH_2Cl$, $R_2 = CH_3$ (6) намоён қилмоқда. Шу билан бирга, филлальбин (4) $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$ алкалоиди 100 мкг/мл концентрациясида кўпроқ бачадон бўйни ўсимтаси хужайралари ўсишини ингибирлаб, бошқа хужайраларга нисбатан 2-4 маротаба куйи цитотоксиклик намоён қилган. Яъни бирикмалар структурасидаги $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$ гуруҳлар ушбу бирикманинг заҳарлилигини пасайтирган.

Амалий тиббиёт учун оз ва жуда оз концентрацияларда фаол бўлган бирикмалар кўпроқ қизиқиш ўйғотади. Тажрибаларда айтиб ўтилган бирикмаларни 10 мкг/мл концентрациясида ҳам синалди (5-жадвал).

**Моддаларнинг 10 мкг/мл концентрациясида цитотоксик фаоллиги,
хужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m$, $n = 9$, $P < 0,05$)**

Моддалар	HeLa	HEp-2	ФБК	ГБК
Конвольвин	15,4±0,17	8,0±0,13	100±0,24	88±6,2
N-бензил конвольвин	35,0±0,25	81,6±0,28	39,0±0,22	42±3,1
Конволинин	0	11,0±0,25	0	8±0,02
Конволидин	33,0±0,22	28,0±0,31	35,0±0,22	24±2,2
N-хлорацетил конвольвин	99,7±0,22	97±0,33	100±0,22	100±3,6
Филлальбин	0	0	Пролиф.	0
Цисплатин-Тева	88,6±0,22	91±0,53	100±0,42	100±1,6
Назорат	0	0	0	0

17

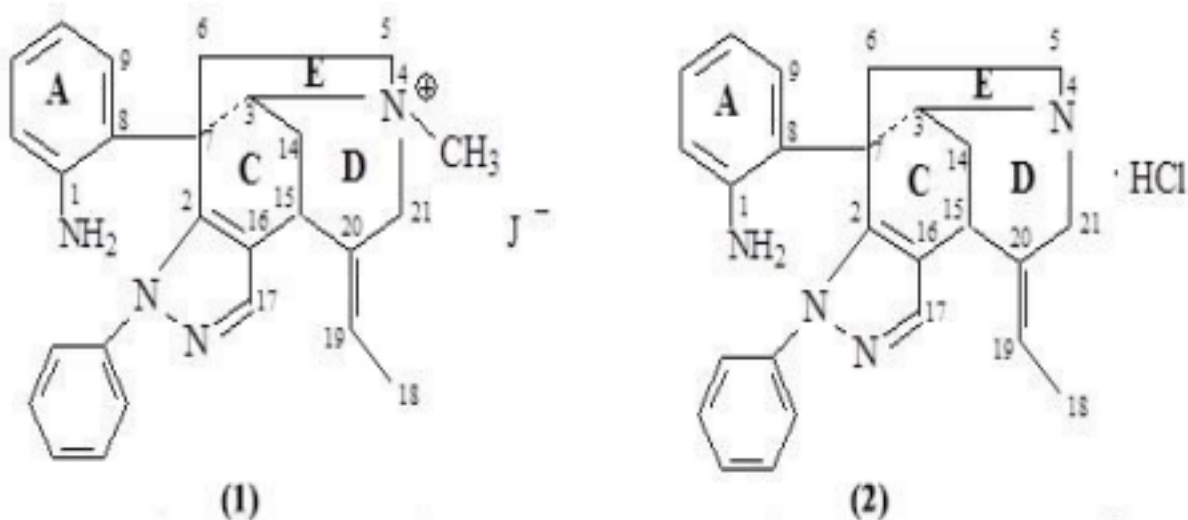
Тадқиқотлар шуни кўрсатдики, 10 мкг/мл ёки 26,3 мМ/л ва 27,3 мМ/л концентрацияларида HeLa ва HEp-2 хужайларига қарши юқори фаолликни тегишли равишда N-бензил конвольвин (5) ҳамда N-хлорацетил конвольвин (6) намоён қилди. N-хлорацетил конвольвин (6) солиштирилаётган ўсимтага қарши препарат даражасида ўсимта хужайраларининг иккала турига ҳам юқори цитотоксик фаолликни намоён қилиш билан бирга, терининг нормал хужайраларига ҳам қарши фаоллик намоён қилган (Цисплатин инсон учун $LD_{50}=2,2$ мг/кг). Яъни бирикмалар структурасидаги $R_1 = COCH_2Cl$, $R_2 = CH_3$ гуруҳлари синалаётган хужайраларга нисбатан кескин заҳарлиликни оширади.

N-бензил конвольвин ҳиқилдоқ ўсимтаси хужайраларига қарши танлаб таъсир қилишни намоён қилиб, $IC_{50} = 12,3$ мМ/л (4,7 мкг/мл) ва нормал хужайраларга 3 маротаба кам заҳарлик (нормал хужайралар учун $IC_{50}=32,8$ мМ/л (12,5 мкг/мл). IC_{50} кўрсаткичидан ҳисоблаб чиқилган LD_{50} венага юборишда 12,0-13,0 мг/кг тенг, ҳиқилдоқ ўсимтаси ўсишини бостирадиган кутилаётган терапевтик концентрация эса 4,4-5,0 мг/кг бўлиши мумкин ҳамда буни *in vivo* тадқиқотларини амалга ошириб текшириш керак.

Табиий бирикмалар билан бирга индол алкалоидлари ва уларнинг фенилгидразин билан олинган ҳосилалари (пиразоллар) ўрганилди. Кўндаланг ичак ўсимтасига қарши цитотоксик фаолликка эга пиразолин (патент RU 2305545, 2006) ҳамда фенилгидразин сут безлари ва жигар ўсимтаси хужайраларини ингибирловчи (Hafez O.M., 2014) ҳосилалари маълум.

Профессор А.Х.Юлдашев *Vinca erecta* илдизидан индол алкалоид –

норфлуорокурарин ($C_{19}H_{20}N_2O$, винканин) ажратиб олинган ва пиразолнинг мураккаб ҳосиласи норфлуорокураринни фенилгидразин билан реакцияси натижасида норфлуорокурарин гидразони ($C_{25}H_{26}N_4$) синтез қилинган. Ушбу бирикмани хлорид кислота билан таъсирлашуви натижасида фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати $C_{25}H_{27}N_4Cl$, йодли метил билан эса – фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати ҳосил бўлади $C_{26}H_{29}N_4I$ (3-расм).



3-расм. Пиразол ҳосилалари: 1 - фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати, 2 - фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати.

18

Ушбу бирикмаларнинг цитотоксик фаоллиги ўрганилди. Натижада дастлабки бирикма – норфлуорокурарин гидразони ва фенилгидразин, ўзларининг ҳосилаларидан фарқли ўлароқ, кутилаётган фаоллик намоён қилмади (6-жадвал).

6-жадвал

Фенилгидразин ва норфлуорокурарин ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги, ҳужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m, n = 9$)

Бирикма, Мкг/мл	HeLa			HEp-2			HBL-100			ФКК		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1	100	10	1
$C_{25}H_{27}N_4Cl$	83,5 ±8, 2	53± 3,9	38± 4,2	89± 12,2	45± 4,9	32±1, 6	91,6 ±2,1	36,9 ±0,2	27,8 ±0,9	100 ±6,0	41± 7,2	29± 0,9
$C_{26}H_{29}N_4I$	60±6 ,7	45± 2,5	11± 1,3	72± 3,1	55± 8,8	31±1, 8	49± 0,1	40± 0,5	38,6 ±1,1	96,7 ±5,2	0	0
$C_{25}H_{26}N_4$	67±5 ,4	30± 1,9	10± 0,6	24± 4,4	10,5 ±0,9	9±0,9	39± 3,2	27± 2,1	14± 1,5	98±7, 2	60± 3,1	34± 0,5
Фенилгид ра зин	100± 15, 5	99± 18	54± 23	99± 21,5	82± 11	37±5, 9	78± 5,0	54± 3,5	44 ± 2,5	100±2 2	85± 13	74± 9,5

Цисплатин –Тева	100± 7,1	72± 2,2	33± 1,9	100 ±11	79± 4,4	23,5± 2,5	70± 0,3	60± 0,5	54± 0,1	100±1 1,3	69± 7,5	34± 2,1
Назорат	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Изоҳ: назоратдан шубҳасиз фарқи $P < 0,05$.

6 жадвалдан кўриниб турибдики, фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати ($C_{25}H_{27}N_4Cl$) 24 мМ/л (10 мкг/мл) концентрациясида ўсимта ҳужайраларига қарши юқори цитотоксик фаолликка фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати эга бўлиб, барча ҳужайралар ўсишини 50 % сусайтириб, нормал ҳужайраларда цитотоксиклиги Цисплатинга нисбатан анча паст. Бу бирикманинг $LD_{50}=7,7-12,5$ мг/кг га тенг. Фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати анча танлаб таъсир қилиб, 19,1 мМ/л (10 мкг/мл) концентрациясида фибробластларда токсик эмаслиги ва бошқа ўсимта ҳужайралари ўсишни сусайтиради. $LD_{50}=48-52$ мг/кг, 50% га яқин ҳиқилдоқ ўсимтаси ҳужайраларини, 40 % га яқин сут беги ва бачадон бўйни ўсимтаси ҳужайралари ўсишини тўхтатувчи кутилаётган терапевтик доза эса 10 мг/кг га тенг. Бундан ташқари, фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати 1-10 мг/кг концентрацияларида Цисплатин каби ЛДГ цитозол ферменти “чиқиб кетишига”, яъни мембрана бузилишига олиб келган бўлса, юқори цитотоксик фаолликка эга фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати таъсирида бу ҳол кузатилмайди.

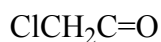
Шундай қилиб, ўсимта ҳужайралари ва фибробластларга қарши юқори цитотоксик фаолликка фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати эга, яъни умуман танлаб таъсир қилмайди. Шу пайтда фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати анча танлаб таъсир қилиб, 1-10 мкг/мл (1,91-19,1 мМ/л) концентрациясида ўсимта ҳужайраларининг ўсишини тўхтатиб, уларнинг мембранасини шикастлайди ва нормал ҳужайралар – фибробластларга нисбатан токсик таъсир кўрсатмайди. Иккала ҳосила кейинчалик истиқболли ўсимтага қарши препаратларнинг компонентлари сифатида *in vivo* усуллари ёрдамида текширилиши мумкин.

19

Табиий бирикмаларнинг ҳосилалари билан бир қаторда юқори самарали ўсимтага қарши препаратларни яратишда синтез йўллари билан олинган бирикмалар ҳам истиқболли саналади. Адабиётларда нормал ҳужайраларга нисбатан қуйи цитотоксикликка, сут беги ўсимтаси 755 ҳужайраларини ингибирловчи (патент RU № 2429224, 2009й.) ёритилган. Шу билан бирга фенилсирка кислотасининг қатор ҳосилалари синтез қилиниб эпителиал ҳужайралардан ҳосил бўлувчи неоплазияни даволашда қўллаш тавсия қилинмоқда (Б.С.Федоров, 2009й.).

Шу сабабли М.Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий университети Кимё факультетининг органик синтез лабораториясида (Абдушукуров А.К.

рахбарлиги остида) синтез қилинган фенил- ва феноксисирка кислоталарининг ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги *p*-Cl ацетилфенилсирка кислота ва *p*-Cl-феноксисирка кислотаси ўрганилди (4-расм, 7-жадвал).



(1) (2) 4-расм. фенил- ва феноксисирка кислоталарининг ҳосилалари - *p*-Cl-ацетилфенилсирка кислота (1) ва *p*-Cl- феноксисирка кислота (2)

7- жадвал

Фенокси- ва фенилсирка кислота ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги, ҳужайралар ўсишини ингибирлаш фойзи ($M \pm m$, $n = 9$)

№	Бирикма мкг/мл	HeLa		HEp-2		HBL-100		ФКК	
		10	1	10	1	10	1	10	1
1	<i>p</i> -Cl-ацетилфенилсирка кислота	13,3± 2,0	41± 1,2	23± 1,2	53± 5,1	60,0 ±1,5	60,0 ±0,9	25± 1,0	16± 0,9
2	<i>p</i> -Cl- феноксисирка кислота	4,3± 0,9	0	57± 4,2	43,6± 0,5	33± 0,2	29 ±2,0	15± 0,2	19± 1,1
3	Цисплатин –Тева	68,5± 3,4	35± 2,3	76± 1,3	44± 1,2	76± 4,5	49± 3,0	72± 3,2	45± 2,2

Изоҳ: назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,05$.

7 жадвалда берилишича, *p*-Cl-ацетилфенилсирка кислота фақат 1 мкг/мл концентрациядагина яққол цитотоксик фаоллик намоён қилиб, Цисплатинга нисбатан нормал фибробласт ҳужайраларининг культурасига деярли таъсир қилмасдан барча ўсимта ҳужайралари ўсишини ингибирлаши аниқланди. *p*-Cl-феноксисирка кислота 1-10 мкг/мл концентрацияларида ҳиқилдоқ ўсимтасини ингибирлаб, нормал ҳужайраларга, хусусан, фибробласт ҳужайраларининг культурасига, сут беги ва бачадон бўйи ўсимталарига жуда паст цитотоксик фаоллик кўрсатди. Бундан ташқари, мазкур бирикмалар 1 мкг/мл концентрациясида ўсимта ҳужайралари мембраналарининг шикастланишига олиб келиши аниқланган. Бу, ўз

20

навбатида, ЛДГ-тестда культурал суяқликда цитозол ферменти лактатдегидрогеназининг пайдо бўлиши билан тасдиқланмоқда. Шундай қилиб, *p*-Cl-ацетилфенилсирка кислота 4,7 мМ/л (1 мкг/мл)

концентрациясида ҳиқилдоқ, сут беи ва бачадон бўйи ўсимталарини 50 % ингибирлайди. LD₅₀ 18-22 мг/кг, кутилаётган терапевтик доза эса 1-10 мг/кг ташкил қилади. n-Cl-феноксисирка кислотасининг ҳиқилдоқ ўсимтаси учун IC₅₀=52 мМ/л (10 мкг/мл), LD₅₀=81-92 мг/кг, кутилаётган терапевтик доза эса 1-10 мг/кг бўлиб, бунда ҳиқилдоқ ўсимтаси ингибирланади. Қўйилган вазифаларнинг биринчи бўлимини – **ўсимта хужайралари ингибиторларини аниқлаш ишларини** бажарилиши натижасида *Convolvulus krauseanus* ўсимлигининг ер устки қисмидан, *Arundo donax* ўсимлигининг илдизидан олинган алкалоидлар йиғиндилари ҳиқилдоқ ўсимтасини ингибирлаб, нормал хужайраларга нисбатан қуйи токсикликни намоён қилмода. *Vinca major* ўсимлигининг илдиз алкалоидлари йиғиндиси бачадон бўйи ўсимтасини ингибирлаб, бошқа, жумладан, нормал хужайраларда бундай таъсир курсатмайди. *Vinca* туркум ўсимликларида паразитловчи эндофит замбуруғлар экстрактларидан нормал хужайралар учун қуйи ўсимта хужайралари учун юқори токсикликни намоён қилувчи – *Alternaria* sp (*V. erecta* баргларида), *Penicillium* sp (*V. erecta* барглари, *V. minor* поясида), *Aspergillus terreus* (*V. erecta* илдизи) экстрактлар ажратиб олинган. Индивидуал бирикмалардан нормал хужайраларга қуйи токсиклик намоён қилувчи, ҳиқилдоқ ўсимтасига танлаб таъсир этувчи иккита – N-бензил конвольвин ва n-Cl-феноксисирка кислота ҳамда танламай таъсир қилувчи ҳиқилдоқ, сут беи ва бачадон бўйи ўсимталари ингибиторларининг иккитаси – n-Cl-ацетилфенилсирка кислота ва фенилгидразон норфлуорокурарин йодметилати. Ўрганилган индивидуал бирикмалардан иккита хлорсақловчи бирикмалар – фенилгидразон норфлуорокурарин хлоргидрати ва N хлорацетил конвольвин Цисплатинга ўхшаш цитотоксик фаоллик намоён қилган ва кейинчалик ўсимтага қарши *in vivo* тажрибаларини олиб бориш мумкин.

Кейинги вазифалардан бири сифатида **регенератив тиббиёт учун нормал хужайралар пролифераторларини аниқлаш** бўйича изланишлар амалга оширилган.

Маълумки, флаваноидлар ва фитостероидлар оксил биосинтезини индукциялаши ҳамда нормал хужайраларнинг пролифераторлари бўлиши мумкин. Проллифераторларни аниқлаш регенератив тиббиёт, косметология ва спорт учун жуда муҳим.

Шу сабабли ЎзР ФА ЎМКИ Экспериментал технологик лабораториясида (А.У.Маматханов раҳбарлиги остида) ажратиб олинган фитостероидлар ва уларнинг йиғиндисини (*Ajuga turkestanica* ўсимлигидан ажратиб олинган экдистерон ва туркестерон ҳамда аюстан – фитостероидлар, иридоидлар ҳамда бошқа бирикмалар йиғиндиси), флаваноидларни (*Ferula tenusecta* ўсимлигининг илдизидан олинган панаферол, *Ferula kuchistanica* ер устки қисмдан ажратиб олинган куфестрол, *Ferula varia* ер устки қисмдан ажратиб олинган цинарозид, *Glyssiriza glabra* ўсимлигининг ер устки

фаоллигини тадқиқ қилишни долзарб деб ҳисобладик. Тадқиқотлар ФҲК нинг 5-7 пассажаларида олиб борилган. Барча ўрганилган флавоноидлар ва “Аюстан” препарати 0,3-100 мкг/мл концентрацияларида сезиларли пролифератив фаоллик намоён қилмаган, туркестерон ҳамда экдистерон фитостероидлари эса бундан мустасно (8-жадвал).

8-жадвал

Флавоноидлар ва фитостероидларнинг ФҲКда пролифератив фаоллиги ($M \pm m, n = 3$)

Моддалар	Фибробластларнинг тирик ҳужайралари проценти, %							
	100 МКГ/МЛ	50 МКГ/МЛ	25 МКГ/МЛ	12,5 МКГ/МЛ	6,25 МКГ/МЛ	3,12 МКГ/МЛ	1,6 МКГ/МЛ	0,8 МКГ/МЛ
Аюстан	67±0,11	62±0,22	78±0,3	64±0,11	89±0,22	72±0,21	94±0,23	106±0,3
Туркестерон	125±4,3	130±6,0	142±5,1	178±2,5	159±5,2	130±7,26	100±4,5	100±7,3
Экдистерон	91±8,7	90±3,5	101±4,2	180±9,2	130±5,3	134±9,5	146±7,3	100±5,3
Панаферол	0±0,02	0±0,2	0±0,1	0±0,05	0±0,1	0±0,2	48,9±2,3	74±3,3
Пиносембрин	0±0,1	0±0,05	0±0,02	14±0,6	105±8,3	119±4,3	106±9,2	99±4,3
Цинарозид	58±11,2	93±9,3	75±2,1	79±9,7	91,5±6,2	91,4±6,0	81,8±6,1	84±7,1
Глабронин	23±4,2	72,9±8,6	76,3±4,9	112±1,2	113±9,3	108±11,4	107±7,2	105±4,5
Пурнетин	0±0,1	0±0,02	0±0,01	47±2,2	135±9,5	122±11,5	97±7,7	110±5,5
Назорат	100%							

Изоҳ: назоратдан ишонарли фарқи $P < 0,05$; * $P < 0,01$.

8 жадвалда кўриниб турибдики, индивидуал фитостероидлар экдистерон ва туркестеронга эга бўлиб, пролиферация пики 12,5 мкг/мл концентрациясига тўғри келди ва пролиферация даражаси 180 % ни ташкил қилди. Бунда туркестерон концентрацияси 10 мкг/млга туширилганда, фаоллиги тенглашиши кузатилди.

Фитостероидларнинг фаоллиги бўйича кўплаб қарама-қарши маълумотларнинг мавжудлиги, уларни тиббиёт, спорт ва косметологияда ишлатилишини ҳисобга олган ҳолда тиббиётда кенг қўлланилаётган, пролифератив фаол бўлган экдистерон фитостероидини ўсимта ҳужайралари культураларида синаб, унинг ҳавфсизлигини аниқлаш мақсад қилинди (9-жадвал).

9-жадвал

Экдистероннинг пролифератив фаоллигини ўсма ҳужайраларида

тадқиқ қилиш ($M \pm m, n = 9, P < 0,05$)

Тирик хужайралар, %												
Мкг/мл	HeLa				HEp-2				HBL-100			
	100	25	12,5	3,12	100	25	12,5	3,12	100	25	12,5	3,12
Экдистерон	54± 2,3	62± 5,9	62± 4,2	65± 2,3	72 ± 5,3	80± 4, 8	87± 2,7	74 ± 3,2	100± 16,4	100± 13, 9	97± 5,8	69± 9,4
Цисплатин	0	0	2,8± 0,2	32± 2,4	0	0	3± 0,2	48 ± 3,1	0	0	0	30± 2,9
Назорат	100											

9 жадвалдан кўриниб турибдики, экдистерон ўрганилган концентрацияларда (3,12-100 мкг/мл) ўсимта хужайраларига нисбатан кучсиз цитотоксик фаоллик намоён қилган.

22

Зотан, тиббиёт ва спортда кенг қўлланилаётган экдистерон фитостероиди 3,12-100 мкг/мл концентрациясида ўсимта хужайралари пролиферациясини келтириб чиқармайди, шунинг учун уни хавфсиз анаболик ва пролифератор деб санаш мумкин.

Ушбу пролифератордан кейинги тадқиқот ишларида фойдаланилди. Оптималлаштирган услубимиз ёрдамида куён терисининг фибробласт ва кератиноцитлар хужайра культуралари олиниб, IV типдаги коллаген ажратиб олинган ҳамда икки турдаги тўқима-муҳандислик конструкциялари яратилган: 1) коллаген гелда фақат фибробластлар – дермал эквивалент (ДЭ); 2) коллаген гелда фибробластлар (ДЭ) ва кератиноцит хужайралар культураси (ДЭ+КХК) ўстирилган; 3) биринчи ДЭ конструкциясига, фибробластлар ўстириш муҳитига 12,5 мкг/мл концентрациясида экдистерон қўшилди (ДЭ+экдистерон). Регенератив тиббиёт учун муносиб конструкцияни топиш ва биз олган хужайра культураларининг ушбу мақсадларга лойиклигини тасдиқлаш мақсадида куйган яраларда конструкциялар ўтказилди.

