

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ, ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ, ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

ЧАРЫШНИКОВА ОКСАНА СТАНИСЛАВОВНА

**ФИТОЭСТРОГЕН ФЕРУТИНИННИНГ КАЛЬЦИЙГА БОҒЛИҚ
БИОЛОГИК ЭФФЕКТЛАРИ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

**ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2018

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Чарышникова Оксана Станиславовна

Фитоэстроген ферутининнинг кальцийга боғлиқ биологик эффектлари 3

Чарышникова Оксана Станиславовна

Кальций–зависимые биологические эффекты фитоэстрогена ферутина 20

Charishnikova Oksana Stanislavovna

The calcium–dependent biologically action of phytoestrogen ferutinin 37

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works 41

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ, ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ, ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

ЧАРЫШНИКОВА ОКСАНА СТАНИСЛАВОВНА

**ФИТОЭСТРОГЕН ФЕРУТИНИННИНГ КАЛЬЦИЙГА БОҒЛИҚ
БИОЛОГИК ЭФФЕКТЛАРИ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

**ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2018

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.2.PhD/B66 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий университетида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (www.biochem.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziyo.net) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар: **Замараева Мария Всеволодовна**
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: **Хушбақтова Зайнаб Абдурахмановна**
биология фанлари доктори, профессор

Мерзляк Петр Григорьевич
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот: **Тошкент фармацевтика институти**

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон Миллий университети, Ўсимлик модалари кимёси институти ҳузуридаги DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2018 йил «__» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262–35–40; факс: (99871) 262–70–63.

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

Диссертация автореферати 2018 йил «__» _____ куни тарқатилди.
(2018 йил «__» _____ даги №____ рақамли реестр баённомаси).

Ш.И.Салихов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси, б.ф.д., академик

М.И.Асраров
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

Ш.У.Турдикулова
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д.

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертациясининг аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда бевосита биологик мембраналар орқали Ca^{2+} транспортини модуляциялаш ва ушбу кўринишда цитозолда Ca^{2+} концентрациясини ҳамда у билан боғлиқ хужайрада амалга ошувчи фундаментал жараёнлар ва патологик ҳолатларни регуляция қилувчи самарали биологик фаол моддаларни излаш долзарб муаммо бўлиб қолмоқда. Шу нуқтаи назардан, ўсимликлардан ажратиб олинган бирикмалар Ca^{2+} транспортининг потенциал фармакологик модуляторлари сифатида шубҳасиз, илмий қизиқиш ўйғотади, бу ҳолат уларнинг синтезланган бирикмаларга нисбатан деярли токсик таъсирга эга эмаслиги ва қисман халқ табobati амалиётида кўп асрлардан буён фойдаланилиши билан боғлиқ ҳисобланади.. Ушбу кўринишдаги бирикмалардан бири, *Ferula* авлоди ўсимлигидан ажратилган, ферутинол сесквитерпен спирти ва *n*-оксибензой кислотанинг мураккаб эфири ферутинин ҳисобланади.

Дунё миқёсида илмий тадқиқотлар амалиётида ушбу ўсимлик терпеноиднинг олдин Ca^{2+} -ионофор хусусияти аниқланиши ҳисобига ферутинин биологик мембраналар орқали кальций транспортининг селектив модулятори сифатида фойдаланилади. Ҳозирги кунда дунёда турли хил хужайраларга ферутининнинг таъсири интенсив биологик текширувлари олиб борилмоқда, булар кенг доирадаги биологик таъсирларини, жумладан эстроген, антиостеопороз, про- ва антипролифератив, нейромодуляцияловчи ва апоптозни келтириб чиқарувчи фаоллигини аниқлашга имкон берди. Шу билан бирга, ферутининнинг бундай кенг доирадаги биологик таъсирларининг молекуляр ва хужайра асослари ҳали етарлича ошкор этилмаган.

Ўзбекистонда *Ferula* авлоди ўсимликлари асосида тиббиёт ва қишлоқ хўжалиги учун зарур бўлган дори-дармон воситаларини ишлаб чиқаришга алоҳида эътибор қаратилмоқда¹. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора тадбирлар асосида, илмий ва инновацион ишланмаларни самарали амалга ошириш учун барча шароитлар яратилган ва потенциал тиббий маҳсулотлар сифатида *Ferula* авлодига мансуб ўсимликлардан ажратилган биологик фаол моддалар таъсир механизмларини аниқлаш бўйича аниқ натижаларга эришилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4-йўналишида “Фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари билан таъминланишини яхшилаш”² йўналишида амалга оширадиган аниқ вазифалари белгиланган. Бу борада, жумладан Ca^{2+} -гомеостази ва Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларнинг

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Республикада каврак плантацияларини ташкил этиш ва уларнинг хомашёсини қайта ишлаш ҳажмларини кўпайтириш ҳамда экспорт қилиш чора тадбирлари тўғрисида»ги ПҚ -3617-сонли қарори.

² Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги ПФ-4947-сонли фармони.

регуляциясига ферутининнинг таъсир механизмларини батафсил аниқланиши ферутинин асосида дори воситаларини қўллаш доирасини кенгайтиради.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 20 мартдаги ПҚ-3617 «Республикада каврак плантацияларини ташкил этиш ва уларнинг хомашёсини қайта ишлаш ҳажмларини кўпайтириш ҳамда экспорт қилиш чора тадбирлари тўғрисида» ги қарорида ва 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947 сонли Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги фармонида белгиланган устувор вазифаларни ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф муҳитни муҳофаза қилиш» ва VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишларига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Дунёда биринчи марта *Ferula tenuisecta* ўсимлигидан ЎМКИ да проф. Саидходжаев А.И. раҳбарлигида бир қатор ароматик кислоталарнинг мураккаб эфирлари ажратиб олинган, улардан бири каротан қаторига мансуб бўлган сесквитерпен спирти билан оксibenзой кислотанинг мураккаб эфири - ферутинин ҳисобланади. Ферутининнинг биологик таъсирлари аниқланиши ушбу терпеноидга дунё илмий оммасининг кенг миқёсда катта қизиқиш уйғотишга сабаб бўлган. Шундай қилиб, проф. Мачо (Италия), шунингдек проф. А.Абрамов ва проф. М.Дучен (Англия) раҳбарлигида олимлар гуруҳи томонидан ферутинин турли хил типдаги хужайралар цитозолида кальций концентрациясини ошириши ва митохондрияларда Ca^{2+} тўпланиши ва навбатдаги босқичда ЦсА таъсирида сусайиши қайд қилинувчи деполяризацияни келтириб чиқариши кўрсатилган. Ферутининнинг кенг спектрдаги биологик хусусиятларини ўрганишга йўналтирилган илмий тадқиқотлар дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан University of Bialystok (Польша), Université Libre de Bruxelles (Бельгия), Ferdowsi University of Mashhad (Эрон), The Chinese University of Hong Kong (Гонконг) да амалга оширилмоқда. МДХ давлатларида ҳам ферутининга катта эътибор қаратилади, жумладан проф. Заводник И.Б. ва унинг гуруҳи (Беларусь республикаси) томонидан ферутининнинг ажратиб олинган митохондрияларнинг функционал кўрсаткичларига таъсири ўрганилади. Бироқ, ферутининнинг биологик фаоллик хоссаларини ўрганиш бўйича шубҳасиз, Ўзбекистон олимлари етакчи ўринни эгаллайди.

Ўзбекистонда ферутининнинг биологик таъсирларини ўрганиш бўйича олинган натижалар Ўзбекистонда акушер-гинекология амалиётида фойдаланилувчи ва токсик таъсири паст даражада бўлган, канцероген ва тератоген хоссага эга эмаслиги билан тавсифланувчи «Тефестрол» маҳаллий

дори препарати яратилишига олиб келган. Муаллифлар гуруҳи томонидан *Ferula tenuisecta* туридан ажратиб олинган терпеноидлар аралашмаси “Пеноферол” эстроген таъсирининг биостимуляторини ишлаб чиқиш учун асос бўлиб хизмат қилди (Муаллифлик гувоҳномаси №948365, 1981). Ушбу препарат товукларнинг жинсий етилиши ва тухум ҳосил бўлишини тезлаштирувчи, ҳосил бўлувчи сариқликнинг кальцификациялашга ёрдам беради. Проф. Замараева М.В. раҳбарлигида ферутинин электроген Ca^{2+} -ионофор хоссани намоён қилиши ва биологик ва сунъий липид мембраналарнинг Ca^{2+} ионлари учун ион ўтказувчанлигини ошириши аниқланган. Ферутининнинг суяк тўқимасига таъсирини ўрганиш бўйича амалга оширилган кўплаб тадқиқотларда ушбу бирикма суяк тўқимаси структурасининг қайта тикланиши ва эстроген танқислиги шароитида юзага келувчи остеопороз ривожланишининг олдини олиш хусусиятига эгалиги аниқланган.

Ферутининнинг турли хил биологик таъсирларга эгалиги билан боғлиқ ҳолатда ва ушбу таъсирларнинг амалга ошиши механизмига кенг қўламдаги илмий қизиқиш мавжудлигини ҳисобга олиб, ушбу тадқиқот ишининг асосини ферутининнинг Ca^{2+} билан комплекс ҳосил қилишининг физик-кимёвий тавсифларини, унинг Ca^{2+} ни оширувчи ҳамда Ca^{2+} га боғлиқ асосий жараёнларни бошқариш механизмларини аниқлашга йўналтирилган тадқиқотларни амалга оширишдан ташкил топган бўлиб, долзарб ва сўзсиз равишда илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университети илмий-тадқиқот ишлари режасининг «Мембранага боғлиқ жараёнларни ўрганиш»; SCOPES Халқаро дастури доирасида IB74A0-110940 «Calcium disregulation as trigger of apoptosis in muscular dystrophy» (2005-2008); шунингдек РФТМҚ томонидан молиялаштирилган лойиҳалар, жумладан шартнома № Ф2.28.5 «Биомембраналарнинг функция бажариш тамойиллари, мембраналарга физиологик фаол моддалар ва физик омилларнинг таъсири»; шартнома ЎзР ФТРМҚ №Ф-4.1.36 «Кальций гомеостази регуляциясининг мембранага оид механизмлари ва ҳайвон ҳужайраларининг энергетик ҳолати»; шартнома №ОТ-Ф3-141 «Сунъий ва биологик мембраналарда наноскопик пораларни шакллантириш, тузилиши ва бошқарилишининг биофизик тамойилларини ўрганиш»; шартнома Ф5-06 «Айрим биорегуляторларнинг таъсир механизмларини ўрганиш» лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади ферутининнинг кальций ионларига нисбатан комплекс ҳосил қилишининг физик-кимёвий тавсифларини баҳолаш ва унинг ҳайвон ҳужайраларидаги асосий Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларга таъсир мезонларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

кальций ионлари мавжуд шароитда ферутинин мономолекуляр каватининг юза-фаол хоссаларини тадқиқ қилиш;

кальций ионлари билан комплекс шаклланишида иштирок этувчи ферутинин молекуласининг функционал гуруҳларини аниқлаш;

ферутининнинг Ca^{2+} ни оширувчи таъсир мезонлари ва унинг одам тромбоцитларида кальцийга боғлиқ асосий жараёнларга таъсирини тадқиқ қилиш;

ферутининнинг каламуш аортаси силлиқ мускули қисқаришига таъсирини тадқиқ қилиш;

ферутининнинг каламуш юраги мембраналарида аденилатциклаза фаоллигига таъсирини тадқиқ қилишдан иборат.

