

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

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

КАХОРОВА КОМОЛА АЗАМАТОВНА

**ОҚСИЛ-ПЕПТИД ТАБИАТЛИ МОДДАЛАРНИ ТАВСИФЛАШДА
ҲУЖАЙРА КУЛЬТУРАСИ МОДЕЛЛАРИНИНГ ҚЎЛЛАНИЛИШИ**

**02.00.10-Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА 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)

Кахорова Комола Азаматовна

Оқсил-пептид табиатли моддаларни тавсифлашда хужайра культураси
моделларининг қўлланилиши 3

Кахорова Комола Азаматовна

Применение моделей клеточных культур при описании биологически
активных веществ белково-пептидной природы 23

Kakhorova Komola Azamatovna

Application of cell culture models in description of biologically active
substances of protein-peptide nature 43

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works 46

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

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

КАХОРОВА КОМОЛА АЗАМАТОВНА

**ОҚСИЛ-ПЕПТИД ТАБИАТЛИ МОДДАЛАРНИ ТАВСИФЛАШДА
ҲУЖАЙРА КУЛЬТУРАСИ МОДЕЛЛАРИНИНГ ҚЎЛЛАНИЛИШИ**

**02.00.10-Биоорганик кимё
(биология фанлари)**

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

Тошкент - 2018

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2017.2.PhD/В83 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб саҳифаси (www.biochem.uz) ва «Ziyonet» Ахборот таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Хашимова Зайнат Саттаровна
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Хушбақтова Зайнап Абдурахмановна
биология фанлари доктори, профессор

Левицкая Юлия Владимировна
биология фанлари номзоди, доцент

Етакчи ташкилот:

Тошкент фармацевтика институти

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон Миллий университети, Ўсимлик моддалар кимёси институти ҳузуридаги DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2018 йил _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч.,83. Тел.: 2623540, 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.: 2623540, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Диссертация ва автореферат 2018 йил _____ куни тарқатилди.
(2018 йил _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

Ш.И.Салихов

Илмий даража берувчи бир марталик илмий кенгаш
раиси, б.ф.д., академик

М.И.Асраров

Илмий даража берувчи бир марталик илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

Ш.У.Турдикулова

Илмий даража берувчи бир марталик илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., доц

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳонда ҳар қандай янги биологик бирикма қандай мақсадда қўлланилишидан қатъий назар токсиклиги ва биологик фаоллиги нуқтаи назаридан тавсифланиши зарур. Шу мақсадда, охириги ўн йилликда фаол, жумладан ўсмага қарши бирикмаларни тест-таҳлил қилиш ва танлаш учун организмдан ташқарида бўлган модел системалари, яъни турли хужайра культуралари қўлланилмоқда. Бу эса, кейинчалик *in vivo* шароитида тадқиқот олиб борилиши керак бўлган, дори препаратларининг сонини оширишда муҳим аҳамиятга эга.

Дунё миқёсида, сўнгги йилларда рақ касаллиги терапияси учун қўлланиладиган, мавжуд қуйи молекулали препаратлар билан бир қаторда оксил ва пептид табиатли дори препаратларига эътибор қаратилмоқда. Ўсманинг даволовчи, альтернатив терапияси сифатида паразит ўсимликлардан (*Haustoria*), оқ омеладан тайёрланган препаратлар муҳим ҳисобланган. Ғарбий Европа мамлакаларида, Оқ омела ўсимлигидан ажратилган экстрактлар асосида тайёрланган препаратлар (ўсимлик баргининг сувли экстрактини сақлаган, махсус технология асосида тайёрланган, ML-1 лектини бўйича стандартлаштирилган «Искадор» препарати) қўлланилган. Шу билан бирга паразит ўсимликлардан зарпечак (*Cuscuta*) ўсимлигига ҳам қизиқиш катта бўлиб, унинг таркибида гликозидсимон табиатли, ўсмага қарши фаол бирикма аниқланган.

Ҳозирги кунда республикамизда цитотоксик фаолиққа эга бўлган моддаларни аниқлаш борасида кенг қамровли илмий-тадқиқот ишлари амалга оширилган ва салмоқли натижаларга эришилган. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4-йўналишида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларни арзон, сифатли дори воситалари билан таъминланишини яхшилаш» юзасидан муҳим вазифалар белгилаб берилган¹. Юқоридаги вазифалардан келиб чиқиб биологик фаол моддаларни, жумладан, раққа қарши фаол бирикмаларни скрининг қилишда хужайра культураси асосида янги тест-система яратиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ва 2017 йил 7 ноябрдаги ПФ-5229 «Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» Фармонлари ҳамда мазкур фармонга тегишли бошқа меъёрий-

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги Фармони

ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга 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. Хужайра куьтурасида бирикмаларнинг цитотоксик фаоллигини аниқлаш ўтган асрнинг 70-йилларида бошланган (R.I. Freshney, T. Mossman). АҚШ нинг раққа қарши миллий марказида бурун-ҳалқум эпидермоид карциномаси КВ ва одам карциномаси хужайра куьтураси Не хужайра линиялари кенг тарқалган бўлиб, бугунги кунда, бутун дунёда биологик фаол моддаларни скрининг қилишда ўнлаб хужайра куьтура линияларидан фойдаланилмоқда.

МДХ давлатларида моддаларни скрининг қилиш тадқиқотлари ўтган асрнинг 80-йилларида бошланган (Россия). Я.В. Добрынин ва унинг шогирдлари томонидан истиқболли цитостатикларини танлаш мақсадида, янги, кўчириб ўтказувчи хужайра линияси, одам тухумдони раки СаО олинган. Бу каби тадқиқотларни кейинчалик бир қатор олимлар давом эттиришган (М.Ю. Еропкин, А.А. Алексеев, А.А. Тухбатова, Е.О. Данченко, М.А. Романова и бошқ.).

Ўзбекистонда биологик фаол моддаларнинг цитотоксик фаоллигини аниқлаш ҳам ўтган асрнинг 80-йилларида Биоорганик кимё институтида Н.Н. Кузнецова ва шогирдлари раҳбарлигида бошланган бўлиб, ошқозон ости беги раки СаРа хужайра линияси асосида раққа қарши моддаларни скрининг қилиш учун тест-тахлил тизими яратилган. Кейинчалик эса, 2005 йил Биоорганик кимё институтида Н.Н. Кузнецова томонидан моддаларнинг цитотоксик ва антимета статик фаоллигини аниқлаш учун янги хужайра линияси, сичқон тери раки-меланомаси КМЛ яратилган ва ушбу хужайра куьтураси линиясига патент олинган. Бугунги кунда эса, Биоорганик кимё ва Ўсимлик моддалари кимёси институтида биологик фаол моддаларни скрининг қилиш учун турли хужайра куьтураларида тадқиқотлар олиб борилмоқда (профессор Ш.С. Азимова, З.С. Хашимова).

Паразит ўсимликлардан *Cuscuta* ўсимлиги компонентлари интенсив равишда тадқиқ қилинган бўлсада, ўсимлик таркибидаги оксил-пептидли компонентлар тўлиқ ўрганилмаган. Адабиётларда ҳам *Cuscuta* ўсимлиги лектинлари ҳақида маълумотлар келтирилмаганлиги сабабли, *Cuscuta europaeae* ўсимлигидан лектинсимон гликопротеидларни ажратиш, тавсифлаш ва цитотоксик фаоллигини аниқлаш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А6 Т064 «Кавказ чаёни рекомбинант инсектотоксини ВисаIT олиш биотехнологиясини яратиш ва хайвон ва рақ хужайралари

культураларида синовлар ўтказиш» (2016-2017) ҳамда ПЗ-20171024153 «Биологик фаол моддаларни скрининг қилиш учун сичқон ингичка ичак раки хужайра культураси асосида тест-тизим яратиш» (2018-2019) мавзусидаги амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади *Cuscuta europeae* ўсимлигидан лектинсимон гликопротеидларни ажратиш, тавсифлаш ва Акат, В-16, КМЛ, Нела, С127, U937 хужайра культураси моделларида цитотоксик фаоллигини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

сичқон ингичка ичак аденокарциномасидан янги кўчириб ўтказиладиган хужайра культурасини олиш, тавсифлаш ва сезилувчанлигини аниқлаш;

сичқон ингичка ичак аденокарциномаси Акат хужайра линияси асосида биологик фаол моддаларни кенг доирада скрининг қилиш учун тест-таҳлил тизимини яратиш;

Cuscuta europeae ўсимлиги уруғидан лектинсимон оқсилларни (ЛО) ажратиш ва тавсифлаш;

турли хужайра линияларида лектинсимон гликопротеидларнинг цитотоксик фаоллигини аниқлаш;

лектинсимон оқсилларнинг гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишига таъсирини, хужайраларнинг оксидланишли стрессга чидамлигига, цитозол ферменти ЛДГ фаоллигига таъсирини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида *Cuscuta europeae* лектинсимон оқсиллари, Акат, В-16, КМЛ, Нела, С127, U937 рак хужайра культуралари, 6-8 ҳафтали зотсиз каламуш тимоцитлари, қуён қизил қон хужайралари олинди.

Тадқиқотнинг предмети *Cuscuta europeae* лектинсимон оқсилларнинг цитотоксик фаоллигини аниқлаш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Тажрибаларда замонавий биофизик ва биокимиёвий усуллардан фойдаланилди. *Cuscuta europeae* лектинсимон оқсилларини ажратиш ва тавсифлаш стандарт метод ёрдамида олиб борилди. Биологик фаоллик МТТ-тест ва тирик хужайраларни ҳисоблаш услуги ёрдамида аниқланди. Тимоцитлар ва қизил қон хужайралари стандарт услублар ёрдамида ажратилди. Хужайра ҳажми суспензиянинг ёруғликни ўтказиши бўйича аниқланди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қўйидагилардан иборат:

янги сичқон ингичка ичак аденокарциномаси Акат хужайра культураси олинган ва ўсиш факторлари аниқланган;

биологик фаол моддаларни кенг доирада скрининг қилиш учун янги Акат линияси асосида эффектив тест-тизим яратилган;

илк бор *Alhagi L* ўсимлигида паразитлик қиладиган *Cuscuta europeae* ўсимлигидан лектинсимон оқсиллар ажратилган ва тавсифланган;

илк бор ажратилган оқсилларнинг биологик фаоллиги, жумладан цитотоксиклиги, мембрана фаоллиги ва антиоксидантлиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қўйидагилардан иборат:

акатон ўсма тўқимасидан янги хужайра линиясини олиш, культивирлаш босқичлари, клонирлаш ва стабил хужайра культураси линиясини олиш шароитлари оптималлаштирилган;

хужайраларни музлатиш, суяқ азотда сақлаш, эритиш ва ҳаётчанлиги юқори хужайраларни олиш ва сақлаш шароитлари яратилган;

лектинсимон оксилларни ажратиб олиш схемаси келтирилган, гемагглютинирловчи фаоллиги ва углеводли спецификлиги, турли хужайра культураларида МТТ-тест бўйича цитотоксиклик фаоллиги аниқланган;

лектинсимон оксиллар таъсирида мембрана шикастланиши, лактатдегидрогеназининг чиқиш фаоллиги билан исботланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тадқиқотларни замонавий биофизик-биокимёвий тадқиқот усуллари кўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Назорат ва тажрибада олинган ўртача қийматлар орасидаги фарқ Стюдент t-тести, стандарт программа “Origin” ва “Microsoft Excel” бўйича ҳисобланди ва қийматлар фарқининг статистик ишончлилиги $P < 0,05$ ва $p < 0,01$ даражасида ифодаланди. 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 лектинсимон оксилларнинг хужайра бўлинишининг S- даври ва қисман G2-фазасига таъсири кўрсатилиши билан изоҳланади. Лектинсимон оксиллар таъсирида мембрана шикастланиши эса, лактатдегидрогеназининг чиқарилиш фаоллиги билан кўрсатилган.

