

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ АСОСИДА БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ

ЭШБОЕВ ФАРҲОД БАКИР ЎҒЛИ

**НАРКОТИК МОДДАЛАР ИСТЕЪМОЛ ҚИЛУВЧИ ШАХСЛАРНИ
АНИҚЛАШ УЧУН ИФА ТЕСТ-СИСТЕМА ЯРАТИШ МАҚСАДИДА
МОРФИН-ОҚСИЛ КОНЪЮГАТЛАРИНИ ОЛИШ**

**03.00.12 – Биотехнология
02.00.10 – Биоорганик кимё**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2020

УЎТ: 571.27:57.083.3:577.117.083:615.074.

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Эшбоев Фарход Бакир ўғли

Наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-система яратиш мақсадида морфин-оқсил конъюгатларини олиш.....3

Эшбоев Фарход Бакир угли

Получение конъюгатов морфин-белок с целью создания на их основе ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики.....22

Eshboev Farkhod Bakir ugli

Obtaining of morphine-protein conjugates with the aim of the creation of ELISA test-system for the identification of drug addicts.....41

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....44

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ
КЕНГАШ АСОСИДА БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ

ЭШБОЕВ ФАРҲОД БАКИР ЎҒЛИ

**НАРКОТИК МОДДАЛАР ИСТЕЪМОЛ ҚИЛУВЧИ ШАХСЛАРНИ
АНИҚЛАШ УЧУН ИФА ТЕСТ-СИСТЕМА ЯРАТИШ МАҚСАДИДА
МОРФИН-ОҚСИЛ КОНЪЮГАТЛАРИНИ ОЛИШ**

**03.00.12 – Биотехнология
02.00.10 – Биоорганик кимё**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2020.2.PhD/B131 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация ўсимлик моддалари кимёси институтида бажарилган.
Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (microbio@academy.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбарлар:	Азимова Шахноз Садьковна биология фанлари доктори, профессор
	Юсупова Элвира Гайнатовна кимё фанлари номзоди, катта илмий ходим
Расмий оппонентлар:	Исмаилов Зафар Файзуллаевич биология фанлари доктори, доцент
	Далимова Сурайё Нугмановна биология фанлари доктори, профессор
Етақчи ташкилот:	Биоорганик кимё институти

Диссертация химояси Микробиология институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «.....» июль кунни соат 11⁰⁰ даги онлайн мажлисида бўлиб ўтди. (Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7⁶-уй, Микробиология институти мажлислар зали, 3-кават Тел.:(+99871) 241-92-28, факс:(+99871) 241-92-71; e-mail: microbio@academy.uz.]

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№__ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100128, Тошкент ш., Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси 7⁶-уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-кават. Библиотека. Тел.:(+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс:(+99871) 241-92-71.

Диссертация автореферати 2020 йил «___» июль кунни тарқатилди.
(2020 йил «_____» июльдаги _____ рақамли реестр баённомаси).

Т.Ф. Арипов
Илмий даража берувчи Илмий кенгаш раиси
б.ф.д., профессор, академик

Р.Н. Жураева
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Т.Г. Гулямова
Илмий даражалар берувчи Илмий кенгаш қошидаги
Илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертация аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти. Дунёда замонавий тиббиёт ва фармакологияда гиёҳвандликни эрта аниқлашга йўналтирилган аниқ ва сезгир диагностика усулларини ишлаб чиқишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Наркоманларни диагностика қилиш амалиётида наркотик модда ёки унинг метаболитларини иммунокимёвий ва физик-кимёвий усуллар ёрдамида аниқлаш кенг қўлланилади. Таъкидлаш жоизки, наркоманларни диагностикасига бўлган бундай ёндашув сезиларли камчиликларга эга, чунки бу усуллар наркотик моддаларни қабул қилган вақтдан бошлаб 24-48 соат оралиғида аниқлаш имконини беради. Бироқ, инсон организмида опиагларга нисбатан ҳосил бўлган махсус антитаналарни аниқлашга асосланган ИФА таҳлили энг оптимал усул ҳисобланади. Шу сабабли, яширин наркоманларни аниқлаш учун янги таҳлил усулларини ишлаб чиқишда юқори спецификлик ва сезувчанликка эга бўлган морфин-оксил конъюгатларини олиш илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Жаҳонда гиёҳвандлик диагностикасининг янги самарали таҳлил усулларини яратиш мақсадида илмий ишлар олиб борилмоқда. Жумладан, турли хил оксиллар ёрдамида гаптен-оксил конюгатларини олиш, гаптен-оксил конюгатлар асосида наркотик моддаларга нисбатан ҳосил бўлган антитаналарни аниқлашга асосланган ИФА таҳлилинини ишлаб чиқиш, морфинга нисбатан специфик антитаналар олиш ва улар асосида одам биологик суякликларидан қабул қилинган гиёҳванд модда ёки унинг метаболитларини аниқлашга асосланган ИХА ва тўғри вариантдаги ИФА усулларини ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишни тақозо этмоқда.

Республикамизда маҳаллий хом-ашё асосида импорт ўрнини босувчи янги доривор воситалар ва тиббиёт буюмларини яратиш ҳамда фармацевтика саноатини янада ривожлантириш мақсадида кенг қўламли чора-тадбирлар ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Ўзбекистон Республикасининг янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4-йўналишида «.....фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, тиббиёт муассасалари ва аҳолини арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш юзасидан муҳим вазифалар белгилаб берилган¹». Мазкур вазифаларни амалга оширишда, жумладан, наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқиш мақсадида морфин-оксил конъюгатларини олиш, келгусида наркоманларни эрта аниқлашда муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасининг янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси

¹Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йилнинг 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасининг янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» Фармони

Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон «Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғи жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора тадбирлар тўғрисида»ги қарориди ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялари ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Халқаро Соғлиқни Сақлаш ташкилотининг маълумотига кўра, ҳозирги кунда 15-64 ёшлар орасида бўлган бутун дунё аҳолисининг 275 миллиони наркотик моддалар истеъмол қилиши, ҳар йилига 585000 одамнинг ўлимига сабаб бўлади (World drug report 2019). Шу боисдан, наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни диагностика қилишнинг янги усуллари ишлаб чиқиш ёки мавжудларини такомиллаштириш бўйича Америка, Хитой, Япония ва бошқа давлатлар тадқиқотчилари томонидан илмий изланишлар олиб борилмоқда. Бутун дунёда наркотик моддалар қабул қилувчи шахсларни диагностика қилишда асосан иммунологик (биринчи навбатда ИФА) усуллардан фойдаланилади. Морфин-оксил конъюгатлари опиятларни ИФА усулида идентификация қилишнинг асоси ҳисобланади. Бир қатор олимлар Agnieszka Sulima (2018), Inger Lisa Bogen (2014), Raleigh M.D., (2013) томонидан морфиннинг оксиллар билан конъюгатлари морфин молекуласидаги иккинчи, учинчи, олтинчи углерод атомлари ва азот атоми орқали турли методлар ёрдамида синтез қилинган. Америкалик олимлар Oscar Torres (2014) томонидан морфин-оксил конъюгатларини олиш учун қоқшол аноксинидан фойдаланган. Япониялик олим Томоюа Sakurada (2010) морфин-оксил конъюгатларини синтез қилиш учун дифтерия токсинидан Хитой ва Эрон тадқиқотчилари эса Azim Akbarzadeh (2004), Qian-Qian Li (2016) одам қон зардоби албумини (ОЗА), буқа зардоби албумини (БЗА), овалбумин (ОА), лизотцим, тиреоглобулин, иммуноглобулин, фибриноген каби оксиллардан фойдаланган.

МДХ давлатларида М.А. Миягкова ва Д.С. Копоровлар раҳбарлигидаги илмий гуруҳлар томонидан наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун антитаналарга асосланган ИФА тест-системалар ишлаб чиқиш билан шуғулланади. Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда, наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-система яратиш мақсадида морфин-оксил (соя оксили) конъюгатларини олиш амалий ва назарий аҳамиятга эга.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўсимлик моддалари кимёси институти илмий-тадқиқот ишлари

режасининг ИБ-ФА-0-15508 «Наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун каттиқ фазали ИФА асосидаги скрининг тест-тизими» (2013–2014), ИБ-ФА-Т010 “Ўзбекистонда наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун каттиқ фазали ИФА асосида скрининг тест-тизимини серияли ишлаб чиқаришни ташкил қилиш” (2016-2017) мавзуларидаги амалий ва инновацион лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-система ишлаб чиқиш мақсадида морфин-оксил конъюгатларини олиш ва ундан фойдаланиш жараёнларини оптималлаштаридан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

морфин-гемисукцинат синтези;

морфин-оксил конъюгатларини олиш учун оптимал оксилни танлаш;

соя ўсимлигидан умумий оксилларини ажратиш усулларини оптималлаштириш ва аминокислоталар таркибини аниқлаш;

морфин билан соя оксили конъюгатларини синтез қилиш ва улар асосидаги наркоманлар қон зардобининг ИФА таҳлилини такомиллаштириш;

синтез қилинган морфин билан соя оксили конъюгатининг спецификлигини аниқлаш ва тижорат ИФА тест-системаси билан таққослаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида наркотик моддалар (опиатлар) истеъмол қилувчи шахсларнинг ва соғлом одамларнинг қон зардоблари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети сифатида морфин-оксил конъюгатларини олиш ва улар асосида наркоманлар қон зардобининг ИФА таҳлилини амалга оширишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот ишини амалга оширишда биотехнологик ва биоорганик кимё услубларидан – ИФА, ЮССХ, ЮҚХ, колонкали хроматография, оксилларни миқдорий аниқлаш, оксилларнинг электрофорез таҳлили, оксилларнинг аминокислоталар таркибини аниқлаш усуллари билан фойдаланилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқотнинг илмий янгилigi куйидагилардан иборат:

илк бор морфин-соя оксили конъюгати синтез қилинган;

соянинг 17 хил маҳаллий навларида умумий оксиллар миқдори аниқланган ва улар орасидан “Ўзбек-6” нави энг оксилга бой навлиги исботланган;

илк бор морфин-оксил конъюгатларини олишда ташувчи сифатида фойдаланиш мақсадида “Ўзбек-6” соя нави таркибидаги оксилларнинг аминокислоталар таркиби аниқланган;

морфин-соя оксили конъюгатидан наркоманлар қон зардобининг ИФА таҳлилида фойдаланиш шароитлари такомиллаштирилган;

морфин-соя оксили конъюгатининг спецификлиги тижорат ИФА тест-системасининг спецификлиги билан таққосланган ҳамда морфин-соя оксили

конъюгати асосида амалга оширилган ИФА нинг спецификлиги юқори эканлиги аниқланган;

Тадқиқотнинг амалий натижалари куйидагилардан иборат:

турли хил оксиллар билан морфин-оксил конъюгатлар олинган ва улар орасида наркоманлар кон зардобининг ИФА таҳлили учун оптимал варианты танланган;

соя оксиллини ажратишнинг оптимал шароитлари ва аминокислоталар таркиби аниқланган;

морфин-соя оксилли конъюгатининг антиген сифатида наркоманлар кон зардобининг ИФА таҳлилида фойдаланиш шароитлари аниқланган;

морфин-соя оксилли конъюгатининг специфик ва сезгирлик даражаси ИФА усулида исботланган;

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги замонавий биоорганик кимё ва биотехнология усулларидан фойдаланилганлиги билан асосланади. Илмий натижалар замонавий аналитик ва статистик усуллар ёрдамида таҳлил қилинган. Бунинг тасдиғи сифатида мутахассислар томонидан эксперт хулосалари, ҳамда республика ва халқаро илмий конференцияларда муҳокамадан ўтганлиги, рецензия қилинувчи илмий нашрларда чоп этилганлиги хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.

Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти соя оксилли асосида морфин-оксил конъюгатларини олишнинг энг мақбул шароитлари аниқланган. Бу конъюгатдан ИФА тест-системаларини ишлаб чиқаришда фойдаланиш махсулот таннархини сезиларли даражада пайсантиришга ва унинг сифатини оширишга имкон бериши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти морфин-соя оксилли конъюгати асосида наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш имконини берувчи арзон ва сезгир ИФА тест-системаларини ишлаб чиқишда асосий компонент сифатида фойдаланишда хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-система яратиш мақсадида морфин-оксил конъюгатларини олиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

морфин-оксил конъюгатларини микропланшетларга адсорбциясини оптималлаштириш жараёни Ўсимлик моддалари кимёси институти қошидаги тажриба ишлаб чиқариш корхонасида наркоманлар диагностикаси учун ИФА диагностика умумларини ишлаб чиқишда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2020 йил 23 январдаги 4/1255-241-сон маълумотномаси). Натижада морфин-соя оксилли конъюгати асосида наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлашда арзон ва сезгир ИФА тест-системаларини ишлаб чиқиш имконини берган;

қуйи молекуляр оксилларни ажратиш учун оптималлаштирилган соя оксиллини ажратиш усуллари ФА–А11-Т037 рақамли «Қуйи молекуляр оғирликдаги оксилларга асосланган полисахаридлар ва парҳез қўшимчалари

асосида пребиотик фаоллиги бўлган агентларни ишлаб чиқиш» мавзусидаги фундаментал лойиҳасида ўсимликлардан ажратилган оксилларнинг физик-кимёвий хусусиятлари ва биологик фаоллигини аниқлашда назорат сифатида фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2020 йил 04 мартдаги 4/1255-655-сон маълумотномаси). Натижада, ўсимлик ҳомашёсидан пребиотик фаолликка эга бўлган куйи молекуляр оксиллар ажратиб олиш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 6 та жумладан 2 та халқаро ва 4 та республика илмий-амалий анжуманларида маъруза қилинган ва муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 10 та илмий ишлар чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 4 мақола, шулардан 2 таси республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 108 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурийлиги, мақсад ва вазифалари асослаб берилган, тадқиқотнинг объект ва предметлари ифодаланган, тадқиқотнинг республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни диагностика қилиш усулларини тадқиқ этиш»** деб номланган биринчи бобида наркотик моддаларнинг инсон организмга таъсири, опийатларга қарши одам организмда АТ ларнинг пайдо бўлиши, наркотик моддаларни аниқлашда бугунги кунда қўлланиладиган усуллар, опийатларнинг иммунологик диагностикаси ва опийод наркоманларни аниқлаш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқишда қўлланиладиган гаптен-оксил конъюгатларини олиш усуллари юзасидан тажриба моделлари ҳақида хорижий ва маҳаллий илмий адабиётлар шарҳи батафсил баён этилган.

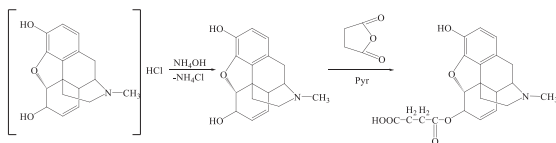
Диссертациянинг **«Тадқиқот ишида қўлланилган материаллар, шароитлар ва биотехнология ва биоорганик кимё усуллари»** деб номланган иккинчи бобида морфин-оксил конъюгатларини олиш учун фойдаланилган материал ва усулларнинг тавсифи баён этилган тажриба қисми келтирилган.

Диссертациянинг учинчи боби **«Морфин-оксил конъюгатларини олиш ва улар асосида наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларнинг ИФА таҳлилинни амалга ошириш шароитларини оптималлаштириш»** га

багишланган. Бобда морфин гемисукцинат ва унинг турли оксиллар билан конъюгатларини синтез қилиш, синтез қилинган конъюгатлар орасидан наркоманларнинг ИФА таҳлилини амалга оширишда фойдаланиш учун энг оптимал вариантини аниқлаш ҳамда танланган гаптен-оксил конъюгатидан наркоманларнинг ИФА таҳлилида фойдаланишнинг мақбул шароитларини тадқиқ этиш жараёнида олинган шахсий натижалар келтирилган.

Морфин гемисукцинатининг синтези

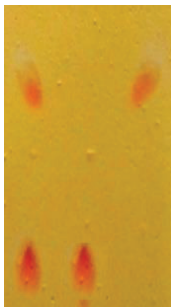
Морфин гемисукцинати пиридинли реакция шароитида 4 соат давомида 80 °С ҳароратда морфин ва қаҳрабо кислотасининг боғланиши натижасида олинди (1-расм).



1-расм. Морфин гемисукцинатини олиш реакцияси

Олинган реакция маҳсулоти бир қатор сезгир усуллар ЮҚХ, ЮССХ ва суюқланиш ҳароратини аниқлаш орқали идентификация қилинди.

Морфин гемисукцинатини олиш реакциянинг бориш ЮҚХ усули ёрдамида текшириб борилди. ЮҚХ натижаларига кўра 4 соатдан сўнг реакция аралашмада эркин ҳолдаги морфин молекулалари йўқлиги реакциянинг тугаганлигини исботлади (2-расм).



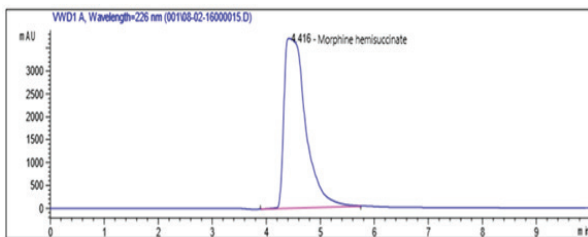
2-расм. Синтез қилинган морфин- гемисукцинатнинг ЮҚХ таҳлили. 1) 2 соатдан сўнг; 2) 4 соатдан сўнг 3) назорат (морфин).

1 2 3

ЮҚХ натижасига кўра морфиннинг Rf қиймати 0,61 га ва олинган морфин-гемисукцинатининг Rf кўрсаткичи 0,12 га тенг эканлиги маълум бўлди.

Шундан сўнг, морфин гемисукцинатининг ЮССХ усулида стандартизацияси амалга оширилди (3-расм).

Ушбу хроматограммадан кўринадики, колонкадан чиқиш вақти – 4,416 мин. бўлган чўкки морфин гемисукцинатига мос келади ва мана шу чўккидан бошқа чўккиларнинг йўқлиги эса реакция маҳсулотининг тозалигидан далолат беради.



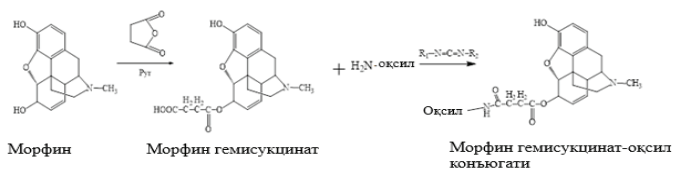
3-расм. Синтез қилинган морфин-гемисукцинатининг ЮССХ стандартизацияси.

Реакция маҳсулотининг суюқланиш ҳарорати 237-239°C эканлиги морфин гемисукцинатининг суюқланиш ҳароратига мос келди ва ундан тадқиқотнинг кейинги босқичларида морфин-оксил конъюгатларини олиш учун фойдаланиш мумкин эканлиги аниқланди.

ИФА таҳлилида антиген сифатида фойдаланиш учун морфин-оксил конъюгатларининг синтези

Морфин гемисукцинати синтез қилингандан сўнг морфинни полистрол планшетлар юзасига адсорбция қилиш мақсадида турли хил оксиллар (БЗА, ОА, ОЗА, соя оксили) билан морфин-оксил конъюгатлари олинди.

Морфин-оксил конъюгатлари карбодимидли усулда олинди. Танланган оксиллар билан морфин конъюгатларини олиш реакциялари паралел равишда бир хил шароитда олиб борилди (4-расм). Эритмадаги оксиллар миқдори Лоури усулида аниқланди.

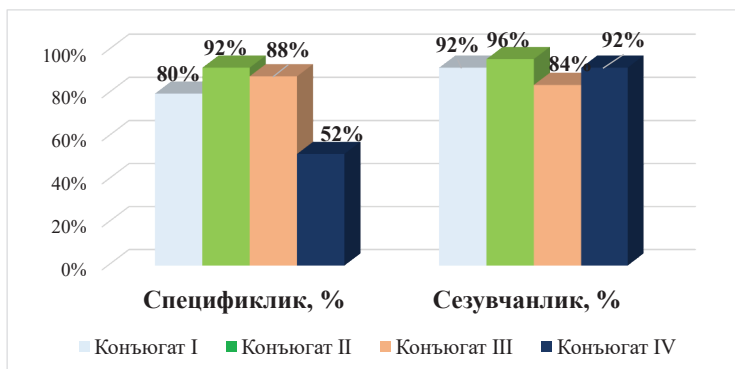


4-Расм. Морфин-оксил конъюгатини олиш реакцияси.

Конъюгатларнинг спецификлиги ва сезгирлиги ИФА усулида баҳоланди. Морфин-оксил конъюгати антиген сифатида фойдаланилди ва 96 чуқурчали полистрол планшетларга адсорбция қилинди. Шундан сўнг 25 нафар соғлом одамлар ва 25 нафар Республика наркология марказидан олиб келинган опиоид наркоманларнинг қон зардобининг ИФА таҳлили амалга оширилди. Ҳар бир текширилаётган қон зардоби намуналари паралел равишда 2 та конъюгатлар адсорбция қилинган чуқурчаларда текширилди ва уларнинг ўрточа оптик зичлик (ОЗ) кўрсаткичлари натижа сифатида олинди.

Юқорида санаб ўтилган тўрт хил оксиллар асосида олинган морфин-оксил конъюгатларидан фойдаланилган ИФА таҳлили бир хил шароитда ва бир хил қон зардоби намуналаридан фойдаланган тарзда паралел

равишда олиб борилди. Бирок олинган натижалар бир-биридан сезиларли фарк қилди (5 ва 6 -расмлар).

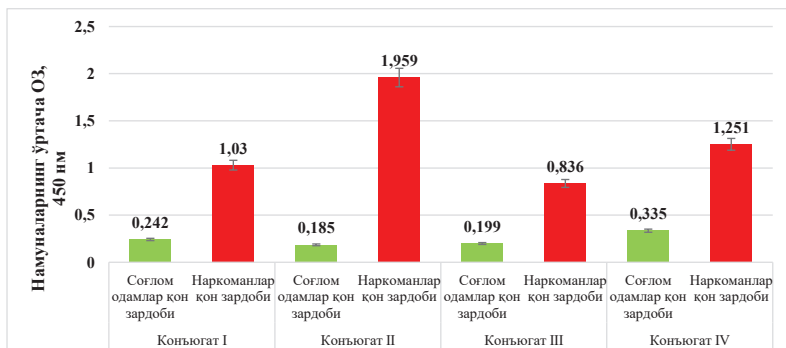


5-расм. ИФА таҳлилида фойдаланилган коньюгатларнинг спецификлик ва сезувчанлик даражаси (n=50, %)

Изоҳ: коньюгат I – морфин/БЗА, $OZ_{\text{крит.}} = 0,264$; коньюгат II – морфин/соя оксиди, $OZ_{\text{крит.}} = 0,254$; коньюгат III – морфин/овалбумин, $OZ_{\text{крит.}} = 0,270$; коньюгат IV – морфин/ОЗА, $OZ_{\text{крит.}} = 0,315$.

Юқоридаги диаграмма морфин соя оксиди асосида олинган морфин коньюгатининг спецификлиги (92 %) ва сезувчанлиги (96 %) ўрганилган қон зардоблари орасида энг юқори эканлигини кўрсатди.

Бундан ташқари, 4 хил коньюгатлар асосида амалга оширилган ИФА таҳлили натижаларининг ўртача OZ ҳисоблаб чиқилди (6-расм). Чунки бу кўрсаткич наркоманларни диагностика қилиш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқишда муҳим ҳисобланади.



6-Расм. 4 хил коньюгатлар асосида амалга оширилган ИФА натижасига кўра намуналарнинг ўртача OZ кўрсаткичи (OZ 450 нм; $P < 0,05$; $n=50$).

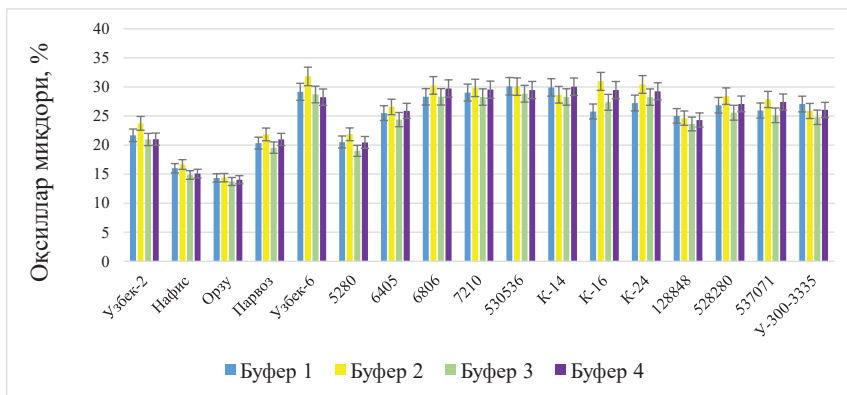
Изоҳ: коньюгат I – морфин-БЗА; коньюгат II – морфин-соя оксиди; коньюгат III – морфин-ОА; коньюгат IV – морфин-ОЗА.

