

ОЦЕНКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОЛЕЙШМАНИОЗНОГО ПРЕПАРАТА IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛОНИИ КЛЕТОК.

Кадилова Наргиза Эсонбоевна

ассистент кафедры биохимии Самаркандского университета имени Зармеда
Кафедра естественных наук, Технический колледж общественного здравоохранения
имени Абу Али ибн Сино, г. Самарканд, Старший преподаватель биологии: Эсонова
Дильфуза Абдурасуловна. Абдуганиев Абдурауф Содикжонович, магистр наук, отдел
создания и усовершенствования новых лекарственных средств, Абердинский
университет, Великобритания.

Исмадова Умида Фозилжон кызы

студентка 2 курса кафедры лечебного дела Самаркандского университета Зармед.

Важность. Лейшманиоз вызывается простейшими паразитами рода *Leishmania*, которые передаются через укус инфицированных самок moskitov. Существует несколько форм лейшманиоза, включая кожный, кожно-слизистый и висцеральный лейшманиоз, каждая из которых имеет различные клинические проявления (1). По данным Всемирной организации здравоохранения, более 350 миллионов человек находятся в группе риска заражения. Создание альтернативных методов тестирования препарата на культуре клеток (метод *in vitro*) и его стандартизация при изучении действия препарата на лейшмании считается одной из актуальных проблем в области медицины (2).

Цель.

Оценка и стандартизация потенциала действия препарата против лейшманиоза *in vitro* с помощью колонии клеток. С этой целью используют клеточные культуры, называемые *L. amazonensis* и *L. infantum*, которые имеют высокую концентрацию встроенного в них гена бета-галактозидазы. Колония таких клеток проявляет все признаки клеток паразита при лейшманиозе, в том числе содержание цитоплазмы, активность, проницаемость двойной мембраны, реакцию на внешние воздействия, жизнеспособность, межклеточный информационный обмен, рост, устойчивость и др. Индикатор, питательная среда и др.

Объект.

Препарат Амфотерицин В является одним из наиболее широко используемых препаратов от лейшманиоза в мировой медицинской практике. Амфотерицин В рекомендуется больным в дозах 5-100 мг в зависимости от степени заболевания. Механизм действия - молекула амфотерицина В связывается с внешними клеточными рецепторами, активирует ферменты, прерывает цепь внутриклеточного метаболизма и одновременно негативно влияет на стабильность мембраны грибковой клетки, вызывая

полное раскрытие пор мембраны и высвобождение цитоплазматических компонентов вызывает гибель грибковой клетки (3).

Оборудование и материалы:

Электронный микроскоп, культуры *L. amazonensis* и *L. infantum* (выращенные на специальной среде в чашке Петри), инкубатор, Амфотерицин Б, вода для инъекций, шприц, пипетки.

Метод.

Для подтверждения интеграции гена из трансфецированных промастигот *Leishmania* была выделена общая геномная ДНК с использованием реагента DNAzol (Thermo Fisher Scientific), и ПЦР-реакции проводились с комбинацией праймеров ssu для *Leishmania* (ssu-F 5'-GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG-3', ssu-R 5'-CTGCAGGTTTCACCTACAGCTAC-3') и внутренних праймеров pLEXSY-hyg2 (utr1-R 5'-TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC-3', hyg_F 5'-CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG-3') (Jena Bioscience). Наличие гена lacZ было подтверждено с помощью праймера lacZ-F и внутреннего обратного праймера lacZ-R' (5'-CGAAACCGCCAAGACTG-3').

Колонию *L. amazonensis* и *L. infantum* выдерживают при 37 ± 2 °C в течение 48 часов и вводят раствор амфотерицина В в 3 разных дозах (5 мг/мл, 50 мг/мл, 100 мг/мл) и каждые 24 часа в течение 3 дней колонию клеток оменяют, проверяют количество погибших клеток, изменение состава питательной среды.

Оценка экспрессии β -галактозидазы у трансгенных промастиготов

Поскольку в геном *Leishmania* был интегрирован ген lacZ, значительных изменений в экспрессии у трансгенных организмов не ожидалось (Reimão и др., 2013; Roy и др., 2000). Пробуя паразитов при различных концентрациях, удалось более точно оценить уровень экспрессии β -галактозидазы и определить пределы обнаружения колориметрического метода для теста на β -галактозидазу. На рисунке 3 (А и В) показаны кривые абсорбции, соответствующие различным концентрациям трансгенных паразитов после инкубации с раствором CPRG. Обнаружение было возможным при концентрации около 75 промастиготов/мл. В нашем эксперименте линейная связь между абсорбцией и плотностью клеток наблюдалась только в диапазоне от $\sim 2 \times 10^4$ до 2×10^7 промастиготов/мл. Этот диапазон является оптимальным для колориметрического определения и подходит для использования в лабораторных условиях