Бунинг учун қуёнларнинг қирилган ёлига махсус электр асбоб ёрдамида ША даражали 3 см² майдонга, ҳар бир ҳайвонга 4 тадан термик куйишлар етказилди. Ярани ўлган тўқималардан тозалаб, антисептик восита билан ишлов берилгандан сўнг яраларга Петри палласидан оҳисталик билан олинган тўқима конструкциялари имплантация қилинди. Ҳар бир ҳайвоннинг бир ярасига фақат ДЭ тортилди. Бошқа ярасига ДЭ билан пролифератив фаол концентрациядаги (12,5 мкг/мл) экдистерон суртилди. Яна бир ярасига ДЭ+КБК тортилди. Охирги яра назорат бўлиб, ҳеч нарса тортилмади. Яна

бир қуёнга ўлган тўқималарни олиб ташлагандан сўнг экдистерон эритмасини (12,5 мкг/мл) ДМЕМ/F12 муҳитида суртилди.

Куйган яраларни регенерация қилиш экспериментлари натижалари (10-жадвал).

10-жадвал

ДЭ ва фитоэкдистероиднинг яралар сатҳи ва битиш муддати таъсири ($M \pm m$, $n = 10$, $P < 0,05$)

Тажриба шароити	Ярани ўртача сатҳи, см ²				Яралар регенерацияси муддати
	5 сутка	10 сутка	15 сутка	20 сутка	Суткалар
ДЭ	2,3±0,09	1,3±0,11	0,9±0,08	0,6±0,06	22,9±1,1
ДЭ + экдистерон	2,2±0,13	1,2±0,07	0,7±0,06	0,2±0,09	20,1±0,2
ДЭ + КХК	2,2±0,11	1,2±0,12	0,6±0,09	0,1±0,09	19,9±0,2
Экдистерон	2,7±0,5	1,9±0,2	1,6±0,05	1,1±0,03	33±0,1
Назорат	2,9±0,14	2,2±0,16	1,9±0,02	1,5±0,07	38,9±0,6

Изоҳ: яраларнинг битиш муддати тўлиқ эпителизациясида белгиланган.

10-жадвалдан кўриниб турибдики, даволанмаган яралар ўртача 38,3-39,5 кунда, тўқима-муҳандислик конструкцияли яралар 2 баробар тез битмоқда. Бунда, коллаген, фибробластлар ва кератиноцитлардан иборат мураккаб конструкция (ДЭ + КХК) (назоратга нисбатан 18,4 – 19,4 сутка

23

аввал), коллаген ва фибробластлардан ҳамда экдистерон қўшимчаси (ДЭ + экдистерон) мавжуд конструкция билан тенг вақтда тўқималарни регенерациясига имкон бермоқда. Шу қаторда ДЭ ва экдистерон алоҳида ҳолда регенерация жараёнига таъсир самараси кучсиз намоён бўлди. Фақат ДЭ билан ишлов берилган яралар назоратга нисбатан 15,5 – 16,5 сутка олдин битиб, экдистерон билан ишлов берилганлари назоратдан 5,4 – 6,4 сутка олдин битиб кетиши кузатилди.

Шундай қилиб, *in vivo* тажрибаси шуни кўрсатдики, регенератив тиббиётда тўқима конструкциялари билан биргаликда, экдистерон реципиент терисида регенератив жараёнларни фаоллаштириб, ҳеч нима билан ишлов берилмаган яраларга нисбатан 2 баробар тез битади ва биз олган тери хужайраларининг культуралари регенератив тиббиёт учун қулай бўлади. Бундан ташқари, ушбу мақсадлар учун коллагенли тагликда экдистеронли

муҳитда (ДЭ+экдистерон) ўстирилган фибробластлардан иборат соддалаштирилган конструкциядан фойдаланиш самараси бўйича анча қимматбаҳо ва кўп меҳнатни талаб қилувчи кератиноцитли конструкцияга – ДЭ+ КХК тенгдир. Шу сабабли куйган ва бошқа узок битмаётган яраларни даволашда коллагенли тагликда экдистеронли муҳитда (ДЭ+экдистерон) ўстирилган фибробластлардан иборат соддалаштирилган конструкциядан фойдаланиш энг мақбули, деб ҳисоблаймиз.

Тўртинчи бобда нормал ва хатарли трансформацияланган хужайра культураларини рекомбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар олиш учун фойдаланиш натижалари ва олинган антитаналарни амалий қўллаши ҳақида маълумотлар келтирилган.

Ўсишнинг гемопоэтик омили – ЭПО эритроцитлар ҳосил қилиш регуляциясида иштирок этади. ЭПО асосидаги препаратлар ЖССТ таклифига асосан тиббиёт амалиётида химиотерапия ва радиотерапия ўтувчи онкобеморлар ҳамда вирус билан инфекцияланганларни даволаш стандартига қиритилган ва аҳволининг коррекцияси ҳамда турли келиб чиқишга эга анемияни даволашда фойдаланилади. МКАТ-ЭПО биологик суюқликларда ЭПО миқдорини аниқловчи диагностик тест-системалар яратиш учун ҳамда табиий вар ЭПО олишда иммуносорбент сифатида ишлатилади.

рЭПО ва унга қарши антитаналардан кенг фойдаланилиши сабабли МКАТ-ЭПОни гибридом технология ёрдамида олишни мақсад қилиб олдик. Асосий мақсадимиз МКАТ-ЭПОни ЭПОни аниқловчи тест-системада қўллаш ва кейинчалик рЭПОни тозалашда ундан иммуносорбент сифатида фойдаланиш эди.

Маълумки, гибридомлар иммунизацияланган ҳайвонларнинг нормал лимфоцитларини миелома штаммлари билан қўшилиши орқали олинади. Шу сабабли биринчи даражали вазифа бу – агентларнинг қўшилиши учун тайёрлаш. ЭПО сут эмизувчиларда ишлаб чиқишини ҳисобга олган ҳолда иммун ҳаракатни юзага келтириш учун ҳайвонларнинг иммунизациялаш схемасини ишлаб чиқиш анча мушкул.

BALB/c сичқонларининг эритропоэтинга қарши антитаналарнинг энг катта титрини берувчи рекомбинант эритропоэтин билан иммунлашнинг

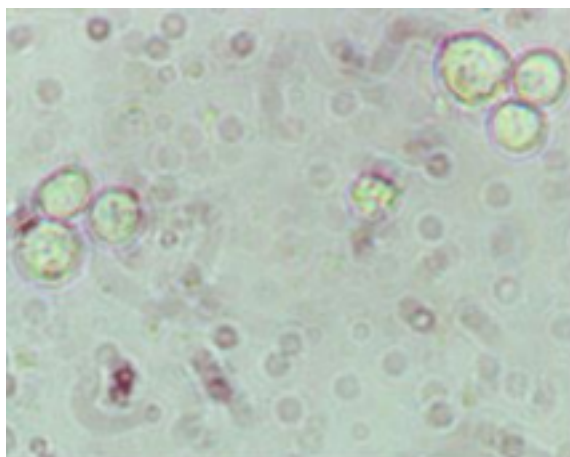
24

оптимал схемаси меъёрига етказилди. Уч ҳафталик 15-20 граммли BALB/c линияси сичқонларга қорин соҳасига 4 мкг оксил сақловчи 0,5 мл рЭПО суспензиясини («Resommon», Roche, Швейцария) Фрейнднинг тўлик адъювантини (ПАФ) юбордик ва бир ҳафтадан кейин иммунизация жараёни Фрейнднинг тўликсиз адъюванти (НАФ) билан қайтарилди. Сичқонлар иммунизациясининг икки циклидан сўнг уларни бир ҳафта оралиғида икки марта 15% додецилсульфат натрий иштирокида полиакриламидли гелга адсорбцияланган рЭПО (гель-рЭПО) билан иммунизацияладик. Икки ҳафтадан сўнг бустерли равишда 0,1 мл (9,8 мкг) рЭПО юборилган ва синалган. Параллел равишда сичқонларни рЭПО билан стандарт схема бўйича иммунизацияладик. Бунда қорин соҳасига кетма кет рЭПО суспензия

билан бирга, ПАФ ва НАФ, кейин бустер равишда 9,8 мкг рЭПО юборилган ва синалган. Ҳар бир циклдан сўнг ва иммунизация охирида қон зардоби олиниб, антитаналарни ЭПОга қарши Оухтерлони усули билан титрланди (гелда қўш диффузия). Биз ишлаб чиққан такомиллаштирилган иммунизация схемаси бўйича антитаналарнинг якуний титри 1:512 ни ташкил этганда, иммунизациянинг стандарт схемасидагги титр 1:128 дан ошмади.

Сўнг сичқон Х Ag 8.653 миеломасининг ишлаб чиқилган рЭПО билан иммунизация қилинган BALB/с линияси сичқонларининг спленоцитлари билан полиэтиленгликолда (ПЭГ) қўшилиши натижасида гибридомлар олинди.

Қўшилиш жараёни тугагандан сўнг чўкма ГАТ (гипоксантин, амидоптерин, тимидин) муҳитида ресуспензияланди. Хужайралар 96 катакчали культурал планшетларга ўтказиб чиқилди. Бир кун олдин катакчаларга синген сичқонларнинг макрофаглари ўтказилиб, CO₂-инкубаторида ўстирилди. Гибрид хужайраларнинг клонлари бир ҳафтадан сўнг пайдо бўлди. 192 катакчадан 45 тасидагина гибридомлар ҳосил бўлгани кузатилди (5-расм).



5-расм. Гибрид хужайралар колонияларининг пайдо бўлиши (сичқон Х Ag 8.653 миеломасини рЭПО билан иммунизация қилинган BALB/с линияси сичқонларини спленоцитлари билан қўшилишининг 3-5 кун), микрофото, ок. ×10, об. ×40

Қўшилишдан кейин, 3 ҳафтасидан сўнг ГАТ муҳитини селектив қўшимчаларсиз ўстириш муҳитига алмаштирилди ва қўшилишдан кейин 14-кунида қаттиқ фазали иммунофермент анализ (ИФА) усули ёрдамида ИФА учун мўлжалланган рЭПОли полистиролли планшетларда рЭПОга қарши антитана ишлаб чиқувчи клон-продуцентлар аниқланди. Антиген – антитана комплексини пайдо бўлишини пероксидаза билан белги солинган сичқонларнинг анти-IgG ёрдамида аниқланди. Ўлчашлар натижасини ижобий санашнинг омиллари – бу намуний оптик зичлиги салбий назоратникидан икки ва ундан ортиқ баробарда ортиқ бўлиши деб қабул қилинди. Тестлардан сўнг МКАТ- ЭПО продуцентлари – 12-гибридомлар аниқланган. Гибридом

продуцентлар сақловчи 12 катакчадан гибрид-хужайралар 3-5 хужайрадан бошқа катакчаларга ўтказилди (катакчаларга олдиндан макрофаглар ўтказилади). 7-10 кундан кейин пайдо бўлган клонларнинг культурал суюқлик аликвоталари МКАТ-ЭПО сақланиши бўйича ИФА усули ёрдамида скрининг қилиб борилади. Бунда 96 катакчали планшетлар туби рЭПО («Resommon») билан иммобилизация қилинади. Аниқланган клон продуцентлар лимитловчи ўстириш усули ёрдамида бир катакчага 1 хужайрадан реклонланди. Сўнг яна бир бор ИФА усулида клон продуцентларнинг аниқлаш ишлари амалга оширилди.

Клон-продуцентларни реклонлаб, серияли пассажлардан сўнг продуктив клонларни оммавий културага олиб чиқилди. Бунинг учун 96 катакли культурал планшетда кўпайган хужайраларни 24 катаклисига, кейин 4 катаклисига олиб ўтилди ва ундан кейин барқарор гибридомлар 25 – 50 млли культурал флаконларга ўтказилди.

Клонларнинг барқарорлигини текшириш мақсадида клонлар музлатилди ва эритиб олинди. Сўнг қайта ўстирилиб, реклонланди. Бундан кейин скрининг ва селекция натижасида МКАТ- ЭПО ишлаб чиқарувчи Е10 (ОЗ = 2.8) ва С9 (ОЗ = 2.8) гибридомасининг 2 та субклонлари танлаб олинди. Самарали штаммга ЭЕ10С9 белгисини қўйдик. Гибрид хужайраларнинг олинган штамми ЎЗР Микробиология институтининг Хужайра культуралари банкида рўйхатга олиш рақами № СКБ 169 остида депозитга қўйилди (№ IAP 02943, 16.12.2002 й.).

МКАТ-ЭПОни кўп миқдорда ишлаб чиқиш учун гибридом – продуцентлар битта сичқонга 1×10^6 сониди BALB/c линияси сичқонларининг қорин соҳасига юборилди. Бундан бир сутка олдин ҳайвонларга 0,5 млдан НАФ инъекциялари қилинган эди. Бир ҳафтадан сўнг сичқонларда асцит (6 мл гача) вужудга келди Антитаналар концентрацияси 6-10 мг/мл оралиғида эди.

Олинган асцит суюқликлар МКАТ-ЭПО мавжудлиги ҳамда ушбу антитананинг рЭПО, табиий ЭПО ва иккита препарат: «Roferon» (альфа-2а рекомбинант интерферон) ва «Neupogen» (ўсишнинг гемопоэтик омили, нейтрофилларни ишлаб чиқиши ва уларнинг иликдан периферик қонга ўтишини бошқаради) билан чапараста ўзаро таъсирлашуви синалди (11-жадвал).

МКАТ-ЭПОнинг бошқа препаратлар билан асцит суюқликларда ўзаро таъсирлашув ИФАси, оптик зичлик кўрсатилган

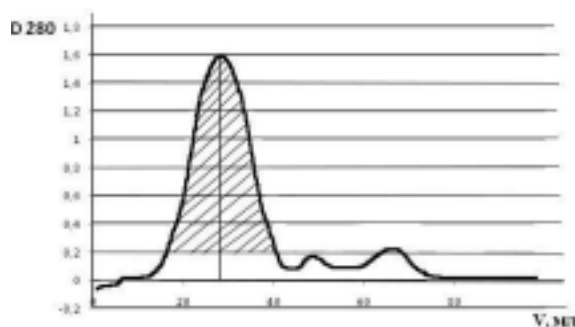
Асцит суюқликни эритиш	Оптик зичлик			
	рЭПО	Плацента р қон зардоби	Roferon	Neupogen

Яхлит	1,888	0,740	0,233	0,223
2 баробар	1,602	0,746	0,253	0,266
4 баробар	1,455	1,085	0,234	0,246
8 баробар	1,454	1,082	0,201	0,205
16 баробар	0,745	0,905	0,232	0,216
32 баробар	0,495	0,495	0,233	0,253
64 баробар	3000	0,403	0,228	0,213
128 баробар	3000	0,213 - K	2,346 + K	0,086 Фон

Изоҳ: **-K** – салбий назорат (1^xPBS), **+K** – ижобий назорат («Roche» (Швейцария) фирмасининг «ЕРО-ELISA» тўпламидан).

11-жадвалдан кўриниб турибдики, асцит суюқликлари таркибида қон зардобидоги табиий ЭПО ва рЭПО билан таъсирлашувчи, интерферон ва нейтрофилларни ўсиш фактори билан таъсирлашмайдиган МКАТ-ЭПО мавжуд.

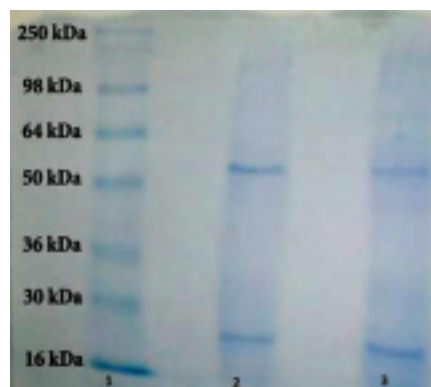
МКАТ-ЭПОни культурал ва асцит суюқликларидан сульфат аммоний эритмаси билан икки марта чўктириш йўли билан олинган. Сўнг тузсизлантириш G-25 сефадексда олиб борилди. Якуний тозалашни 5 мМ натрий-фосфат буфери, рН 8,0 билан ишлов берилган ДЭАЭ-целлюлозали колонкада олиб борилди. Колонка 0 дан 0.25 М NaCl эритмаси билан ювилди (6-расм).



6-расм. 5 мМ натрий-фосфат буфери, рН 8,0ли NaCl градиенти билан тенглаштирилган ДЭАЭ-целлюлозали колонкада МКАТ-ЭПО ювилиш профили.

Натижада юқори тозаликдаги МКАТ-ЭПО фракциялари олинди ва лиофил тарзда қуритилди.

Антитаналарнинг гомогенлиги Laemmli усули ёрдамида полиакриламид гелда, натрий додецилсульфати иштирокида баҳоланди (7-расм).



7-расм. Қайтарилувчи шароитда (меркаптоэтанол) МКАТни ЭПОга 12% ПААГ-SDS даги электрофореграммаси: биринчи чизик – маркерлар (миозин - 250 кДа, фосфорилаза - 98 кДа, глютамин дегидрогеназа - 64 кДа, алкоголь дегидрогеназа - 50 кДа, карбоангидраза - 36 кДа, миоглобин - 30 кДа, лизозим - 16 кДа); иккинчи ва учинчи чизиклар – 2 субклонларнинг тозаланган МКАТ-ЭПОси.

Тикланувчи шароитларда олиб борилган электрофорез усули ёрдамида олинган моноклонал антитаналарнинг енгил занжирлари молекуляр массаси 23.000 Да, оғирларини эса 52,000 Да тенг ва ушбу антитаналарни G синфига мансублигини тасдиқлайди.

МКАТнинг ЭПО антиген детерминанталари билан таъсирлашувининг хусусиятини аниқлаш мақсадида тўғри ИФА олиб борилди. Бунинг учун антиген (АГ) сифатида 96 катакли планшетга 60 мкг/мл концентрацияда рЭПО (“Roche”, Швейцария), натив ЭПО (“Протеиновый контур”, РФ) ва плацентар қон зардоби сорбция қилинди. Антитана (АТ) сифатида биз олган МКАТ-ЭПО хизмат қилди (12-жадвал).

12-жадвал

ИФА усули билан МКАТ-ЭПО хусусиятинг аниқлаш

МК АТ ЭПО мкг/мл	ИФА олиб бориш учун пластикка сорбцияланган антигенлар				
	рЭПО, «Resommon»	Табиий ЭПО, «Протеиновый контур»	плацентар қон зардоби	+К	-К
20	3,000	3,000	1,120	3,000	0,110
15	1,980	2,800	0,770	3,000	0,100
10	1,900	1,890	0,430	2,790	0,110
5	1,290	1,500	0,200	1,850	0,150
2,5	0,950	1,150	0,150	1,340	0,110
1,7	0,430	0,860	0,120	0,850	Фон 0,09

Изоҳ: -К – салбий назорат (1^хPBS), +К – ижобий назорат - рЭПО («Roche», Швейцария) ва МКАТ-ЭПО «ЕРО-ELISA» («Roche», Швейцария)

12-жадвалдан кўриниб турибдики, биз олган МКАТ-ЭПО ҳам табиий ЭПО («Протеиновый контур») ҳам рЭПО билан чапараста ўзаро таъсирлашиб, ўзининг фаоллиги бўйича «ЕРО-ELISA» («Roche», Швейцария) МКАТ-ЭПОсидан қолишмайди.

Антитаналар титри ҳам ИФА ёрдамида. Культурал суюқликдаги антитаналар титри 2×10^4 ташкил қилган, асцит суюқликдаги антитаналарнинг юқори титри- 1×10^7 кўрсатмоқда. Тозаланган МКАТ-ЭПО

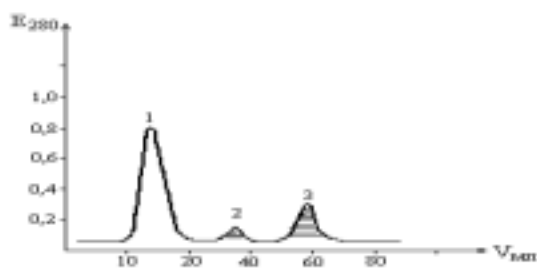
28

умумий фракция энг титрни 4×10^7 намоён қилди. Шундай қилиб МКАТ ЭПО олинди, ажратилди, тозаланди ва тавсифланди.

Олинган МКАТ-ЭПOnинг иммуносорбент сифатида аффин хроматография усули ёрдамида плацента қон зардобидан ЭПО препаратив олиш ва тозалашда самарасини синаш мақсадида ажратиб олинган ва тозаланган МКАТ-ЭПО асосида иммуносорбент яратилди – BrCN-сефароза 4В – МКАТ-ЭПО). Иммуносорбент антитаналарни BrCN-сефароза 4В билан конъюгациялаш йўли орқали тайёрланди. Бунинг учун BrCN билан фаоллаштирилган ва 1мМ HCl эритмасида бўктирилган 1г 4В сефарозага олинган МКАТ-ЭПО 3 мл. (15 мг/мл) қўшилиб 12 соат инкубация қилинди.

Антитаналар диализ йўли билан 0,5М NaCl сақлаган 0,1М натрий-карбонатли буфер эритмага олинди (рН 8,3). Антитаналар адсорбциясидан сўнг сефарозали суспензияни 0,1М натрий-карбонатли буфер (рН 8,3) билан ювилиб сўнгра 1М этаноламин (рН 9) эритмаси қўшилди. Бундан кейин сорбент 1М NaCl сақлаган 0,1М натрий-карбонатли буфер (рН 8), 1М NaCl сақлаган 0,1М натрий-ацетатли буфер (рН 4) ва яқунда 1М NaCl сақлаган 0,1М натрий-боратли буфер, (рН 8,5) эритмалари билан кетма-кет тартибда ювилди. 1х10 см колонка эритропое́тинга қарши 30 мг антитаналар сақловчи гель билан тўлдирилди.

ЭПО плацента қон зардобидан ажратилиб, қоннинг шаклли элементлари чиқариб ташланди, таркибида 3,75 мМ NaCl ва 1 % фенилметилсульфонилфлуорид эритмаси бўлган 25 мМ фосфат буферда (рН 4,5) диализ қилинди. Сўнг балласт моддалар ДЕАЕ целлюлоза-52да олиб ташланди. ДЕАЕ целлюлоза-52 дан ЭПО ни таркибида 0,5 М NaCl ва 1% фенилметилсульфонилфлуорид эритмаси мавжуд 0,1 М натрий фосфат буфери (рН 4,5) билан ювиб олинди. Элюат сувда диализ қилиниб лиофил қурилди. Лиофил қурилган ЭПО сақловчи фракциялар 0,5 М NaCl эритмаси сақлаган 0,1 М натрий-боратли буферда (рН 8,5) эритилди ва 5 мл оксил (концентрация 3 мг/мл) эритмаси BrCN-сефарозой 4В – МКАТ-ЭПО биосорбентли колонкага солинди. Боғланмаган оксиллар шу буферни ўзида олиб чиқади. Кейинчалик оксил элюцияси кетма-кет 0,5М NaCl сақловчи, рН=3,2 бўлган 0,1М натрий-ацетатли буфер билан ҳамда 1МNaCl сақловчи, рН=3,2 бўлган 0,5М натрий ацетатли буфер билан давом эттирилган. Фракцияларнинг оптик зичлиги фракций 280 нм тўлқин узунлигида амалга оширилди (8-расм).

