

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

ХАМИДОВА ОЗОДА ЖОХОНГИРОВНА

**ҲУЖАЙРАЛАРНИНГ ОСМОТИК СТРЕССГА
ЧИДАМЛИЛИГИДА ТРАНСПОРТ ЖАРАЁНЛАРИНИНГ РОЛИНИ
ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

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

Тошкент – 2020

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

Хамидова Озода Жохонгировна Хужайраларнинг осмотик стрессга чидамлилигида транспорт жараёнларининг ролини тадқиқ қилиш.....	3
Хамидова Озода Жохонгировна Исследование роли транспортных процессов в устойчивости клеток к осмотическому стрессу.....	21
Khamidova Ozoda Joxongirovna Investigation of the role of transport processes in the resistance of cells to osmotic stress.....	39
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works.....	41

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

ХАМИДОВА ОЗОДА ЖОХОНГИРОВНА

**ҲУЖАЙРАЛАРНИНГ ОСМОТИК СТРЕССГА
ЧИДАМЛИЛИГИДА ТРАНСПОРТ ЖАРАЁНЛАРИНИНГ РОЛИНИ
ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

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

Тошкент – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.2.PhD/B65 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

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

Илмий раҳбар:

Сабиров Равшан Заирович
биология фанлари доктори, академик

Расмий оппонентлар:

Хушматов Шунқор Садуллаевич
биология фанлари доктори

Курганов Эркин Шухратович
биология фанлари бўйича PhD

Етакчи ташкилот:

Қарши давлат университети

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги илмий даражалар берувчи DSc.03/30.12.2019.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «___» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96).

Диссертация билан Биофизика ва биокимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№___ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Диссертация автореферати 2020 йил «___» _____ кун тарқатилди.
(2020 йил «___» _____ даги №_____ рақамли реестр баённомаси).

Саатов Талъат Саатович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси ўринбосари, б.ф.д., академик

Асраров Музаффар Исламович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

Ахмеджанов Искандар Гулямович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда дунёда аҳоли орасида анемия, бактериял ва вирусли инфекциялар, яллиғланиш ва турли хил захарланиш касалликларининг ортиши кузатилмоқда, булар эса ўз навбатида ҳужайра сув баланси ва ҳажми ўзгаришларига олиб келади. Экзоген пора ҳосил қилувчи моддалар (антибиотиклар, токсинлар ва бошқалар) ҳужайра ҳажми ўзгаришига сабаб бўлади ва уларнинг осмотик ҳамда коллоид-осмотик стрессга таъсир механизмларини аниқлаш нанобиология ва наномедицинада ҳужайра ҳажм ўзгаришини манипуляция қилишда, ҳужайраларнинг турли стрессларга чидамлилигини оширишда, ҳажмга боғлиқ анион каналларининг янги блокаторларини топишда, анемияга қарши доривор препаратларни ишлаб чиқишда муҳим илмий ва амалий аҳамият касб этади.

Ҳозирги кунда жаҳондаги етакчи илмий-тадқиқот марказларида ҳужайраларнинг осмотик стрессга чидамлилигида транспорт жараёнларининг ролини тадқиқ қилиш жадал суръатлар билан олиб борилмоқда ва бу замонавий ҳужайра физиологияси ва биофизиканинг долзарб вазифаларидан бири ҳисобланади. Ҳужайралардаги осмотик стрессга жавобан кечадиган жараёнларда ҳажмга боғлиқ анион каналлари ҳамда макси-анион каналлари асосий роль ўйнайди. Демак, бу икки турдаги канал ҳужайраларнинг лизисга нисбатан чидамлилигини таъминлашга ҳам хизмат қилиши мумкин. Гипоосмотик стресс шароитида ҳужайра ҳажм бошқарилиш системасини фаоллаштириш ёки ҳужайра ҳажм бошқарилишини дисрегуляция қилиниши тиббиёт ва фармакологияда иммуностимулятор ёки иммунодепрессант моддаларни кашф этишда устувор йўналишни очиб беради.

Мамлакатимизда бугунги кунда илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали усуллари яратилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «...илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш»¹ га катта урғу берилган, бунга жавоб тариқасида маҳаллий ўсимликлардан ажратилган табиий биологик фаол бирикмаларнинг ҳужайра ҳажм бошқарилиши тизимида таъсир механизмларини аниқлаш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони, 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида» ги Қарори ва 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ҳамда мазкур

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги ПФ-4947-сонли фармони

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

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Дунёнинг йирик илмий-тадқиқот марказлари етакчи олимлари ҳайвон ҳужайраларида, гипоосмотик стресс шароитида ҳужайра ҳажм бошқарилиш жараёни устида тадқиқотлар ўтказган ва бу жараёндаги ҳажмга боғлиқ хлор канали ролини аниқлаган. Ушбу соҳадаги тадқиқотлар ҳорижий олимлар Pedersen S.F. (2016), Okada Y. (2019), Nilius B.(2003), Hoffmann E.K. (2009), Pasantes-Morales H. (2016) ва бошқалар томонидан самарали ривожлантирилган.

МДХ мамлакатларида Самедова А.А. (2010), Чеботарева, Н.А. (2007) ва бошқалар томонидан иммун тизимини заифлаштирувчи таъсирларга антибиотикларни ноҳўя таъсири, баъзи дори воситаларининг гемолитик таъсири, уларнинг турли касалликлардаги таъсир механизми бўйича ҳамда ҳужайрадаги макромолекулаларнинг жойлашувидаги краудинг эффекти янги доривор препаратларни тадқиқ қилишда муҳим ўрин тутиши бўйича тадқиқотлар олиб борилган.

Мамлакатимиз олимлари томонидан эритроцитларда ҳужайра ҳажм доимийлигини ҳужайрадаги ионлар ассиметрияси ва мембрананинг селектив ўтказувчанлиги таъминлаши (Красильников О.В. 1991), ҳужайра бутунлигининг сақланиши ҳажм доимийлигини сақлаш билан боғлиқ бўлиб, айниқса бунда анион каналларининг роли муҳимлиги (Сабилов Р.З. 2016), буметанидга сезгир бўлган Na/K/2Cl котранспорт системаси одам эритроцит ҳужайраларининг амфотерицин моддаси таъсирида содир бўлувчи коллоид-осмотик лизисига нисбатан чидамлилик бериши (Бессонова С.В. 2004) кўрсатилган. Анион каналлари ҳужайралардаги осмотик стрессга жавобан содир бўлувчи ҳажм бошқарилиши жараёнида муҳим ўрин тутиши ва тимоцит ҳужайраларининг ҳажм бошқарилишида Ca^{2+} , K^{+} ва Cl^{-} каналларининг ҳамда K^{+}/Cl^{-} -котранспортининг роли аниқланган (Курбанназарова Р.Ш. 2008).

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти ЎзМУ ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А11-Т080 «Ҳажмга боғлиқ анион транспортининг молекуляр физиологияси ва биофизикаси» (2012-2016) мавзусидаги ва ПЗ-2017-0920-49 «Маҳаллий хомашё асосида ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ мембрана транспорти модуляторлари бўлган янги перспектив субстанцияларни тадқиқи» (2018-2020) ҳамда ФА-Ф5-014 «Ҳажмга боғлиқ анион каналларининг биофизикавий фенотипи ва ҳужайра ҳажм бошқарилиш

механизмидаги функцияларини ўрганиш» (2017-2020) мавзусидаги илмий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади хужайраларнинг осмотик стресс ва коллоид-осмотик лизисга чидамлилигида транспорт жараёнларининг ролини пора ҳосил қилувчи моддалар ҳамда блокаторлар ёрдамида аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

одам эритроцит хужайраларининг осмотик стресс таъсиридаги лизисини биофизикавий тавсифини ва ундаги ион транспорти жараёнларининг ролини аниқлаш;

одам эритроцит хужайраларининг канал ҳосил қилувчи моддалар нистатин ва эсцин таъсиридаги лизисининг биофизикавий тавсифини ва ундаги ион транспорти жараёнларининг ролини аниқлаш;

нистатин моддасини каламуш тимуси лимфоцитларининг нормал изоосмотик ҳажмига ва гипоосмотик стрессдаги ҳажм бошқарилиш системасига таъсирини тадқиқ қилиш;

эсцин моддасини каламуш тимуси лимфоцитларининг нормал изоосмотик ҳажмига ва гипоосмотик стрессдаги ҳажм бошқарилиш ситемасига таъсирини тадқиқ қилиш;

ўсимликлардан ажратилган полифенол бирикмаларнинг хужайра ҳажм бошқарилиш жараёнига таъсирини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида одам қизил қон хужайралари, зотсиз, ёш эркак каламушлардан ажратилган тимоцитлар, нистатин, эсцин ва баъзи ўсимлик полифеноллари олинган.

Тадқиқотнинг предмети эритроцитларнинг осмотик ва коллоид-осмотик стрессга чидамлилигида ион транспортини роли ва пора ҳосил қилувчи моддаларнинг тимоцит хужайраларидаги ҳажм бошқарилиш жараёнига таъсирини тадқиқ қилишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тажрибаларда замонавий биофизик ва биокимёвий усуллардан фойдаланилди. Каламуш тимоцитлари ва одам қизил қон хужайралари стандарт методлар ёрдамида ажратилди. Гемолиз миқдори қизил қон хужайраларидан гемоглобиннинг чиқиши бўйича ўлчанди. Тимоцитлар хужайра ҳажми ўзгариши суспензиянинг ёруғлик ўтказувчанлигини регистрацияси усули ёрдамида аниқланди. Натижаларни математик ва статистик таҳлил қилиш учун Origin 5.0 ва 8.6 (OriginLab Corporation, АҚШ) компьютер дастурларидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилigi куйидагилардан иборат:

эритроцит хужайраларида ҳажмга боғлиқ анион каналлари мавжудлиги ҳамда бу каналлар осмотик ва коллоид-осмотик лизисда ҳимояловчи функцияга эга эканлиги аниқланган;

плазматик мембранадаги наноскопик ион ўтказувчи поралар ҳосил қилувчи нистатин ва эсцин моддалари таъсирида кечувчи гемолиз механизмлари тубдан фарқ қилиши ва фақатгина нистатин чақирган коллоид-осмотик лизисдагина ҳажмга боғлиқ анион транспорти ҳимояловчи функцияга эгаллиги аниқланган;

осмопротекция ёрдамида нистатиннинг эритроцит ва тимоцит хужайраларида радиуси 0,39-0,42 нм бўлган наноскопик поралар ҳосил қилиши, натижада қўш Доннан мувозанати бузилиб, хужайра ҳажми ошиши ва мембрана бутунлиги йўқолиши исботланган, эсцин моддаси жуда катта (~2,6 нм радиусли) поралар ҳосил қилилиши ва натижада эритроцит лизиси ва тимоцитларнинг кўп фазали ҳажм осцилляциялари содир бўлиши аниқланган;

ўсимликлардан ажратилган полифенол моддалар тимоцитлардаги хужайра ҳажм бошқарилиш жараёнини самарали сусайтириши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

эритроцитлардаги ҳажмга боғлиқ анион транспортининг ҳимояловчи роли ушбу тизимга таъсир қилиб, анемия ва бошқа қон патологияларида қизил қон хужайраларини ҳимоялаш имкониятини берган;

лимфоцитларда олинган натижалар нанобиологияда наноманипуляция қилиш, яъни битта хужайра даражасида ҳажмни бошқариш имкониятини яратган;

самарали ҳамда токсиклиги кам бўлган янги иммуномодуляторлар кашф қилишда полифенол бирикмаларнинг назарий ва амалий асос бўлиши асосланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги олинган натижалар замонавий биофизикавий, биокимёвий тадқиқот усуллари қўллаш орқали олинганлиги, натижалар замонавий компьютер дастурлари ёрдамида таҳлил қилинганлиги билан тасдиқланади. Олинган натижаларнинг исботи уларнинг Республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси, натижалар рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти камқонлик касаллиги сабабларидан бири бўлган эритроцитларнинг парчаланиб кетишини олдини олишда, эритроцит хужайраларнинг мустаҳкамлигини таъминлашда, стрессларга чидамлилигини оширишда, анемияга қарши доривор препаратларни аниқлашда муҳим назарий асос сифатида қўлланилиши билан изоҳланади. Нистатин ҳосил қилган ўзи йиғилувчи поралари таъсирида хужайра ҳажм ўзгариши механизмлари нанобиологияда наноманипуляция қилиш учун назарий аҳамиятга эга.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, фаол полифенол бирикмаларни иммун тизими хужайралари патологиясида иштирок этувчи ион каналларига боғлиқ касалликларни олдини олиш ва даволашда эффектив иммуномодулятор бирикмаларнинг истиқболли янги авлоди сифатида қўллаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Хужайраларнинг лизис жараёнлари ҳамда ҳажм бошқарилишининг биофизикавий тавсифи бўйича олинган илмий натижалар асосида:

қон хужайраларининг осмотик стрессга чидамлилиги, канал ҳосил қилувчи моддалар таъсиридаги лизис ва лимфоцит ҳажм бошқарилишининг биофизикавий тавсифи бўйича олинган натижалардан ФА-А11-Т031

«Экдистерон ва унинг полисинтетик ҳосилалари асосида қандли диабетни даволаш учун янги самарали воситасини яратиш» (2015-2017) амалий лойиҳасида индивидуал экдистерон ва унинг полисинтетик ҳосилаларининг қон ҳужайралари осмотик стрессга чидамлилигига ҳамда уларнинг ҳужайра ҳажмининг бошқарилишига таъсир механизмларини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 4 июлдаги 4/1255-1853 - сон маълумотномаси). Натижада экдистерон ва унинг полисинтетик ҳосилаларининг қон ҳужайралари осмотик стрессга чидамлилигига ҳамда уларнинг ҳужайра ҳажм бошқарилишига таъсир механизмларини тавсифлаш имконини берган;

қон ҳужайралари ва тимус лимфоцитларининг осмотик стресс ва канал ҳосил қилувчи моддалар таъсиридаги лизиснинг биофизикавий тавсифи, қон ҳужайраларининг осмотик ва коллоид-осмотик лизисга чидамлилигида ион-транспорт тизимининг роли бўйича олинган натижалардан ПЗ-20171024153 рақамли: «Биологик фаол моддаларни скрининг қилиш учун сичқон ингичка ичак раки ҳужайра культураси асосида тест тизими яратиш» (2018-2019) амалий лойиҳасида *Cuscuta evropea* ўсимлиги уруғи экстрактининг гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишини камайтирувчи таъсирини аниқлашда ҳамда уларнинг ҳужайра ҳажм бошқарилишига таъсири механизмларини ва ушбу экстрактнинг гемолитик эмаслигини ойдинлаштиришда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2019 йил 7 октябрдаги 4/1255-2659-сон маълумотномаси). Натижада *Cuscuta evropea* ўсимлиги уруғи экстрактининг ҳужайра мембранасига таъсири ҳамда ҳужайра ҳажмининг бошқарилиш жараёнига таъсир механизминини тавсифлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 5 та халқаро ва 10 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 22 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 7 та мақола, шундан 6 таси республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 118 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объекти ҳамда предметлари тавсифланган, муаммонинг ўрганилганлик даражаси, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён

қилинган, олинган натижаларнинг ишончлилиги, илмий-амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