Тадқиқотнинг объекти зотсиз оқ каламушлардан ажратиб олинган юрак мембраналарининг умумий фракцияси ва аорта фрагментлари ҳисобланади. Тромбоцитлар устида амалга оширилган тажрибаларда донор конидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг предмети ферутинин сесквитерпеноидининг кальций билан комплекс ҳосил қилиш ҳоссаси ва ҳужайра ичида Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларнинг бошқарилишини тадқиқ қилиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертация тадқиқотида замонавий биокимёвий ва биофизик тадқиқот услубларидан: жумладан, инфракизил спектроскопия; сув/ҳаво ажралиш чегарасида моно-каватларнинг юза хоссаларини баҳолаш учун ленгмюр плёнкалари услуби; Fura-2AM дан фойдаланилган ҳолатда, цитозолдаги кальцийни ўлчашнинг флуориметрик услуби; цитозолдаги кальцийни ўлчаш учун оқим тавсифидаги цитометрия услуби; флуоресцент зондлар ва нишонланган специфик антителолардан фойдаланилган ҳолатда, умумий қон таркибида тромбоцитларда фибриноген ва GPIIb/IIIa рецепторлар экспрессияси; умумий қонда тромбоцитлар агрегациясини ўлчаш импеданс услуби; радиоактив нишонланган [α - ^{32}P]АТФ дан фойдаланган ҳолатда, каламуш юраги мембраналарида цАМФ ни аниқлашнинг хроматографик услуби; механо-электрик қайта ўзгартирувчи трансдусер (механотрон) дан фойдаланилган ҳолатда, каламуш аортаси фрагментларининг изометрик қисқаришини қайд қилиш услубидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

ферутинин юза-фаоллик ҳоссасига эга бўлиши ва бу Ca^{2+} ионлари мавжуд шароитда кучайиши, бу эса кальций ионлари мавжуд шароитда ферутинин молекуласи эгаллаган майдоннинг камайиши аниқланган;

кальций ионлари билан комплексларни шакллантиришда иштирок этган ферутинин молекулаларнинг гуруҳлари аниқланган, мураккаб шаклланиш жараёнида ферутинин молекулаларнинг қайта йўналтирилиши модели тақдим этилган;

ферутининнинг тромбоцитларда цитозолдаги кальцийни ошириши ва фибриноген рецепторларни фаоллаштириши Ca^{2+} -ионофор ҳоссасига эгаллигига боғлиқлиги исботланган;

ферутинин-индурцирлаган ҳужайра ичидаги Ca^{2+} мобилизацияси тромбоцитлар дезагрегациясининг механизми аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари куйидагилардан иборат:

Ca^{2+} билан комплекс ҳосил қилишда иштирок этувчи ферутинин молекуласининг гуруҳлари тавсифланган, ферутинин: Ca^{2+} комплекси 2:1 стехиометрияда фенол гидроксиди кислороди ва бензой кислотанинг мураккаб эфирдаги карбонил гуруҳи кислороди орқали шакллантирилган;

ферутининнинг одам қони тромбоцитларининг функционал кўрсаткичларига таъсири: тромбоцитларда ферутинин таъсирида юзага келтирилган хужайра ичида Ca^{2+} концентрациясининг ортиши GPIIb-IIIa рецепторлар экспрессиясини юзага келтириши исботланган;

ферутининнинг тромбоцитлар агрегациясига таъсир кўрсатмаслиги исботланган;

ферутинин мавжуд шароитда каламуш аортаси фрагментлари қисқаришининг тоник компоненти ўзгариш фазаси унинг Ca^{2+} -ионофор фаоллиги амалга ошиши билан боғлиқ бўлиб, фазали компонентнинг ўзгариши эса, цАМФ миқдори ортиши бўшашиш фазаси унинг эстроген сифатидаги таъсири ҳисобига амалга ошиши мумкинлиги исботланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги илғор биокимёвий ва биофизик услублардан фойдаланиш билан асосланади. Хулосалар Студент мезонидан фойдаланиш ёки ишончлилиги эҳтимоллиги даражаси $p \leq 0,05$ шароитда OriginPro7.5 (OriginLab Corporation, АҚШ) компьютер дастуридан фойдаланилган ҳолатда вариацион таҳлилдан (ANOVA) фойдаланиш асосида замонавий математик статистика услублари билан қайта ишланган натижалар асосида шакллантирилди. Эксперт мутахассислар томонидан баҳоланиши, олинган натижаларнинг республика ва халқаро миқёсдаги конференцияларда муҳокама қилиниши ҳамда тадқиқот натижаларининг рецензиядан ўтказилувчи илмий журналларда нашр қилиниши олинган натижаларнинг тасдиқланиши сифатида хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.

Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти бу уни илмий тадқиқотларда мембрананинг Ca^{2+} бўйича ўтказувчанлигининг селектив модулятори сифатида фойдаланишга тавсия қилиш имконини берувчи ферутининнинг биологик таъсирларининг унинг мембрана-фаоллиги билан ўзига хос ўзаро боғлиқлик хусусиятлари аниқланишидан ташкил топган. Олинган натижалар дарсликлар, ўқув қўлланмалар тайёрлашда, шунингдек ОЎЮда биофизика ва молекуляр физиологияни ўқитиш амалиётида муваффақиятли тарзда фойдаланилиши мумкин.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти бу ферутининнинг ушбу ишда тақдим этилган гемаглютинация каскадининг томир-тромбоцитлардаги патологик таъсирининг йўқлиги бўлиб, ферутинин асосида дори воситаларини қўллаш доирасини кенгайтириши ҳисобланади. Ўз навбатида, олинган натижалар фармакология ва даволаш учун катта амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Фитоэстроген ферутининнинг кальцийга боғлиқ биологик эффектлари бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ферутининнинг комплекс ҳосил қилиш хоссаси ҳақидаги маълумотлар юқори импакт факторга эга бўлган хорижий журналларда бошқа хелаторларнинг Ca^{2+} ионлари билан таъсирлашиши физик-кимёвий комплекс ҳосил қилишини ва ферутининнинг структура-функционал хусусиятларини баҳолашда фойдаланилган (*Desalination*, 2017, V.422(15), ResearchGate, IF-4,98; *Journal of Membrane Biology*, 2018, V.251, N.4, ResearchGate, IF-2,03; *Iraian Journal of Basic Medical Sciences* 2015, V.18(11), ResearchGate, IF-0,70; *Current Medicinal Chemistry* 2018. V.25, ResearchGate, IF-3,09). Натижада хелатор молекулаларнинг Ca^{2+} билан комплекс ҳосил қилиш хоссаларини тавсифлаш имконини берган;

ферутининнинг тромбоцитларда биологик Ca^{2+} -модуляцияловчи таъсири ҳақидаги маълумотлар юқори импакт факторга эга бўлган хорижий журналларда бошқа типдаги хужайраларда Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларни аниқлашда фойдаланилган (*Chemical Research in Toxicology*, 2013, V.26(8), ResearchGate, IF-4,65; *Natural Products & Chemical Researches*, 2013, V.1(3), Directory of Open Access Journals, IF-1,7; *Thrombosis and Haemostasis* 2011, V.106, ResearchGate, IF-4,96). Натижада ферутининнинг антиконвульсант таъсирини, унинг эритроцитларда апоптозни юзага келтирувчи фаоллигини тушинтириш, тамоксифеннинг антиагрегацион фаоллигини таҳлил қилиш имконини берган;

Тромбоцитларда Ca^{2+} -га боғлиқ жараёнларга ферутининнинг таъсири бўйича натижалари «Cayman Chemical» (АҚШ, Мичиган) биотехнологик компанияси томонидан таҳлилий ва экспериментал мақсадлар учун ишлаб чиқарилувчи «Ferutinin» маҳсулотини тавсифлашда фойдаланилган (<http://www.caymanchem.com/product/16554>) («Cayman Chemical» нинг 2018 йил 13 июлдаги маълумотномаси). Натижада экспериментал тадқиқотлар амалиётида ферутининнинг фойдаланиш спектрини кенгайтирган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 3 та халқаро ва 1 та республика миқёсидаги илмий-амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 9 та илмий иши чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 5 та мақола, жумладан 3 таси республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, олтита боб, хулосалар, якуний қисм, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 121 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

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

Диссертациянинг **«Кальций гомеостази ва унинг хужайра функциялари бошқарилишидаги роли»** деб номланган биринчи бобида хужайра функциялари бошқарилишида кальций гомеостазининг роли, хужайраларнинг Ca^{2+} -транспорт тизимлари, уларнинг хужайрада амалга ошувчи жараёнлардаги иштироки ва ўзаро алоқадорликлари ҳақидаги илмий нашрларнинг батафсил шарҳи келтирилган.

Диссертациянинг **«Ўсимликлар терпеноидларининг таркиби ва функцияси»** деб номланган иккинчи бобида ўсимлик терпеноидларнинг номенклатураси ва физик-кимёвий хусусиятлари берилган ва *Ferula* туркуми ўсимликларидан ажратиб олинган экстрактларнинг кенг спектрдаги биологик фаолликлари батафсил тавсифланган. Бунда сесквитерпеноид ферутининнинг биологик ва фармакологик хоссаларига алоҳида эътибор қаратилган.

Диссертациянинг **«Хужайра ичида Ca^{2+} га боғлиқ жараёнларни ўрганишнинг замонавий физик-кимёвий услублари»** деб номланган учинчи бобида ушбу тадқиқотда фойдаланилган материаллар, услублар, биологик объектларни ажратиб олиш услублари, тажрибалар дизайни ва протоколлари, қурилмаларнинг батафсил тавсифлари келтирилган. Сув/ҳаво чегарасида ферутининнинг мономер молекуляр қаватининг юза-фаол хоссаларини ўрганиш лентмюр плёнкаси услубида амалга оширилди, тензиометр билан олинган маълумотларни қайта ишлаш Nima ST9002 дастуридан фойдаланиб бажарилди. ИҚ-спектроскопия Magna-550 II сериясидаги FT-IR спектрофотометрида (Nicolet Instrument Corporation, АҚШ) ёзиб олинди. Синов намуналари KBr намуналар сифатида тайёрланди, ИҚ-спектрларни ёзиб олиш 2 см^{-1} спектрал рухсат этилиш билан амалга оширилди. Fura-2AM зондидан фойдаланилган ҳолатда цитозолдаги кальций миқдорини ўлчаш LS50B спектрофлуориметрида (Perkin Elmer, Англия) амалга оширилди. Нишонланган селектив антителолар ва флуоресцент зондлардан фойдаланилган ҳолатда қон таркибида тромбоцитларни цитофлуориметрик таҳлил қилиш оқим тавсифидаги LSR II Elite Flow Cytometer цитометрида (Becton-Dickinson, Германия) Becton Dickinson томонидан модификацияланган услуб ёрдамида амалга оширилди (Boncler et al., 2006). Қонда тромбоцитлар агрегацияси Chrono-Log 592 импеданс агрегаторида (Chrono-Log, АҚШ) стандарт протоколга мувофиқ амалга оширилди. (Cardinal and Flower, 1980). Каламушдан ажратиб олинган кўкрак аорта фрагментларининг қисқариш кучи изометрик режимда механотрон

ёрдамида ўлчанди (Кожевникова ва бошқ., 2006). Каламуш юраги мембраналарида цАМФ ҳосил бўлиши радиоактив нишонланган [α - ^{32}P]АТФ дан фойдаланиб, хроматографик услубда аниқланди.

Диссертациянинг «**Ферутининнинг кальций-комплекс ҳосил қилиш хоссасини ўрганиш**» деб номланган тўртинчи бобида ферутинин: Ca^{2+} комплексининг ҳосил бўлишининг физик-кимёвий тавсифларини ўрганиш бўйича натижалар келтирилган.

Ферутинин молекуласининг сув/ҳаво ажралиш чегарасида адсорбцияланиш хоссасини ўрганиш кўрсатишича, ферутинин юза-фаоллик хоссасига эга ҳисобланиб, сув/ҳаво чегарасида барқарор моно-қават ҳосил қилади, бунда мусбат адсорбцияни ва юза тарангликни 51,48 мН/м га ўзгаришини юзага келтиради, бу қиймат кальций ионлари мавжуд шароитда камайиши кузатилди ва 47,37 мН/м ни ташкил қилди. Олинган натижаларга асосланган ҳолатда изотермалар тузиб чиқилди, ҳисоблашлар Ca^{2+} ионлари мавжуд шароитда битта ферутинин молекуласининг эгаллаган юза майдони уч мартага камайиши ва нисбий юза майдони $3\text{\AA}^2$ га тенг бўлишини кўрсатади, яъни кальций ионлари мавжуд бўлмаган шароитда битта ферутинин молекуласининг эгаллаган юза майдони $9,2\text{\AA}^2$ тенг ҳисобланади, бу ҳолат эҳтимол комплекс ҳосил бўлишида ферутинин молекуласининг фазодаги жойлашиш ҳолати қайта ўзгариши билан боғлиқ бўлиши мумкин.