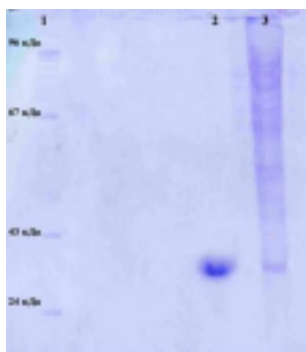


8-расм. Таббий ЭПОнинг BrCN-сефароза 4В-МКАТ-ЭПОли аффинли хроматографиядаги элюция кўрсаткичи. Колонка 1x10 см pH 8,5 бўлган 0,1 М Na-боратли буфер билан тенглаштирилган.

29

Оқсилнинг 3 фракцияси олиниб ИФА ёрдамида оқсилнинг иккинчи фракциясидаги ЭПО миқдори ($OP=0,979$) аниқланди. Учинчи фракцияда ҳам ЭПО миқдорининг ($OP=0,507$) аниқланиши ЭПО фракцияларининг турли аффинлигига далолат бўлади. II ва III фракцияларни бирлаштириб, дистилланган сувда диализ қилинди ва лиофил қуритилди.

Бирлаштирилган фракциянинг гомогенлиги Laemmli усули ёрдамида гель-электрофорез усулида аниқланган (9-расм).



9-расм. ЭПО фракцияларининг β-меркаптоэтанол иштирокида 12% ПААГ-SDS даги электрофореграммаси: 1 - маркер оқсилларни аралашмаси (фосфоорилаза В – 96 кДа, буканинг зардоб альбумини - 67 кДа, овалбумин – 43 кДа, соядан олинган трипсин ингибитори - 24 кДа.), 2 – аффинли хроматографиядан сўнг ЭПО фракцияси, 3 – дастлабки ЭПО фракцияси, хроматографиядан олдин.

Олинган ЭПО молекуляр массаси 32-36 кДа атрофида бўлиб адабиётларда келтирилган маълумотлар билан мос келади ва ЭПОнинг турли даражада гликозилашганига боғлиқ.

Хуллас, олинган МКАТ-ЭПО табиий ва рекомбинант ЭПО олишда аффин хроматографияда, нафақат диагностик тест-система компонентлари, балки биосорбент сифатида катта миқдорда рЭПОни ажратиш олишда ҳам қўллаш мумкин.

ХУЛОСАЛАР

1. *Vinca* туркум ўсимликлари ва уларда паразитловчи эндофит замубуруғларнинг экстрактларининг цитотоксик фаоллиги ҳиқилдоқ

ўсимтаси - Нер-2, бачадон бўйни ўсимтаси - HeLa, сут беzi ўсимтаси - HBL 100 ва фибробластлар, гепатоцитларнинг нормал хужайраларида ўрганилди. Ўсимлик ва замбуруғ экстрактлари цитотоксик фаолликка эгаллиги аниқланди. Бунда *Vinca major* ўсимлигининг илдизидан олинган экстракт HeLa хужайраларига, *V. erecta* ўсимлигининг баргларида паразитловчи *Alternaria sp* эндофит паразит замбуруғнинг экстракти эса HBL-100 ўсимтаси хужайраларига кўпроқ танлаб таъсир қилиб, нормал хужайраларга нисбатан қуйи цитотоксиклик намоён қилади.

2. *Convolvulus*, *Arundo* ва *Buxus* туркумларига мансуб ўсимликларнинг алкалоидлар йиғиндисининг таъсири ўрганилди. *Convolvulus krauseanus* ер устки қисми олинган алкалоидлар йиғиндиси Нер-2 хужайраларини ва

30

Arundo donax илдизларидан олинган алкалоидлар йиғиндиси эса Нер-2 ва HeLa хужайраларини ингибирлаб фибробластларга нисбатан қуйи цитотоксиклик намоён қилиши аниқланди.

3. *Convolvulus* туркум ўсимликларидан ажратиб олинган индивидуал алкалоидлар ва ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди. Ушбу бирикмаларнинг цитотоксиклиги алкалоиднинг тропан қолдиғидаги азот атомига бириккан радикал табиатига боғлиқлиги аниқланди. Нер-2 хужайраларини ингибирлаб ($IC_{50} = 12,3$ мМ/л), фибробласт хужайраларида қуйи цитотоксиклик намоён қилувчи ($IC_{50} = 32,8$ мМ/л) танлаб таъсир қилиш хусусияти юқорилиги билан N-бензил конвольвин ажралиб туради.

4. *Vinca erecta* ўсимлигидан олинган норфлуорокурарин ва унинг ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди. Ушбу бирикмалар орасида энг кўп танлаб таъсир қилиш хусусиятини норфлуорокурарин фенилгидразон йодметилати намоён қилиб Нер-2, HeLa ва HBL-100 ($IC_{50} = 19,1$ мМ/л барча ўсимта хужайралари учун) хужайраларини ингибирлаб фибробластларга нисбатан қуйи токсиклик ($IC_{50} = 95,5$ мМ/л) намоён қилиши аниқланди.

5. Фенил- ва феноксисирка кислоталарининг ҳосилаларининг цитотоксик фаоллиги ўрганилди. n-Cl-феноксисирка кислота ҳиқилдоқ ўсимтаси хужайраларига танлаб таъсир қилувчи ингибиторлик ($IC_{50} = 5,2-52$ мМ/л) ва нормал хужайраларга қуйи цитотоксик фаоллик ($IC_{50} = 442$ мМ/л) намоён қилиши аниқланди. n-Cl-ацетилфенилсирка кислотаси Нер-2, HeLa ва HBL-100 хужайраларини ингибирлаб ($IC_{50} = 4,7-5$ мМ/л) нормал хужайраларга паст цитотоксиклик ($IC_{50} = 94$ мМ/л) намоён қилиши аниқланди.

6. Фитостероидларнинг пролифератив фаоллиги ўрганилди. Ўрганилган фитостероид – экдистерон эса Нер-2, HeLa ва HBL-100 ўсимта хужайраларини 15% ингибирлаб, фибробластлар ҳамда кератиноцитларнинг яхши пролифератори эканлиги аниқланди.

7. Қуйган яраларни даволашда коллаген асосдаги фибробластлардан иборат тўқима-муҳандислик конструкцияларини олиш усули такомиллаштирилди. Тўқима-муҳандислик конструкциялари билан бирга

эkdистepондан фойдаланиш аутокератиноцитлар бўлинишини жадаллаштириб эпителизацияни 2 баробарга тезлаштириши белгилаб ўтилди.

8. Рекомбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналарни ишлаб чиқувчи гибридомалар олинди. Улардан препаратив миқдорда рЭПОга қарши моноклонал антитаналар олишда фойдаланиш мумкин бўлган гибрид ҳужайра-продуцентларининг истиқболли иккита субклони ажратиб олинди.

9. Асцит суюқликдан рекомбинант эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар ажратиб олинди, тозаланди ва тавсифланди. Олинган МКАТ ЭПО ҳам плазма эритропоэтини ҳам рекомбинант эритропоэтини билан ўзаро таъсирлашиши ва IgG синфига мансуб эканлиги аниқланди. Асцит суюқликда антитаналар титри 1×10^7 , культурал суюқликдагиси - 2×10^4 ташкил қилди. Тозаланган МКАТ-ЭПО фракцияси юқори титрни кўрсатиб 4×10^7 ташкил қилди.

31

10. Эритропоэтинга қарши моноклонал антитаналар асосида яратилган иммунносорбентда плацентар қон зардобидан одам эритропоэтини ажратиб олиш усули ишлаб чиқилди.

11. «Доривор воситалар, тиббий жиҳозлари, косметик воситалар, кимёвий бирикмалар, пестицидлар ва ветеринария воситалари цитотоксиклигини баҳолаш» услубий кўрсатма тасдиқланган (ЎзР ССВ, № 8Н-Р/18, 02.03.2016 й.).

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 ПРИ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НАЦИОНАЛЬНОМ
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК
ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

ЦЕОМАШКО НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК (НОРМАЛЬНЫХ И
ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ) ДЛЯ СКРИНИНГА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ПОЛУЧЕНИЯ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

**02.00.10 – Биоорганическая химия
(биологические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

33

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан, за номером 30.09.2014/B2014.5.B69

Докторская диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ АН

РУз.

Полный текст докторской диссертации размещён на веб-сайте Научного совета 16.07.2013.К/В/Т.13.01 при Институте биоорганической химии и Национальном Университете РУз по адресу (<http://ss.biochem.uz>)

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице Научного совета по адресу <http://ss.biochem.uz> и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу www.ziyo.net

Научный консультант: Азимова Шахноз Садыковна

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Ахунов Али Ахунович

доктор биологических наук, профессор

Далимова Сурайо Нугмановна

доктор биологических наук, профессор

Саитмуратова Огилжон Худайбергеновна

доктор биологических наук, доцент

Ведущая организация: Ташкентский фармацевтический институт

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании разового Научного совета при Научном совете 16.07.2013.К/В/Т.13.01 при Институте Биоорганической химии и Национальном Университете РУз (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел. 262 35 40, факс (99871) 262 70 63, e-mail: asrarov54@mail.ru)

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии по адресу г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2016 года
(протокол рассылки №___ от _____ 2016г.)

А.С. Тураев,

Председатель Научного совета по присуждению
учёной степени доктора наук, д.х.н., профессор

М.И. Асраров,

Учёный секретарь Научного совета по присуждению
учёной степени доктора наук, д.б.н., профессор

Д.А. Кадырова,

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н.

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Одной из

актуальных задач биоорганической химии, клеточной биологии и фармакологии является выявление новых соединений, обладающих противоопухолевым действием и другими биологическими активностями. На протяжении многих лет в научных лабораториях республики проводятся систематические исследования по выделению и синтезу различных классов соединений и изучению их фармакологической активности, часть соединений протестированы на различные виды биологической активности, такие как антиаритмическая, холинэстеразная, эстрогенная и противовоспалительная, однако не изучена их цитотоксическая активность.

Скрининг цитотоксической активности химических соединений, лекарственных препаратов, медицинских изделий *in vitro* на различных культурах клеток является составной частью доклинических исследований по международным требованиям GLP (Good Laboratory Practice). Методы исследования веществ *in vitro* позволяют значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых химических соединений.

Такие проблемы как дифференцировка, канцерогенез, клеточная подвижность, пролиферация, передача наследственной информации, регуляция экспрессии генов и другие решаются в мировой науке, в основном с применением клеточных культур. Клеточные культуры имеют также большое значение для решения прикладных задач медицины и сельского хозяйства. В частности, к основным прикладным задачам следует отнести массовое промышленное производство вакцин и физиологически активных соединений, получение моноклональных антител методами гибридомной технологии, лечение тяжелых заболеваний методами генотерапии и клеточной заместительной терапии.

В связи с вышеизложенным выявление соединений, ингибирующих рост опухолевых клеток с низкой токсичностью для нормальных клеток и веществ, пролиферирующих рост нормальных клеток, но не раковых для регенеративной медицины, а также получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к эритропоэтину является актуальной.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлениях Президента Республики Узбекистан от 28 ноября 2011 года № ПП-1652 «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения» и Кабинета Министров Республики Узбекистан от 29 марта 2012 г. № 91 «О мерах по дальнейшему укреплению материально-технической базы и совершенствованию организации деятельности медицинских учреждений», а также другим нормативно-правовым документам.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологии республики VI. «Медицина и фармакология».

Научные исследования, направленные на выявление высокоспецифичных для каждого типа опухолевых клеток соединений, скрининга соединений на цитотоксичность, проведения доклинических исследований химических соединений и лекарственных препаратов методами *in vitro*, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в Национальном институте здоровья (Мэриленд, США), в Национальном институте рака (Роквилл, США), в Институте Патологии (Сиэтл, США), в Университете Рокфеллеров (США), в Институте цитологии (Россия), в Институте биоорганической химии (Узбекистан); в центрах по изучению рака при ВОЗ (Бельгия), EURL ECVAM и ЕРАА (Европа), JаCVAM (Япония), KoCVAM (Корея), Health Canada (Канада), ICATM (США), Vitroscreen (Италия) и др.

В результате исследований, проведенных в мире по выявлению соединений направленного действия методами *in vitro* на различных культурах клеток, получен ряд научных результатов, в том числе: выявлены новые ингибиторы роста раковых клеток, разработаны таргетные препараты винтафолид (Merk&Co, США), эрлотиниб (Roche, Швейцария), афатиниб (Boehringer ingelheim pharm. Inc., США), кризотиниб (Pfizer Inc., США) и церитиниб (Novartis, США), вызывающие инактивацию мутантных белков в опухолевых клетках, и бевацизумаб (Pfizer Inc., США), ингибирующий ангиогенез; получены моноклональные антитела к различным антигенам, в том числе и к эритропоэтину («Roche», Швейцария, «Протеиновый контур», Россия).

В настоящее время в мире при скрининге методами *in vitro* химических соединений и лекарственных препаратов по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: выявление селективных ингибиторов роста раковых клеток для онкологии; селективных пролифераторов роста нормальных клеток для регенеративной медицины; определение общей и специфических видов цитотоксичности, определение механизмов действия соединений на клеточном уровне.

Степень изученности проблемы. Исследования по изучению действия соединений, ингибирующих рост опухолевых клеток методами *in vitro*, стартовали в мире с конца 70-х годов (R.I.Freshney, T.Mosmann, K.Taylor, G.Taju), использование культур клеток в регенеративной медицине – ещё раньше (P.B.Medawar, J.Rheinwald, H.Green), развитие гибридомной технологии с середины 80-х (Kohler и Milstein). В настоящее время данные направления получили бурное развитие. Так, скрининг новых соединений в автоматизированных лабораториях, например, при Университете Рокфеллеров и Национальном институте здоровья в США, проводят уже не только на 96-луночных планшетах, но и на 384, 1536 или 3456-луночных планшетах по так называемому методу HTS (high-throughput screening), исследуя при этом соединения со всего мира (J.Agrestia, X.Zhang, A.Florian).

В СНГ успехов в области скрининга веществ на культурах клеток и культивировании клеток человека и животных достигли М.Ю.Еропкин, Г.Георгиев, Н.Р.Тафришьян, А.А.Алексеев, В.И.Шумаков, Е.В.Парфенова и др.

В Узбекистане исследования на культурах клеток также начались с конца прошлого века. В 70-80-х годах изучению рецепторных систем клеток HeLa и нормальных клеток эмбриона человека посвящены работы А.А.Абдукаримова, А.А.Арипджанова, Т.Г.Гулямовой, Ш.С.Азимовой, О.Петровой, С.Е.Мучника и других. В Институте химии растительных веществ А.Х.Юлдашевым впервые были выделены такие противоопухолевые соединения, как винкристин и винбластин, но их потенция ингибировать рост опухолевых клеток была выявлена не в стенах института, а в Венгрии. В 2002-2003 гг. в лаборатории молекулярной генетики под руководством проф. Ш.С.Азимовой были получены гибридные клетки, продуцирующие моноклональные антитела к поверхностным антигенам гепатита В. В 2005 году в Институте биоорганической химии Н.Н.Кузнецовой была получена и запатентована новая линия клеток меланомы мышей. В этом же году в лабораторию молекулярной генетики Института химии растительных веществ были доставлены верифицированные линии раковых клеток (Hela, HEP-2 и HBL-100). В настоящее время коллекции клеточных культур в лабораториях Институты химии растительных веществ и биоорганической химии постоянно пополняются новыми линиями клеток, и ведутся исследования на культурах клеток.

Связь темы диссертации с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ прикладных и фундаментальных проектов ИХРВ, на темы № А-10-144 «Получения моноклональных антител к эритропоэтину человека» (2006-2008 гг.), № ФА-ФЗ-Т041 «Получение и изучение фармако-токсикологических свойств биологически активных соединений методами генно-клеточной биологии» (2007-2011 гг.), и № ФА-Ф6-Т198 «Изучение влияния биологически активных веществ на метаболизм клеток» (2012-2016 гг.).

Целью исследования является поиск цитостатических соединений - ингибиторов роста раковых клеток, низкотоксичных для нормальных клеток, и соединений, ускоряющих рост нормальных клеток, но не рост раковых клеток, а также получение гибридных клеток (гибридом), продуцирующих моноклональные антитела к рекомбинантному эритропоэтину. **Задачи исследования.**

По поиску ингибиторов роста раковых клеток:

изучение действия экстрактов и индивидуальных соединений на

культуры злокачественно трансформированных клеток (Hela – клеток рака шейки матки, HEp-2 – рака гортани и HBL-100 – рака молочных желез);
получение культур нормальных клеток фибробластов человека и гепатоцитов крыс для скрининга соединений;
изучение действия экстрактов и индивидуальных соединений на культуры нормальных клеток (фибробластов и гепатоцитов).

37

По поиску пролифераторов роста нормальных клеток (для регенеративной медицины:

получение культур клеток фибробластов и кератиноцитов, создание на их основе тканеинженерной конструкции;

изучение действия флавоноидов и фитостероидов на культуры клеток фибробластов человека и кролика;

изучение действия выявленных пролифераторов роста клеток и тканеинженерной конструкции на процессы заживления ожоговых ран *in vivo*. По получению гибридных клеток - продуцентов моноклональных антител к эритропоэтину (МКАТ-ЭПО):

разработка схемы иммунизации мышей линии BALB/c рекомбинантным эритропоэтином;

слияние клеток мышинной миеломы X63Ag8.653 со спленоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных рекомбинантным эритропоэтином. Селекция, скрининг и клонирование гибридом-продуцентов МКАТ-ЭПО;

характеристика и отбор перспективных клонов для получения препаративных количеств моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину, получение асцита;

выделение и очистка моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину;

выделение и очистка эритропоэтина из плацентарной крови методами аффинной хроматографии на основе МКАТ-ЭПО.

Объектом исследования являются культуры клеток фибробластов, кератиноцитов и гепатоцитов, культуры раковых клеток Hela – клеток рака шейки матки, HEp-2 – рака гортани и HBL-100 – рака молочных желез, дермальный эквивалент кожи, экстракты, суммы алкалоидов, индивидуальные соединения (алкалоиды тропанового ряда, производные фенил- и феноксисукусных кислот, производные фенилгидразина и норфлуорокурарина, флавоноиды, фитостероиды), экспериментальные животные с термическими ожогами IIIA степени, мыши линии BALB/c, клетки перевиваемой мышинной миеломы X-63 АГ8.653

Предмет исследования - цитотоксическая, пролиферативная и метаболическая активности, регенерация ожоговых ран, способность гибридных клеток продуцировать моноклональные антитела к эритропоэтину и возможность использования полученных моноклональных антител в качестве иммуносорбента.

Методы исследования. При выполнении работы использовались методы биоорганической химии (методы разделения белка, качественного и количественного определения белка, спектрофотометрические и электрофоретические методы), методы клеточной биологии и инженерии (методы получения первичных культур клеток, гибридом), методы биохимии (колориметрические методы – МТТ, нейтральный-красный, ЛДГ-тест), иммунохимии (метод Оухтерлони, ИФА).

38

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые: выявлена новая фармакологическая активность ряда соединений и экстрактов;

доказано, что экстракты - из растений рода *Convolvulus*, растений *Vinca major* и *Arundo donax*, а также грибов-эндофитов, паразитирующих на растениях рода *Vinca*, обладают избирательной цитотоксической активностью на культурах раковых клеток;

выявлен селективный ингибитор роста клеток рака гортани - N-бензил конвольвин – производное алкалоида конвольвина, выделенного из активного экстракта растения рода *Convolvulus*, который не ингибирует рост клеток рака молочной железы, шейки матки и низкотоксичный для нормальных клеток;

выявлены селективные ингибиторы роста раковых клеток - n-Cl ацетилфенилуксусная кислота, n-Cl-феноксиуксусная кислота и йодметилат фенилгидразона норфлуорокурина;

установлено, что хлорсодержащие алкалоиды, в частности производные конвольвина и винканина, проявляют высокую цитотоксическую активность на культурах раковых клеток на уровне препарата цисплатина;

разработан способ получения культур мезенхимальных клеток; доказано, что фитостероид - экдистерон увеличивает пролиферацию «нормальных» клеток кожи – фибробластов и кератиноцитов, и не вызывает пролиферацию клеток рака гортани, рака молочной железы и шейки матки; установлено, что экдистерон совместно с аллофибробластами способствует увеличению пролиферации аутоэпидермоцитов и эпителизации ткани, что может быть использовано в терапии ожоговых ран; получены гибридомы – продуценты моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину.

Практические результаты исследования заключаются в следующем: разработаны оптимальные методы получения культур мезенхимальных клеток;

проведён скрининг экстрактов и индивидуальных соединений, из которых выявлены ингибиторы роста раковых клеток с избирательной активностью и пролифератор роста клеток кожи;

определены дозы биологической активности и токсичности соединений;

разработан эффективный способ лечения ожоговых ран IIIA степени; получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к эритропоэтину;

разработан способ выделения эритропоэтина, как природного, так и рекомбинантного на основе полученных моноклональных антител к эритропоэтину.

Достоверность результатов исследования. Результаты работы подтверждены применением современных аналитических и статистических методов. Подтверждением полученных результатов служат и экспертные

39

оценки специалистов, и практическая реализация результатов исследований, обсуждение результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, а также публикация результатов исследований в рецензируемых научных изданиях и получение патентов.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Результаты исследований, представленные в работе, имеют несомненно, как фундаментальное, так и прикладное значение. Отобранные из большого количества экстрактов и индивидуальных соединений активные ингибиторы и пролифераторы роста клеток открывают перспективу их углубленного исследования в данных направлениях, выявления их механизма действия.

Налаженные *in vitro* методы доклинического скрининга биологически активных веществ, лекарственных препаратов по международным принципам надлежащей лабораторной практики (GLP), позволяют быстро и экономично проводить оценку цитотоксичности новых соединений и препаратов.