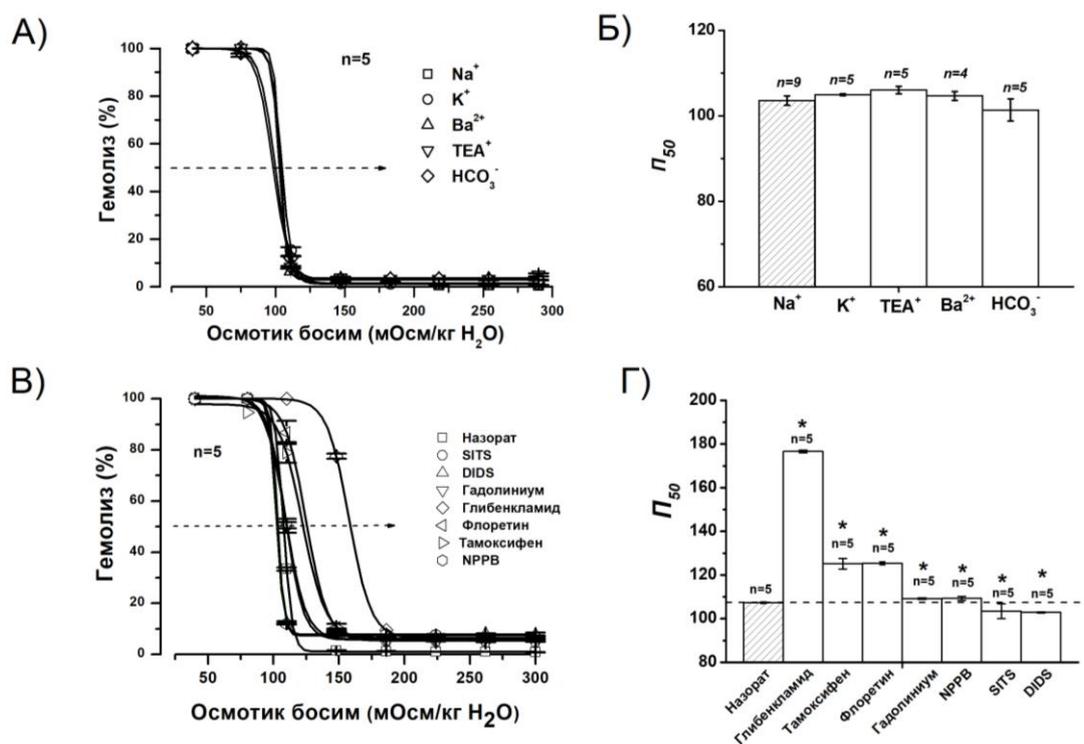
Диссертациянинг «**Эритроцит ва тимоцитларда ҳажм бошқарилишининг умумий хусусиятлари ва механизмлари**» деб номланган биринчи бобида хужайра ҳажм бошқарилишида иштирок қиладиган мембрана транспорт тизимлари ҳамда тимоцит ва эритроцит хужайраларида ҳажм бошқарилиш жараёнлари таҳлил қилинган, ҳажмга боғлиқ анион каналларининг молекуляр тузилиши, нистатин ва эсциннинг умумий таърифи, полифеноллар ва уларнинг хусусиятлари тўғрисида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Хужайраларнинг нормал ва осмотик стресс шароитидаги ҳажмга боғлиқ хусусиятларини тадқиқ қилиш усуллари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотда фойдаланилган моддалар ва эритмалар тавсифи, тадқиқот олиб борилган эритроцит хужайраларини кўнгилли, соғлом одам қонидан ажратишнинг стандарт методлари, эритроцитлар суспензиясини тайёрлаш ва гемолиз тажрибалари, тимоцит хужайраларини ёш оқ каламушлардан ажратиб олиш ва тадқиқотда фойдаланилган хужайра ҳажмини суспензиянинг ёруғлик ўтказувчанлигини регистрация қилиш усуллари батафсил ёритилган, шунингдек олинган натижаларни математик қайта ишлаш усуллари ва статистик таҳлили келтирилган.

Диссертациянинг «**Эритроцит хужайраларининг осмотик стресс ва мембрана-фаол моддалар таъсиридаги лизис механизмлари**» деб номланган учинчи бобида эритроцит хужайраларининг осмотик стресс таъсиридаги лизисининг биофизикавий тавсифи, эритроцит хужайраларининг канал ҳосил қилувчи моддалар нистатин ва эсцин таъсиридаги лизисининг биофизикавий тавсифи келтирилган. Дастлабки олиб борилган тадқиқотлар натижаси асосида 50% гемолизга олиб келувчи осмотик босим (Π_{50}) $107,3 \pm 0,2$ мОсм/кг H_2O ($n=5$) ни ташкил этиши ва жараённинг максимал даражадаги гемолизга тахминан 30 минутда эришиш мумкинлиги аниқланди. Эритроцит хужайраларининг осмотик стрессга чидамлилигида ион каналларининг роли тадқиқ қилинганда хужайраларни ташқи муҳитидаги эритма таркибидаги Na^+ ионини K^+ ионига, Cl^- анионини HCO_3^- анионига алмаштирган ҳолда тажриба ўтказдик. Тажрибамизнинг кейинги қисмида эса фойдаланилаётган эритмалар таркибига K^+ -каналлари блокаторлари Ba^{2+} (5 мМ) ва $TЭА^+$ (5 мМ) катионларини киритиб, эритроцитлардаги гемолизни кузатдик (1-расм А ва Б). Олинган натижалар бу жараёнда K^+ -каналлари ҳамда эритроцитларда ниҳоятда интенсив бўлган хлор/бикарбонат алмашинувининг роли сезиларли эмаслигидан далолат беради.

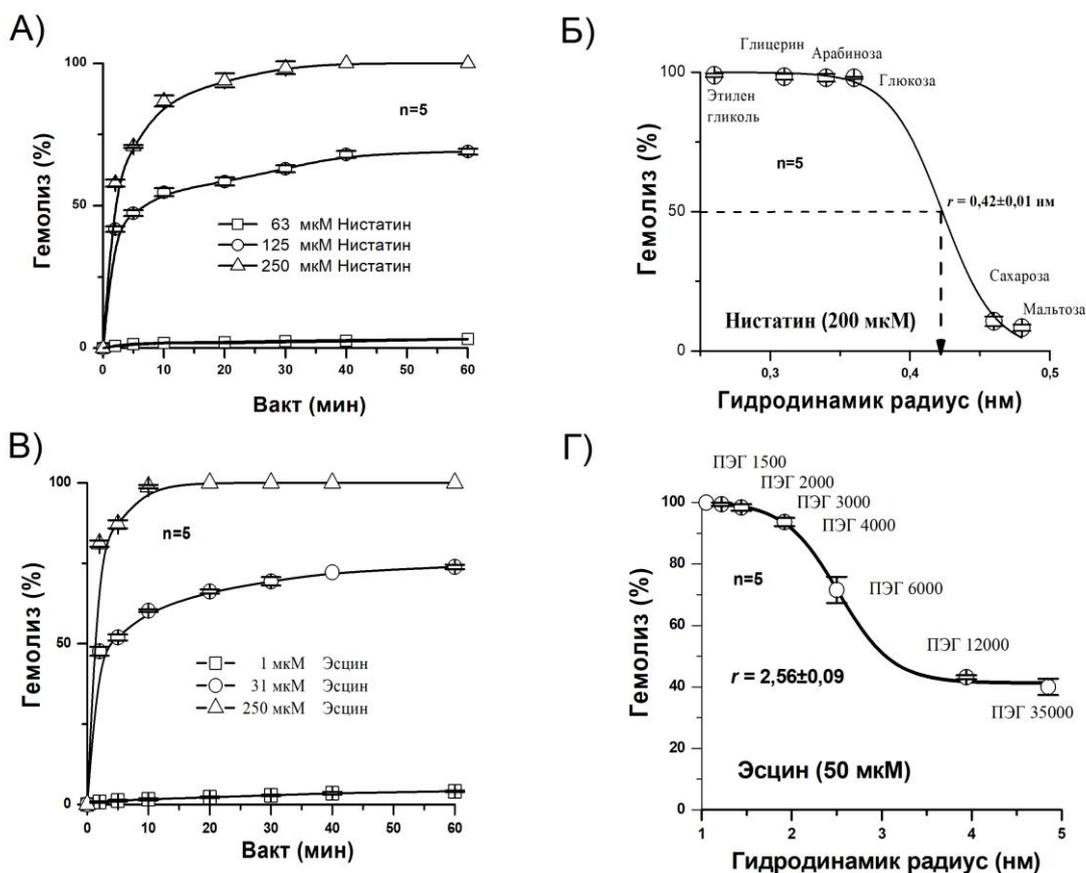
Ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокаторлари – глибенкламид, тамоксифен ва флоретин (лекин макси-анион канали блокатори гадолиниуммас) эритроцит хужайраларининг осмотик чидамлилигини заифлаштириши ушбу каналнинг эритроцитларда ҳам мавжудлигидан ва

осмотик стресс шароитида химояловчи функцияга эгалигидан далолат беради (1-расм, С ва Д).



1-расм. Гипоосмотик стресс шароитида эритроцит хужайраларининг осмотик чидамлигида ион транспортининг ролини блокаторлардан фойдаланиб аниқлаш. А) ва В) гемолиз даражасининг муҳит осмотик босимига боғлиқлиги; Б) ва Г) ордината ўқида – 50% гемолизга олиб келувчи осмотик босим (P_{50}), абсцисса ўқида – тажриба шароити кўрсатилган; n – тажрибалар сони. Стастистик аҳамиятли ($P < 0,05$) фарқ (*) белгиси билан кўрсатилган.

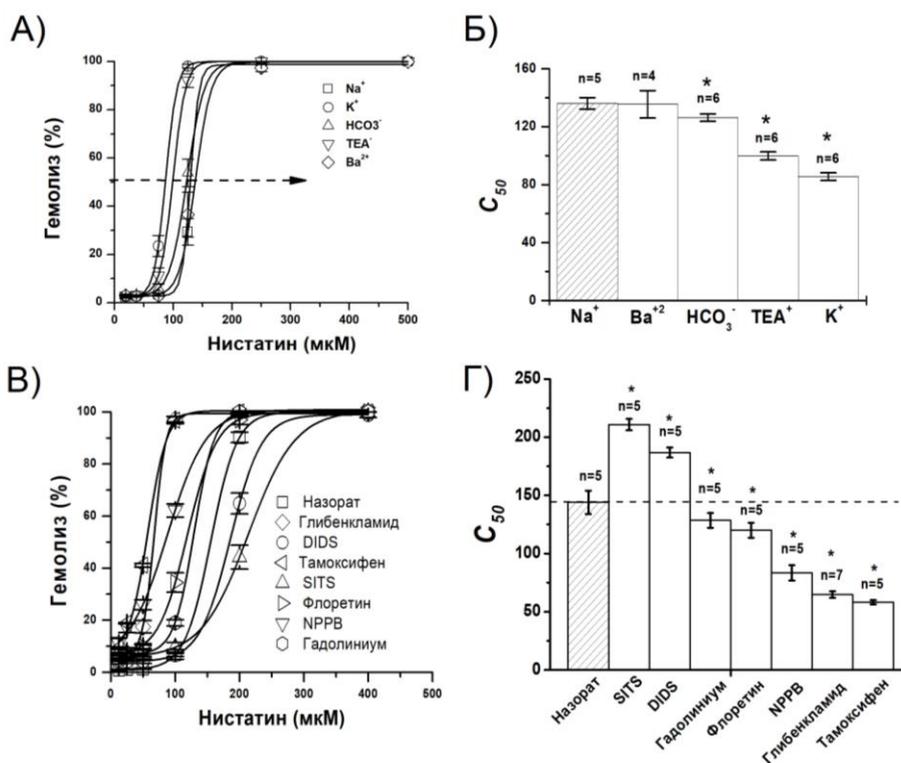
Эритроцит хужайраларининг канал ҳосил қилувчи моддалар – нистатин ва эсцин таъсиридаги лизисининг биофизикавий тавсифини тадқиқ қилишда ушбу биологик фаол моддалар таъсирида гемолиз чақирилиб, шу жараённинг вақтга боғлиқлиги кузатилди (2-расм, А ва В). Натижалар таҳлили моддаларнинг стоционар гемолизга 40-чи минутда эришиш мумкинлигини кўрсатди. Жараённинг механизмини аниқлаш мақсадида моддаларнинг 100% гемолиз чақирувчи миқдори: нистатин 200 мкМ ва эсцин 50 мкМ концентрациясида гемолиз чақириб, ноэлектролит моддалар таъсир эттирилганда нистатин гемолизи тўлиқ блокланди (2-расм, Б ва Г) ва нистатин порасининг радиуси $r = 0,42 \pm 0,01$ нм ($n = 5$) га тенг, деб топилди. Эсцин таъсиридаги гемолиз фақат қисман блокланди ва у ҳосил қилган пора $r = 2,56 \pm 0,09$ нм ($n = 5$) ни ташкил этиши ва бу гемоглобиннинг катталигига яқинлиги аниқланди. Олинган натижалар нистатин ва эсцин таъсирида содир бўладиган гемолиз бир-биридан кескин фарқ қилишидан далолат беради: нистатинли гемолиз батамом коллоид-осмотик механизм билан, эсцин таъсирида содир бўлган лизис эса фақат қисмангина коллоид-осмотик механизм билан, асосий қисми эса кимёвий гемолиз механизми (сирт-фаол сапониннинг мембранани бузиши) билан кечади.



2-расм. Эритроцит хужайраларининг канал ҳосил қилувчи моддалар таъсиридаги лизис жараённинг вақтга боғлиқлиги ва механизмини аниқлаш. Ордината ўқида – гемолиз даражаси % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – вақт (минут) ёки гидродинамик радиус (нм) кўрсатилган; n – тажрибалар сони.

