

**ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ
ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.01.2020.К/Т.104.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСИТУТИ

ИКРАМОВ САИДАЗИМ АДИЛОВИЧ

**ГЕПАТИТ С ВИРУСИНИ АНИҚЛАШ УЧУН ПЦР ДИАГНОСТИКУМНИ
ИШЛАБ ЧИҚИШ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

**АВТОРЕФЕРАТ
Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори(PhD)**

Тошкент – 2023

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси авторефератининг мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of Doctor of Philosophy (PhD)

Икромов Саидазим Адилевич

Гепатит С вирусини аниқлаш учун ПЦР диагностикаумни ишлаб чиқиш.....3

Икромов Саидазим Адилевич

Разработка ПЦР диагностикаума на выявление вируса гепатита С.....21

Ikramov Saidazim Adilovich

Development of PCR diagnosticum for detection viral hepatitis C.....42

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....45

**ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ
ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.01.2020.К/Т.104.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСИТУТИ

ИКРАМОВ САИДАЗИМ АДИЛОВИЧ

**ГЕПАТИТ С ВИРУСИНИ АНИҚЛАШ УЧУН ПЦР ДИАГНОСТИКУМНИ
ИШЛАБ ЧИҚИШ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

**АВТОРЕФЕРАТ
Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори(PhD)**

Тошкент – 2023

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2017.4. PhD /К79 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.icps.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Азимова Шахноз Садыковна
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Раҳманбердиева Рано Каримовна
кимё фанлари доктори
Ошепкова Юлия Игоревна
кимё фанлари доктори

Етакчи ташкилот: Тошкент фармацевтика институти

Диссертация ҳимояси Ўсимлик моддалари кимёси институти ҳузуридаги DSc.02/30.01.2020.К/Т.104.01 рақамли Илмий кенгашининг 2023 йил «__» _____соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100170, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 77. Тел.:262-59-13, факс: (99871) 262-73-48, e-mail : plantinst@icps.org.uz, ixrv@mail.ru

Диссертация билан Ўсимлик моддалари кимёси институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____рақами билан рўйхатларга олинган). (Манзил: 100170, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 77. Тел.: 262-59-13, факс: (99871) 262-73-48, e-mail : nhidirova@yandex.ru).

Диссертация автореферати 2023йил «__» _____ кунни тарқатилди.

(2023йил «__» _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

Ш.Ш. Сагдуллаев
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси, т.ф.д., профессор

Н.К. Хидирова
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, к.ф.н.,
катта илмий ходим

Э.Х. Ботиров
Илмий даражалар берувчи илмий
Кенгаш қошидаги илмий семинар раиси,
к.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори диссертацияси аннотацияси PhD).

Тадқиқотнинг долзарблиги ва зарурати. Гепатит С вируси – бу инсон жигарига зарар етказадиган ва беморнинг ҳаёт сифатини пасайтирадиган инфекция ҳисобланади. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти (ЖССТ) маълумотларига кўра гепатит С вируси (ГСВ) ташувчилари дунёда 58 миллион кишини ташкил этиб, аксарият беморларда гепатит С нинг ўткир шакли ГСВ нинг сурункали шаклига айланади ва ҳар йили 150000 дан ортиқ инсоннинг ўлимига сабабчи бўладиган жигар циррози, жигар шикастланиши ёки гепатоцеллюлар карциномага олиб келиши мумкин. Афсуски, ЖССТ маълумотларига кўра, беморларнинг 12% дан кўпи ГСВ касаллиги ҳақида маълумотга эга эмас.

Гепатит С вируси ижобий йўналтирилган РНКни ўз ичига олган, *Flaviviridae* оиласига мансуб 55-65 нм ўлчамли сферик вирусдир. Вирус геноми ижобий йўналтирилган битта занжирли РНКда жойлашган, тахминан 9600 нуклеотид қолдиғидан иборат.

Ҳозирги вақтда ГСВнинг диагностикаси иммунофермент анализ (ИФА), иммуно–хроматографик анализ(ИХА), полимеризация занжир реакцияси (ПЗР) усуллари ёрдамида амалга оширилади. Бироқ, энг сезгир ПЗР усули ҳисобланади.

Улар орасидан Реал вақтдаги ПЗР (RT, Real Time PCR) усулининг афзаллиги шубҳасиз унинг аниқлигидир. Кўп қиррали, информацион ва ишлаб чиқариш нуқтаи назаридан Реал вақтдаги ПЗР усулига турли хил молекуляр генетик ёндашувларнинг бутун спектрини яратиш учун ноёб асос сифатида қаралиши мумкин. Бундан ташқари, Реал вақтдаги ПЗР пайдо бўлиши билан нафақат ГСВ ташхисини қўйиш, балки даволаниш жараёнини ҳам кузатиш мумкин.

Ушбу диссертация тадқиқотлари Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 21 январдаги "2022-2026 йилларда Республиканинг фармацевтика тармоғини жадал ривожлантиришга оид чора-тадбирлари тўғрисида" ги ПФ-55-сонли фармонида, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 28 январдаги "2022-2026 йилларга мўлжалланган янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегияси тўғрисида" ги ПФ-60-сонли Фармонида назарда тутилган вазифаларни, шунингдек, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги "Дори воситалари ва тиббиёт буюмларини ишлаб чиқариш ва олиб киришни янада тартибга солиш чора-тадбирлари тўғрисида"ги ПҚ-3489-сон қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги "Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида" ги ПҚ-3532-сон қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2020 йил 25 ноябрдаги "Биотехнологияларни ривожлантириш ва мамлакатнинг биологик хавфсизлик

¹Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йилнинг 28 январдаги ПФ-60-сон «2022-2026 йилларга мўлжалланган янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегияси тўғрисида» Фармони тизимини такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида" ги ПҚ-4899-сон қарори ва Ўзбекистон Республикаси президентининг 2022 йил 16 майдаги "Айрим долзарб вирусли инфекциялар тарқалишига қарши курашиш чора-

тадбирларни такомиллаштириш тўғрисида" ги ПҚ-243-сон қарори шунингдек, ушбу соҳада қабул қилинган бошқа норматив-ҳуқуқий ҳужжатлардаги вазифаларни бажаришга хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги. Ушбу тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишнинг VI "Тиббиёт ва фармакология" устувор йўналишига мувофиқ, Ўсимлик моддалари кимёси институтининг №И-2015-6-15 "Вирусли гепатит С ни аниқлаш учун ПЗР диагностикаум ишлаб чиқиш" (2015-2016)мавзусидаги инновацион лойиҳасининг илмий-тадқиқот ишлари доирасида амалга оширилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Вирусли гепатит С ни аниқлаш учун ПЗР таҳлилини ўрганиш ва ривожлантириш бўйича тадқиқотлар турли давлатлар олимлари ва тадқиқотчилари томонидан олиб борилмоқда. Жумладан, Eileen Z. Zhang ва унинг ходимлари ПЗР усули билан ГСВ 1-генотипининг амплификация усулини ишлаб чиқдилар, Girish J. Kotwal. ва бошқалар вирусли гепатитларнинг диагностикасига янгича ёндашувларни кўрсатиб бердилар. Буюк Британия тадқиқотчилари ГСВ миқдорини аниқлаш учун ПЗР усулини ишлаб чиқишган (ClancyA). Муаллифлар (M.Hassan, E. Azzazy ва бошқалар) ўз ишларида ГСВ ташхисини ИФА таҳлил ёрдамида амалга оширганлар.АҚШ олимлари вирусли гепатит С ни генотиплаш усулини тасвирлаб беришди (S.Frederick, Nolte). G.Pogosyan бошчилигидаги тадқиқотчилар реал вақтдаги ПЗР ва агароза гели ёрдамида қайд этиш усули билан вирусли гепатит С ни аниқлашнинг қиёсий самарадорлигини ўрганишди.

Ҳозирги вақтда ("Марказий эпидемиология илмий-тадқиқот институти" ФБУН(Россия) савдо белгиси остида, реал вақт режимида ПЗР усули билан вирусли гепатит С ни аниқлаш учун "АмплиСенсHCV-FL"тўплам ишлаб чиқарилмоқда.

Хорижий ишланмалар патентлар билан ҳимояланган, шу сабаб уларнинг нуклеотидлар кетма-кетлиги асосида Ўзбекистон Республикасида ПЗР диагностикаумларни ишлаб чиқариш мумкин эмас.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти ЎЗР ФА Ўсимлик моддалари кимёси институтининг И-2015-6-15 "Вирусли гепатит С ни аниқлаш учун ПЗР диагностикаумни ишлаб чиқиш "(2015-2016йй.) инновацион лойиҳа доирасида амалга оширилган.

Тадқиқотнинг мақсади гепатит С вирусини аниқлаш учун "Реал вақтдаги" маҳаллий ПЗР диагностикаумни ишлаб чиқишдан иборатдир.

Тадқиқот вазифалари:

- Праймерлар дизайни учун мос бўлган ГСВ нинг барча 6 генотиби (NCBI маълумотлар базаларидан олинган) учун умумий бўлган нуклеотидлар кетма-кетлиги ҳудудларини аниқлаш. Праймер ва флуоресцент зондларни *in silico* лойиҳалаш,
- олигонуклеотид праймерларнинг кимёвий синтези ва уларни тозалаш,
- энг самарали праймерлар жуфтлигини аниқлаш,
- флуоресцент зондларнинг кимёвий синтези ва уларни тозалаш,

-ЮССХ усули ёрдамида олигонуклеотид праймерларни стандартлаштириш,

- ГСВ ни аниқлаш учун RT-ПЗР методологиясини ишлаб чиқиш,

-ПЗР диагностик тўпламнинг лаборатория синовларини ўтказиш,

-Меъёрий-техник ҳужжатлар ишлаб чиқиш ва ДУК"Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш давлат маркази" рўйхатидан ўтказиш.

Тадқиқотнинг объекти Гепатит С вирусининг РНКси.

Тадқиқотнинг предмети ГСВ вирус геноми, праймерлар, флуоресцент зондлар, олигонуклеотид праймерларнинг термодинамик хусусиятлари, ишлаб чиқилган тўпламнинг сезгирлиги ва ўзига хослиги.

Тадқиқотнинг усуллари. Ишни бажаришда биоорганик кимё усуллари (нуклеин кислоталарни сифат ва миқдорий аниқлаш усуллари, спектрофотометрик усул, олигонуклеотид праймерларни синтез қилиш ва тозалаш усули), молекуляр биология ва биотехнология усуллари қўлланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги:

гепатит С вирусининг 6 та генотипи нуклеотидлар кетма-кетлигини ўрганиш асосида унинг барча генотиплари учун умумий бўлган консерватив геном қисмлари аниқланган; олинган маълумотларга асосланиб, янги олигонуклеотид праймерлари ва флуоресцент зондлар *in silico* лойиҳаштирилган ва синтез қилинган бўлиб, улар ёрдамида ГСВни гибридизацион-флуоресцент (RT-ПЗР) усули билан аниқлаш мумкинлиги кўрсатилган; ГСВ RT-ПЗР тўпламлари учун праймерлар ва флуоресцент зондларнинг синтези амалга оширилган, тозалаш ва стандартлаш усуллари ишлаб чиқилган; вирус РНКси билан праймерларнинг ўзаро комплементар таъсирини кўпайтириш учун янги модификация қилинган нуклеотидлар ишлатилган; тадқиқотлар давомида лойиҳалаштирилган ва синтез қилинган олигонуклеотид праймерлари асосида RT-ПЗР ўтказиш шароитлари танланган ва оптималлаштирилган, шунингдек битта пробиркада RT-ПЗР ўтказиш шароитлари ишлаб чиқилган; ишлаб чиқарилган "ПЗР-Детект-Гепатит С" тўпламнинг лаборатория синовлари ўтказилиб; унинг спецификлиги ва сезгирлиги ўрганилган; ҳамда меъёрий-техник ҳужжатлар ишлаб чиқилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагича:

ГСВ 6 генотипининг нуклеотид кетма-кетлигини таҳлил қилиш асосида консерватив участка 5-NC-минтақа (344 нуклеотид) эканлиги аниқланган ва унинг асосида олигонуклеотид праймерлар лойиҳалаштирилган. ГСВни RT-ПЗР усулида аниқлаш учун олигонуклеотид праймерлар ва флуоресцент зондлар синтез қилинган. ПЗР таҳлили учун оптимал шароитлар ишлаб чиқилган. Диагностик тўплам учун меъёрий-техник ҳужжатлар ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижасида ГСВ диагностикаси учун олигонуклеотид праймерлари ва флуоресцент зондлар кетма-кетлиги билан хорижий аналоглардан фарқ қилувчи RT-ПЗР усули асосидаги маҳаллий тўплам ишлаб чиқилган. Модификацияланган нуклеотидлардан фойдаланиш тест тизимининг сезгирлиги ва спецификлигини оширишга имконият берган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги замонавий биокимёвий ва

молекуляр биологик усуллардан фойдаланиш билан асосланади. Илмий натижалар замонавий аналитик ва статистик усуллар билан таҳлил қилинган. Олинган натижаларни тасдиқлаш республика ва халқаро илмий конференциялардаги маърузалар, мутахассисларнинг эксперт баҳолари, тадқиқот натижаларини муҳокама қилиш, тадқиқот натижаларини экспертлар томонидан рецензия қилинадиган илмий нашрларда чоп этиш, патент олиш, Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни Сақлаш Вазирлиги ҳузуридаги фармацевтика тармоғини ривожлантириш агентлигининг "Дори воситалари, тиббий буюмлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш давлат маркази" ДУК дарўйхатдан ўтказиш орқали амалга оширилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.

Диссертация ишида келтирилган тадқиқот натижалари ҳам фундаментал, ҳам амалий аҳамиятга эга.

Гепатит С вирусининг барча 6 генотиби учун геномнинг консерватив участкалари аниқланиб, хорижий аналоглардан праймерлар ва флуоресцент зондлар нуклеотид кетма-кетлиги билан фарқ қилади. ПЗР таҳлилида ишлатиладиган праймерлар *in silico* лойиҳалаштирилган. Амплификация самарадорлигига таъсир қилувчи праймерларнинг асосий термодинамик хусусиятлари аниқланган. ПЗР самарадорлиги аралашманинг таркиби ва реактивларнинг концентрацияси билан боғлиқлиги аниқланган. Олинган натижалар РНК асосидаги ПЗР диагностика умумларни ишлаб чиқишда ишлатилиши мумкин.

Ушбу тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, олинган натижалардан гепатит С вирусининг РНКсини аниқлаш учун маҳаллий тижорат тўпламларини ишлаб чиқариш учун фойдаланиш мумкин. Бу Ўзбекистон Республикаси эҳтиёжлари учун сотиб олиннадиган қимматбаҳо ПЗР тўпламларини маҳаллий диагностика воситалари ёрдамида ўрнини босиш имконини беради.

Тадқиқот натижаларини жорий қилиниши. Олинган маълумотлар асосида Ўзбекистон Республикаси интеллектуал мулк агентлигининг (ФАР - 01553-сон) "Гепатит С вируси РНКсини аниқлаш учун синтетик олигонуклеотидлар" фойдали моделига патент олинган. Натижада, гепатит С вируси РНКни аниқлаш усули ишлаб чиқилган ва синтез қилинган синтетик олигонуклеотидлар ЎЗР патенти билан ҳимояланган.

Ишлаб чиқилган ПЗР "ПЦР-Детект – Гепатит С" диагностик тўплами Ўзбекистон Республикаси соғлиқни сақлаш вазирлиги қошидаги Фармацевтика тармоғини ривожлантириш агентлиги "Дори воситалари, тиббий маҳсулотлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш давлат маркази" ДУК да рўйхатдан ўтказилган (Рўйхатдан ўтганлик гувоҳномаси № ТВ/М 00620/10/22 28.10.22).

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Диссертация иши натижалари маърузалар шаклида баён этилиб, 2 та халқаро ва 3 та республика илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича Ўзбекистон Республикаси олий аттестация комиссияси томонидан PhD

диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашларда 4 та илмий мақола, жумладан 2 таси халқаро ва 2 таси республика журналларида чоп этилган, 1 та Ўзбекистон Республикаси патентидан иборатдир.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертация ҳажми 93 бет ташкил топган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти, мақсади ва вазифалари келтирилиб, тадқиқот объекти ва предмети тавсифланган, тадқиқотнинг республика фан ва технологияларини ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши тўғрисидаги маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг биринчи бобида **"Гепатит С вируси ҳақида умумий маълумотлар, унинг диагностикаси ва тузилиши"** ҳақида хорижий ва маҳаллий адабиётлардаги маълумотлар батафсил келтирилган бўлиб, унда ГСВ нинг дунёда тарқалиши, вирус зарраларининг тузилиши, вирус геномининг тузилиши, структуравий ва ноструктуравий оқсиллари, вируснинг асосий 6 генотиплари, ГСВ диагностика усуллари ҳақида маълумотлардан иборатдир.