ИФА натижаларига кўра, морфинниг БЗА, ОА ва ОЗА оксиллари билан олинган конъюгатлари асосида текширилган кон зардоби намуналарининг ўртача ОЗ қийматига такқосланганда, морфин-соя оксили конъюгати асосида текширилган соғлом одамлар кон зардоби энг кам (ўртача ОЗ: 0,185) ва наркоманлар кон зардобиди эса энг юкори (1,959) бўлган ўртача ОЗ ни намоеън қилди. Бу эса танланган тўрт хил морфин конъюгатлари орасида наркоманларнинг ИФА таҳлили учун энг оптимали морфин-соя оксили конъюгати эканлигини кўрсатади, чунки бу энг юкори спецификлик ва сезувчанлик намаён қилди. Ушбу натижаларга асосланган ҳолда, тадқиқотнинг кейинги босқичларида морфин-соя оксили конъюгатлари олиш ва ундан ИФА таҳлилида фойдаланиш шароитларини оптималлаштиришга асосий эътибор қаратилди.

Соя донидан умумий оксилларини ажратишини оптималлаштириши

Бу тадқиқот ишида соя оксили одам антитаналари билан ўзаро реакцияга киришмаслиги сабабли танланган, чунки соя оксили таркибида одам АТ билан боғланадиган умумий детерминант участкалар мавжуд эмас, бу эса сохта/ижобий натижаларга йўл қўймайди.

Шунинг учун, тадқиқот ишининг навбатдаги босқичида морфин-оксил конъюгатларини олишда фойдаланиш учун соя ўсимлиги дони таркибидан умумий оксилларни ажратиб олиш ва морфин сояоксили конъюгатларини олиш учун оптимал вариантини аниқлаш вазифа сифатида белгиланди. Шолчилик илмий-тадқиқот институтидан олиб келинган 17 хил соя навлари донидан 4 хил экстракцияловчи буферлар ёрдамида умумий оксиллари ажратилди (7-расм).



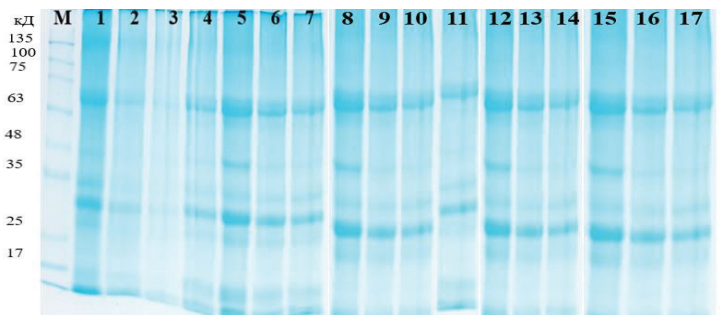
7-расм. Турли соя навлардан ажратилган оксиллар миқдори % ҳисобида ($P < 0,05$; $n = 68$).

Изоҳ: буфер I - NaOH 0,2 M; буфер II- Трис буфер; буфер III – Na-фосфат буфери; буфер IV- Na-корбанат/бикорбанат буфери.

7-расмдаги натижаларга кўра, буфер II ёрдамида экстракция қилинган намуналарда оксиллар миқдори энг юкори эканлиги аниқланди. Оксиллар

микдори ўрганилган навлар орасида энг оксилга бой соя нави бу Ўзбек-6 (31,82 %) эканлиги аниқланди. Натижада соя ўсимлигининг барча тадқиқ этилган навлари орасидан Ўзбек-6 навидан ажратилган оксиллар морфин оксил конъюгатларини олиш учун танлаб олинди ва кейинги тадқиқотлар шу оксил асосида олиб борилди.

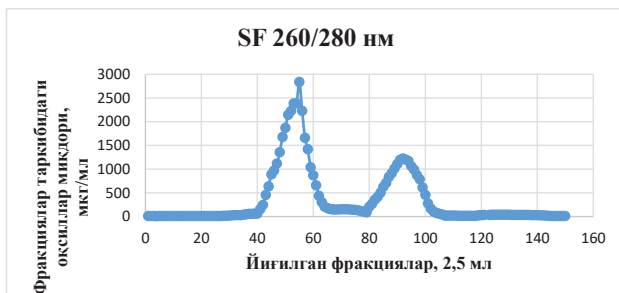
Шундан сўнг, бу оксилларнинг 10% полиакриламид (ПААГ) гелидаги гел-электрофорез таҳлили амалга оширилди (8-расм).



8-расм. Буфер II ёрдамида соя навларидан ажратилган умумий оксилларнинг электрофореграммаси. 1)Ўзбек-2; 2) Нафис; 3) Орзу; 4)Парвоз; 5)Ўзбек-6; 6)5280; 7)6405; 8)6806; 9)7210; 10)530536; 11) К-14; 12)К-16; 13)К-24; 14)0128848; 15)528280; 16)537071; 17)У-300-3335.

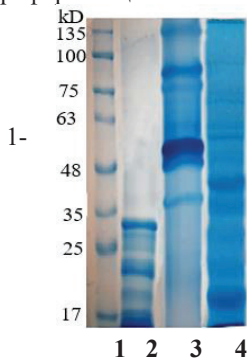
Гел-электрофорез натижаарига кўра (8-расм), ҳар хил навлардан ажратилган оксил намуналари 7 тадан 8 тагача турли молекуляр массали оксил компонентларини сақлайди. Шунинг учун соя оксили гел-филтрация методи ёрдамида юкори ва қуйи молекуляр фракцияларга ажратилди.

Гел-филтрация G 50, G 75, G 100 Сефодекс геллари билан тўлдирилган колонкаларда олиб борилди. Сефодекс G 75 соя оксилларини фракцияларга ажратиш учун мақул вариант эканлиги аниқланди (9-расм).



9-расм. Соя ўсимлигининг Ўзбек-6 нави умумий оксилларининг сефадекс G 75 гелида фракцияларга ажратиши.

Тозаланган фракцияларнинг 10 % ли полиакриламид гелида гел-электрофорез таҳлили амалга оширилди (10-расм).



10-расм. Соя оксиди фракцияларининг электрофореграммаси: маркер; 2-қуйи молекуляр фракция; 3-юқори молекуляр; 4-умумий соя оксиди.

Олиб борилган гел-электрофорез натижаларига кўра юқори молекуляр фракция 40-135 кДа молекуляр массага эга бўлган оксиллар ва қуйи молекуляр фракциянинг таркибида 17-35 кДа молекуляр массали оксиллар борлиги аниқланди (10-расм). Шундан сўнг ажратилган фракцияларнинг аминокислоталар таҳлили амалга оширилди.

Соя оксиди фракцияларининг аминокислоталар таркибини ўрганиш

Ўзбек-6 навининг оксил фракцияларининг аминокислоталар таркиби ЮССХ (Agilent Technologies 1200) методи ёрдамида аниқланди, чунки, морфин гемисукцинатининг корбоксил гуруҳи билан боғлана оладиган оксил таркибидаги эркин аминогруҳлар қанча кўп бўлса, шунча кўп морфин молекулалари ташувчи оксил молекулалари билан боғланади. Шу сабабдан конъюгатлар олиш учун фойдаланиладиган соя оксиди фракцияларининг аминокислоталар таркибини ўрганиш жуда муҳимдир.

1-Жадвал.

Соя оксиди фракцияларининг аминокислоталар таркиби, % ҳисобида

Амино кислоталар	Юқори молекуляр фракция	Қуйи молекуляр фракция	Амино кислоталар	Юқори молекуляр фракция	Паст молекуляр фракция
<i>Asp</i>	4,943	7,986	<i>Pro</i>	2,691	1,818
<i>Glu</i>	0,000	10,73	<i>Tyr</i>	2,159	1,329
<i>Ser</i>	3,284	2,710	<i>Val</i>	3,909	2,000
<i>Gly</i>	3,923	2,402	<i>Met</i>	0,000	0,294
<i>Asn</i>	0,000	0,000	<i>Ile</i>	5,502	3,146
<i>Gln</i>	0,000	0,000	<i>Leu</i>	6,743	3,112
<i>Sys</i>	0,501	0,732	<i>His</i>	0,000	0,000
<i>Thr</i>	2,259	1,632	<i>Trp</i>	0,000	0,000
<i>Arg</i>	6,878	3,621	<i>Phe</i>	2,403	1,340
<i>Ala</i>	2,999	1,939	<i>Lys</i>	1,298	0,704

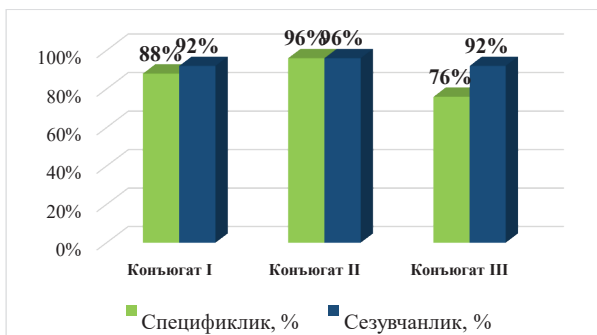
Соя оксидини фракцияларининг аминокислоталар таркибини ўрганиш, энг кўп ϵ -аминокислоталар (лизин, аргинин) юқори молекуляр оғирликдаги

фракциялар таркибида эканлиги кўрсатди (1-жадвал). Кўриниб турибдики, ушбу соя соя фракцияларининг таркибида ϵ -аминокислоталарнинг кўп бўлиши гаптен-оксил конъюгатларини олиш самарадорлигини оширади.

Шундай қилиб, соя оксилнинг юкоримолекуляр фракциясидан куйи молекуляр моддаларни (опиоид гуруҳи алкаллоидлари ва уларнинг ҳосилалари) ИФА усулида диагностика қилишда фойдаланиладиган конъюгатлар олишда ташувчи сифатида фойдаланиш мумкин.

Морфиннинг соя оксили фракциялари билан конъюгатларини олиш

Соя ўсимлигининг Ўзбек-6 нави донидан ажратилган оксилларнинг юкоримолекуляр ва қуйимолекуляр фракциялари билан морфин конъюгатлари бир хил шароитларда синтез қилинди. Морфин гемисукцинати ва соя оксили фракциялари асосида синтез қилинган конъюгатларнинг сезувчанлиги ва спецификлигини ИФА усулида аниқланди. Конъюгатлар адсорбция қилинган плашкалардан 25 нафар наркоманлар қон зардоби намуналари ва 25 нафар соғлом одамлар қон зардобини ИФА усулида таҳлили амалга қилиш орқали керакли бўлган оксил фракцияси аниқланди. ИФА натижалари қуйда келтирилган (11 ва 12 - расмлар):



11-расм. Соя оксили фракциялари билан синтез қилинган морфин-оксил конъюгатларининг спецификлик ва сезувчанлик даражаси ($n=50$, %).

Изох: Конъюгат I – умумий соя оксили билан олинган конъюгат, $OZ_{\text{крит.}} = 0,294$. Конъюгат II – соя оксилнинг юкори молекуляр фракцияси билан синтезланган конъюгат, $OZ_{\text{крит.}} = 0,283$. Конъюгат III – соя оксилнинг куйи молекуляр фракцияси билан синтезланган конъюгат, $OZ_{\text{крит.}} = 0,329$.

Юқоридаги диаграмма соя оксилнинг юкори молекуляр фракцияси билан синтез қилинган морфин-оксил конъюгатининг спецификлиги (96 %) ва сезувчанлиги (96 %) энг юкори даражада эканлигини кўрсатди.

Бундан ташқари, соя оксили фракциялари билан олинган конъюгатлар асосида амалга оширилган ИФА таҳлили натижаларининг ўртача OZ ҳисоблаб чиқилди (12-расм). Чунки бу кўрсаткич наркоманларни диагностика қилиш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқишда муҳим кўрсаткич бўлиб, оптимал конъюгатларни танлашда асосий мезонлардан бири ҳисобланади.



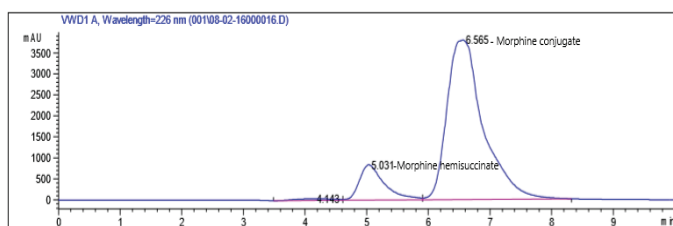
12-расм. Соя оксиди фракциялари билан синтез қилинган морфин-оксид конъюгатлари ёрдамида ўтказилган ИФА натижаларининг ўртача ОЗ кўрсаткичи (ОЗ 450 нм; $P < 0,05$; $n = 50$).