Выявленные экстракты и индивидуальные соединения, ингибирующие рост раковых клеток с низкой цитотоксичностью для нормальных клеток, предложены для *in vivo* исследований на противоопухолевую активность (заявки на патенты № IAP20130222, № IAP20130304, № IAP 20140170, № IAP20140182).

Предложенные в работе способы получения культур клеток кожи и тканеинженерных конструкций, и использование их в терапии ожоговых ран значительно ускоряют эпителизацию глубоких повреждений кожи (заявка на патент РУз. № IAP20120160).

Внедрение результатов исследования. На основании полученных данных по скринингу биологически активных соединений на цитотоксичность и получению моноклональных антител:

получены два субклона гибридных клеток и получен патент на изобретения Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (16.12.2002, № IAP 02943), которые продуцируют моноклональные антитела к эритропоэтину. В результате исследования полученные антитела использованы в качестве иммуносорбента для очистки эритропоэтина;

выявлена новая биологическая активность алкалоида N-бензил

конвольвина и защищены патентом изобретения РУз (16.02.2012г. № IAP 04965). В результате исследования полученное соединение предложено в качестве селективного ингибитора роста клеток рака гортани при низкой цитотоксичности для нормальных клеток.

Получена аккредитация от Узстандарта на проведение оценки цитотоксичности медицинских изделий и лекарственных средств, поступающих на рынок страны (свидетельство об аккредитации №UZ.AMT.07.MAI.220).

Утверждены Методические Рекомендации «Оценка цитотоксичности лекарственных средств, изделий медицинского назначения, косметических

40

средств, химических соединений, пестицидов и средств для ветеринарии» (начальником Главного управления науки и учебных заведений МЗ РУз, №8Н-Р/18 от 02.03.16г.).

Апробация результатов исследования. Результаты исследований по теме диссертации изложены в виде докладов и прошли апробацию на 10 международных и республиканских научно-исследовательских конференциях, в частности на конференциях молодых ученых (Ташкент, 2004, 2009, 2010, 2011, 2012), на международном съезде биотехнологов (Пушино, Россия, 2006), на 7th и 10th International Symposium of Chemistry of Natural Compounds (Tashkent, 2007, 2013), на 3rd International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients (Urumqi, China, 2012), на 11th International Symposium of Chemistry of Natural Compounds (Turkey, 2015).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 28 научных работ, из них 2 патента РУз, 14 научных статей, в том числе 11 в республиканских и 3 в международных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объём диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырёх глав, заключения, списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 227 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Современные аспекты применения культур клеток для решения научных и прикладных задач медицины, биологии, химии»** приведён обзор литературы, включающий общие сведения о культурах клеток, методах их культивирования и применения, о цитотоксической активности экстрактов и индивидуальных соединений на различных культурах клеток, о способах выявления ингибиторов и пролифераторов роста клеток, о современных противоопухолевых препаратах. Кроме того, приведены данные и исследования по применению культур клеток в регенеративной медицине. Отдельные подглавы посвящены гибридной технологии, а также гормону эритропоэтину и препаратам на

его основе.

Во второй главе диссертации **«Материалы, условия и методы биоорганической химии, биотехнологии и клеточной биологии, использованные в работе»** приведены материалы, использованные в работе, и методы, в частности, методы биоорганической химии (гель-фильтрация, иммунообменная и аффинная хроматографии, спектрофотометрия, электрофорез и др. методы качественного и количественного определения белка), методы клеточной биологии и инженерии (методы получения культур клеток, гибридом и тканеинженерных конструкций), методы биохимии (колориметрические методы – МТТ, нейтральный-красный, ЛДГ-тест) и иммунохимии (метод Оухтерлони, ИФА).

В третьей главе диссертации **«Изучение цитотоксической и пролиферативной активности экстрактов и индивидуальных соединений»** обсуждаются результаты получения и культивирования нормальных и злокачественно трансформированных клеток, результаты проведения скрининга на данных культурах, как экстрактов, так и индивидуальных соединений на цитотоксическую и пролиферативную активности, а также исследования по применению культур клеток в регенеративной медицине.

Для работы использованы культуры нормальных клеток фибробластов, кератиноцитов и гепатоцитов, которые получали неферментативным методом экспланта. При этом данный метод был оптимизирован нами путем кондиционирования сред культивирования двумя процентами среды, снятой с конфлюэнтной культуры фибробластов, богатой ростовыми факторами (EGF - эпидермальный фактор роста, FGF - фактор роста фибробластов, KGF

42

- фактор роста кератиноцитов и др.) и матричными белками (коллагены I и III типов, эластин и др.).

Основные преимущества оптимизированного нами способа получения

культур клеток заключаются в том, что получается пул «юных» жизнеспособных и пролиферативно активных клеток, кроме того нет необходимости в фидерном слое и в целом ряде коммерческих добавок.

Данный способ получения культур нормальных клеток экономичен и высокопродуктивен, монослой образуется из клеток одного возраста, далёкого от лимита Хейфлика, что важно для регенеративной медицины.

Таким образом, нами получены культуры клеток фибробластов - ККФ человека, дермы кролика, мышцы, крыс и эмбрионов крыс (рис. 1), получены первичные культуры кератиноцитов кожи - ПКК человека и кролика, и культуры клеток гепатоцитов крыс - ПКГ (рис. 2).

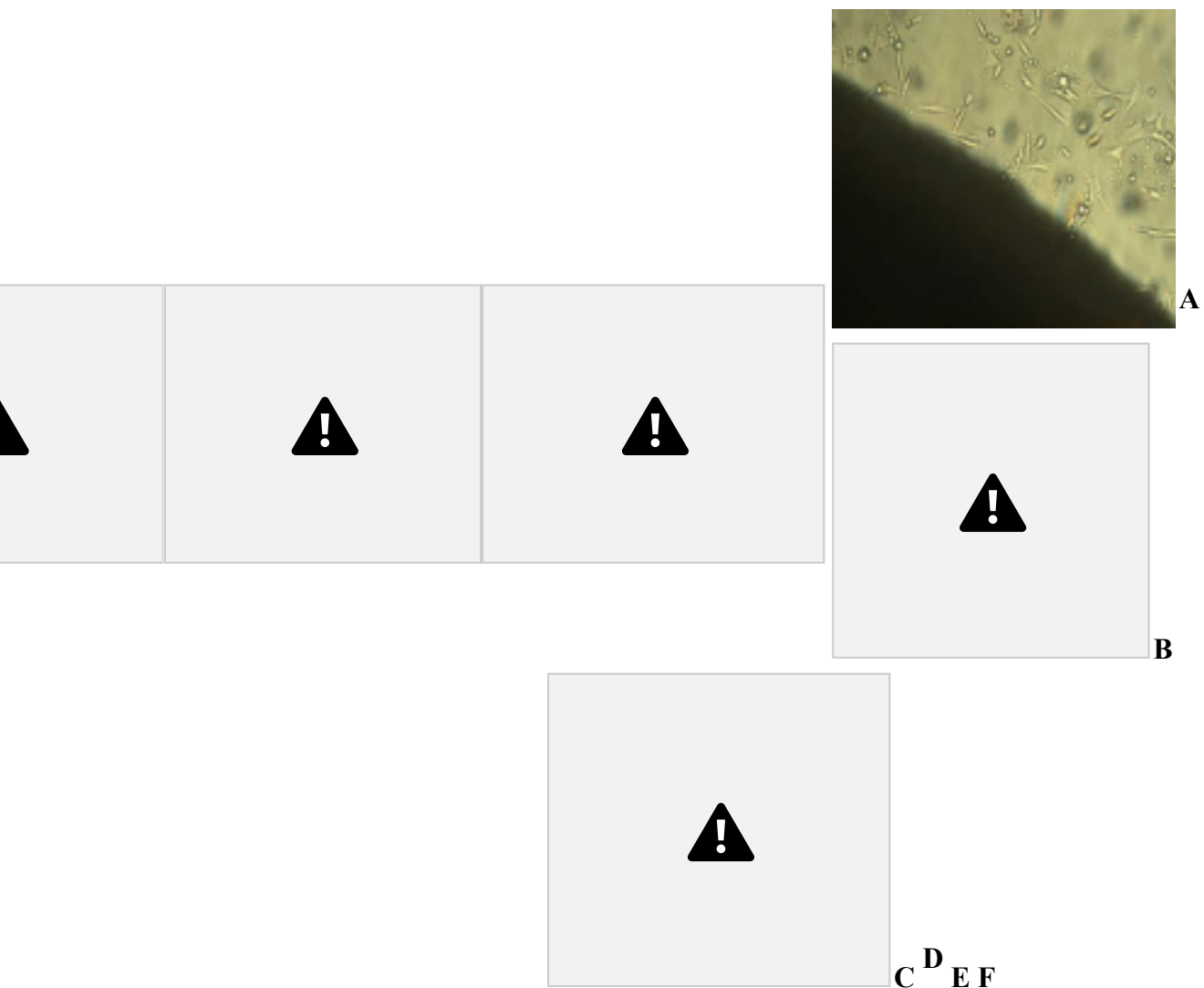
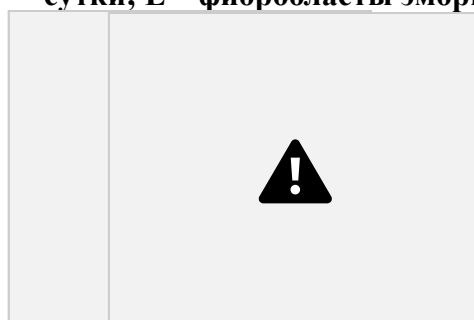


Рис. 1. Культура клеток фибробластов: А – эксплант дермы человека на 3 сутки культивирования; В – монослой фибробластов человека на 10 сутки; С – монослой фибробластов кролика на 10 сутки; D – фибробласты дермы крыс на 10 сутки; E – фибробласты эмбриона крысы на 10 день культивирования; F - фибробласты эмбриона крысы на 10 день культивирования; ок. $\times 10$, об. $\times 10$.



А В

Рис. 2. ПКК человека (А) на 20 день культивирования и ПКГ крыс на 3 день культивирования (В), ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

43

Морфологические исследования полученных культур показали, что ПКК представлены эпителиоподобными клетками, ККФ - фибробластоподобными клеткам (см. рис. 1,2), а клетки гепатоцитов содержали 1-2 крупных ядра, что соответствует литературным данным. Культуры клеток пригодны как для доклинического *in vitro* скрининга химических соединений, лекарственных препаратов и медицинских изделий, так и для регенеративной медицины.

Для скрининга экстрактов и индивидуальных соединений на цитотоксическую и пролиферативную активности нами были использованы верифицированные линии раковых клеток, полученные из банка клеточных культур Института цитологии РАН, такие как HeLa – клетки карциномы шейки матки, HBL-100 – клетки рака молочной железы и HEP-2 – клетки рака гортани (в сотруд. с Хашимовой З.С., Терентьевой Е.О.).

Скрининг соединений осуществляли также и на нормальных культурах клеток. ККФ использовали в работе на 5-7 пассажах, а ПКГ на 1 пассаже, при достижении 80% конfluence. Скрининг метаболического состояния клеток оценивали по следующим показателям: 1) снижению суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ в микротетразолиевом колориметрическом тесте Мосмана – МТТ-тест; 2) уменьшению эндоцитоза витального красителя нейтрального красного, коррелирующему с лизосомальной функцией - нейтральный-красный тест; 3) активности в среде инкубации цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, который может быть использован как маркер нарушения целостности плазматической мембраны (ЛДГ-тест). В качестве препарата сравнения использовали противоопухолевый препарат «Цисплатин–Тева», (Pharmachemie, B.V., Нидерланды). В качестве контроля служили интактные клетки.

Проведён скрининг на цитотоксичность экстрактов растений рода *Vinca*, полученных в ИХРВ АН РУз. Известно, что растения данного рода содержат винкаалкалоиды, большая часть которых проявляют противоопухолевую активность (R.Berges, 2014, V.Rai, 2014). К примеру, противоопухолевые препараты «Винкристин», «Винбластин» относятся к винкаалкалоидам. В этой связи была исследована цитотоксическая активность экстрактов из наземной и корневой частей растения *Vinca major* (табл. 1).

Таблица 1

Цитотоксическая активность экстрактов
***V. major*, % ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)**

Экстракты, мкг/мл	HeLa		HEp-2		ККФ	
	100	10	100	10	100	10
из наземн. <i>V. major</i>	71±2,9*	30±2,2	77±3,04*	43±2,49	40±0,5*	19±0,1
из корней <i>V. major</i>	73±5,61*	50±4,38*	67±4,09*	5±0,05	30,4±0,1	0
Цисплатин –Тева	97,5±2,4	70±2,31*	89±0,28*	51±1,2 *	100±9,5*	72±3,1*
Контроль	0	0	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; *-достоверное отличие от контроля $P < 0,01$

44

Установлено (см. табл 1), что из изученных экстрактов наибольшую цитотоксическую активность проявил экстракт из корней растения *Vinca major*. Данный экстракт в концентрации 10 мкг/мл ингибировал рост клеток рака шейки матки, не подавляя рост нормальных клеток и интересен для дальнейших исследований методами *in vivo*.

Исходя из полученных данных, мы сочли интересным провести скрининг экстрактов грибов эндофитов, паразитирующих на растениях рода *Vinca*. Так нами была изучена цитотоксическая активность восьми экстрактов грибов штаммов *Solerotium sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Acremonium sp* и *Aspergillus tureus*, паразитирующих на растениях *Vinca minor* и *Vinca erecta*, выделенных в институте микробиологии АН РУз (под рук. Т.Г.Гулямовой). Данные экстракты могут содержать винкаалкалоиды и подавлять рост раковых клеток (табл. 2).

Таблица 2
Цитотоксическая активность экстрактов грибов эндофитов,
% ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)

Экстракты мкг/мл	HeLa			HEp-2			HBL-100			ПКГ	
	100	10	1	100	10	1	100	10	1	10	1
Solerotium sp Лист <i>V. minor</i>	51± 6,2	20,5 ±0,2	0± 0,1*	43± 1,8	30,5 ±0,3	21± 0,6	73,5 ±8,8	47± 1,6	29± 0,9	40± 4,9	12± 2,0
Penicillium sp Стебель <i>V. minor</i>	24± 0,4	19,5 ±2,1	6± 0,1*	64± 3,3	61± 6,8	28± 0,1	72± 7,6	43± 4,2	40± 2,5	32± 3,7	9± 0,9
Acremonium sp Лист <i>V. minor</i>	37,5 ±1,5	6,0 ±0,3	0	36± 1,2	5± 0,1*	3± 0,2*	53± 1,3	27± 1,0	25± 0,6	20± 3,2	8± 1,5
Alternaria sp	82±	6,5±	1±	36±	26±	11±	91±	47±	32±	76±	54±

лист <i>V. minor</i>	8,6	0,6	0,1*	0,9	1,9	0,1	7,5	3,8	3,2	9,5	6,2
Aspergillius tureus Корень <i>V. erecta</i>	51± 4,2	44± 3,6	9± 0,1*	53± 4,9	45,5 ±3,1	32± 0,9	56± 3,1	54± 3,1	49± 3,0	34± 3,1	12± 2,2
Penicillium sp корни <i>V. erecta</i>	36± 2,5	6,0± 0,1*	0	27± 0,6	20± 0,9	8±0, 1*	54± 2,4	50± 5,3	32± 1,2	29± 4,5	13± 2,9
Penicillium sp лист <i>V. erecta</i>	72,5 ±8,2	48± 4,6	39± 1,3	90± 9,7	39± 1,2	37,5 ±1,2	79± 9,8	54± 4,7	45± 3,2	24± 3,8	16± 2,5
Alternaria sp лист <i>V. erecta</i>	54,5 ±2,5	28,5 ±2,2	13± 0,2	47,5 ±2,8	27± 0,8	13± 0,1	66± 5,2	64± 5,1	48± 2,8	50± 5,7	19± 2,7
Цисплатин-Тева	99± 2,6	78± 1,9	32± 2,6	99,5 ±1,8	60± 1,6	41± 0,9	93± 4,9	76± 2,9	49± 0,3	98± 5,9	49± 3,3
Контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля P<0,05; * P<0,01.

Как видно из таблицы 2, в низких концентрациях 1-10 мкг/мл наибольшую ингибирующую активность на раковых культурах клеток проявили экстракты *Alternaria sp* (лист *V. erecta*), *Penicillium sp* (лист *V. erecta*) *Aspergillius tureus* (корень *V. erecta*) и *Penicillium sp* (стебель *V. minor*), которые в сравнение с противоопухолевым препаратом проявили низкую цитотоксическую активность на культуре нормальных клеток гепатоцитов. Следует отметить, что из данных экстрактов избирательную цитотоксическую активность проявил экстракт грибов *Alternaria sp* лист (*V.*

45

erecta) в концентрации 1 мкг/мл, так как в большей степени подавлял рост клеток рака молочных желез - HBL-100. Экстракт грибов *Alternaria sp*, паразитирующих на листьях растения *Vinca erecta*, можно предложить для углубленных исследований *in vivo*.

Далее был проведён скрининг на цитотоксичность сумм алкалоидов (СА), полученных в ИХРВ АН РУз (под рук. С.Ф.Ариповой), из растений, входящих в список Cragg – список растений канцеролитиков.

Была исследована цитотоксическая активность СА из растения *Convolvulus krauseanu*, СА из растения *Buxus Semperviren L.* и СА из корневой части растения *Arundo donax* (табл. 3).

Таблица 3

Цитотоксическая активность сумм алкалоидов,
% ингибирования роста клеток (M ± m, n = 9)

Вещества	HeLa	HEp-2	ККФ
----------	------	-------	-----

мкг/мл	100	10	100	10	100	10
СА из корней <i>Arundo d.</i>	100±3,54	43±2,35*	100±6,72	55±2,53	39±1,5*	0
СА из <i>C. krauseanus</i>	46,5±2,7	7±0,8*	60,8±3,9	43,6±0,5	100±9,3*	0
СА из <i>B.Sempervirens</i>	99,4±5,5	17±1,05*	97,8±7,7	4,2±0,03	100±11,2	36±2,4*
Цисплатин –Тева	97,5±2,4	70±2,31*	89±0,28*	51±1,2 *	100±9,5*	72±3,1*
Контроль	0	0	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; * $P < 0,01$.

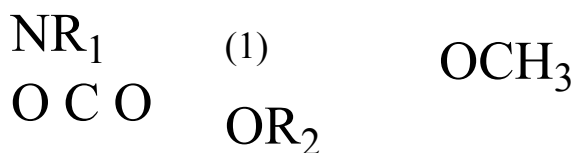
Установлено, что из изученных СА наибольшую цитотоксическую активность проявили СА корней растения *Arundo donax* и СА из растения *C. krauseanus*, ингибирующие рост раковых клеток и не подавляющие рост нормальных клеток. При этом СА из растения рода *Convolvulus* в концентрации 10 мкг/мл подавляла рост клеток рака гортани почти на 50%, не ингибируя рост других исследуемых клеток. В этой связи перспективными для дальнейших исследований методами *in vivo* на противоопухолевую активность являются СА из растений рода *Convolvulus* и корней растения *Arundo donax*.

Из сумм алкалоидов растений рода *Convolvulus* (*C. subhirsutus*, *C. krauseanus*, *C. pseudocanthabrica*) в ИХРВ АН РУз (под рук. С.Ф.Ариповой) были выделены тропановые алкалоиды, получены их химические производные. Данные соединения исследованы нами на цитотоксичность.

Четыре алкалоида - конвольвин (1), конволидин (2), конволинин (3) и филлальбин (4) выделены из растений рода *Convolvulus*. N-бензил конвольвин (5) и N-хлорацетил конвольвин (6) - являются синтетическими аналогами конвольвина.

Все соединения по структуре имеют общий скелет тропана (8-азабициклооктана), являются сложными эфирами аминспирта тропина и вератровой (конвольвин, конволинин) или ванилиновой (конволидин) кислот и отличаются лишь заместителем при атоме азота:

46



1. $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ 2. $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$ 3. $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ 4. $\text{R}_1 = \text{CH}_3$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ 5. $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ 6. $\text{R}_1 = \text{COCH}_2\text{Cl}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3$

Первоначальный скрининг алкалоидов был проведен при концентрации 100 мкг/мл на четырёх типах клеток – HeLa, HEp-2, ККФ и ПКГ (табл. 4).

Таблица 4

Цитотоксическая активность алкалоидов в концентрации 100 мкг/мл, % ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)

Вещества	HeLa	HEp-2	ККФ	ПКГ
<i>Конвольвин</i>	83,0±0,12	99,1±0,24	100±0,17	100±0,25
<i>N-бензил конвольвин</i>	90,3±0,22	100±0,23	100±0,28	100±0,71
<i>Конволинин</i>	35,0±0,12	79,0±0,32	65,5±0,31	89±4,2
<i>Конволидин</i>	27,0±0,35	20,0±0,12	100±0,41	98±2,5
<i>N-хлорацетил конвольвин</i>	100±0,24	98±0,11	100±0,13	100±2,4
<i>Филлальбин</i>	44±0,15	15±0,2	0	14±1,2
<i>Цисплатин-Тева</i>	100±0,2	100±1,5	100±0,5	100±2,5
<i>Клетки без веществ</i>	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$.

Как видно из таблицы 4, высокую цитотоксическую активность по отношению к раковым и нормальным клеткам показали алкалоид конвольвин $R_1 = H$, $R_2 = CH_3$ (1) и его производные: N-бензил конвольвин $R_1 = CH_2-C_6H_5$, $R_2 = CH_3$ (5) и N-хлорацетил конвольвин $R_1 = COCH_2Cl$, $R_2 = CH_3$ (6). В то время как алкалоид филлальбин (4) $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$ в концентрации 100 мкг/мл ингибировал в большей степени рост клеток рака шейки матки и был в 2-4 раза менее цитотоксичен для других клеток в эксперименте. Следовательно, группировка - $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$ в структуре соединений предотвращает токсическое действие данного соединения на исследуемые культуры клеток.

Наибольший интерес для практической медицины имеют вещества, активные в низких и очень низких концентрациях. В наших экспериментах мы также исследовали эти же соединения в концентрации 10 мкг/мл (табл. 5).

Таблица 5

**Цитотоксическая активность алкалоидов в концентрации
10 мкг/мл, % ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)**

Вещества	HeLa	HEp-2	ККФ	ПКГ
<i>Конвольвин</i>	15,4±0,17	8,0±0,13	100±0,24	88±6,2
<i>N-бензил конвольвин</i>	35,0±0,25	81,6±0,28	39,0±0,22	42±3,1
<i>Конволинин</i>	0*	11,0±0,25	0*	8±0,02*
<i>Конволидин</i>	33,0±0,22	28,0±0,31	35,0±0,22	24±2,2
<i>N-хлорацетил конвольвин</i>	99,7±0,22	97±0,33	100±0,22	100±3,6
<i>Филлальбин</i>	0*	0*	Пролиф.*	0*
<i>Цисплатин-Тева</i>	88,6±1,2	91±0,5	78±0,4	82±1,6
<i>Контроль</i>	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; * - достоверное отличие от контроля $P < 0,01$.