Диссертациянинг иккинчи бобида **"Биоорганик кимё, молекуляр биология, ген муҳандислиги материал, шарт-шароитлари ва усуллари"** экспериментал қисми берилган бўлиб, унда ишлатилган реагентларнинг хусусиятлари ва олигонуклеотид праймерларини синтез қилиш, тозалаш, стандартлаштириш усуллари, шунингдек, вирус РНКсини ажратиш ҳамда ПЗР усуллари берилган.

Диссертациянинг учинчи боби **"Олигонуклеотид праймерларини лойиҳалаш, синтез қилиш ва тозалаш, ГСВ ни аниқлаш учун RT-OT-ПЗР тўпланини ишлаб чиқиш"**га бағишланган. Ушбу бобда ГСВ ни аниқлаш учун RT-OT-ПЗР тўпланини ишлаб чиқиш бўйича шахсий тадқиқот натижалари келтирилган бўлиб, унда 6 та ГСВ генотипининг нуклеотидлар кетма-кетлигини таҳлил қилиш, олигонуклеотид праймерларини лойиҳалаш, синтез қилиш ва тозалаш, ПЗР аралашмаси таркибини оптималлаштириш, ГСВ аниқлаш учун ишлаб чиқилган тўпланининг спецификлиги ва сезгирлиги бўйича қиёсий таҳлил келтирилган.

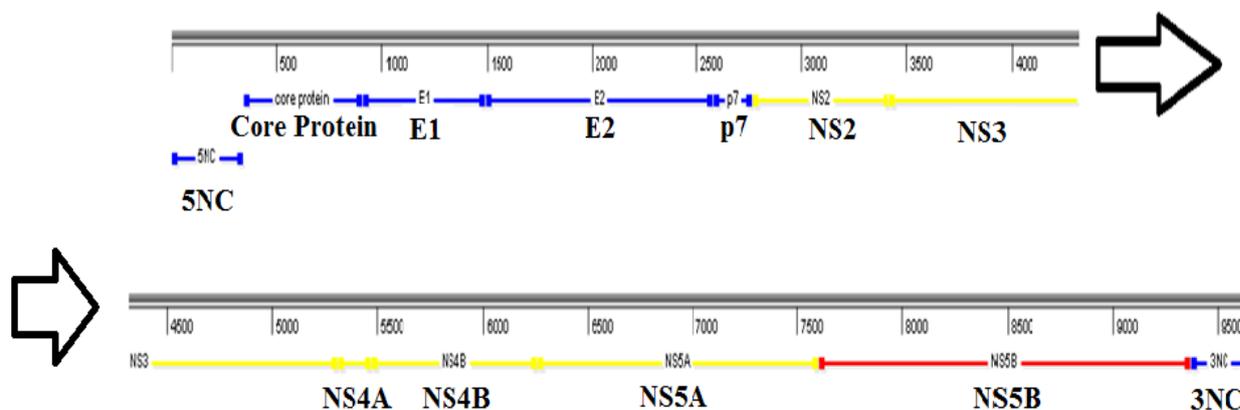
Ишда Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги вирусология илмий-тадқиқот институтидан олинган ГСВ беморларининг плазма намуналаридан фойдаланилган. ГСВ 6 та генотиплари геномининг нуклеотид кетма-кетлиги NS5I маълумотлар базасидан олинган. Таққослаш учун "Марказий Эпидемиология илмий-тадқиқот институти" (Россия) томонидан ишлаб чиқарилган "Ампли СенсHCV-FL" тижорат ПЗР тўплами ишлатилган. Нуклеин кислоталарни қон плазмаси намуналаридан ажратиш учун ЎЗР ФА

ЎМКИ томонидан ишлаб чиқарилган "ЭНКОР" реагентлар тўпламидан фойдаланилган.

Праймерларни дизайни учун маъқбул бўлган ҳудудларни аниқлаш мақсадида ГСВ 6 та генотиби геномларининг нуклеотидлар кетма-кетлигини таҳлил қилиш

Консерватив участкалари топиш учун ГСВнинг 6 та генотиби геномларининг нуклеотидлар кетма-кетлиги таҳлил қилинди. Геном нуклеотидлари кетма-кетлиги NCBI маълумотлар базасидан олинган. ГСВ генотиплари орасидаги нуклеотидлар кетма-кетлигининг гетерогенлиги туфайли DNA STAR LASER GENE 7 дастури таҳлил қилиш учун ишлатилган.

ГСВ геноми 12та қисмдан иборат (1-расм). 4 та таркибий оқсиллар ҳудудлари Core protein, E1, E2, p7, 6та таркибий бўлмаган оқсиллар ҳудудлари NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B ва иккита кодламайдиган ҳудудлар 5NC ва 3NC.

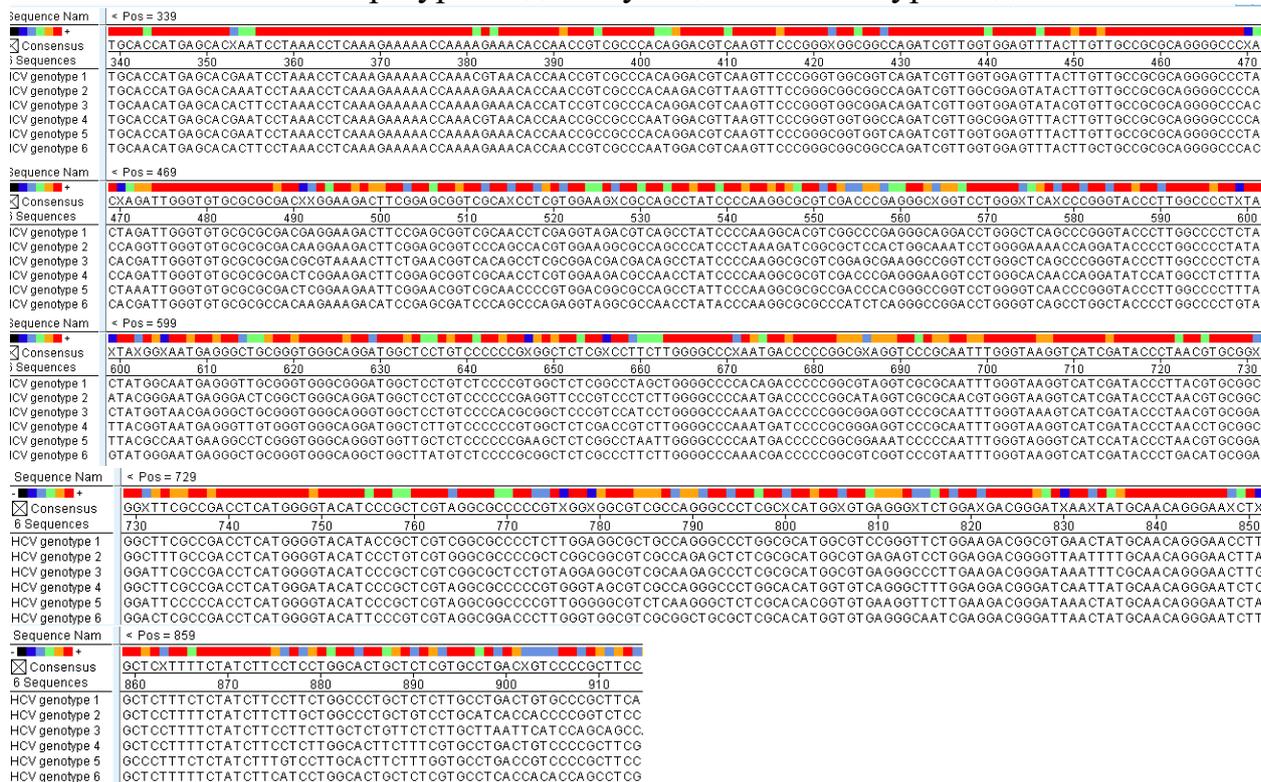


1-расм. Гепатит С вирус геномининг тuzилиши.

ГСВ геномининг нуклеотидлар кетма-кетлиги генотиплар орасида ката фарқларга эга. Бу барча ГСВ 6 та генотиплари учун консерватив ҳудудни топишни қийинлаштирди. DNA STAR LASER GENE 7 дастурдан фойдаланиб, биз ГСВ генотиплар ўртасидаги сайтлар қиёсий таҳлилини ўтказдик. (2-расм ва 3-расм.)

Sequence Name	Pos = 1
Consensus	... C C X X C C C C T X A X X G G G G C G A C A C T C C A C C A T G - A T C A C T C C C C C T O T G A G G A A C T A C T O T C T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O T X C A G C C T C C A G G A C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 1	0 C C A G C C C C T G A T G G G G C G A C A C T C C A C C A T G A A T C A C T C C C C C T O T G A G G A A C T A C T O T C T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O T G A G C C T C C A G G A C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 2	A C C C G C C C T A A T A G G G G C G A C A C T C C C C C A T G A A T C A C T C C C C C T O T G A G G A A C T A C T O T C T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O T A C A G C C T C C A G G C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 3	A C C T G C C T C T T A C G A G G G C A C A C T C C A C C A T G G A T C A C T C C C C C T O T G A G G A A C T T C T O T C T T C A C G C G A A A A G C C C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O T G A G C C T C C A G G A C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 4	... T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T T O T A C A G C C T C C A G G A C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 5	... T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O A A C A G C C T C C A G G A C C C C C C C T C C C G
HCV genotype 6	0 C C A G C C C T T A A C G G G G C G A C A C T C C A C C A T G - A T C A C T C C C C C T O T G A G G A A C T A C T O T C T T C A C G C A G A A A G C C O T C T A G C C A T G C C O T T A G T A T G A O T O T C O T G A G C C T C C A G G C C C C C C C T C C C G
Sequence Name	Pos = 129
Consensus	C C G G A G A G C C A T A T G G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T T G C C G G A T G A C C G G T C C T T T C - T T G G A T - A A A C C C C T C A A T G C C C G G A G A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
HCV genotype 1	C C G G A G A G C C A T A T G G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T T G C C A G G A C A C C G G G T C C T T T C - T T G G A T - A A A C C C C T C A A T G C C T G G A G A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
HCV genotype 2	C C G G A G A G C C A T A T G G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T T G C C G G A A G A C T G G G T C C T T T C - T T G G A T - A A A C C C A C T A T A C C C G G C A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
HCV genotype 3	C C G G A G A G C C A T A T G G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T C G C T G G G T G A C C G G G T C C T T T C - T T G G A G - C A A C C C C T C A A T C C C A G A A A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T A G C A T A G C C
HCV genotype 4	... T T G G A T - T A A C C C C T C A A T G C C C G G A A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
HCV genotype 5	C C G G A G A G C C A T A T G G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T T G C C G G A T G A C C G G G T C C T T T C - T T G G A T - A A A C C C C T C A A T G C C C G G A G A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
HCV genotype 6	C C G G A G A G C C A T A T G A T G T C T C C G G A A C C G G T G A G T A C A C C G A A T T G C C A G A C A C C G G G T C C T T C A T T G G A T G A A A C C C C T C A A T G C C T G G A G A T T T G G C G T G C C C C C G C A A G A C T G C T A G C C
Sequence Name	Pos = 249
Consensus	A C T G C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A
HCV genotype 1	A C T G C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A C
HCV genotype 2	A C T G C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C A A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A A C
HCV genotype 3	A T C A C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C A T G A G C A C A C T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A A C
HCV genotype 4	A C T G C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G C C G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C G A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A A C
HCV genotype 5	A C T G C T A G C C G A G T A G T G T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C G A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A A C
HCV genotype 6	A C T G C T A G C C G A G T A G C T T G G G T C C G A A A G C C C T T G T G G T A C T G C C T G A T A G G T G C T T G C G A G T G C C C C G G G A G G T C T C O T A G A C C O T G C A C C A T G A G C A C A A T C C T A A A C C T C A A A G A A A A C C A A A A C

2-расм. ГСВнинг 6 та генотиплари ўртасида 5-NC – кодламайдиган ҳудудни таққослаш. Қизил ранг билан белгиланган нуклеотид кетма-кетлиги ГСВ олтига генотиплари ўртасидаги тўлиқ мосликни кўрсатади.



3-расм. ГСВнинг 6 та генотиплари ўртасида Core protein – кодламайдиган ҳудудни таққослаш.

Таҳлил натижаларига кўра праймерлар дизайни учун 5'-NC, Core оксил ва 3'-NC ҳудудлар эканлигини аниқладик. 3'-NC ҳудуд праймерларни лойиҳалаш учун мос бўлганлиги билан унинг ўлчами қисқа кетма-кетликдан (140 н.ж.) иборат бўлиб, праймерлар дизайнида зарур ўзгарувчанликни таъминламади ва шу сабабли биз ушбу ҳудудни чиқариб ташладик. Натижада, 6 та генотип ўртасида 5'-NC кодламайдиган ҳудуд учун нуклеотидлар кетма - кетлигининг мослиги 70,05%, Core оксил ҳудуд учун 65,04% ни ташкил этиши аниқланди.

Олигонуклеотид праймерларнинг дизайни

ГСВ геномида танланган сайтлар учун олигонуклеотид праймерлар in silico ишлаб чиқилди (1-жадвал).

1-жадвал

Конструкцияланган праймерлар

№	Праймерларнинг номи	Праймерларнинг нуклеотид кетма-кетлиги	Геномда жойлаш иши	Праймер узунлиги	Сууюклани ш ⁰ С
1	HCSHF	TCACGCAGAAAGCGTCTA	64-81	18	54
2	HCSHR	GCAGACCACTATGGCTC	135-151	17	54
3	HCSHF2	GCAGAAAGCGTCTAGCCA	68-85	18	56
4	HCSHR3	GCAGACCACTATGGCTCAC	133-151	19	60
5	HCV-F	CATGGCGTTAGTATGAGTG	84-102	19	56
6	HCV-R	STATCAGGCAGTACCACAAG	280-299	20	60

7	NEW-F	CATGGCGTTAGTATGAGTGT CG	84-105	22	66
8	NEW-R	TCCGCAGACCACTATGGCTC	135-154	20	60
9	ACF91	CCTCTAGCCATGGCGTTAGT A	76-96	21	64
10	ACR90	CAAGCACCCCTATCAGGCAGT A	287-307	21	64
11	ACR91	GTGACTCCACCAACGATCTG	426-445	20	62
12	ACF92	CGGAACCGGTGAGTACACCG GAAT	151-174	24	76
13	ACR92	CGTGCAGTGGCGCGCACACC CAA	471-493	23	78
14	ACF93	GGTACTGCCTGATAGGGTGC TTGCGAGT	285-312	28	88
15	ACR93	GGCCGTGCAGTGGCGCGCAC ACCCAA	471-496	26	88
16	HCXF02	CATGGCGTTAGTATGAGTGT CG	84-105	22	66
17	HCXR01	CACTCGCAAGCACCCCTATCA G	293-313	21	66
18	HCXR03	GGCYATTCCGGTGTACTCA	160-178	19	58
19	HCXR04	GACCCAACACTACTCGGCTA	251-270	20	62
20	HCXR05	GAGCACGAATCCTAAACCT	344-362	19	56
21	HCVHR01	TGGTACTGCCTGATAGGGTGC C	284-304	21	66
22	HCVHR02	CCTTGTGGTACTGCCTGATA	279-298	20	60

Натижада, 22 жуфт праймерлар ишлаб чиқилиб, улар жумласига 8 та форвард ва 14 та реверс праймерлар киради(1-жадвал).

Тадқиқотлар доирасида модификацияланган праймерлар ҳам синтез қилинди, бунда LNA нуклеотиди (lock nucleic acid) праймерларнинг сувоқланиш ҳароратини ошириш учун ишлатилди (2-жадвал).

2-жадвал

Модификацияланган праймерлар

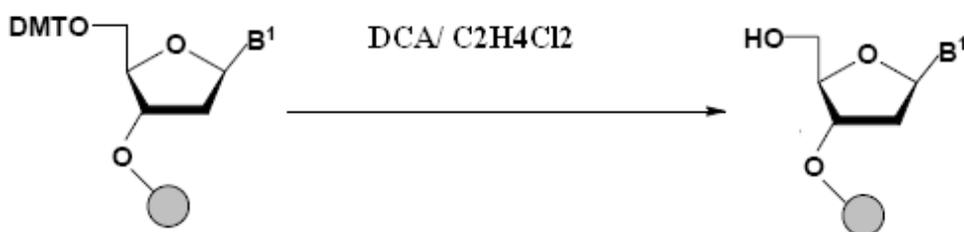
№	Праймер номи	Праймерлар нуклеотид кетма-кетлиги	Праймер узанлиги	Эриш t °C
1	HCXF02-84shLa	GGCGTT ^{LNA} AGTATGAGTGTCTG	19	54
2	HCXR04a-270shLa	CCCAACAACCT ^{LNA} ACTCGGCT	17	54

3	HCXF03	GAGAGCCAT ^{LNA} AGTGGTCTG	18	56
4	HCXR05	GAGCACGAAT ^{LNA} CCTAAACCT	19	56

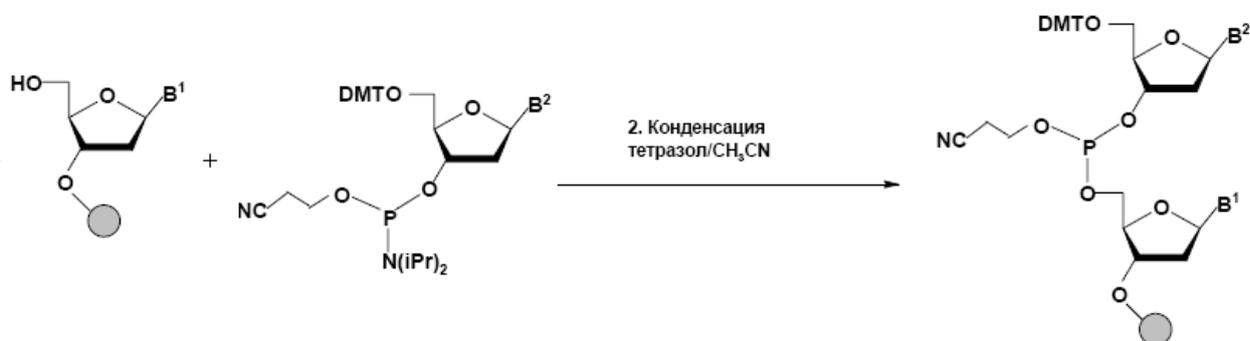
Шундай қилиб, биз 22 жуфт оддий праймерларни ишлаб чиқдик, улардан кейинги тадқиқотлар учун 7 та форвард ва 12 та реверс праймерлар, шунингдек 2 жуфт модификацияланган праймерлар танлаб олинди.