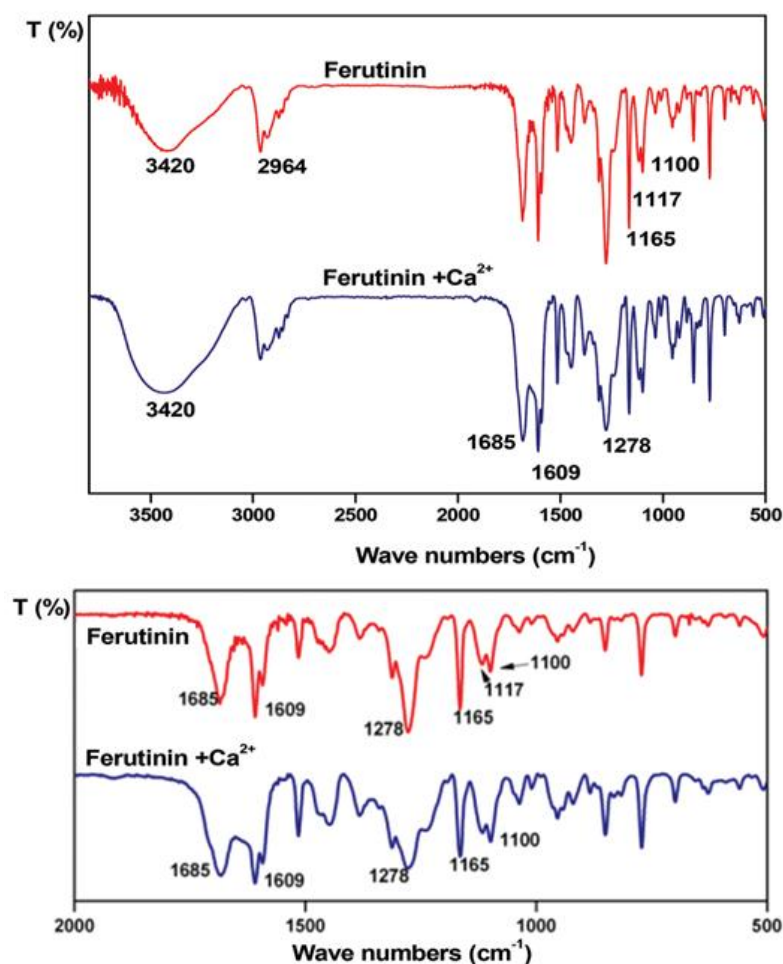
Ферутининнинг ИҚ-спектрларини (1-расм) таҳлил қилиш кўрсатишича, 3266 см^{-1} ни ташкил қилиши ҳолатида интенсив ютилиш соҳаси $3500\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ да унинг спирт гидроксигига нисбатан солиштирилганда қутбланганлик даражаси юқори бўлиши ҳисобига фенол гидроксигининг валент тебранишлари амалга ошади. Пик ҳолатининг силжиши 3400 см^{-1} соҳада бўлиши Н- боғларнинг мавжудлигидан, унинг кенгайиши эса - ушбу Н- боғларнинг молекулалараро ўзаро таъсирлашишларга жалб қилинишидан далолат беради.

Ферутининнинг Ca^{2+} билан комплекси ИҚ-спектрида ферутининнинг ўзининг ҳиссаси устунлик қилади. Ферутининнинг Ca^{2+} билан спектрларида О-Н, С-Н ва С-О боғлар интенсивлигининг ортиши (1-жадвал) спирт гидроксил гуруҳи кислороди ва скелетдаги карбонил гуруҳи кислородининг Ca^{2+} билан комплекс шаклланишидаги иштирокидан далолат беради.

1-жадвал

Ферутинин ва унинг Ca^{2+} билан комплекслари спектрларида О-Н, С-Н ва С-О боғлар интеграл интенсивлиги нисбатлари

	Ферутинин	Ферутинин+ Ca^{2+}
$I_{\text{O-H}}/I_{\text{C-H}}$	0,98	1,57
$I_{\text{C-O}}/I_{\text{C-H}}$	1,27	1,49



1-расм. Ферутинин ва унинг KBr таблеткаларида Ca^{2+} билан комплекси инфрақизил спектрлари. Пастдаги расмда ферутинин ва унинг Ca^{2+} билан 2000 ва 500 cm^{-1} оралиғидаги частота диапазонида комплексининг ИҚ-спектри фрагменти кўрсатилган.

Биз олган тажриба натижаларимиз боғланиш энергияси минимал қийматининг назарий ҳисобланишига асосланган олдин таклиф қилинган ферутинин:кальций комплекси модели билан мос келади (Abramov et al., 2001), ушбу моделга мувофиқ, ферутининнинг иккита молекуласида ферутинол гидроксил гуруҳининг кислороди, *n*-оксибензой кислотанинг карбонил гуруҳи кислороди ва карбоксил гуруҳи кислороди Ca^{2+} иони билан боғланиш ҳосил қилиб, бунда тўртта кучли ва иккита кучсиз боғни юзага келтиради.

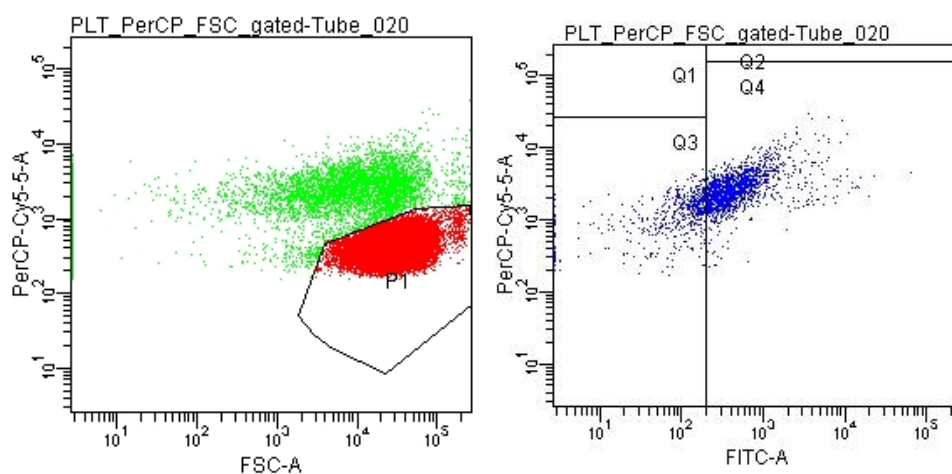
Диссертациянинг «**Ферутининнинг одам тромбоцитларида Ca^{2+} гомеостази ва Ca^{2+} га боғлиқ функционал кўрсаткичларига таъсирини ўрганиш**» деб номланган бешинчи бобида ферутининнинг одам қони тромбоцитларида Ca^{2+} ни оширувчи таъсири, унинг агрегация ва яширин фибриноген рецепторлар экспрессиясига таъсири механизмини ўрганиш бўйича маълумотлар келтирилган.

Олдин Jurkat Т-лимфобласт хужайралар линияси культурасида ферутинин L-тип Ca^{2+} -каналларининг очилиши йўли билан, шунингдек ушбу ионларнинг хужайра ичидаги деполардан ажралиши ҳисобига $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорини ошириш хоссасига эгаллиги аниқланган (Macho et al., 2004). Ушбу

йўналишдаги тадқиқотларнинг ривожлантирилиши сифатида биз хужайрада Ca^{2+} -транспорт тизимларининг ингибиторларидан фойдаланиб, ферутининнинг одам қони тромбоцитларида Ca^{2+} ни оширувчи таъсир механизмини аниқладик.

Ушбу тажрибалар сериясида қон тромбоцитлари специфик CD61-PerCP антитело ёрдамида аниқланди, хужайра ичидаги кальций миқдори ичкарига кириб борувчи, Ca^{2+} -сезгир Fluo-3 зондидан фойдаланиб қайд қилинди (2-расм), бунда тромбоцитларда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорини оширувчи классик индуктор ҳисобланган АДФ дан фойдаланилди.

Олинган натижаларга кўра, ферутинин 50 мкМ концентрацияда тромбоцитларда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорининг ошиши билан ифодаланувчи классик индуктор ҳисобланган АДФ таъсирига ўхшаш таъсирни юзага келтиради.



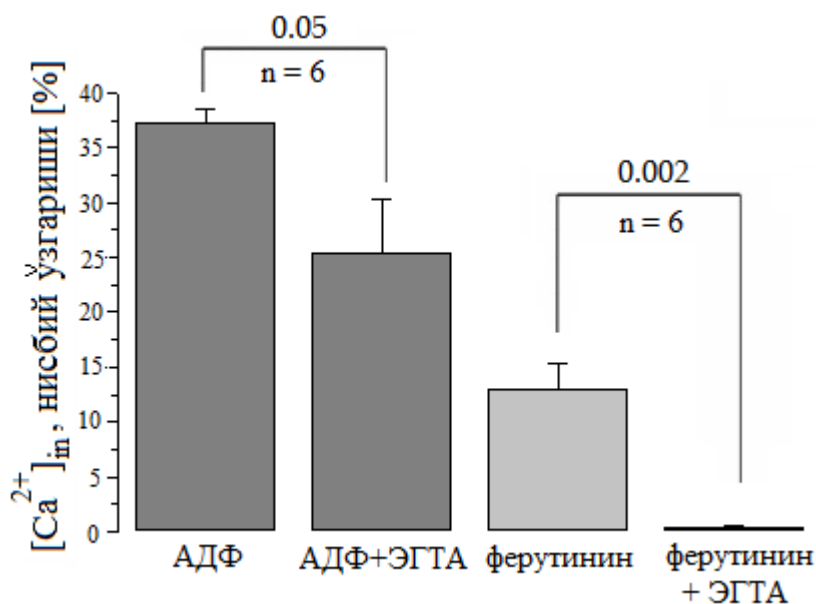
2-расм. Ферутинин мавжуд шароитда PerCP (FSC-A) билан бўялган қон тромбоцитлари популяциясида Fluo-3 (FITC-A) флуоресценция интенсивлиги.

Олинган натижаларга кўра, ферутинин 50 мкМ концентрациясида тромбоцит фаоллашувининг классик индуктори – АДФ га ўхшаш таъсир $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ нинг ошиши билан намоён бўлди. Хужайра ташқарисидagi Ca^{2+} хелатори ҳисобланган ЭГТА мавжуд шароитда АДФ-индуцирланган $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ўсиши 37,2±3,0% дан 25,4±2,2% гача камайиши қайд қилинди, ферутинин индуцирланган $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ ўсиши эса ЭГТА мавжуд шароитда минимал 0,4±1,5% бўлган, ЭГТА сиз муҳитга нисбаттан 13,0±3,0 бўлган (3-расм).

Тромбоцитларнинг плазматик мембранаси орқали АДФ ва ферутинин таъсиридаги Ca^{2+} транспорти механизмига аниқлик киритиш мақсадида биз плазматик мембранада жойлашган Ca^{2+} -каналлари ингибиторларидан фойдаланиб тажрибаларни амалга оширдик.

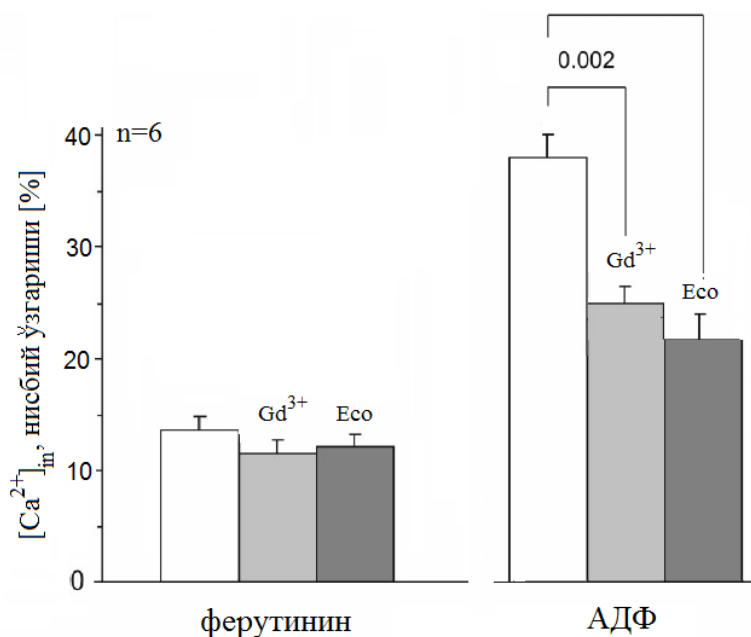
Тромбоцитларнинг плазматик мембрана Ca^{2+} -каналлари ингибитори - гадолинийум (Gd^{3+}) ионлари (Wieclawska et al., 2001, Treiber et al., 2005), шунингдек депо орқали бошқарилувчи Ca^{2+} -каналлари блокатори - эконазол (Sargeant et al., 1994; Jenner et al., 1996) билан ишлов берилиши ферутинин таъсирида юзага келтирилган $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорининг ортишини фақат

сезиларсиз даражада камайтириши - яъни, мос равишда - $5,6 \pm 0,9\%$ ва $4,3 \pm 1,8\%$ га камайтириши аниқланди.



3-расм. ЭГТА мавжуд шароитда ферутинин ва АДФ нинг одам тромбоцитларида ҳужайра ичидаги Ca^{2+} миқдорига таъсири. Илова: Ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); ЭГТА (1мМ). I - фарқланишнинг ишончилиги $p \leq 0,05$.

Аксинча, ушбу ингибиторлар мавжуд шароитда АДФ таъсирида юзага келтирилган $[Ca^{2+}]_{цит.}$ миқдорининг ортиши етарли даражада сезиларли камайиши - яъни, мос равишда - $33,5 \pm 1,6\%$ ва $41,6 \pm 1,9\%$ га камайиши аниқланди (4-расм).