Внутриклеточные амастиготы и тестирование лекарственных средств

Поскольку амастиготы представляют собой внутриклеточные формы жизни *Leishmania* в макрофагах позвоночных хозяев (Gupta и Nishi, 2011), мы решили протестировать этот колориметрический метод с амастиготами. Для получения амастиготов были оценены два типа макрофагов: перитонеальные макрофаги и клеточная линия RAW 264.7. Мы наблюдали, что перитонеальные макрофаги легче инфицируются *Leishmania*. С другой стороны, клеточные макрофаги оставались жизнеспособными в культуре на протяжении длительного времени и при этом не требовали использования

животных (Maia и др., 2007; Sereno и др., 2007). Для образования амастиготов и валидации метода тестировались различные соотношения паразитов и временные интервалы

Краткое содержание.

Создание клеточных линий *L. amazonensis* (La β gal) и *L. infantum* (Li β gal), экспрессирующих β -галактозидазу

Для создания линий клеток *L. amazonensis* и *L. infantum* с постоянной экспрессией β -галактозидазы (β -gal) мы сначала клонировали открытую рамку считывания гена *lacZ* в вектор экспрессии *Leishmania* (pLEXSY-Hyg2) и трансфицировали экспрессионную кассету в дикие штаммы *L. amazonensis* и *L. infantum*. Этот вектор позволяет интегрировать целевой ген в локус 18S рРНК (*ssu*) *Leishmania* с помощью гомологичной рекомбинации (Рисунок 1, А). После трансфекции, но до клонирования, трансфицированные паразиты были подвергнуты первоначальному тестированию на экспрессию β -gal и его колориметрическое определение. Согласно литературе, концентрация колориметрического реактива CPRG для определения β -gal может варьироваться от 100 μ M до 100 mM (Andriani и др., 2011; Buckner и др., 1996; Okuno и др., 2003). В данном случае оптимальной концентрацией для теста β -gal для *L. amazonensis* и *L. infantum* была выбрана 500 μ M, что подтвердило эффективную экспрессию фермента у обоих видов (данные не показаны). Для всех последующих экспериментов была стандартизирована одинаковая концентрация CPRG, что позволило снизить затраты на тест.

Подтверждение колориметрического теста с Амфотерицином В

Для подтверждения возможности использования трансгенных клеток *L. amazonensis* и *L. infantum* в тестировании лекарственных препаратов они были протестированы с Амфотерицином В, одним из стандартных препаратов для лечения лейшманиоза (Batista и др., 2019). Значительных различий в значениях IC₅₀ для Li β gal, полученных двумя различными методами, не наблюдалось ($p = .3710$). С другой стороны, для La β gal было выявлено значительное различие ($p = .0020$), что может быть связано с ограничениями метода подсчета с использованием камеры Нойбауэра.

Определение β -галактозидазы методом проточной цитометрии

Другим методом для обнаружения β -gal является использование флуоресцентного реагента FDG в качестве субстрата с последующим анализом методом проточной цитометрии. В данном случае трансгенные и дикие промастиготы оценивались после инкубации с FDG. Из-за высокой стоимости и низкой стабильности FDG он не является оптимальным вариантом для скрининговых тестов. Вместе с тем, колориметрический метод оказался наиболее подходящим для скрининга новых антилейшманиальных соединений в лабораторных условиях.

Лейшманиоз признан серьезной проблемой здравоохранения в Узбекистане и Центральной Азии. Результаты эксперимента показали, что колонии *L. amazonensis* и *L. infantum* полностью уничтожались препаратом в течение 72 часов. В ходе эксперимента

было установлено, что питательная среда не вредит действию препарата. Кроме того, ожидается, что описанный выше эксперимент и предлагаемая культура клеток послужат небольшой тестовой моделью *in vitro* для курса лечения амфотерицином В. Этот метод предполагается широко использовать на начальных стадиях вновь создаваемых противолейшманиозных препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. КУЦОНИ О., КАРАМПЕЦУ К. и ДОЦИКА Э., 2019. Скрининг *in vitro* противолейшманиозной активности соединений натуральных продуктов: определение значений IC50, CC50 и SI. Биопротокол, 9(21), с. e3410.
2. ДА СИЛЬВА САНТОС, А.К., МОУРА, Д.М.Н., ДОС САНТУС, Т.А.Р., ДЕ МЕЛО НЕТО, О.П. и PEREIRA, VRA, 2019. Оценка клеточных линий *Leishmania*, экспрессирующих высокие уровни бета-галактозидазы, в качестве альтернативных инструментов для оценки активности лекарств против лейшманиоза. Журнал микробиологических методов, 166, с. 105732.
3. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00681>