Установлено, что наибольшую активность на культурах раковых клеток HeLa и HEp-2 в концентрации 10 мкг/мл или 26,3 мМ/л и 27,3 мМ/л соответственно, проявили алкалоиды N-бензил конвольвин (5) и N-хлорацетил конвольвин (6). Алкалоид N-хлорацетил конвольвин (6) показал высокую цитотоксическую активность по отношению ко всем типам клеток в эксперименте и был более цитотоксичен, чем коммерческий противоопухолевый препарат цисплатины (летальная доза LD_{50} цисплатина для человека равна 2,2 мг/кг). Следовательно, группировка - $R_1 = COCH_2Cl$, $R_2 = CH_3$ в структуре соединений значительно повышает токсическое действие соединения на исследуемые культуры клеток.

Алкалоид N-бензил конвольвин избирательно подавляет рост клеток рака гортани $IC_{50} = 12,3$ мМ/л (4,7 мкг/мл) и в 3 раза менее токсичен для нормальных клеток. IC_{50} N-бензил конвольвина для нормальных клеток составляет 32,8 мМ/л (12,5 мкг/мл). LD_{50} пересчитанная нами из показателя IC_{50} составляет 12,0-13,0 мг/кг при внутривенном введении, а терапевтическая концентрация может находиться в пределах 4,4-5,0 мг/кг,

при которой данное соединение способно угнетать рост карциномы гортани, что необходимо исследовать *in vivo*.

Далее нами изучены индольные алкалоиды и их производные с фенилгидразином (пиразолы). Так, известны синтетические производные пиразолов, обладающие цитотоксической активностью по отношению к клеткам рака ободочной кишки (патент RU 2305545, 2006) и производные фенилгидразина ингибирующие рост клеток рака молочных желез и печени (О.М.Нafez, 2014).

Профессором А.Х.Юлдашевым выделен индольный алкалоид норфлуорокумарин $C_{19}H_{20}N_2O$ (винканин) из корней *Vinca erecta* и синтезировано сложное соединение пиразола, которое образовалось в результате реакции норфлуорокумарина с фенилгидразином – гидразон норфлуорокумарина $C_{25}H_{26}N_4$. При взаимодействии данного соединения с соляной кислотой образуется хлоргидрат фенилгидразона

48

норфлуорокумарина $C_{25}H_{27}N_4Cl$, а с йодистым метилатом - йодметилат фенилгидразона норфлуорокумарина $C_{26}H_{29}N_4I$ (рис. 3).

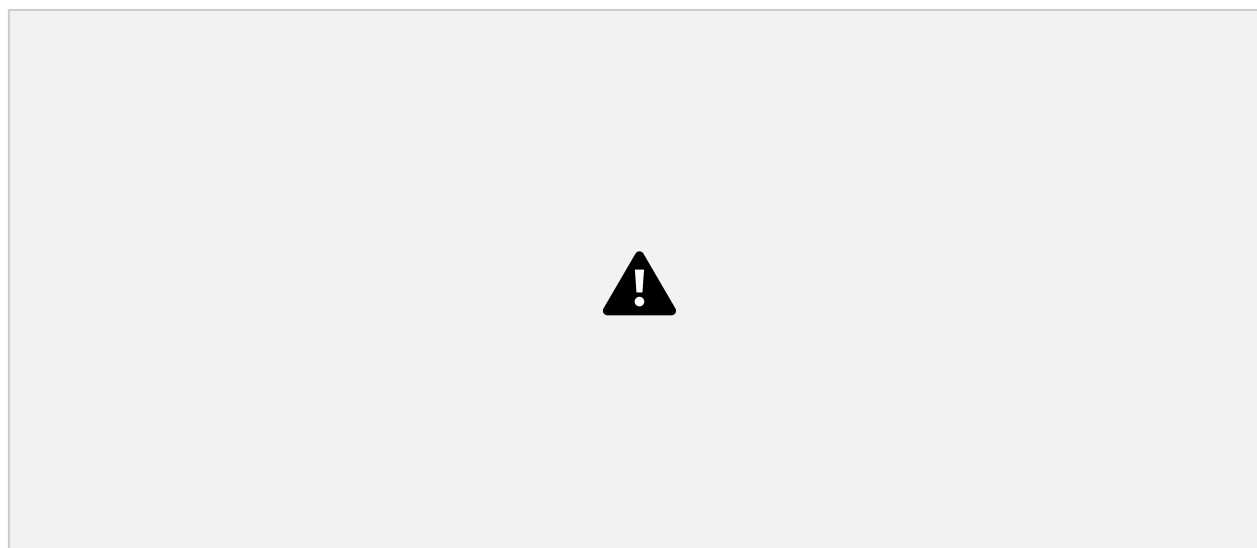


Рис. 3. Производные пиразола: 1 - йодметилат фенилгидразона норфлуорокумарина, 2 - хлоргидрат фенилгидразона норфлуорокумарина.

Данные соединения изучены на цитотоксическую активность. В результате установлено, что исходные соединения – гидразон норфлуорокумарина и фенилгидразин не проявили искомой активности в отличие от их производных (табл. 6).

Таблица 6

Цитотоксическая активность производных фенилгидразина и норфлуорокумарина, % ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)

Вещества Мкг/мл	HeLa			HEp-2			HBL-100			ККФ		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1	100	10	1
$C_{25}H_{27}N_4Cl$	83,5 ±8,2	53 ±3,9	38 ±4,2	89 ±12,2	45 ±4,9	32 ±1,6	91,6 ±2,1	36,9 ±0,2	27,8 ±0,9	100 ±6,0	41 ±7,2	29 ±0,9
$C_{26}H_{29}N_4I$	60 ±6,7	45 ±2,5	11 ±1,3	72 ±3,1	55 ±8,8	31 ±1,8	49 ±0,1	40 ±0,5	38,± 1,1	96,7 ±5,2	0	0
$C_{25}H_{26}N_4$	67± 5,4	30± 1,9	10± 0,6	24± 4,4	10,5 ±0,9	9±0,9	39 ± 3,2	27 ± 2,1	14±1 ,5	98 ± 7,2	60 ± 3,1	34 ± 0,5
Фенилги др азин	100± 15,5	99± 1 8	54±23	99± 21,5	82± 11	37± 5,9	78±5 ,0	54 ± 3,5	44 ± 2,5	100± 22	85±1 3	74 ± 9,5
Цисплат ин –Тева	100 ±7,1	72 ±2,2	33 ±1,9	100 ±11,2	79 ±4,4	23,5± 2,5	70±0 ,3	60±0 ,5	54±0 ,1	100 ±11	69 ±7,5	34 ±2,1
Контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$.

Как видно из таблицы 6, хлоргидрат фенилгидразона норфлуорокуarina $C_{25}H_{27}N_4Cl$ в концентрации 24 мМ/л (10 мкг/мл) подавляет рост раковых клеток всех изученных типов почти на 50% и низкотоксичен для нормальных клеток, по сравнению с препаратом Цисплатин. LD_{50} $C_{25}H_{27}N_4Cl$ составляет 7,7-12,5 мг/кг. Йодметилат фенилгидразона норфлуорокуarina $C_{26}H_{29}N_4I$ в концентрации 19,1 мМ/л (10

49

мкг/мл) не токсичен для фибробластов, но подавляет рост всех раковых клеток в эксперименте. LD_{50} $C_{26}H_{29}N_4I$ находится в пределах 48-52 мг/кг, а ожидаемая терапевтическая доза - 10 мг/кг, при которой данное соединение способно подавлять рост карциномы гортани на 50%, рост клеток рака молочной железы и шейки матки почти на 40%.

Выявлено также, что более цитотоксически активное соединение хлоргидрат фенилгидразона норфлуорокуarina не вызывало «утечки» цитозольного фермента ЛДГ, т.е. повреждения мембран не наблюдалось, в то время как другое производное йодметилат фенилгидразона норфлуорокуarina повреждало мембраны раковых клеток в концентрациях 1-10 мкг/мл, как и противоопухолевый препарат цисплатин.

Таким образом, наибольшей цитотоксической активностью, как по отношению к культурам раковых клеток, так и по отношению к клеткам фибробластам, обладает хлоргидрат фенилгидразона норфлуорокуarina, т.е. абсолютно неизбирателен, в то время как йодметилат фенилгидразона норфлуорокуarina действует более избирательно, в частности в

концентрации 1-10 мкг/мл (1,91-19,1 мМ/л) он подавляет рост раковых клеток и нетоксичен для нормальных клеток фибробластов. Оба производных могут быть исследованы методами *in vivo*, как перспективные компоненты противоопухолевых препаратов.

Помимо химических соединений природного происхождения перспективными в плане создания эффективных противоопухолевых препаратов являются соединения синтетического происхождения. В литературе описан синтезированный смешанный ангидрид дихлоруксусной и аминоксусной кислот, обладающий низкой цитотоксичностью по отношению к нормальным клеткам, но при этом ингибирующий рост карциномы молочной железы 755 (патент RU № 2429224, 2009г.). Также синтезирован ряд производных фенилуксусной кислоты, которые предлагаются для лечения неоплазии, образующейся из эпителиальных клеток (Б.С.Федоров, 2009г.).

В этой связи нами изучены на цитотоксическую активность производные фенил- и феноксиуксусных кислот, синтезированные в лаборатории орг. синтеза химфака НУУ (под рук. А.К.Абдушукурова). Так изучены *p*-Cl-ацетилфенилуксусная кислота и *p*-Cl- феноксиуксусная кислота (рис. 4., табл. 7.)



(1) (2) **Рис. 4. Производные фенил- и феноксиуксусных кислот - *p*-Cl ацетилфенилук-сусная кислота (1) и *p*-Cl- феноксиуксусная кислота (2)**

50

Таблица 7

Цитотоксическая активность производных фенокси- и фенилуксусной кислот, % ингибирования роста клеток ($M \pm m$, $n = 9$)

№	Вещества мкг/мл	HeLa		HEp-2		HBL-100		ККФ	
		10	1	10	1	10	1	10	1
	1 <i>p</i> -Cl-ацетилфенилук сусная кислота	13,3± 2,0	41± 1,2	23± 1,2	53± 5,1	60,0 ±1,5	60,0 ±0,9	25± 1,0	16± 0,9
	<i>p</i> -Cl- феноксиуксус ная кислота	4,3± 0,9	0	57± 4,2	43,6± 0,5	33± 0,2	29 ±2,0	15± 0,2	19± 1,1
3	Цисплатин –Тева	68,5± 3,4	35± 2,3	76± 1,3	44± 1,2	76± 4,5	49± 3,0	72± 3,2	45± 2,2
4	контроль	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: достоверное отличие от контроля $P < 0,05$, где в качестве контроля – интактные клетки.

Как видно из таблицы 7, *p*-Cl-ацетилфенилуксусная кислота наибольшую цитотоксическую активность проявила только в очень низкой концентрации - 1 мкг/мл, ингибируя рост всех исследованных раковых клеток, при незначительной цитотоксической активности на нормальных культурах клеток фибробластов по сравнению с препаратом Цисплатин. Производное - *p*-Cl-феноксиуксусная кислота подавляло рост клеток рака гортани в концентрациях 1-10 мкг/мл и при этом обладало меньшей цитотоксичностью по отношению к культурам клеток рака молочной железы и шейки матки, а также к культурам нормальных клеток фибробластов. Кроме того, данные соединения в концентрациях 1 мкг/мл вызывали повреждения плазматических мембран раковых клеток, о чём свидетельствовало появление цитозольного фермента лактатдегидрогеназы в культуральных жидкостях при постановке ЛДГ-теста.

Таким образом, *p*-Cl-ацетилфенилуксусная кислота ингибирует рост клеток рака гортани, рака шейки матки и молочной железы в низкой концентрации 4,7 мМ/л (1 мкг/мл) почти на 50%. LD₅₀ по нашим расчётам составляет 18-22 мг/кг, а терапевтическая концентрация - в пределах 1-10 мг/кг. IC₅₀ *p*-Cl-феноксиуксусной кислоты для клеток рака гортани равна 52 мМ/л (10 мкг/мл), LD₅₀ по нашим расчётам составляет 81-92 мг/кг, а терапевтическая доза - 1-10 мг/кг, при которой данное соединение способно подавлять рост карциномы гортани.

В результате выполнения поставленных задач по первому блоку исследований – **поиску ингибиторов роста раковых клеток**, было выявлено, что суммы алкалоидов из надземной части растения *Convolvulus krauseanus* и из корней *Arundo donax* ингибируют рост клеток рака гортани и низкоцитотоксичны для нормальных клеток; сумма алкалоидов из корней *Vinca major* ингибирует рост клеток рака шейки матки, и не подавляет рост других клеток, в том числе нормальных. Из экстрактов грибов эндофитов, паразитирующих на растениях рода *Vinca* отобраны экстракты с низкой токсичностью для нормальных клеток и высокой токсичностью для раковых клеток - экстракты штаммов грибов *Alternaria sp* (листья *V. erecta*),

51

Penicillium sp (листья *V. erecta*, стебель *V. minor*) и *Aspergillius tureus* (корень *V. erecta*). Из индивидуальных соединений отобраны два низкотоксичных для нормальных клеток селективных ингибитора роста клеток карциномы гортани - N-бензил конвольвин и *p*-Cl-феноксиуксусная кислота, и два неселективных ингибитора роста клеток рака гортани, рака шейки матки и молочных желез - *p*-Cl-ацетилфенилуксусная кислота и йодметилат фенилгидразона норфлуорокураина. Из исследованных индивидуальных соединений два хлорсодержащих соединения - хлоргидрат фенилгидразона норфлуорокураина и N-хлорацетил конвольвин, показали схожую

цитотоксическую активность с известным противоопухолевым препаратом цисплатин и также могут быть изучены на противоопухолевую активность методами *in vivo*.

Далее нами решались задачи по второму блоку исследований – **поиску пролифераторов роста нормальных клеток для регенеративной медицины.**

Известно, что флавоноиды и фитостероиды способны индуцировать биосинтез белка и могут быть хорошими пролифераторами роста нормальных клеток. В этой связи интересно исследовать пролиферативную активность фитостероидов и их суммы (экдистерона и туркестерона, а также аюстана - суммы фитостероидов, иридоидов и других соединений, выделенных из растения *Ajuga turkestanica*), флавоноидов (панаферола из корня *Ferula tenuisecta*, пиносембрина, глабронина и пурнетина из надземной части *Glyssiriza glabra*, цинарозид из надземной части *Ferula varia*), выделенных в ИХРВ АН РУз (под рук. А.У.Маматханова). Исследования проводили на 5-7 пассажах ККФ. Все исследованные флавоноиды и препарат «Аюстан» в концентрациях 0,3-100 мкг/мл не проявили значимой пролиферативной активности, исключение составили фитостероиды туркестерон и экдистерон (табл. 8).

Таблица 8
Пролиферативная активность флавоноидов и фитостероидов на
культуре клеток фибробластов, % живых клеток ($M \pm m$, $n = 3$)

Вещества мкг/мл	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,6	0,8
Аюстан	67±0,1	62±0,22	78±0,3	64±0,11	89±0,22	72±0,21	94±0,23	106±0,3
Туркестерон	125±4,3	130±6,0	142±5,1	178±2,5	159±5,2	130±7,2	100±4,5	100±7,3
Экдистерон	91±8,7	90±3,5	101±4,2	180±9,2	130±5,3	134±9,5	146±7,3	100±5,3
Паноферол	0±0,02*	0±0,2	0±0,1	0±0,05*	0±0,1	0±0,2	48,9±2,3	74±3,3
Пиносембрин	0±0,1*	0±0,05*	0±0,02*	14±0,6	105±8,3	119±4,3	106±9,2	99±4,3
Цинарозид	58±11,2	93±9,3	75±2,1	79±9,7	91,5±6	91,4±6	81,8±6,1	84±7,1
Глабронин	23±4,2	72,9±8	76,3±5	112±1,2	113±9,3	108±11	107±7,2	105±4,5
Пурнетин	0±0,1*	0±0,02*	0±0,01*	47±2,2	135±9,5	122±11	97±7,7	110±5,5
Контроль	100%							

Примечание: *-достоверное отличие от контроля $P < 0,01$; достоверное отличие от контроля $P < 0,05$; где в качестве контроля – интактные клетки.

Как видно из таблицы 8, пик пролиферативной активности туркестерона и экдистерона приходится на концентрацию 12,5 мкг/мл, когда

пролиферация клеток составляет 180%, при этом наблюдается некое плато активности с уменьшением концентрации туркестерона до 10 мкг/мл. В связи с большим количеством противоречивых данных по активностям фитостероидов и учитывая широкий спектр их использования в медицине, спорте и косметологии, нами были проведены исследования пролиферативно активного и широко используемого в медицине фитостероида – экдистерона, на культурах раковых клеток, с целью выяснения степени его безопасности (табл.9).

Таблица 9

Пролиферативная активность экдистерона на культурах раковых клеток, % живых клеток, (M ± m, n = 9, P<0,05)

Мкг/мл	HeLa				HEp-2				HBL-100			
	100	25	12,5	3,12	100	25	12,5	3,12	100	25	12,5	3,12
Экдистерон	54 ± 2,3	62 ± 5,9	62 ± 4,2	65 ± 2,3	72 ± 5,3	80 ± 4,8	87 ± 2,7	74 ± 3,2	100 ± 16,4	100 ± 13,9	97 ± 5,8	69 ± 9,4
Цисплатин	0	0	2,8 ± 0,2	32 ± 2,4	0	0	3 ± 0,2	48 ± 3,1	0	0	0	30 ± 2,9
Контроль	100											

Установлено (см. табл. 9), что экдистерон в исследованных концентрациях 3,12-100 мкг/мл не вызывает пролиферацию раковых клеток и проявляет невысокую цитотоксическую активность на исследованных культурах раковых клеток.

Таким образом, наиболее часто используемый в медицине и спорте фитостероид экдистерон в концентрациях 3,12-100 мкг/мл не вызывает пролиферацию раковых клеток, а потому его можно считать безопасным анаболиком и пролифератором роста нормальных клеток.

Данный пролифератор был использован нами в дальнейших исследованиях. Оптимизированным нами способом были получены культуры клеток фибробластов и кератиноцитов кожи кролика, выделен коллаген IV типа и сконструированы тканеинженерные конструкции следующих типов: 1) на коллагеновом геле культивировались только фибробласты – дермальный эквивалент (ДЭ); 2) на коллагеновом геле культивировали совместно фибробласты и кератиноциты (ДЭ+ПКК); 3) в первую конструкцию ДЭ, в среду культивирования фибробластов добавляли экдистерон в концентрации 12,5 мкг/мл (ДЭ+экдистерон). Все конструкции были нанесены на ожоговые раны с целью выявления наиболее подходящей

для регенеративной медицины конструкции и подтверждения пригодности наших культур клеток для данных целей.

Для этого на выбритую холку усыпленным медицинским эфиром тринадцати кроликам с помощью специального электрического прибора наносили термические ожоги IIIA степени площадью 3 см², по 4 ожога каждому животному. После очистки ран от омертвевших тканей и обработки антисептическим раствором на раны были имплантированы

тканеинженерные конструкции. При этом на одну из четырёх ран каждому

53

животному наносили только ДЭ, на вторую – ДЭ+экдистерон, на третью – ДЭ+ПКК. На последнюю рану ничего не наносили – контроль. Трём кроликам с такими же ранами, обработку ран осуществляли раствором экдистерона (12,5 мкг/мл) в среде ДМЕМ/F12.

Результаты эксперимента по регенерации ожоговых ран представлены в таблице 10.

Таблица 10

Влияние ДЭ и фитоэкдистероида на изменение площади ран и сроков заживления ($M \pm m$, $n = 10$, $P < 0,05$)

Условия опыта	Средняя площадь раны, см ²				Срок регенерации ран
	5-е сутки	10-е сутки	15-е сутки	20-е сутки	сутки
ДЭ	2,3±0,09	1,3±0,11	0,9±0,08	0,6±0,06	22,9±1,1
ДЭ+экдист.	2,2±0,13	1,2±0,07	0,7±0,06	0,2±0,09	20,1±0,2
ДЭ + ПКК	2,2±0,11	1,2±0,12	0,6±0,09	0,1±0,09	19,9±0,2
Экдистерон	2,7±0,5	1,9±0,2	1,6±0,05	1,1±0,03	33±0,1
Контроль	2,9±0,14	2,2±0,16	1,9±0,02	1,5±0,07	38,9±0,6

Примечание: сроки заживления указаны до полной эпителизации ран.

Как видно из таблицы 10, не обработанные контрольные раны зажили в среднем за 38,3-39,5 дней, в то время, как раны с тканеинженерными конструкциями зажили в 2 раза быстрее. При этом сложная конструкция, состоящая из коллагена, фибробластов и кератиноцитов (ДЭ+ПКК) способствовала регенерации ткани за схожие сроки (на 18,4 – 19,4 суток раньше контрольных) с конструкцией, состоящей только из коллагена и фибробластов, но с добавлением в среду культивирования экдистерона (ДЭ+экдистерон). В то время как по отдельности ДЭ и экдистерон действовали менее эффективно на процесс регенерации. Раны, обработанные только ДЭ, зажили на 15,5 – 16,5 суток раньше ран, ничем не обработанных (контрольных), раны, обработанные экдистероном, зажили на 5,4 – 6,4 суток раньше контрольных.

Таким образом, опыт *in vivo* показал, что использование в регенеративной медицине тканеинженерных конструкций совместно с экдистероном, активно стимулирует регенераторные процессы кожи реципиента, раны заживают в 2 раза быстрее необработанных ран, и полученные нами культуры клеток кожи пригодны для регенеративной медицины. Кроме того, использование для данных целей упрощённой конструкции, состоящей только из фибробластов на коллагеновой подложке, но культивированных в среде с экдистероном (ДЭ+экдистерон) по эффективности сопоставимо с использованием более дорогостоящей и трудоёмкой конструкции с кератиноцитами - ДЭ+ПКК. В этой связи использование для лечения ожоговых ран и других длгонезаживающих ран тканеинженерной конструкции из коллагена и фибробластов, культивированных в среде с экдистероном, считаем наиболее оптимальным.

В четвёртой главе диссертации **«Получение моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину и их применение»** приведены

54

результаты получения моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину, создания на основе полученных антител иммуносорбента и выделения природного ЭПО человека.