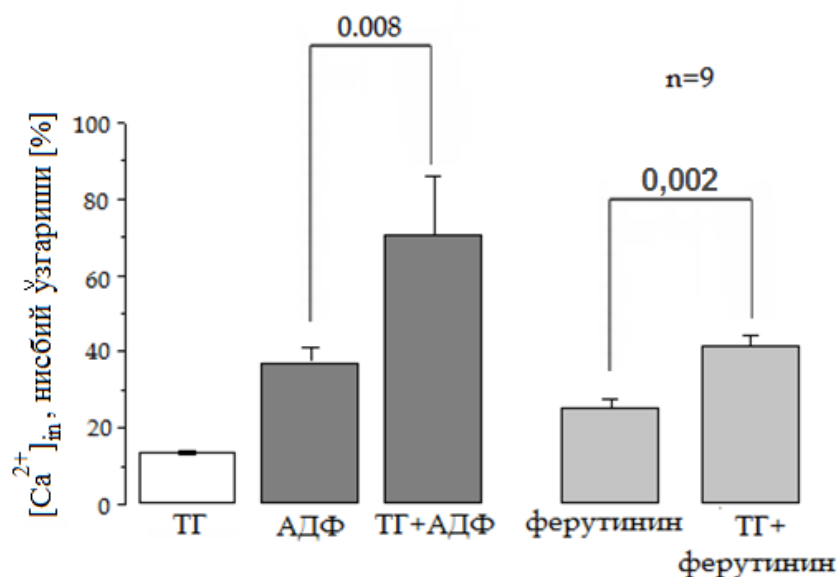
4-расм. Плазматик мембрана Ca^{2+} -каналлари блокаторлари мавжуд шароитда ферутинин ва АДФ нинг одам тромбоцитларида ҳужайра ичидаги Ca^{2+} миқдорига таъсири. Илова: ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); Gd^{3+} (100 мкМ); Eco (эконазол) (50 мкМ)). I - фарқланишнинг ишончилиги $p < 0,05$

Шундай қилиб, ферутинин таъсирида тромбоцитларда Ca^{2+} миқдорининг ортиши унинг плазматик мембранада жойлашган потенциалга боғлиқ ёки депога боғлиқ бошқарилувчи Ca^{2+} -каналларига эҳтимолли мавжуд таъсирига боғлиқ эмас.

Ушбу кўринишда биз эндоплазматик ретикулум Ca^{2+} -АТФазасининг специфик ингибитори - тапсигаргиннинг ферутининнинг Ca^{2+} ни оширувчи эффектига таъсирини ўргандик. Маълумки, тапсигаргин таъсирида дастлаб хужайра ички депосидан Ca^{2+} нинг чиқиши амалга ошади, кейин эса - депонинг бўшаб қолиши билан, ташқи муҳитдан Ca^{2+} ионларининг кириши фаоллашади (Sasaki et al., 1993).

Тромбоцитларнинг олдиндан тапсигаргин билан инкубацияланиши тромбоцитларда $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорининг назоратдаги миқдорига нисбатан $13,4 \pm 0,2\%$ га ортишини юзага келтирди. Тапсигаргин мавжуд шароитда АДФ таъсирида юзага келтирилган $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ миқдорини оширувчи таъсири $70,7 \pm 7,6\%$ ни ташкил қилди, яъни бунда АДФ юзага келтирувчи таъсир 1,9 мартага ($37,2 \pm 1,8\%$) ортиши қайд қилинди.

Тапсигаргин мавжуд шароитда ферутининнинг Ca^{2+} ни оширувчи таъсири сезиларли даражада паст бўлиб, $28,0 \pm 1,8\%$ ни ташкил қилади, бунда тапсигаргин мавжуд бўлмаган шароитда ушбу қиймат $25,4 \pm 1,1\%$ ни ташкил қилиши қайд қилинади (5-расм).

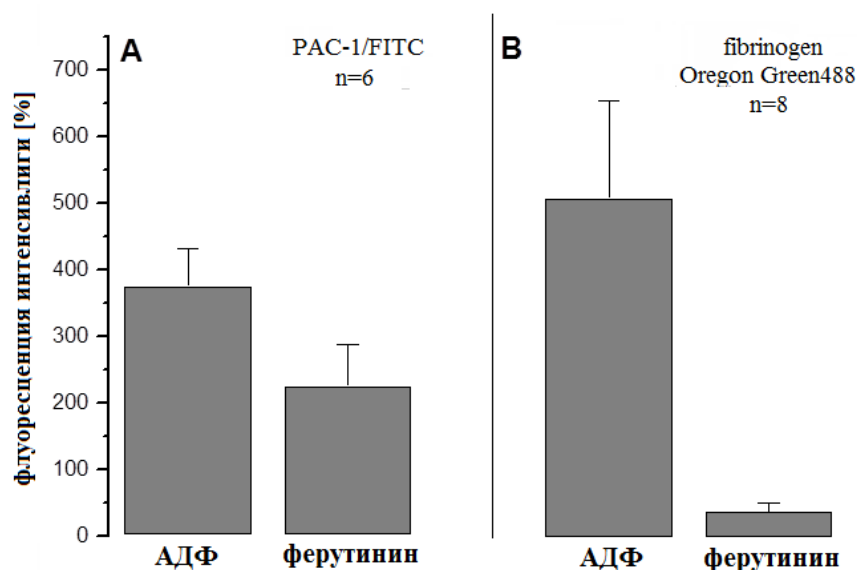


5-расм. Тапсигаргин мавжуд шароитда ферутинин ва АДФ нинг одам тромбоцитларида хужайра ичидаги Ca^{2+} миқдорига таъсири. Илова: ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); тапсигаргин (1 мкМ).

Маълумки, Ca^{2+} ионлари тромбоцитларнинг фаоллашишининг турли хил босқичларида, жумладан фибриноген рецепторларнинг экспрессиясида иштирок этиши аниқланган бўлиб (Moro, 2005), биз тадқиқотларда ферутининнинг уларнинг фаоллашиши ва фибриноген билан таъсирлашишига таъсирини аниқладик.

Ферутининнинг қонда тромбоцитларда фибриноген рецепторларнинг фаоллашишига таъсири АДФ нинг таъсирига нисбатан сезиларли даражада

кучсиз ифодаланиши қайд қилинди: яъни, бунда GPIIb-IIIa комплексларнинг фаоллаштирилган шакллари экспрессияланиши ферутинин таъсирида 2,2 мартага ортиши, АДФ учун эса - бу қиймат 3,7 га тенглиги аниқланди (6А-расм).



6-расм. Ферутинин ва АДФ нинг одам тромбоцитларида фибриноген рецепторларининг экспрессияси (А) ва фибриногеннинг фаоллашишига таъсири (Б). Илова: ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); тапсигаргин (1 мкМ). I - фарқланишнинг ишончлилиги $p < 0,05$.

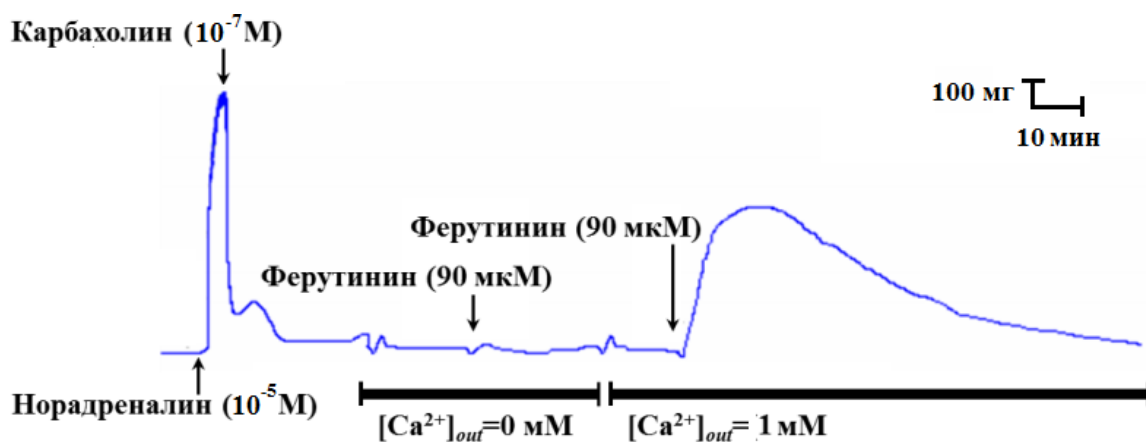
Ферутинин ва АДФ мавжуд шароитда тромбоцитлар юзасида жойлашган рецепторларга фибриногеннинг боғланишини ўрганишда ўрганилаётган бирикмаларнинг таъсиридаги ўзаро фарқланиш яна ҳам яққол ифодаланиши қайд қилинди. Шундай қилиб, бунда АДФ назоратга нисбатан фибриногеннинг боғланишини 5,11 мартага ошириши, ферутинин эса - 1,8 мартага ошириши аниқланди, бироқ унинг таъсири статистик ишонарли даражада бўлмаслиги қайд қилинди (6Б-расм).

Одам қони тромбоцитлари агрегацияси бўйича тажрибаларда АДФ таъсирида юзага келтирилган ва мусбат назорат сифатида қабул қилинган тромбоцитлар агрегацияси $90,1 \pm 2,5$ шартли бирликни ташкил қилиши аниқланди, шунингдек ферутинин учун ушбу қиймат бор-йўғи $8,3 \pm 0,6$ ни ташкил қилиши қайд қилинди.

Шундай қилиб, биз тадқиқотларда ферутинин тромбоцитларнинг ички қисмида Ca^{2+} миқдорини ошириши, тромбоцитларда GPIIb/IIIa рецепторларнинг фаол шакллари экспрессияланишини юзага келтириши, бироқ уларни агрегациясини юзага келтирмаслигини аниқладик.

Диссертациянинг «Ферутининнинг силлик мускулларнинг қисқариш ҳолатига таъсирини ўрганиш» деб номланган олтинчи бобида ферутининнинг каламушдан ажратиб олинган кўкрак аортаси фрагментларининг изометрик қисқаришига таъсирини ўрганиш натижалари келтирилган. Биз тадқиқотларда ферутинин фақат Ca^{2+} ионлари мавжуд

шароитдагина каламуш аортасида дозага боғлиқ қисқаришни юзага келтиришини аниқладик. Шундай қилиб, ферутинин 30, 60 ва 90 мкМ концентрацияларда аорта қисқариш кучини назоратга нисбатан мос равишда - $3 \pm 0,04\%$, $32,12 \pm 1,6\%$ ва $58,1 \pm 3,4\%$ га ошириши аниқланди.



7-расм. Ферутининнинг каламуш аортаси фрагментлари изометрик қисқариш фаоллигига муҳитда Ca^{2+} ионлари мавжудлигига боғлиқ таъсири.

Препаратни ювиб турган эритма таркибида Ca^{2+} ионлари мавжуд бўлмаган шароитда ферутинин максимал фойдаланилган концентрацияда (90 мкМ) каламуш аортасининг изометрик қисқаришига таъсир кўрсатмади. Бироқ, аорта фрагментларини ювиб турувчи эритмани таркибида 2,5 мМ CaCl_2 мавжуд бўлган ювиб турувчи эритмага ўрин алмаштиришдан кейин, ферутинин (90 мкМ) томирнинг қисқариш кучи кескин ортишини келтириб чиқариши аниқланди (7-расм). Тезкор тавсифдаги фаза қисқаришнинг муҳитда Ca^{2+} ионлари мавжудлигига қатъий тарздаги боғлиқлиги сўзсиз равишда, ферутининнинг Ca^{2+} -ионофор фаоллиги амалга ошиши билан боғлиқ ҳисобланади. Ферутинин таъсирида барча ўрганилган концентрациялар диапазонида юзага келтирилган аорта фрагменти қисқаришидан кейин томирнинг бўшашиш фазаси нисбатан секин амалга ошиши кузатилди. Бунда биз кузатган ферутининнинг релаксацияга таъсирида эҳтимоллиги мавжуд механизмлардан бири - ҳужайра ичида цАМФ миқдорининг ортиши бўлиши мумкин. Шунини қайд қилиш керакки, классик эстроген ҳисобланган 17β -эстрадиол каламуш ўпка артериясида айнан эстроген орқали аденилатциклаза фаоллашиши ва ҳужайра ичида цАМФ миқдори ортиши ҳисобига релаксацияни келтириб чиқариши аниқланган (Farhat et al., 1996).

Юқорида келтирилган маълумотларга боғлиқ ҳолатда, бизнинг тадқиқотларимизнинг навбатдаги босқичи ферутининнинг каламуш юраги мембраналари препаратида аденилатциклаза фаоллигига таъсирини ўрганишдан ташкил топди. Бунда ферутинин мавжуд шароитда аденилатциклазанинг фаоллашган ҳолатда бўлиши ҳақида $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{цАМФ}$ ҳосил бўлиши бўйича хулоса чиқарилди. Биз тақиқотларда ферутинин 50, 75 ва 100 мкМ концентрацияларда мембранада дозага боғлиқ ҳолатда аденилатциклаза фаоллашишини юзага келтиришини аниқладик, яъни бу

қиймат 100% деб қабул қилинган назоратга нисбатан мос равишда - $129,5 \pm 6,8\%$, $174,9 \pm 11,0\%$ и $263,8 \pm 14,0\%$ га тенг бўлиши аниқланди. Биз олган маълумотлар ферутинин таъсирида цАМФ микдорининг ортиши аортанинг бўшашишидаги роли ҳақидаги тахминимизни тасдиқлайди. Эҳтимол, айнан ушбу механизм ферутининнинг хужайра ички қисмида Ca^{2+} миқдори юқори бўлган шароитдаги дезагрегацияни келтириб чиқарувчи таъсири асосида ётиши мумкин.