Изох: конъюгат I – умумий соя оксиди билан олинган конъюгат; Конъюгат II- соя оксидининг юкори молекуляр фракцияси билан синтезланган конъюгат; конъюгат III- соя оксидининг куйи молекуляр фракцияси билан синтезланган конъюгат.

ИФА таҳлили натижаларига кўра, тадқиқот ишида конъюгат олиш учун фойдаланилган оксиллар орасида соя ўсимлигининг Ўзбек-6 навидан ажратилган оксилларнинг юкори молекуляр фракцияси морфин-оксид конъюгатларини олиш учун энг оптимали эканлиги аниқланди.

Соя оксидининг юкори молекуляр фракция билан олинган конъюгат асосидаги натижалар бу конъюгатдан наркотик моддалар (опиатлар) истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-системалари ишлаб чиқиш учун фойдаланиш мумкинлигини исботлади (соғлом одамлар қон зардоби (ОЗ 0,222) ва наркоманлар қон зардобини (ОЗ 1,747) таҳлили натижасида олинган ўртача оптик зичлик кўрсаткичлари орасида сезиларли фарқ мавжуд).

Морфин-юкоримолекуляр соя оксиди конъюгатининг ЮССХ стандартизацияси амалга оширилди (13-расм).

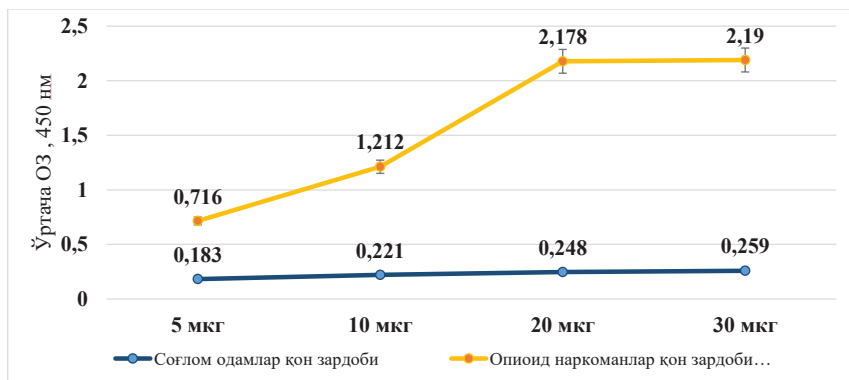


13-расм. Морфин/соя оксиди конъюгатининг Zorbax-Eclipse XDB-C18 колонкасидаги ЮССХ хроматограммаси. 1-пик – морфин гемисукцинати (5,031 дак.); 2 – морфин-соя оксиди конъюгати (6,565 дак.) ($n = 3$).

Текшириляётган намуналар таркибидан морфин гемисукцинати ва морфин конъюгатини бир вақтнинг ўзида аниқлаш имконини берувчи ЮССХ методи ишлаб чиқилди.

*Морфин-оқсил конъюгатининг ИФА учун мўлжалланган планшетларга
иммобилизациясини оптималлаштириши*

Иммуносорбент яъни антиген ёки антитаналар адсорбция қилинган 96 чуқурчали полистирол планшетлари ИФА тест-системаларининг асосий таркибий қисмларидан бири ҳисобланади. Шунинг учун, ушбу тадқиқот ишида морфин-соя оқсили конъюгатининг ИФА учун мўлжалланган полистирол плашкаларга иммобилизациясининг оптимал миқдордаги варианты ишлаб чиқилди. Бунинг учун олинган конъюгат ҳар бир плашка чуқурчасига 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг, 25 мкг, 30 мкг миқдорда бўлган вариантларда иммобилизация қилинди. Шундан сўнг, плашкалар 18 соат давомида 4 °С ҳароратда инкубация қилинди. Инкубациядан сўнг планшетлар 2 % ли соя оқсили эритмаси билан 12 соат 4 °С ҳароратда инкубация қилинди сўнгра 2 марта ювувчи буфер билан ювилди ва ИФА таҳлили амалга оширилди. Ҳар бир вариантда 24 нафар соғлом одамлар қон зардоби ва Республика Наркология марказидан олиб келинган 24 нафар наркоманларнинг қон зардоблари текширилди. Бундан ташқари ҳар бир текшириладиган қон намунасининг ўзи ҳам паралел равишда 2 та чуқурчаларда текширилди ва уларнинг ўртача оптик зичлиги натижа сифатида олинди. ИФА таҳлили натижалари 14-расмда келтирилган.



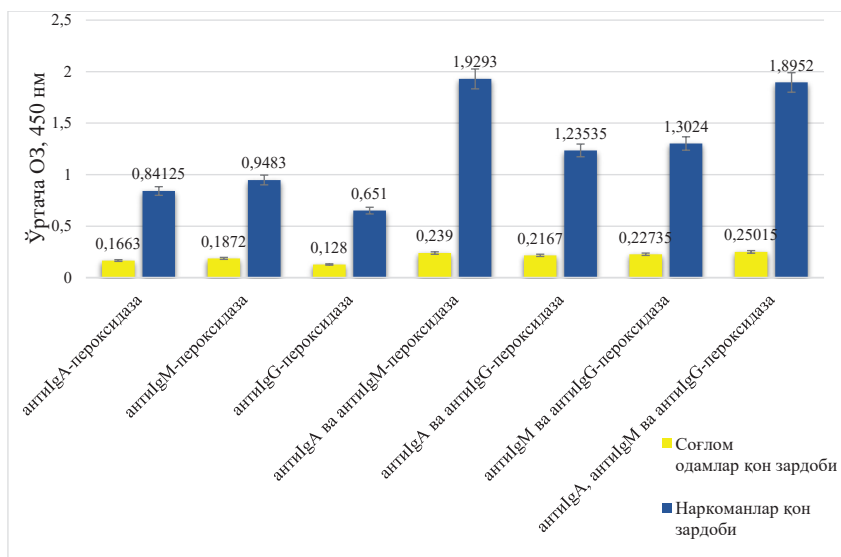
14-расм. Ҳар хил миқдорда адсорбция қилинган морфин/соя оқсили конъюгатлари асосида ўтказилган наркоманлар ва соғлом одамлар қон намуналарининг ИФА таҳлили натижаси олинган ўртача O₃ (O₃ 450 нм; P<0,05; n=48).

ИФА натижасига кўра, морфин/соя оқсили конъюгатининг оптимал концентрацияси 20 мкг эканлиги аниқланди. Чунки бу концентрацияда оптик зичлик максимал қийматга эришилди ва кеинчалик конъюгат миқдорини ошириш таҳлил натижаларининг оптик зичлиги қиймати деярли ўзгармади.

*Опиатларга қарши ҳосил бўлган антитаналарни ИФА усулида аниқлаш учун
антиАТ-пероксидаза ферменти конъюгатларини танлаш*

Аниқловчи конъюгат – фермент билан нишонланган ва антитаналар билан специфик боғлана оладиган антитанага қарши олинган атитанадир.

Тадқиқот ишининг ушбу босқичида, опиятларга қарши одам организмиди ҳосил бўлган АТ ларни аниқлашга асосланган ИФА таҳлилини амалга оширишда антиАТ-пероксидаза ферменти конъюгатидан фойдаланилди (Anti-Human IgA, IgM, IgG (μ -chain specific)-Peroxidase antibody, Sigma, USA). ИФА натижаси асосида улар орасидан наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлашда фойдаланиладиган ИФА тест-системалари учун энг оптимал варианти танланди. Бу ишни амалга оширишда, мавжуд конъюгатлар қуйидагича гуруҳларга ажратилди; 1) антиIgA; 2) антиIgM; 3) антиIgG; 4) антиIgA ва антиIgM; 5) антиIgA ва антиIgG; 6) антиIgM ва антиIgG; 7) антиIgA, антиIgM ва антиIgG. Бу гуруҳ конъюгатларнинг оптимал вариантини аниқлаш учун 20 нафар соғ ва 20 нафар наркоманлар кон зардоби ИФА усулида текширилди. ИФА натижаларининг ўртача қиймати қуйда келтирилган (15-расм).



15-расм. Ҳар хил антиIg – пероксидаза ферменти конъюгатларидан фойдаланган ҳолда ўтказилган ИФА таҳлили натижаларининг ўртача ОЗ (ОЗ 450 нм; n=40).

ИФА таҳлили натижаларига қўра, наркоманлар қонидан опиятларга нисбатан ҳосил бўлган АТ ларни аниқлашга асосланган ИФА таҳлилини амалга оширишда IgA ва IgM-пероксидаза конъюгатлари комплекси энг оптимал: наркоманлар кон зардоблари ИФА натижасининг ўртача ОЗ қиймати-1,929 ва соғлом одамлар кон зардоблари ИФА натижасининг ўртача ОЗ қиймати-0,239 га тенг. Шунга боғлиқ ҳолда мазкур конъюгатлар кеинги тадқиқотларимизда фойдаланиш учун танлаб олинди.

Синтез қилинган морфин-соя оқсили конъюгатининг спецификлигини аниқлаш

Наркотик моддаларни таний оладиган АТ ларни аниқлашга асосланган ИФА тест-тўпламларининг спецификлигини полистирол планшетларга адсорбция қилинган гаптен-оқсил конъюгатлари таъминлайди. Шунинг учун ушбу тадқиқот ишида наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқиш мақсадида синтез қилинган морфин-соя оқсили конъюгатининг спецификлиги аниқланди. Бунинг учун Республика наркология марказидан олиб келинган опиоид наркоманлар қон зардоби намуналари ва соғлом одамларнинг қон зардоби намуналари синтез қилинган конъюгат асосида ИФА усулида текширилди. Айнан шу намуналар паралел равишда опиятлар билан боғлана оладаган АТ ларни аниқлашга асосланган тижорат ИФА тест-системаси (Дианарк-Ат-О опияты, Россия) билан ҳам текширилди. ИФА натижалари қуйдаги жадвалда келтирилган (3-жадвал).

3-Жадвал

Синтез қилинган морфин-соя оқсили конъюгати ва тижорат ИФА тўпламининг спецификлигини таққослаш (ОЗ 450 нм; n=60)

№	Намуналарнинг ўртача оптик зичлиги, 450 нм.				
	Морфин-соя оқсили конъюгати асосидаги ИФА			Дианарк-Ат-О опиятлар, Россия	
	Соғлом одамлар қон зардоби	Наркоманлар қон зардоби	Соғлом одамлар қон зардоби	Наркоманлар қон зардоби	
1	0,192	1,895	0,269	1,982	
2	0,260	2,056	0,250	2,105	
3	0,234	2,531	0,242	2,510	
4	0,287	1,361	0,605	1,412	
5	0,148	1,425	0,160	1,346	
6	0,185	1,264	0,226	1,318	
7	0,293	1,894	0,572	1,922	
8	0,246	2,135	0,226	2,074	
9	0,232	2,325	0,262	2,356	
10	0,142	1,926	0,246	1,950	
11	0,268	1,875	0,281	1,833	
12	0,272	1,950	0,272	1,910	
13	0,526	2,561	0,917	2,598	
14	0,254	2,742	0,293	2,770	
15	0,283	1,630	0,245	1,688	
16	0,262	1,741	0,217	1,652	
17	0,252	1,260	0,290	0,260	
18	0,238	1,907	0,286	1,758	
19	0,283	1,325	0,255	1,106	
20	0,257	2,110	0,294	1,725	
21	0,237	1,783	0,225	1,544	
22	0,230	2,177	1,044	1,715	
23	0,186	1,754	0,275	1,778	
24	0,237	1,446	0,220	1,264	
25	0,205	2,135	0,274	2,204	

26	0,187	1,626	0,262	1,489
27	0,218	1,871	0,292	1,632
28	0,193	2,622	0,246	2,592
29	0,208	2,116	0,287	2,187
30	0,290	2,102	0,292	2,176
ОЗ крнг		0,298		0,300

Натижалар шуни кўрсатдики, биргина намуна (№ 13) ёлгон/ижобий натижа сифатида аниқланди ва бу морфин-соя оксили конъюгатининг спецификлиги 96,6 % эканлигини кўрсатди. Бироқ, тижорат ИФА тўплами орқали текширилган намуналарда 4 та соғлом одамлар қон намуналари (№4, №7, №13, №22) ёлгон/ижобий натижалар кўрсатди ва бу ИФА тўпламининг аниқлик даражаси 86,6 % эканлигини англатади.

Ушбу босқичда олинган натижа асосида куйдагича хулоса қилиш мумкинки, соя оксили асосида олинган конъюгатдан наркоманлар диагностикаси учун ИФА тест-тўплamlарини яратишда фойдаланиш ижобий натижаларга олиб келади.