Гемопоэтический фактор роста - ЭПО, участвует в регуляции продукции эритроцитов. Препараты на основе ЭПО по рекомендации ВОЗ входит в стандарт лечения онкобольных, проходящих химио- и радиотерапию, и для лечения анемий другой этиологии. МКАТ-ЭПО применяют для создания диагностических тест-систем, выявляющих содержание ЭПО в биологических жидкостях.

В связи с широким спектром использования рЭПО и антител к нему, мы сочли актуальным получить МКАТ-ЭПО методом гибридной технологии, с целью применения их как для создания тест-систем к ЭПО, так и для использования их в качестве биосорбента для очистки в дальнейшем рЭПО.

Известно, что гибридомы получают путем слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных с клетками миеломных штаммов. В этой связи первостепенной задачей является подготовка агентов для слияния. Учитывая, что ЭПО вырабатывается всеми млекопитающими, достаточно сложно подобрать схему иммунизации животных.

Нами отработана оптимальная схема иммунизации мышей линии BALB/c рекомбинантным эритропоэтином, дающая наибольший титр антител к эритропоэтину. Так мышам массой 15-20 г трехнедельного возраста мы внутрибрюшинно вводили 0,5 мл суспензии рЭПО «Recormon» (Roche, Швейцария), содержащей 4 мкг белка с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ), через неделю процедуру иммунизации повторяли с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ). Через два цикла иммунизации, мышей иммунизировали рЭПО, адсорбированным на полиакриламидном геле в присутствии 15% додецилсульфата натрия (гель-рЭПО). Затем через неделю мышам бустерно

вводили 0,1 мл (9,8 мкг) рЭПО в хвостовую вену и тестировали. Параллельно иммунизировали мышей линии BALB/c рЭПО по стандартной схеме, при которой внутрибрюшинно вводили поочередно суспензии рЭПО с ПАФ и НАФ, затем бустерно вводили 9,8 мкг рЭПО и тестировали. После каждого цикла и по окончании иммунизации отбирали сыворотку крови иммунизированных животных и определяли титр антител к ЭПО методом Оухтерлони (двойная диффузия в геле). Конечный титр антител составил 1:512 при модифицированной нами схеме иммунизации, в то время как при стандартной схеме иммунизации титр ниже в 4 раза (1: 128).

Далее были получены гибридомы путем слияния в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) клеток мышинной миеломы X Ag 8.653 со спленоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных рЭПО по отработанной схеме.

После окончания процедуры слияния осадок клеток ресуспендировали в селективной среде ГАТ (гипоксантин, амидоптерин, тимидин), в которой неслившиеся с лимфоцитами клетки миеломы погибают. Суспензию клеток рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты, на которые за сутки до

55

слияния высаживали макрофаги сингенных мышей (фидерный слой), и культивировали в CO₂-инкубаторе. Клоны гибридных клеток появлялись через неделю. Из 192 рассеянных лунок в 45 наблюдали образование гибридом (рис.5).

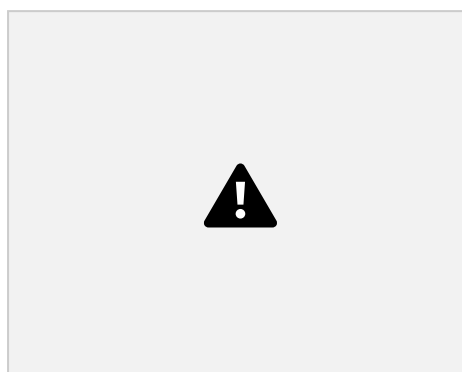


Рис. 5. Образование колоний гибридных клеток (3-5 день после слияния клеток мышинной миеломы X Ag 8.653 со спленоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных рЭПО), ок. $\times 10$, об. $\times 40$

Через 3 недели после слияния ГАТ-среду заменяли на ростовую среду без селективных добавок, а на 14-ый день после слияния выявляли клоны продуценты антител к рЭПО методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на полистироловых планшетах для ИФА с иммобилизованным рЭПО. Образование комплекса антиген – антитело выявляли с помощью меченных пероксидазой анти-IgG мыши. Результат измерения считали положительным, если значение оптической плотности (ОП) образца в два и более раз превышало значение ОП отрицательного

контроля. После тестирования выявлено 12- гибридом - продуцентов МКАТ ЭПО. Из 12 лунок, содержащих гибридомы-продуценты, рассеивали гибридные клетки в концентрации 3-5 клеток в лунку (в лунки предварительно высаживали макрофаги). Через 7-10 дней проводили скрининг аликвот культуральных жидкостей образовавшихся клонов на наличие МКАТ-ЭПО методом ИФА. Выявленные клоны-продуценты реклонировали методом лимитирующего разведения в концентрации 1 клетка в лунку. Затем еще раз проводили выявление клонов-продуцентов методом ИФА.

Клоны-продуценты реклонировали и далее, путем серийных пассажей, продуктивные клоны выводили в массовую культуру. Для этого размножившиеся клетки из 96-луночного культурального планшета переносили в 24-луночный, затем в 4-луночный, после чего стабильные гибридомы пересеивали в культуральные флаконы по 25 – 50 мл.

Для проверки стабильности клонов, клоны были заморожены и разморожены, далее рекультивированы и реклонированы. После чего в результате скрининга и селекции нами были отобраны 2 субклона гибридом Е10 (ОП = 2.8) и С9 (ОП = 3.0), продуцирующие МКАТ-ЭПО. Продуктивный штамм обозначили ЭЕ10С9. Полученный штамм гибридных клеток

56

задепонирован в банке клеточных культур Института микробиологии РУз под регистрационным номером № СКБ 169.

Для наработки больших количеств МКАТ-ЭПО гибридомы - продуценты в количестве 1×10^6 клеток на мышь вводили внутрибрюшинно мышам линии

BALB/c. За сутки до этого животным делали инъекции НАФ по 0,5 мл. на мышь. Через неделю у мышей образовывался асцит (до 6 мл асцита с одной мышью). Концентрация антител в среднем составляла 6 мг/мл.

Полученные асцитные жидкости были протестированы нами на наличие МКАТ-ЭПО и на наличие перекрёстного взаимодействия данных антител с рЭПО, природным ЭПО (сыворотка крови) и двумя препаратами фирмы «Roche» (Швейцария) - рекомбинантным интерфероном альфа-2а «Roferon» и гемопозитическим фактором роста нейтрофилов «Neupogen» (табл. 11).

Таблица 11

ИФА перекрёстного взаимодействия МКАТ-ЭПО в асцитных жидкостях с другими препаратами, указана оптическая плотность

Разведения асцит. жидк.	Оптическая плотность			
	рЭПО	Сывор. плаз. крови	Roferon	Neupogen
цельная	1,888	0,740	0,233	0,223
в 2 раза	1,602	0,746	0,253	0,266
в 4 раза	1,455	1,085	0,234	0,246

в 8 раз	1,454	1,082	0,201	0,205
в 16 раз	0,745	0,905	0,232	0,216
в 32 раза	0,495	0,495	0,233	0,253
в 64 раза	3000	0,403	0,228	0,213
в 128 раз	3000	0,213 - К	2,346 + К	0,086 Фон

Примечание: - **К** – отрицательный контроль (1^xPBS), + **К** – положит. контроль МКАТ-ЭПО из набора «ЕРО-ELISA» («Roche», Швейцария).

Как видно из таблицы 11, асцитные жидкости содержат МКАТ-ЭПО, которые взаимодействуют, как с природным ЭПО из сыворотки крови, так и с рЭПО и не взаимодействует с другими белками крови - интерфероном и фактором роста нейтрофилов.

Выделение и очистку антител осуществляли в несколько этапов. МКАТ-ЭПО получали из культуральной и асцитной жидкостей путем двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Затем проводили обессоливание на сефадексе G-25 и доочистку на колонке с подготовленной ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 5 мМ натрий фосфатным буфером, рН 8,0 в градиенте от 0 до 0.25 М NaCl (рис. 6).

57

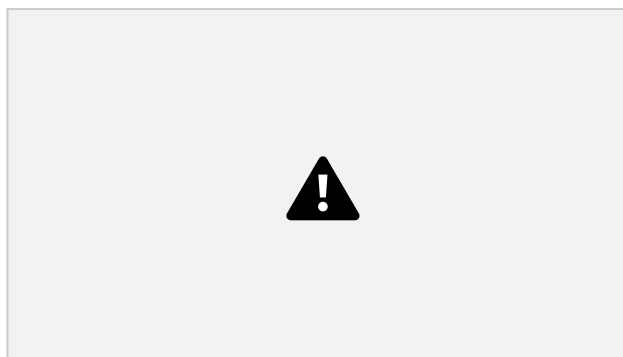


Рис. 6. Профиль элюции МКАТ-ЭПО при разделении на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 5 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 8,0 в градиенте NaCl

В результате, нами были получены и лиофильно высушены высокоочищенных МКАТ-ЭПО.

Методом электрофореза в восстанавливающих условиях нами установлено, что легкие цепи полученных нами моноклональных антител имеют молекулярную массу 23,000 Да, а тяжёлые 52,000 Да, что свидетельствует о принадлежности данных антител к классу G (рис.7).

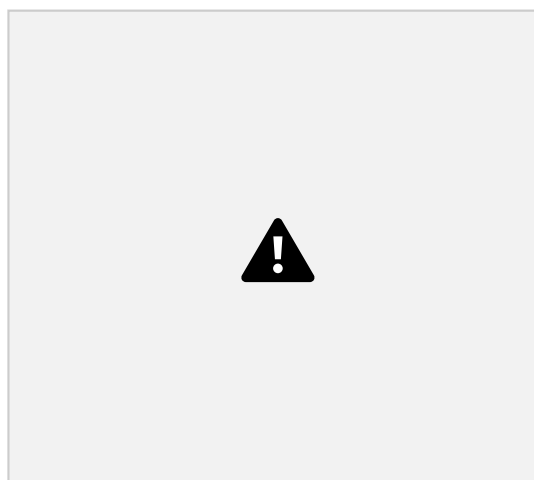


Рис. 7. Электрофореграмма препарата МКАТ к ЭПО в 12% ПААГ SDS (меркаптоэтанол): первая полоса – маркеры (миозин - 250 кДа, фосфоорилаза - 98 кДа, глутамин дегидрогеназа - 64 кДа, алкоголь дегидрогеназа - 50 кДа, карбоангидраза - 36 кДа, миоглобин - 30 кДа, лизозим - 16 кДа); вторая и третья полосы - очищенные МКАТ-ЭПО двух субклонов.

Для выяснения специфичности взаимодействия МКАТ с антигенными детерминантами ЭПО проводили прямой ИФА. Для этого в качестве антигенов (АГ) сорбировали на пластик 96 луночного планшета по 60 мкг/мл рЭПО «Roche» (Швейцария), природного ЭПО «Протеиновый контур» (Россия) и сыворотку плацентарной крови. В качестве антител (АТ) служили полученные нами МКАТ-ЭПО, за исключением лунок с положительным контролем, где для сравнения использовали МКАТ-ЭПО «ЕРО-ELISA» («Roche», Швейцария) (табл. 12).

Таблица 12

Определение специфичности МКАТ-ЭПО методом ИФА

МКАТ ЭПО, мкг/мл	Антигены, сорбированные на пластик для постановки ИФА				
	рЭПО, «Roche»	Нативный ЭПО, «Протеиновый контур»	Сыворотка плацентарной крови	К+	К
20	3,000	3,000	1,120	3,00 0	0,110
15	1,980	2,800	0,770	3,00 0	0,100
10	1,900	1,890	0,430	2,790	0,110

5	1,290	1,500	0,200	1,850	0,150
2,5	0,950	1,150	0,150	1,340	0,110
1,7	0,430	0,860	0,120	0,850	Фон 0,09

Примечание: Положительный контроль «К+» – рЭПО с МКАТ-ЭПО «ЕРО ELISA» («Roche», Швейцария), отрицательный контроль «К-» - фосфатно солевой буфер (1*PBS).

Как видно из таблицы 12, полученные нами МКАТ-ЭПО, специфично взаимодействуют как с природным ЭПО «Протеиновый контур», так и с рЭПО и по активности не уступают МКАТ-ЭПО «ЕРО-ELISA».

Титр антител также исследовали методом ИФА. Титр антител в культуральной жидкости составлял 2×10^4 , в асцитной - 1×10^7 . Высокий титр 4×10^7 показала суммарная очищенная фракция МКАТ-ЭПО.

Таким образом, были наработаны, выделены, очищены и охарактеризованы МКАТ-ЭПО.

С целью проверки эффективности полученных нами МКАТ-ЭПО, в качестве иммуносорбента для препаративного получения и очистки ЭПО из плацентарной крови методом аффинной хроматографией, нами синтезирован иммуносорбент на основе полученных МКАТ-ЭПО (BrCN-сефароза 4В – МКАТ-ЭПО). Иммуносорбент готовили путем конъюгации антител с BrCN сефарозой 4В. Для этого к 1г сефарозы 4В, активированной BrCN и набухшей в 1мМ HCl, добавляли 3 мл (15 мг/мл), полученных МКАТ-ЭПО и инкубировали 12 часов. Антитела предварительно были переведены путем диализа в 0,1М натрий-карбонатный буфер, 0,5М NaCl (pH 8,3). После адсорбции антител суспензию с сефарозой отмывали 0,1М натрий карбонатным буфером (pH 8,3), а затем добавляли 1М раствор этаноламина, pH 9. После чего, сорбент последовательно промывали растворами 0,1М натрий-карбонатного буфера с 1М NaCl (pH 8), 0,1М натрий-ацетатного буфера с 1М NaCl (pH 4) и далее 0,1М натрий-боратного буфера с 1М NaCl, (pH 8,5). Колонку 1x10 см заполняли гелем, содержащим 30 мг антител к эритропоэтину.

ЭПО выделяли из плацентарной крови, удаляли форменные элементы крови, диализовали против 25мМ фосфатного буфера, pH 4,5. Затем удаляли балластные белки на ДЭАЭ целлюлозе-52. Элюцию ЭПО с ДЭАЭ целлюлозы проводили 0,1М натрий фосфатным буфером, pH 4,5. Элюат диализовали против воды и лиофильно высушивали. Лيوфильно высушенные фракции, растворяли в 0,1М натрий-боратном буфере с 0,5М NaCl, pH 8,5 и наносили 5 мл белка (3 мг/мл) на колонку с биосорбентом BrCN-сефарозой 4В – МКАТ-

последовательно проводили 0,1М натрий-ацетатным буфером, 0,5М NaCl, pH 3,2 и 0,5М натрий ацетатным буфером, 1МNaCl, pH 3,2. Измерение оптической плотности фракций проводили при 280 нм (рис.8).

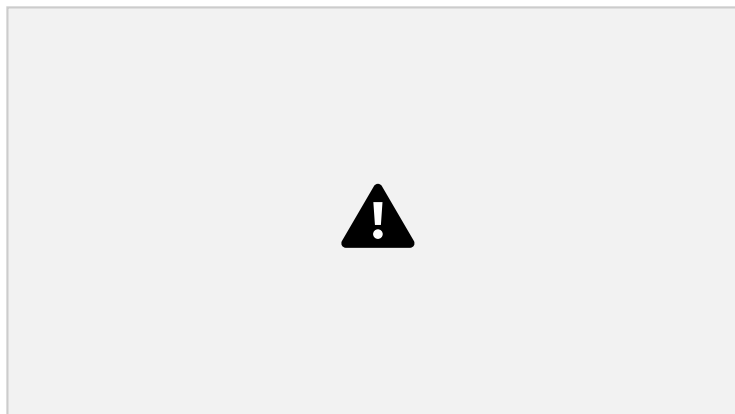


Рис. 8. Профиль элюции при аффинной хроматографии природного ЭПО на колонке с МКАТ к ЭПО - BrCN - сефарозой. Колонка размером 1x10 см уравновешена 0,1 М Na-боратным буфером, pH 8,5.

Получили 3 фракции белка. Методом ИФА было установлено содержание ЭПО во второй фракции белка (ОП=0,979). Третья фракция также содержала ЭПО по ИФА тесту (ОП=0,507), что свидетельствует о различной аффинности фракций ЭПО. Фракции II и III объединяли в одну, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Гомогенность объединенной фракции определяли методом гель электрофореза по методу Laemmli (рис.9)

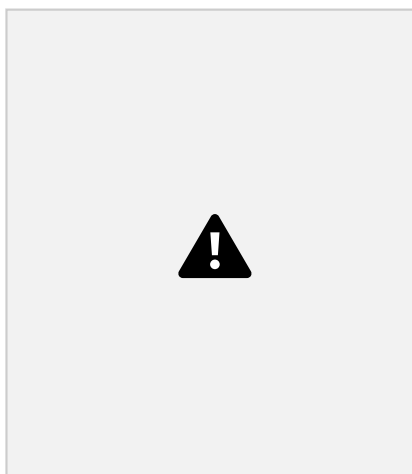


Рис. 9. Электрофореграмма фракции эритропоэтина в 12% ПААГ SDS в присутствии β-меркаптоэтанола: 1 - смесь маркерных белков (фосфорилаза В – 96 кДа, бычий сывороточный альбумин - 67 кДа, овалбумин – 43 кДа, ингибитор трипсина из сои - 24 кДа.), 2 - фракция ЭПО, после аффинной хроматографии, 3 - исходная фракция ЭПО, до аффинной хроматографии.

Молекулярная масса полученного ЭПО находится в пределах 32-36 кДа, что соответствует литературным данным и связано с различной степенью гликозилированности ЭПО.

Таким образом, полученные нами МКАТ-ЭПО пригодны для выделения природного и рекомбинантного ЭПО методом аффинной хроматографии и будут очень полезны не только как компоненты диагностических тест-систем, но и как биосорбенты для промышленного выделения рЭПО.

ВЫВОДЫ

1. Изучена цитотоксическая активность экстрактов растений рода *Vinca* и грибов эндофитов, паразитирующих на растениях рода *Vinca* на культурах клеток рака гортани - НЕр-2, рака шейки матки – HeLa, рака молочной железы- HBL-100 и на нормальных клетках фибробластов, гепатоцитов. Установлено, что экстракты как растений, так и грибов обладают цитотоксической активностью. При этом экстракт из корней *Vinca major* проявляет большую специфичность к клеткам HeLa, а экстракт грибов эндофитов *Alternaria sp.*, паразитирующих на листьях *Vinca erecta* обладает большей специфичностью к клеткам HBL-100 при низкой цитотоксичности для нормальных клеток.

2. Изучена цитотоксическая активность суммарных фракций алкалоидов из растений родов *Convolvulus*, *Arundo* и *Buxus*. Установлено, что алкалоиды из надземной части растения *Convolvulus krauseanus* ингибируют рост клеток НЕр-2, а из корней *Arundo donax* ингибируют рост клеток НЕр-2 и HeLa, при низкой токсичности для фибробластов.

3. Изучена цитотоксическая активность тропановых алкалоидов из растений рода *Convolvulus* и их производных. Установлено, что цитотоксическая активность зависит от природы радикала при атоме азота тропанового остатка. Наибольшей специфичностью обладает N-бензил конвольвин, ингибируя рост клеток НЕр-2 ($IC_{50} = 12,3$ мМ/л) с низкой токсичностью для клеток фибробластов ($IC_{50} = 32,8$ мМ/л).

4. Изучена цитотоксическая активность норфлуорокурарина - алкалоида из растения *Vinca erecta* и его синтетических производных. Установлено, что наибольшей избирательностью обладает йодметилат фенилгидразона норфлуорокурарина, ингибируя рост клеток НЕр-2, HeLa и HBL-100 ($IC_{50} = 19,1$ мМ/л для всех раковых клеток) при низкой токсичности для фибробластов ($IC_{50} = 95,5$ мМ/л).

5. Изучена цитотоксическая активность производных фенил- и феноксисукусных кислот. Выявлен селективный ингибитор роста клеток рака гортани - n-Cl-феноксисукусная кислота ($IC_{50} = 5,2-52$ мМ/л), низкотоксичный для нормальных клеток ($IC_{50} = 442$ мМ/л). n-Cl ацетилфенилуксусная кислота ингибирует рост клеток Нер-2, HeLa и HBL 100 ($IC_{50} = 4,7-5$ мМ/л) и низкотоксичен для нормальных клеток ($IC_{50} = 94$ мМ/л).

6. Изучена цитотоксическая и пролиферативная активность фитостероидов. Установлено, что фитостероид - экдистерон подавляет рост клеток Нер-2, HeLa и HBL-100 на 15% и при этом вызывает пролиферацию роста нормальных клеток фибробластов на 80%.

7. Оптимизирован способ получения тканеинженерной конструкции кожи, состоящей из клеток фибробластов на коллагеновой подложке, для лечения ожоговых ран. Показано, что использование экдистерона совместно с тканеинженерной конструкцией, в 2 раза ускоряет эпителизацию ожоговых ран.

8. Получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к рекомбинантному эритропоэтину. Отобраны два наиболее перспективных субклона гибридных клеток-продуцентов, которые в дальнейшем использованы для получения препаративных количеств моноклональных антител к рекомбинантному эритропоэтину.

9. Выделены из асцитной жидкости, очищены и охарактеризованы моноклональные антитела к рекомбинантному эритропоэтину. Установлено, что моноклональные антитела к рекомбинантному эритропоэтину перекрёстно взаимодействуют как с плазменным эритропоэтином, так и с рекомбинантным, и относятся к классу IgG. Титр антител в асцитной жидкости составил 1×10^7 , в культуральной - 2×10^4 . Высокий титр 4×10^7 показала суммарная очищенная фракция МКАТ-ЭПО.

10. Разработан метод выделения эритропоэтина из плацентарной крови человека с использованием иммуносорбента, синтезированного на основе моноклональных антител к эритропоэтину человека.

11. Разработаны и утверждены Методические Рекомендации «Оценка цитотоксичности лекарственных средств, изделий медицинского назначения, косметических средств, химических соединений, пестицидов и средств для ветеринарии» (8Н-Р/18 от 02.03.2016г.).

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREE OF
DOCTOR OF SCIENCES 16.07.2013.K/B/T.13.01 AT THE INSTITUTE OF
BIOORGANIC CHEMISTRY AND THE NATIONAL UNIVERSITY OF
UZBEKISTAN
INSTITUTE OF THE CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES**

TSEOMASHKO NATALYA YEVGENEVNA

**UZZING CELL CULTURES (NORMAL AND TRANSFORMED
MALIGNANTLY) FOR SCREENING BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES AND OBTAINING THE MONOCLONAL ANTIBODIES**

**02.00.10 – Bioorganic chemistry
(biological sciences)**

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT - 2016

63

The subject of doctoral dissertation is registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of Republic of Uzbekistan under number 30.09.2014/B2014.5.B69

Doctoral dissertation is carried out at the Institute of the Chemistry of Plant Substances of Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan.