Натижаларининг амалий аҳамияти шундаки, сичқон ингичка ичак аденокарциномасидан янги хужайра линияси олинган. Ушбу линия асосида биологик фаол бирикмаларни скрининг қилиш учун эффектив тест-тизим яратилган. Олинган натижалар фармакология ва тиббиётда муҳим амалий аҳамиятга эга. Яратилган тест-тизим келажакда синтезланадиган моддаларни скрининг қилишда қўлланилиши ва хужайра линиясини олиш учун ўқув қўлланма бўлиб хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Акат линиясини олиш, культивирлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

сичқон ингичка ичак раки, культивирланадиган хужайра штамми, Акат E7 клонига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти олинган (№ IAP 05428, 2017 й). Натижада Акат линияси асосида яратилган тест-система биологик фаол моддаларни скрининг қилиш имконини берган;

Акат ва Сасо-2 хужайра линияларидан Т.4-16 рақамли «Бактериоцин ишлаб чиқарувчи микроорганизмларни ажратиш ва уларни озик-овқат саноатида ишлатиш имкониятларини баҳолаш» (2016-2017) илмий лойиҳада, Акат E7 клонидан *in vitro* шароитида лактобацилларнинг ичакда адгезиясини баҳолашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2018 йил 24-июлдаги №4/1255-1946-сон маълумотномаси).

Натижада лактобациллаларни озиқ-овқат саноатида қўллаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 4 та халқаро ва 3 та республика илмий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларнинг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 19 та илмий иши чоп этилган, шулардан, улардан 1 та ихтиро патенти, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 10 та мақола, жумладан, 6 та маҳаллий, 3 та МДХ ва 1 та Халқаро журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 104 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 очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «*Cuscuta europeae* биологик фаол бирикмаларини хужайра культураси моделларида аниқлаш» деб номланган биринчи бобида паразитлик қилиб ўсувчи ўсимликлар, жумладан, оқ омела ва зарпечак ўсимлигининг биологик фаол компонентлари, янги олинган бирикмаларнинг скрининг системаси, жумладан хужайра культураси моделлари ҳақидаги маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Кўчириб ўтказилувчи хужайра культурасини олиш, *Cuscuta europeae* лектинсимон оқсилларини ажратиб олиш, тавсифлаш ва биологик фаоллигини аниқлаш усуллари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқот изланишлари бажарилишида фойдаланилган материаллар ва усуллар, жумладан биоорганик кимё (электрофорез, оқсил ва углеводни микдорий ва ва сифат жиҳатдан аниқлаш усуллари), хужайра биологияси (хужайра культурасини олиш, культивирлаш ва сақлаш услублари), биокимёвий (калориметрик услублар –МТТ, ЛДГ-тест, гемагглютинирловчи фаолликни аниқлаш) каби услублардан фойдаланилган.

Кўчириб ўтказилувчи хужайра культураси Акатон ўсмасидан олинди ва кейинчалик RPMI–1640 ўстирувчи озуқа муҳити суюқлигида культивирланди. Культивирлаш шароитимизга мослаштирилган HeLa, C127, B-16 ва U937 каби рак хужайраси культуралари академик Р.З Сабилов томонидан тақдим қилинган.

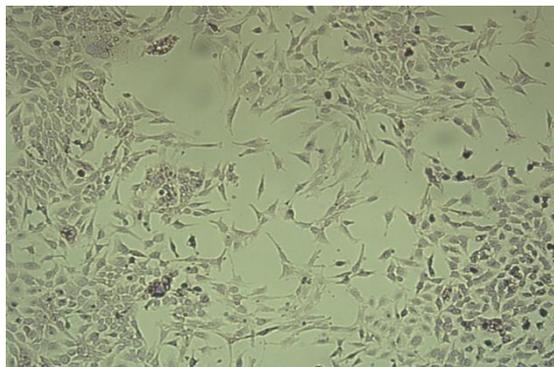
Цитотоксик фаоллик уч турдаги тест: МТТ-тест, ЛДГ-тест ва тирик хужайралар сонини санаш методига кўра аниқланди.

Зарпечак уруғидан лектинсимон оксиллар стандарт усул бўйича ажратилди. Лектинсимон оксилларнинг гемагглютинирловчи фаоллиги ва углеводли спецификлиги Пospelов услуги ёрдамида иммунологик планшетда аниқланди.

Тимоцитлар стандарт усул асосида ажратиб олинди. Тимоцитлар ҳажм ўзгариши 610 нм ёруғлик ютилишида аниқланди.

Диссертациянинг «*Cuscuta europeae* лектинсимон оксилари ва уларнинг хужайра метаболизмига таъсири» деб номланган учинчи бобида сичқон ингичка ичак аденокарциномасидан янги хужайра линиясини олиш, янги хужайра линиясининг тавсифи, *Cuscuta europeae* лектинсимон оксилларини ажратиб олиш, тавсифлаш ва турли Акат, В-16, КМЛ, HeLa, С127, U937 хужайра линияларига таъсирини тадқиқ қилишда олган натижаларимиз муҳокама қилинган.

Сичқон ингичка ичак аденокарциномаси янги хужайра линиясини олиш. Кўчириб ўтказилувчи хужайра линиялари турини янада кенгайтириш мақсадида сичқон ингичка ичак аденокарциномасидан Акат деб номланган янги хужайра линияси олинди ва ушбу линия биоорганик кимё институти хужайра культураси банкида сақланмоқда. Хужайра штами, сичқон ингичка ичак аденокарциномаси ўсмасини ажратиш, гомогенизациялаш ёрдамида, таркибида глутамин, бузоқ эмбриони зардоби, антибиотик ва антимикотик сақлаган RPMI – 1640 озуқа муҳити суюқлигида хужайралар суспензиясини олиш билан ажратиб олинди. Хужайралар махсус матрацга ўтказилди, бирламчи колониялар ҳосил қилгандан сўнг озуқа муҳити суюқлиги янгиланди, 37° С да 5% CO₂ – инкубаторда культивирланди ва 3-4 ойдан кейин Акат деб номланган янги линия стабил ҳолатга келди. Зичлиги 5 x 10⁴ кл/мл га тенг бўлган хужайралар ҳар ҳафтада 1-2 марта қайта тикланди ва 10% ли бузоқ эмбриони зардоби, антибиотик, антимикотик ва глутамин сақлаган RPMI – 1640 озуқа муҳити суюқлигига ўтказилди. Акат штами биринчи марта 60-65 пассаждан кейин 1x10⁶ миқдордаги хужайралар ўсишнинг логарифмик фазасида 1,8 мл ҳажмли криофлаконларда музлатилди ва ҳозирги кунда хужайра культураси банкида сақланмоқда (1-расм).



1-расм. Кўчириб ўтказилувчи Акат хужайра культураси, ок. ×10, об. ×40.

Сичқон ингичка ичак аденокарциномаси хужайра культураси Акат гиперхром ядроли, эпителийсимон кўпбурчакли хужайралардан ташкил топган. Ядролари овал-думалоқ бўлиб, икки ёки учта ядрочалардан иборат. Хужайралар субстратга зич ҳолда ёпишади ва ўсишнинг логарифмик фазасининг охирида яхлит монокават ҳосил қилади. Хужайралар 1 мМ ЭДТА эритмаси таъсирида монокават юзасидан осон силжийди

Акат хужайраларининг сезилувчанлигини аниқлаш. Моддаларнинг цитотоксик таъсирини аниқлашда хужайра линиясининг модел сифатида қўлланилиши мумкин эканлигини исботлаш мақсадида, хужайра культурасининг турли синфларга оид, клиник, ўсмага қарши препаратларга нисбатан сезилувчанлиги аниқланди: циклофосфан алкилловчи цитотоксик; метотрексат, антиметоболит гуруҳига оид цитостатик; доксорубицин, антрациклин катори, ўсмага қарши антибиотик; винбластин, ўсимликдан ажратиб олинган бўлиб, РНК ва ДНК синтезини ингибирлайди; цисплатин, бифункционал алкилловчи агент хусусиятига эга; этопозид- топоизмеразалар ингибитори; фторафур, антиметаболит бўлиб, ДНК ва РНК синтезини бузиши билан ўсмага қарши таъсир кўрсатади.

Препаратларниг ўсмага қарши фаоллигини МТТ ва тирик хужайраларни санаш услуби ёрдамида аниқладик. Назорат сифатида модда таъсир қилмаган хужайралар олинди ва бунда МТТ ёрдамида аниқланган ҳаётчанлик 100% (1-жадвал).

1-жадвал

Акат хужайра культурасига клиник ўсмага қарши препаратларнинг таъсири ($M \pm m, n = 3, P < 0,05$)

Доза, мкг/мл	МТТ таъсирида хужайра ўсишининг камайиши, %			Хужайра ўсишининг камайиши, %		
	100	10	1	100	10	1
Препаратлар						
1. Этопозид	75,0±0,3	59,2±0,7	36,3±0,4	72,6±0,5	57,3±0,6	32,2±0,1
2. Винбластин	81,2±0,1	65,4±0,1	57,1±1,1	83,7±0,3	62,6±0,1	56,7±0,2
3. Метатрексат	58,4±0,5	45,6±1,4	33,2±0,6	57,5±0,1	42,4±0,3	32,5±0,2
4. Доксорубицин	72,3±0,7	58,1±0,7	38,4±0,2	70,1±0,4	59,7±0,6	35,3±0,3
5. Циклофосфан	57,1±0,3	43,4±1,1	43,7±0,1	56,2±0,3	42,7±0,1	41,5±0,5
6. Цисплатин	96,7±0,1	92,3±0,1	56,5±0,7	97,1±0,4	90,8±0,3	54,3±0,7
7. Фторафур	59,1±0,2	58,5±0,8	49,3±0,9	56,8±0,4	53,3±0,3	48,3±0,1

1-жадвалдан кўриниб турибдики, барча препаратлар МТТ-тест услуби ва хужайралар сонини санаш услуби бўйича ҳам цитотоксик фаолликни номоён қилган. МТТ-тест услуби бўйича, синтетик препарат цисплатин 100, 10 и 1мкг/мл концентрацияда 96,7%, 92,3% и 56,5% энг юқори цитотоксик фаолликни номоён қилди. Винбластин 81,2%, 65,5%, 57,1, доксорубицин 72,3%, 58,1% , 38,4% ва этопозид 75,0%, 59,2%, 36,3% цитотоксик фаолликни номоён қилди. Нисбатан қуйи цитотоксик фаоллик метатрексат, фторафур ва циклофосфан препаратлар таъсирида кузатилди. Олинган натижалар трипан кўки иштирокида тирик хужайраларни санаш услуби натижаларини такрорлайди.