ХУЛОСАЛАР

1. Морфин гемисукцинатининг синтези оптималлаштирилди ва унинг стандартизацияси (ЮҚХ ва ЮССХ) амалга оширилди.
2. Морфиннинг буқа қон зардоби албумини, соя оксили, овалбумин ва одам қон зардоби албумини каби оқсиллар билан конъюгатлари олинди. Морфин-соя оксили конъюгати энг юқори спецификлик ва сезувчанликка эга эканлиги қайд этилди.
3. Илк бор морфин-соя оксили конъюгатларини олиш мақсадида 17 хил маҳаллий соя навлари таркибидан оқсиллар ажратилди; соя оқсилларини экстракция қилиш ва ажратиш шароитлари оптималлаштирилди; “Ўзбек-6” нави энг кўп миқдорда (31,82%) оқсил сақловчи нав эканлиги аниқланди.
4. “Ўзбек-6” навидан ажратилган оқсил фракцияларининг аминокислоталар таркиби аниқланди. Соя оксилининг юқори молекуляр фракцияси морфин-оқсил конъюгатларининг синтези учун зарур бўлган ϵ -аминокислоталарни энг кўп миқдорда сақлашни намoён этади.
5. Морфин-соя оксили конъюгати синтезининг оптимал шароитлари аниқланди ва унинг стандартизацияси ЮССХ усулида амалга оширилди.
6. Опиатларга қарши антитаналарни аниқлаш учун хрен пероксидазаси билан нишонланган антиIgA ва антиIgM конъюгатларидан бир вақтнинг ўзида фойдаланиш оптимал эканлиги қайд этилди.
7. ИФА усулида опиатларга нисбатан ҳосил бўлган антитаналарни аниқлашда морфин-соя оксили конъюгатининг спецификлиги 96,6% эканлиги аниқланди. Мазкур конъюгат асосида наркотик моддалар истеъмол қилувчи шахсларни аниқлаш учун ИФА тест-системаларини ишлаб чиқиш имконини беради.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 ПО
ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ
МИКРОБИОЛОГИИ**

ИНСТИТУТ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ЭШБОЕВ ФАРХОД БАКИР УГЛИ

**ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ МОРФИН-БЕЛОК С ЦЕЛЬЮ
СОЗДАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИЦ, УПОТРЕБЛЯЮЩИХ НАРКОТИКИ**

03.00.12 – Биотехнология

02.00.10 – Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2020.2.PhD/B131

Диссертация выполнена в Институте химии растительных веществ.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (microbio@academy.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научные руководители:	Азимова Шахноз Садыковна доктор биологических наук, профессор Юсупова Эльвира Гайнатовна кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Официальные оппоненты:	Исмаилов Зафар Файзуллаевич доктор биологических наук, доцент Далимова Сурайё Нугмановна доктор химических наук, профессор
Ведущая организация	Институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «__» июля 2020 года в «11⁰⁰» часов на заседании Научного Совета DSc.02/30.12.2019.B.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г. Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 76, конференц-зал Института Микробиологии, 3 этаж Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, 246-02-24, e-mail: microbio@academy.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрирована под № __). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А. Кадырий, 76, Административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека. Тел.: (+99871) 241-92-28.

Автореферат диссертации разослан «__» июля 2020 года.
(реестр протокола рассылки № __ от «__» июля 2020 года).

Т.Ф. Арипов
Председатель Научного совета по присуждению учёных степеней, б.ф.д., профессор, академик

Р.Н. Жураева
Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёных степеней, к.б.н., старший научный сотрудник

Т.Г. Гулямова
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёных степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность исследования. В современной мировой медицине и фармакологии особое внимание уделяется разработке точных и чувствительных методов диагностики, направленных на раннее выявление лиц, употребляющих наркотики. Наиболее широкое распространение в практике для диагностики наркомании получили иммунохимические и физикохимические методы определения наркотических веществ или его метаболитов. Следует отметить, что такой подход к диагностике наркомании имеет существенный недостаток, поскольку позволяет диагностировать наличие наркотика только в течение 24-48 часов с момента принятия препарата. Однако, наиболее оптимальным методом является метод иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющий определять наличие антител, специфичных к опиатам. Следовательно, получение морфин-белковых конъюгатов с высокой специфичностью и чувствительностью имеет научное и практическое значение для разработки новых методов выявления скрытых наркоманов.

В мире проводятся научные исследования над улучшением методов диагностики наркомании с целью создания новых эффективных методов анализа. В частности, получение гаптен-белковых конъюгатов с использованием разных белков, разработка анализа ИФА для выявления антител к наркотическим веществам на основе конъюгатов гаптен-белок, получение специфических антител к морфину и на их основе разработка и внедрение ИХА и правильного варианта ИФА для выявления употребляемого наркотика или продуктов его метаболизма, из биологических жидкостей человека.

В нашей стране особое внимание уделяется разработке и реализации широкомасштабных мер по созданию новых, импортозамещающих лекарственных средств и медицинских изделий на основе местного сырья и дальнейшему развитию фармацевтической промышленности. В четвертом направлении Стратегии действий развития Республики Узбекистан определены важные задачи «по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности, медицинских учреждений и улучшению обеспечения населения доступными качественными лекарственными средствами и медицинскими изделиями»¹. Получение конъюгатов морфин-белок с целью создания на их основе ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики, служит выполнению задач, обозначенных в Стратегии и будет иметь важное значение в дальнейшем для раннего выявления наркоманов.

Данное диссертационное исследование в определенной степени направлено на выполнение задач, обозначенных Указом Президента Республики Узбекистан №УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», от 7 февраля 2017 года, Постановлением

¹Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

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, а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

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».

Степень изученности проблемы. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время 275 миллионов человек, в возрасте от 15 до 64 лет, потребляют наркотики, от которых ежегодно умирает 585 000 человек (World drug report 2019). Следовательно, исследования по разработке или улучшению существующих методов диагностики потребителей наркотиков проводятся американскими, китайскими, японскими учеными и исследователями других стран. Во всем мире иммунологические (и прежде всего ИФА) методы наиболее широко используются для диагностики наркоманов. Основой идентификации опиатов методом ИФА являются конъюгаты морфин-белок. Конъюгаты морфина с белками синтезируют через второй, третий, шестой атомы углерода морфина или атомы азота разными методами Agnieszka Sulima (2018), Inger Lisa Bogen (2014) Raleigh M.D., (2013). Американский ученый Oscar Torres (2014) применил столбнячный анатоксин для получения морфин-белковых конъюгатов. Исследователь из Японии Tomoya Sakurada (2010) использовал дифтерийный токсин для получения конъюгатов морфин-белок, ученые Qian-Qian Li (2016), Azim Akbarzadeh (2004) из Китая и Ирана - человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин (ОА), лизоцим, тиреоглобулин, глобулин, фибриноген. В СНГ разработкой ИФА-тест-систем на основе антител для выявления лиц, употребляющих наркотики, занимаются исследовательские группы под руководством Мягковой М.А. и Копорова Д.С. Исходя из выше-изложенного, получение конъюгатов морфин-белок с целью создания на их основе ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики, имеет практическое и теоретическое значение.

Связь диссертационного исследования с исследовательской работой научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ по прикладным проектам Института химии растительных веществ И6-ФА-0-15508 “Скрининговая тест-система на основе твердофазного ИФА для выявления лиц, употребляющих наркотики” (2013-2014 гг.) и И6-ФА-Т010 “Организация серийного выпуска скрининговой тест-системы на основе твердофазного ИФА для выявления лиц, употребляющих наркотики, в Узбекистане” (2016-2017).

Целью исследования является оптимизация процесса получения и применения морфин-белковых конъюгатов с целью создания на их основе ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики.

Задачи исследования:

синтез гемисукцината морфина;

выбор оптимального белка для получения морфин-белковых конъюгатов;

оптимизация методов выделения белка из сои и изучение его аминокислотного состава;

синтез конъюгатов морфина с белками сои и оптимизация ИФА-анализа сывороток крови наркоманов на их основе;

определение специфичности синтезированного конъюгата морфина с белками сои и сравнение с коммерческим ИФА набором.

Объектами исследования являются сыворотки крови лиц, употребляющих наркотики (опиаты), и здоровых людей.

Предметом исследования является получение конъюгатов морфин-белок и ИФА анализ сывороток крови наркоманов на их основе.

Методы исследования. При выполнении работы использовали методы биотехнологии и биоорганической химии - ИФА, ВЭЖХ, ТСХ, колоночная хроматография, количественное определение белков, электрофоретический анализ белков, аминокислотный анализ белков.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые был синтезирован конъюгат морфина с соевым белком;

было доказано общее содержание белка в 17 местных сортах сои и доказано, что «Узбек-6» - сорт с наибольшим содержанием белка среди изученных сортов;

впервые определён аминокислотный состав белков сои сорта «Узбек-6» для использования в качестве носителя для получения конъюгата морфина;

усовершенствованные условия использования конъюгата морфин-соевый белок в ИФА анализе сывороток крови наркоманов;

проведено сравнительное изучение специфичности конъюгата морфин-соевый белок с коммерческой ИФА тест-системой. В результате определено высокая специфичность ИФА на основе синтезированного конъюгата морфин-соевый белок.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

получены морфин-белковые конъюгаты с различными белками и выбран оптимальный вариант для ИФА-анализа сывороток крови наркоманов;

определены оптимальные условия выделения соевого белка и его аминокислотный состав;

определены условия использования конъюгата морфин-соевый белок в качестве антигена в ИФА анализе сывороток крови наркоманов;

доказано специфичность и чувствительность конъюгата морфин-соевый белок методом ИФА;

Достоверность результатов исследования обосновывается использованием современных методов биоорганической химии и

биотехнологии. 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.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов данного исследования заключается в том, что в ходе исследования были определены оптимальные условия получения морфин-белковых конъюгатов на основе соевого белка. Использование этих конъюгатов при производстве ИФА тест-систем позволяет значительно снизить себестоимость продукции и повысить её качество.

Практическая значимость результатов данного исследования заключается в использовании полученных конъюгатов в качестве основных компонентов при разработке недорогих и чувствительных ИФА тест-систем для выявления лиц, употребляющих наркотики.

Внедрение результатов исследования. На основе научных результатов, получение конъюгатов морфин-белок с целью создания на их основе ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики:

результаты, полученные в ходе оптимизации адсорбции морфин-белковых конъюгатов на микропланшетах, были использованы при разработке ИФА тест-систем для выявления лиц, употребляющих наркотики, на производственном предприятии при Институте Химии Растительных Веществ Академии наук Республики Узбекистан (справка № 4 / 1255-241 Академии наук Республики Узбекистан от 23 января 2020 года). Использование научных результатов позволило разработать высокочувствительные и высокоспецифичные ИФА тест-системы для выявления лиц, употребляющих наркотики, на основе конъюгата морфин-белок;

оптимизированные методы выделения соевых белков были использованы для выделения низкомолекулярных белков из растений в проекте ФА- А11-Т037 «Разработка средств с пребиотической активностью на основе полисахаридов и биологически активных добавок, обладающих антихолестеринемическими свойствами на основе низкомолекулярных белков-пептидов» (справка № 4/1255-655 Академии наук Республики Узбекистан от 4 марта 2020 года). В результате низкомолекулярные белки с пребиотической активностью были выделены из растительного сырья.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования были доложены и обсуждены на 6 научно-практических конференциях, в том числе на 2 международных и 4 республиканских.

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

научных результатов диссертаций на соискание научной степени доктора философии (PhD).

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 108 страниц компьютерного текста.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновываются актуальность и востребованность, цель и задачи темы диссертации, характеризуются объект и предмет проведенного исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологии 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, озаглавленной **«Изучение методов диагностики наркомании»**, подробно изложен обзор зарубежной и отечественной литературы, который включает описание эффектов воздействия наркотических веществ на организм человека, механизмы выработки антител к опиатам в организме человека, современные методы диагностики наркомании, методы иммунологической диагностики опиатов и методы получения конъюгатов морфин-белок для дальнейшего использования в производстве ИФА тест-систем для выявления опиоидных наркоманов.

Во второй главе диссертации **«Материалы, условия и методы биотехнологической и биоорганической химии»** приведена экспериментальная часть, в которой даны характеристики использованных реактивов и методики получения конъюгатов морфин-белок.

Третья глава диссертации посвящена **«оптимизации условий получения конъюгатов морфин-белок и на их основе оптимизация проведения ИФА-анализа у лиц, употребляющих наркотики»**. В этой главе представлены результаты собственных исследований по синтезу гемисукцината морфина и его конъюгатов с различными белками, выбор наиболее оптимального варианта для проведения ИФА анализа наркоманов и исследование условий для использования, выбранного конъюгата морфин-белок в ИФА.

Синтез гемисукцината морфина

Гемисукцинат морфина получали при взаимодействии морфина с янтарным ангидридом в пиридине в течение 4 ч при 80 °С (рис.1).