Олигонуклеотид праймерлар синтези

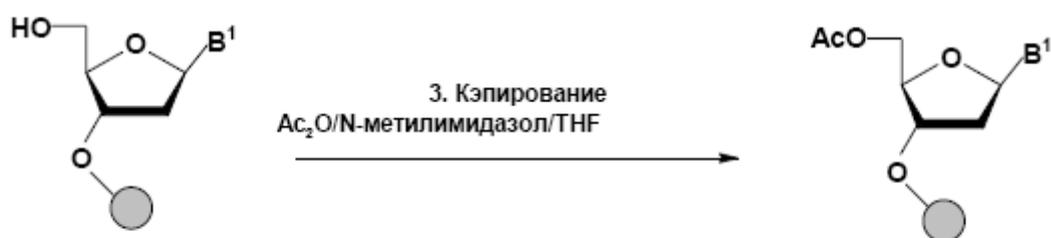
Дизайн қилинган олигонуклеотид праймерларнинг синтези ASM-2000 “Биоссет” автоматик синтезаторида, амидофосфит усули ёрдамида амалга оширилди. Бунда синтез жараёни қуйидаги 4 босқичдан иборат: (4-расм).



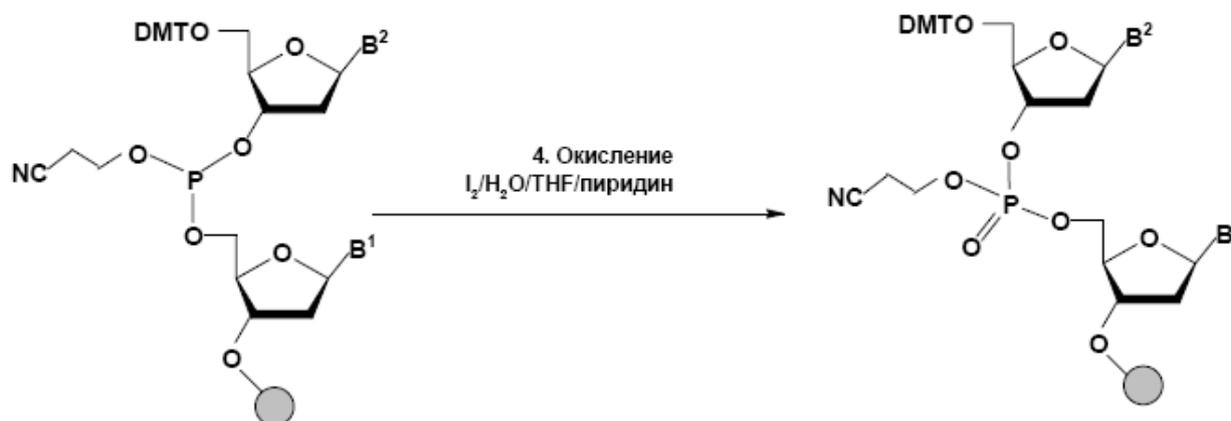
1-босқич. Диметокситритил (ДМТ) гуруҳини олиб ташлаш.



2-босқич. Амидофосфит нуклеозидининг бирикиши.



3-босқич. Эркин гидроксил гурухларини химоялаш.



4-босқич. Фосфит гурухни фосфотриэфир боғланишигача оксидланиши.

4-расм. Олигонуклеотид праймерларни амидофосфит усул билан синтез қилиш босқичлари.

Синтезнинг биринчи босқичида нуклеотид қолдиғининг 5¹ОН гурухи очилади, бунга диметокситритил гурухининг дихлорсирка кислотасининг (ДСА) дихлорэтан эритмаси таъсирида ажралиб чиқиши билан эришилади. Синтезнинг иккинчи босқичида амидофосфит нуклеозид активатор н-тетразол ёрдамида эркин 5¹ОН гурухига бириктирилади ва фосфит-учэфир боғи шаклланади. Учинчи босқичда, реакцияга киришмаган эркин 5¹ОН гидроксил гурухлари сирка ангидриднинг тетрогидрофурандаги эритмаси СаpА ва 1-метилимидазолнинг тетрогидрофурандаги СаpВ эритмаси таъсирида ациллаш билан блокланади. Тўртинчи босқичда оксидланиш жараёни орқали нуклеотид қолдиқлари орасидаги фосфит боғи йод, пиридин ва сув аралашмасининг тетрогидрофурандаги эритмаси таъсирида фосфоучэфир боғланишига айланади. Синтез қилинган праймерлар тескари фазали хроматография усули ёрдамида DMT-on Purification Resin (SBSGenetech, China) сорбенти билан тўлдирилган картридждларда тозаланди.

Тозалаш жараёнидан кейин олигонуклеотид праймерларнинг концентрацияси Gene Quant II спектрофотометрида ўлчанди (3-жадвал).

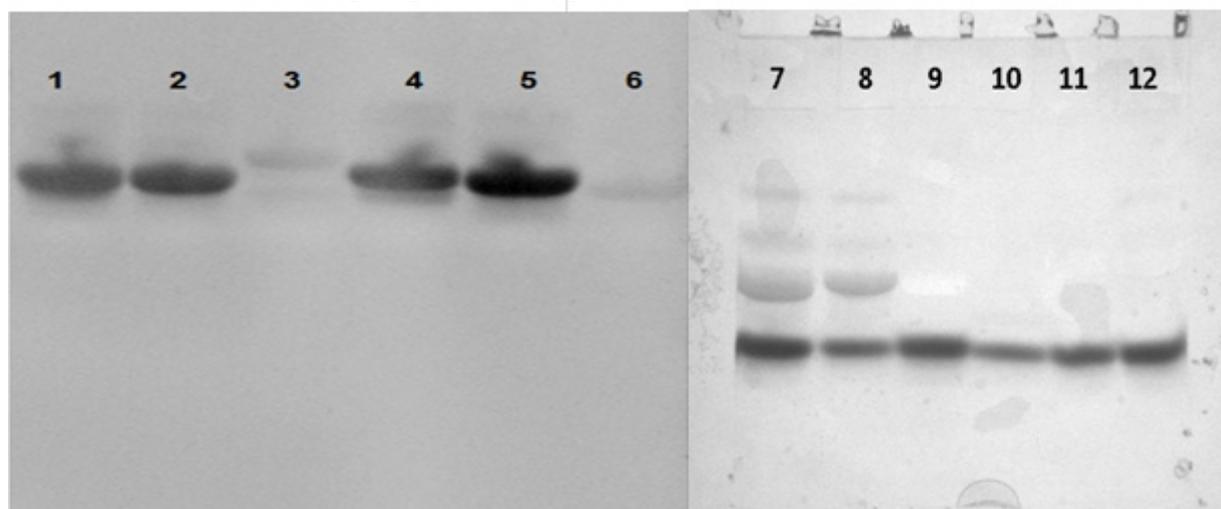
3-жадвал

Тозалаш жараёнидан кейинги праймерларнинг концентрациялари

Праймер номи	Нисбати Ratio (1,7-1,8)	Оптик зичлик	Концентрация нмоль/мкл
HCV-F	1,786	1,162	20,7
HCV-R	1,730	1,709	17,4
NEW-F	1,755	1,676	16,5
NEW-R	1,748	2,234	21,2
ACF91	1,702	1,622	22,2
ACR90	1,784	2,816	21,7
HCXF02	1,789	1,259	19,1
HCXR01	1,722	1,458	21,2

HCXR03	1,705	2,161	18,5
HCXR04	1,726	1,698	22,8
HCXR05	1,733	1,578	21,2
HCVHF01	1,760	1,642	20,4
HCVHR01	1,756	1,954	22,3

Праймерларнинг тозалиги 20% ПААГ гелъ электрофорези ёрдамида аниқланди. Натижалар 5-расмда кўрсатилган.

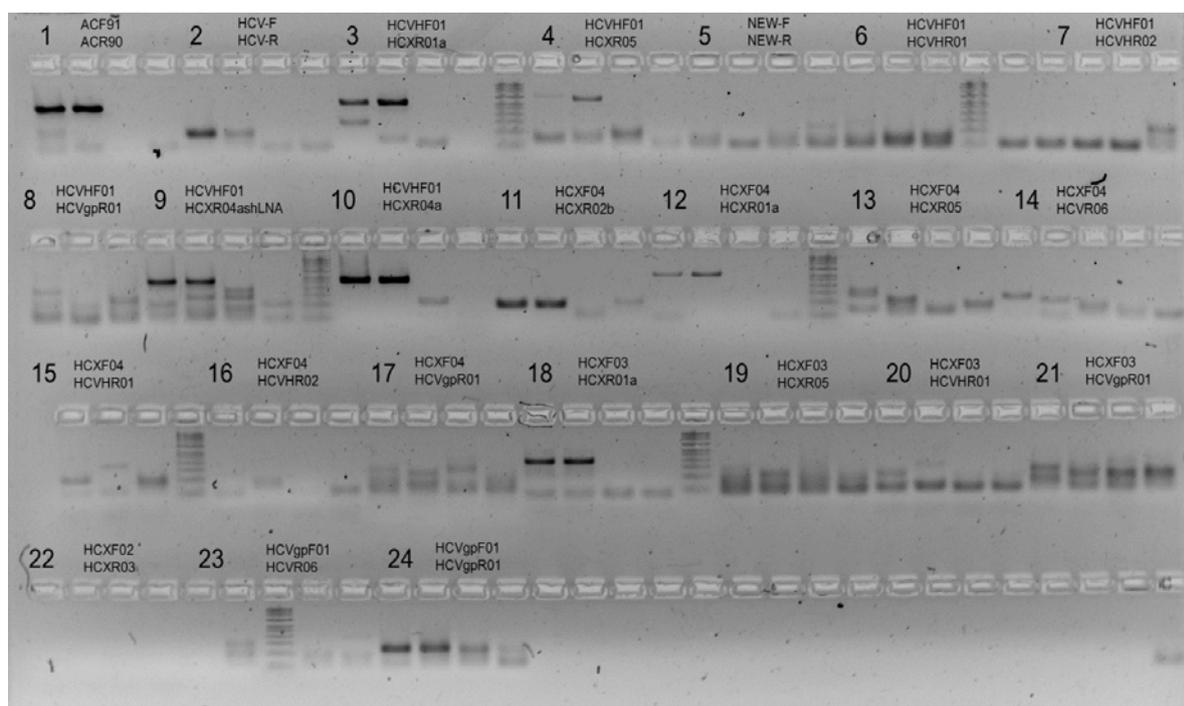


5-расм. Праймерларнинг 20% ПААГ электрофорези.

Праймерлар :1.HCV-F 2.HCV-R 3.NEW-F 4. ACR905.ACF91 6. NEW-R
7.HCXF028.HCXR01 9.HCXR03 10.HCXR04 11.HCXR05 12.HCVHF01

5-расмдан кўриниб турибдики, тозаланмаган праймерларда асосий маҳсулот чизиғидан ташқари ёт маҳсулотларнинг уч кичик чизиқлари (1,2,3,4,5,6,7,8 намуналар) мавжуд, тозаланган праймерларда (9,10,11,12 намуналар) эса битта асосий чизиқ мавжуд.

ГСВ ни аниқлаш учун энг самарали праймер жуфтлигини аниқлаш
Энг самарали праймерлар жуфтлигини аниқлаш учун ПЗР одатдаги усулда турли праймер жуфтлари билан амалга оширилди(6-расм).



6-расм.2% агарозда ПЗР таҳлил маҳсулотларининг гелъ электрофорези.

ПЗР таҳлил маҳсулотларининг 2% агарозадаги гелъ электрофорези натижаларига кўра (6-расм), (1) АCF91-ACR90, (3) – HCVHF01 – HCXR01a ва (10) HCVHF01-HCXR04a праймер жуфтликлари энг самарали бўлиб чикди.Бу намуналарнинг чизиклари энг кучли интенсивликни намоён этишди. 6-расмдан кўриниб турибдики, (1) АCF91-ACR90 праймер жуфтлигининг ампликонлари ёрқинроқ рангга ва аниқ чизикларга эга бўлиб, кўшимча чизиклар мавжуд эмас (ёт маҳсулотларсиз).

Бундан ташқари, RT ПЗР таҳлили учун, танланган ампликон тузилишига мос келадиган флуоресцент зондлар *in silico* ишлаб чикилди ва уларнинг синтези амалга оширилди(4-жадвал).

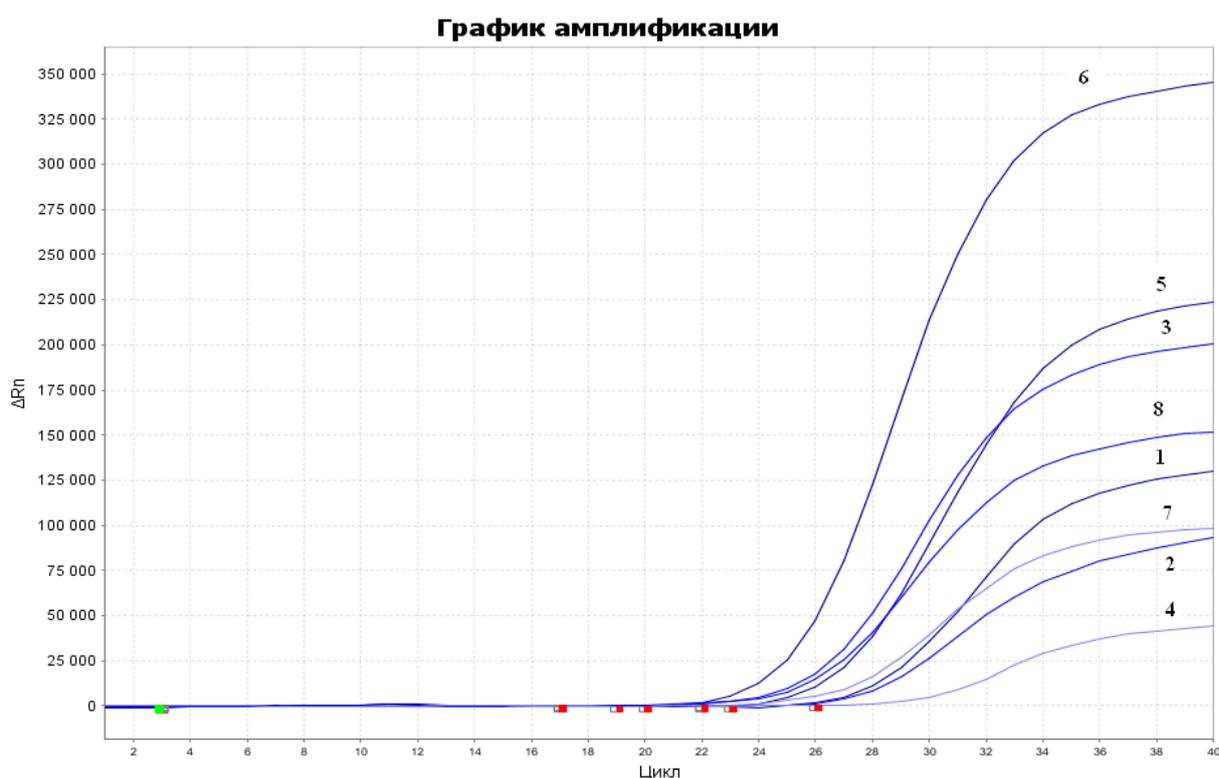
4-жадвал

Флуоресцент зондлар

№	Зонд номи	Нуклеотидлар кетма-кетлиги	Зонд узунлиги	Суюқланиш t ⁰ C
1	HCP01	JOE- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG A-BHQ	24	74,4
2	HCP02	TET- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG -BHQ	23	73,2
3	HCP03	FAM- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG A-BHQ	24	74,4
4	HCP04	FAM-CGGGAGAGCCATAGTGG TCTGCGG- BHQ	25	60,2

5	HCP05	FAM- CGGGAGAGCCATAGTGGTCT GCGGAAA-BHQ	28	63,9
6	HCP01nq 2	FAM-CGGGAGAGCCATAGTGGT CTGCGG-BHQ	25	61,1
7	HCP01nq 1	FAM-CGGGAGAGCCA-BHQ- AGTGGTCTGCGG-BHQ	23	76,9
8	HCP01q- 1dt0	FAM-C-BHQ-CGGGAGAGCCA TAGTGGTCTGCGA-BHQ	26	52,8
9	HCP01FA	FAM-ACGGGAGAGCCATAGT GGTCTGCGA – BHQ	26	53,4
1 0	HCP01q- 2A	FAM-ACGGGAGAGCCATAGTGG TCTGCGG-BHQ-1	26	61,1

Барча синтезланган флуоресцент зондлар учун энг самарали праймер-зонд жуфтлиги аниқланди(7-расм).