HeLa ва Акат хужайраларида препаратлар таъсиридаги цитотоксик фаоллик натижалари бир-бирига мос.

Шундай қилиб, айтиш мумкинки, янги Акат хужайра линияси ўсмага қарши клиник препаратларга етарли даражада сезилувчан бўлиб, кам миқдордаги биологик фаол, жумладан, ўсмага қарши препаратларни

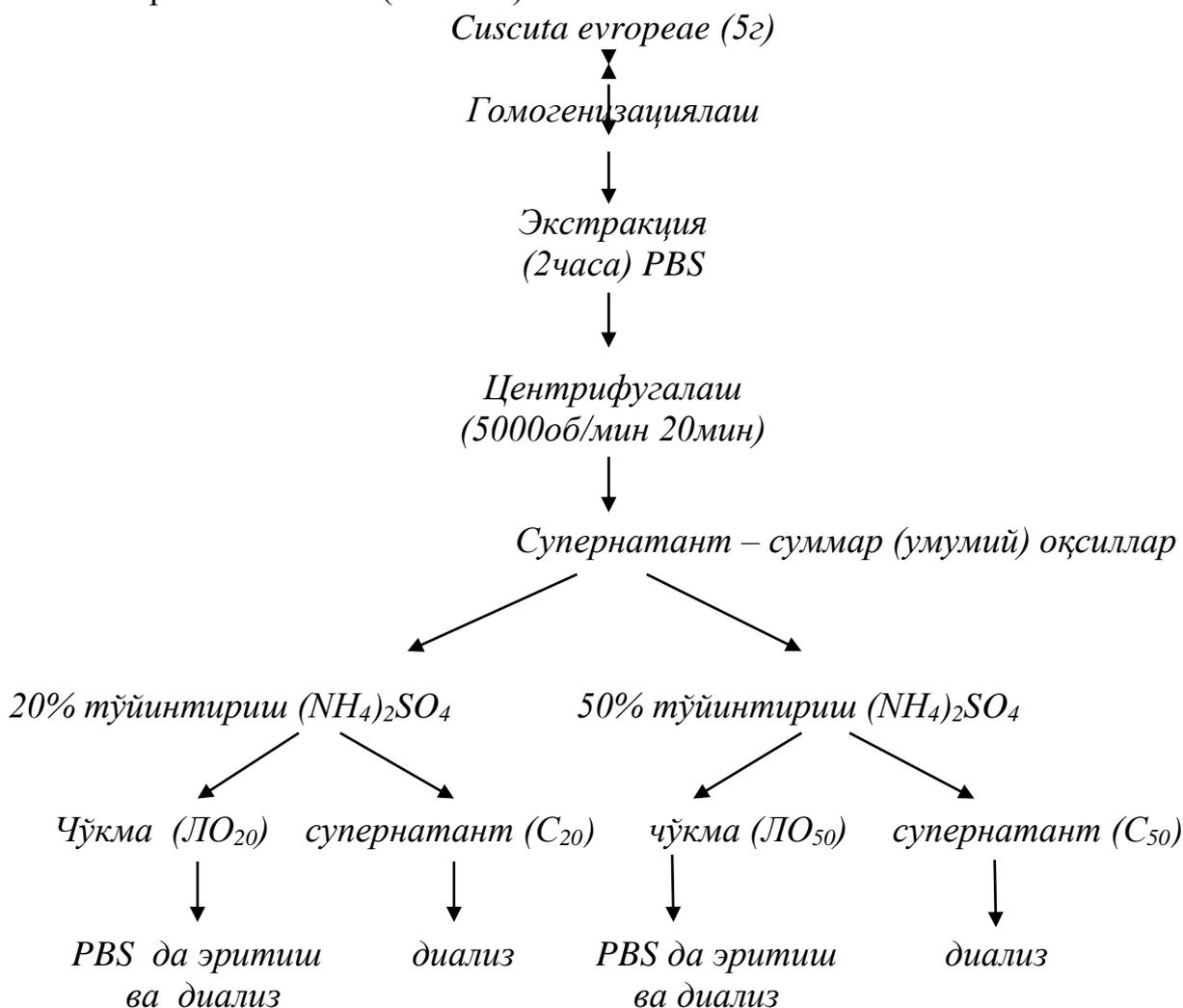
скрининг қилишда фойдаланиладиган хужайравий модел система сифатида хизмат қилади.

Cuscuta europaea лектинсимон оқсилларини ажратиб олиш ва уларнинг тавсифи. Паразит ўсимликлардан бири зарпечак (*Cuscuta*) кўплаб тадқиқотчиларда қизиқиш уйғотади.

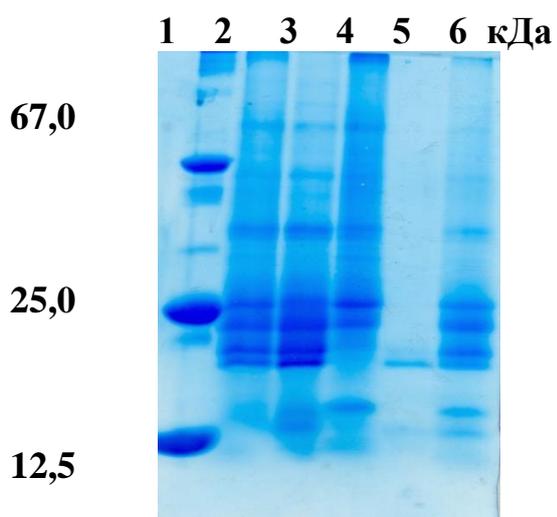
Cuscuta europaea ўсимлиги компонентларини умумий таҳлил қилиш учун, ўсимлик уруғлари ёзда йиғиб олинган. Дала ўтлари, янтоқда (*Alhagi.L*) ва мевали буталарда паразит ҳолда ўсувчи зарпечакларнинг спиртли, сувли ва тузли экстрактлари олинган.

Олинган натижалардан келиб чиқиб, шунини айтиш мумкинки, *Cuscuta europaea* компонентларининг цитотоксик фаоллиги у паразитлик қилаётган ўсимликка боғлиқ. Юқори цитотоксик фаоллик эса, асосан янтоқда паразитлик қилиб ўсувчи зарпечакнинг спиртли ва сув-тузли экстрактларида кузатилган.

Зарпечак ўсимлигининг кам ўрганилган объектлардан бири лектинсимон оқсиллари (ЛО) ҳисобланади. Лектинсимон оқсиллар янтоқда паразитлик қилувчи зарпечак уруғидан, стандарт услуб, яъни тузли эритма билан экстракциялаш ва аммоний сульфат ёрдамида босқичли чўктириш билан ажратиб олинган (1-схема).



Ажратиб олинган лектинсимон оксиллар электрофорез услуби ёрдамида тавсифланди (2-расм).



2-расм. 15% ПААГ-SDS (меркаптоэтанол)да *Cuscuta europaea* лектинсимон гликопротеидларининг электрофореграммаси:

1-маркерлар (BCA-67кДа, хемотрипсин-25 кДа, цитохром-12,5 кДа), 2- суммар оксиллар, 3- 20%-ли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ чўктиришда олинган супер-натант; 4- 20%-ли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ чўктиришда олинган чўкма; 5- 50%-ли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ чўктиришда олинган супернатант; 6-20%-ли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ чўктиришда олинган чўкма $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Электрофореграммадан кўриниб турибдики, аммоний сульфат ёрдамида 50%ли чўктиришдан кейин олинган фракция 12,5-25,0 кДа оралиғида аниқ бир чизиқ ва хира иккита чизиқни ҳосил қилган. Аммоний сульфат ёрдамида 50%ли чўктиришдан кейин олинган чўкма умумий фракцияга нисбатан камроқ гетероген бўлиб, асосан 12,5 -25 кДа оралиғида оксилли чизиқлар ҳосил қилган.

Маълумки, лектинларнинг асосий хусусиятларидан бири уларнинг гемагглютинацияовчи фаоллиги ва углеводли спецификлиги ҳисобланади.

Олинган фракциялардан LO_{20} и LO_{50} гемагглютинацияовчи фаолликни номоён қилган. LO_{50} фракциясида глюкоза ва маннозага нисбатан юқори спецификлик кузатилган.

Шундай қилиб, илк бор *Alhagi L.* ўсимлигида паразитлик қилувчи *Cuscuta europaea* дан лектинсимон оксиллар ажратилган ва тавсифланган.

Турли хужайра культураси линияларида *Cuscuta europaea* лектинсимон оксилларининг биологик фаоллигини аниқлаш. Биологик фаолликни баҳолаш, шу билан бирга оксил табиатли моддаларнинг таъсир механизмини аниқлаш учун хужайра культураси энг муносиб модел ҳисобланади.

Лектинсимон оксилларнинг турли хужайра системаларида цитотоксик фаоллиги ўрганилган.

Цитотоксиклик МТТ-услуби, тирик хужайраларни санаш ва морфологик жиҳатдан баҳоланди.

Оксилларнинг турли хужайра линияларида цитотоксик таъсири юқорида кўрсатилганидек аниқланди.

Кўчириб ўтказилувчи КМЛ хужайра штами илк бор, Биоорганик кимё институти биорегуляторлар лабораториясида Н.Н. Кузнецова томонидан сичкон меланомаси В-16 C_{57}Bl линиясидан ажратиб олинган ва унинг асосида биологик фаол моддаларни кенг доирада скрининг қилиш учун тест-тизим яратилган.

Cuscuta europea лектинсимон оксилларининг В-16 ва КМЛ хужайраларидаги киёсий цитотоксик фаоллиги 2-жадвалда келтирилган.