The full text of doctoral dissertation is placed on web page of Scientific council 16.07.2013.K/B/T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan to the address <http://ss.biochem.uz>

Abstract of dissertation in three languages (Uzbek, Russian, English) is placed on web page to address <http://ss.biochem.uz> and on Information-educational portal “ZiyoNet” to address www.ziyo.net

Scientific Consultant: Azimova Shahnoz Sadikovna

doctor of sciences in biology, professor

Official opponents: Akhuniv Ali Akhunovich

doctor of sciences in biology, professor

Dalimova Surayo Nugmanovna

doctor of sciences in biology, professor

Saitmuratova Ogiljon Khudaybergenovna

doctor of sciences in biology, docent

Lead organization: Tashkent Pharmaceutical Institute

Defense will take place on «__»_____2016 at __ at the meeting of the Scientific council 16.07.2013.K.B.T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the

National University of Uzbekistan at the following address: 100 125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phon: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63; e-mail: asrarov54@mail.ru

Doctoral dissertation is registered in library at the Institute of Bioorganic Chemistry, it is possible to review it in library (100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63)

Abstract of dissertation sent out on «____»_____2016 year

(mailing report_____on «____»_____2016 year)

A.S. Turaev

Chairman of Scientific council on award of scientific degree
of doctor of sciences, D. ch. Sc., Professor

M.I. Asrarov

Scientific secretary of Scientific council on award of
scientific degree of doctor of sciences, D. b. Sc.

D.A. Kadirova,

Chairman of Scientific seminar under Scientific council on award
of scientific degree of doctor of sciences, D. b. Sc.

64

INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

Topicality and relevance of the theme of the dissertation. One of the urgent tasks of bioorganic chemistry, cell biology and pharmacology is the identification of novel compounds having antitumor property and other biological mechanisms. For many years in the republic's scientific laboratories systematic research conducted on the isolation and synthesis of various classes of compounds and the study of their pharmacological activity, some of the compounds tested on various biological activities such as anti-arrhythmic, cholinesterase, estrogenic and anti-inflammatory, however their cytotoxic activity has not be studied.

Screening of cytotoxic activity of chemical compounds, pharmaceuticals, *in vitro* medical devices on different cell cultures is an integral part of pre-clinical studies according to international standards GLP (Good Laboratory Practice). Methods of *in vitro* studies allow significantly reducing the cost and reducing the time of the preliminary study of new chemical compounds.

Such problems as the differentiation, tumorigenesis, cell motility, proliferation, transfer of genetic information, regulation of gene expression and others settled in the world of science, mainly with the use of cell cultures. Cell cultures are also of great importance for the solution of applied problems of medicine and agriculture. In particular, the main problems of application should include the massive industrial production of vaccines and physiologically active compounds, the preparation of monoclonal antibodies by hybridoma technology, and the treatment of serious diseases using gene therapy and cell replacement therapy.

In connection with the above identification of compounds which inhibit the growth of tumor cells with low toxicity for normal cells and substances of proliferating the growth of normal cells, but not the cancerous for regenerative medicine, as well as preparation of hybridomas producing monoclonal antibodies to erythropoietin is relevant.

This research work to a certain degree corresponds to the tasks provided in the Resolution of the President of the Republic of Uzbekistan dated November 28, 2011 № PP-1652 "On measures to further deepen the reform of the health system" and the Cabinet of Ministers of March 29, 2012 № 91 "on measures to further strengthen the material-technical base and improvement of the organization of medical institutions," and other legal documents.

Relevance of the research to the priority areas of science and technology development of the republic. This study was performed in accordance with the priority areas of science and technology of the Republic VI. "Medicine and Pharmacology."

Review of international research on the topic of the dissertation. Research, such as those aimed at identifying highly specific for each type of tumor cell connections, screening compounds for cytotoxicity, preclinical studies of chemical compounds and drugs with the help of *in vitro* methods, are carried out in the leading research centers and higher educational institutions of the world, including the National Institutes of Health (Maryland, USA), the National cancer Institute

65

(Rockville, USA), at the Institute of Pathology (Seattle, USA), Rockefeller University (USA), the Institute of Cytology (Russia), in the Institute of Bioorganic chemistry (Uzbekistan); in Cancer Research at the WHO Centre (Belgium), EURL ECVAM and the EPAA (Europe), JaCVAM (Japan), KoCVAM (Korea), Health Canada (Canada), ICATM (USA), Vitroscreen (Italy) and others.

As a result the research carried out in the world on identification of compounds involved in directed action using *in vitro* methods on different cell cultures, obtained a series of research results, including: identified new inhibitors of the growth of cancer cells, developed targeted therapies vintafolid (Merk & Co, USA), erlotinib (Roche, Switzerland) afatinib (Boehringer ingelheim pharm. Inc., USA), krizotinib (Pfizer Inc., USA) and tseritinib (Novartis, USA), causing inactivation of the mutant protein in tumor cells, and bevacizumab (Pfizer Inc., USA) which inhibits angiogenesis; obtained monoclonal antibodies to various antigens, including erythropoietin and («Roche», Switzerland, "Protein contour", Russia).

Currently, in the world with present screening methods *in vitro* chemical compounds and drugs in the order of priority areas of research are carried out, including the identification of selective cancer cell growth inhibitors for cancer; proliferators selective growth of normal cells for regenerative medicine; determination of total and specific types of cytotoxicity, identification of mechanisms of action of the compounds at the cellular level.

The degree of study of the problem. Studies on the effect of compounds that inhibit the growth of tumor cells using *in vitro* methods started in the world since the late '70s (R.I.Freshney, T.Mosmann, K.Taylor, G.Taju), even earlier the use of cell culture in regenerative medicine (P.B.Medawar, J.Rheinwald, N.Green), the development of hybridoma technology to the mid-80s (Kohler and Milstein). Currently these areas have a rapid development. Thus, screening of new compounds in automated laboratories, for example, at Rockefeller University and the National Institutes of Health in the US, carried out not only on the 96-well plates, but also on the 384, 1536 or 3456 well plates for the so-called method of HTS (high-throughput screening), while exploring the connections with the world (J.Agrestia, X.Zhang, A.Florian).

In the CIG, progress in the field of screening substances on cultures of cells and cultured human and animal cells were achieved by M.Y.Eropkin, G.Georgiev, N.R.Tafrishyan, A.A.Alekseev, V.I.Shumakov, E.V.Parfenov and etc.

In Uzbekistan, the research on cell cultures also began at the end of the last century. In the 70-80-ies the study of HeLa cell receptor systems and normal human fetal cells were works of A.A.Abdukarimov, A.A.Aripdzhanov, T.G.Gulyamova, Sh.S.Azimova, O.Petrova, S.E.Muchnik and others. At the Institute of the chemistry of plant substances prof. A.H.Yuldashev for the first time antineoplastic compounds such as vinblastine and vincristine were isolated, but their potency to inhibit the growth of tumor cells was not detected at the Institute, instead it has been identified in Hungary. In 2002-2003 in the laboratory of molecular genetics, led by prof. Azimova Sh.S., hybrid cells producing the monoclonal antibodies to the surface antigens of hepatitis B have been obtained. In 2005, the Institute of Bioorganic Chemistry, N.N.Kuznetsova received and patented a new line of mouse melanoma cells. In the

66

same year, the verified cancer cell lines (Hela, HEp-2 and HBL-100) were taken to the laboratory of the molecular genetics in the Institute of the chemistry of plant substances. Currently, the collection of cell cultures in the laboratory of the Institute of the chemistry of plant substances and Institute of bioorganic chemistry are constantly replenished with new cell lines, and the research on cell cultures is being carried out.

Connection of dissertation work to the state programs or plans of scientific-research works of the institution. The dissertation research is carried out within the framework of research projects of basic and applied projects of ICPS on topics number A-10-144 "Production of monoclonal antibodies to erythropoietin man" (2006-2008), number of FA-F3-T041 "Preparation and study of pharmacological toxicological properties of biologically active compounds by genetic cell biology" (2007-2011), and the number of FA-F6-T198 "The study of the influence of biologically active substances on the metabolism of the cells" (2012-2016).

The aims of the research work are finding the cytostatic compounds - inhibitors of growth of cancer cells with low toxicity for normal cells and

compounds accelerating the growth of normal cells without the growth of cancerous cells, and obtaining of hybrid cells (hybridomas) producing monoclonal antibodies to recombinant erythropoietin.

The tasks of the research work.

By finding inhibitors of cancer cell growth:

study of the effects of individual compounds and extracts for malignantly transformed cells culture (Hela - cervical cancer cells, HEp-2 - laryngeal cancer and HBL-100 - breast cancer);

obtaining cell cultures of normal human fibroblasts and rat hepatocytes for screening compounds;

study of the effects of extracts and of individual compounds on culture normal cells (fibroblasts and hepatocytes).

For the search of proliferators' growth of normal cells (for regenerative medicine):

obtaining cell cultures of fibroblasts and keratinocytes, creating their tissue based structures;

study of the effects of flavonoids and phytosteroids on the culture of human fibroblasts;

study of the effect of identified proliferators cell growth and tissue engineering design of the processes of healing of burn wounds *in vivo*. Upon receipt of hybrid cells - producers of monoclonal antibodies to erythropoietin (MAbs-EPO):

developing immunization scheme of mice line BALB/c with recombinant erythropoietin;

fusion X63Ag8.653 mouse myeloma cells with splenocytes of mice BALB/c line immunized with recombinant erythropoietin. Selection, Screening and cloning of hybridomas-producing MAbs-EPO;

67

characterization and selection of promising clones for preparative amounts of monoclonal antibodies to recombinant erythropoietin, obtaining ascites; isolation and purification of monoclonal antibodies to recombinant erythropoietin; isolation and purification of erythropoietin from placental blood by affinity chromatography based on MAbs-EPO.

The objects of the research were cells cultures of fibroblasts, keratinocytes, and hepatocytes, cultures of cancer cells (Hela - cervical cancer cells, HEp-2 - laryngeal cancer cells and HBL-100 - breast cancer cells), equivalent of dermal, extracts, and individual compounds (tropane alkaloids, derivatives of phenyl and phenoxyacetic acids, derivatives of phenylhydrazine with norfluorocurarin, flavonoids, phytosteroids), the experimental animals with thermal burns IIIA, mouse line BALB/c, myeloma cells X-63 AG8.653.

The subject of the research - cytotoxic, metabolic and proliferative activity, recovery of burn wounds, the ability of hybrid cells producing monoclonal antibody to erythropoietin and the use of the obtained monoclonal antibodies as

immunosorbent.

The methods of the research work. In the study methods of bioorganic chemistry (methods of separation of protein, qualitative and quantitative determination of protein, spectrophotometric and electrophoretic methods), methods of cell biology and engineering (methods of obtaining primary cell cultures and hybridomas), biochemical methods (colorimetric methods - MTT, neutral red LDH-test), and immunochemistry (Ouchterlony method, ELISA) were used.

Scientific novelty of the dissertation work is that the first time: new pharmacological activity of a number of compounds and extracts is identified;

It proved that extracts - from the genus *Convolvulus*, *Vinca major* plant and *Arundo donax*, and endophyte fungi, parasites of the plants of genus *Vinca* have selective cytotoxic activity on tumor cell cultures;

revealed a selective inhibitor of growth of larynx cancer cells - N-benzyl convolvin – derivative of alkaloid convolvin, which isolated from active extract of plants of the genus *Convolvulus*, does not inhibit the growth of breast cancer cells, cervical and normal cells;

identified selective inhibitors of growth of cancer cells - n-Cl-phenylacetic acid, n-Cl-phenoxyacetic acid and iodmethylat of phenylhydrazone of norfluorokurarin;

It found that chlorinated alkaloids including derivatives of convolvin and vinkanin, exhibit high cytotoxic activity on cancer cell cultures at a level of the drug Cisplatin;

a method of producing cultures of mesenchymal cells;

It proved that ecdysterone increases proliferation of normal skin cells - fibroblasts and keratinocytes, and not increases proliferation of cells of larynx cancer, breast cancer and cervical cancer;

68

It found that used allofibroblasts together with ecdysterone increases proliferation autoepidermocyts and epithelialization tissue, which can be used in the treatment of burn wounds;

received hybridoma - producers of monoclonal antibodies to recombinant erythropoietin.

Practical results of the research are as follows:

developed best practices for producing crops mesenchymal cells; conducted screening of individual compounds and extracts from which inhibitors revealed the growth of cancer cells with selective activity and growth of skin cells proliferator;

defined the dose of biological activity and toxicity of the compounds; It developed an effective method for the treatment of burn wounds IIIA degree; prepared hybridomas producing monoclonal antibodies to erythropoietin; It developed a method for isolating erythropoietin, both natural and recombinant produced based on monoclonal antibody to erythropoietin. **The reliability of the results.** The results were confirmed using modern analytical and statistical

methods. Confirmation of these results serve and expertise, and practical implementation of research results, discussion of the results of research at national and international conferences, and the publication of research results in peer-reviewed scientific publications and patents. **The scientific and practical significance of the research results.** The research results presented in the dissertation, have without a doubt, both fundamental and practical importance. Selected from a large number of extracts and active individual compounds inhibitors of cell growth and proliferators open the prospect of in-depth research in these areas, identifying their mechanism of action.

Well-established *in vitro* methods for the preclinical screening of biologically active substances, medicines according to international principles of Good Laboratory Practice (GLP), allow you to quickly and efficiently assess the cytotoxicity of new compounds and devices.

Identified individual extracts and compounds inhibiting the growth of cancer cells with low cytotoxicity for normal cells, proposed for *in vivo* studies on antitumor activity (patent applications № IAP20130222, № IAP20130304, № IAP 20140170, № IAP20140182).

Proposed methods of obtaining cultures of skin cells and tissue-engineering structures, and programs included in their treatment of burn wounds significantly accelerates epithelialization of deep skin lesions (patent № IAP20120160).

Implementation of the research results. Based on the data obtained by the screening of biologically active compounds for cytotoxicity and production of monoclonal antibodies:

Obtained two subclones' hybrid cells and a patent for the invention of Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (16.12.2002, № IAP 02943) which produce monoclonal antibodies to erythropoietin. The study produced antibodies that deployed as an immunosorbent for the purification of erythropoietin;

69

identified a new biological activity of the alkaloid N-benzyl convolvulin and protected by the patent invention of Uzbekistan (16.02.2012, № IAP 04965). The compound in the study suggested as a selective inhibitor of the growth of cancer cells of larynx under low cytotoxicity to normal cells.

Accreditation by "Uzstandard" to assess the cytotoxicity of medical devices and drugs entering the market of the country (the accreditation certificate №UZ.AMT.07.MAI.220).

The guidelines were accredited "Evaluation of the cytotoxicity of drugs, medical devices, cosmetics, chemicals, pesticides and veterinary funds" (Chief of the Science and Education Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, №8N-P/18 of 02.03.2016).

Approbation of the research results. The research results on the theme of the dissertation were presented in the form of reports and have been tested by 10 international and national research conferences, particularly at conferences of young scientists (Tashkent, 2004, 2009, 2010, 2011, 2012), at the International

Congress Biotechnology (Pushchino , Russia, 2006), on the 7th and the 10th International Symposium of Chemistry of Natural Compounds (Tashkent, 2007, 2013), at the 3rd International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients (Urumqi, China, 2012), at the 11th International Symposium of Chemistry of Natural Compounds (Turkey, 2015).

Publication of the research results. On the theme of the dissertation a total of 28 scientific papers were published, including 2 patents RUz, 14 scientific articles were published in the journals recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publication of basic scientific results of doctoral dissertations, including 11 national and 3 international journals.

The volume and structure of the dissertation. The dissertation consists of the introduction, four chapters, conclusions and a list of references and appendices. The size of the dissertation is 227 pages.

THE MAIN CONTENT OF THE RESEARCH PAPER

In the introduction of the dissertation, the topicality and relevance of the research are substantiated, the aim and objectives of the research, its object and subject are formulated, its conformity with the priorities of development of science and technology of the Republic of Uzbekistan is shown, the scientific novelty and practical results of the study are described, the theoretical and practical significance of the obtained results are revealed, a list of introducing the research results into practice, published works and information on the structure of the dissertation are provided.

In the first chapter of the thesis "**Modern aspects of cell cultures to solve scientific and applied problems of medicine, biology, chemistry,**" gives an overview of the literature, including an overview of cell cultures, methods of cultivation and use of the cytotoxic activity of the extracts and the individual

compounds on different cell cultures, on how to identify inhibitors and proliferators of cell growth of modern anticancer drugs. Furthermore, data and studies are presented on the application of the cell culture in regenerative medicine. Individual sub-chapters are devoted to the hybridoma technology, as well as the hormone erythropoietin, and drugs based on it.

In the second chapter of the thesis **"The materials, conditions and techniques of bioorganic chemistry, biotechnology and cell biology used at work"** shows examples of materials used in the work and methods, in particular - the methods of Bioorganic Chemistry (gel filtration, immune-interchangeable and affinity chromatography, spectrophotometry, electrophoresis and other methods in the form of qualitative and quantitative determination of protein), methods of engineering and cell biology (methods for producing cell cultures, hybridoma tissue-engineering and construction), biochemistry techniques (colorimetric methods - MTT, neutral red, a test-LDH) and immunochemistry (Ouchterlony method, ELISA).

The third chapter of the thesis **"Study of cytotoxic and proliferative activity of extracts and individual compounds,"** discusses the results of obtaining and culturing normal and malignantly transformed cells, and the results of the screening for these cultures as extracts, as well as individual compounds for cytotoxic and proliferative activity, as well as research cell cultures for use in regenerative medicine.

Here, cultures of normal fibroblasts, keratinocytes, and hepatocytes, which obtained by non-enzymatic explant, were used. However, this method has been optimize by conditioning environments culturing with two percent of medium, removed from confluent cultures of fibroblasts rich in growth factors (EGF - epidermal growth factor, FGF - fibroblast growth factor, etc.) Moreover, matrix proteins (collagens type I and III, elastin, etc.).

The main advantages of the optimized process for producing cell cultures lies in the fact that it results in obtainment of a "young" pool and proliferative activity of viable cells in one stage of differentiation, moreover, a feeder layer or a whole row, is no longer necessary from commercial additives. This method of

71

obtaining cultures of normal cells is economical and highly productive, a monolayer of cells formed from the same age, far from the "Hayflick limit," which is important in the regenerative medicine.

Thus, we have obtained a culture of fibroblasts cells (FCC) - human, dermal rabbit, mice, rats and their embryos (Fig. 1), obtained primary cultures of skin keratinocytes - PCK, and culture hepatocytes of rats – PCH (Fig. 2).

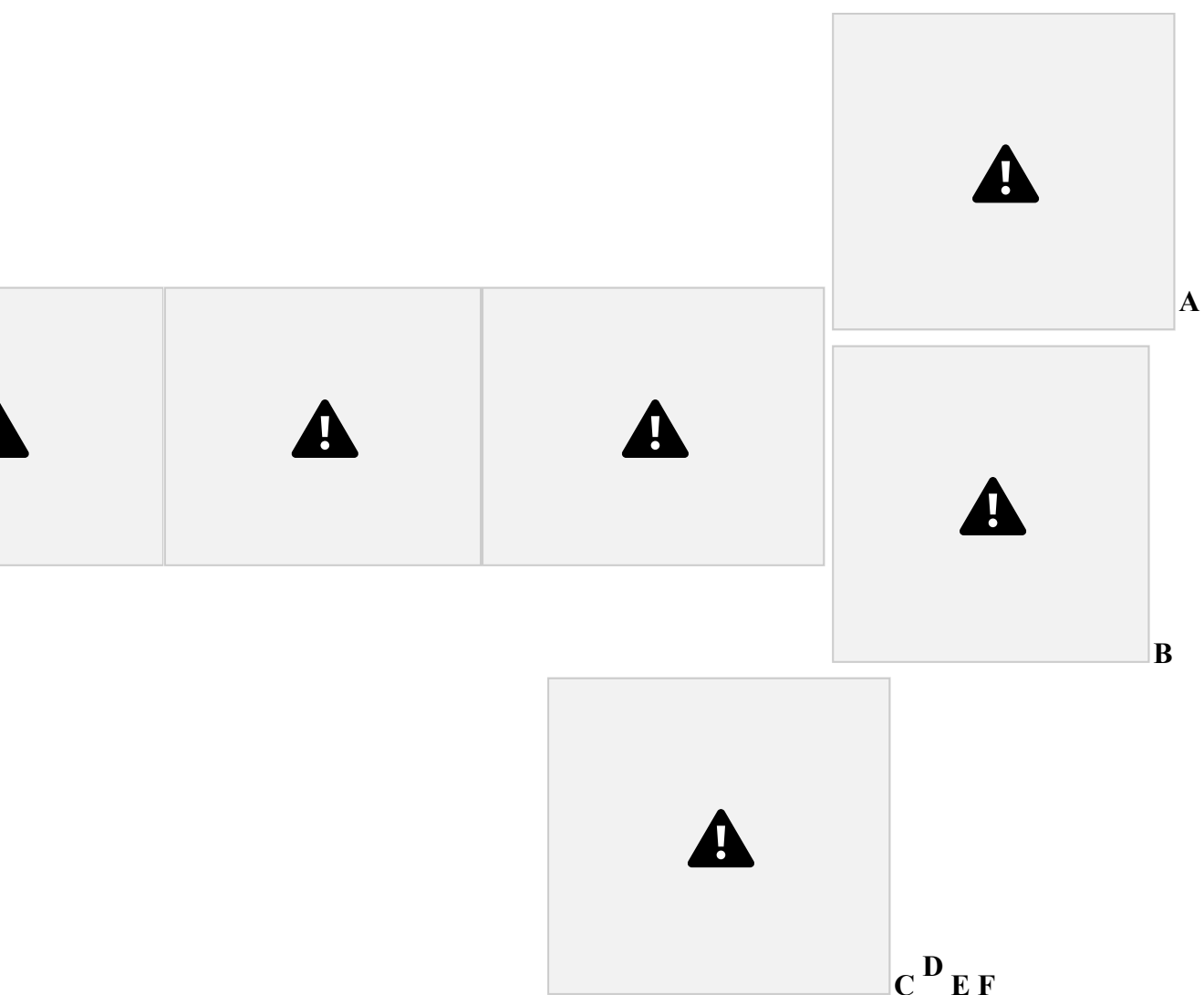


Fig. 1. Culture fibroblast cells: A - explant of human dermis on the 3 day of cultivation; B - human fibroblast monolayer on the 10 day; C - rabbit fibroblast monolayer for 10 day; D - fibroblasts of rats on the 10 day; E – rat's embryo fibroblasts on the 10 day; F - fibroblasts of mouse on the 10 day ($\times 10 \times 10$).