Эритроцит хужайраларининг коллоид-осмотик лизисга чидамлилигида K^+ -каналлари муҳим роль ўйнаши Na^+ ионларини K^+ га алмаштирилганда ва калий каналлари блокатори TEA^+ таъсирида гемолиз сезиларли ўзгаришидан маълум бўлди (3-расм, А ва Б). Коллоид-осмотик лизисда анион транспортининг роли ҳам муҳимлиги гадолинийум (макси-анион канали блокатори) ҳамда флоретин, NPPВ, глибенкламид ва тамоксифен (барчаси ХБАК блокаторлари) моддалари таъсирида гемолиз сезиларли даражада ўзгарганидан маълум бўлди (3-расм, В ва Г). Олинган натижалардан хулоса қилдикки, нистатин хужайра мембранасида ўз-ўзидан йиғилувчи ион ўтказувчан пораларни ҳосил қилиши ҳисобига хужайранинг коллоид-осмотик мувозанати бузилади. Бу ҳолат плазматик мембраналарнинг Na^+ ионига нисбатан ўтказувчанлигини оширади. Натижада хужайра кўш Доннан системадан оддий Доннан системасига ўтади, ҳажм максимал ортади ва хужайра лизисга учрайди. Коллоид-осмотик лизис жараёнидаги хужайралар шишиши натижасида ҳажмга боғлиқ ХБАК каналлари ҳамда макси-анион каналлари фаоллашади. Бу иккита канал орқали цитоплазмадаги манфий зарядланган осмолитлар (хлор, баъзи аминокислоталар ва бошқалар) хужайрани тарк этади ва натижада хужайра ҳажми камаяди ҳамда унинг лизисга нисбатан чидамлилиги ортади. Албатта, электронейтраллик

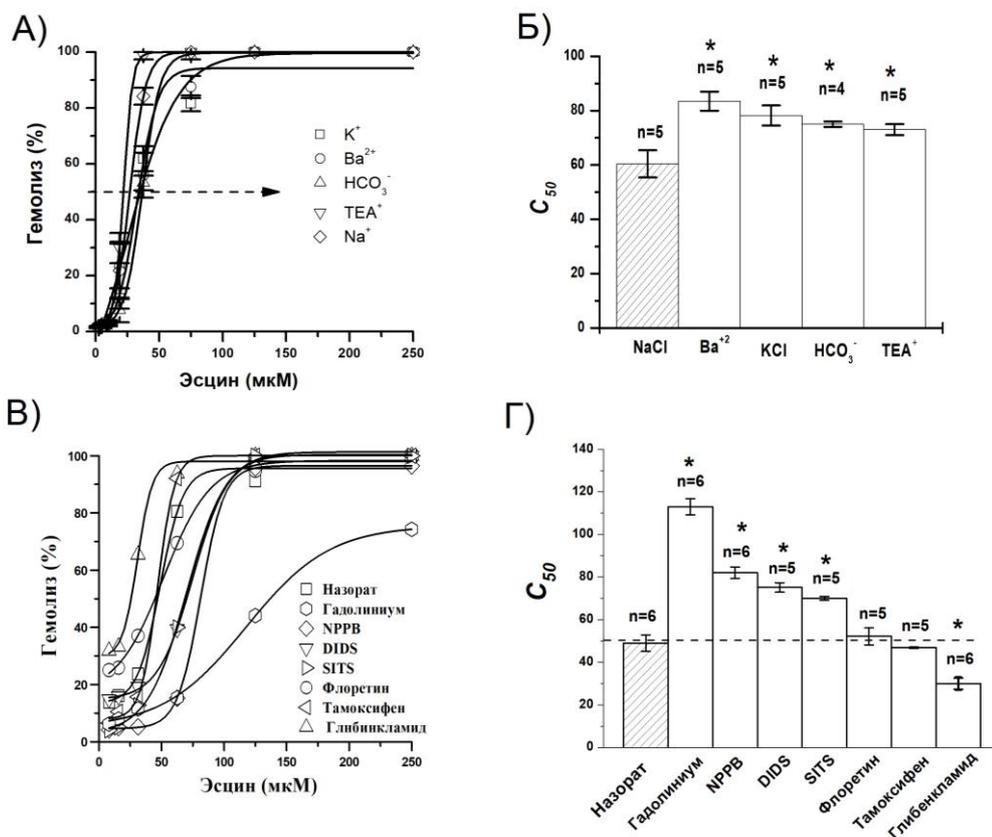
принципига асосан, хужайра ташқарисига йўналган анион транспорти эквивалент миқдордаги катионлар ҳаракатисиз содир бўлолмайди. Шу сабабдан коллоид-осмотик лизисда K^+ -каналлари фаоллиги ҳам муҳим аҳамиятга эга ва у ҳам хужайраларни ҳимоялайди. Хлор/бикарбонат алмашинуви 1:1 стехиометриясида содир бўлиши сабабли унинг хужайра осмотик балансига таъсири кучли эмас. SITS ва DIDS моддалари таъсирида эритроцитларнинг чидамлилиги ортиши (3-расм, В ва Г) ушбу тизим эритроцитларнинг коллоид-осмотик лизисга нисбатан чидамлилигига салбий таъсир этишидан далолат беради.



3-расм. Эритроцит хужайраларининг нистатинли муҳитдаги гемолизига блокатор моддаларнинг таъсири. А) ва В) ордината ўқида – стационар (37 °С, 60 мин) гемолиз миқдори % да кўрсатилган, абсцисса ўқида – нистатин концентрацияси (мкМ) ифодаланган. Б) ва Г) ордината ўқида – 50% гемолизга олиб келувчи нистатин концентрациясига (C₅₀) кўрсатилган, абсцисса ўқида – муҳитдаги турли хил блокатор моддалар; n – тажрибалар сони. Статистик аҳамиятли (P<0,05) фарқ (*) белгиси билан кўрсатилган

Эритроцит хужайраларининг эсцин таъсиридаги лизисига чидамлилигида ион каналларининг ролини аниқлаш мақсадида олиб борган тадқиқотларимизда эсцинли гемолиз жараёнида K^+ -каналлари ҳамда хлор/бикарбонат ўтказувчининг роли сезиларли бўлди (4-расм, А ва Б). Биз тадқиқотимизни эсцин гемолизига анион транспортининг ролини тадқиқ қилиш билан давом эттирдик (4-расм, В ва Г). Натижалардан кўриниб турибдики, коллоид-осмотик механизмдан кескин фарқ қилувчи эсцин гемолизига ҳажмга боғлиқ ХБАК каналлари сезиларли роль ўйнамайди. Айтиш жоизки, глибенкламид таъсирида эсциннинг (C₅₀) кўрсаткичи назоратга нисбатан 61,2% ни ташкил қилди (4-расм, В ва Г). Бу натижа лизис

жараёнида глибенкламидга сезгир бўлган бошқа системалар, хусусан АТФга боғлиқ калий каналларининг аҳамияти борлигидан далолат бериши мумкин.

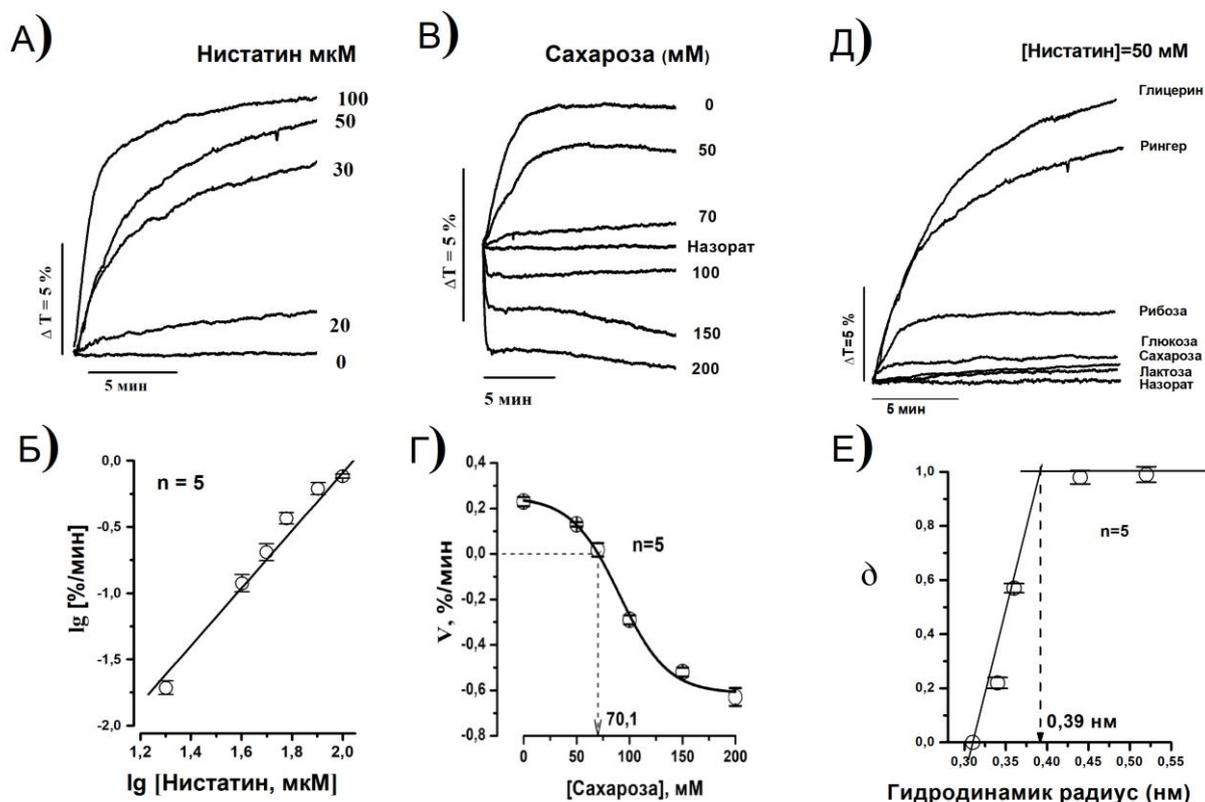


4-расм. Эритроцит хужайраларининг эсцили мухитдаги гемализига блокатор моддаларнинг таъсири. А) ва В) ордината ўқида – стационар (37 °С, 60 мин) гемализ миқдори % да кўрсатилган, абсцисса ўқида – эсцин концентрацияси (мкМ) ифодаланган. Б) ва Г) ордината ўқида – 50% гемализга олиб келувчи эсцин концентрацияси (C₅₀) кўрсатилган, абсцисса ўқида – мухитдаги турли хил блокатор моддалар; n – тажрибалар сони. Статистик аҳамиятли (P<0,05) фарқ (*) белгиси билан кўрсатилган.

Тажрибаларимиздан олинган хулоса: одам эритроцит хужайраларидаги коллоид-осмотик лизис жараёнида (нистатин мисолида) хужайралар шишади ва ҳажмга боғлиқ ХБАК каналлари ҳамда макси-анион каналлари фаоллашади. Бу иккита канал хужайраларнинг лизисга нисбатан чидамлилигини таъминлаб беради. Лекин лизис механизми коллоид-осмотик бўлмаганда (эсцин мисолида) ҳажмга боғлиқ анион транспорт тизимининг протектив роли амалга ошмайди.

Диссертациянинг «Тимоцитлар ҳажм бошқарилишига канал ҳосил қилувчи моддаларнинг таъсири» деб номланган тўртинчи бобида тимус лимфоцитлари ҳажмига нистатин ва эсцин моддаларининг нормал ва осмотик стресс шароитидаги таъсири келтирилган. Тадқиқотимизда изоосмотик шароитда тимоцит хужайралари мембранасига нистатин моддасининг таъсир эттирилганда хужайра ҳажмининг модданинг дозасига боғлиқ ҳолда ортиши кузатилди (5-расм, А). Қўш логорифмик координаталар графигида (5-расм, Б) муносабат чизиқли функцияга билан ифодаланди ва унинг қиялиги 1,6±0,2 га

тенг эканлиги аниқланди. Бу кўрсаткич тимоцит мембраналарида пора ҳосил қилиш учун нистатиннинг камида иккита молекуласи керак бўлишидан далолат беради.



5-расм. Тимоцит хужайралари мембранасида нистатин таъсирида ҳосил бўлувчи поралар катталигини аниқлаш. А), В) ва Д) хужайралар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги ўзгариши регистрациясининг оригинал ёзувлари кўрсатилган. Б) ордината ўқида – хужайра ҳажмининг бошланғич ортиш тезлиги (чизиқли фазаси) I_g (%/мин) ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – нистатин миқдори I_g (мкМ)да ифодаланган. Г) ордината ўқида – хужайра ҳажмининг бошланғич ўзгариш тезлиги (%/мин) ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – сахароза миқдори (мМ)да. Е) ордината ўқида – ноэлектролит молекулаларининг нистатин пораларидан ўтиши Ставерман коэффецентидан фойдаланган ҳолда кўрсатилган; абсцисса ўқида – ноэлектролит моддаларнинг радиуси (глицерин, рибоза, глюкоза, сахароза, мальтоза), n – тажрибалар сони.

Тажриба шароити изоосмотик бўлгани учун биз хужайрадаги шишишни куйидагича содир бўлган деб тахмин қилдик: аввал тимоцит плазматик мембранасида нистатин поралари ҳосил бўлгани сабабли хужайра ҳажмини стабиллаштирувчи қўш Доннан мувозанати бузилади, хужайра оддий Доннан системасига айланади ва шу туфайли хужайра шишиши содир бўлади. Бунда хужайра ичига йўналган сув оқимини ҳаракатлантирувчи куч – бу нистатин ҳосил қилган поралардан ўта олмайдиган цитоплазмик осмолитлар ҳосил қилган онкотик босим градиенти.

Кейинги тажрибаларимизда изотоник шароитда нистатиннинг 50 мкМ концентрацияли эритмасидан назорат сифатида фойдаланиб, унга нистатин порасидан каттароқ бўлган ноэлектролит – сахарозанинг турли концентрацияларини таъсирини кузатдик (5-расм, В). Олинган натижага кўра,

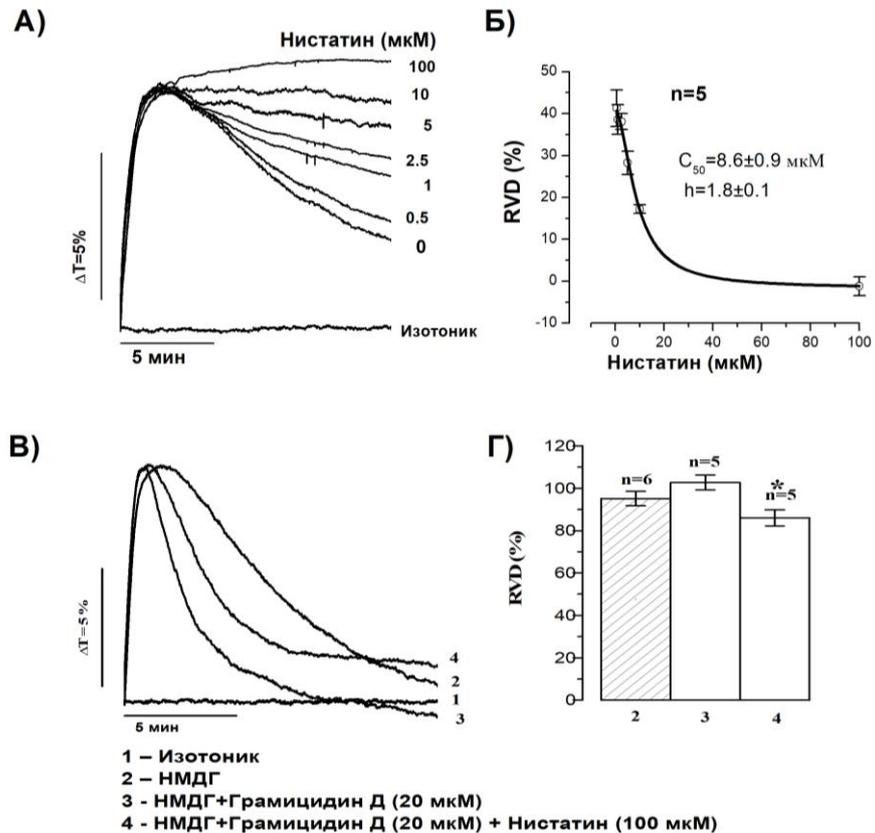
нистатин ҳосил қилган поралардан каттароқ бўлган тимоцит хужайраси цитоплазмасидаги осмолитларининг эффектив онкотик босими тахминан 70-80 мОсмоль/кг Н₂О га тенг бўлди (5-расм, Г).

Тажрибаларимизнинг кейинги босқичида биз ноэлектролит моддаларнинг катталигини ўзгартириб, тимоцит мембранасида нистатин ҳосил қилган поралар ўлчамини аниқладик. Олинган натижалар Ставерман “акс этиш” коэффиценти ёрдамида таҳлил қилинганда тимоцит плазматик мембранасида нистатин ҳосил қилган пораларнинг радиуси $r=0,39\pm 0,01$ нм га тенг эканлиги аниқланди (5-расм, Д ва Е).

Шундай қилиб, биз олган маълумотлардан фойдаланиб, плазматик мембранадаги наноскопик ион ўтказувчи пораларни турли ноэлектролитлар ёрдамида блоклар онкотик босимни мувозанатлаш, хужайра ҳажмини модификация қилиб, ҳажм ортиши ёки кичрайишини бошқариш орқали нанабиология ва наномедицинада фойдаланиш учун муҳим воситага эришиш мумкин.