2-жадвал

***Cuscuta europea* лектинсимон оксилларининг В-16 ва КМЛ хужайра культурасига таъсири (M ± m, n = 9, P<0,05)**

Доза мкг/мл Намуналар	МТТ таъсирида хужайра ўсишининг камайиши, %					
	В-16			КМЛ		
	100	10	1	100	10	1
∑ фракция	96,0±0,6	55,0±0,1	14,0±0,3	93,1±0,3	45,7±0,5	14,0±0,3
C ₂₀	61,0±0,3	46,0±0,6	15,0±0,1	81,2±0,1	38,4±0,3	13,8±0,5
C ₅₀	37,0±0,1	23,0±0,2	10,0±0,5	37,3±0,5	25,4±0,4	10,1±0,1
ЛПБ ₂₀	97,0±0,6	56,0±0,3	49,0±0,3	98,4±0,1	62,4±0,3	37,2±0,3
ЛПБ ₅₀	93,5±0,4	61,0±0,1	46,0±0,2	93,5±0,4	57,8±0,6	42,0±0,1
цисплатин	98,7±0,1	91,0±0,4	45,4±0,4	99,9±0,4	88,6±0,3	50,4±0,3

2-жадвалдан кўриниб турибдики, ҳар иккала хужайраларда ҳам юқори цитотоксик фаоллик умумий фракция, ЛО₂₀ ва ЛО₅₀ таъсирида кузатилган. Фракцияларнинг 100 мкг/мл концентрациядаги таъсири натижасида В – 16 хужайраларида цитотоксик фаоллик -96%, 97% ва 93,5% ни, КМЛ хужайраларидаги цитотоксик фаоллик эса - 93,1%, 98,4% и 93,5% ни ташкил қилган.

Киёсий таҳлил бўйича, В-16 ва КМЛ хужайраларида фракциялар таъсирида олинган натижаларга бир-бирига мос келади.

HeLa хужайра линиясида ЛОнинг таъсири ўрганилган (3-жадвал).

3-жадвал

HeLa хужайра культурасига *Cuscuta europea* лектинсимон оксилларининг таъсири (M ± m, n = 9, P<0,05)

Доза, мкг/мкл Намуналар	МТТ таъсирида хужайра ўсишининг камайиши, %			Хужайра ўсишининг камайиши, %		
	100	10	1	100	10	1
∑ фракция	100±0,1	45,3±0,6	19,6±0,1	99,1±0,1	34,6±0,1	17,4±0,1
C ₂₀	52,2±0,1	29,6±0,1	27,3±0,1	51,4±0,2	26,8±0,2	25,7±0,2
C ₅₀	45,5±0,2	28,7±0,1	15,6±0,2	46,4±0,1	26,4±0,2	14,3±0,2
ЛПБ ₂₀	98,3±0,1	58,4±0,1	18,7±0,2	96,5±0,1	55,4±0,1	19,3±0,2
ЛПБ ₅₀	94,3±0,2	60,8±0,1	47,7±0,1	95,3±0,2	58,6±0,2	37,6±0,2
Цисплатин	98,1±0,6	85,5±0,8	35,5±0,1	97,5±0,1	59,5±0,1	34,6±0,2

3-жадвалдан кўриниб турибдики, *Cuscuta europea* нинг оксилли фракциялари хужайра культурасига турли ҳил таъсир қилади. Умумий фракция, ЛО₂₀ ва ЛО₅₀ 100 мкг/мл концентрацияда - 100%, 98% и 94% цитотоксикни номоён қилди. Шу билан бирга, 60% ли цитотоксиклик 10 мкг/мл концентрациядаги ЛПБ₅₀ таъсирида кузатилди.

Шунга ўхшаш натижалар трипан кўки таъсирида хужайраларни санаш услуги ёрдамида ҳам олинган.

Шабадаш методи бўйича, оксиллар таъсирида хужайралар моноқавати морфологик жиҳатдан кузатилди ва хужайралар моноқаватининг етишмовчилиги кўрсатилди.

Олинган ЛО фракцияларнинг фаоллиги U937 қон хужайраларининг суспензион культураси ва янги Акат хужайра культурасида ҳам аниқланган. (4- ва 5-жадвал).

4-жадвал

Cuscuta europea лектинсимон оксилларининг U937 хужайра культурасига таъсири ($M \pm m, n = 9, P < 0,05$)

Доза, мкг/мкл	МТТ таъсирида хужайра ўсишининг камайиши, %			Хужайра ўсишининг камайиши, %		
	100	10	1	100	10	1
Намуналар						
∑ фракция	100±0,1	31±0,1	17±0,1	98±0,1	35±0,1	17±0,3
C ₂₀	48±0,2	49±0,1	51±0,1	50±0,2	43±0,2	51±0,2
C ₅₀	49±0,1	51±0,2	42±0,2	52±0,2	49±0,2	40±0,2
ЛПБ ₂₀	86±0,5	64±0,1	61±0,2	80±0,2	60±0,3	59±0,2
ЛПБ ₅₀	93±0,2	76±0,2	53±0,2	95±0,1	70±0,2	46±0,3
Цисплатин	100±0,2	96±0,1	45±0,1	97±0,1	88±0,1	34±0,1

U937 суспензион культурасида ҳам умумий фракция, ЛО₂₀ ва ЛО₅₀ фракциялар 100 мкг/мл концентрацияда 100%, 86% ва 93% цитотоксик фаолликни номоён қилди.

5-жадвал

Cuscuta europea лектинсимон оксилларининг Акат хужайра культурасига таъсири ($M \pm m, n = 9, P < 0,05$)

Доза, мкг/мкл	МТТ таъсирида хужайра ўсишининг камайиши, %			Хужайра ўсишининг камайиши, %		
	100	10	1	100	10	1
Намуналар						
∑ фракция	86,1±0,5	33,4±0,6	10,3±0,3	83,2±0,3	30,6±0,4	6,5±0,5
C ₂₀	35,3±0,1	15,2±0,5	8,7±0,4	32,5±0,1	14,5±0,6	7,4±0,3
C ₅₀	40,2±0,3	12,5±0,4	10,5±0,5	39,4±0,5	10,3±0,4	6,5±0,2
ЛПБ ₂₀	89,2±0,3	58,4±0,9	43,6±0,1	87,3±0,8	55,3±0,6	41,2±0,2
ЛПБ ₅₀	96,0±0,2	60,1±0,5	40,4±0,6	95,1±0,1	57,2±0,3	34,1±0,3
Цисплатин	98,5±0,1	85,4±0,4	35,7±0,1	98,4±0,1	83,6±0,3	32,7±0,1

5-жадвалда кўрсатилганидек, умумий фракция, аммоний сульфат ёрдамида 20% ва 50% чўктиришдан олинган фракция Акат хужайра культурасига цитотоксик таъсир кўрсатган. 100мкг/мл оксил дозасида 86%, 89% ва 96% цитотоксик фаоллик кузатилган. ЛО₂₀ ва ЛО₅₀ фракциялари учун СЕ₅₀ 10 мкг/мл ва 1мкг/мл оралиғидаги концентрацияни ташкил қилади. Трипан кўки таъсирида хужайраларни санаш услуги ёрдамида хужайра

ўсишининг камайиши бўйича олинган натижалар юқоридаги натижаларни такрорлайди. ЛО нинг С127 кўкрак ўсмаси ҳужайра культурасига сустритотоксик таъсири кузатилган.

Шундай қилиб, айтиш мумкинки, аммоний сульфат ёрдамида 20% ва 50% чўктириш натижасида ажратилган *Cuscuta europea* лектинсимон оқсиллари турли ҳужайра линияларида юқори цитотоксик фаолликни номоён қилади. Аммо, ҳар бир ҳужайра линияси ўзига хос сезилувчанликка эга. Меланома, ингичка ичак аденокарциномаси ва бачадон бўйни ўсмаси ҳужайра линиялари С127 кўкрак ўсмасига нисбатан сезилувчанлиги юқори эканлиги аниқланган.

Cuscuta europea лектинсимон оқсилларининг, таъсир механизми маишхур бўлган, клиник ўсмага қарши препаратлар билан биргаликда таъсири. Биологик фаол моддаларнинг ҳужайра-нишонга таъсир механизмини тадқиқ қилиш турли тестлардан, жумладан, ҳужайравий даражада токсикликнинг турли индикаторлари, токсик таъсирнинг турли муддатларидаги ҳужайра культураси тўплами ва ички муҳитдаги жараёнлардан ташкил топган комплекс ёндашувни талаб қилади.

Акат ҳужайра культурасида ЛО нинг таъсир механизмини янада чуқурроқ тадқиқ қилиш учун инструмент сифатида маълум таъсир механизмига эга бўлган клиник препаратлардан фойдаланилди. Булардан, этопозид ҳужайрани G2 –ва кечки S-фазада нобуд қилади; колхицин эса, ҳужайранинг метафаза босқичида митозни блоклайди. Ҳужайра ўсишини 50% га камайтириш (CE₅₀) этопозид учун 10 мкг/мл, колхицин учун 1 мкг/мл ни ташкил қилади. ЛО учун эса, CE₅₀ 10 мкг/мл га тенг. Тажриба учун юқорида кўрсатилган препаратлар ҳужайра ўсишини 50% гача камайтириш дозасида Акат линиясига алоҳида ва биргаликда таъсир этирилган (6-жадвал).

6-жадвал

Акат ҳужайраларида ЛПБ₅₀ ва клиник препаратларнинг биргаликдаги таъсирининг эффекти (M ± m, n = 3, P < 0,05)

Намуналар	Дозалар мкг/мл, CE ₅₀	МТТтаъсирида ҳужайра ўсишининг камайиши, %	Ҳужайра ўсишининг камайиши, %
ЛПБ ₅₀	10	52,4 ± 1,4	48,3 ± 0,9
Этопозид	10	48,8 ± 0,8	50,0 ± 1,4
Колхицин	1	49,4 ± 1,1	48,0 ± 0,9
Этопозид+Колхицин	10 +1	83,4 ± 0,3	80,1 ± 0,5
ЛПБ ₅₀ + Этопозид	10+10	62,3 ± 2,4	61,0 ± 1,9
ЛПБ ₅₀ +Колхицин	10+1	78,2 ± 1,5	77,8 ± 0,6
Цисплатин	1	47,6 ± 1,4	45,2 ± 0,8

6-жадвалда кўрсатилганидек, хужайра ўсишининг логарифмик фазасида этопозид ва колхицин хужайра ўсишини 83%га камайтирган. Бу эа, хужайра бўлинишининг 2-фаза –S даврни (ДНК репликацияси) ва митозни блоклаб, цитотоксик таъсир юзага келганидан далолат беради. 50% дозада ЛО₅₀ ва этопозиднинг биргаликдаги таъсири натижасида (10 ва10 мкг/мл) хужайра ўсишини камайишини 62%ни ташкил қилган. Демак, ЛО₅₀ ҳам этопозид каби S-даврга таъсир қилади. ЛО₅₀ ва колхициннинг биргаликдаги таъсирида олинган натижалар этопозид ва колхициннинг биргаликдаги таъсирида олинган натижалари билан мос келади. Шундай қилиб, ЛО₅₀ ва колхицин хужайра ўсишини S-даврга ва митозда камайтиради.

Шуни эътиборга олиш керакки, ЛО₅₀ ва этопозид хужайра культурасига алоҳида таъсир қилганига нисбатан, уларнинг биргаликдаги таъсири натижасида юқори цитотоксик фаоллик кузатилган. Бундан ташқари, ЛО этопозиднинг таъсирини кучайтирган. Олинган натижалар адабиётлардан олинган натижалар билан мос келади.

Олинган натижалар, мақсадга йўналтирилган дори воситаларини маълум бир ўсма турига таъсирини аниқлаш учун хужайра культурасидан фойдаланишга асос бўлади.