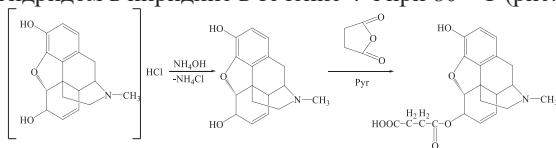


Рис.1. Реакция получения гемисукцината морфина

Полученный продукт идентифицировали с помощью ряда чувствительных методов, таких как ТСХ, ВЭЖХ и определения температуры плавления.

Полноту реакции получения гемисукцината морфина определяли методом ТСХ. По данным ТСХ, т.е. по отсутствию свободных молекул морфина в реакционной смеси установлено, что реакция завершилась через 4 часа (рис.2).

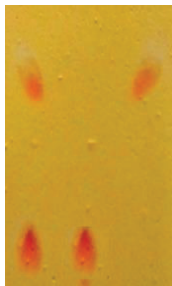


Рис.2. ТСХ анализ синтезированного гемисукцината морфина. 1) через 2 часа: 2) через 4 часа 3) контроль (морфин).

1 2 3

Согласно результатам ТСХ, Rf морфина составил 0,60, а Rf гемисукцината морфина - 0,12.

После этого, стандартизацию получения гемисукцината морфина проводили методом ВЭЖХ (рис.3).

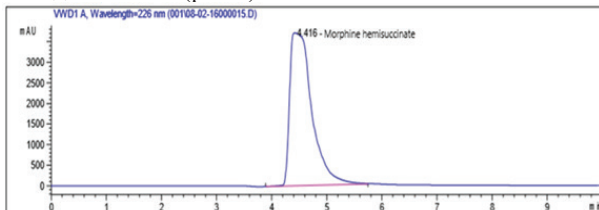


Рис.3. ВЭЖХ-стандартизация синтезированного гемисукцината морфина.

Время выхода пика с колонки, который соответствует гемисукцинату морфина, составляет 4,416 мин., а отсутствие других пиков указывает на чистоту продукта реакции.

Температура плавления продукта реакции составила 237-239^oC, что соответствует температуре плавления гемисукцината морфина, который можно в дальнейшем использовать для получения конъюгатов морфин-белок.

Синтез конъюгатов морфин-белок для использования в качестве антигена в ИФА анализе

После наработки гемисукцината морфина получали конъюгаты с различными белками (БСА, ОА, ЧСА, соевый белок), с целью их сорбции на поверхности полистиролового планшета.

Морфин-белковые конъюгаты были получены карбодимидным методом. Реакции конъюгирования гемисукцината морфина с выбранными

белками проводили параллельно в одних и тех же условиях (рис.4). Количество белка в растворе определяли по методу Лоури.

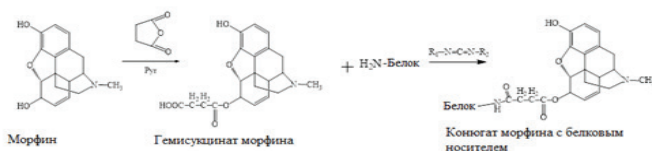


Рис.4. Реакция получения конъюгата морфина.

Специфичность и чувствительность конъюгатов оценивали методом ИФА. Конъюгат морфин - белок использовали в качестве антигена и адсорбировали на 96-луночных полистирольных планшетах. После этого проводили ИФА-анализ образцов крови 25 здоровых людей и 25 опиоидных наркоманов из Республиканского наркологического центра. Каждый образец сыворотки крови тестировали параллельно на 2 лунках с адсорбированными конъюгатами, и получали среднее значение оптической плотности (ОП).

Анализ ИФА с использованием конъюгатов морфин - белок, полученных из четырех различных белков, перечисленных выше, проводили в одинаковых условиях и параллельно с использованием одинаковых образцов сыворотки крови. Однако результаты значительно различались (Рис. 5 и 6).

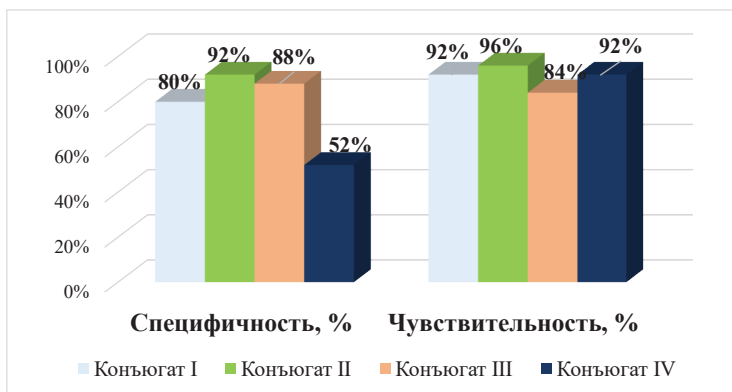


Рис.5. Специфичность и чувствительность конъюгатов, используемых в ИФА (n=50, %)

Примечание: конъюгат I – морфин-БСА, ОП_{крит.} - 0,264; конъюгат II – морфин-соевый белок, ОП_{крит.} - 0,254; конъюгат III – морфин-ОА, ОП_{крит.} - 0,270; конъюгат IV – морфин-ЧСА, ОП_{крит.} - 0,315.

Приведенная выше диаграмма показывает, что конъюгат морфина с соевым белком обладает наиболее высокой специфичностью (92%) и чувствительностью (96%) среди исследованных конъюгатов.

Кроме того, была рассчитана средняя ОП результатов анализа ИФА, проведенного на основе 4 различных конъюгатов (рис.6), так как этот

показатель важен для дальнейшей успешной разработки ИФА тест-систем для диагностики наркомании.

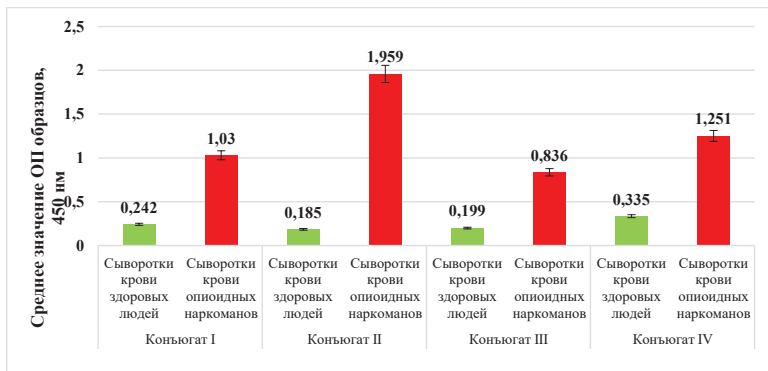


Рис.6. Среднее значение ОП образцов, определенных методом ИФА, для 4 различных конъюгатов (ОП 450 нм; $P < 0,05$; $n = 50$).

Примечание: конъюгат I – морфин-БСА; конъюгат II – морфин-соевый белок; конъюгат III – морфин-ОА; конъюгат IV – морфин-ЧСА.

Согласно результатам ИФА, сыворотки крови здоровых людей, которые были протестированы на основе конъюгата морфина с соевым белком, показали самый низкий уровень ОП (среднее значение ОП 0,185), при этом ОП сывороток крови наркоманов были наиболее высокими (1,959) по сравнению с результатами ИФА с применением конъюгатов морфина с БСА, ЧСА и ОА. Это указывает на то, что конъюгат морфина на основе соевого белка среди четырех отобранных конъюгатов является наиболее оптимальным для диагностики наркомании методом ИФА, поскольку проявляет наибольшую специфичность и активность. Основываясь на этих результатах, далее была проведена оптимизация условий получения конъюгата морфин-соевый белок и его использования в анализе ИФА.

Оптимизация выделения суммарного белка из семян сои

В настоящей работе был выбран соевый белок в связи с тем, что на него нет перекрестных реакций антител с сывороткой крови человека из-за отсутствия в его составе общих детерминантных сайтов, которые могут связывать человеческие антитела, что позволяет избежать ложноположительных результатов.

Задачами следующего этапа исследования было выделение общего белка из соевых бобов для его дальнейшего использования при получении конъюгатов морфин-белок и определение оптимального варианта получения конъюгатов морфин-соевый белок.

Соевый белок был экстрагирован с применением четырех различных экстракционных буферов из 17 различных сортов сои, полученных из

научно-исследовательского института Рисоводства. Количество белка, выделенного из сортов сои, показано ниже (рис.7).

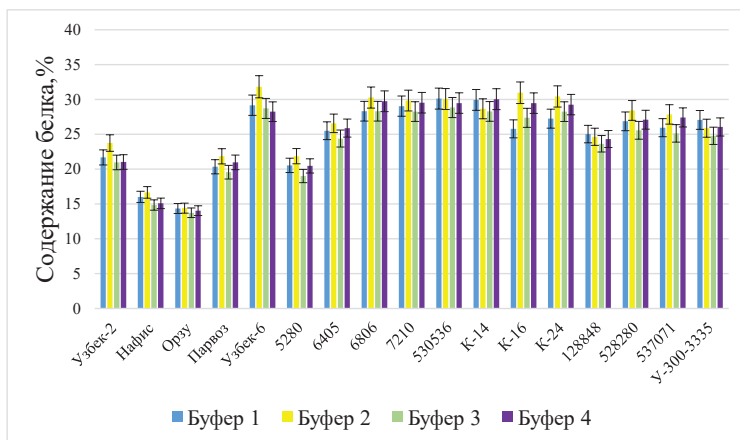


Рис.7. Количество белка, выделенного из разных сортов сои в % ($P < 0,05$; $n=68$).

Примечание: буфер I - 0,2 М NaOH; буфер II - Трис буфер, pH 7,4; буфер III - Na-фосфатный буфер, pH 7,4; буфер IV - Na-карбонатный буфер, pH 9,5.

Как видно из рис.7, наибольшее количество белка получено при использовании буфера II. Из всех исследованных сортов сои наибольшее количество экстрагируемого белка содержится в сорте – “Узбек-6” (31,82%). В результате сорт Узбек-6 был отобран нами для дальнейшего получения конъюгатов морфина с белком, и последующие исследования были проведены с использованием этого белка.

Анализ белков проводили методом гель-электрофореза в 10% ПААГ в денатурирующих условиях (рис.8).

Как видно из данных гель-электрофореза (рис.8), все образцы соевых белков из различных сортов содержали от 7 до 8 белковых компонентов с разными молекулярными массами. Затем соевый белок разделяли методом гель-фильтрации на низко- и высокомолекулярные фракции.

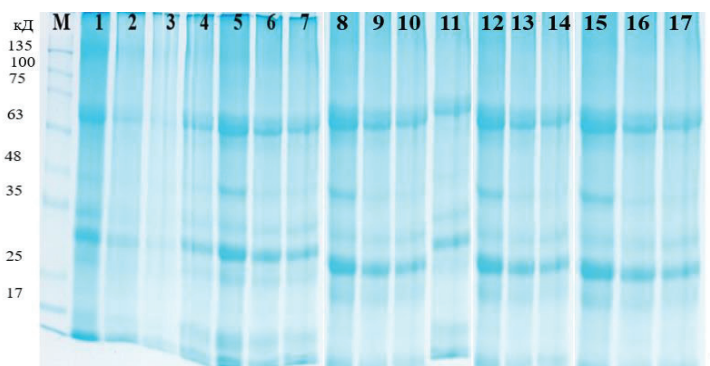


Рис.8. Электрофореграмма суммарных белков, выделенных из сортов сои с использованием буфера II. 1) Узбек-2; 2) Нафис; 3) Орзу; 4) Парвоз; 5) Узбек-6; 6)5280; 7)6405; 8)6806; 9)7210; 10)530536; 11) К-14; 12) К-16; 13) К-24; 14) 0128848; 15)528280; 16)537071; 17) У-300-3335.

Гель-фильтрацию проводили на колонках с использованием Сефадексов G 50, G75, G 100. Наилучшее разделение получено при разделении на колонке с G75 (рис.9).

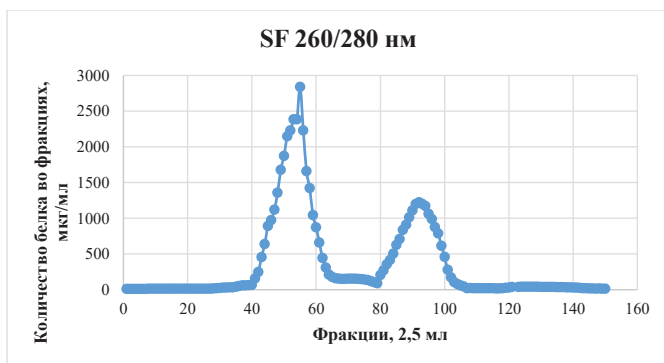


Рис.9. Разделение суммарного белка сорта Узбек-6 на фракции в сефадексе G 75

Очищенные фракции анализировали методом гель- электрофореза в 10-% полиакриламидном геле (рис.10).