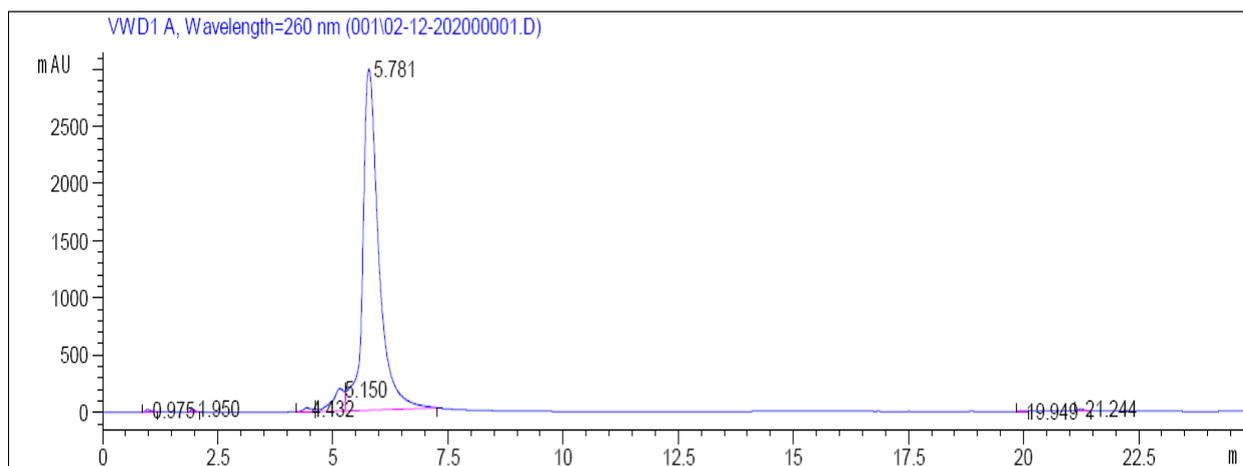


7-расм.Энг самарали флуоресцент зондни аниқлаш учун RT - ПЗР таҳлил графиги.1- HCP01, 2-HCP01nq2, 3-HCP03, 4-HCP04, 5-HCP05, 6-HCP02, 7- HCP01FA, 8-HCP01q-2A.

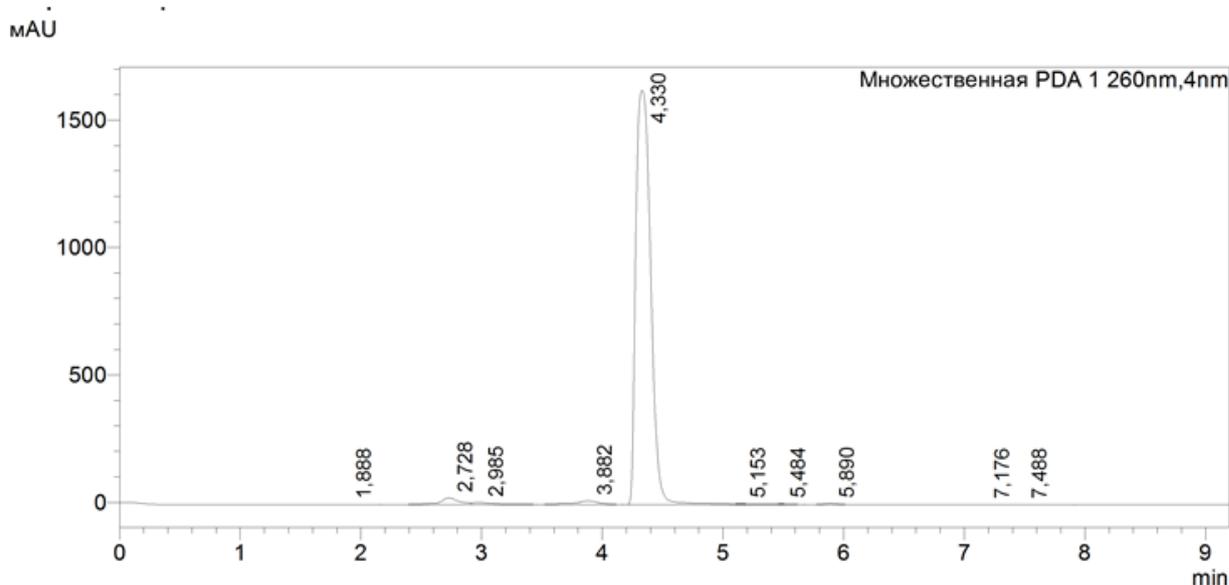
Синов натижаларига кўра, флуоресцент сигналнинг энг юқори 345000 кўтарилиши 6 намуна, яъни HCP02 зонди томонидан кўрсатилди ва ушбу намуна кейинги синовлар учун танлаб олинди.

Олигонуклеотид праймерларни ЮССХ ёрадида стандартлаштириш

Праймерларни стандартлаштириш учун ЮССХ усули ёрдамида таҳлил қилиш услуги ишлаб чиқилди. Праймерлар Agilent 1100 хроматографида таҳлил қилинди. Олинган хроматограммаларда қуйидаги чўққиларни кўриш мумкин (8-расм). Хроматография шартлари: 1. Градиент -60% ацетонитрил, 40% буфер (0,1 М триэтиламмонийацетат, рН 7,0 га етказилган); 70%-30%, 80% - 20%. Колонка: XDB C18 Eclipse, 100x3 мм, 3,5 мкм, "Zorbax", детекция: UV=260 нм, оқим тезлиги 0,5 мл.



Форвард праймер хроматограммаси



Реверс праймер хроматограммаси

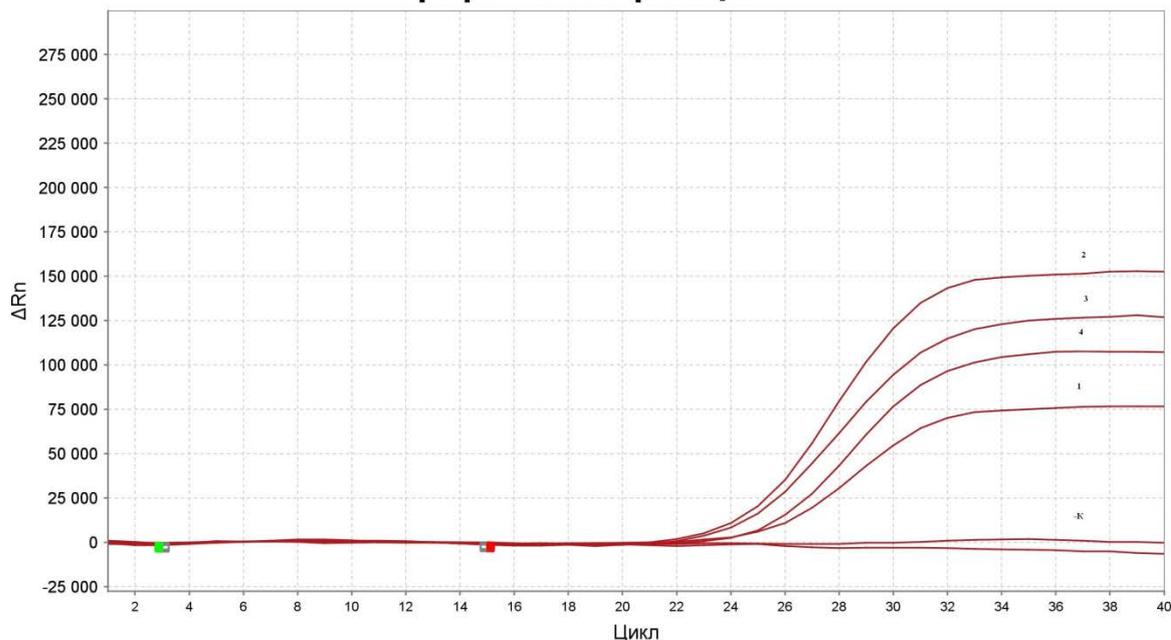
8-расм. Олигонуклеотид праймерларни ЮССХ хроматограммалари.

Хроматография натижаларига кўра, форвард праймер АСF91 94,6%, реверс праймер АСR90 95,4% тозалигига эга (8-расм).

ПЗР аралашмасидаги праймерларнинг концентрациясини оптималлаштириш.

Кейин, биз праймерларнинг самарали концентрациясини аниқлаш учун бир қатор тажрибалар ўтказдик (9-расм).

График амплификации

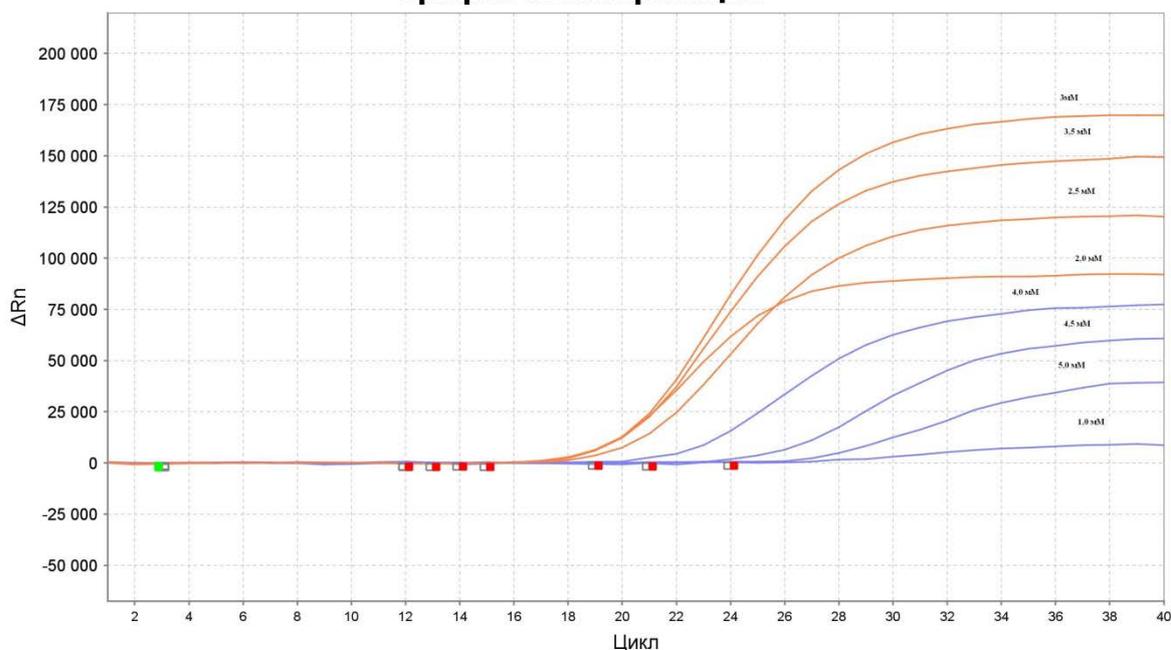


9-расм. Праймерларнинг самарали концентрациясини аниқлаш учун RT - ПЗР таҳлилининг графиги. 1 - 100 нмол, 2 - 200 нмол, 3 - 300 нмол, 4 - 400 нмол, к – салбий назорат намунаси.

Натижада, праймерларнинг энг самарали концентрацияси 200 нмолни ташкил этди, флуоресцент сигнал 150 000 бирликка ортди.

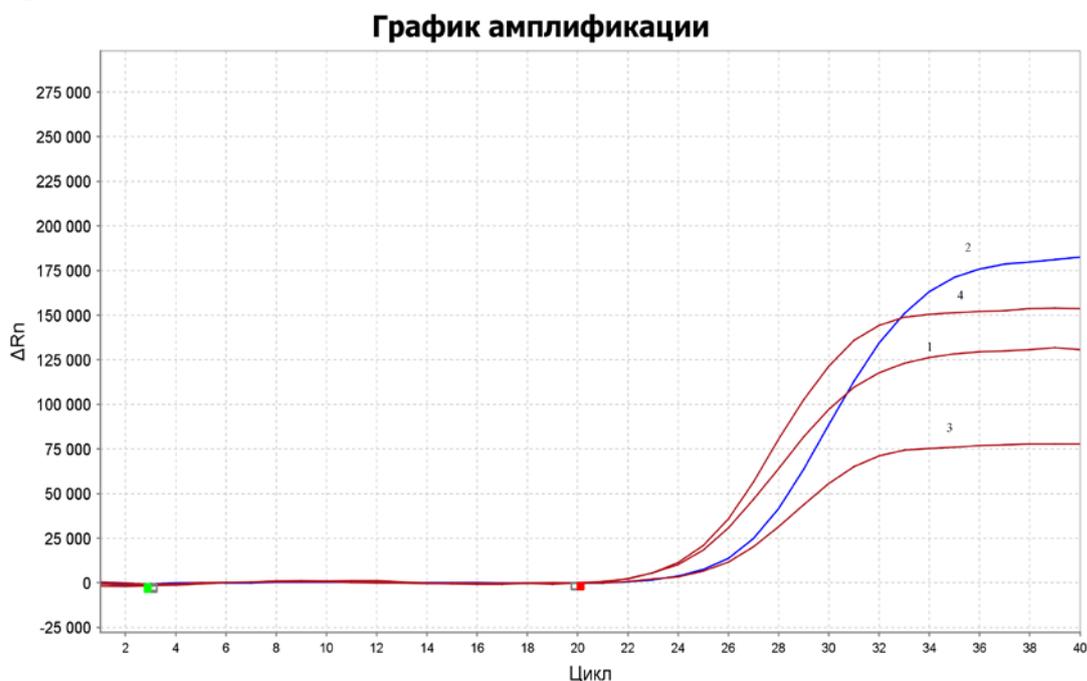
Навбатдаги тадқиқотларимизда ПЗР аралашмасидаги Mg^{2+} ионларининг оптимал концентрацияси аниқланди, шу мақсадда магний хлориднинг турли концентрациялари билан ПЗР таҳлили ўтказилди (10-расм).

График амплификации



10-расм. Аралашмадаги Mg^{2+} ион концентрациясининг ПЗР самарадорлигига таъсири.

Таърибаларда Mg^{2+} тузининг турли концентрацияли ПЗР аралашмалари ишлатилган (1 дан 5 ммольгача). Флуоресцент сигналнинг (170,000 бирликка) энг катта ўсишиги ПЗР аралашмасидаги 3.0 ммоль Mg^{2+} концентрациясида эришилди. Mg^{2+} ионларининг бу концентрациясидан кейинги ПЗР таҳлилларда фойдаланилди. Сўнг, ПЗР реакцияси учун энг самарали буфер эритмаси танланди. Бунинг учун ГСВ ПЗР турли буфер эритмалари билан таҳлил қилинди (11-расм).



11-расм. 5-жадвалда кўрсатилган турли хил буфер эритмалари билан RT-ОТ-ПЗР таҳлилининг графиги.

5-жадвал

Энг самарали буфер эритмаларнинг таркиби

Буфер номи	Буфер система	pH	KCl	$(NH_4)_2SO_4$	Поли сорбат - 20	БСА	ДТТ
1. NK Buffer	Трис – SO_4 /30 мМ	8,4	20 мМ	10 мМ	0,02%	0,05 мг/мл	
2. One step PCR Buffer 1	Трис – HCl /60 мМ	8,8	75 мМ		0,1%		
3. One step PCR Buffer 2	Трис – HCl /30 мМ	8,3	20 мМ	10 мМ	0,02%	0,05 мг/мл	
4. One step PCR Buffer 3	Трис – HCl /50 мМ	8,3	75 мМ				10 мМ

11-расмдан кўришиб турибдики, №2 буфер 180,000 бирликдаги энг юқори флуоресцент сигналини кўрсатди, №4 ва № 1 намуналар мос равишда 155,000 бирлик ва 127,000 бирликка флуоресцент сигналининг кўпайишини кўрсатди. Шундай қилиб, қуйидаги таркибли композит буфер - 75 мМКСl, 60 мМ TrisHCl, 0,1% Tween 20, рН=8,8 ГСВ РНКсини аниқлаш мақсадида RT- ПЦР таҳлил учун энг самарали буфер деб топилди.