Олинган тадқиқот натижаларига кўра, ЛПБ₅₀ нинг хужайрага таъсири оксил дозасига боғлиқ экан. ЛО₅₀, этопозид ва колхицин билан биргаликда олиб борилган тадқиқот натижалари, ЛО₅₀ нинг айнан S – даврга таъсир қилиши мумкинлигидан далолат беради.

Лактатдегидрогеназа фаоллигини аниқлаш. Хужайра мембранаси бутунлигини таҳлил қилувчи тестлардан бири, шикастланган мембранадан культура ташқи муҳит суюқлигига ажралиб чиқадиган, цитозол фермент-лактатдегидрогеназининг (ЛДГ) ҳолатини баҳолаш ҳисобланади. Ушбу тест, хужайра мембранаси бутунлиги бузилишини белгиловчи маркер сифатида қўлланилади. Модданинг салбий таъсири унинг хужайра мембранаси бутунлигига таъсири, яъни, хужайра ташқи муҳитига ЛДГ нинг чиқиши билан баҳоланади. Лактатдегидрогеназа фаоллиги иккита хужайра линиясида HeLa ва U937 баҳоланган (7-жадвал).

7-жадвал

***Cuscuta europea* ЛО таъсирида HeLa хужайраларидан
лактатдегидрогеназа чиқиши (M ± m, n = 9, P<0,05)**

Моддалар	ЛДГ фаоллиги, %		
	100 мкг/мл	10 мкг/мл	1 мкг/мл
∑ фракция	26,3±0,2	8,3±0,0	3,2±0,1
C ₂₀	23,4±0,2	5,4±0,1	4,3±0,2
C ₅₀	25,2±0,1	5,2±0,2	3,8±0,1
ЛПБ ₂₀	27,3±0,2	7,1±0,2	5,7±0,2
ЛПБ ₅₀	28,6±0,0	9,7±0,1	5,6±0,1
цисплатин	30,2±0,2	22,4±0	5,5±0,1

7-жадвалда кўрсатилганидек, ЛО умумий фракцияси, ЛО₂₀ ва ЛО₅₀ таъсирида ЛДГ нинг юқори фаоллиги кузатилган ва бу фракциялар таъсири натижасида хужайра мембранаси шикастланганидан далолат беради. U937 хужайра культурасида ҳам шу каби фаоллик кузатилган. Натижалар ушбу оксилларнинг цитотоксик фаоллиги билан мос келади.

Гипоосмотик стресс шароитида зарпечак гликопротеидларининг тимоцитлар ҳажм бошқарилишига таъсири. Муҳит осмотиклиги ўзгарувчан шароитда хужайра ҳажмининг доимий сақланиши унинг фундаментал хусусиятларидан бири ҳисобланади.

Олдинги тадқиқотларда зарпечак ўсимлиги турли экстрактларининг (ЗЭ) мембранани фаолловчи хусусияти текис қўшқаватли мембраналарда олиб борилган. Фосфолипид сифатида тухум фосфатидилэтаноламинидан фойдаланилган ва ЗЭ нинг таъсирида мембрананинг бузилиши якка калийли каналлар ўтказувчанлиги билан боғлиқлиги кўрсатилган. Ушбу тадқиқот, б.ф.д.Салахутдинов Б.А. раҳбарлигидаги 4Ф–419 «Канцеролитик фаол табиий бирикмаларни тадқиқ қилиш ва уларнинг асосида ўсмага қарши дори воситаларини яратиш» лойиҳаси асосида амалга оширилган.

Гипоосмотик стресс шароитида зарпечак ЛО нинг тимоцитлар ҳажм бошқарилишига таъсири ўрганилган.

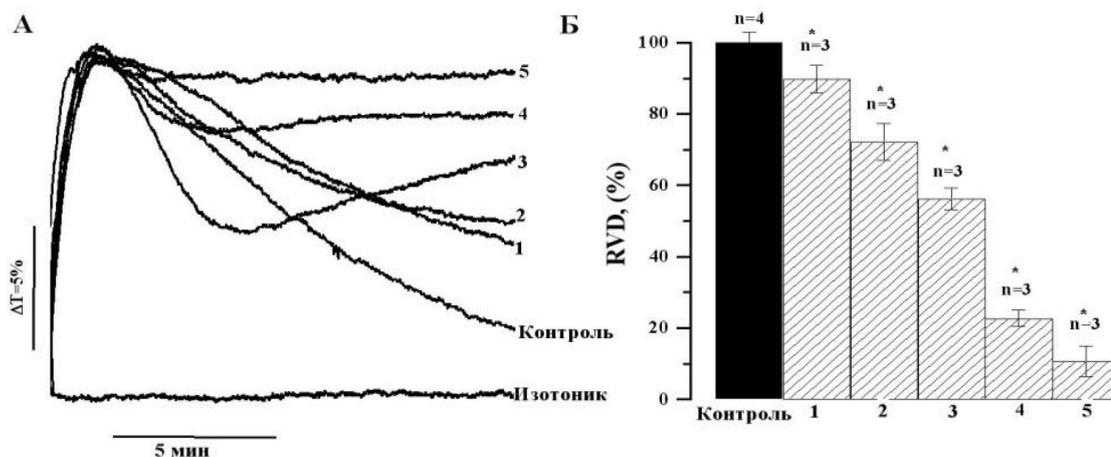
6-8 ҳафталик зотсиз каламушлардан тимоцитлар стандарт услуб бўйича ажратилди ва трипан кўки ёрдамида хужайраларнинг ҳаётчанлиги аниқланди. Тимоцитлар ҳажми ўзгаришини 25°C да термостат кюветасида ўтувчи нур ва $10^4 \cdot 10^6$ хуж/мл концентрацияда қайд қилинган. Таҷрибада хужайра ҳажмини ёруғлик ўтказувчанлиги бўйича қайд қилиш усули қўлланилган. Тимоцитлар ҳажми ўзгаришини микроколориметр МКМФ-1 ёрдамида қайд қилинди. Ютилиш максимуми 610 нм бўлган ёруғлик фильтри қўлланилди. Микроколориметрда ўлчанган сигнал У5-11 операцион кучайтиргичи ёрдамида кучайтирилди ва GO!Link (Qubit Systems, Канада) аналог-рақам конвертори орқали компьютерга (Pentium IV) узатилиб, Logger Lite (Qubit Systems, Канада) махсус дастури ёрдамида 100 Гц частотасида қайд қилинди. Биз, гипоосмотик стресс шароитида хужайра ҳажмининг тикланиши жараёнини миқдорий тавсифлашда, RVD (Regulatory Volume Decrease; ҳажм бошқарилишининг камайиши параметридан фойдаландик, куйидаги формула орқали ифодаланади:

$$RVD = (T_{max} - T_0) / (T_{max} - T_{15}) * 100\%$$

T_0 и T_{max} – бошланғич ва максимал ёруғлик ўтказувчанлик бирлиги, T_{15} – гипоосмотик стресс бошланганидан 15 минутдан кейинги ёруғлик ўтказувчанлик. Хужайра ҳажмининг тўла тикланишида RVD=100%. Ҳажм бошқарилишининг тўла камайишида RVD=0.

Гипотоник эритмага ЛО 10 мкг/мл концентрацияда таъсир этирилганда, гипоосмотик муҳитда тимоцитлар ҳажми бошқарилишига сезиларли даражада таъсир кўрсатмади. Навбатдаги тадқиқотда, ЛО

фракцияларининг концентрациси 100 мкг/мл гача оширилди. Олинган натижалар 3-расмда келтирилган.



3-расм. ЛО нинг (100 мкг/мл) тимоцитлар хужайра ҳажми ўзгаришининг кинетикасига таъсири.

Чапда- тимоцитлар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги ўзгариши регистрациясининг оригинал ёзуви кўрсатилган; (А); Ўнгда – гипотоник муҳитда бўкишдан кейин хужайра ҳажми тикланишининг % кўрсатилган (Б).

Илова : 1- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ёрдамида 50% ли чўктириши ёрдамида олинган супернатант; 2 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ёрдамида 20% ли чўктириши ёрдамида олинган супернатант; 3-умумий оқсиллар; 4- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ёрдамида 50% ли чўктириши ёрдамида олинган чўкма ; 5- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ёрдамида 50% ли чўктириши ёрдамида олинган чўкма.

3-расмда кўрсатилганидек, ушбу шароитда барча тадқиқ қилинган фракциялар тимоцитлар ҳажм бошқарилишига статик жиҳатдан сезиларли даражада ингибирловчи таъсир кўрсатган. LO_{50} ва LO_{20} фракциялари нисбатан фаоликни номоён қилди, яъни, назоратга нисбатан ҳажм бошқарилишининг камайиши $14.9 \pm 1.5\%$ ва $7.1 \pm 1.5\%$ га тенг бўлди.

Шундай қилиб, илк бор *Cuscuta evropea* лектинсимон оксилларининг гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишини камайтирувчи таъсири аниқланган. Ўрганилаётган моддаларнинг RVD га таъсир механизми, фракцияларнинг ҳажмни-фаоллаштирувчи калийли каналларга таъсири билан боғлиқ бўлиши мумкин.

Зарпечак лектинсимон оқсилларининг антиоксидант фаоллиги. Маълумки, ўсимликларнинг лектинсимон оксиллари ҳимоя вазифасини бажаради. Бошқа томондан, токсик ҳисобланган полифеноллар ҳам (госсипол) антиоксидантлик хусусиятига эга.

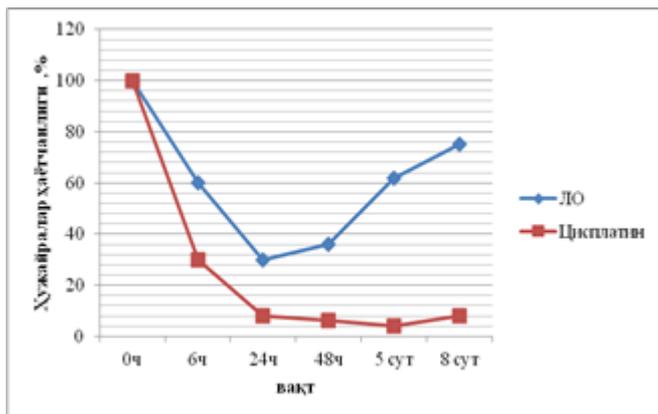
Шунга боғлиқ равишда, паразит ўсимликлардан *Cuscuta evropea* лектинсимон оксилларининг липидлар пероксидли оксидланиши натижасида ҳосил бўлган иккиламчи маҳсулот – малон диальдегид (МДА) миқдорининг ортишига ва антиоксидантликни ҳимояловчи фермент-супероксиддисмутаза (СОД) фаоллигига таъсири ўрганилган.

Илк бор, зарпечак ўсимлигининг умумий оксил, C_{50} ва LO_{50} фракциялари маълум даражада МДА миқдорини ва антиоксидантликни

ҳимоя қилувчи фермент- супероксиддисмутаза фаоллигига таъсир қилиб, деярли, сезиларсиз антиоксидантлик фаолликни номоён қилиши кўрсатилган.