Ушбу тадқиқот доирасида биз ўсимлик терпеноиди ферутининнинг Ca^{2+} -ионофор фаоллиги ва ҳайвон хужайраларида Ca^{2+} гомеостази ҳамда Ca^{2+} га боғлиқ айрим жараёнларнинг алоҳида ҳалқаларига эстрогенга ўхшаш таъсирини ўргандик.

ХУЛОСАЛАР

1. Ферутинин Ca^{2+} ионлари сув/ҳаво чегара фазаси битта ферутинин молекуласига тўғри келувчи юза майдоннинг камайиши билан биргаликда мусбат адсорбция билан ифодаланувчи барқарор ҳолатдаги моно-қатламни шакллантиради.

2. Эркин ферутинин молекуласи 4-гидробензой кислотанинг водород боғлари бўйича димеризацияланади. Ca^{2+} ионлари билан комплекснинг шаклланиши ферутинин молекуласининг фазода параллел ва анти-параллел тавсифда қайта жойлашиши ҳисобига водород боғларининг бузилиши билан спиртнинг гидроксил гуруҳидаги кислород, мураккаб эфирнинг карбонил гуруҳидаги кислород ва бензой кислотанинг карбоксил гуруҳидаги кислород орқали амалга ошади.

3. Ферутинин-индуцирланган Ca^{2+} -ионофор хоссаси амалга ошиши натижасида тромбоцитларда цитозолдаги кальцийни оширади ва тромбоцитларнинг фибриноген рецепторлари ва каламушнинг дозага боғлиқ аорта қисмларининг қисқарилиши фаоллашишини юзага келтиради.

4. Ферутинин, эстрогенга ўхшаш эффектни амалга ошириб, аденилатциклаза фаоллигини рағбатлантиради, чунки бу каламушнинг юрак мембраналарда цАМФ концентрациясининг доза-боғлиқлигинини ортиши изохлаб беради.

5. Ферутинин иштирокида цАМФ концентрацияси ўсиши бу модда билан индурцирланган хужайра ичидаги Ca^{2+} мобилизация қилиш шароитида тромбоцит агрегацияси самарасининг йўқлигини изохлаб беради.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИООРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ, НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА,
ИНСТИТУТЕ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА

ЧАРЫШНИКОВА ОКСАНА СТАНИСЛАВОВНА

**КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ФИТОЭСТРОГЕНА ФЕРУТИНИНА**

03.00.02-Биофизика и радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ
ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)**

Ташкент-2018

Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.2.PhD/B66.

Диссертация выполнена в Национальном университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека

Автореферат диссертации на трех языках (русский, узбекский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.biochem.uz) и на Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный руководитель:

Замараева Мария Всеволодовна
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Хушбакова Зайнаб Абдурахмановна
доктор биологических наук, профессор

Мерзляк Петр Григорьевич
доктор биологических наук

Ведущая организация:

Ташкентский Фармацевтический институт

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. в __ часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 при Институте биоорганической химии, Национальный университет Узбекистана, Институте химии растительных веществ (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871)262-70-63).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии (регистрационный номер №.....). (Адрес: 10 0125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2018 года
(реестр протокола рассылки № «__» от _____ 2018).

Ш.И.Салихов

Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., академик

М.И.Асраров

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

Ш.У.Турдикулова

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н.

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире остается актуальной проблема, направленная на поиск эффективных биологически-активных соединений, способных прямо или опосредованно модулировать транспорт Ca^{2+} через биологические мембраны, регулируя, таким образом, концентрацию цитозольного Ca^{2+} и связанные с ним фундаментальные клеточные процессы и патологические состояния. В этой связи, несомненный научный интерес представляют соединения растительного происхождения как потенциальные фармакологические модуляторы транспорта Ca^{2+} , что обусловлено практическим отсутствием у них токсичности по сравнению с синтезированными соединениями и зачастую - многовековым опытом использования в народной медицине. Одним, из таких соединений является ферутинин - сложный эфир ферутинола и п-оксибензойной кислоты, изолированный из растений рода *Ferula*.

В мировой научно-исследовательской практике растительный терпеноидферутинин нашел применение как селективный модулятор транспорта кальция через биологические мембраны, благодаря ранее обнаруженным Ca^{2+} -ионофорным свойствам данного соединения. В настоящее время в мире ведутся интенсивные исследования биологических эффектов ферутинина на разных типах клеток, которые позволили обнаружить широкий спектр биологических эффектов данного соединения, включая эстрогенную, антиостеопорозную, про- и антипролиферативную, нейромодулирующую и апоптоз-индуцирующую активности. Вместе с тем, молекулярные и клеточные основы столь широкого круга биологических эффектов ферутинина все еще остаются недостаточно раскрытыми.

В Узбекистане особое внимание уделяется разработке технологий производства необходимых для медицины и сельского хозяйства лекарственных средств на основе растений рода *Ferula*³. На основе программных мер, предпринятых в этом направлении, создаются все условия для эффективного внедрения научных и инновационных разработок и достигнуты конкретные результаты по исследованию механизмов действия индивидуальных биологически-активных соединений, выделенных из растений рода *Ferula*, как потенциальных лекарственных средств. Конкретные задачи, реализуемые в данном направлении, отмечены в Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан в четвертом приоритетном направлении «Развитие фармацевтической промышленности, а также обеспечение населения и медицинских учреждений дешевыми высококачественными лекарствами и медицинскими изделиями»⁴. В данном контексте, в т.ч. детальное исследование влияния

³ Постановление Президента Республики Узбекистан ПП-3617 «О мерах по созданию в Республике плантаций ферулы, увеличению объема переработки ее сырья и экспорта».

⁴Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

ферутина на клеточные механизмы регуляции Ca^{2+} -гомеостаза и Ca^{2+} -зависимые процессы позволит расширить спектр применения лекарственных препаратов на основе ферутина.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлении Президента Республики Узбекистан ПП-3617 от 20 марта 2018 года «О мерах по созданию в Республике плантаций ферулы, увеличению объема переработки ее сырья и экспорта», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды» и VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. Впервые в мире, из растений *Ferula tenuisecta*, под руководством проф. Саидходжаева А.И. в ИХРВ выделен ряд сложных эфиров ароматических кислот, одним из которых является ферутинин - сложный эфир сесквитерпенового спирта каротанового ряда с оксибензойной кислотой. Обнаруженные биологические эффекты ферутина обусловили широкий интерес к этому терпеноиду в мировой научном сообществе. Так, группой ученых под руководством проф. Мачо (Италия), а также проф. А. Абрамовым и проф. М. Дучен (Великобритания) было показано, что ферутинин вызывает увеличение концентрации цитозольного кальция в разных типах клеток и способствует накоплению Ca^{2+} в митохондриях с последующей их деполяризацией, которая предотвращается ЦсА. Научные исследования, направленные на изучение широкого спектра биологических свойств ферутина осуществляются в ряде научных центров и высших образовательных учреждениях мира, в том числе University of Bialystok (Польша), Université Libre de Bruxelles (Бельгия), Ferdowsi University of Mashhad (Иран), The Chinese University of Hong Kong (Гонконг).

В странах СНГ ферутинину также уделяется большое внимание, в частности проф. Заводник И.Б. и его группа (Республика Беларусь) изучают влияние ферутина на функциональные параметры изолированных митохондрий. Однако лидирующее место по изучению биологически-активных свойств ферутина, несомненно, принадлежит ученым Узбекистана.

В Узбекистане результаты по изучению биологических эффектов ферутина привели к созданию отечественного лекарственного препарата Тефестрол, который применяется в акушерско-гинекологической практике в Узбекистане; он охарактеризован как низкотоксичное соединение, не проявляющее канцерогенных и тератогенных свойств. Смесь терпеноидов, выделенных группой авторов из *Ferula tenuisecta*, послужила основой для

разработки биостимулятора эстрогенного действия «Паноферол» (Авт.Св. N948365, 1981). Данный препарат ускоряет процесс полового созревания кур и яйцеобразования, а также способствует кальцификации сформировавшихся желтков. Под руководством проф. Замараевой М.В. было обнаружено, что ферутинин, проявляет свойства электрогенного Ca^{2+} -ионофора и увеличивает ионную проницаемость биологических и искусственных липидных мембран для ионов Ca^{2+} . Многочисленные исследования действия ферутинина на костную ткань показали, что данное соединение способствует восстановлению структуры костной ткани и предупреждает развитие эстроген-дефицитного остеопороза.

В связи с разнообразием биологических эффектов ферутинина и учитывая масштабный научный интерес к механизмам их реализации, осуществление исследования, направленного на изучение физико-химических характеристик комплексообразования ферутинина с Ca^{2+} , механизма его Ca^{2+} -повышающего эффекта и регуляции ключевых Ca^{2+} -зависимых процессов, составляющих основу настоящей работы, является актуальным и имеет несомненную научно-практическую значимость.

Связь исследования с планом научно-исследовательских работ высшего учебного заведения и научно-исследовательской организации, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательской работы Национального Университета Узбекистана по теме «Изучение мембраносвязанных процессов»; в рамках международной программы SCOPES по проекту IB74A0-110940 «Calcium dysregulation as trigger of apoptosis in muscular dystrophy» (2005-2008), а также в рамках проектов, финансируемых ККРНТ, в том числе: «Принципы функционирования биомембран, механизм действия на мембраны физиологически активных веществ и физических факторов» контракт № Ф 2.28.5. ГКНТ РУз; «Мембранные механизмы регуляции кальциевого гомеостаза и энергетического статуса животных клеток» контракт № Ф-4.1.36 ЦНиТРУз; «Исследование биофизических принципов формирования, структуры и регуляции наноскопических пор в искусственных и биологических мембранах» контракт № ОТ-ФЗ-141; «Изучение механизма действия некоторых биорегуляторов» контракт Ф5-06.

Целью исследования является оценка физико-химических характеристик комплексообразования ферутинина в отношении ионов кальция и выяснение принципа его влияния на ключевые Ca^{2+} -зависимые процессы в животных клетках.

Задачи исследования:

исследовать поверхностно-активные свойства мономолекулярных слоев ферутинина в присутствии ионов кальция;

выявить функциональные группы в молекуле ферутинина, участвующие в формировании комплексов с ионами кальция;

исследовать принцип Ca^{2+} -повышающего эффекта ферутинина и его влияние на ключевые кальций-зависимые процессы в тромбоцитах человека;

исследовать влияние ферутина на сокращение гладкой мускулатуры аорты крыс;

исследовать влияние ферутина на активность аденилатциклазы мембран сердца крыс.

Объектом исследования являются суммарная фракция мембран сердца и фрагменты аорты, изолированные из беспородных белых крыс. В экспериментах на тромбоцитах была использована донорская кровь.

Предметом исследования являются кальций-комплексирующие свойства и регуляция Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов сесквитерпеноидом ферутином.

Методы исследования. В диссертационном исследовании использованы современные биохимические и биофизические методы исследования: метод инфракрасной спектроскопии; метод ленгмюровских пленок для оценки поверхностных свойств монослоев на границе раздела вода/воздух; флуориметрический метод измерения цитозольного кальция с использованием Fura-2AM; метод проточной цитометрии для измерения цитозольного кальция, экспрессии GPIIb/IIIa рецепторов и фибриногена в тромбоцитах цельной крови с использованием флуоресцентных зондов и меченых специфичных антител; импедансный метод изучения агрегации тромбоцитов в цельной крови; хроматографический метод определения цАМФ в мембранах сердца крыс с использованием радиоактивно меченного $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$; метод регистрации изометрического сокращения фрагментов аорты крысы с использованием механо-электрического преобразователя (механотрона).

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

доказаны поверхностно-активные свойства ферутина, усиливающиеся в присутствии ионов Ca^{2+} и уменьшение площади поверхности молекулы ферутина при комплексообразовании с Ca^{2+} ;

определены группы молекулы ферутина участвующие в формировании комплексов с ионами кальция, представлена модель пространственной переориентации молекул ферутина в процессе формирования комплекса;

обнаружена активация фибриногеновых рецепторов в тромбоцитах связанная с ферутинин-индуцируемым увеличением внутриклеточного Ca^{2+} ;

определен механизм дезагрегации тромбоцитов в условиях ферутинин-индуцируемой мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} .

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

определены группы молекулы ферутина, участвующие в комплексообразовании с Ca^{2+} , показано, что комплекс ферутинин: Ca^{2+} со стехиометрией 2:1 формируется через кислород фенольного гидроксила, и кислород сложноэфирной карбонильной группы бензойной кислоты;

доказано влияние ферутина на функциональные параметры тромбоцитов цельной крови человека: ферутинин-индуцированное

увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в тромбоцитах вызывает поверхностную экспрессию GPIIb-IIIa рецепторов;

доказано отсутствие влияния ферутина на процесс агрегации тромбоцитов;

доказано, что фаза сокращения фрагментов аорты крысы в присутствии ферутина связана с реализацией его Ca^{2+} -ионофорной активности, тогда как фаза расслабления обусловлена накоплением ЦАМФ и реализуется за счет его эстрогенной активности.