Гепатит С вирусини аниқлаш учун «ПЦР-Детект Гепатит С»реагентлар тўпламининг спецификлиги ва сезгирлигини қиёсий таҳлил қилиш

Биз ишлаб чиққан «ПЦР-Детект Гепатит С»тўпламининг сезгирлиги ва ўзига хос фаоллигини солиштирма таҳлил учун «АмплиСенсHCV-FL» (кат. № R-V1-Mod (RG, iQ, Mx, Dt), яроликлик муддати 2020-12-14) ФБУН “Марказий эпидемиология илмий-тадқиқот институти” (Россия) томонидан ишлаб чиқарилган серия 14.12.19 тўпламидан фойдаланилди. 40 та намуналар, шу жумладан ГСВ беморларининг 30 та ижобий намуналари ва соғлом одамларнинг 10 та намуналари таҳлил қилинди (6-жадвал).

6-Жадвал

Гепатит С вирус РНКсини аниқлаш учун "ПЗР-детект гепатит С" ва “Амплисенс HCV-FL”тўпламларининг қиёсий тест натижалари

№	«ПЦР-Детект Гепатит С» тўпламининг натижалари Ст*кўрсаткичлари TET канал бўйича			«АмплиСенс-HCV-FL» тўпламининг натижалари Ст*кўрсаткичлари Yellow канал бўйича			
1	23,57	21	22,79	1	23,64	21	22,16
2	21,45	22	25,16	2	21,33	22	25,43
3	19,13	23	19,53	3	18,68	23	19,17
4	30,12	24	29,09	4	30,22	24	29,43
5	27,28	25	26,79	5	26,79	25	25,87
6	22,34	26	23,15	6	22,67	26	23,23
7	11,74	27	31,46	7	10,98	27	30,88
8	25,69	28	14,33	8	26,01	28	15,11
9	23,78	29	29,14	9	22,72	29	28,84
10	29,62	30	30,54	10	29,38	30	30,27
11	15,54	31	-	11	15,79	31	-
12	21,53	32	-	12	21,31	32	-
13	23,56	33	-	13	23,74	33	-
14	27,44	34	-	14	28,11	34	-
15	23,69	35	-	15	23,15	35	-
16	27,12	36	-	16	27,76	36	-
17	21,08	37	-	17	21,43	37	-
18	23,45	38	-	18	24,21	38	-
19	19,87	39	-	19	19,36	39	-

20	17,51	40	-	20	17,97	40	-
----	-------	----	---	----	-------	----	---

Синовлар натижасида биз томондан ишлаб чиқилган «ПЦР-Детект-Гепатит С» тўплами, тижорат«АмплиСенс-НСV-FL»тўплами билан ўхшаш натижаларни кўрсатди. Иккала тўпламдаги St* кўрсаткичининг ижобий намуналардаги қийматлари яқин ва соғлом одам намуналарида салбий натижаларни кўрсатди.

Шундай қилиб, диссертация тадқиқотлари доирасида ишлаб чиқилган RT-ПЗР тўплами гепатит С вирусининг клиник диагностикасида қўлланилиши мумкин. Ушбу тўпламнинг диагностик хусусиятлари хориждан импорт қилинадиган аналоглардан кам эмас ва уларга нисбатан анча паст нархга эга.

ХУЛОСА

1. Гепатит С вируси (ГСВ) 6 генотипининг геномлари кетма-кетлиги генотиплар орасидаги консерватив ҳудудларни аниқлаш орқали таҳлил қилинди. Илқбор консерватив ҳудудлар учун 22 та ноёб олигонуклеотид праймерлари ишлаб чиқилди.
2. Конструкцияланган олигонуклеотид праймерларнинг кимёвий синтези амалга оширилди. Синтез қилинган праймерлар тескари - фаза хроматография усули ёрдамида тозаланган.
3. Стандарт ПЗР усули учун энг самарали праймерлар жуфтлиги АСF91 [21 н.ж] ва -АСR90 [21 н.ж] аниқланган.
4. Биринчи маротаба танланган 210 н.ж. ўлчамли ампликон учун флуоресцент зондлар ишлаб чиқилди ва уларнинг синтези амалга оширилган.
5. Ишлаб чиқилган праймерларни ЮССХ усули ёрдамида стандартлаштириш амалга оширилган.
6. ПЗР таҳлили шароитлари оптималлаштирилди: RT-ПЗР усули билан ГСВ ни самарали аниқлаш учун праймерларнинг концентрацияси, Mg²⁺ионларининг энг самарали концентрацияси аниқланди. RT-ПЗР усули ёрдамида ГСВ ни аниқлаш учун самарали буфер - One step PCR Buffer 1 танланган.
7. Ишлаб чиқилган маҳаллий тўпламнинг тижорат тўпламига нисбатан лаборатория синовлари ўтказилган ва унинг сезгирлиги, ҳамда спецификлиги хорижий аналоглардан кам эмаслиги аниқланган. "ПЗР-Детект-гепатит С" тўплами учун меъёрий-техник ҳужжатлар ишлаб чиқилди. Тўплам Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни Сақлаш Вазирлиги ҳузуридаги Фармацевтика тармоғини ривожлантириш агентлигининг “Дори воситалари, тиббий маҳсулотлар ва тиббий техника экспертизаси ва стандартлаштириш давлат маркази” ДУКда рўйхатдан ўтказилган (Гувоҳнома рақами № ТВ/М 00620/10/22 28.10.22).

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.01.2020.К/Т.104.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ИКРАМОВ САИДАЗИМ АДЫЛОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ПЦР ДИАГНОСТИКУМА НА ВЫЯВЛЕНИЕ
ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации доктора философии (PhD) по химическим наукам**

Ташкент – 2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) по химическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.4. PhD /K79

Диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-сайте Научного Совета (www.icps.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyo.net).

Научный руководитель: **Азимова Шахноз Садыковна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Рахманбердыева Рано Каримовна**
доктор химических наук
Ощепкова Юлия Игоревна
доктор химических наук

Ведущая организация: Ташкентский фармацевтический институт.

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в ____ часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.01.2020.K/T.104.01. при Институте химии растительных веществ, (Адрес: 100170, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 77. Тел.:262-59-13, факс: (99871) 262-73-48), e-mail: plantinst@icps.org.uz, ixrv@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института химии растительных веществ (регистрационный номер № ____). Адрес: 100170, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 77. Тел.:262-59-13, факс: (99871) 262-73-48, e-mail: nhidirova@yandex.ru.

Автореферат диссертации разослан: «__» _____ 2023 года.
(реестр протокола рассылки ____ от «__» _____ 2023 года).

Ш.Ш. Сагдуллаев
Председатель Научного Совета по присуждению
ученых степеней, доктор технических наук, профессор

Н.К. Хидирова
Ученый секретарь Научного Совета по присуждению
ученых степеней, кандидат химических наук,
старший научный сотрудник

Э.Х. Ботиров
Председатель Научного семинара при Научном Совете
по присуждению ученых степеней,
доктор химических наук, профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность исследования. Гепатит С является инфекцией, приводящей к поражению печени человека, и ухудшающий качество жизни больного. Носителями Вируса Гепатита С (ВГС) по данным ВОЗ являются 58 миллионов человек в мире, у большинства пациентов острая форма Гепатита С переходит в хроническую форму ВГС. Это может привести к циррозу печени, гепатическому повреждению или гепатоцеллюлярной карциноме, которые приводят к более 150 тысяч смертей каждый год. К сожалению, по данным ВОЗ, о своей болезни ВГС информированы не более 12% больных.

Вирус Гепатита С является минус ориентированным РНК содержащим вирусом, представляя собой сферический вирус размером 55-65 нм из семейства Flaviviridae. Геном вируса состоит примерно из 9600 нуклеотидов, расположенных в положительно ориентированной одноцепочной РНК.

В настоящее время диагностирование ВГС проводят методами ИФА, ИХА, ПЦР. Однако наиболее чувствительным является метод ПЦР.

Неоспоримым преимуществом метода ПЦР в реальном времени является его точность. С точки зрения универсальности, информативности, и технологичности, ПЦР в реальном времени может рассматриваться как уникальная основа для создания целого спектра различных молекулярно-генетических подходов для исследований. Более того, с появлением ПЦР в Реальном времени (RT-ПЦР) можно осуществлять не только диагностирование ВГС, но и следить за ходом лечения.

Данное диссертационное исследование служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан № УП-55 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли Республики в 2022-2026 годах» от 21 января 2022 года, а также в Постановлении Президента Республики Узбекистан №ПП-60 «О стратегии развития нового Узбекистана на 2022-2026 годы» от 28 января 2022 года, Постановлением Президента Республики Узбекистан №ПП-3489 «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения» от 23 января 2018 года, Постановлением Президента Республики Узбекистан № ПП-3532 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли» от 14 февраля 2018 года, Постановления РУз № ПП-4899 от 25.11.2020 г «О комплексе мер по развитию биотехнологий и совершенствованию системы биологической безопасности страны» и Постановлении Президента Республики Узбекистан № ПП-55 от 16.05.2022г «О совершенствовании мер противодействия распространению некоторых актуальных вирусных инфекций», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в

¹Постановлении Президента Республики Узбекистан №ПП-60 от 28.01.2022 «О стратегии развития нового Узбекистана на 2022-2026 годы»

соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологии Республики VI «Медицина и фармакология», в рамках научно-исследовательских работ инновационного проекта Института химии растительных веществ на тему № И-2015-6-15 «Разработка ПЦР диагностикума для выявления вирусного гепатита С» (2015-2016 гг.)

Степень изученности проблемы. Исследования по изучению и разработке ПЦР диагностикума на выявление вирусного гепатита С проводятся учеными и исследователями разных стран. Так, Eileen Z Zhang с сотрудниками разработали методику амплификации ВГС генотипа -1 методом ПЦР, Girish J. Kotwal, и др. показали подходы к диагностике вирусных Гепатитов. Исследователями из Великобритании разработана ПЦР методика количественного определения ВГС (Clancy A). Авторы (Hassan M. E. Azzazy и др.) приводят в своей работе диагностирование ВГС, используя ИФА анализ. Ученые из США описали метод генотипирования Вирусного Гепатита С (Frederick S. Nolte). Исследователями под руководством Rogosyan G. была изучена сравнительная эффективность метода измерения при выявлении вирусного гепатита С в режиме ПЦР реального времени и при детекции в агарозном геле.

В настоящее время производят набор для определения вирусного гепатита С методом ПЦР в режиме реального времени, выпускаемый под торговой маркой «Ампли Сенс HCV-FL» (ФБУН «Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» (Россия).

Зарубежные разработки защищены патентами и не могут быть использованы для производства ПЦР-диагностикумов на основе их последовательности нуклеотидов в Республике Узбекистан.

Связь темы диссертации с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ инновационного проекта Института химии растительных веществ по проекту № И-2015-6-15 «Разработка ПЦР диагностикума для выявления вирусного гепатита С» (2015-2016 гг.)

Целью исследования является разработка отечественного ПЦР диагностикума в «реальном времени» для выявления вируса Гепатита С.

Задачи исследования:

Определение участков нуклеотидных последовательностей, общих для всех 6 генотипов (из баз данных NCBI) ВГС, подходящих для дизайна праймеров. In silico конструирование праймеров и флуоресцентного зонда; химический синтез олигонуклеотидных праймеров и их очистка; определение наиболее эффективной пары праймеров; химический синтез флуоресцентных зондов и их очистка; стандартизация олигонуклеотидных праймеров методом ВЭЖХ; разработка методики проведения RT-ПЦР для выявления ВГС; проведение лабораторных испытаний ПЦР диагностикума. Разработка нормативно технической документации на набор и регистрация в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники».

Объектами исследования является РНК Вирусного Гепатита С.

Предметами исследования являются геном вируса, праймеры, флуоресцентные зонды, термодинамические свойства олигонуклеотидных праймеров, специфичность, чувствительность разработанного набора.

Методы исследования. При выполнении работы использовали методы биоорганической химии (методы качественного и количественного определения нуклеиновых кислот, спектрофотометрический метод, метод синтеза и очистки олигонуклеотидных праймеров), методы молекулярной биологии и биотехнологии.

Научная новизна исследования:

Проведено исследование нуклеотидных последовательностей 6 генотипов Вируса Гепатита С общих для всех генотипов ВГС консервативных участков РНК ВГС. На основе полученных данных *in silico* сконструированы и синтезированы новые олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды для определения ВГС методом гибридизационно – флуоресцентной метки (RT-PCR). Разработаны методы проведения синтеза, очистки и стандартизации праймеров и флуоресцентного зонда к набору RT-ПЦР ВГС. Для повышения специфического, комплементарного взаимодействия праймеров с РНК вируса были использованы модифицированные нуклеотиды. На основе разработанных и синтезированных нами олигонуклеотидных праймеров подобраны и оптимизированы условия проведения RT-ПЦР, оптимизированы условия проведения RT ПЦР в одной пробирке. Проведены лабораторные испытания разработанного набора. Изучены показатели специфичности и чувствительности разработанного диагностикума. Разработана нормативно – техническая документация на набор «ПЦР – Детект – Гепатит С».

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

При проведении анализа последовательности 6 генотипов ВГС был выявлен консервативный участок 5¹– NC регион (344 нуклеотида) для всех 6 генотипов вируса, на основе которого было проведено конструирование олигонуклеотидных праймеров. Были синтезированы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды для определения ВГС. Разработаны оптимальные условия для ПЦР анализа. Разработана нормативно – техническая документация на диагностический набор.

В результате исследования был разработан отечественный набор для диагностики ВГС методом RT–ПЦР, отличающийся от зарубежных аналогов последовательностью олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда. Использование модифицированных нуклеотидов позволило увеличить чувствительность и специфичность тест – системы.

Достоверность результатов исследования обосновывается использованием современных биохимических и молекулярно-биологических методов. Научные результаты анализировали современными аналитическими и статистическими методами. Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, публикации результатов исследований в рецензируемых научных изданиях, получение

патентов, регистрацией в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» Агентства по развитию фармацевтической отрасли при Министерстве Здравоохранения Республики Узбекистан.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Результаты исследований, представленные в работе, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Установлен участок генома Вирусного Гепатита С, консервативный для всех 6 генотипов вируса, отличающаяся от зарубежных аналогов последовательностью нуклеотидов праймеров и флуоресцентного зонда. In silico сконструированы олигонуклеотидные праймеры, используемые при постановке ПЦР анализа. Определены основные термодинамические свойства праймеров, влияющих на эффективность амплификации. Определена взаимосвязь эффективности ПЦР с составом смеси и концентрацией реагентов. Полученные данные могут быть использованы при разработке ПЦР диагностикумов на основе РНК.

Практическая значимость результатов данного исследования заключается в том, что полученные результаты могут использоваться для производства отечественных коммерческих наборов реагентов для выявления РНК Вируса Гепатита С. Это позволит осуществить импортозамещение дорогостоящих ПЦР наборов, закупаемых для нужд Республики Узбекистан, на отечественные тест – системы.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных данных получен патент на полезную модель Агенства интеллектуальной собственности РУз “Синтетические олигонуклеотиды для определения РНК Вируса Гепатита С” (№FAP 01553). В результате синтетические олигонуклеотиды, сконструированные и синтезированные нами для определения РНК вируса гепатита С, имеют патентную защиту.

Набор реагентов для определения Вирусного Гепатита С “ПЦР – Детект Гепатит С” зарегистрирован в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» Агенства по развитию фармацевтической отрасли при Министерстве Здравоохранения Республики Узбекистан, регистрационное удостоверение № ТВ/М 00620/10/22 от 28.10.22.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований по теме диссертации изложены в виде докладов и прошли апробацию на 2 международных и 3 республиканских научно-исследовательских конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 1 патент РУз, 4 научные статьи, в том числе 2 в международных и 2 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 93 страниц компьютерного текста.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность, цель и задачи темы диссертации, характеризуется объект и предмет проведенного исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, изложены 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 диссертационной работы **«Общие сведения, диагностика и строение Вирусного Гепатита С»** подробно изложен обзор зарубежной и отечественной литературы, который включает в себя информацию о распространении ВГС в мире, строении вирусных частиц, структуре генома вируса, обзор по структурным и неструктурным белкам ВГС, информацию об основных 6 генотипах вируса, методы диагностики ВГС.

Во второй главе диссертации **«Материалы, условия и методы биоорганической химии, молекулярной биологии, генной инженерии»** приведена экспериментальная часть, в которой даны характеристики использованных реактивов и методики по синтезу, очистке, стандартизации олигонуклеотидных праймеров, метод выделения РНК вируса, метод ПЦР.

Третья глава диссертации посвящена **«Конструированию, синтезу и очистке олигонуклеотидных праймеров, разработке методики RT-OT-ПЦР для выявления ВГС»**. В главе представлены результаты собственных исследований по разработке RT-OT-ПЦР набора для выявления ВГС, включающего в себя анализ нуклеотидных последовательностей 6 генотипов ВГС, конструирование, синтез и очистку олигонуклеотидных праймеров, оптимизацию состава ПЦР смеси, сравнительный анализ на специфичность и чувствительность разработанного набора.

В работе были использованы образцы плазмы пациентов больных ВГС, полученных из НИИ Вирусологии МЗ РУз. Нуклеотидные последовательности генома 6 генотипов ВГС были взяты из баз данных NCBI. В качестве сравнения использовался коммерческий ПЦР набор «Ампли Сенс HCV-FL», производства ФБУН «Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» (Россия). Для выделения нуклеиновых кислот из образцов плазмы крови использовали набор реагентов «ЭНКОР» производства ИХРВ АН РУз.