ЛО₅₀ таъсирида ҳужайралар нобуд бўлиши динамикаси. Навбатдаги тадқиқотларимизда, инкубация вақтига боғлиқ равишда ҳужайралар нобуд бўлиши динамикаси кузатилган. Тажрибада, 20минг./мл ҳужайралар 100 мкл дан 96-ўйиқли платаларга ўтказилди. Кейин ҳар бир ўйиққа 10 мкг ЛО₅₀ таъсир эттирилди (конц.100мкг/мл). Ҳар 12 соатдан трипан кўки ёрдамида Горяева камерасида ҳужайралар сони саналди.

Натижалар 4-расмда кўрсатилган.



Расм.4. ЛО таъсирида Акат ҳужайраларининг нобуд бўлиши динамикаси.

4-расмда ЛО₅₀ таъсирида Акат ҳужайраларида цитотоксик фаоллик кўрсатилган. Ҳужайраларнинг максимал нобуд бўлиши (70%) 24 соатда кузатилган бўлиб, кейинчалик ҳаётчан, колония ҳосил қилувчи ҳужайралар моноқават ҳосил қилиб, культивирланишни давом қилган.

Цисплатин препарати эса, 24 соатда максимал таъсир қилиши 90% ни ташкил қилса, 5 суткага яқинлашганда 100% ҳужайраларнинг нобуд бўлиши кузатилган. Демак, цисплатин препарати узоқ давомий таъсир кўрсатади. Аммо, 8 суткада бир ёки иккита ҳужайраларнинг кичик колониялари пайдо бўлганлиги диққатга сазовор бўлган. Бундан келиб чиқиб айтишимиз мумкинки, препарат таъсиридан сўнг қолган битта ҳаётчан ҳужайра ҳам қулай шароитда иккига бўлиниб, кейинчалик колония ҳосил қилиши мумкин экан.

ХУЛОСАЛАР

1. Сичқон ингичка ичак аденокарциномасидан Акат деб номланган янги, стабил, кўчириб ўтказилувчи ҳужайра культураси олинди.

2. Биологик фаол, жумладан, ўсмага қарши фаол моддаларни аниқлаш мақсадида экстрактлар, қуйи молекуляр массага эга ва оксил-пептид табиатли моддаларни кенг доирада скрининг қилиш учун, Акат линияси асосида эффектив тест-таҳлил тизими яратилди.

3. Илк бор, *Alhagi. L.* ўсимлигида паразит ҳолда ўсувчи *Cuscuta europea* ўсимлигидан лектинсимон оксиллар ажратилди. 20% ва 50% ли аммоний сульфат ёрдамида чўктириш натижасида ажратилган *Cuscuta europea*

лектинсимон оксиллари турли ҳужайра линияларида дозага боғлиқ бўлган юқори цитотоксик фаолликни номоён қилиши аниқланди. Акат, бачадон бўйни ўсмаси кўкрак ўсмаси ҳужайраларига (C127) нисбатан сезилувчанлиги юқори эканлиги кўрсатилди.

ЛО ўсмага қарши препаратлар таъсир кучини ошириши аниқланди. ЛО ва этопозиднинг биргаликдаги таъсири, ЛО нинг айнан ҳужайра бўлинишининг G2- фазасига ва шу билан бирга S- фазасига ҳам таъсир қилишини кўрсатди.

4. Лектинсимон оксиллар таъсирида лактатдегидрогеназа фаоллиги ортиши, айниқса, ЛО₅₀ фракция таъсирида кузатилди.

5. Илк бор, *Cuscuta evropea* уруғидан ажратилган лектинсимон оксилларинг гипоосмотик шароитда тимоцитлар ҳажм бошқарилишини камайтирувчи таъсири аниқланди. Зарпечакнинг умумий оксил, С₅₀ ва ЛО₅₀ фракциялари МДА ни маълум миқдорда камайтирди ва антиоксидантликни ҳимоя қилувчи фермент- супероксиддисмутаза фаоллигига таъсир қилиб, сезиларли даражада бўлмаган антиоксидант фаолликни номоён қилди.

**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**

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

КАХОРОВА КОМОЛА АЗАМАТОВНА

**ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ПРИ
ОПИСАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕЛКОВО-
ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ**

02.00.10-Биоорганическая химия

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

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/B83

Диссертации выполнена в Институте биоорганической химии.

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

Научный руководитель: **Хашимова Зайнат Саттаровна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Хушбактова Зайнап Абдурахмановна**
доктор биологических наук, профессор

Левицкая Юлия Владимировна
кандидат биологических наук, доцент

Ведущая организация: **Ташкентский фармацевтический институт**

Защита диссертации состоится «__» _____ 2018 г. в __ часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017.К/В/Т.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: 100125, 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 разового Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., академик

М.И. Асраров
Ученый секретарь разового Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор

Ш.У.Турдикулова
Председатель Научного семинара при разовом Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., доц

ВВЕДЕНИЕ (Аннотации диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мировой практике любое новое соединение независимо от предполагаемых целей его применения должно быть охарактеризовано с точки зрения его возможной токсичности и биологической активности. Поэтому для тестирования и отбора активных веществ, включая противоопухолевые, в последние десятилетия успешно применяются модельные системы вне организма, т.е. используют панели нескольких клеточных культур. Это позволяет увеличить отбор потенциальных лекарственных препаратов, которые в дальнейшем будут изучаться *in vivo*.

Анализ литературных данных в мировом масштабе показал, что наряду с существующими низкомолекулярными препаратами для терапии раковых заболеваний, наибольшее внимание в последнее время уделяется соединениям белково-пептидной природы. Среди них в качестве лекарственной альтернативной терапии рака внимание привлекает ряд препаратов, полученных из растений паразитов (*Haustoria*), в частности омелы белой. В странах Западной Европе успешно применяют препараты, получаемые из растения омелы белой в виде экстрактов (препарат Искадор, приготовленный по специальной технологии водного экстракта листьев и стандартизованный по лектину ML-1). Среди паразитирующих растений большой интерес вызывает также повилика (*Cuscuta*). В составе экстракта *Cuscuta chinensis* обнаружены противоопухолевые вещества гликозидподобной природы.

В настоящее время в Республике проведены комплексные научно-исследовательские работы и получены весомые результаты по выявлению веществ, обладающих цитотоксической активностью. В 4-м направлении Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан поставлены задачи по «улучшению дальнейшего развития фармацевтической промышленности, обеспечению населения и медицинских учреждений дешевыми высококачественными препаратами»¹. Исходя из вышеизложенного, создание новых тест-систем на основе культур клеток для скрининга биологически активных веществ, включая противоопухолевые соединения, имеет важное научно-практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указах Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года УП-4947 «О стратегии действий по пяти приоритетным направлениям дальнейшего развития Республики Узбекистан» и от 7 ноября 2017 года УП-5229 «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

¹ Указ Президента Республики Узбекистан № УП-4947 от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

Соответствие исследования с приоритетными направлениями 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. Исследования по изучению цитотоксической активности соединений на клеточных культурах начались в мире в 70-х годах прошлого столетия. (R.I. Freshney, T. Mossman). Так в национальном противораковом центре США широкое распространение получила клеточная линия эпидермоидной карциномы носоглотки KB, культура клеток карциномы человека He и др. В настоящее время во всем мире для исследования биологически активных веществ используют панели клеточных культур, состоящие из 10-ти и более культур.

В СНГ прескрининг веществ на перевиваемых культурах клеток начался в 80-х годах прошлого столетия (Россия). Я.В. Добрыниным с сотрудниками была предложена новая перевиваемая клеточная линия рака яичника человека CaO для отбора перспективных цитостатиков. Эти исследования в дальнейшем продолжили ряд ученых (М.Ю. Еропкин, А.А. Алексеев, А.А. Тухбатова, Е.О. Данченко, М.А. Романова и др.).

В Узбекистане исследования на перевиваемых культурах клеток по определению цитотоксической активности веществ начались в 80-х годах прошлого столетия в Институте биоорганической химии Н.Н. Кузнецовой с сотрудниками. Была создана тест-система для скрининга потенциальных противоопухолевых веществ на перевиваемой клеточной линии CaPa (рак поджелудочной железы человека). В дальнейшем в Институте в 2005 году Н.Н. Кузнецовой была получена и запатентована новая линия клеток меланомы мышей КМЛ, для изучения, как цитотоксической активности веществ, так и антиметастатической активности. В настоящее время в Институте биоорганической химии и Химии растительных веществ ведутся исследования биологической активности веществ на нескольких линиях клеточных культур (профессор Ш.С. Азимова, З.С. Хашимова).

Несмотря на интенсивные исследования компонентов паразитирующего растения *Cuscuta*, белково – пептидные компоненты мало изучены. В литературе нет сведений об исследованиях лектинов *Cuscuta*, поэтому выделение, характеристика лектиноподобных гликопротеидов *Cuscuta europaea* и определение цитотоксической активности является актуальным и имеет научно-практическую значимость.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ прикладных проектов Института биоорганической химии ФА-А6 ТО64 «Создание биотехнологии получения рекомбинантного инсектотоксина VusaIT из яда кавказского подвида скорпиона *Mesobuthus caucasicus* и проведение его прикладных испытаний на животных и культурах раковых клеток» (2016-2017) и ПЗ-20171024153 «Создание тест-системы на основе культуры

клеток аденокарциномы мыши для широкого скрининга биологически активных веществ» (2018-2019).

Целью исследования является выделение, характеристика лектиноподобных гликопротеидов *Cuscuta europeae* и анализ цитотоксической активности на моделях клеточных культур Акат, В-16, КМЛ, HeLa, C127, U937.

Задачи исследования:

выведение и характеристика новой перевиваемой клеточной культуры из аденокарциномы тонкого кишечника мыши, определение чувствительности полученной нами клеточной линии рака тонкого кишечника мыши Акат;

создание эффективной тест-системы на основе культуры клеток аденокарциномы мыши Акат для широкого скрининга биологически активных веществ;

выделение и характеристика лектиноподобных белков (ЛПБ) из семян *Cuscuta europeae*;

изучение цитотоксической активности лектиноподобных гликопротеидов на различных перевиваемых линиях клеточных культур;

изучение влияния ЛПБ на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе, устойчивость клеток к окислительному стрессу, определение активности цитозольного фермента ЛДГ и др.

Объектом исследования являются лектиноподобные белки *Cuscuta europeae*, культуры раковых клеток Акат, В-16, КМЛ, HeLa, C127, U937, тимоциты, выделенные из беспородных белых крыс 6-8 недельного возраста, красные кровяные клетки кролика.

Предметом исследования является определение цитотоксической активности лектиноподобных белков *Cuscuta europeae*.