Кейинги тажрибаларимизда нистатин препаратининг гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига блокловчи таъсирини аниқладик (6-расм, А). Натижалар Хилл тенгламаси асосида аппроксимация қилинганда, ярим-максимал эффект (C_{50}) $8,6\pm 0,9$ мкМ ва Хилл коэффиценти $1,8\pm 0,4$ га тенг эканлиги аниқланди (6-расм, Б).

Нистатиннинг хужайра ҳажм бошқарилиш системасига таъсири ушбу тизимга кирувчи кальций, калий ёки хлор каналларига таъсири билан боғлиқ бўлиши мумкин. Тажрибаларимизда гипотоник эритма (назорат) таркибидаги натрий ионларини НМДГ ионларига алмаштирдик ва мембрананинг катион ўтказувчанлигини ошириш мақсадида муҳитга Грамицидин Д ионофорини қўшдик. Бу шароитда нистатиннинг 100 мкМ миқдори таъсирида тимоцитлар ўз ҳажмини самарали тиклади (6-расм, В ва Г). Айтиш жоизки, агар нистатиннинг таъсири ҳажмга боғлиқ хлор каналининг блоклаши орқали амалга оширилганда, биз бу шароитдаги ҳажм тикланишини кузатмаслигимиз керак эди. Демак, олинган натижалар нистатиннинг ҳажмга боғлиқ хлор каналига таъсири йўқлигидан далолат беради.

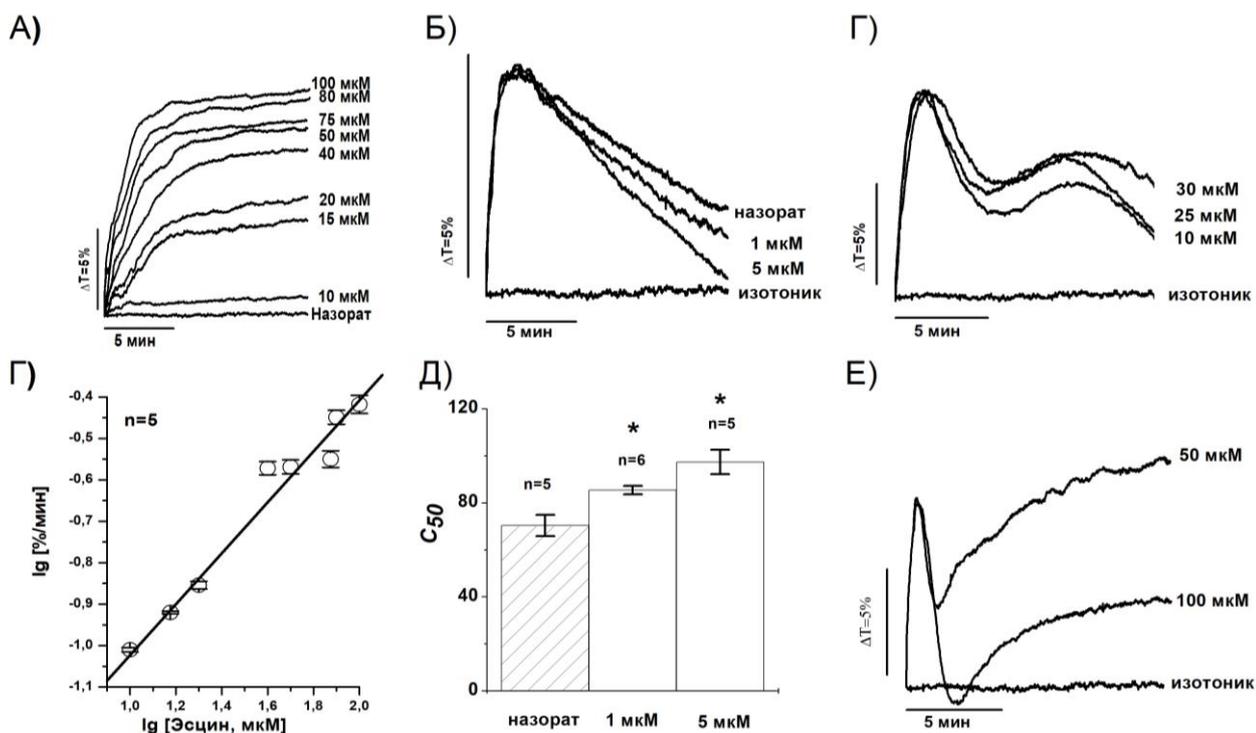


6-расм. Гипоосмотик стресс шароитда тимоцитлар ҳажм бошқарилишига нистатиннинг таъсири. А) ва В) ҳужайралар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги ўзгариши регистрациясининг оригинал ёзуви кўрсатилган. Б) ордината ўқида – ҳужайра ҳажмининг тикланиши максимал шишишга нисбатан бошқарилиши % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – нистатин миқдори мкМ да ифодаланган. Г) гипоосмотик муҳитда назоратда (қора устун) ва берилган 100 мкМ концентрацияда нистатин иштирокида ҳужайра шишгандан кейин ҳажм тикланиш фоизи (*RVD*) кўрсатилган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан статистик аҳамиятли ($P<0,05$) фарқ (*) белгиси билан ифодаланган; *n* – тажрибалар сони.

Тимоцит ҳужайралари суспензиясига изоосмотик шароитда эсцин моддасини таъсир эттирганимизда ҳужайра ҳажмининг ортиши кузатилди (7-расм, А). Кўш логорифмик координаталарда муносабат чизиқли функция билан ифодаланди ва унинг қиялиги $0,75\pm 0,06$ тенг эканлигини аниқланди (7-расм, Г). Бу кўрсаткич тимоцит мембраналарида пора ҳосил қилиш учун эсциннинг битта молекуласи етарли бўлишидан далолат беради.

Гипоосмотик стресс шароитда тимоцит ҳужайралари ҳажм бошқарилишига (назоратда $70,3\pm 4,5\%$ ($n=5$)) эсцин моддасини таъсир эттирганимизда 1 мкМ концентрацияда ҳужайра ҳажми тикланиши $85,3\pm 1,8\%$ ($n=6$) ни ташкил этди, модда миқдори 5 мкМ га етганда ҳужайра ҳажмининг дастлабки ҳолатига қайтиши янада ошди ва $97,3\pm 5,2\%$ ($n=5$) га тенг бўлди (7-расм, Б ва Д). Олинган натижани биз эсцин моддаси мембранада поралар ҳосил қилиб, шу поралар орқали ҳужайра ички осмолитлари чиқиши ҳисобига ҳужайра ҳажмини дастлабки ҳолатига максимал даражада қайтишига шароит яратган деб изоҳлаймиз. Аммо эсцин концентрацияси 10-30 мкМ бўлганда

хужайра ҳажм бошқарилиш системаси уч фазали (7-расм, В), эсциннинг концентрацияси 50 ва 100 мкМгача оширилганда эса хужайра ҳажм ўзгариши икки фазали кўринишга эга бўлди (7-расм, Е).

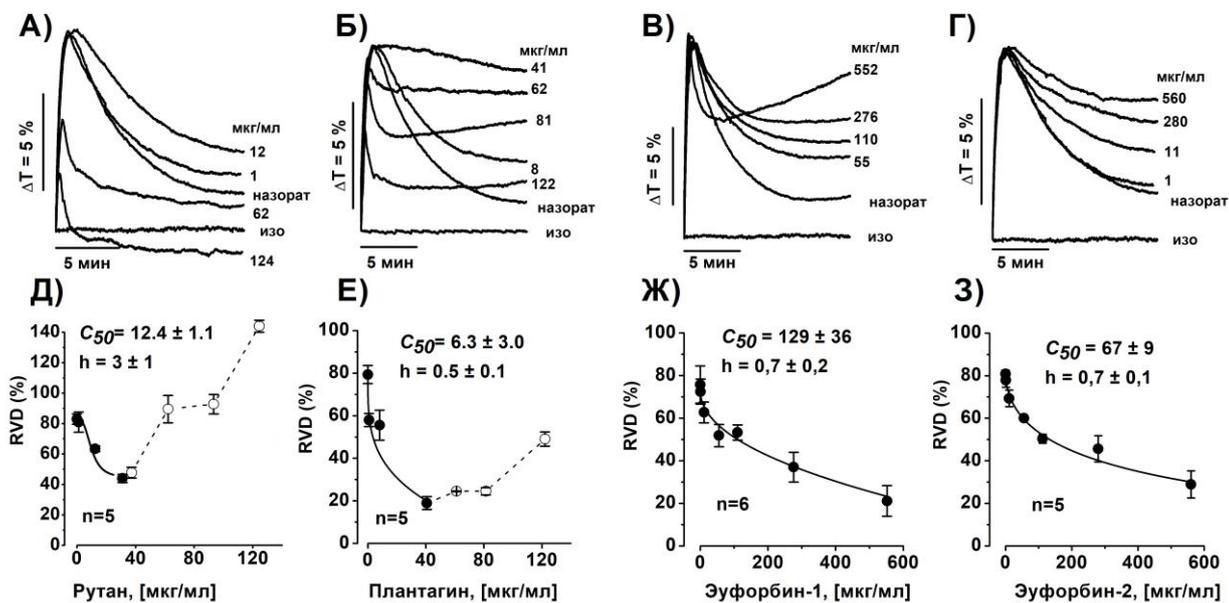


7-расм. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитларда тимоцитлар ҳажм бошқарилишига эсциннинг турли концентрациядаги таъсири. А), Б), В) ва Е) хужайралар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги ўзгариши регистрациясининг оригинал ёзуви кўрсатилган. Д) гипоосмотик муҳитда назоратда (кора устун) ва турли концентрациядаги эсцин таъсирида хужайра шишгандан кейин ҳажм тикланиш фоизи (*RVD*) кўрсатилган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан статистик аҳамиятли ($P < 0,05$) фарқ (*) белгиси билан ифодаланган. Г) ордината ўқида – хужайра ҳажмининг бошланғич ортиш тезлиги (чизикли фазаси) Ig (%/мин) ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – эсциннинг миқдори Ig (мкМ) да ифодаланган; n – тажрибалар сони.

Биз эсцин препаратининг кичик концентрацияда хужайра ҳажм бошқарилиш системасини фаоллаштириши иммуностимуляторлигидан далолат берса, катта концентрациясида хужайра ҳажм бошқарилишини дисрегуляция қилиши, иммун системасига салбий таъсир этади, деган хулосага келдик.

Диссертациянинг «Гипоосмотик стресс шароитда тимоцитларнинг регулятор ҳажм кичрайишига полифенолларнинг таъсири» деб номланган бешинчи бобида биз гипоосмотик стресс шароитда тимоцитларнинг регулятор ҳажм кичрайишига ўсимликлардан ажратиб олинган полифенолларнинг таъсири ва шу шароитда фаол полифенол препаратларнинг тимоцит хужайралар ҳажм кичрайишига концентрацияга боғлиқ таъсирини тадқиқ қилдик. Гипоосмотик стресс шароитда 10 та полифенол препаратларнинг (ЎзР ФА Биоорганик кимё институтидан проф. С.М. Мавлянов томонидан тақдим этилган) тимоцит хужайралари ҳажм кичрайишига таъсирини текширганимизда, танинлар синфига мансуб тўртта

фаол препарат (рутан, плантагин эуфорбин-1 ва эуфорбин-2) мавжудлиги аниқланди. Шу фаол полифенол препаратларнинг тимоцит ҳужайралар ҳажм кичрайишига концентрацияга боғлиқ таъсири аниқланди (8-расм).



8-расм. Тимоцит ҳужайра ҳажм кичрайишига фаол танинларнинг турли концентрацияларининг таъсири. А), Б), В) ва Г) ҳужайралар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги ўзгариши регистрациясининг оригинал ёзуви кўрсатилган; Д), Е), Ж) ва З) ордината ўқида – ҳужайра ҳажмининг бошқарилиши % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – муҳитда моддаларнинг концентрацияси мкг/мл да ифодаланган; n – тажрибалар сони. Яхлит чизиқлар – Хилл тенгламасига кўрсатилган параметрлар билан аппроксимация. Пунктир билан рутан ва плантагин препаратларининг иккинчи (носпецифик) таъсир фазаси кўрсатилган.

Ҳажм бошқарилиш тизимига таъсири бўйича ўсимликлардан ажратилган таннин препаратлари таъсир эффеќтига кўра қуйидаги қаторни ташкил этди: плантагин>рутан>эуфорбин-2> эуфорбин-1. Келажакда ушбу моддалар асосида янги иммуномодулятор дори воситалар таклиф этилиши мумкин.

ХУЛОСАЛАР

1. Ҳажмга боғлиқ анион каналининг одам эритроцитларида мавжудлиги ва унинг функцияси осмотик стрессга нисбатан ҳимояловчи эканлиги аниқланди. Бу жараёнда K^+ -каналлари ва хлор/бикарбонат алмашинувининг аҳамияти катта эмас деб топилди.

2. Канал ҳосил қилувчи моддалар нистатин ва эсцин таъсирида содир бўлувчи гемолиз бир-биридан кескин фарқ қилиб, нистатинли гемолиз батамом коллоид-осмотик механизм билан, эсцин таъсирида содир бўлган лизис эса фақат қисман коллоид-осмотик бўлиб, асосан кимёвий гемолиз механизмида амалга ошиши исботланди.

3. Эритроцит хужайраларида коллоид-осмотик лизисга нисбатан чидамлиликини K^+ -каналлари, ҳажмга боғлиқ анион канали ва макси-анион канали таъминлаб беради. Лизис механизми коллоид-осмотик бўлмаганда ҳажмга боғлиқ анион транспортининг протектив роли амалга ошмайди.

4. Нистатин эритроцит ва тимоцит мембраналарида радиуси 0,39-0,42 нм бўлган поралар ҳосил қилиши осмопротекция усули ёрдамида аниқланди. Нистатин поралари хужайрани кўш Доннан системадан оддий Доннан системасига ўтказиши ва гипоосмотик шароитдаги ҳажм бошқарилиш механизмини фаолсизлаши аниқланди.

5. Эсцин эритроцит мембранасида радиуси 2,56 нм бўлган катта поралар ҳосил қилиши аниқланди. Эсцин поралари ҳосил бўлиши тимоцитларни изоосмотик шароитда шишишига, гипоосмотик стресс шароитида эса кўп фазали ҳажм ўзгаришига олиб келади.

6. Биринчи бор таннинлар синфига мансуб полифенолларнинг тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига ингибирловчи таъсири аниқланди ва улар таъсир эффектига кўра қуйидаги қаторни ташкил этди: плантагин > рутан > эуфорбин-2 > эуфорбин-1.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSC03/30.12.2019.В.01.13 ПО
ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И
БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ
УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ

ХАМИДОВА ОЗОДА ЖОХОНГИРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ТРАНСПОРТНЫХ ПРОЦЕССОВ В
УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ**

03.00.02 – Биофизика и радиобиология

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

Тошкент – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована Высшей аттестационной комиссией при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером В2017.2.PhD/В65.

Диссертация выполнена в Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском и английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета www.ibb-nuu.uz и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель:	Сабиров Равшан Заирович доктор биологических наук, академик
Официальные оппоненты:	Хушматов Шунқор Садуллаевич доктор биологических наук Курганов Эркин Шухратович PhD, по биологическим наукам
Ведущая организация:	Каршинский государственный университет

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 г. в ____ часов на заседании Научного Совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 по присуждению ученых степеней при Институте биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана. (Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел. (99871) 262-68-96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института Биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана (зарегистрированной за № ____). Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел: (99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: « ____ » _____ 2020 года.
(реестр протокола рассылки № « ____ » от _____ 2020 года).