Анализ нуклеотидных последовательностей геномов 6 генотипов ВГС с целью поиска возможных участков для конструирования праймеров.

Был произведен анализ последовательности нуклеотидов генома 6 генотипов ВГС для нахождения консервативных участков. Последовательности нуклеотидов генома были получены из баз данных NCBI. В связи с неоднородностью последовательности нуклеотидов между генотипами ВГС, была использована программа DNASTARLASERGENE 7 для проведения анализа.

Геном ВГС состоит из 11 регионов (Рис.1.). Из трех регионов структурных белков Core protein, E1, E2, p7, 6 регионов неструктурных белков NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B и двух некодирующих регионов 5NC и 3NC.

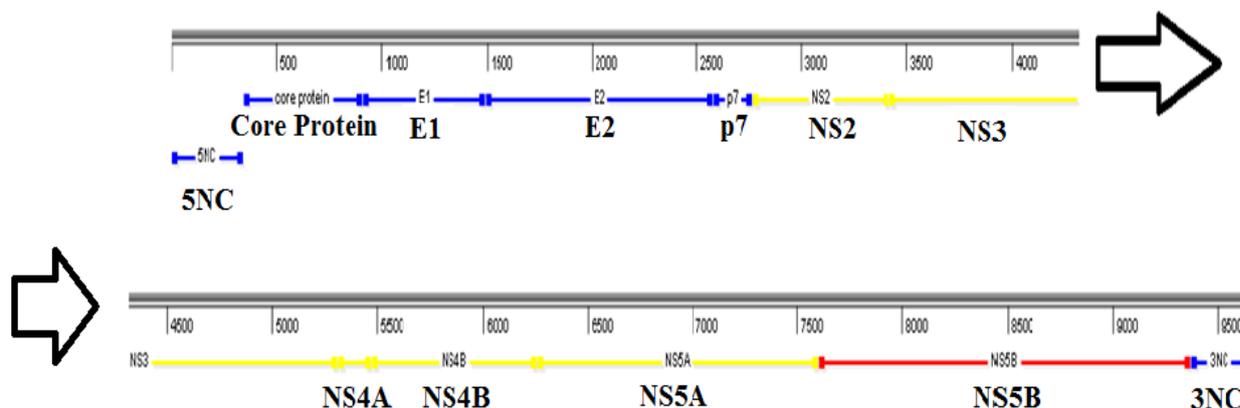


Рис.1. Структура Генома Вирусного Гепатита С.

Нуклеотидные последовательности генома ВГС имеют большие различия между генотипами. Это затрудняло задачу нахождения консервативных участков для всех 6 генотипов ВГС. Используя программу DNA STAR LASER GENE7 мы провели сравнительный анализ участков между генотипами ВГС Рис.2 и Рис.3.



Рис.2. Сравнение 5'-НС – некодирующего региона шести генотипов ВГС. Красным цветом обозначено полное совпадение последовательности в шести генотипах ВГС.

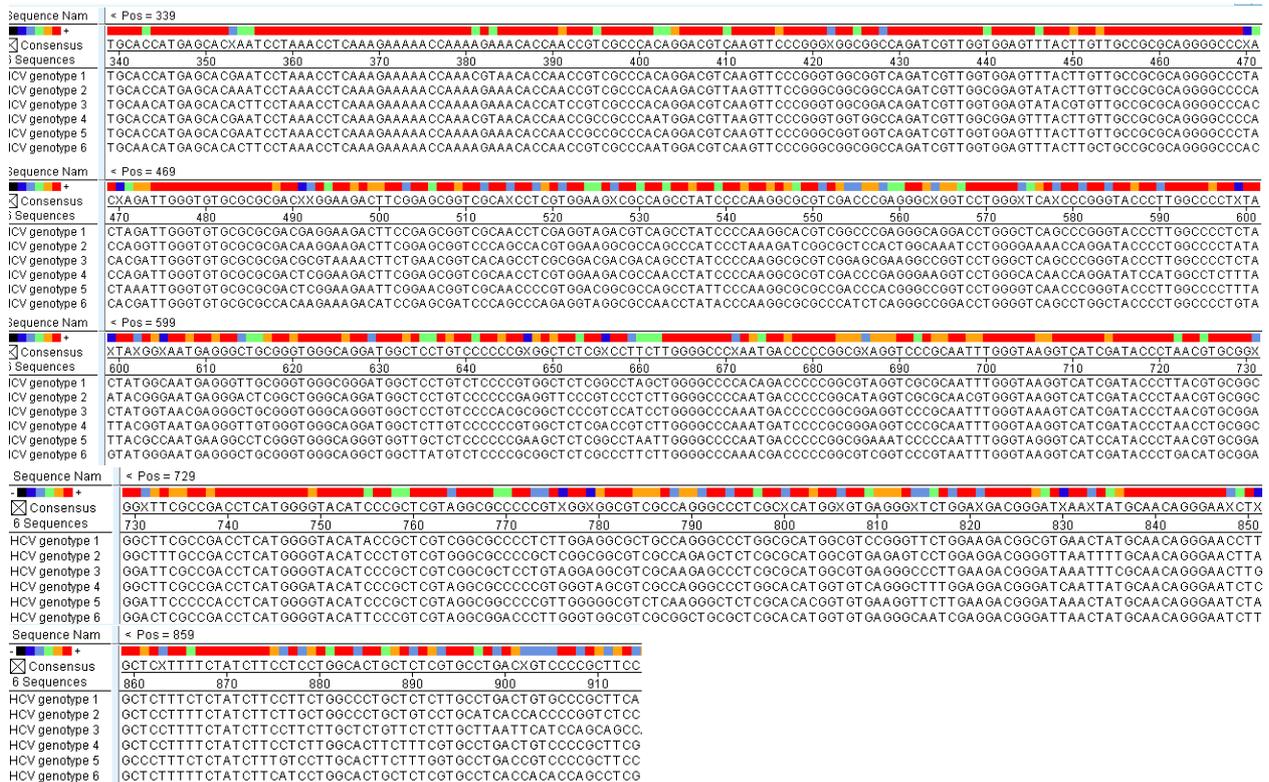


Рис.3. Сравнение последовательности С-сегмента белка шести генотипов ВГС.

По полученным результатам анализа нами было установлено, что подходящими регионами являются 5'-NC – некодирующий регион и регион Core белка, и 3'-NC – не кодирующий регион имел однородные участки между генотипами ВГС, но был исключен за счет короткой последовательности (140 п.н.), не предоставляющей нужную вариабельность при конструировании праймеров. В результате между 6 генотипами- идентичность последовательностей нуклеотидов для 5'-NC – некодирующего региона составила 70,05%, для региона С-сегмента белка составила – 65,04%.

Конструирование олигонуклеотидных праймеров.

На выбранные участки в геноме ВГС были *in silico* сконструированы олигонуклеотидные праймеры (таб.1.).

Таблица 1. Сконструированные праймеры

№	Название праймера	Последовательность нуклеотидов	Расположение в геноме	Длина праймера	t °C плавления
1	HCSHF	TCACGCGAAGAGCGTCTA	64-81	18	54
2	HCSHR	GCAGACCACTATGGCTC	135-151	17	54
3	HCSHF2	GCAGAAAGCGTCTAGCCA	68-85	18	56
4	HCSHR3	GCAGACCACTATGGCTCAC	133-151	19	60
5	HCV-F	CATGGCGTTAGTATGAGTG	84-102	19	56
6	HCV-R	STATCAGGCAGTACCACAAG	280-299	20	60
7	NEW-F	CATGGCGTTAGTATGAGTGTG	84-105	22	66
8	NEW-R	TCCGCAGACCACTATGGCTC	135-154	20	60
9	ACF91	CCTCTAGCCATGGCGTTAGTA	76-96	21	64
10	ACR90	CAAGCACCCCTATCAGGCAGTA	287-307	21	64

1 1	ACR91	GTGACTCCACCAACGATCTG	426-445	20	62
1 2	ACF92	CGGAACCGGTGAGTACACCGGA AT	151-174	24	76
1 3	ACR92	CGTGCAGTGGCGCGCACACCCA A	471-493	23	78
1 4	ACF93	GGTACTGCCTGATAGGGTGCTTG CGAGT	285-312	28	88
1 5	ACR93	GGCCGTGCAGTGGCGCGCACAC CCA	471-496	26	88
1 6	HCXF02	CATGGCGTTAGTATGAGTGTCG	84-105	22	66
1 7	HCXR01	CACTCGCAAGCACCCSTATCAG	293-313	21	66
1 8	HCXR03	GGCYATTCCGGTGTACTCA	160-178	19	58
1 9	HCXR04	GACCCAACACTACTCGGCTA	251-270	20	62
2 0	HCXR05	GAGCACGAATCCTAAACCT	344-362	19	56
2 1	HCVHR 01	TGGTACTGCCTGATAGGGTGC	284-304	21	66
2 2	HCVHR 02	CCTTGTGGTACTGCCTGATA	279-298	20	60

В результате было сконструировано 22 пары праймеров, из них 8 форвард праймеров и 14 реверс праймеров (таб.1.)

Также были синтезированы модифицированные праймеры, для увеличения температуры плавления праймера использован нуклеотид LNA (lock nucleic acid) (таб.2).

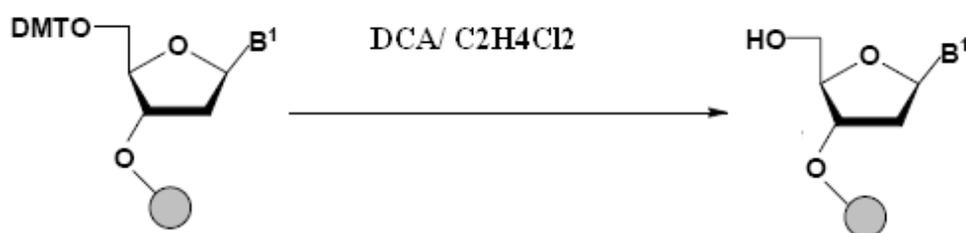
Таблица 2.Модифицированные праймеры

№	Условное название праймера	Последовательность нуклеотидов	Длина праймера	t ⁰ С плавления
1	HCXF02-84shLa	GGCGTT ^{LNA} AGTATGAGTGTCG	19	54
2	HCXR04a-270shLa	CCAACAAC ^{LNA} ACTCGGCT	17	54
3	HCXF03	GAGAGCCAT ^{LNA} AGTGGTCTG	18	56
4	HCXR05	GAGCACGAAT ^{LNA} CCTAAACCT	19	56

Таким образом нами сконструировано 22 пары обычных праймеров, из них для дальнейших работ было отобрано 7 форвард праймеров и 12 реверс праймеров, и 2 пары модифицированных праймеров.

Синтез олигонуклеотидных праймеров.

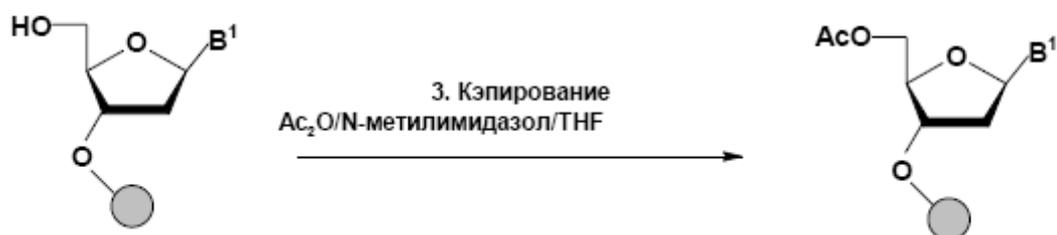
Сконструированные олигонуклеотидные праймеры были синтезированы амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе модели ASM-2000 Biosset. Синтез состоит из следующих 4 этапов (Рис.4.)



Этап 1 снятие диметокситрительной группы DMT



Этап 2 Присоединение амидофосфитного нуклеозида



Этап 3 Блокировка свободных гидроксильных групп



Этап 4 окисление фосфитной связи в фосфотриэфирную связь

Рис.4. Этапы синтеза олигонуклеотидных праймеров амидофосфитным методом.

На первом этапе синтеза освобождается 5¹ОН группа нуклеотидного остатка от диметокситритильной группы при действии раствора дихлоруксусной кислоты (DCA) в растворе дихлорэтана. На втором этапе синтеза происходит присоединение амидофосфитного нуклеозида к свободной ОН группе, при помощи активатора н-тетразола с образованием фосфитно – триэфирной связи. На третьем этапе происходит блокировка не вступивших в реакцию свободных гидроксильных групп при помощи ацилирования, посредством действия растворов Cap A - уксусного ангидрида в тетрагидрофуране и CapB 1-метилимидазола в тетрагидрофуране. На четвертом этапе фосфитную связь между нуклеотидными остатками, при окислении переводят в фосфотриэфирную связь, в смеси йода, пиридина и воды в тетрагидрофуране. Синтезированные праймеры очищали при помощи обращено – фазной хроматографии на картриджах, заполненных сорбентом DMT-on Purification Resin (SBS Genetech, China).

После очистки, концентрацию олигонуклеотидных праймеров измеряли на спектрофотометре Gene Quant II. (таб.3.)

Таблица 3. Результаты измерения концентрации праймеров после очистки

Название праймера	Соотношение Ratio (1,7-1,8)	Оптическая плотность	Концентрация в нмоль/мкл
HCV-F	1,786	1,162	20,7
HCV-R	1,730	1,709	17,4
NEW-F	1,755	1,676	16,5
NEW-R	1,748	2,234	21,2
ACF91	1,702	1,622	22,2
ACR90	1,784	2,816	21,7
HCXF02	1,789	1,259	19,1
HCXR01	1,722	1,458	21,2
HCXR03	1,705	2,161	18,5
HCXR04	1,726	1,698	22,8
HCXR05	1,733	1,578	21,2

HCVHF01	1,760	1,642	20,4
HCVHR01	1,756	1,954	22,3

Чистоту праймеров определяли методом гель-электрофореза в 20% ПААГ. Результаты представлены в Рис.5.

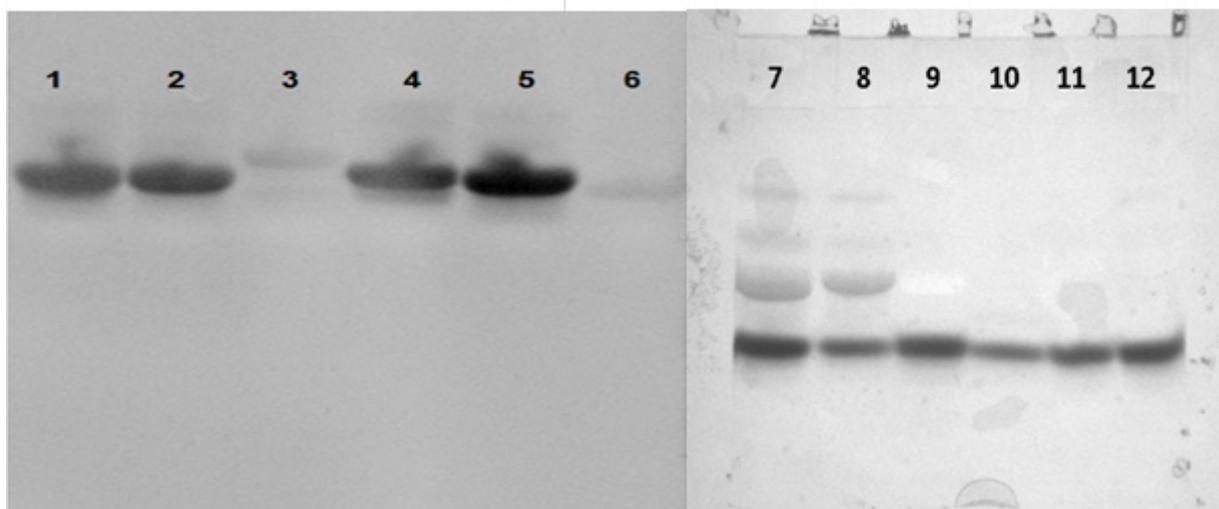


Рис.5. Гель электрофорез праймеров в 20% ПААГе . Гель электрофорез праймеров в 20% ПААГе . Праймеры :1.HCV-F 2.HCV-R 3.NEW-F 4. ACR905.ACF91 6. NEW-R 7.HCXF028.HCXR01 9.HCXR03 10.HCXR04 11.HCXR05 12.HCVHF01

Как видно из рис.5., очищенные праймеры имеют одну интенсивную полосу (образцы 9,10,11,12), в то время как, неочищенные праймеры имеют кроме основной полосы продукта, три минорные полосы примесных продуктов (образцы 1,2,3,4,5,6,7,8).

Определение наиболее эффективной пары праймеров для определения ВГС.
Для определения наиболее эффективных пар праймеров был проведен ПЦР анализе обычном режиме с различными парами праймеров по выявлению ВГС.