Достоверность результатов исследования обоснована использованием передовых биохимических и биофизических методов. Выводы сформулированы на основе результатов, обработанных с помощью современных методов математической статистики с использованием критерия Стьюдента или вариационного анализа (ANOVA) с применением компьютерной программы OriginPro7.5 (OriginLabCorporation, США) при уровне доверительной вероятности $P \leq 0,05$. Подтверждением достоверности полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждения полученных результатов на республиканских и международных конференциях, и опубликование результатов исследования в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в том, что состоит в обнаружении характерных особенностей взаимосвязи биологических эффектов ферутина с его мембранной активностью, позволяющих рекомендовать его применение в практике научных исследований в качестве селективного модулятора мембранной проницаемости по Ca^{2+} . Результаты исследования могут быть успешно использованы в подготовке учебников, учебных пособий, а также в практике преподавания биофизики и молекулярной и клеточной физиологии в ВУЗах.

Практическая значимость результатов исследования заключается в отсутствии патологического влияния ферутина на сосудо-тромбоцитарное звено гемокоагуляционного каскада, представленных в данной работе, что расширяет спектр применения лекарственных препаратов на основе ферутина. Следовательно, полученные результаты имеют важное практическое значение для фармакологии и терапии.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов о биологических эффектах фитоэстрогена ферутина на Ca^{2+} -зависимые внутриклеточные процессы:

данные о комплексообразующих свойствах ферутина были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при изучении структурно-функциональных особенностей ферутина и оценке физико-химических характеристик комплексообразования иных хелаторов с ионами Ca^{2+} (*Desalination*, 2017, V.422, N.15, ResearchGate (№ 40), IF - 4.98; *Journal of Membrane Biology*, 2018, V.251, N.4, ResearchGate (№ 40), IF - 2.03; *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2015, V.18, N.11, ResearchGate (№ 40), IF - 0.70; *Current Medicinal Chemistry* 2018. V.25, ResearchGate (№ 40), IF

- 3.09). Результаты позволили охарактеризовать Ca^{2+} -комплексирующие свойства молекул-хелаторов Ca^{2+} ;

данные о биологических Ca^{2+} -модулирующих эффектах ферутина, полученные на тромбоцитах, были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при исследовании Ca^{2+} -зависимых процессов в других типах клеток (*Chemical Research in Toxicology*, 2013, V.26, N.8, ResearchGate (№ 40), IF - 4.65; *Natural Products&Chemical Researches* 2013, V.1, N.3, Directory of Open Access Journals (№ 25), IF - 1.7; *Thrombosis and Haemostasis* 2011, V.106, ResearchGate (№ 40), IF - 4.96). Результаты позволили объяснить антиконвульсантное действие ферутина, его апоптоз-индуцирующую активность в эритроцитах и антиагрегационную активность тамоксифена;

результаты о влиянии ферутина на Ca^{2+} -зависимые процессы в тромбоцитах цитируются американской биотехнологической компанией «Cayman Chemical» (США, Мичиган), в части описания продукта Ferutin, производимого для аналитических и экспериментальных целей (<http://www.caymanchem.com/product/16554>). Результаты расширяют спектр использования ферутина в практике экспериментальных исследований (справка компании «Cayman Chemical» от 13 июля 2018 года).

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 3 международных и 1 республиканской научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 9 печатных работ, из них 5 научных статей, в том числе 3 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 121 страницы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснована актуальность проблемы и востребованность проведенных научных исследований, определено соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, сформулированы цели и задачи, представлен обзор международных научных исследований по теме диссертации, определена степень изученности проблемы, ее научная новизна, обоснована достоверность полученных результатов, предложено их внедрение, а также изложены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Кальциевый гомеостаз и его роль в регуляции клеточных функций**» приведен подробный обзор научных публикаций о роли кальциевого гомеостаза в регуляции клеточных функций,

Ca²⁺-транспортирующих системах клетки, механизмах их взаимодействия и участие в реализации клеточных процессов.

Во второй главе **«Структура и функция растительных терпеноидов»** приведена номенклатура и физико-химические характеристики растительных терпеноидов, подробно описан широкий спектр биологической активности индивидуальных соединений терпеноидной природы и экстрактов, выделенных из растений рода *Ferula*. Особое внимание уделено биологическим и фармакологическим свойствам сесквитерпеноида ферутина.

В третьей главе **«Современные физико-химические и биофизические методы изучения Ca²⁺-зависимых внутриклеточных процессов»** приведено подробное описание материалов, методов выделения биологических объектов, дизайн и протоколы экспериментов, описание оборудования, использованных в данном исследовании. Изучение поверхностно-активных свойств мономолекулярных слоев ферутина на границе раздела фаз вода/воздух проводили методом ленгмюровских пленок, обработку данных, полученных с тензиометра, проводили с использованием программы Nima ST9002. ИК-спектры были записаны на FT-IR спектрофотометре Magna -550 серия II (Nicolet Instrument Corporation, США). Пробы были приготовлены в качестве KBr образцов, запись ИК-спектров проводили со спектральным разрешением 2 см⁻¹. Измерение содержания цитозольного кальция с использованием зонда Fura-2AM проводили на спектрофлуориметре LS50B (Perkin Elmer, Великобритания). Цитофлуориметрический анализ тромбоцитов в цельной крови с использованием меченных селективных антител и флуоресцентных зондов проводили на проточном цитометре LSR II Elite Flow Cytometer (Becton-Dickinson, Германия) по модифицированной процедуре Becton Dickinson [Boncler et al., 2006]. Агрегацию тромбоцитов в цельной крови проводили на импедансном агрегометре Chrono-Log 592 (Chrono-Log, США), согласно стандартному протоколу [Cardinal, Flower, 1980]. Измерение силы сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты крысы проводили в изометрическом режиме [Кожевникова и соавт. 2006] с помощью механотрона. Образование цАМФ в мембранах сердца крыс определяли хроматографическим методом с использованием радиоактивно меченного [α -³²P]АТФ.

В четвертой главе **«Исследование кальция - комплексирующих свойств ферутина»** приведены результаты по исследованию физико-химических характеристик комплексообразования ферутина: Ca²⁺.

Изучение адсорбционных свойств молекул ферутина на границе раздела фаз вода/воздух показало, что ферутинин обладает поверхностно активными свойствами, образует стабильный монослой на границе фаз вода/воздух, вызывая при этом положительную адсорбцию и изменение поверхностного натяжения равное 51,48 мН/м, которое уменьшается в присутствии ионов кальция и составляет 47,37 мН/м. Основываясь на полученных результатах были построены изотермы, расчеты которых

показали трех-кратное уменьшение площади поверхности, занимаемой одной молекулой ферутина в присутствии ионов Ca^{2+} равную $3\text{\AA}^2$, относительно площади поверхности, занимаемой молекулой ферутина в отсутствии ионов кальция и равной $9,2\text{\AA}^2$, что, вероятно, связано с формированием комплекса и пространственной переориентацией молекул ферутина.

Расшифровка ИК-спектров ферутина (Рис.1) показала, что интенсивная полоса поглощения в области $3500\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ с максимумом 3266 см^{-1} , происходит от валентных колебаний фенольного гидроксила, в виду его большей поляризованности по сравнению со спиртовым гидроксидом. Смещение пика в область 3400 см^{-1} свидетельствует о наличии H -связи, а его расширение - о вовлечении данной H -связи в межмолекулярные взаимодействия. В ИК-спектре комплекса ферутина с Ca^{2+} доминирует вклад самого ферутина.

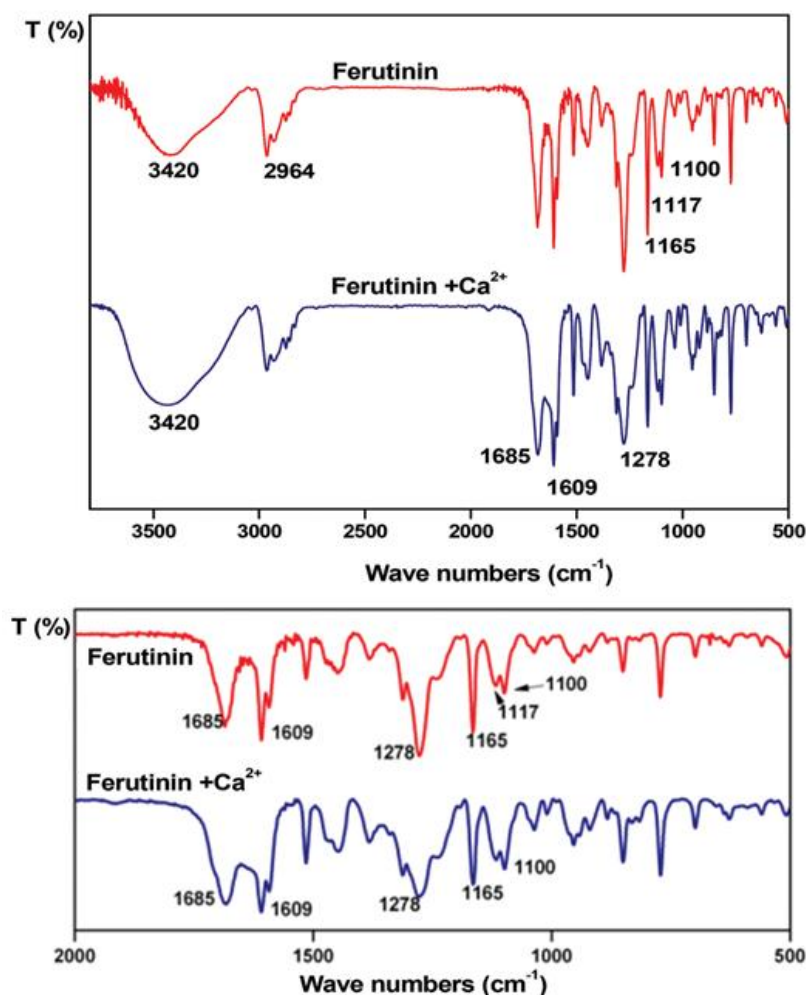


Рисунок 1. Инфракрасные спектры ферутина и его комплекса с Ca^{2+} в KBr таблетках. На нижнем рисунке показан фрагмент ИК-спектров ферутина и его комплекса с Ca^{2+} в диапазоне частот между 2000 и 500 см^{-1} .

Увеличение интенсивностей O-H , C-H и C-O связей в спектрах ферутина с Ca^{2+} (Табл.1) свидетельствует об участии кислорода

спиртового гидроксила и кислорода карбонильной скелетной группы в формировании комплекса с Ca^{2+} .

Таблица 1

Отношение интегральных интенсивностей O-H, C-H и C-O связей в спектрах ферутина и его комплексов с Ca^{2+}

	ферутинин	ферутинин+ Ca^{2+}
$I_{\text{vO-H}}/I_{\text{vC-H}}$	0.98	1.57
$I_{\text{vC-O}}/I_{\text{vC-H}}$	1.27	1.49

Полученные нами экспериментальные результаты согласуются с ранее предложенной моделью комплекса ферутинин:кальций [Abramov et al, 2001], основанной на теоретическом расчете минимальных значений энергии связей, согласно которой две молекулы ферутина связывают ион Ca^{2+} кислородом гидроксильной группы ферутинола, кислородом карбонильной группы *n*-оксibenзойной кислоты и карбоксильным кислородом, образуя при этом четыре сильные и две слабые связи.

В пятой главе «Исследование влияния ферутина на Ca^{2+} гомеостаз и Ca^{2+} -зависимые функциональные параметры тромбоцитов человека» приведены данные по исследованию механизма Ca^{2+} -повышающего эффекта ферутина в тромбоцитах цельной крови человека, их агрегацию и экспрессию скрытых фибриногеновых рецепторов.

Ранее, на культуре линии Т- лимфобластных клеток Jurkat, было показано, что ферутинин способен увеличивать уровень $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ путем открывания Ca^{2+} -каналов L-типа, а также за счет высвобождения этих ионов из внутриклеточных пулов [Macho et al., 2004]. Как развитие исследований в данном направлении, нами был исследован механизм Ca^{2+} -повышающего действия ферутина в тромбоцитах цельной крови с применением ингибиторов Ca^{2+} -транспортирующих систем клетки.

В этой серии экспериментов тромбоциты в цельной крови были выявлены с помощью специфического антитела - CD61-PerCP, уровень внутриклеточного кальция регистрировали с использованием Ca^{2+} -чувствительного проникающего зонда Fluo-3 (Рис.2), в качестве классического индуктора, повышающего $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в тромбоцитах, был использован АДФ.