Саатов Талъат Саатович
Заместитель председателя Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., академик

Асраров Музаффар Исламович
Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

Ахмеджанов Искандар Гулямович
Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время в мире наблюдается рост среди населения таких патологий, как анемия, бактериальные и вирусные инфекции с сопутствующим воспалением, а также различного рода интоксикации, что приводит к резкому и часто необратимому нарушению водного баланса клеток и их объема. Экзогенные порообразующие вещества (антибиотики, токсины и др.) воздействуют на клеточный объем и, следовательно, установление механизмов их влияния на клетки в условиях осмотического и коллоидно-осмотического стресса имеет большое научное и практическое значение в нанобиологии и наномедицине для манипулирования объемом клеток, повышения устойчивости клеток к стрессовым ситуациям, при поиске новых блокаторов объем-зависимых анионных каналов и разработке новых противоанемических препаратов.

В настоящее время исследования по изучению роли транспортных процессов в устойчивости клеток к осмотическому стрессу ведутся ускоренными темпами в ведущих научных центрах мира и это является одной из актуальных задач современной клеточной физиологии и биофизики. В клеточных процессах, происходящих в ответ на осмотический стресс, объем-зависимые анионные и макси-анионные каналы играют ключевую роль. Следовательно, эти два типа каналов могут помочь в обеспечении устойчивости клеток к лизису. Активация системы регуляции объема клеток при гипоосмотическом стрессе или ее дисрегуляция открывает путь к приоритетным направлениям при создании иммуностимуляторов или иммунодепрессантов для медицины и фармакологии.

В настоящее время в нашей стране уделяется большое внимание внедрению в практику научных достижений и инновационных разработок. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан особо подчеркивается «...стимулирование научно-исследовательской и инновационной деятельности, создание эффективных механизмов внедрения научных и инновационных достижений в практику»². Исходя из этих задач, большое научное и практическое значение приобретает определение механизма действия природных биологически активных соединений, выделенных из местных растений, в системе регуляции клеточного объема и создание на их основе новых фармакологических препаратов.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года № УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлении Президента Республики Узбекистан от 14 февраля 2018 г № ПП-3532 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли» и Постановлении Президента Республики Узбекистан от 6 мая 2019 г № ПП-

² Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан». № УП-4947.

4310 «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

Степень изученности проблемы. Учеными из ведущих мировых исследовательских центров на клетках животных проведены исследования процесса регуляция объема клеток в условиях гипоосмотического стресса и определена роль хлорных каналов в этом процессе. Исследования в этой области успешно проводятся такими зарубежными учеными, как: Pedersen S.F. (2016), Okada Y. (2019), Nilius B. (2003), Hoffmann E.K. (2009), Pasantes-Morales H. (2016) и другие.

В странах СНГ, Самедовой А.А. (2010), Чеботаревой Н.А. (2007) и другими учеными были проведены исследования по изучению влияния побочных эффектов антибиотиков при ослаблении иммунной системы, гемолитических эффектов некоторых лекарственных средств, по их механизму действия при различных заболеваниях, а также эффектов краудинга при расположения макромолекул в клетке при создании новых лекарственных препаратов.

Учеными нашей страны показано, что в эритроцитах постоянство объема клеток обеспечивается асимметрией ионов в клетке и селективной проницаемостью мембраны (Красильников О.В. 1991), сохранение целостности клеток связано с поддержанием постоянного объема, и особенную роль в этом играют анионные каналы (Сабиров Р.З.), транспортная система Na/K/2Cl, чувствительная к буметаниду, обеспечивает устойчивость к коллоидно-осмотическому лизису эритроцитов человека под действием амфотерицина (Бессонова С.В. 2004). Установлена важная роль анионных каналов в регуляции объема клеток в ответ на осмотический стресс, роль Ca²⁺, K⁺ и Cl⁻ каналлв и K⁺/Cl⁻ котранспорта в регуляции объема тимоцитов (Курбанназарова Р.Ш. 2008).

Связь диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментальных проектов Института биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана по теме: ФА-А11-Т080 «Молекулярная физиология и биофизика объём-активируемого анионного транспорта» (2012-2016), ПЗ-2017-0920-49 «Разработка новых перспективных субстанций на основе растительных экстрактов и их компонентов из местного сырья – модуляторов регуляции клеточного объема и объём-зависимого мембранного транспорта» (2018-2020) и ФА-Ф5-014 «Исследование биофизического фенотипа объём-зависимых

анионных каналов и их функций в механизме регуляции клеточного объема» (2017-2020).

Целью исследования является определение роли транспортных процессов в устойчивости клеток к осмотическому стрессу и коллоидно-осмотическому лизису с помощью блокаторов и порообразующих веществ.

Задачи исследования:

определить биофизические характеристики лизиса эритроцитов человека при осмотическом стрессе и роль в нем процессов ионного транспорта;

определить биофизические характеристики лизиса эритроцитов человека под действием каналообразующих веществ нистатина и эсцина и роль в нем процессов ионного транспорта;

исследовать влияние нистатина на нормальный изоосмотический объем лимфоцитов тимуса и на систему регуляции объема при гипоосмотическом стрессе;

исследовать влияние эсцина на нормальный изоосмотический объем лимфоцитов тимуса и на систему регуляции объема при гипоосмотическом стрессе;

установить, действуют ли полифенольные соединения, выделенные из растений, на процесс регуляции объема клеток.

Объектом исследования являются красные кровяные клетки человека, тимоциты, выделенные из тимуса молодых крыс-самцов, нистатин, эсцин и некоторые растительные полифенолы.

Предметом исследования является исследование роли ионного транспорта в устойчивости эритроцитов к осмотическому и коллоидно-осмотическому стрессу и действия порообразующих веществ на процесс регуляции объема тимоцитов.

Методы исследования. В экспериментах использовались современные биофизические и биохимические методы. Тимоциты крыс и эритроциты человека выделялись с помощью стандартных методов. Уровень гемолиза определялся по выходу гемоглобина из эритроцитов. Изменение объема тимоцитов определялось методом регистрации светопропускания клеточной суспензии. Математическая и статистическая обработка данных была проведена с помощью компьютерной программы Origin версии 5.0, 7.5 и 8.6 (OriginLab Corporation, США).

Научная новизна исследования заключается в следующем:

установлено наличие объем-зависимых анионных каналов в эритроцитах и показано, что эти каналы выполняют защитную функцию при осмотическом и коллоидно-осмотическом лизисе;

установлено, что гемолиз, вызванный нистатином и эсцином, образующими наноскопические ион-проводящие поры в плазматической мембране, принципиально отличается по своему механизму, и только при коллоидно-осмотическом лизисе, вызванном нистатином, проявляется защитная функция объем-зависимого анионного транспорта;

методом осмопротекции доказано, что нистатин образует в клетках эритроцитов и тимоцитов наноскопические поры с радиусом 0,39-0,42 нм, в результате чего нарушается равновесие двойной Доннановской системы, приводящее к увеличению объема клетки и нарушению целостности мембраны; установлено, что эсцин формирует очень большие поры (с радиусом ~ 2,6 нм), в результате чего происходит лизис эритроцитов и многофазные осцилляции объема тимоцитов;

установлено, что растительные полифенолы эффективно подавляют процесс регуляции объема в тимоцитах.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

защитная роль объем-зависимого анионного транспорта в эритроцитах дает возможность, влияя на эту систему, защитить красные кровяные клетки при анемии и других патологиях крови;

результаты, полученные на лимфоцитах, позволяют осуществлять наноманипуляции в нанобиологии, то есть создают возможность управлять объемом на уровне одиночной клетки;

обосновано, что полифенольные соединения являются теоретической и практической основой при создании новых эффективных и малотоксичных иммуномодуляторов.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что результаты получены с применением современных методов биофизики и биохимии, данные проанализированы с применением современных компьютерных программ. Подтверждением достоверности полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение полученных результатов на республиканских и международных конференциях, и публикация результатов исследования в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования выражается в том, что они являются важной теоретической основой для предотвращения разрушения эритроцитов, что является одной из причин анемии; повышения устойчивости эритроцитов к стрессовым ситуациям; поиска противоанемических препаратов. Механизмы изменения объема клеток под действием самособирающихся пор, формируемых нистатином, имеют теоретическое значение для наноманипуляций в нанобиологии.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что они дают возможность практического использования активных полифенольных соединений в профилактике заболеваний, связанных с патологией ионных каналов клеток в качестве перспективных и эффективных иммуномодулирующих соединений нового поколения.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов по биофизической характеристике процессов лизиса клеток и регуляции клеточного объема тимоцитов:

результаты по исследованию устойчивости клеток крови к осмотическому стрессу, лизису под действием каналообразующих веществ и регуляции объема лимфоцитов были использованы в прикладном проекте ФА-А11-ТО31 «Создание нового эффективного средства от сахарного диабета на основе экдистерона и его полисинтетических производных» (2015-2017) при определении механизма действия индивидуального экдистерона и его полисинтетических производных на устойчивость клеток крови к осмотическому стрессу и регуляцию клеточного объема (справка Академии Наук Республики Узбекистан № 4/1255-1853 от 4 июля 2019 года). Применение научных результатов позволило охарактеризовать механизмы действия экдистерона и его полисинтетических производных на устойчивость к осмотическому стрессу клеток крови и на регуляцию клеточного объема;

результаты по исследованию биофизической характеристики лизиса клеток крови и лимфоцитов тимуса при осмотическом стрессе и под действием каналообразующих веществ, роли ион-транспортирующих систем в устойчивости к осмотическому и коллоидно-осмотическому лизису были использованы в прикладном проекте ПЗ-20171024153 «Создание тест-системы на культуре клеток рака тонкой кишки для скрининга биологически активных веществ» (2018–2019) при установлении понижающего эффекта действия экстракта семян растений *Cuscuta evropea* на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе и прояснении механизма действия на систему регуляции объема клеток и того, что экстракт не является гемолитиком (справка Академия Наук Республики Узбекистан № 4/1255-2659 от 7 октября 2019 года). Применение научных результатов дало возможность объяснить действие экстракта семян *Cuscuta evropea* на клеточную мембрану, а также механизм его влияния на процесс регуляции объема клеток.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 5 международных и 10 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 22 печатные работы, из них в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации 7 научных статей, в том числе 6 в республиканских и 1 в зарубежном журнале.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 118 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики, характеризуются цель и задачи исследования, объект и предмет, излагаются степень изученности проблемы, научная новизна и практические результаты

исследования, раскрываются достоверность полученных результатов, научная и практическая значимость, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Общие особенности и механизмы регуляции объема в эритроцитах и тимоцитах»** проведен анализ мембранных транспортных систем, участвующих в процессах регуляции объема клеток, механизмы регуляции объема в тимоцитах и эритроцитах, молекулярная структура анионных каналов, нистатина и эсцина, полифенолов, информация об их свойствах.

Во второй главе диссертации **«Методы изучения объем-зависимых свойств клеток в нормальных условиях и при осмотическом стрессе»** дано описание веществ и растворов, использованных в исследовании, подробно описаны стандартные методы выделения эритроцитов человека из крови здоровых добровольцев, приготовление суспензии эритроцитов и эксперименты по гемолизу, подробно описаны методы выделения лимфоцитов из тимуса молодых белых крыс и регистрации объема клеток по величине светопропускания суспензии, а также методы математической обработки и статистического анализа полученных результатов.

В третьей главе **«Механизмы лизиса эритроцитов под действием осмотического стресса и мембрано-активных веществ»** приведены результаты по биофизической характеристике процесса лизиса эритроцитов при осмотическом стрессе и под действием каналобразующих веществ нистатина и эсцина. Осмотическое давление (Π_{50}), приводящее к 50% гемолизу, составило в контроле $107,3 \pm 0,2$ мОсм/кг H_2O ($n=5$), а максимальный уровень гемолиза мог быть достигнут примерно через 30 минут. Для оценки роли калиевых каналов в устойчивости клеток к осмотическому стрессу, мы сначала заменили ионы Na^+ во внеклеточной среде на K^+ , но это не привело к заметному изменению уровня гемолиза. Внесение во внеклеточную среду блокаторов K^+ -каналов – катионов Ba^{2+} (5 мМ) и ТЭА⁺ (5 мМ) также было безрезультативным, что свидетельствует о том, что роль K^+ -каналов в этом процессе незначительна (рис. 1, А и Б). Отсутствие эффекта замены Cl^- на анион HCO_3^- свидетельствует о том, что крайне интенсивный эритроцитарный процесс хлор/бикарбонатного обмена также никак не связан с осмотической резистентностью красных кровяных клеток. В тоже время, блокаторы объем-зависимого анионного канала, такие как глибенкламид, тамоксифен и флоретин (но не гадолиний – блокатор макси-анионного канала), значительно ослабляли осмотическую резистентность эритроцитов (рост Π_{50} , рис. 1, В и Г), что свидетельствует о том, что этот канал присутствует в эритроцитах и выполняет защитную роль при осмотическом стрессе.

Для биофизической характеристики процесса лизиса эритроцитов под действием каналобразующих веществ нистатина и эсцина, мы сначала изучили временную зависимость этого процесса (рис. 2, А и В).

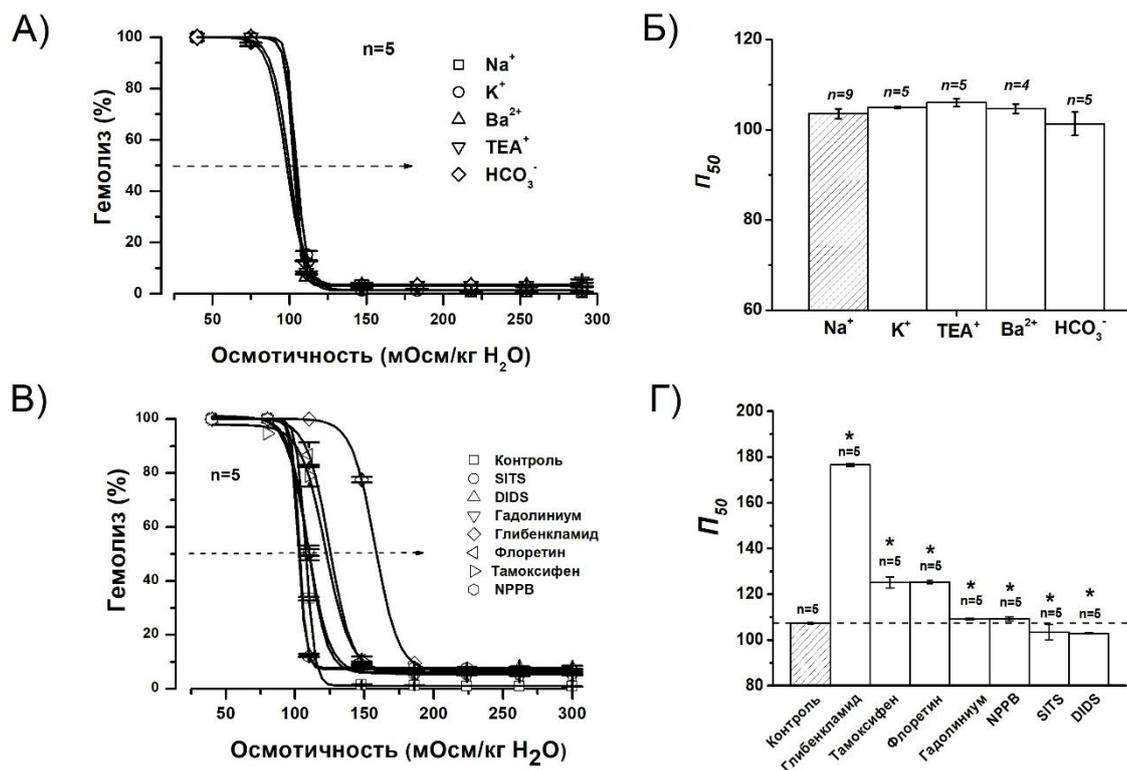


Рисунок 1. Определение роли транспорта ионов в осмотической резистентности эритроцитов с использованием блокаторов. А) и В) зависимость уровня гемолиза от осмотичности среды; Б) и Г) на оси ординат – осмотическое давление, приводящее к 50% гемолизу (P_{50}), на оси абсцисс – условия эксперимента (подробности в тексте). n – число экспериментов. Статистически значимое различие ($P < 0,05$) обозначено знаком (*).