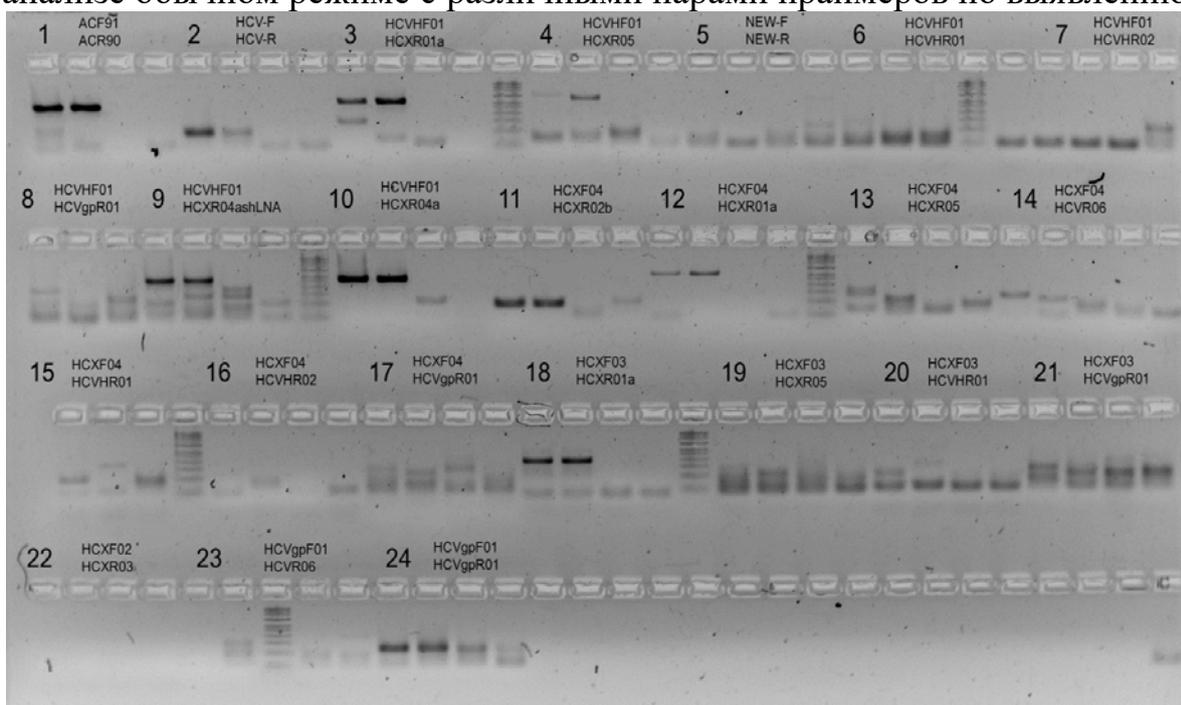


Рис.6. Гель-электрофорез продуктов ПЦР анализа в 2 % агарозе

По результатам продуктов ПЦР анализа электрофореза в 2% агарозном геле (рис.6.), наиболее эффективными оказались пары праймеров(1) АСF91-АСR90 , пары праймеров (3) – НСVНF01 – НСХR01а и (10) НСVНF01-НСХR04а которые показали наиболее интенсивное свечение полос. Как видно из рис.6., ампликоны пары праймеров(1) АСF91-АСR90 имеет более яркую окраску и четкие полосы, без дополнительных полос (примесей).

Далее для проведения RT ПЦР для отобранных ампликонов сконструировали и синтезировали соответствующие их структуре флуоресцентные зонды. (Таб.4.).

Таблица 4 .Флуоресцентные зонды.

№	название зонда	Последовательность нуклеотидов	Длина зонда	t ⁰ С плавления
1	НCP01	JOE- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGA- BHQ	24	74,4
2	НCP02	TET- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCG - BHQ	23	73,2
3	НCP03	FAM- CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGA- BHQ	24	74,4
4	НCP04	FAM-CGGGAGAGCCATAGTGG TCTGCGG- BHQ	25	60,2
5	НCP05	FAM-CGGGAGAGCCATAGTGGTCT GCGGAAA-BHQ	28	63,9
6	НCP01nq2	FAM-CGGGAGAGCCATAGTGGT CTGCGG-BHQ	25	61,1
7	НCP01nq1	FAM-CGGGAGAGCCA-BHQ- AGTGGTCTGCGG-BHQ	23	76,9
8	НCP01q- 1dt0	FAM-C-BHQ-CGGGAGAGCCA TAGTGGTCTGCGA-BHQ	26	52,8
9	НCP01FA	FAM-ACGGGAGAGCCATAGT GGTCTGCGA – BHQ	26	53,4
10	НCP01q- 2A	FAM-ACGGGAGAGCCATAGTGG TCTGCGG-BHQ-1	26	61,1

Для всех синтезированных флуоресцентных зондов была определена наиболее эффективная пара – **праймер-зонд**. (рис.7)

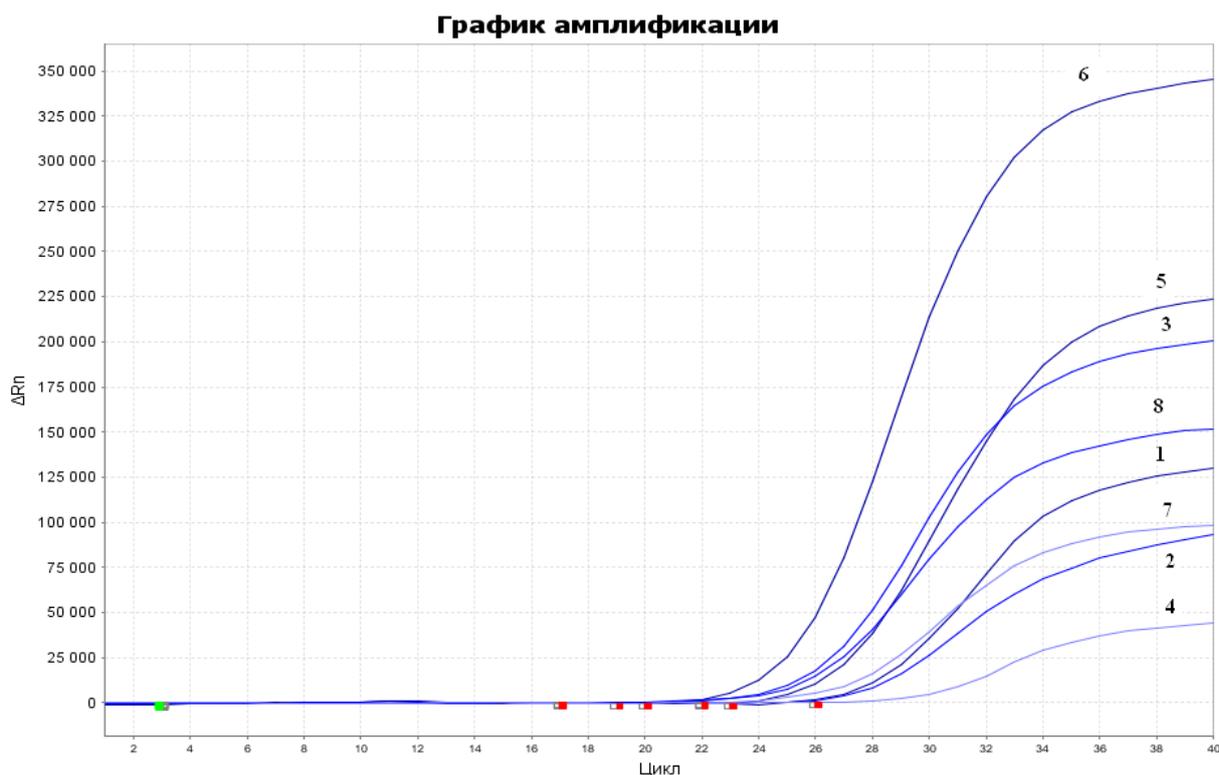
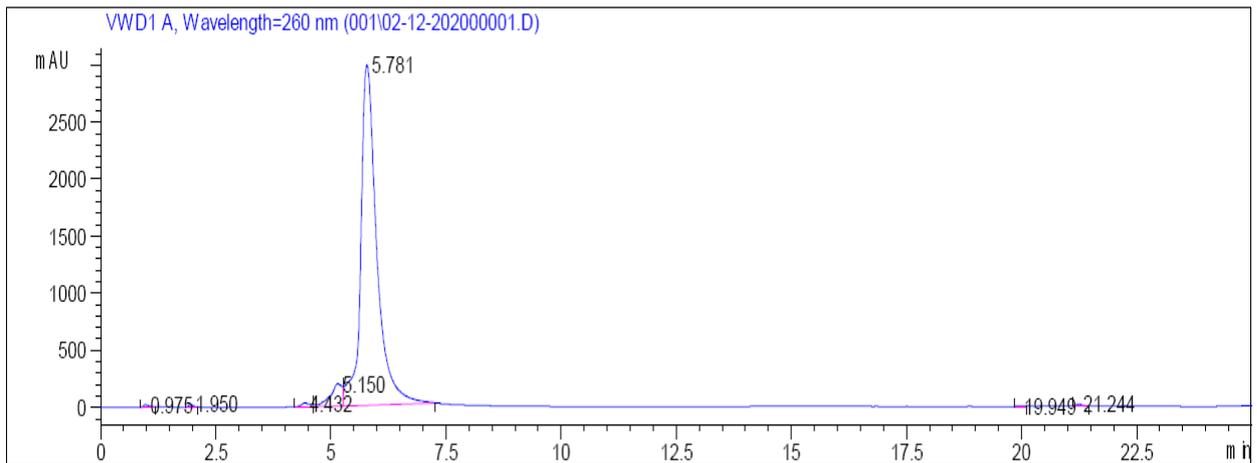


Рис.7. График анализа RT - ПЦР по определению наиболее эффективного флуоресцентного зонда.1- НСР01, 2-НСР01nq2, 3-НСР03, 4-НСР04, 5-НСР05, 6-НСР02, 7-НСР01FA, 8-НСР01q-2А.

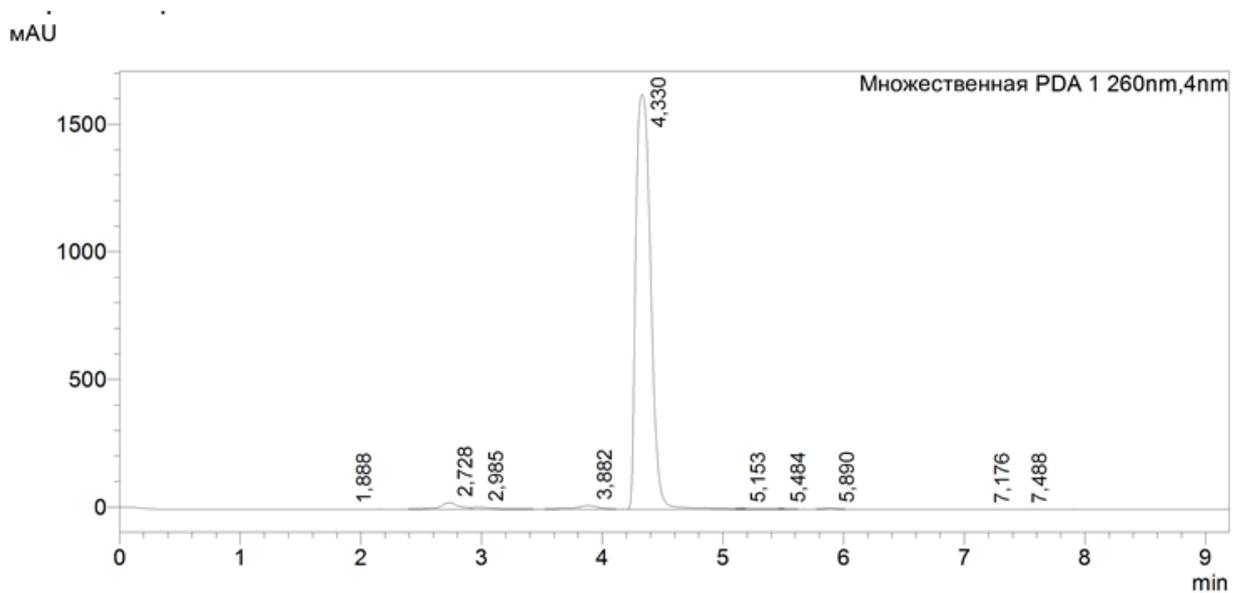
По результатам испытаний, наиболее высокий 345 000 подъем флуоресцентного сигнала показал зонд НСР02 под номером шесть, и был использован для дальнейших испытаний.

Стандартизация олигонуклеотидных праймеров методом ВЭЖХ.

Для стандартизации праймеров была разработана методика проведения ВЭЖХ. Праймеры были анализированы в хроматографе модели Agilent 1100 , и показали следующие пики в хроматограммах (рис.8)Условия проведения хроматографии: 1. градиент - 60% ацетонитрил – 40% буфер (0,1 М триэтиламмонийацетат, -доводят до рН 7,0);70%-30%, 80% - 20%. Колонка: XDB C18 Eclipse, 100x3 мм, 3,5 мкм"Zorbax«, детектирование:260 нм, скорость потока 0,5мл.



Хроматограмма форвард праймера



Хроматограмма реверс праймера

Рис.8.Хроматограммы стандартизации олигонуклеотидных праймеров.

По результатам проведенной хроматографии, форвард праймер ACF91 имеет чистоту 94,6%, реверс праймер ACR90 95,4% чистоту. (рис.8.)

Оптимизация концентрации праймеров в ПЦР смеси.

Далее нами был проведен ряд экспериментов по определению эффективной концентрации праймеров (рис.9.).

График амплификации

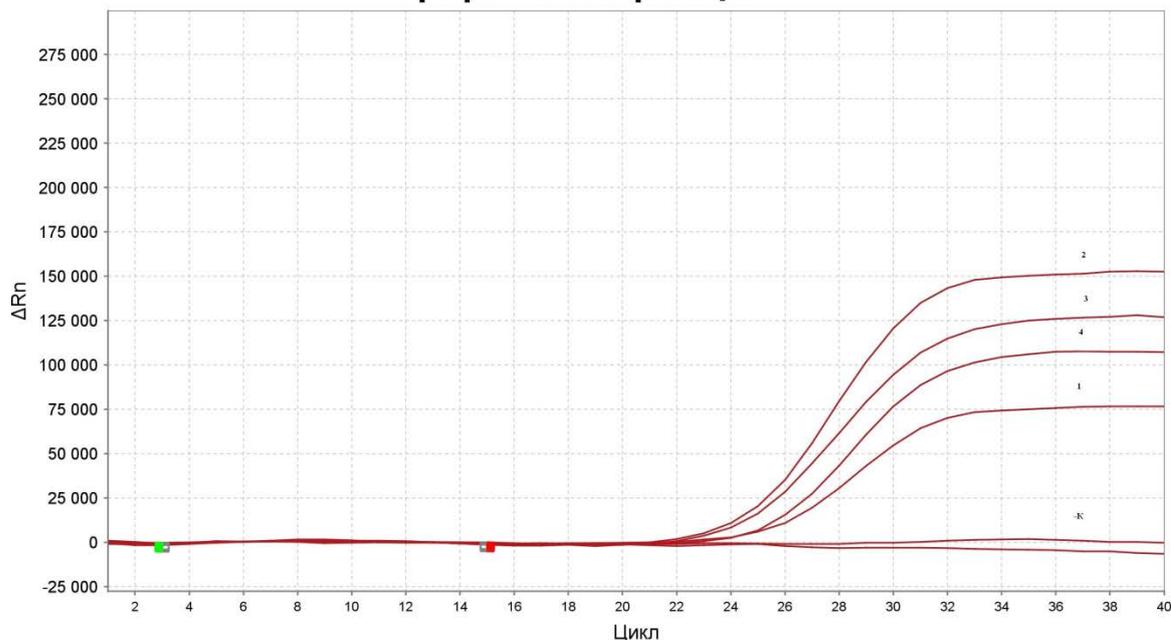


Рис.9. График анализа RT - ПЦР по определению эффективной концентрации праймеров – 1- 100 нмоль, 2- 200 нмоль, 3- 300 нмоль, 4- 400 нмоль, к- отрицательные контроли.

В результате наиболее эффективной концентрацией праймеров является значение 200 нмоль, при росте флуоресцентного сигнала в 150 000 ед.

Далее была определена оптимальная концентрация ионов Mg^{2+} в ПЦР смеси, для этого проводили ПЦР анализ с разными концентрациями магния хлорида. (рис.10.)