Согласно результатам гель-электрофореза, фракции содержат высокомолекулярные белки с массой 40 - 135 кДа и низкомолекулярные белки с массой 17-35 кДа (рис.10).

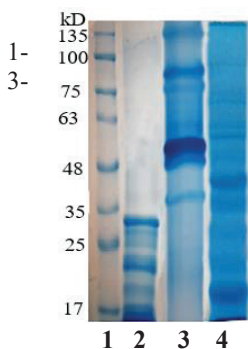


Рис.10. Электрофореграмма фракций соевого белка: маркер, 2-низкомолекулярная фракция, высокомолекулярная фракция, 4- суммарный соевый белок

Далее определяли аминокислотный состав полученных фракций.

Исследование аминокислотного состава белковых фракций соевого белка

Аминокислотный состав фракций белков сои из сорта Узбек-6 определяли методом ВЭЖХ (Agilent Technologies 1200), поскольку чем больше в белке свободных аминогрупп, способных взаимодействовать с карбоксильными группами гемисукцината морфина, тем больше молей морфина свяжется с одним молекул белка-носителя. В этой связи исследование аминокислотного состава белковых фракций сои, используемых для получения конъюгатов, имеет важное значение.

Таблица 1.

Аминокислотный состав белковых фракций соевого белка, в%

Аминокислоты	Высокомолекулярная фракция	Низкомолекулярная фракция	Аминокислоты	Высокомолекулярная фракция	Низкомолекулярная фракция
<i>Asp</i>	4,943	7,986	<i>Pro</i>	2,691	1,818
<i>Glu</i>	0,000	10,73	<i>Tyr</i>	2,159	1,329
<i>Ser</i>	3,284	2,710	<i>Val</i>	3,909	2,000
<i>Gly</i>	3,923	2,402	<i>Met</i>	0,000	0,294
<i>Asn</i>	0,000	0,000	<i>Ile</i>	5,502	3,146
<i>Gln</i>	0,000	0,000	<i>Leu</i>	6,743	3,112
<i>Sys</i>	0,501	0,732	<i>His</i>	0,000	0,000
<i>Thr</i>	2,259	1,632	<i>Trp</i>	0,000	0,000
<i>Arg</i>	6,878	3,621	<i>Phe</i>	2,403	1,340
<i>Ala</i>	2,999	1,939	<i>Lys</i>	1,298	0,704

Исследование аминокислотного состава фракций соевых белков показало, что наибольшее количество ϵ -аминокислот (лизин, аргинин), содержится в высокомолекулярной фракции сои (табл.1). Очевидно, что наличие выше-перечисленных аминокислот в большем количестве в составе этой фракции повышает эффективность получения конъюгатов гаптен-белок.

Таким образом, высокомолекулярную фракцию сои можно использовать в качестве носителя при получении конъюгата для выявления антител к

низкомолекулярным веществам (алкалоиды группы опиатов и их производные и др.) методом ИФА.

Получение конъюгатов морфина с фракциями соевого белка

Конъюгаты морфина с высокомолекулярными и низкомолекулярными фракциями белков, выделенных из сои Узбек-6, были получены в одинаковых условиях. Чувствительность и специфичность конъюгатов, синтезированных на основе гемисукцината морфина и фракций соевого белка, определяли методом ИФА. Для определения необходимой фракции белка был проведен ИФА анализ с использованием 25 образцов сыворотки крови наркоманов и 25 сывороток здоровых людей. Результаты ИФА приведены на рисунках 11 и 12:

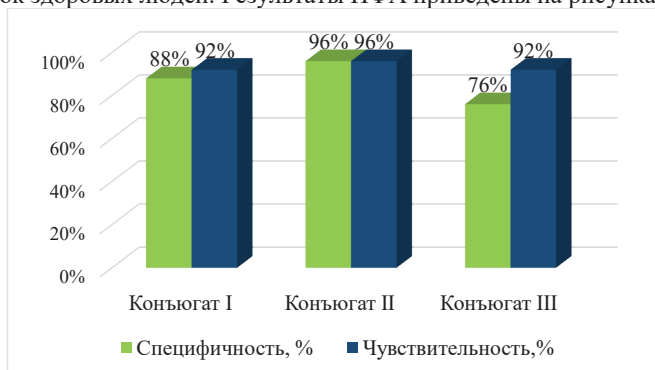


Рис.11. Специфичность и чувствительность морфин-белковых конъюгатов, синтезированных на основе фракций соевого белка (n=50, %).

Примечание: конъюгат I - конъюгат с суммарным соевым белком, $ОП_{крит.} - 0,294$; конъюгат II - конъюгат, полученный с высокомолекулярной фракцией соевого белка, $ОП_{крит.} - 0,283$; конъюгат III - конъюгат, полученный с низкомолекулярной фракцией соевого белка, $ОП_{крит.} - 0,329$.

Приведенная выше диаграмма показывает наивысшую специфичность (96%) и чувствительность (96%) морфин-белкового конъюгата, синтезированного с высокомолекулярной фракцией соевого белка.

Кроме того, была рассчитана средняя ОП результатов анализа ИФА, проведенного на основе полученных конъюгатов (рис.12), так как данный показатель важен при разработке ИФА тест-систем для диагностики наркомании и является одним из основных критериев выбора оптимального конъюгата.



Рис.12. Среднее значение ОП результатов ИФА с использованием конъюгатов морфина и белка, с фракциями соевого белка (ОП 450 нм; $P < 0,05$; $n = 50$).

Примечание: конъюгат I - конъюгат с суммарным соевым белком; конъюгат II – конъюгат, полученный с высокомолекулярной фракцией соевого белка; конъюгат III – конъюгат, полученный с низкомолекулярной фракцией соевого белка.

Результаты ИФА анализа показали, что среди белков, используемых для конъюгации, высокомолекулярная фракция белков, выделенных из сои сорта Узбек-6, была наиболее подходящей для получения конъюгатов морфин-белок. Результаты, полученные на основе конъюгата белка с фракцией II, доказывают, что этот конъюгат можно применять в качестве антигена при разработке ИФА тест систем, используемых для диагностики лиц, употребляющих опиаты (достоверная разница в средних значениях оптической плотности, полученных при анализе сыворотки крови здоровых людей (ОП 0,222) и сыворотки крови наркоманов (ОП 1,747)).

Нами была проведена стандартизация конъюгата морфин-соевый белок методом ВЭЖХ (рис.13).

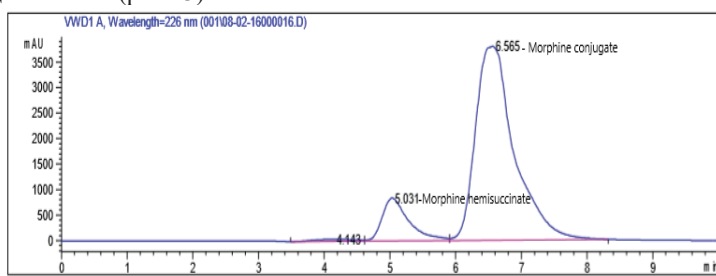


Рис.13. ВЭЖХ хроматограмма конъюгата морфина-соевого белка на колонке Zorbax-Eclipse XDB-C18. 1-й пик - гемисукцинат морфина (5,031 мин.); 2 -й пик-конъюгат морфина (6,565 мин) ($n = 3$).

Таким образом, разработан метод ВЭЖХ анализа образцов, позволяющих одновременно определять гемисуццинат морфина и конъюгат морфина в исследуемых образцах.

Оптимизация иммобилизации конъюгата морфин-белок на полистирольных планшетах для ИФА

Иммунсорбент (96-луночные полистирольные планшеты для ИФА, на которых адсорбируется либо антиген, либо антитело) является одним из основных компонентов тест-систем ИФА. Поэтому в настоящем исследовании было разработано оптимальное количество конъюгата морфин-соевого белка для иммобилизации на полистирольных планшетах для ИФА. Для этого полученный конъюгат иммобилизовали в количестве 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг и 30 мкг на лунку. Затем планшеты инкубировали в течение 18 ч при 4 °С. После инкубации в лунку добавляли 2 % раствор соевого белка и выдерживали в течение 12 ч при 4 °С, затем промывали промывочным буфером и проводили ИФА. В каждом варианте тестировали сыворотку крови 24 здоровых людей и сыворотку крови 24 наркоманов из Республиканского наркологического центра. Каждый образец крови был протестирован параллельно в 2 лунках, и была получена их средняя оптическая плотность. Результаты анализа ИФА показаны на рисунке 14.

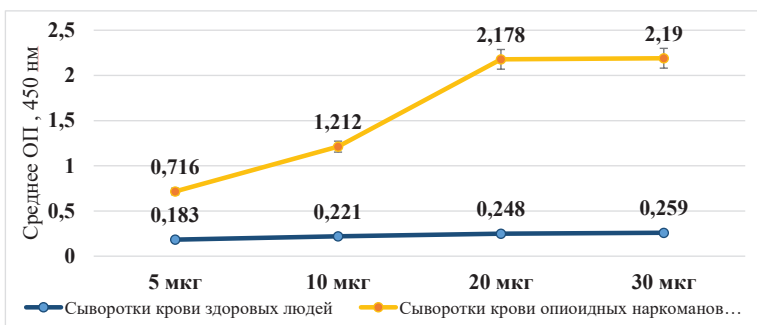


Рис.14. Среднее значение ОП, полученное методом ИФА при анализе образцов сыворотки крови наркоманов и здоровых людей на основе различных количеств сорбированного конъюгата морфин-соевый белок (ОП 450 нм; R<0,05; n=48).

В результате определено, что оптимальное количество конъюгата морфина-соевого белка для сорбции составляет 20 мкг/лунка, поскольку при этой концентрации было достигнуто максимальное значение оптической плотности положительных образцов при сохранении их высокой специфичности.

Выбор проявляющих конъюгатов антиАТ-пероксидаза хрена для проведения анализа антител к опиатам методом ИФА

Проявляющий конъюгат - антивидовые антитела, содержащие ферментную метку и способные специфически связываться с антителом. На

данном этапе исследования использованы конъюгаты антиАТ-пероксидаза (Anti-Human IgA, IgM, IgG (μ -chain specific)-Peroxidase antibody, Sigma, USA) для проведения ИФА анализа по выявлению антител к опиатам в сыворотке опиоидных наркоманов. По результатам ИФА был выбран лучший вариант для использования при анализе сывороток методом ИФА. При выполнении этого этапа исследования, проявляющие конъюгаты были сгруппированы в: 1) антиIgA; 2) антиIgM; 3) антиIgG; 4) антиIgA и антиIgM; 5) антиIgA и антиIgG; 6) антиIgM и антиIgG; 7) антиIgA, антиIgM и антиIgG. Для определения оптимального варианта проявляющего конъюгата проводили ИФА анализ сыворотки крови 20 здоровых людей и 20 наркоманов. Средние значения результатов ИФА приведены ниже (рис.15).

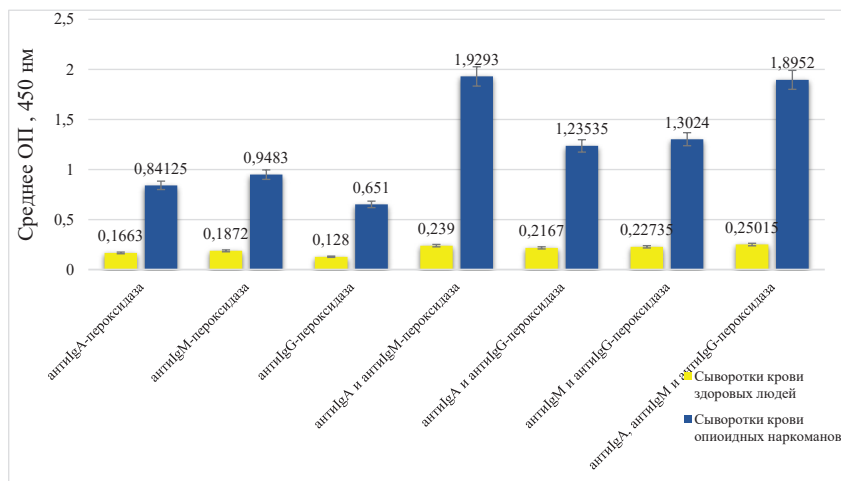


Рис. 15. Среднее значение ОП результатов ИФА анализа с использованием различных конъюгатов антиIg – пероксидаза хрена (ОП 450 нм; $P < 0,05$; $n = 40$).