Результаты показали, что стационарный гемолиз может достигаться в течение 40 минут. Для того, чтобы определить механизм этого процесса, мы использовали метод осмопротекции. В концентрации веществ, вызывающих 100% гемолиз (нистатин 200 мкМ и эсцин 50 мкМ) процесс полностью блокировался в присутствии неэлектролитов только в случае нистатина (рис. 2, Б и Г), и радиус нистатиновой поры был оценен равным $r = 0,42 \pm 0,01$ нм (n=5). В отличие от нистатина, эсцин-индуцированный гемолиз блокировался лишь частично, а эсциновая пора оказалась значительно большего размера с $r = 2,56 \pm 0,09$ нм (n=5), что близко к размеру гемоглобина. Эти результаты показывают, что гемолиз под влиянием нистатина и эсцина сильно отличается по своему механизму: нистатиновый гемолиз происходит полностью по коллоидно-осмотическому механизму, в то время как лизис под действием эсцина лишь частично протекает по коллоидно-осмотическому механизму, а основная часть – по механизму химического гемолиза (разрушение мембраны поверхностно-активным сапонином).

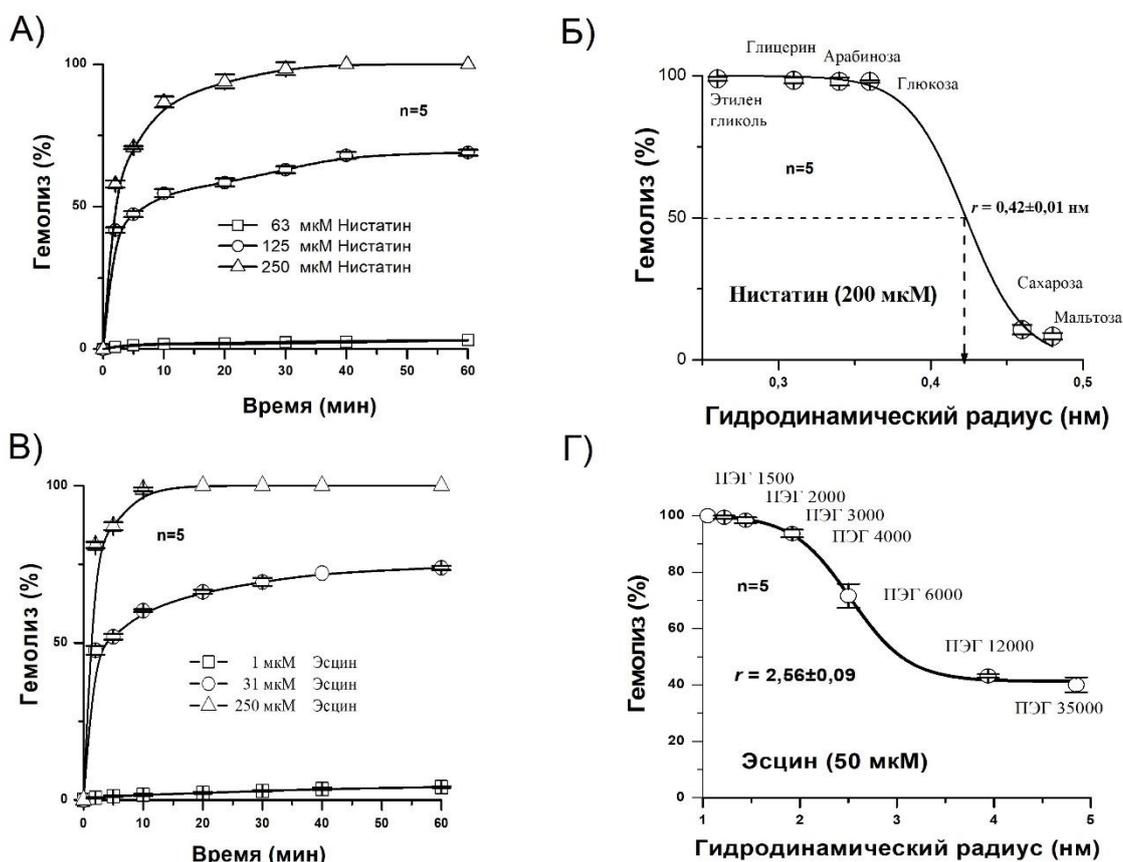


Рисунок 2. Определение временной зависимости и механизма процесса лизиса эритроцитов под действием каналообразующих веществ. По оси ординат – степень гемолиза, выраженная в %, по оси абсцисс – время (минуты) или гидродинамический радиус (нм); n - количество экспериментов.

В отличие от осморезистентности, K^+ -каналы играют важную роль в устойчивости эритроцитов к коллоидно-осмотическому лизису, о чем свидетельствует значительное изменение уровня гемолиза при замене ионов Na^+ на K^+ и под действием блокатора калиевых каналов TEA⁺ (рис. 3, А и Б). О важной роли систем анионного транспорта в коллоидно-осмотическом лизисе свидетельствует значимый эффект ионов гадолиния (блокатора макс-анионных каналов (МАК)), а также флоретина, NPPB, глибенкламида и тамоксифена (блокаторы объем-зависимого анионного канала (ОЗАК)) (рис. 3, В и Г). На основании полученных данных мы приходим к выводу, что нистатин, образуя самособирающиеся ионопроводящие поры, нарушает коллоидно-осмотический баланс в клетке. Увеличение проницаемости плазматической мембраны для ионов Na^+ приводит к тому, что клетка переходит от двойной системы Доннана к простой, объем увеличивается до максимума и клетка лизирует. В результате набухания клеток при коллоидно-осмотическом лизисе активируются ОЗАК и МАК. Через эти два канала отрицательно заряженные осмолиты цитоплазмы (хлор, некоторые аминокислоты и др.) покидают клетку, что приводит к уменьшению размера клетки и увеличению ее устойчивости к лизису. Разумеется, согласно принципу электронейтральности, транспорт анионов не может происходить без параллельного движения эквивалентного количества катионов. По этой

причине активность K^+ -каналов также важна в коллоидно-осмотическом лизисе, и также защищает клетку. Поскольку обмен хлора на бикарбонат происходит по стехиометрии 1:1, его влияние на осмотический баланс клеток не должно быть велико. Повышенная резистентность эритроцитов под влиянием блокаторов этого обменника – SITS и DIDS (рис. 3, В и Г), свидетельствует о том, что эта система оказывает негативное влияние на устойчивость эритроцитов к коллоидно-осмотическому лизису.

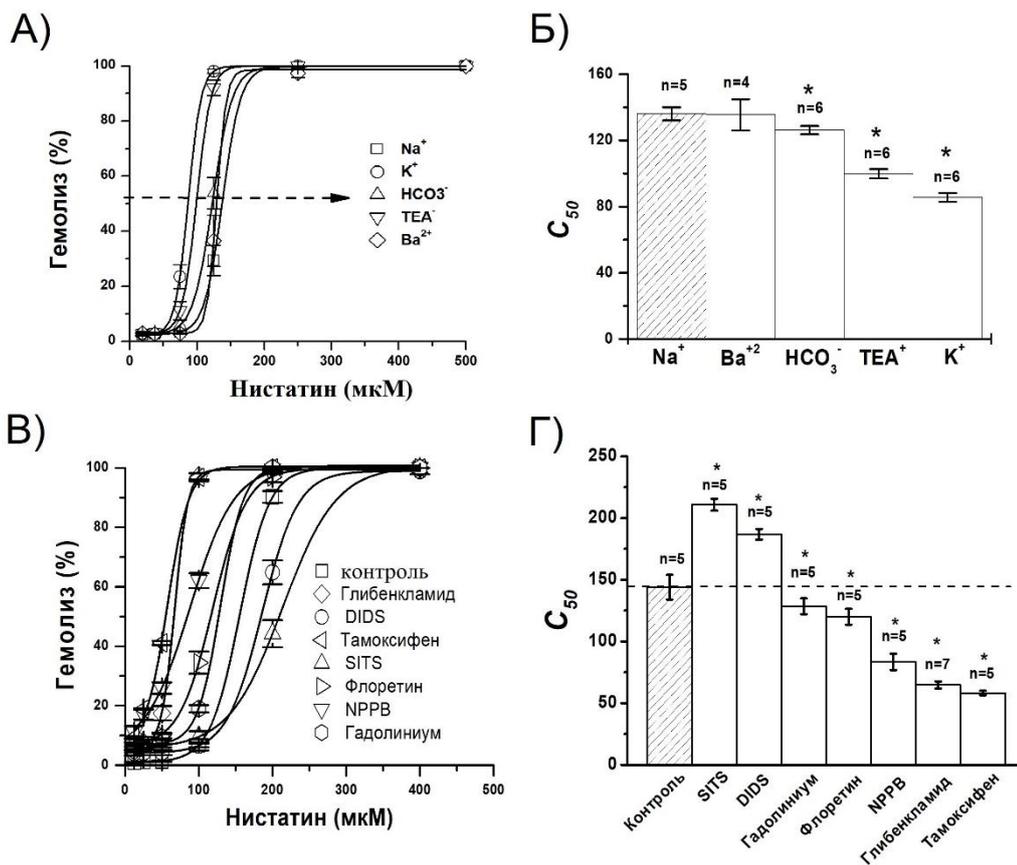


Рисунок 3. Влияние различных блокаторов на гемолиз в присутствии нистатина.

А) и В) – по оси ординат – стационарная величина гемолиза ($37^{\circ}C$, 60 мин), выраженная в %; по оси абсцисс – концентрация нистатина (мкМ). Б) и Г) – по оси ординат – концентрация нистатина (C_{50}), которая приводит к 50% гемолизу, по оси абсцисс – условия эксперимента (замена ионов, присутствие различных блокаторов). Статистически значимое различие ($P < 0,05$) обозначено знаком (*), n – количество экспериментов.

В случае эсцинового гемолиза, роль K^+ -каналов, а также хлор/бикарбонатного обменника была небольшой, но статистически значимой (рис. 4, А и Б). Результаты изучения роли транспорта анионов (рис. 4, В и Г) показывают, что каналы ОЗАК не играют защитной роли в эсциновом гемоллизе, который по своему механизму резко отличается от коллоидно-осмотического. Следует отметить, что уровень C_{50} под влиянием глибенкламида составил 61,2% по сравнению с контролем (рис. 4, В и Г). Этот результат может указывать на важность других систем, чувствительных к глибенкламиду, в частности, АТФ-зависимых калиевых каналов.

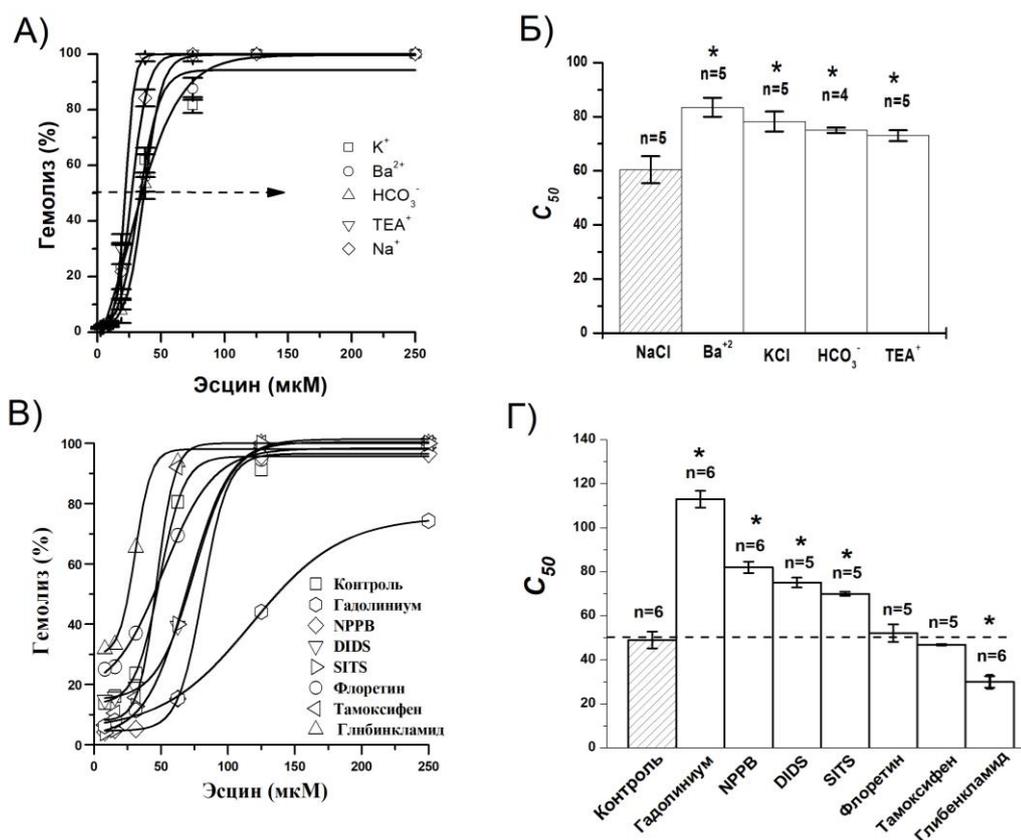


Рисунок 4. Влияние различных блокаторов на гемолиз в присутствии эстина. А) и В) – по оси ординат – стационарная величина гемолиза (37°C, 60 мин), выраженная в %; по оси абсцисс – концентрация нистатина (мкМ). Б) и Г) – по оси ординат – концентрация нистатина (C₅₀), которая приводит к 50% гемолизу, по оси абсцисс – условия эксперимента (замена ионов, присутствие различных блокаторов). Статистически значимое различие (P<0,05) обозначено знаком (*), n - количество экспериментов.

Основной вывод из наших экспериментов заключается в том, что в процессе коллоидно-осмотического лизиса в эритроцитах человека (на примере нистатина) клетки набухают, что приводит к активации ОЗАК и МАК, и эти два канала обеспечивают устойчивость клеток к лизису. Однако, когда механизм лизиса не является коллоидно-осмотическим (на примере эцина), протективная роль объем-зависимой системы транспорта анионов не реализуется.