Методы исследования. В экспериментах использовались современные биофизические и биохимические методы. Выделение и характеристика лектиноподобных белков *Cuscuta europeae* осуществлялись с помощью стандартных методов. Биологическую активность определяли с помощью МТТ- теста и подсчета живых клеток. Выход глутатиона определялся с помощью метода количественной колориметрии, основанном на реакции 5,5-дителиобис-2-нитробензойной кислоты с глутатионом. Изменения объема клеток определялись по светопропусканию клеточной суспензии.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

выведена и определены ростовые факторы новой клеточной культуры аденокарциномы тонкого кишечника мыши (Акат);

создана эффективная тест – система на основе выведенной клеточной линии Акат для скрининга широкого круга биологически активных веществ;

впервые выделены и охарактеризованы лектиноподобные белки *Cuscuta europeae*, паразитирующей на *Alhagi L*;

впервые определена биологическая активность выделенных белков, включающая цитотоксичность, мембранноактивность и антиоксидантность.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

оптимизированы условия выведения новой клеточной культуры из опухолевой ткани Акатон, этапы культивирования, клонирования и получения стабильной линии перевиваемой культуры клеток;

созданы условия хранения клеток, т.е. замораживание, хранение в жидком азоте, размораживание и получение жизнеспособных клеток.

продемонстрирована схема выделения лектиноподобных белков, определена гемагглютинирующая активность и углеводная специфичность, цитотоксическая активность лектиноподобных белков на различных линиях культуры по МТТ тесту.

доказано повреждающее действие лектиноподобных белков на мембраны раковых клеток по активности выхода лактатдегидрогеназы.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что они получены с применением современных биофизических и биохимических методов исследований. Статистическую обработку всех данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента и стандартных пакетов программ “Origin” и “Microsoft Excel”. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$ и $p < 0,01$. Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение их на республиканских и международных конференциях, и публикация результатов исследования в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследований заключается в том, что лектиноподобные белки действуют на S-период, преимущественно на G2-фазу клеточного деления. Впервые показано повреждающее действие ЛПБ на мембрану клеток по выходу лактатдегидрогеназы.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что получена новая клеточная линия Акат из аденокарциномы тонкого кишечника мыши. Создана эффективная тест-система на основе клеточной линии Акат для скрининга широкого круга биологически активных веществ. Результаты диссертационной работы имеют важное практическое значение для фармакологии и медицины. Созданная тест-система может использоваться в качестве скрининга вновь синтезированных веществ и служить учебным пособием по выведению клеточной линии.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов по выведению новой клеточной линии Акат:

штамм культивируемых клеток рака тонкого кишечника мышей Акат, клон Е7. Получен патент на изобретения Агентства интеллектуальной собственности Республики Узбекистан (№ IAP 05428, 2017 г). Возможно использование созданной тест-системы на основе культуры клеток линии Акат для скрининга биологически активных веществ.

клеточная линия Акат и Сасо-2 использованы в рамках научного проекта Т.4-16 «Поиск микроорганизмов-продуцентов бактериоцинов и оценка возможности их использования в пищевой промышленности»(2016-2017) при оценке лактобацилл в адгезии кишечнике *in vitro* (справка №4/1255-1946 от 24 июля 2018 года). Полученные научные результаты дали возможность использовать лактобациллы в пищевой промышленности.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 4 международных и 3 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации получен патент РУз, опубликовано 19 научных работ, из них 10 научных статей, в том числе 6 в республиканских, 3 в журналах СНГ, 1 в зарубежном журнале.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 104 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки, излагается научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Определение биологически активных соединений *Cuscuta europeae* на моделях клеточных культур**» приведены литературные данные о биологически активных компонентах паразитирующих растений, в частности омелы белой и повилики, общие характеристики системы скрининга новых полученных соединений, включая модели клеточных культур.

Во второй главе диссертации «**Методы выведения перевиваемой культуры клеток, выделение и характеристика, включая биологическую активность лектиноподобных белков *Cuscuta europeae***» приведены материалы, использованные в работе и методы, в частности , методы биоорганической химии (электрофорез, методы качественного и количественного определения белка и углеводов), методы клеточной биологии (выведение культуры клеток, культивирования и хранения), методы биохимии (калориметрические методы-МТТ, ЛДГ-тест, определения гемагглютинирующей активности). описаны основные стадии экспериментов, материалы и методы.

Перевиваемую клеточную культуру получали из опухоли Акатон (рак тонкой кишки мыши) и в дальнейшем культивировали в ростовой среде RPMI– 1640. Культуры раковых клеток HeLa, C127, В-16, U937 были

любезно предоставлены академиком Сабировым Р.З., которые были адаптированы к нашим условиям культивирования. Цитотоксическая активность изучали по трем тестам: МТТ-тест, ЛДГ-тест и подсчет живых клеток.

Лектиноподобные белки из семян повилики выделяли по стандартной методики. Гемагглютинирующую активность и углеводную специфичность мембранных белков ЛПБ определяли в иммунологических планшетах по методу Поспелова.

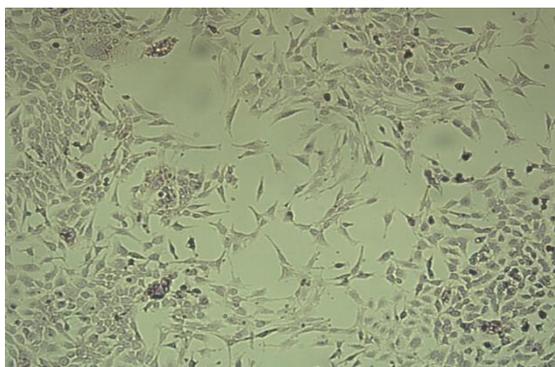
Выделение тимоцитов проводили по стандартной методике. Изменение объема тимоцитов исследовали по величине светопропускания при 610 нм.

В третьей главе диссертации «**Лектиноподобные белки *Cuscuta europaeae* и действие их на метаболизм клетки**» дано выведение новой клеточной линии аденокарциномы тонкого кишечника мыши, характеристика полученной линии, выделение, характеристика лектиноподобных гликопротеидов *Cuscuta europaeae* и действие этих белков на различные линии перевиваемых клеточных культур Акат, В-16, КМЛ, HeLa, C127, U937.

Выведение новой клеточной линии аденокарциномы тонкой кишки мыши.

Для расширения линии перевиваемых клеток выведена новая перевиваемая культура клеток из аденокарциномы тонкого кишечника мыши, названная Акат, которая хранится в Институте биоорганической химии в банке клеточных культур.

Штамм клеток получали путем удаления опухоли аденокарциномы тонкой кишки мыши с последующей гомогенизацией опухолевой ткани в гомогенизаторе для получения суспензии клеток в питательной среде RPMI – 1640, содержащей глутамин, телячью эмбриональную сыворотку, антибиотик и антимиотик. Клетки засеивались в культуральные матрасы, после образования единичных колоний клеток производилась смена среды и культивировались в атмосфере 5% углекислого газа в CO₂ - инкубаторе при 37° С и через 3 - 4 месяца культивирования клеточная линия, названная нами Акат, приобрела стабильность. Клетки пересевались 1 -2 раза в неделю с плотностью 5×10^4 кл/мл с коэффициентом посева 1:3 и были полностью переведены на среду RPMI – 1640, содержащую 10% телячью эмбриональную сыворотку, антибиотик, антимиотик, глутамин (ростовая среда). Штамм Акат был впервые заморожен на 60-65 пассажах по 1×10^6 на криофлакон объемом 1,8 мл. в логарифмической фазе роста и хранится в банке клеточных культур (рис.1)



Перевиваемая культура аденокарцинома тонкого кишечника мыши Акат, представлена эпителиоподобными полигональными клетками с гиперхромными ядрами. Форма ядра овально-округлая с двумя или тремя ядрышками. Клетки плотно прилегают к субстрату и к концу логарифмической фазы роста образуют почти сплошной тяжистый монослой. Клетки легко снимаются с поверхности раствором 1 мМ

Рис.1 Перевиваемая культура клеток ЭДТА. Акат, ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

Определение чувствительности клеток Акат. Для использования клеточной линии в качестве модели при изучении цитотоксического действия веществ нами изучена чувствительность полученной культуры клеток к действию клинических противоопухолевых препаратов разных классов: циклофосфан алкилирующий цитотоксический препарат; метотрексат, цитостатический препарат из группы антиметаболитов; доксорубицин, противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда; винбластин, вещество растительного происхождения, избирательно ингибирует синтез РНК и ДНК; цисплатин, синтетический противоопухолевый препарат, обладает свойствами бифункциональных алкилирующих агентов; этопозид- ингибитор топоизомеразы; фторафур, антиметаболит, противоопухолевое действие обусловлено нарушением синтеза ДНК и РНК.

Цитотоксический эффект противоопухолевых препаратов оценивали по включению МТТ в клетки и подсчету клеток трипановым синим.

Контролем служили клетки без воздействия веществ, где уровень включения ММТ в клетки было 100% (табл.1).

Таблица 1

Действие клинических противоопухолевых препаратов на перевиваемую культуру клеток Акат ($M \pm m$, $n = 3$, $P < 0,05$)

Доза, мкг/мкл Препараты	Подавление включения МТТ в клетки, %			Подавление роста клеток, %		
	100	10	1	100	10	1
1. Этопозид	75,0 \pm 0,3	59,2 \pm 0,7	36,3 \pm 0,4	72,6 \pm 0,5	57,3 \pm 0,6	32,2 \pm 0,1
2. Винбластин	81,2 \pm 0,1	65,4 \pm 0,1	57,1 \pm 1,1	83,7 \pm 0,3	62,6 \pm 0,1	56,7 \pm 0,2
3. Метатрексат	58,4 \pm 0,5	45,6 \pm 1,4	33,2 \pm 0,6	57,5 \pm 0,1	42,4 \pm 0,3	32,5 \pm 0,2
4. Доксорубицин	72,3 \pm 0,7	58,1 \pm 0,7	38,4 \pm 0,2	70,1 \pm 0,4	59,7 \pm 0,6	35,3 \pm 0,3
5. Циклофосфан	57,1 \pm 0,3	43,4 \pm 1,1	43,7 \pm 0,1	56,2 \pm 0,3	42,7 \pm 0,1	41,5 \pm 0,5
6. Цисплатин	96,7 \pm 0,1	92,3 \pm 0,1	56,5 \pm 0,7	97,1 \pm 0,4	90,8 \pm 0,3	54,3 \pm 0,7
7. Фторафур	59,1 \pm 0,2	58,5 \pm 0,8	49,3 \pm 0,9	56,8 \pm 0,4	53,3 \pm 0,3	48,3 \pm 0,1

Как следует из таблицы 1, все препараты проявляют цитотоксическую активность как по МТТ – тесту, так и по подсчету клеток. Наиболее высокую чувствительность проявил синтетический препарат цисплатин – при дозах 100, 10 и 1мкг/мл подавление роста клеток по МТТ – тесту составил 96,7%, 92,3% и 56,5%. Винбластин, доксорубин и этопозид проявляли выраженный цитотоксический эффект – цитотоксическая активность по МТТ- тесту составила 81,2%, 65,5%, 57,1, 72,2%, 58,1% и 38,4% и 75,0%, 59,2% и 36,3%, соответственно. Умеренную чувствительность проявили препараты метатрексат, фторафур и циклофосфан. Полученные данные коррелируются с данными по подсчету живых клеток трипановым синим.