Результаты анализа ИФА показали, что совместное использование конъюгатов антиIgA и антиIgM с пероксидазой хрена в качестве проявляющего конъюгата для ИФА анализа, основанного на выявлении АТ к опиатам, является оптимальным: средние ОП образцов сыворотки крови наркоманов - 1,929 и сыворотки здоровых людей - 0,239. В связи с этим данный состав проявляющего конъюгата и был выбран нами для дальнейшего использования.

Определение специфичности синтезированного конъюгата морфин-соевый белок

Специфичность и чувствительность ИФА тест-наборов, основанных на анализе АТ, образующихся к наркотическим препаратам, напрямую зависит от качества конъюгата гаптен-белок, адсорбированного на полистирольных планшетах для ИФА. Поэтому на данном этапе работы мы исследовали специфичность конъюгата морфин-соевый белок, который был синтезирован

для разработки ИФА тест-систем для выявления лиц, употребляющих наркотики. С этой целью образцы сыворотки крови опиоидных наркоманов из Республиканского наркологического центра и сыворотки крови здоровых людей тестировали методом ИФА на основе синтезированных конъюгатов. Те же самые образцы были протестированы параллельно с помощью коммерческой ИФА тест-системы (Дианарк-Ат-О опиаты, Россия). Результаты ИФА представлены в таблице ниже (таб.3).

Таблица 3

Сравнение специфичности синтезированного конъюгата морфин-соевый белок и коммерческого ИФА набора (ОП 450 нм; n=60).

№	Среднее значение ОП образцов, 450 нм			
	ИФА на основе конъюгата морфин-соевый белок		Дианарк-Ат-О опиаты, Россия	
	Сыворотки крови здоровых людей	Сыворотки крови опиоидных наркоманов	Сыворотки крови здоровых людей	Сыворотки крови опиоидных наркоманов
1	0,192	1,895	0,269	1,982
2	0,260	2,056	0,250	2,105
3	0,234	2,531	0,242	2,510
4	0,287	1,361	0,605	1,412
5	0,148	1,425	0,160	1,346
6	0,185	1,264	0,226	1,318
7	0,293	1,894	0,572	1,922
8	0,246	2,135	0,226	2,074
9	0,232	2,325	0,262	2,356
10	0,142	1,926	0,246	1,950
11	0,268	1,875	0,281	1,833
12	0,272	1,950	0,272	1,910
13	0,526	2,561	0,917	2,598
14	0,254	2,742	0,293	2,770
15	0,283	1,630	0,245	1,688
16	0,262	1,741	0,217	1,652
17	0,252	1,260	0,290	0,260
18	0,238	1,907	0,286	1,758
19	0,283	1,325	0,255	1,106
20	0,257	2,110	0,294	1,725
21	0,237	1,783	0,225	1,544
22	0,230	2,177	1,044	1,715
23	0,186	1,754	0,275	1,778
24	0,237	1,446	0,220	1,264
25	0,205	2,135	0,274	2,204
26	0,187	1,626	0,262	1,489

27	0,218	1,871	0,292	1,632
28	0,193	2,622	0,246	2,592
29	0,208	2,116	0,287	2,187
30	0,290	2,102	0,292	2,176
ОП_{крит}	0,298		0,300	

Результаты показали, что один образец был определён как ложноположительный (№13), а специфичность конъюгата морфин-соевый белок составила 96,6 %. При этом 4 образца сыворотки крови здоровых людей (№4, №7, №13, №22), протестированных с помощью коммерческого ИФА набора, показали ложноположительные результаты, это означает, что специфичность коммерческого набора ИФА составляет 86,6%.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при создании ИФА тест-наборов для диагностики наркомании целесообразно использовать конъюгат на основе соевого белка.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован синтез гемисукцината морфина и проведена его стандартизация (ТСХ и ВЭЖХ).
2. Получены конъюгаты морфина с белками, такими как бычий сывороточный альбумин, соевый белок, овальбумин и человеческий сывороточный альбумин. Установлено, что конъюгат морфина с соевым белком проявляет наиболее высокую специфичность и чувствительность.
3. Впервые изучены 17 местных сортов сои с целью выделения белка для получения конъюгата с морфином; подобраны оптимальные условия экстракции и разделения соевых белков; установлено, что сорт «Узбек-6» содержит наибольшее количество белка (31,82%);
4. Определён аминокислотный состав белковых фракций, выделенных из сорта «Узбек-6». Установлено, что высокомолекулярная фракция соевого белка содержит наибольшее количество ϵ -аминокислот, необходимых для синтеза конъюгата морфин-белок;
5. Определены оптимальные условия синтеза конъюгата морфин-соевый белок и проведена его стандартизация методом ВЭЖХ.
6. Установлено, что оптимальным для выявления антител к опиатам является одновременное использование антиIgA и антиIgM, меченных пероксидазой хрена.
7. Установлено, что специфичность конъюгата морфина с соевым белком при определении антител к опиатам методом ИФА составляет 96,6%. Это позволяет создать на его основе диагностическую ИФА тест-систему для выявления лиц, употребляющих наркотики.

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC
DEGREES DSc.02/30.12.2019.B.38.01 AT THE INSTITUTE OF
MICROBIOLOGY**

INSTITUTE OF THE CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES

ESHBOEV FARKHOD BAKIR UGLI

**OBTAINING OF MORPHINE-PROTEIN CONJUGATES WITH THE AIM
OF THE CREATION OF ELISA TEST-SYSTEM FOR THE
IDENTIFICATION OF DRUG ADDICTS**

03.00.12 – Biotechnology

02.00.10 – Bioorganic chemistry

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHD) ON BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2020

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 B2020.2.PhD /B130

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.biochem.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisors:

Azimova Shakhnoz Sadikovna
doctor of sciences in biology, professor
Yusupova Elvira Gaynatovna
Doctor of Philosophy (PhD) in Chemical
Sciences, senior researcher

Official opponents:

Ismailov Zafar Fayzullaevich
doctor of biological sciences, docent.

Dalimova Surayyo Nugmanovna
doctor of sciences in biology, professor

Leading organization:

Institute of the Bioorganic Chemistry

The defense of the dissertation will take place on «__» July 2020 at 11⁰⁰ the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of Institute of Microbiology at the following address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under №__ (Address: 100128, Tashkent, 7B A.Kadyri str. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71), e-mail: info@microbio.uz).

The abstract of the dissertation is distributed on «__» July 2020 year
(protocol at the register No _____ dated by «__» July 2020 year)

Aripov Takhir Fatikhovich.

Chairman of the scientific council awarding of scientific
degrees, Dr.S.B., Academician

Juraeva Roxila Nazarovna

Scientific secretary of the scientific council
awarding scientific degrees, PhD, senior researcher

Gulyamova Tashkhan Gafurovna.

Chairman of the scientific seminar under the
scientific council awarding scientific degrees,
Dr.Sc.B., Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work is optimization the process of obtaining and using of morphine-protein conjugates with the aim of creation of ELISA test-system on their basis for identification of drug addicts.

Objects of the research work are the blood serum of drug (opiates) addicts and healthy people.

The scientific novelty of the study is as follows:

first time the morphine conjugates with soybean proteins were synthesized;

the total protein content of 17 local soybean varieties was studied and it was proved that the “Uzbek-6” is the variety with the highest protein content among the studied varieties;

first time the amino acid composition of soybean proteins of the Uzbek-6 variety was studied for using as a carrier protein for the obtaining of morphine conjugate;

improved conditions for the use of the morphine-soybean protein conjugate in the ELISA of the blood serum of drug addicts;

a comparative study of the specificity of the conjugate morphine-soy protein with a commercial ELISA test system was carried out. As a result, the high specificity of ELISA based on the synthesized conjugate morphine-soy protein was determined.

Implementation of the results. Based on the results established from the study of the obtaining of morphine-protein conjugates with the aim of the creation of ELISA test-system for the identification of drug addicts:

The results obtained during the optimization of the adsorption of morphine-protein conjugates on microplates were used in the development of ELISA test systems for the identification drug addicts at a manufacturing at the Institute of the Chemistry of Plant substances of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan (certificate No. 4/1255-241 of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated January 23, 2020). The use of scientific results will allow the development of highly sensitive and specific ELISA test systems for identifying drug addicts based on the morphine-protein conjugate;

optimized methods for isolation of soybean proteins were used to isolate low molecular weight proteins from plants in the project FA-A11-T037 “Development of agents with prebiotic activity based on polysaccharides and dietary supplements with anticholinergic properties based on low molecular weight protein-peptides” (certificate No. 4 / 1255-655 of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated March 4, 2020). As a result, low molecular weight proteins with prebiotic activity were isolated from plant materials.

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 108 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Ф.Б. Эшбоев, Э.Г. Юсупова, С.А. Сасмаков, Ж.М.Абдурахманов, Г.А. Пиякина, Ш.С. Азимова. Морфин гемисукцинатининг синтези // Ўзбекистон Фармосевтик хабарномаси. 2019, №1, - С. 36-39 (02.00.00, №5).

2. Ф.Б. Эшбоев, Э.Г. Юсупова, Г.А. Пиякина, Л.Г.Межлумян, Ж.Ф. Зиявитдинов, У.Ж. Ишимов, Ш.С. Азимова. Выделение и изучение аминокислотного состава белков из сои для получения конъюгатов для ИФА // Universum: химия и биология. 2019, №11(65), - С. 62-66 (02.00.00, №2).

3. Eshboev F.B., Yusupova E.G., Pyakina G.A., Mejlumyan L.G., Ziyavitdinov J.F., Ishimov U.J., Azimova Sh.S. Soya oqsilini ajratish va aminokislotalar tarkibini o'rganish // Ilmiy axborotnoma. 2019, №5 (117), - S. 137-141 (02.00.00, №9).

II бўлим (II часть; II part)

4. F.B. Eshboev, E.G. Yusupova, G.A. Piyakina, S.A. Sasmakov, Sh.S. Azimova. Obtaining of morphine-BSA conjugate for using in ELISA as an antigen for sorption // European Science Review. 2019, №9, - P. 16-21, doi.org/10.29013/ESR-19-9.10-16-20, (№5, GIF-1,36).

5. Ф.Б. Эшбоев, Э.Г. Юсупова, Д. Мансуров, С.А. Сасмаков, Г.А. Пиякина, Ш.С. Азимова. Синтез сукцинита морфина для получения конъюгатов морфина с белками // XXI аср – интеллектуал ёшлар аcri мавзусидаги республика илмий ва илмий-техник анжумани материаллари, Тошкент, 30 март 2018 й. – С. 189.

6. Ф. Эшбоев, Д. Мансуров, Э. Юсупова, С. Сасмаков, Г. Пиякина, Ш. Азимова. Морфин гемисукцинатининг синтези // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни, Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академиясининг 75 йиллик юбилейига бағишланган республика микёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари, Тошкент, 23-ноябрь 2018 й. – С. 121.

7. Ф.Б. Эшбоев, Э.Г. Юсупова, С.А. Сасмаков, Д. Мансуров, Ж.М. Абдурахманов, Ш.Ш. Хасанов, О.Н. Аширов, Ш.С. Азимова. Морфин сукцинати ва Морфин-БЗА конъюгати таҳлилида ЮССХ (HPLC) усулидан фойдаланиш // “Ўзбекистонда генетика соҳасининг бугунги ҳолати, муаммолари ва истиқболлари” мавзусидаги Республика илмий-амалий конференцияси материаллари, Тошкент, 5 декабрь 2018 й. – С. 217

8. F. Eshboev, E. Yusupova, G. Piyakina, Sh. Azimova. Isolation and Determination of Composition of Amino Acids of Soybean Protein for Using in ELISA // XIII International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, Shanghai, China, October 16-19, 2019 y. – P. 93.

9. F. Eshboev, E. Yusupova, G. Piyakina, Sh. Azimova. Obtaining of morphine hemisuccinate- protein conjugates // International conference of young Scientists “Science and Innovation” Tashkent, November 1, 2019 y. – P. 20.

10. Ф.Б. Эшбоев, Э.Г.Юсупова, С.А.Сасмаков, Ж.М.Абдурахманов, А.П. Пиякина, Ш.С.Азимова. Морфин-оксил конъюгатини ЮССХ методи ёрдамида таҳлил қилиш // Фан ва таълимни ривожлантиришда ёшларнинг ўрни Республика миқёсидаги илмий ва илмий-техник конференция материаллари, Тошкент, 22 ноябрь 2019 й. – С. 181.

Автореферат «Ўзбекистон кимё журнали» таҳририятида таҳрирдан
ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 10.07.2020 йил.
Қоғоз бичими 60x84 1/16. Адади 100 нусха.
Буюртма №92.

“Sano-standart” МЧЖ босмахонасида чоп этилди.
Тошкент ш., Широқ кўчаси, 100