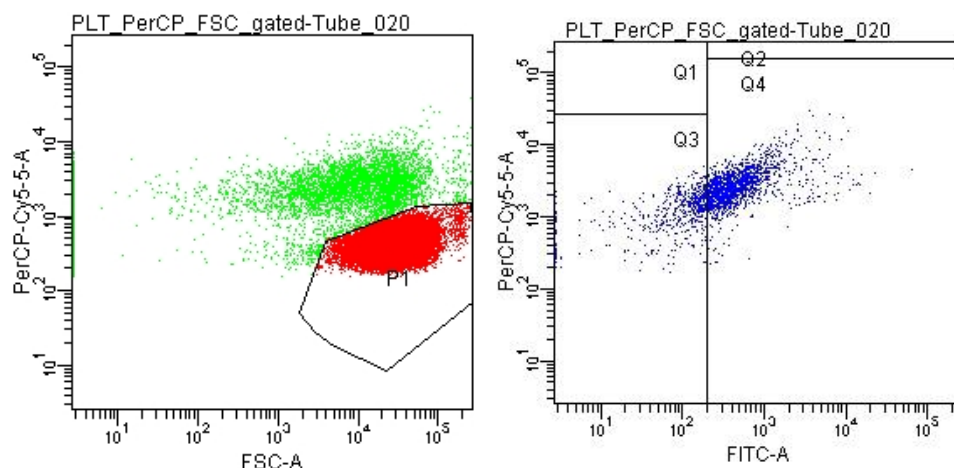


Рисунок 2. Интенсивность флуоресценции Fluo-3 (FITC-A) в популяции тромбоцитов цельной крови, окрашенных PerCP (FSC-A) в присутствии ферутина.

Согласно полученным результатам, ферутинин в концентрации 50 мкМ вызывал эффект, подобный действию классического индуктора активации тромбоцитов - АДФ, выражающийся в увеличении уровня $[Ca^{2+}]_{цит}$. В присутствии хелатора внеклеточного Ca^{2+} - ЭГТА, эффект АДФ-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_{цит}$ снижался с $37,2 \pm 3,0\%$ до $25,4 \pm 2,2\%$, тогда как ферутинин-индуцированное повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$ в присутствии ЭГТА было минимальным - $0,4 \pm 1,5\%$ относительно эффекта в среде без ЭГТА - $13,0 \pm 3,0\%$ (Рис.3).

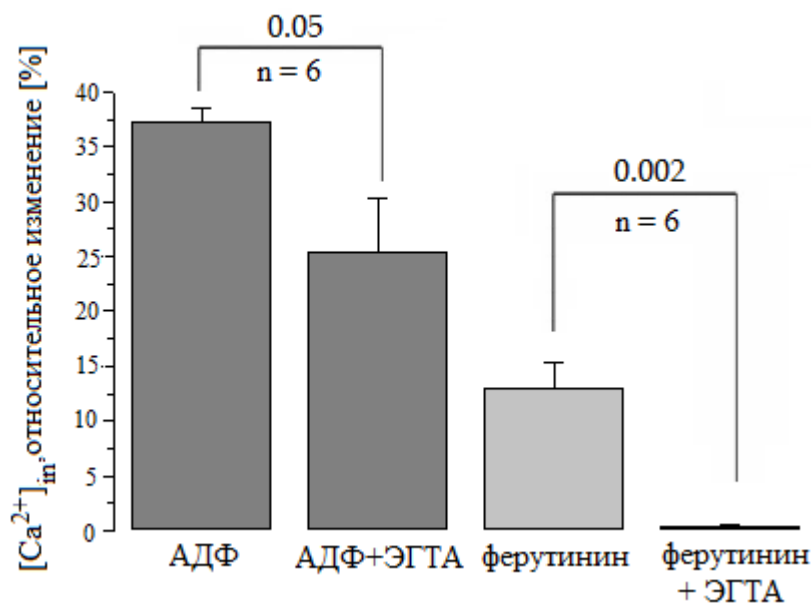


Рисунок 3. Влияние ферутина и АДФ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах человека в присутствии ЭГТА. Примечание: Ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); ЭГТА (1мМ). I - Достоверность различий $p \leq 0,05$.

С целью выяснения механизмов АДФ- и ферутинин-опосредованного транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану тромбоцитов нами были

проведены эксперименты с использованием ингибиторов Ca^{2+} -каналов плазматических мембран.

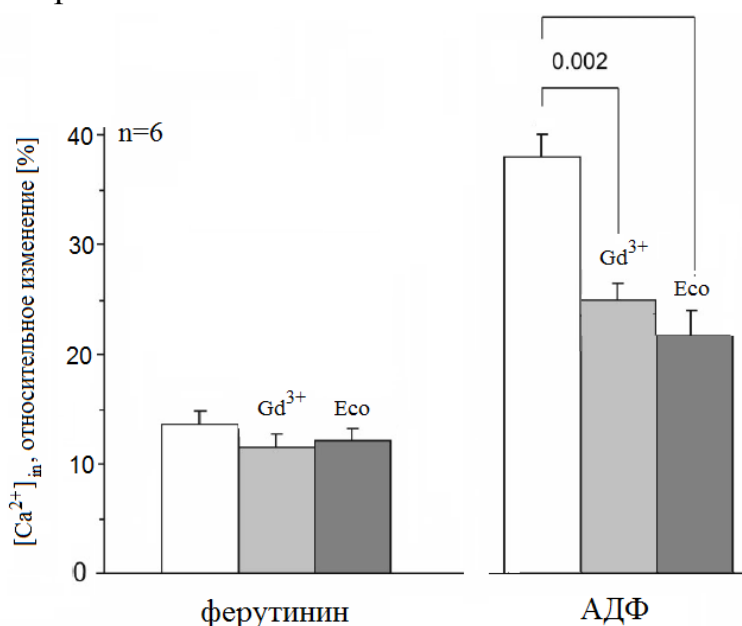


Рисунок 4. Влияние ферутинина и АДФ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах человека в присутствии блокаторов Ca^{2+} -каналов плазматических мембран. Примечание: ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ); Gd^{3+} (100 мкМ); Есо (эконазол) (50 мкМ)). I- Достоверность различий: $p < 0,05$

Обработка тромбоцитов ионами гадолиния (Gd^{3+}) - ингибиторами потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов плазматических мембран [Wieclawska et.al, 2001, Treiber et al, 2005], а также эконазолом - блокатором депо-управляемых Ca^{2+} -каналов [Sargeant et.al, 1994; Jenner et. Al, 1996] лишь незначительно снижала ферутинин - индуцированный прирост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ - на $5,6 \pm 0,9\%$ и $4,3 \pm 1,8\%$, соответственно. Напротив, АДФ - индуцированное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ снижалось в присутствии этих ингибиторов гораздо существеннее - на $33,5 \pm 1,6\%$ и $41,6 \pm 1,9\%$, соответственно (Рис.4). Таким образом, в случае тромбоцитов Ca^{2+} -повышающий эффект ферутинина не связан с возможным влиянием на потенциал-зависимые или депо-управляемые Ca^{2+} каналы плазматических мембран.

Таким же образом, нами было изучено влияние специфического ингибитора Ca^{2+} -АТРаза мембран эндоплазматического ретикулума тапсигаргина на Ca^{2+} - повышающий эффект ферутинина.

Известно, что при действии тапсигаргина сначала происходит выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а затем, по мере опустошения последних, активируется вход Ca^{2+} из внеклеточной среды [Sasaki, et al., 1993].

Предварительная инкубация тромбоцитов с тапсигаргином вызывала увеличение содержания $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в тромбоцитах на $13,4 \pm 0,2\%$ относительно базального уровня. Ca^{2+} -повышающий эффект АДФ в присутствии тапсигаргина составил $70,7 \pm 7,6\%$, что в 1,9 раз превышает АДФ-индуцированный эффект ($37,2 \pm 1,8\%$).

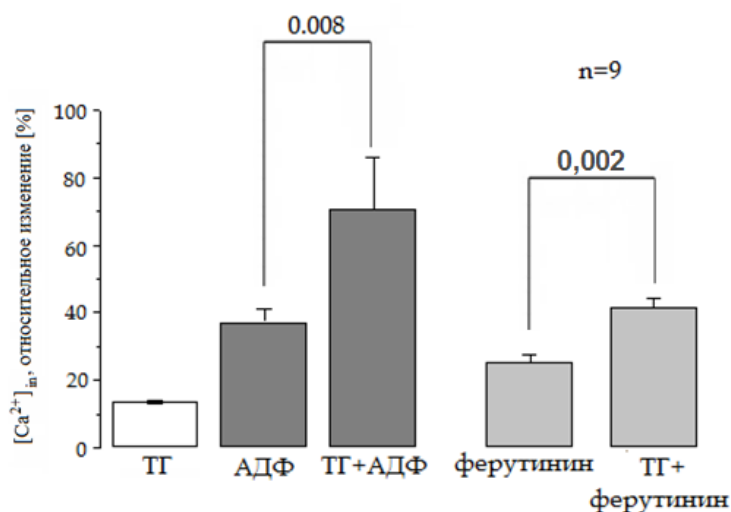


Рисунок 5. Влияние Ферутина и АДФ на уровень внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах человека в присутствии тапсигаргина. Примечание: ферутинин (50мкМ); АДФ (5мкМ); тапсигаргин (1мкМ).

В случае ферутина, Ca^{2+} -повышающий эффект в присутствии тапсигаргина был значительно ниже - $28,0 \pm 1,8\%$, против $25,4 \pm 1,1\%$ в отсутствие тапсигаргина (Рис.5). Поскольку известно, что ионы Ca^{2+} принимают участие на разных этапах активации тромбоцитов, в том числе и экспрессии фибриногеновых рецепторов [Мого, 2005], нами было исследовано влияние ферутина на их активацию и взаимодействие с фибриногеном.

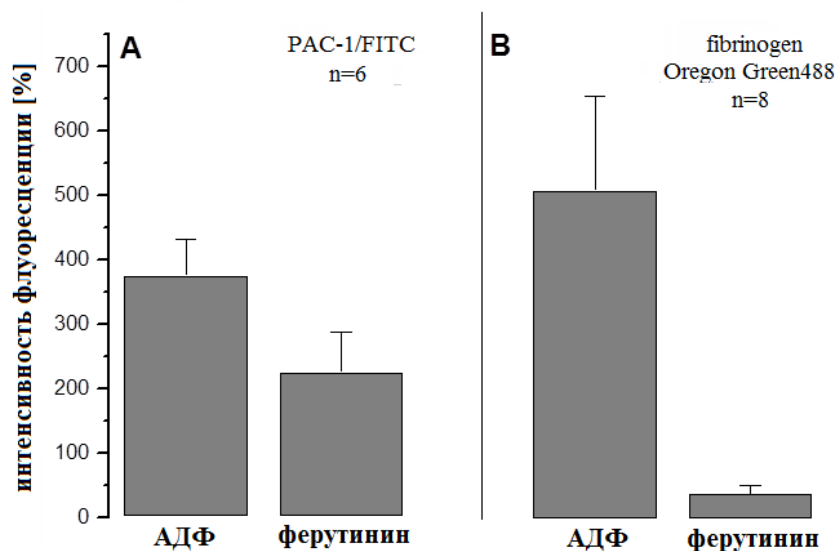


Рисунок 6. Влияние ферутина и АДФ на экспрессию фибриногеновых рецепторов (А) и активацию фибриногена (В) в тромбоцитах человека. Примечание: Ферутинин (50 мкМ); АДФ (5 мкМ). I- Достоверность различий: $p < 0,05$.

Эффект ферутина на активацию фибриногеновых рецепторов тромбоцитов в цельной крови оказался значительно слабее эффекта АДФ: экспрессия активированных форм комплексов GPIIb-IIIa возросла в 2,2 раз в ответ на ферутинин, тогда как для АДФ это значение было равно 3,7. (Рис.6А).

При исследовании связывания фибриногена с рецепторами на поверхности тромбоцитов в присутствии ферутина и АДФ разница в эффектах исследуемых соединений была еще более выражена. Так, АДФ увеличивал связывание фибриногена в 5,11 раз по сравнению с контролем, тогда как ферутинин - в 1,8 раз, однако его эффект не был статистически достоверным (Рис.6В).

В экспериментах по агрегации тромбоцитов в цельной крови человека было установлено, что уровень агрегации тромбоцитов, индуцируемый АДФ и принятый за положительный контроль, составил $90,1 \pm 2,5$ усл. ед., в то время как для ферутина это значение составило всего $8,3 \pm 0,6$.

Таким образом, нами обнаружено, что ферутинин увеличивает содержание внутритромбоцитарного Ca^{2+} , индуцирует экспрессию активных форм GPIIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, но не вызывает их агрегацию.

В шестой главе «Исследование влияния ферутина на контрактильное состояние гладких мышц» приведены результаты исследования влияния ферутина на силу изометрического сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты крысы. Нами было показано, что ферутинин только в присутствии ионов Ca^{2+} вызывает сокращение аорты крысы доза-зависимым образом. Так, при концентрациях ферутина 30, 60 и 90 мкМ сила сокращений аорты относительно контроля увеличилась на $3 \pm 0,04\%$, $32,12 \pm 1,6\%$ и $58,1 \pm 3,4\%$, соответственно.