В четвертой главе диссертации «Влияние каналообразующих веществ на регуляцию объема тимоцитов» описывается влияние каналоформеров нистатина и эцина на объем лимфоцитов тимуса в норме и при осмотическом стрессе. В наших экспериментах, проведенных в изоосмотических условиях, в присутствии нистатина мы наблюдали дозозависимое увеличение клеточного объема (рис. 5, А). На графике в двойных логарифмических координатах (рис. 5, Б) эта связь была линейной с наклоном, равным 1,6±0,2. Эта величина указывает на то, что для образования нистатиновой поры в мембранах тимоцитов необходимы как минимум две молекулы антибиотика. Поскольку экспериментальные условия были изоосмотическими, мы предположили, что

набухание клеток происходит следующим образом: образование нистатиновых пор в плазматической мембране тимоцитов нарушает равновесие двойной Доннановской системы, которая стабилизирует объем, и при переходе в простую доннановскую систему происходит набухание клеток. При этом, градиент онкотического давления, который образуется вследствие наличия в цитоплазме непроникающих через нистатиновую пору осмолитов, является той движущей силой, которая направляет поток воды внутрь клетки. Для оценки величины этого градиента, мы использовали неэлектролит сахарозу, размер которой больше, чем размер нистатиновой поры (рис. 5, В). Результаты показали, что эффективное онкотическое давление осмолитов в цитоплазме клетки тимоцита составило приблизительно 70-80 мОсм/кг H_2O , так как именно при таком давлении снаружи клетки наблюдалась полная остановка набухания (рис. 5, Г). На следующем этапе наших экспериментов мы определили размер поры, образованной нистатином в мембране тимоцита, варьируя размером неэлектролитов. Когда результаты были проанализированы с использованием коэффициента «отражения» Ставермана, было обнаружено, что радиус пор, образуемых нистатином в плазматической мембране тимоцита, составляет $r=0,39\pm 0,01$ нм (рис. 5, Д и Е).

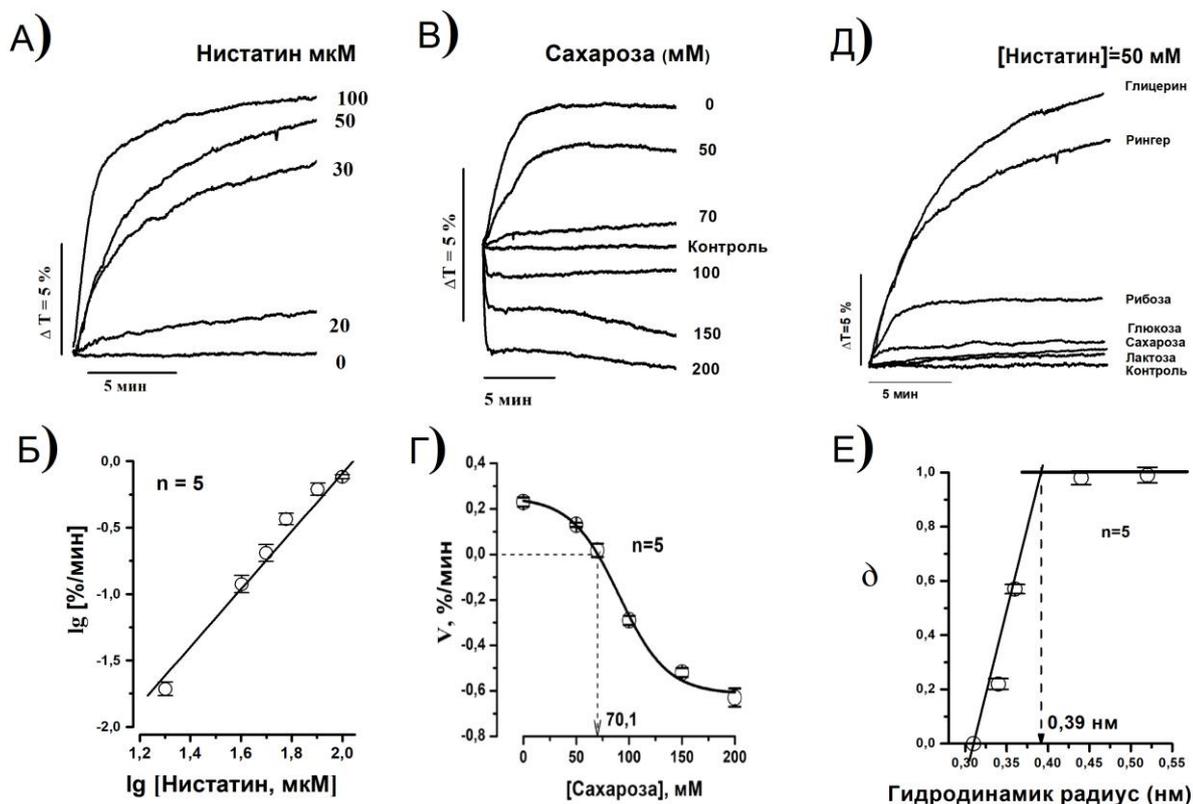


Рисунок 5. Определение размера пор, образующихся под действием нистатина на мембране тимоцитов. А), В) и Д) – оригиналы записи изменения светопропускания суспензии клеток. Б) на оси ординат – начальная скорость увеличения объема клеток (линейная фаза) в lg (%/мин), на оси абсцисс – концентрация нистатина в lg (мкМ). Г) на оси ординат – начальная скорость изменения объема клеток (%/мин), на оси абсцисс – концентрация сахарозы (мМ). Е) на оси ординат – коэффициент Ставермана, на оси абсцисс

– радиус неэлектролитов (глицерин, рибоза, глюкоза, сахароза, мальтоза), n - количество экспериментов.

Таким образом, основываясь на полученных нами данных, путем контролируемой пермеабиллизации плазматической мембраны наноскопическими ион-проводящими порами и балансируя разницу в онкотическом давлении с помощью внеклеточных непроникающих неэлектролитов, можно контролировать размер клетки и манипулировать ее объемом, что может быть важным инструментом в нанобиологии и наномедицине.

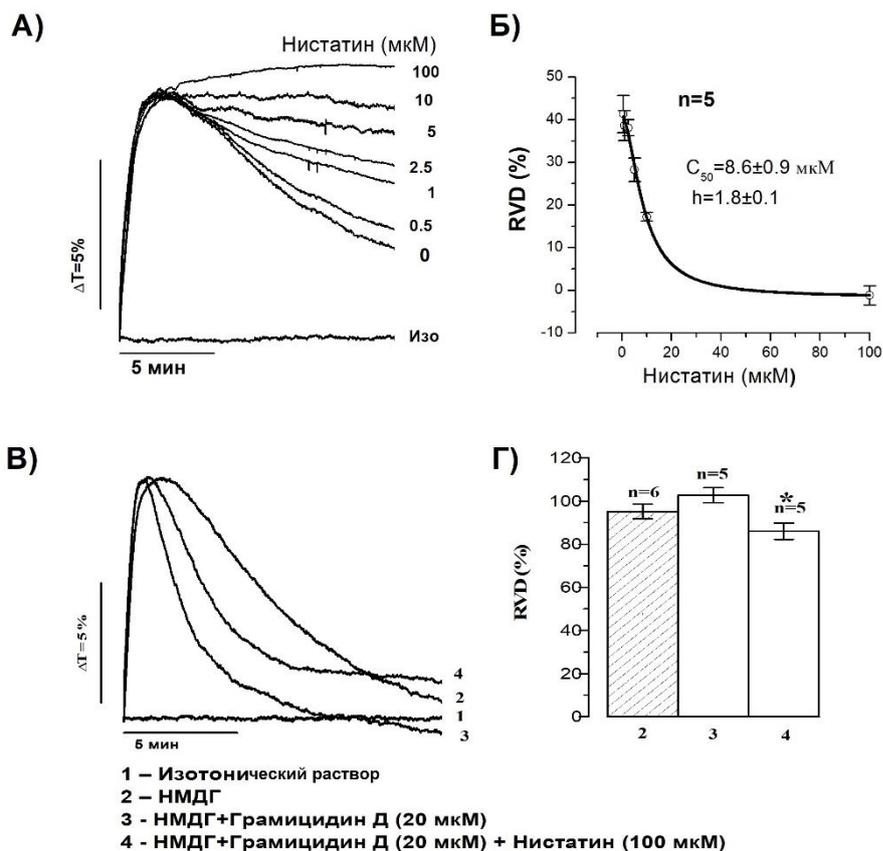


Рисунок 6. Влияние нистатина на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. А) и В) – оригиналы записи изменения светопропускания суспензии клеток; Б) – по оси ординат – параметр RVD (Regulatory Volume Decrease, степень восстановления объема за 15 мин в % от максимального набухания), по оси абсцисс – концентрация нистатина в мкМ; Г) – параметр RVD в присутствии нистатина в концентрации 100 мкМ. Условия эксперимента показаны внизу панели (В). Во всех случаях статистически значимое различие ($P<0,05$) относительно контроля выразалось знаком (*); n - количество экспериментов.

В наших следующих экспериментах, проведенных в условиях гипоосмотического стресса, мы обнаружили блокирующее влияние нистатина на регуляцию объема тимоцитов (рис. 6, А). Когда результаты были аппроксимированы уравнением Хилла, полумаксимальный эффект (C_{50}) составил $8,6\pm 0,9$ мкМ, а коэффициент Хилла был равен $1,8\pm 0,4$ (рис. 6, Б). Влияние нистатина на систему регуляции объема клеток может быть связано

с его влиянием на кальциевые, калиевые или хлорные каналы. В наших последующих экспериментах мы заменили ионы натрия в гипотоническом растворе (контроль) ионами НМДГ и, для того, чтобы увеличить катионную проницаемость мембраны, добавили в среду ионофор грамицидин Д. В этих условиях даже в присутствии максимальной концентрации нистатина 100 мкМ тимоциты эффективно восстанавливали свой объем (рис. 6, В и Г). Так как, если бы эффект нистатина был связан с блокированием ОЗАК, мы не должны были бы наблюдать восстановления объема в этих условиях, полученный результат показывает, что нистатин не влияет на объем-зависимый анионный канал.

Эсцин, при его внесении во внеклеточную среду, также вызывал дозозависимое увеличение объема тимоцитов в изоосмотических условиях (рис. 7, А). Зависимость была линейной в двойных логарифмических координатах с наклоном, равным $0,75 \pm 0,06$ (рис. 7, Г). Эта величина указывает на то, что одной молекулы эсцина может быть достаточно для образования поры в тимоцитарной мембране.

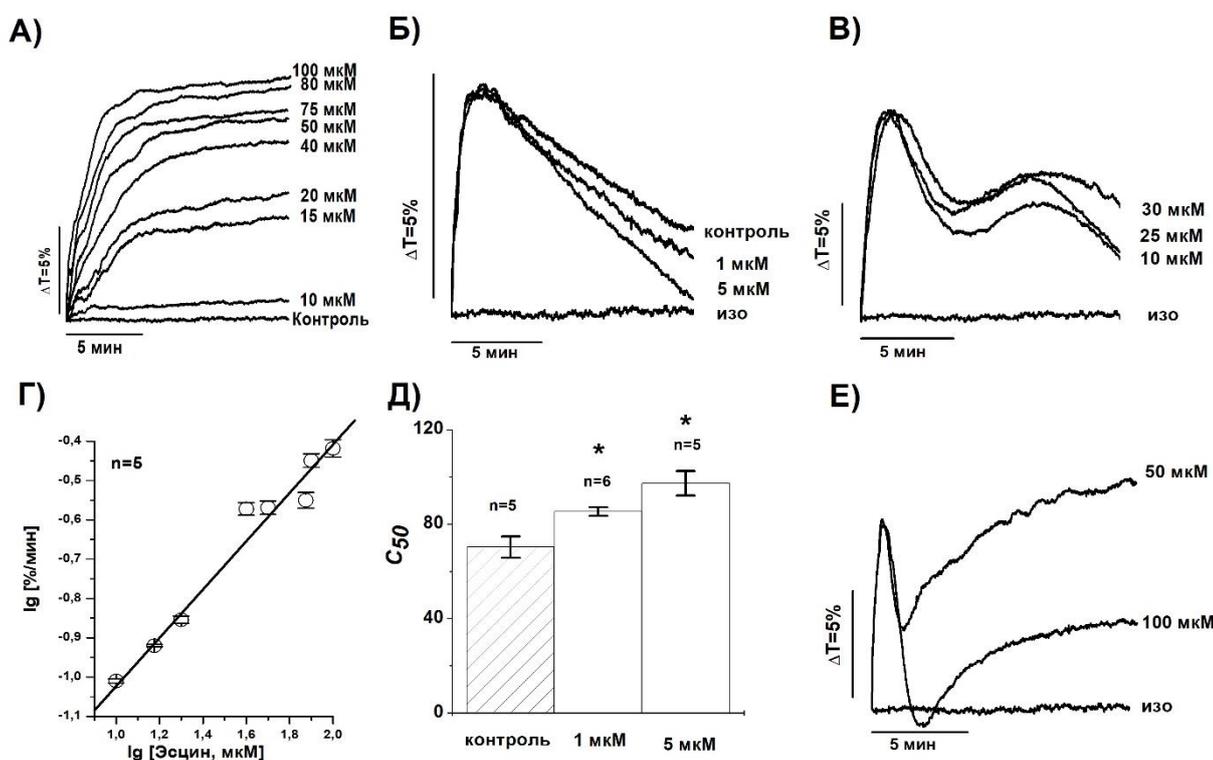


Рисунок 7 Влияние эсцина в различных концентрациях на регуляции объема тимоцитов в условиях нормального и гипоосмотического стресса. А), Б), В) и Е) оригинал записи изменения светопропускания суспензии клеток. Д) показан процент восстановления объема (*RVD*) после набухания клеток под контролем (черная колонка) в гипоосмотической среде и под влияние эсцина в различных концентрациях. Во всех случаях статистически значимое различие ($P < 0,05$) относительно контроля выражалось знаком (*). Г) по оси ординат - начальная скорость увеличения объема клеток (линейная фаза) выражена в $\lg (\%/\text{мин})$, по оси абсцисс - количество эсцина в $\lg (\text{мкМ})$; n - количество экспериментов.

В условиях гипоосмотического стресса, контрольная величина регуляции объема (параметр *RVD*) составила $70,3 \pm 4,5\%$ ($n=5$). При концентрации эсцина 1 мкМ произошло не блокирование, а увеличение этого параметра до $85,3 \pm 1,8\%$ ($n=6$), а при 5 мкМ скорость восстановления объема стала еще больше и составила $97,3 \pm 5,2\%$ ($n=5$) (рис. 7, Б и Д). Мы предполагаем, что образование в клеточной мембране небольшого количества эсциновых пор при низкой концентрации вещества ускоряет восстановление объема клетки благодаря высвобождению внутриклеточных осмолитов через эти поры.

Дальнейшее увеличение концентрации эсцина до 10–30 мкМ привело к появлению трехфазной кинетики изменения клеточного объема (рис. 7, В), а при еще больших концентрациях (до 50 и 100 мкМ), первоначальное сжатие клеток сменялось неконтролируемым ростом объема (рис. 7, Е).

На основании полученных данных мы приходим к заключению, что при низких дозах эсцин может являться иммуностимулятором, в то время как при больших дозах он, нарушая систему регуляции клеточного объема, может оказывать отрицательное влияние на иммунную систему.

В пятой главе «Влияние полифенолов на регуляторное уменьшение объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе» мы изучили влияние полифенолов растительного происхождения на регуляторное уменьшение объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.