График амплификации

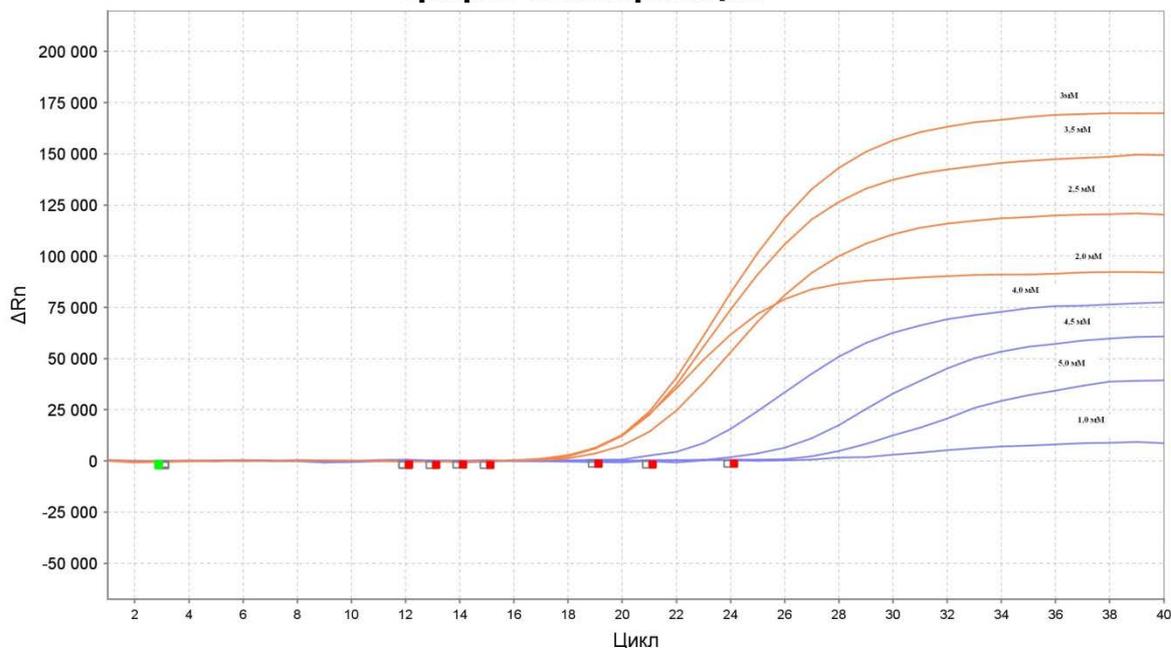


Рис.10. Влияние концентрации ионов Mg^{2+} в смеси на эффективность ПЦР. В эксперименте использовали ПЦР смеси с разной концентрацией соли $MgCl_2$ – в интервале от 1 до 5 ммоль. Установлено, что наибольшей рост флуоресцентного

сигнала (170 000 ед.) достигается при концентрации 3,0 ммоль Mg^{2+} в ПЦР смеси. Эту концентрацию ионов Mg^{2+} использовали в дальнейшем при ПЦР анализе. Далее проводили отбор наиболее эффективного буферного раствора для ПЦР реакции. Для этого был проведен анализ ПЦР ВГС с различными буферными растворами .(рис 11.)

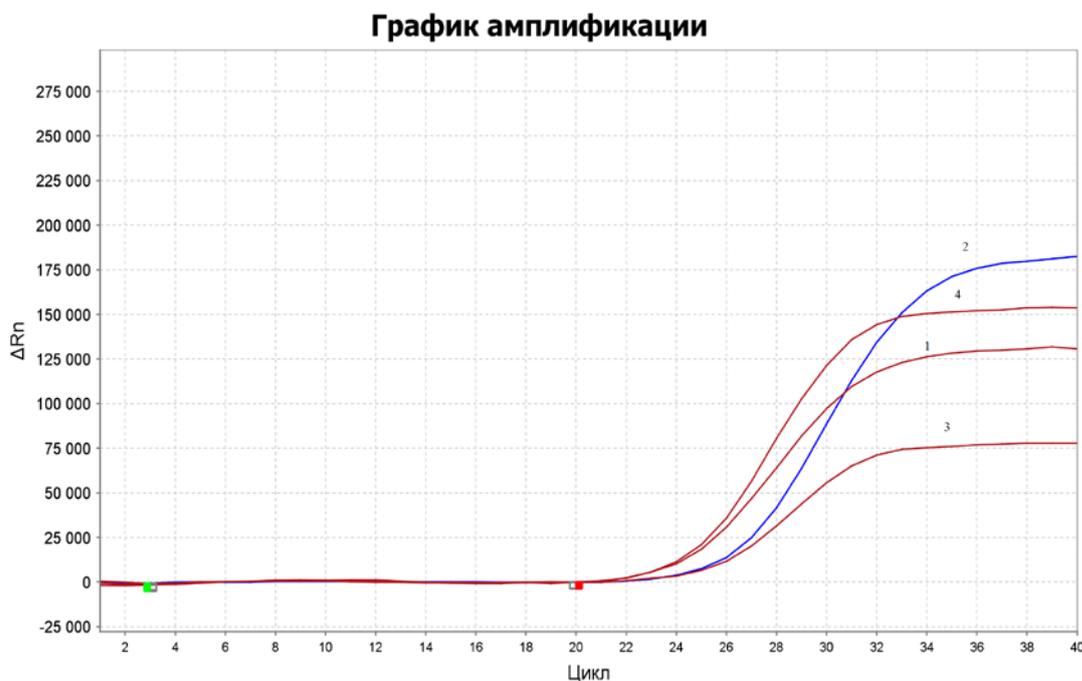


Рис.11.График RT-OT-ПЦР анализа ВГС с разными буферными растворами,указанными в таб.5.

Таблица.5. Состав наиболее эффективных буферных растворов.

Название буфера	Буферная система	pH	KCl	$(NH_4)_2SO_4$	Поли сорбат - 20	БСА	ДТТ
1.NK Buffer	Трис – SO_4 /30 мМ	8,4	20 мМ	10 мМ	0,02%	0,05 мг/мл	
2. One step PCR Buffer 1	Трис – HCl /60 мМ	8,8	75мМ		0,1%		
3.One step PCR Buffer 2	Трис – HCl /30 мМ	8,3	20 мМ	10 мМ	0,02%	0,05 мг/мл	
4. One step PCR Buffer 3	Трис – HCl /50 мМ	8,3	75 мМ				10 мМ

Из рис.11. видно, что буфер №2 показал самый высокий сигнал флуоресценции 180 000 ед., образцы №4 и № 1 показали увеличение сигнала флуоресценции 155 000 ед. и 127 000 ед., соответственно. Таким образом, буфер состава- 75 мМ

KCl, 60 mM TrisHCl, 0,1% Tween 20, pH=8,8 является наиболее эффективным буфером для проведения RT-ПЦР анализа на выявление РНК ВГС.

Сравнительный анализ специфичности и чувствительности набора реагентов для определения Вируса Гепатита С «ПЦР-Детект Гепатит С».

Для сравнения чувствительности и специфической активности разработанного нами набора «ПЦР-Детект Гепатит С» использовали коммерческий ПЦР набор «Ампли Сенс HCV-FL», кат. № R-V1-Mod (RG, iQ, Mx, Dt), серия 14.12.19, срок годности 2020-12-14, производства ФБУН «Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» (Россия). Было проанализировано 40 образцов, из них 30 положительных образцов больных ВГС и 10 образцов здоровых людей (таб.6).

Таблица 6. Результаты сравнительных испытаний определения РНК вируса гепатита С наборами «ПЦР-Детект Гепатит С» и «Ампли Сенс HCV-FL».

№	Результаты набора «ПЦР-Детект Гепатит С» показания St* по каналу FAM			Результаты набора «Ампли Сенс-HCV-FL» показания St* по каналу Yellow			
	1	2	3	1	2	3	4
1	23,57	21	22,79	1	23,64	21	22,16
2	21,45	22	25,16	2	21,33	22	25,43
3	19,13	23	19,53	3	18,68	23	19,17
4	30,12	24	29,09	4	30,22	24	29,43
5	27,28	25	26,79	5	26,79	25	25,87
6	22,34	26	23,15	6	22,67	26	23,23
7	11,74	27	31,46	7	10,98	27	30,88
8	25,69	28	14,33	8	26,01	28	15,11
9	23,78	29	29,14	9	22,72	29	28,84
10	29,62	30	30,54	10	29,38	30	30,27
11	15,54	31	-	11	15,79	31	-
12	21,53	32	-	12	21,31	32	-
13	23,56	33	-	13	23,74	33	-
14	27,44	34	-	14	28,11	34	-
15	23,69	35	-	15	23,15	35	-
16	27,12	36	-	16	27,76	36	-
17	21,08	37	-	17	21,43	37	-
18	23,45	38	-	18	24,21	38	-
19	19,87	39	-	19	19,36	39	-
20	17,51	40	-	20	17,97	40	-

В результате испытаний, разработанный нами набор «ПЦР -детект – Гепатит С» показал аналогичные результаты с коммерческим набором «Ампли Сенс-HCV-FL». Показатели St* в положительных образцах близки по значениям к положительным, а отрицательные образцы показали отрицательный результат.

Таким образом, разработанный RT -ПЦР набор может быть использован в клинической диагностике вируса гепатита С, не уступающий импортным аналогам по своим диагностическим свойствам и существенно ниже по стоимости существующих аналогов.

ВЫВОДЫ

1. Произведен анализ последовательностей геномов 6 генотипов вируса гепатита С по определению консервативных участков между генотипами. Впервые на консервативные участки сконструировано 22 уникальных олигонуклеотидных праймера.
2. Осуществлен химический синтез олигонуклеотидных праймеров. Синтезированные праймеры очищены методом обратной фазной хроматографии.
3. Методом стандартного ПЦР выявлена наиболее эффективная пара праймеров-ACF91 [21 п.н.]-ACR90[21 п.н.].
4. Впервые сконструированы и синтезированы флуоресцентные зонды на выбранный ампликон 210 п.н.
5. Проведена стандартизация праймеров методом ВЭЖХ.
6. Оптимизированы условия проведения ПЦР - Определена концентрация праймеров для эффективного определения ВГС методом RT-ПЦР и наиболее эффективная концентрация ионов Mg^{+2} . Подобрана эффективная буферная система One step PCR Buffer 1 для выявления ВГС методом ОТ-RT-ПЦР.
7. Проведены лабораторные испытания разработанного отечественного набора по сравнению с коммерческим и установлено, что его чувствительность и специфичность не уступает зарубежным аналогам. Разработана нормативно – техническая документация для набора «ПЦР-Детект Гепатит С». Набор зарегистрирован в ГУП «Государственный центр экспертизы и стандартизации лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» Агентства по развитию фармацевтической отрасли при МЗ РУз.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.02/30.01.2020.K/T.104.01AT THE INSTITUTE OF THE CHEMISTRY OF
PLANT SUBSTANCES**

INSTITUTE OF THE CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES

IKRAMOV SAIDAZIM ADILOVICH

**DEVELOPMENT OF PCR DIAGNOSTICUM FOR DETECTION
VIRAL HEPATITIS C**

02.00.10 – Bioorganic chemistry

**DISSERTATION
abstract for the doctor of philosophy on chemical sciences (PhD)**

Tashkent – 2022

The title of the dissertation of doctor of philosophy (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2017.4. PhD /K79

The dissertation has been carried out at the Institute of the Chemistry of Plant Substances.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.icps.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor: **Azimova Shakhnoz Sadikovna**
doctor of sciences in biology, professor

Official opponents: **Rakhmanberdieva Rano Karimovna**
doctor of science in chemistry
Oshchepkova Julia Igorevna
doctor of science in chemistry

Leading organization: Tashkent Pharmaceutical Institute

Defense will take place on «__»_____2023 year ___at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.01.2020.K/T.104.01. of the Institute of the Chemistry of Plant Substances at the following address: 100170, Tashkent, 77, M. Ulugbek street. Phone: 262-59-13, Fax: (99871) 262-73-48, e-mail:plant.inst@icps.org.uz, ixrv@mail.ru.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of the Chemistry of Plant Substances (registration number № _____). Address: 100170, Tashkent, 77, M. Ulugbek street. Phone: 262-59-13, Fax: (99871) 262-73-48, e-mail:nhidirova@yandex.ru.

Abstract of the dissertation is distributed on «__»_____2023 y.
(protocol at the register No_____dated «__»_____2023 y).

Sh.Sh. Sagdullayev
Chairman of scientific council on awarding of
scientific degrees, doctor of technical sciences, professor

N.Q. Khidirova
Scientific secretary of scientific council on awarding of
scientific degrees, candidate of chemical sciences senior researcher

E.Kh. Botirov
Chairman of scientific seminar under scientific council
on awarding of scientific degrees, doctor of chemical sciences, professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of research work is the development of a domestic PCR diagnosticum in "real time" for the detection of the Hepatitis C virus, the preparation of regulatory and technical documentation and laboratory testing.

The objects of the research work are Hepatitis C virus RNA.

Scientific novelty of the study is as follows:

The study of the nucleotide sequences of 6 genotypes of the Hepatitis C Virus was carried out in order to find conservative sections of HCV RNA common to all HCV genotypes. On the basis of the data obtained, new oligonucleotide primers and a fluorescent probe were designed and synthesized for the detection of HCV by the method of hybridization-fluorescent labeling (RT-PCR). Methods for the synthesis, purification and standardization of primers and a fluorescent probe for the HCV RT-PCR kit have been developed. Modified nucleotides were used to increase the special interaction of primers with virus RNA. On the basis of the oligonucleotide primers developed and synthesized by us, the conditions for conducting RT-PCR were developed, and the conditions for conducting RT-PCR in one tube were optimized. Laboratory tests of the developed set were carried out. The indicators of specificity and sensitivity of the developed diagnosticum were studied. Normative and technical documentation for the set has been developed.

Implementation of the results Based on the data obtained, a patent was obtained for a utility model of the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan "Synthetic oligonucleotides for the determination of Hepatitis C Virus RNA" (No. FAP 01553). As a result, synthetic oligonucleotides designed and synthesized by us for the determination of hepatitis C virus RNA have patent protection.

A set of reagents for the determination of Viral Hepatitis C "PCR - Detect Hepatitis C" is registered with the State Unitary Enterprise "State Center for Expertise and Standardization of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment" of the Pharmaceutical Industry Development Agency under the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, registration certificate number TB / M 00620/10/22 dated 10/28/22.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of the introduction, three chapters, conclusion and list of references. The volume of the thesis is 93 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I часть (I бўлим, I part)

1. Ikramov S.A., Makhnev A.A., Alimukhamedova O.B, Abdurakhmanov J.M., Sasmakov S.A, Yusupova E.G, Azimova Sh.S.. Synthetic oligonucleotides for the determination of HCV RNA in human blood by RT-PCR// Узбекский биологический журнал, 2017.- №4.- С. 64-67. (03.00.00, №5)
2. Ikramov S.A., Makhnev A.A., Nassiridinov Kh.Z, Baimirzaev A.B., Azimova Sh.S., Identification of hepatitis C virus with PCR real time method// European Science Review, 2019. -№9-10. - P.11 -15.
3. Икрамов С.А., Махнев А.А., Алимухамедова О.Б., Баймирзаев А.Б., Насриддинов Х.З., Лысова Е.М., Азимова Ш.С. Определение вирусного гепатита С методом ПЦР с помощью гибридизационно-флуоресцентной детекции//Universum журнал, химия и биология ,2022. - №11(101).- С. 43-49.(02.00.10, №2)
4. Икрамов С.А., Махнев А.А., Алимухамедова О.Б., Баймирзаев А.Б., Насриддинов Х.З., Лысова Е.М., Азимова Ш.С. ПЦР диагностирование вирусного гепатита С в образцах крови человека // Вестник НУУз, 2022. Естественные науки- №3.2.1. – С.364-366. (02.00.00, №12)
5. №FAP 01553 от 28.10.2020г Икрамов С.А., Махнёв А.А., Азимова Ш.С., Синтетические олигонуклеотиды для определения РНК вируса гепатита С.

II часть (II бўлим, II part)

- 6.Икрамов С.А., Махнев А.А., Алимухамедова О.Б., Абдурахманов Ж.М.Сасмаков С.А..Synthetic oligonucleotides for the determination of HCV RNA in human blood by RT-PCR // «XII Международная конференция по химии природных соединений» - Ташкент, 7-8 сентября, 2017. – с.208
- 7.Икрамов С.А., Махнев А.А., Насриддинов Х.З., Абдурахманов Ж.М., Аширов О.Н., Сасмаков С.А., Азимова Ш.С. Праймеры для определения 1и 4 генотипов вируса гепатита С в крови человека методом ПЦР // сб. тезисов научно- практическая конференция молодых ученых «Актуальные проблемы химии природных соединений» - Ташкент, 19 март, 2019. – С.68
- 8.Икрамов С.А., Махнев А.А., Насриддинов Х.З. Определение вирусного гепатита С методом ПЦР в реальном времени.// Тез. докл.Рес научно-техническая. конф.”Роль молодежи в развитии науки и образования”, Ташкент, 30 октября, 2020.
9. Икрамов С.А., Махнев А.А., Насриддинов Х.З. Подбор праймеров для генотипирования вирусного гепатита С.// Тез. докл.Рес научно-техническая.

конф. "Роль молодежи в развитии науки и образования", Ташкент, 30 октября, 2020.

10. Икрамов С.А., Махнев А.А., Насриддинов Х.З., Лысова Е.М., Алимухамедова О.Б., Баймирзаев А.Б., Азимова Ш.С.. Selection of primers for genotyping of viral hepatitis C // XIV Международная конференция "Актуальные проблемы химии, биологии и технологии природных соединений» - Ташкент, 7-8 октябрь, 2021. – с.110