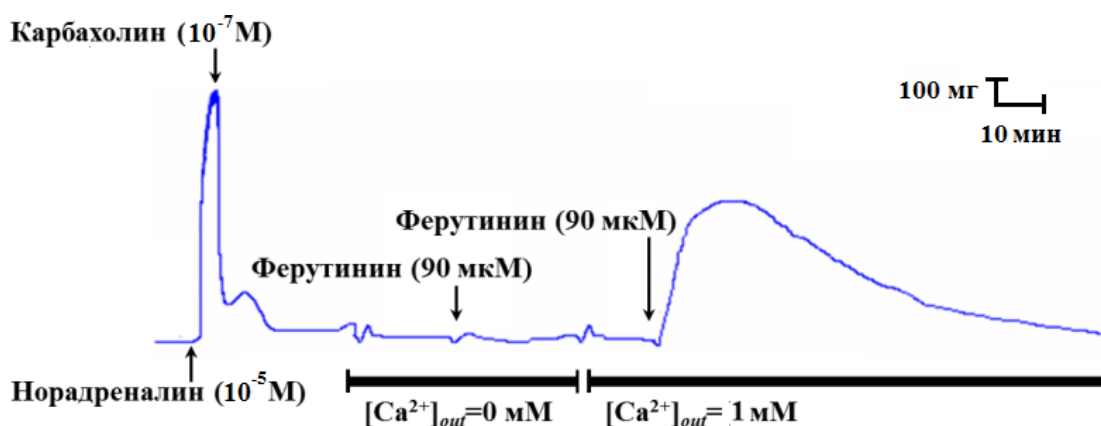


Рисунок 7. Зависимость действия ферутина на изометрическое сокращение фрагмента аорты крысы от присутствия в среде Ca^{2+} .

Внесение максимальной используемой концентрации ферутина (90 мкМ) при условии отсутствия ионов Ca^{2+} в омывающем растворе не оказывало влияния на силу изометрического сокращения аорты крысы. Однако, после отмывки фрагмента аорты и смены омывающего раствора на раствор, содержащий 1 мМ CaCl_2 , ферутинин (90 мкМ) индуцировал резкое увеличение силы сокращения сосуда (Рис.7). Строгая зависимость фазы быстрого сокращения от присутствия Ca^{2+} в среде, очевидно, связано с реализацией Ca^{2+} -ионофорной активности ферутина.

Вслед за индуцированным ферутином сокращением фрагментов аорты наблюдалась более медленная фаза расслабления сосуда во всем

исследуемом диапазоне концентраций. Одним из возможных механизмов, вовлеченных в наблюдавшийся нами релаксационный эффект ферутина является увеличение уровня внутриклеточного цАМФ. Следует отметить, что классический эстроген 17 β -эстрадиол способен вызывать релаксацию легочной артерии крыс именно за счет эстроген-опосредованной активации аденилатциклазы и увеличения внутриклеточного уровня цАМФ [Farhat et al., 1996].

В связи с вышеизложенным, следующим этапом наших исследований явилось изучение влияния ферутина на активацию аденилатциклазы в препаратах мембран сердца крысы. Об активационном статусе аденилатциклазы в присутствии ферутина судили по образованию [α -³²P]цАМФ. Нами было установлено, что ферутинин в концентрациях 50, 75 и 100 мкМ вызывал доза-зависимую активацию аденилатциклазы в мембранах, которая составила 129,5 $\pm$ 6,8%, 174,9 $\pm$ 11,0% и 263,8 $\pm$ 14,0% соответственно, по отношению к базальному уровню, принятому за 100%. Полученные данные подтверждают наше предположение о роли ферутинин-индуцированного увеличения цАМФ в релаксации аорты. Вероятно, что тот же самый механизм лежит в основе дезагрегационного эффекта ферутина при высоком уровне внутриклеточного Ca²⁺.

В рамках настоящей работы нами исследовано влияние растительного терпеноида ферутина, обладающего Ca²⁺-ионофорной активностью и проявляющего эстрогеноподобные свойства на отдельные звенья Ca²⁺ гомеостаза и некоторые Ca²⁺-зависимые процессы в животных клетках.

ВЫВОДЫ

1. Ферутинин на границе фаз вода/воздух формирует стабильный монослой с положительной адсорбцией, возрастающей в присутствии Ca^{2+} с одновременным уменьшением площади поверхности, приходящейся на одну молекулу.
2. Свободные молекулы ферутинина димеризуются по водородной связи 4-гидроксibenзойной кислоты. В формировании комплекса с ионами Ca^{2+} участвуют кислород спиртового гидроксила, кислород сложноэфирной карбонильной группы и карбоксильный кислород бензойной кислоты с разрушением водородной связи и пространственной переориентации молекул ферутинина с параллельного на антипараллельное положение.
3. Ферутинин-индуцированное увеличение цитозольного Ca^{2+} , обусловленное его Ca^{2+} -ионофорными свойствами, ведет к активации фибриногеновых рецепторов тромбоцитов и дозозависимому сокращению фрагментов аорты крыс.
4. Ферутинин, реализуя эстрогеноподобный эффект, стимулирует аденилатциклазную активность, о чем свидетельствует дозозависимое увеличение концентрации цАМФ в мембранах сердца крыс в присутствии данного соединения
5. Увеличение концентрации цАМФ в присутствии ферутинина объясняет отсутствие эффекта агрегации тромбоцитов в условиях мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} , индуцированного данным соединением.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 AT THE INSTITUTE OF BIOORGANIC
CHEMISTRY, THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN AND
INSTITUTE OF CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES**

NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN

CHARISHNIKOVA OKSANA STANISLAVOVNA

**THE CALCIUM-DEPENDENT BIOLOGICALLY ACTION OF
PHYTOESTROGEN FERUTININ**

03.00.02 -Biophysics and radiobiology

**DISSERTATION ABSTRACT
FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)**

Tashkent-2018

The title of the dissertation of doctor of philosophy (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2017.2PhD/B66.

The dissertation has been prepared at the National university of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek

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

Scientific supervisor:

Zamaraeva Mariya Vsevolodovna
doctor of biological sciences, professor

Official opponents:
Abdurakhmanovna

Khushbaktova Zaynab
doctor of biological sciences, professor

Merzlyak Pyotr Grigorievich
doctor of biological sciences

Leading organisation:

Tashkent Pharmaceutical institute

Defense will take place on «__» _____ 2018 year __ at the meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry, the National University of Uzbekistan and the Institute of Chemistry of Plant Substances at the following address: 100125, Tashkent, 83, M.Ulugbek street. Phone: 262-35-40, Fax: (99871) 262-70-63.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of Bioorganic Chemistry (Address 100125, Tashkent, 83, M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63., e-mail: asrarov54@mail.ru).

Abstract of the dissertation is distributed on «__» _____ 2018.
(protocol at the register № _____ dated _____ 2018).

Sh.I.Salikhov
Chairman of scientific council on award of
scientific degrees, D.Ch.Sc., academician

M.I.Asrarov
Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, D.B.Sc., professor

Sh.U.Turdikulova
Chairman of scientific seminar under scientific council
on award of scientific degrees, D.B.Sc.

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work is to estimate the physics and chemical characteristics of the complexation of ferutinin with calcium ions and to elucidate the principles of its effect on a key Ca^{2+} -dependent processes in animal cells.

The objects of the research work were the calcium-complexing properties of ferutinin and its regulation of Ca^{2+} -dependent intracellular processes.

Scientific novelty of the research work: is as follows:

surface-active properties of ferutinin, which are enhanced in the presence of Ca^{2+} ions and a decrease in the surface area of the ferutinin molecule during complexation with Ca^{2+} , have been proved;

molecular groups of ferutinin involved in the formation of complexes with calcium ions are identified, a model of spatial reorientation of ferutinin molecules in the process of complex formation is presented;

activation of fibrinogen receptors in platelets associated with ferutinin-induced increase in intracellular Ca^{2+} was detected;

mechanism of platelet disaggregation under conditions of ferutinin-induced intracellular Ca^{2+} mobilization was determined.

Implementation of the research results. Based on the obtained scientific results about biological effects of phytoestrogen ferutinin on Ca^{2+} -dependent intracellular processes:

data, showing the complexing properties of ferutinin were used in foreign journals with high impact factor in studying the structural and functional features of ferutinin and evaluating the physics and chemical characteristics of other chelators of Ca^{2+} (*Desalination*, 2017, V.422, N. 15, ResearchGate (No. 40), IF-4.98, *Journal of Membrane Biology*, 2018, DOI 10.1007 / s00232-018-0032-0, ResearchGate (No. 40), IF 2.03, *Iraian Journal of Basic Medical Sciences* 2015, V.18 , No. 11, ResearchGate (No. 40), IF-0.70, *Current Medicinal Chemistry* 2018. V.25, ResearchGate (No. 40), IF - 3.09. The results allowed to characterize the Ca^{2+} complexing properties of Ca^{2+} chelating molecules;

data showing the biological Ca^{2+} modulating effects of ferutinin obtained on platelets were used in foreign journals with a high impact factor in the study of Ca^{2+} -dependent processes in other types of cells (*Chemical Research in Toxicology*, 2013, V.26, N. 8, ResearchGate (No. 40), IF-4.65; *Natural Products & Chemical Researches* 2013, V.1, N.3, Directory of Open Access Journals (No. 25), IF-1.7; *Thrombosis and Haemostasis* 2011, V.106, ResearchGate (No. 40), IF - 4.96). The results allowed to explain the anticonvulsant action of ferutinin, its apoptosis-inducing activity in erythrocytes and the anti-aggregation activity of tamoxifen;

ferutinin's effects on Ca^{2+} -dependent processes in platelets are cited by the American biotechnology company Cayman Chemical (USA, Michigan), in terms of the description of the Ferutinin product, produced for analytical and

experimental purposes ([http: www.caymanchem.com/product/16554](http://www.caymanchem.com/product/16554)) . The results expand the range of use of ferutinin in the practice of experimental research (reference of the company "Cayman Chemical" on July 13, 2018).

The structure and volume of the thesis. Containing 121 pages of text, the dissertation has introduction, six chapters, conclusions, list of references.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Чарышникова О.С., Алимджанова Л.И., Замараева М.В. Биологическая активность терпеноидов, выделенных из растений рода *Ferula* // Инфекция, Иммуитет и Фармакология. - 2017. - №3. - С.248-256 (03.00.00; № 7)
2. Чарышникова О.С., Суханова И.Ф., Левицкая Ю.В. Ферутинин стимулирует аденилатциклазную активность в мембранах сердца крыс // ЎзМУ хабарлари. - 2011. - Махсус сон. - С.42-43 (03.00.00; №9).
3. Чарышникова О.С., Суханова И.Ф. Влияние фитоэстрогена ферутинина на гладкую мускулатуру // ЎзМУ хабарлари. - 2011. - Махсус сон. - С.44-45 (03.00.00; №9).
4. Dubis A., Zamaraeva M., Siergiejczyk L., Charishnikova O., Shlyonsky V. Ferutinin as a Ca^{2+} complexone: lipid bilayers, conductometry, FT-IR, NMR studies and DFT-B3LYP calculation // Dalton Transaction. - 2015. - V.44. - P.16506-16514 (№40; ResearchGate, IF-3,84).
5. Zamaraeva M., Charishnikova O., Saidkhodjaev A., Isidorov V., Granosik M., Rojalski M., Watala C. Calcium mobilization by the plant estrogen ferutinin does not induce blood platelet aggregation // Pharmacological Reports. - 2010. - V.62. - P.1117-1126 (№40; ResearchGate, IF-1,99).

II бўлим (II часть; II part)

6. Чарышникова О.С., Суханова И.Ф. Влияние ферутинина на сократимость гладкой мускулатуры крыс // Сборник тезисов. 14-ая Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». - Пушино, 2010. - С.218-219.
7. Чарышникова О.С., Дубис А., Замараева М.В. О комплексообразовании ферутинина с ионами кальция // Материалы научно-практической конференции «Современные аспекты физико-химической биологии и экотоксикологии», посвящ. 70-летию проф. У.З.Мирходжаева. - Ташкент, 2016. - С.244.
8. Charishnikova O.S., Dubis A., Siergiejczyk L., Shlyonsky V., Zamaraeva. Membrane-active properties of Ferutinin // Сборник тезисов. XX Межд. практ. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». - Минск, 2016. - С.189.
9. Charishnikova O.S., Sukhanova I.F., Zamaraeva M.V., Alimdjanova L.I., Abzalov. Biomedical aspects of Ca^{2+} /cAMP regulation of signal systems by phytoestrogen ferutinin // Abs. in conf. «Educational and scientific without borders». «Fundamental and applied research in nanotechnology» (Munich, Germany, 2017): International Journal Of Applied And Fundamental Research. - 2017. - V.3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://science-sd.com/471-25254>.

Автореферат «Ўзбекистон Биология журналы» таҳририятида таҳрирдан ўтказилди