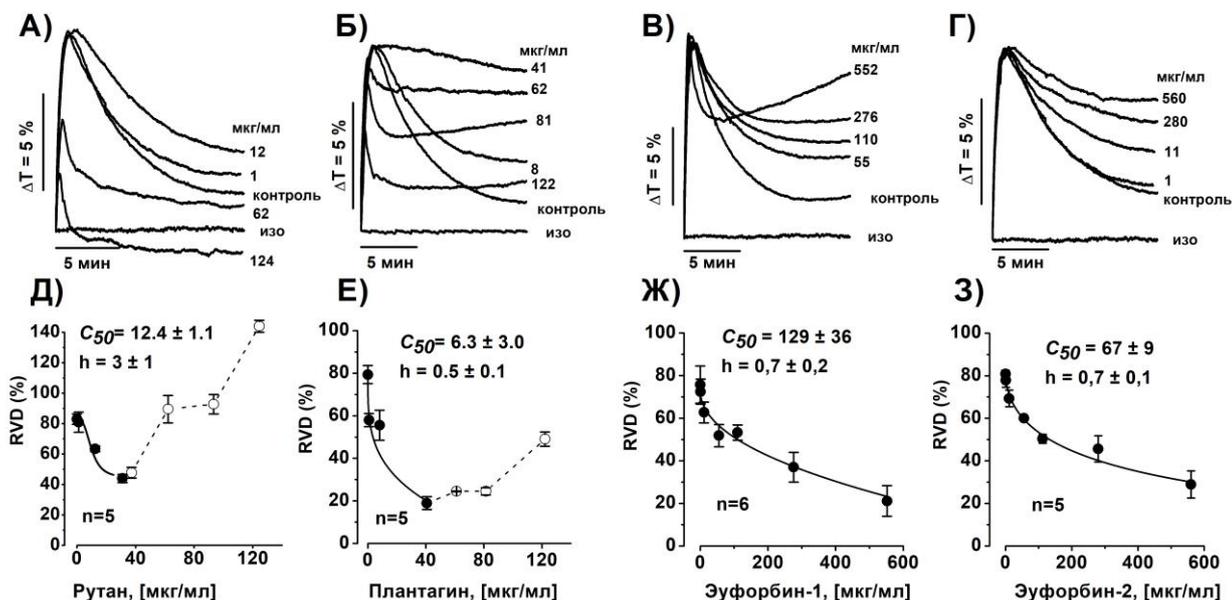


Рисунок 8. Влияние различных концентраций активных танинов на регуляцию клеточного объема тимоцитов. А), Б), В) и Г) – оригиналы записей изменения светопропускания суспензии клеток. Д), Е), Ж) и З) – по оси ординат – параметр *RVD*, по оси абсцисс – концентрация веществ в мкг/мл; n – количество экспериментов. Сплошные линии – аппроксимация уравнением Хилла с указанными параметрами. Пунктиром показана вторая (неспецифическая) фаза действия препаратов рутана и плантагина.

Когда мы предварительно протестировали влияние 10 различных полифенольных препаратов (любезно предоставленных проф. С.М.

Мавляновым, Институт биоорганической химии АН РУз), мы обнаружили, что только четыре из них, относящихся к классу танинов (рутан, плантагин эуфорбин-1 и эуфорбин-2) являются активными в отношении регуляции объема тимоцитов. Далее мы подробно исследовали концентрационные зависимости влияния этих активных препаратов (рис. 8) и определили эффективные помумаксимальные дозы путем аппроксимирования уравнением Хилла (рис. 8, Д-3).

По влиянию на систему регуляции объема тимоцитов, препараты растительных танинов расположились в следующий ряд: плантагин > рутан > эуфорбин-2 > эуфорбин-1. Мы предполагаем, что эти вещества могут быть основой для разработки новых иммуномодулирующих препаратов.

ВЫВОДЫ.

1. Установлено, что объем-зависимый анионный канал присутствует в мембране эритроцитов человека и выполняет защитную функцию в условиях осмотического стресса. Роль K^+ -каналов и хлор/бикарбонатного обмена в этом процессе найдена незначительной.

2. Доказано что механизмы гемолиза под действием каналообразующих веществ нистатина и эсцина сильно отличаются друг от друга: нистатин-индуцированный гемолиз является полностью коллоидно-осмотическим, тогда как лизис под действием эсцина является лишь частично коллоидно-осмотическим и в основном осуществляется по химическому механизму.

3. Устойчивость эритроцитов к коллоидно-осмотическому лизису обеспечивают K^+ -каналы, объем-зависимый анионный канал и макс-анионный канал. Защитная роль объем-зависимого анионного транспорта не реализуется при не коллоид-осмотическом механизме лизиса.

4. Методом осмопротекции установлено что нистатин формирует в мембране эритроцитов и тимоцитов поры с радиусом 0,39-0,42 нм. Установлено, что нистатиновые поры переводят клетки из двойной доннановской системы в простую и при гипоосмотических условиях инактивируют механизм регуляции клеточного объема.

5. Обнаружено, что эсцин образует большие поры в мембране эритроцитов с радиусом 2,56 нм. Образование поры вызывает набухание тимоцитов в изососмотических условиях, а при гипоосмотическом стрессе приводит к многофазным изменениям клеточного объема.

6. Впервые обнаружено ингибирующее действие полифенолов класса таннинов на регуляцию объема тимоцитов; по своей активности полифенолы расположились в ряд: плантагин > рутан > эуфорбин-2 > эуфорбин-1.

**SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc03/30.12.2019.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND
BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

KHAMIDOVA OZODA JOXONGIROVNA

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF TRANSPORT PROCESSES IN
THE RESISTANCE OF CELLS TO OSMOTIC STRESS**

03.00.02 – Biophysics and radiobiology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)
OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2020

The title the dissertation of PhD Has been registered with number B2017.1.PhD/B6 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been prepared at the Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation in three (Uzbek, Russian and English (Resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.ibb-nuu.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor:

Sabirov Ravshan Zairovich
doctor of biological sciences, academician

Official opponents:

Khushmatov Shunkor Sadullaevich
doctor of biological sciences

Kurganov Erkin Shukhratovich
PhD, of biological sciences

Leading organization: Karshi state university

The dissertation will be defended on _____2020 year ___ at the meeting of the Scientific Council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 at the Institute of biophysics and biochemistry, at the National University of Uzbekistan at the following Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student`s town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number № _____). Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student`s town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of the dissertation has been distributed on « ____ » _____ 2020
(Protocol at the register № ____ dated « ____ » _____ 2020)

Saatov Talat Saatovich
Vice-Chairman of the Scientific Council Awarding
Scientific Degrees, D.B.Sc., academician

Asrarov Muzaffar Islamovich
Scientific secretary the Scientific Council Awarding
Scientific Degrees, D.B.Sc., professor

Axmedjanov Iskandar Gulyamovich
Chairman of the academic seminar under the
Scientific Council Awarding Scientific Degrees, D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work investigation of the role of transport processes in cellular resistance to osmotic stress and colloid-osmotic lysis using pore-forming substances and blockers.

The objects of the research work: human red blood cells, thymocytes isolated from pedigree, young small rats, nystatin, escin, plant polyphenols.

The scientific novelty of the research work is as follows:

it was established that the volume-sensitive anion channel is present in human red blood cells and has a protective function under osmotic stress; the role of K^+ -channels and chloride/bicarbonate exchange was negligible;

it is proved that the mechanism of hemolysis induced by channel-forming agents, nystatin and escin-, is different from each-other: nystatin-induced hemolysis is fully colloid-osmotic whereas the lysis by escin is only partially colloid-osmotic and mainly occurs by chemical mechanism;

the resistance of erythrocytes to the colloid-osmotic lysis is mainly provided by K^+ -channels, volume-sensitive anion channels and maxi-anion channels; the protective role of the volume-sensitive anion channel does not take place under non-colloid-osmotic lysis;

it was established by osmoprotection method that nystatin forms in the erythrocyte and thymocyte membrane pores with a radius of 0.39-0.42 nm; as a result, the double Donnan balance is impaired; the nystatin pores also disable the volume regulation machinery;

it was found that escin forms large pores with a radius of ~ 2.6 nm which causes thymocytes swelling under isotonic conditions and multi-phasic volume oscillations under hypotonicity;

plant polyphenols of tannin family inhibit the cell volume regulation with efficiency sequence of plantagine > rutan > euphorbin-2 > euphorbin-1.

Implementation of the research results. The results of the biophysical description of the cell lysis processes and of the cell volume regulation served as a basis for the followings:

the results on the resistance of blood cells to osmotic and channel-induced lysis and on the lymphocytes volume regulation were used in the applied grant project FA-A11-TO31 «Creation of a new effective remedy for diabetes mellitus based on ecdisterone and its polysynthetic derivatives» (2015-2017) for determination of the mechanism of the effects of individual ecdisterone and its polysynthetic derivatives on the resistance of blood cells to osmotic stress and on volume regulation (Certificate of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan № 4/1255-1853 of July 4, 2019). The use of scientific results allowed explanation of the mechanism of action of ecdisterone and its polysynthetic derivatives on the resistance of blood cells to osmotic stress and on the cell volume regulation;

the results on the biophysical characteristics of the blood cells lysis and on the volume changes of thymic lymphocytes induced by channel-formers as well as on the role of ion-transporting systems in the resistance to osmotic and colloid-osmotic lysis were used in the applied grant project PZ-20171024153 «Creating a test system

based on the colon cancer cells culture for screening the biologically active substances» (2018–2019) to determine the weakening effect of *Cuscuta europea* seed extract on the thymocytes volume regulation under hypoosmotic stress and to clarify the mechanisms of the influence on the cell volume control and that the extract is non-hemolytic (Certificate of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan No. 4 / 1255-2659 of October 7, 2019). The use of scientific results has provided an opportunity to explain the effects of *Cuscuta europea* seed extract on the cell membrane and the mechanisms of its effects on the process of cell volume regulation.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of Introduction, five chapters, conclusion and list of publications. Total volume is 118 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Эритроцит хужайраларининг осмотик резистентлигида анион каналларининг роли. // ЎзМУ хабарлари. -2011. (Махсус сони). -Б. 32-34. (03.00.02., Махсус сони).

2. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Роль анионного транспорта в механизме коллоидно-осмотического гемолиза под действием нистатина и β -эсцина. // Узб. биол. Журнал. -2012. -№1. -С. 3-7. (03.00.02., №1).

3. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Изменения клеточного объема лимфоцитов, индуцированные нистатиновыми нанопорами. // Узб. биол. Журнал. -2014. -№6. -С. 7-10. (03.00.02., №6).

4. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. β -эсцин моддасининг тимоцит хужайра ҳажм бошқарилишига таъсирини ўрганиш. // ЎзМУ хабарлари. -2015. -№3/1. -Б. 46-48. (03.00.02., №3/1).

5. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Тимоцит хужайра ҳажм бошқарилишига нистатин моддасининг таъсири. // ЎзМУ хабарлари. -2015. -№3/1. -Б. 43-45. (03.00.02., №3/1).

6. Хамидова О.Ж., Амонов А.У., Рахимова М.Б., Абдулладжанова Н.Г., Рахимов Р.Н., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Баъзи полифенол бирикмаларининг хужайра ҳажм бошқарилиш жараёнларига таъсири. // ҚарДУ хабарлари. -2019. -№1. -Б. 47-51. (03.00.02., №1).

7. Tsiferova N.A., Khamidova O.J., Amonova A.U., Rakhimova M.B., Rustamova S.I., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., Abdulladjanova N.G. and Sabirov R.Z. Tannins, novel inhibitors of the volume regulation and the volume-sensitive anion channel // European Pharmaceutical Journal. -2019. -V. 66. № 2. P. 37-44. (Research Gate, IF – 0,11).

II бўлим (II часть; II part)

8. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Исследование ингибиторов объем-зависимого хлорного канала на осмотическую резистентность эритроцитов человека. // Тезисы конференции «Актуальные проблемы химии природных соединений». Ташкент (17 марта) -2011. -С. 19.

9. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Одам қизил қон хужайраларининг нистатин

таъсиридаги коллоид-осмотик лизис механизмини ўрганиш. // Респ. Научн. Конф. «Проблемы ботаники, биоэкологии, физиологии и биохимии растений» Ташкент (13-14 мая). -2011. -С. 127-128.

10. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р. Ш., Мерзляк П. Г., Ташмухамедов Б. А., Сабилов Р. З. Фармакологическое исследование механизма лизиса эритроцитов под действием β -эсцина. // Коференция молодых ученых, «Актуальные проблемы химии природных соединений» Ташкент (19 марта). - 2012. -С. 55.

11. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Тимоцит хужайраларига нистатин моддасининг таъсирини ўрганиш. // Илмий-амалий анжуман “Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши ва истиқболлари”. Андижон (25-26 май). -2012. -Б. 18-19.

12. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Действие β -эсцина на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. // Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая 12». Пущено (22-24 октябрь). -2012. -С. 28.

13. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Исследование коллоидно-осмотического механизма процесса гемолиза под действием нистатина и β -эсцина. // Тезисы конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» Ташкент. Узбекистан, (15-16 ноября). -2013. -С. 76.

14. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Контроль объема тимоцитов с помощью нистатиновых нанопор в изоосмотической среде. // Конференция молодых ученых «Актуальные проблемы химии природных соединений» посвященной памяти акад. С.Ю. Юнусова. Ташкент (12 марта). -2015. -С. 153.

15. Sabirov R.Z., Khamidova O.J., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., & Okada Y. Lymphocyte cell volume manipulations by self-assembling polyene nanopores. // In: “Abstracts of the 62nd Annual Meeting of the Physiological Society of Chubu Area”, Toyama. Japan, (13-14 November). -2015. -P.57.

16. Хамидова О.Ж., Бахронова С.О., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Изотоник шароитда лимфоцит хужайралар мембранасига β -эсцин моддасининг таъсири. // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы физико-химической биологии», посв. 80-летию акад. АН РУз Ташмухамедова Б.А. Ташкент (14 апреля). -2015. -С. 323.

17. Хамидова О. Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Лимфоцит хужайралари ҳажмини нистатин нанопоралари таъсирида манипуляция қилиш. // Материалы научно-практической конференции «Современные аспекты физико-химической биологии и экотоксикологии». Ташкент (26 апреля) -2016. -С. 226-227.

18. Хамидова О.Ж., Амонов А.У., Рахимова М.Б., Абдулладжанова Н.Г., Рахимов Р.Н., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Влияние

некоторых полифенолов на регуляцию объема лимфоцитов тимуса. // Материалы международной конференции научной конференции. Ташкент (18 сентября). -2018. -С. 70.

19. Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Амонов А.Ў., Абдулладжанова Н.Г., Рахимов Р.Н., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Эуфорбин-1 ва эуфорбин-2 бирикмаларнинг RVD жараёнига таъсири. // Ёш олимларнинг I илмий-амалий конференцияси "Биофизика ва биокимёнинг ютуқлари ва истиқболлари". Тошкент (17 сентябрь). -2019. -Б.91-92.

20. Хамидова О.Ж., Циферова Н.А., Амонов А.У., Рахимова М.Б., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдулладжанова Н.Г., Сабилов Р.З. Баъзи полифенол бирикмаларнинг ҳужайра мембраналарига таъсири. // Республика илмий анжумани "Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари". Тошкент (16 май). -2019. -Б. 169.

21. Khamidova O.J., Rustamova S.I., Kurbannazarova R.S., Merzlyak P.G., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. Effect of β -escin on the volume regulation of rat thymocytes. // European Sciences review. -2019. -V. 2. № 1-2. -P. 51-53. (DOI: <https://doi.org/10.29013/ESR-19-1.2.2-51-53>).

22. Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Канал ҳосил қилувчи моддалар таъсирида кечаётган гемолиз жараёнининг коллоид-осмотик механизми. // «Биофизика ва биокимё муаммолари – 2020» илмий конференцияси материаллар, Тошкент (22 май) -2020. -Б. 151.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» таҳририяида
таҳрирдан ўтказилиб, ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро
мувофиқлаштирилди.