^A_B

Fig. 2. The PCK of human on the 20th day of cultivation (A) and PCH of rats on 3 day of cultivation (B), ($\times 10$, $\times 40$).

Morphological studies of the obtained cultures showed that the PCK presented epithelial-cells, FCC - fibroblast-like cells (Fig. 1, 2), and hepatocyte cells contained 1-2 large nucleus, which corresponds to the literature data.

Cell cultures are useful for preclinical *in vitro* screening of chemical compounds, drugs and medical devices, and for regenerative medicine. For the screening of extracts and individual compounds for cytotoxic and proliferative activity were used verified cancer cell line, which derived from the

72

Bank of Cell Cultures of the Institute of Cytology, such as HeLa - cervical carcinoma cells, HBL-100 - breast cancer cells and Hep- 2 - laryngeal cancer cells. Studies in cancer cell cultures held together with Khashimova Z., Terentyeva E.

Screening compounds were also performed on cultures of normal cells. FCC used in the 5-7 passages and PCH in the 1 passage, when its reaches 80% confluence. Screening of the metabolic state of the cells was assessed by the following indicators: 1) reduce the overall activity of mitochondrial dehydrogenases in colorimetric test Mosman - MTT test; 2) a decrease in endocytosis of the vital dye neutral red, is correlated with lysosomal function - neutral red test; 3) Incubation medium activity in the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase, which can be used as a marker of plasma membrane integrity disorders (LDH-test). As a comparison drug cytotoxicity used anticancer drug - "Cisplatin-Teva" (Pharmachemie, B.V., Netherlands). Served as the control intact cells, which contributes only culture medium.

Carried out screening on the cytotoxicity of extracts of plant genus *Vinca*, obtained in ICPS AS RUz (under the lead. S.F.Aripova). It is known that plants of this kind include vincaalkaloids, many of which exhibit anti-tumor activity (R.Berges, 2014, V.Rai, 2014). For example, the well-known anticancer drugs "Vincristine" and "Vinblastine" refer to vincaalkaloids.

In this regard, cytotoxic activity of the extracts was studied of the ground part of the plant *Vinca major* and from the root of the plant *Vinca major* (Table. 1).

Table 1

**Cytotoxic activity of the extracts, % inhibitions
the growth of cells ($M \pm m$, $n = 9$)**

Extracts	HeLa	HEp-2	CCF
----------	------	-------	-----

$\mu\text{g/ml}$	100	10	100	10	100	10
of ground part of <i>V. major</i>	71 $\pm$ 2,9*	30 $\pm$ 2,2	77 $\pm$ 3,04*	43 $\pm$ 2,49	40 $\pm$ 0,5*	19 $\pm$ 0,1
from roots of <i>V. major</i>	73 $\pm$ 5,61*	50 $\pm$ 4,38*	67 $\pm$ 4,09*	5 $\pm$ 0,05	30,4 $\pm$ 0,1	0
Cisplatin-Teva	97,5 $\pm$ 2,4	70 $\pm$ 2,31*	89 $\pm$ 0,28*	51 $\pm$ 1,2 *	100 $\pm$ 9,5*	72 $\pm$ 3,1
Control	0	0	0	0	0	0

Note: significant difference from controls $P < 0.05$; * $P < 0.01$

It is found (see. Table 1) that from the extracts examined, the highest cytotoxic activity was from the roots of the plant extract *Vinca major*. This extract at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ inhibited the growth of cervical cancer cells, without inhibiting the growth of normal cells and its interest for further investigations *in vivo*.

Based on the data, we found it interesting to carry out a screening of extracts of fungi endophytes plant parasitic genus *Vinca*. So we studied the cytotoxic activity of the extracts of eight fungi strains *Solerotium sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Acremonium sp* and *Aspergillius tureus*, parasitic plants *Vinca minor* and *Vinca erecta*, allocated at the Institute of microbiology (under the lead. T.G.Gulyamova). Extracts may include vincaalkaloids and inhibit the growth of cancer cells (Table 2).

73

Table 2
Cytotoxic activity of the extracts of fungi endophytes,
% inhibition the growth of cells ($M \pm m$, $n = 9$)

Extracts $\mu\text{g/ml}$	HeLa			HEp-2			HBL-100			PCH	
	100 0	10	1	100	10	1	100	10	1	10	1
Solerotium sp <i>V. minor</i>	51 $\pm$ 6,2	20,5 $\pm$ 0,2	0 $\pm$ 0,1*	43 $\pm$ 1,8	30,5 $\pm$ 0,3	21 $\pm$ 0,6	73,5 $\pm$ 8,8	47 $\pm$ 1,6	29 $\pm$ 0,9	40 $\pm$ 4,9	12 $\pm$ 2,0
Penicillium sp <i>V. minor</i>	24 $\pm$ 0,4	19,5 $\pm$ 2,1	6 $\pm$ 0,1*	64 $\pm$ 3,3	61 $\pm$ 6,8	28 $\pm$ 0,1	72 $\pm$ 7,6	43 $\pm$ 4,2	40 $\pm$ 2,5	32 $\pm$ 3,7	9 $\pm$ 0,9
Acremonium sp <i>V. minor</i>	37,5 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 0,3	0	36 $\pm$ 1,2	5 $\pm$ 0,1*	3 $\pm$ 0,2*	53 $\pm$ 1,3	27 $\pm$ 1,0	25 $\pm$ 0,6	20 $\pm$ 3,2	8 $\pm$ 1,5
Alternaria sp <i>V. minor</i>	82 $\pm$ 8,6	6,5 $\pm$ 0,6	1 $\pm$ 0,1*	36 $\pm$ 0,9	26 $\pm$ 1,9	11 $\pm$ 0,1	91 $\pm$ 7,5	47 $\pm$ 3,8	32 $\pm$ 3,2	76 $\pm$ 9,5	54 $\pm$ 6,2
Aspergillius tureus <i>V. erecta</i>	51 $\pm$ 4,2	44 $\pm$ 3,6	9 $\pm$ 0,1*	53 $\pm$ 4,9	45,5 $\pm$ 3,1	32 $\pm$ 0,9	56 $\pm$ 3,1	54 $\pm$ 3,1	49 $\pm$ 3,0	34 $\pm$ 3,1	12 $\pm$ 2,2

Penicillium sp roots <i>V. erecta</i>	36± 2,5	6,0± 0,1*	0	27± 0,6	20± 0,9	8± 0,1*	54± 2,4	50± 5,3	32± 1,2	29± 4,5	13± 2,9
Penicillium sp <i>V. erecta</i>	72,5 ±8,2	48± 4,6	39± 1,3	90± 9,7	39± 1,2	37,5 ±1,2	79± 9,8	54± 4,7	45± 3,2	24± 3,8	16± 2,5
Alternaria sp <i>V. erecta</i>	54,5 ±2,5	28,5 ±2,2	13± 0,2	47,5 ±2,8	27± 0,8	13± 0,1	66± 5,2	64± 5,1	48± 2,8	50± 5,7	19± 2,7
Cisplatin-Teva	99± 2,6	78± 1,9	32± 2,6	99,5 ±1,8	60± 1,6	41± 0,9	93± 4,9	76± 2,9	49± 0,3	98± 5,9	49± 3,3
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: significant difference from controls P <0,05; * P <0,01.

As can be seen from Table 2, in low concentrations of 1-10 µg/ml the highest inhibitory activity on cancer cell culture extracts showed *Alternaria sp* (liaves of *V. erecta*), *Penicillium sp* (liaves of *V. erecta*) *Aspergillus tureus* (root of *V. erecta*) and *Penicillium sp* (stem of *V. minor*), which in comparison with the antineoplastic drug showed lowest cytotoxic activity on normal hepatocytes cell culture. Note that out of the described extracts the selective cytotoxic activity was only observed in the extract of fungi *Alternaria sp* (liaves of *V. erecta*) and only at a concentration of 1 µg/ml, since greater suppressed the growth of breast cancer cells glands - HBL-100. We propose that the extract fungi *Alternaria sp*, parasitic on the liaves of *Vinca erecta* interesting in further in-depth studies *in vivo*.

Further screening for cytotoxicity was held amounts of alkaloids (AA), obtained in ICPS AS RUz (under the lead. S.F.Aripova), from plants belonging to the Cragg list - a list of plants as a source of anticancer agents.

Then was investigate cytotoxic activity of AA from plant *Convolvulus krauseanu*, AA from plants *Buxus Semperviren L.* and AA of roots of *Arundo donax* (Table. 3).

Table 3

**Cytotoxic activity of the amounts of alkaloids,
% inhibition the growth of cells (M ± m, n = 9)**

Amounts of Alkaloids µg/ml	HeLa		HEp-2		CCF	
	100	10	100	10	100	10
AA from roots of Arundo	100±3,54	43±2,35*	100±6,72	55±2,53	39±1,5*	0

AA from <i>C. krauseanus</i>	46,5±2,7	7±0,8*	60,8±3,9	43,6±0,5	100±9,3*	0
AA from <i>B.Sempervirens</i>	99,4±5,5	17±1,05*	97,8±7,7	4,2±0,03	100±11,2	36±2,4
<i>Cisplatin-Teva</i>	97,5±2,4	70±2,31*	89±0,28*	51±1,2 *	100±9,5*	72±3,1
<i>Control</i>	0	0	0	0	0	0

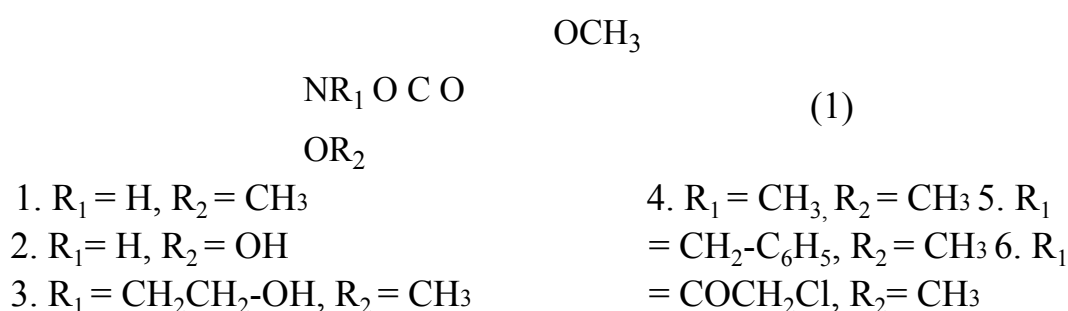
Note: significant difference from controls P <0.05; * P <0.01

It was found of the studied AA that the most cytotoxic activity was shown by the AA roots of the plant *Arundo donax* and AA from the plant *C. krauseanus*, inhibiting the growth of cancer cells and not suppressing the growth of normal cells. AA from plants of the genus *Convolvulus* at the concentration of 10 µg/ml inhibited growth of larynx cancer cells by about 50% without inhibiting the growth of other test cells. In this connection it is interesting for further research on methods of *in vivo* on anti-tumor activity are the AA from the genus *Convolvulus* and roots of the plant *Arundo donax*.

From amounts alkaloids of plants of genus *Convolvulus* (*C. subhirsutus*, *C. krauseanus*, *C. pseudocanthabrica*) were allocated tropane alkaloids, obtained their chemical derivatives, and studied by us for cytotoxicity.

Four alkaloids - convolvin (1) convolidin (2) convolinin (3) and fillalbin (4) isolated from the plant genus *Convolvulus*. N-benzyl convolvin (5) and N-chloroacetyl convolvin (6) - are chemical derivatives of convolvin (under the lead. S.F.Aripova).

All the compounds of the structure have a common skeleton tropane (8-azabicyclooctan) are esters of an amino alcohol and veratric tropane (convolvin, convolinin) or vanillin (convolidin) acids, and differ only in the substituent at the nitrogen atom:



Initial screening was conducted alkaloids at a concentration of 100 µg/ml in four cell types - HeLa, HEP-2, PCH and CCF (Table 4.).

**Cytotoxic activity of alkaloids in a concentration of 100
μg/ml, % inhibition the growth of cells (M ± m, n = 9, P <0.05)**

Substances	HeLa	HEp-2	CCF	PCH
Convolvin	83,0±0,12	99,1±0,24	100±0,17	100±0,25
N-benzyl convolvin	90,3±0,22	100±0,23	100±0,28	100±0,71
Convolinin	35,0±0,12	79,0±0,32	65,5±0,31	89±4,2
Convolidin	27,0±0,35	20,0±0,12	100±0,41	98±2,5
N-chloroacetyl convolvin	100±0,24	98±0,11	100±0,13	100±2,4
Fillalbin	44±0,15	15±0,2	0	14±1,2
<i>Cisplatin-Teva</i>	100±0,2	100±1,5	100±0,5	100±2,5
<i>Control</i>	0	0	0	0

As shown in Table 4, high cytotoxic activity toward cancerous and normal cells showed alkaloid convolvin R1 = H, R2 = CH₃ (1) and its derivatives: N benzyl convolvin R1 = CH₂-C₆H₅, R2 = CH₃ (5) and N-chloroacetyl convolvin R1 = COCH₂Cl, R2 = CH₃ (6). While alkaloid fillalbin (4) R1 = CH₃, R2 = CH₃ at a concentration of 100 μg/ml inhibited more growth of cervical cancer cells and was 2-4 times less cytotoxic to other cells in the experiment. Consequently, the grouping - R1 = CH₃, R2 = CH₃ in structure of compound prevents the toxic effect of the investigated compound on cell culture.

The greatest interest for practical medicine are substances that are active in the low and very low concentrations. In our experiments, we also tested the same compounds in a concentration of 10 μg/ml (Table 5).

Table 5
Cytotoxic activity of alkaloids in a concentration of 10
μg/ml, % inhibition the growth of cells (M ± m, n = 9, P
<0.05)

Substances	HeLa	HEp-2	CCF	PCH
Convolvin	15,4±0,17	8,0±0,13	100±0,24	88±6,2
N-benzyl convolvin	35,0±0,25	81,6±0,28	39,0±0,22	42±3,1
Convolinin	0	11,0±0,25	0	8±0,02
Convolidin	33,0±0,22	28,0±0,31	35,0±0,22	24±2,2
N-chloroacetyl convolvin	99,7±0,22	97±0,33	100±0,22	100±3,6
Fillalbin	0	0	0	0

Cisplatin-Teva	88,6±1,2	91±0,5	78±0,4	82±1,6
Control	0	0	0	0

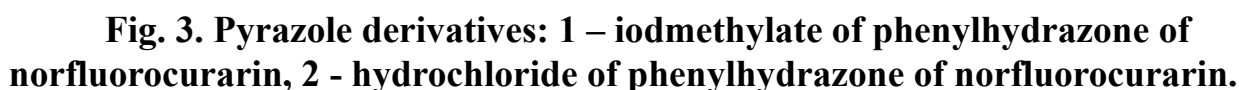
It was established that the greatest activity on cultures of cancer cells and HeLa, HEP-2 at a concentration of 10 µg/ml or 26.3 mM/l and 27,3 mM/l, respectively, showed alkaloids convolvin N-benzyl (5) and N-chloroacetyl konvolvin (6). Alkaloid N-chloroacetyl convolvin (6) showed high cytotoxic activity against all cell types in the experiment and was more cytotoxic than the commercial anti-cancer drug cisplatin (LD₅₀ lethal dose of cisplatin to humans is 2.2 mg/kg). Consequently, the grouping - R1 = COCH₂Cl, R2 = CH₃ in structure of compound significantly increases the toxic effect of the investigated compound on

76

cell culture. N-benzyl convolvin selectively inhibits growth of larynx cancer cell with IC₅₀ = 12,3 mM/l (4.7 µg/ml) and 3 times less toxic to normal cells. IC₅₀ N benzyl convolvina to normal cells is 32.8 mM/l (12.5 µg/ml). LD₅₀ pereschitanaya us of IC₅₀ values of 12,0-13,0 mg/kg by intravenous administration and the expected therapeutic concentration may be within 4,4-5,0 mg/kg at which the compound is able to inhibit the growth of laryngeal carcinoma, it is necessary to investigate *in vivo*. In addition to chemical compounds of natural origin promising in terms of creating effective anticancer drugs are compounds based on organic synthesis.

Next, we have studied indole alkaloids and their derivatives with phenylhydrazine (pyrazoles). Thus, the known synthetic derivatives of pyrazoles possessing cytotoxic activity against colon cancer cultures (patent RU 2305545, 2006) and phenylhydrazine derivatives inhibit cell growth of the mammary glands and cancer of the liver (Hafez O.M., 2014).

In the ICPS AS RUz isolated indole alkaloid norfluorokurarin C₁₉H₂₀N₂O (vinkanin) from the roots of *Vinca erecta* (under the lead. A.H.Yuldashev) and synthesized a complex compound pyrazole, which was formed by reaction with phenylhydrazine - hydrazone norfluorokurarin C₂₅N₂₆N₄. The interaction of the compound with hydrochloric acid is formed - hydrochloride of phenylhydrazone of norfluorokurarin C₂₅H₂₇N₄Cl, and iodide methylete - iodmethylete of phenylhydrazone of norfluorokurarin C₂₆N₂₉N₄I (Fig. 3).



77

Table 6

**Cytotoxic activity of the derivatives of norfluorouracil,
% inhibition the growth of cells ($M \pm m$, $n = 9$)**

[illegible]

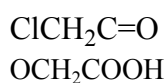
Note: significant difference from controls $P < 0.05$

Thus, it was found that $C_{25}H_{27}N_4Cl$ at a concentration of 24 mM/l (10 μ g/ml) inhibits the growth of cancer cells of all studied types nearly 50% with less cytotoxic to normal cells than cisplatin. LD_{50} of $C_{25}H_{27}N_4Cl$ is 7,7-12,5 mg/kg. $C_{26}N_{29}N_4I$ at a concentration of 19.1 mM/l (10 mM/l) is not toxic to fibroblasts, but inhibits the growth of cancer cells. LD_{50} of $C_{26}N_{29}N_4I$ is 48-52 mg/kg, and the expected therapeutic dose - 10 mg/kg then this compound is able to inhibit 50% the growth of carcinoma of the larynx, breast and cervical cancer cell. It also revealed that a cytotoxic active compound $C_{25}H_{27}N_4Cl$ was not observed "leakage" of the cytosolic enzyme LDH – marker damage of cell's membrane, and while another derivative - $C_{26}N_{29}N_4I$ damaged the membrane of cancer cells at concentrations of 1-10 μ g/ml as the anticancer drug cisplatin.

Thus, the greatest cytotoxic activity, both in relation to cultures of cancer cells, and on cells of fibroblast has hydrochloride of phenylhydrazone of norfluorocurarin, i.e. not completely selective, while iodmethyle of phenylhydrazone of norfluorocurarin acts more selectively, particularly, at a concentration of 10 μ g/ml (19.1 mM/l) it inhibits the growth of cancer cells and damaging their membrane, and this compound is not toxic to normal cells fibroblasts. Both derivatives can be study *in vivo*, as a promising component of anticancer drugs.

Other synthetic compounds, we studied the potency to inhibit the growth of tumor cells and become phenyl derivatives of phenoxyacetic acid, as the literature is evidence of cytotoxic activity of phenylacetic acid and its salts. We studied the compound (Fig. 4) synthesized in National University of Uzbekistan (under the lead. Abdushukurov A.K.), their ability to suppress the growth of cells is presented in Table 7.

78



(1) (2)

Fig. 4. The derivatives of phenyl- и phenoxyacetic acids - n-Cl acethylphenylacetic acid (1) и n-Cl- phenoxyacetic acid (2).

Table 7

**Cytotoxic activity of the derivatives of acetic acid,
% inhibition the growth of cells (M ± m, n = 9)**

Substances μg/ml	HeLa		HEp-2		HBL-100		CCF	
	10	1	10	1	10	1	10	1
n-Cl-acethylphenylacetic acid	13,3± 2,0	41± 1,2	23± 1,2	53± 5,1	60,0 ±1,5	60,0 ±0,9	25± 1,0	16± 0,9
n-Cl- phenoxyacetic acid	4,3± 0,9	0	57± 4,2	43,6 ± 0,5	33± 0,2	29 ±2,0	15± 0,2	19± 1,1
<i>Cisplatin-Teva</i>	68,5± 3,4	35± 2,3	76± 1,3	44± 1,2	76± 4,5	49± 3,0	72± 3,2	45± 2,2
<i>Control</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: significant difference from control p < 0.05.

It is found that the n-Cl-acethylphenylacetic acid showed the highest cytotoxic activity in low concentrations - 1 μg/ml to inhibit the growth of all tested cancer cells, with small cytotoxic activity on normal fibroblast cell cultures as compared with cisplatin. Derivative - n-Cl-phenoxyacetic acid most suppressed growth of cancer cell of larynx in concentrations of 1-10 μg/ml and thus possess less cytotoxic to cultures of breast cancer cells and cervical cancer, as well as the normal fibroblast cell cultures. Furthermore, the compounds induced in concentrations of 1 μg/ml damage of plasma membrane of cancer cells, indicating what the appearance of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase in the culture fluids at staged LDH assay.

Thus, n-Cl-acethylphenylacetic acid, inhibits growth cancer's cells of larynx, cervix, and breast cancer in a low concentration of 4.7 mM/l (1 μg/ml) almost 50%. LD₅₀ is 18-22 mg/kg, and the expected therapeutic concentration - 1-10 mg/kg. IC₅₀ n-Cl-phenoxyacetic acid for larynx cancer cells is 52 mM/l (10 μg/ml), LD₅₀ of 81-92 mg/kg, and the expected therapeutic dose is 1-10 mg/kg dose which the compound is able to inhibit the growth of laryngeal carcinoma.

As a result of the implementation of tasks in the first block of research - the search for cancer cell growth inhibitors, it has been revealed that the total alkaloids from aboveground part of plant of *Convolvulus krauseanus* and from roots of *Arundo donax* inhibits the growth of cancer cells of larynx and small toxicity to

normal cells; sum of alkaloids from roots of *Vinca major* inhibits the growth of

cervical cancer cells and suppress the growth of other cells, including normal. From extracts of fungi endophytes, parasitic on plants of genus of *Vinca* was selecte extracts with low toxicity to normal cells and highly toxic to cancer cells -

Note: significant difference from controls $P < 0.05$, $*P < 0.01$, a control - intact cells.

As shown in table 8, the peak of proliferative activity of ecdysterone and turkesterone accounts for the concentration of $12.5 \mu\text{g/ml}$, when cell proliferation is