Проведенный сравнительный анализ цитотоксической активности данных препаратов с клетками HeLa коррелируется с данными полученными на клетках Акат.

Таким образом, установлено, что новая перевиваемая культура клеток Акат достаточно чувствительна к действию клинических противоопухолевых препаратов и может быть использована как модельная клеточная система для скрининга минимальных количеств биологически активных веществ, включая противоопухолевые.

Выделение и характеристика лектиноподобных белков Cuscuta europaea. Среди паразитирующих растений большой интерес вызывает повилика (*Cuscuta*).

Для всестороннего исследования активных компонентов *Cuscuta europaea*, семена растения были собраны летом. Получены спиртовые, водные и солевые экстракты повилики, паразитирующие на луговых травах, янтате (*Alhagi.L*) и побегах фруктовых кустарниках. Установлено, что цитотоксическая активность компонентов *Cuscuta europaea* зависит от растений, на котором паразитирует повилика, высокая цитотоксическая активность выявлена в экстрактах повилики, паразитирующих на луговых травах, в частности на янтате.

Одним из малоизученных объектов являются лектиноподобные белки (ЛПБ) повилики. Лектиноподобные белки были выделены из семян повилики, паразитирующей на *Alhagi L.*, по стандартной методике путем экстракции солевым раствором с последующим ступенчатым высаливанием сульфатом аммония (схема 1).

по сравнению с суммарной фракцией и белковые полосы в основном сосредоточены в интервале от 12,5 -25 кДа.

Установлено, что наибольшую гемагглютинирующую активность проявляли фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀. Фракция белков ЛПБ₅₀ проявила высокую специфичность к глюкозе и маннозе.

Таким образом, впервые выделены и охарактеризованы лектиноподобные белки *Cuscuta europea*, произрастающей на *Alhagi L.*

Определение биологической активности лектиноподобных белков Cuscuta europea на различных линиях клеточных культур. Наиболее подходящей моделью к оценке биологической активности, а также определению характера действия новых белковых веществ является культура клеток.

Изучена цитотоксическая активность лектиноподобных белков (ЛПБ) повики в различных перевиваемых клеточных системах.

Цитотоксичность оценивали биохимически с помощью МТТ-метода, подсчета живых клеток, а также морфологически.

Перевиваемый штамм клеток КМЛ впервые был получен из перевиваемой опухоли меланомы мыши В-16 линии С₅₇В1 в Институте биоорганической химии им. акад. А.С.Садыкова в лаборатории биорегуляторов с.н.с. Кузнецовой Н.Н. с сотрудниками и на ее основе создана тест-система для широкого скрининга биологически активных веществ.

Сравнительное цитотоксическое действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на культурах клеток В-16 и КМЛ представлено в таблице 2

Таблица.2

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на культуры клеток В-16 и КМЛ (М ± м, n = 9, P<0,05)

Дозы мкг/мл Образцы	Подавление включения МТТ в клетки, %					
	В-16			КМЛ		
	100	10	1	100	10	1
Σ фракция	96,0±0,6	55,0±0,1	14,0±0,3	93,1±0,3	45,7±0,5	14,0±0,3
С ₂₀	61,0±0,3	46,0±0,6	15,0±0,1	81,2±0,1	38,4±0,3	13,8±0,5
С ₅₀	37,0±0,1	23,0±0,2	10,0±0,5	37,3±0,5	25,4±0,4	10,1±0,1
ЛПБ ₂₀	97,0±0,6	56,0±0,3	49,0±0,3	98,4±0,1	62,4±0,3	37,2±0,3
ЛПБ ₅₀	93,5±0,4	61,0±0,1	46,0±0,2	93,5±0,4	57,8±0,6	42,0±0,1
цисплатин	98,7±0,1	91,0±0,4	45,4±0,4	99,9±0,4	88,6±0,3	50,4±0,3

Как видно из таблицы 2, наибольшую цитотоксическую активность как на клетках В-16, так и на клетках КМЛ проявили суммарная фракция и фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ - 96%, 97% и 93,5% на клетках В – 16 и 93,1%, 98,4% и 93,5% на клетках КМЛ при дозе белка 100 мкг/мл, соответственно. При дозах 10 и 1 мкг эти фракции также проявили цитотоксическую активность на данных типах клеток.

Из сравнительного анализа следует, что данные, полученные на клетках В-16 с большей вероятностью коррелируются с данными, полученными на клетках КМЛ.

Изучено действие ЛПБ на перевиваемой линии клеток HeLa. (табл.3).

Таблица 3

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на культуру клеток HeLa (M ± m, n = 9, P<0,05)

Доза, мкг/мкл Образцы	Подавление включения МТГ в клетки, %			Подавление роста клеток, %		
	100	10	1	100	10	1
∑ фракция	100±0,1	45,3±0,6	19,6±0,1	99,1±0,1	34,6±0,1	17,4±0,1
C ₂₀	52,2±0,1	29,6±0,1	27,3±0,1	51,4±0,2	26,8±0,2	25,7±0,2
C ₅₀	45,5±0,2	28,7±0,1	15,6±0,2	46,4±0,1	26,4±0,2	14,3±0,2
ЛПБ ₂₀	98,3±0,1	58,4±0,1	18,7±0,2	96,5±0,1	55,4±0,1	19,3±0,2
ЛПБ ₅₀	94,3±0,2	60,8±0,1	47,7±0,1	95,3±0,2	58,6±0,2	37,6±0,2
Цисплатин	98,1±0,6	85,5±0,8	35,5±0,1	97,5±0,1	59,5±0,1	34,6±0,2

Как видно из таблицы 3, фракции белков *Cuscuta europea* оказывают различное воздействие на культуру клеток. Так, цитотоксическое действие на клетки HeLa оказывает суммарная фракция белка и фракции, полученные осаждением сульфатом аммония ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ - 100%, 98% и 94% при дозе белка 100 мкг/мл, соответственно. А также 60% цитотоксичность проявили фракция ЛПБ₅₀ при дозе белка 10 мкг/мл.

Аналогичные результаты подавления роста клеток получены при подсчете клеток трипановым синим

Также морфологически исследовали монослой клеток при воздействии белков и показана обеднение монослоя клеток (окрашивание клеток по методу Шабдаша).

Изучены полученные фракции ЛПБ на суспензионной культуре клеток крови U937 и на полученной перевиваемой линии клеток аденокарциномы тонкого кишечника мыши Акат (Табл.4 и 5).

Таблица 4

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на культуру клеток U937 (M ± m, n = 9, P<0,05)

Доза, мкг/мкл Образцы	Подавление включения МТГ в клетки, %			Подавление роста клеток, %		
	100	10	1	100	10	1
∑ фракция	100±0,1	31±0,1	17±0,1	98±0,1	35±0,1	17±0,3
C ₂₀	48±0,2	49±0,1	51±0,1	50±0,2	43±0,2	51±0,2
C ₅₀	49±0,1	51±0,2	42±0,2	52±0,2	49±0,2	40±0,2
ЛПБ ₂₀	86±0,5	64±0,1	61±0,2	80±0,2	60±0,3	59±0,2
ЛПБ ₅₀	93±0,2	76±0,2	53±0,2	95±0,1	70±0,2	46±0,3
Цисплатин	100±0,2	96±0,07	45±0,1	97±0,1	88±0,1	34±0,1

На клетках суспензионной культуры U937 наибольшую цитотоксическую активность проявили те же белки: суммарная фракция и фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ - 100%, 86% и 93% при дозе белка 100 мкг/мл.

Таблица 5

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europea* на культуру клеток Акат ($M \pm m, n = 9, P < 0,05$)

Доза, мкг/мл	Подавление включения МТТ в клетки, %			Подавление роста клеток, %		
	100	10	1	100	10	1
Образцы						
Σ фракция	86,1±0,5	33,4±0,6	10,3±0,3	83,2±0,3	30,6±0,4	6,5±0,5
C ₂₀	35,3±0,1	15,2±0,5	8,7±0,4	32,5±0,1	14,5±0,6	7,4±0,3
C ₅₀	40,2±0,3	12,5±0,4	10,5±0,5	39,4±0,5	10,3±0,4	6,5±0,2
ЛПБ ₂₀	89,2±0,3	58,4±0,9	43,6±0,1	87,3±0,8	55,3±0,6	41,2±0,2
ЛПБ ₅₀	96,0±0,2	60,1±0,5	40,4±0,6	95,1±0,1	57,2±0,3	34,1±0,3
Цисплатин	98,5±0,1	85,4±0,4	35,7±0,1	98,4±0,1	83,6±0,3	32,7±0,1

Как следует из данных таблице 5 цитотоксическая активность на культуре клеток Акат показывает, что суммарная фракция белка и фракции, полученные осаждением сульфатом аммония 20% и 50% также оказывают цитотоксическое действие. Так при дозе белка 100 мкг/мл цитотоксическая активность составляет 86%, 89% и 96% соответственно, при этом СЕ₅₀ ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ находится в интервале доз 10 мкг/мл и 1 мкг/мл. Аналогичные результаты подавления роста клеток получены при подсчете клеток трипановым синим.

Цитотоксическая активность ЛПБ на клетках рака груди С127 менее выражена.

Таким образом, лектиноподобные белки *Cuscuta europea*, осажденные 20% и 50% сульфатом аммония проявляют высокую цитотоксическую активность на различных линиях клеток. Однако разные клетки по разному проявляют чувствительность. Наиболее чувствительны клеточные культуры меланомы, аденокарциномы тонкого кишечника мыши и рака шейки матки, нежели клетки рака груди С127.

*Изучение сочетанного действия лектиноподобных белков *Cuscuta europea* с противоопухолевыми препаратами известного механизма действия.*

Исследование механизма действия биологически активных веществ на клетки-мишени требует комплексного подхода, состоящего из различных тестов с использованием нескольких индикаторов токсичности на клеточном уровне, набора клеточных культур и разных сроков токсического воздействия, процессов, происходящих внутри.

Для более детального изучения механизма действия ЛПБ в культуре клеток Акат в качестве инструмента были использованы клинические препараты с известным механизмом действия. Так, этопозид вызывает гибель клеток в G2 фазе и поздней S-фазе; колхицин, блокирует митоз клеток на стадии метафазы. Определено 50% подавление роста клеток (СЕ₅₀), который

составил для этопозида 10 мкг/мл и для колхицина – 1 мкг/мл. Для ЛПБ (СЕ₅₀) составил 10 мкг/мл.

Для опыта вводили вышеуказанные препараты в 50% дозах гибели клеток в перевиваемую линию клеток Акат отдельно или вместе (табл. 6).

Таблица 6

Эффект сочетанного действия ЛПБ₅₀ с клиническими препаратами на клетках Акат (M ± m, n = 3, P<0,05)

Образцы	Дозы мкг/мл, СЕ ₅₀	Подавление включения МТТ, %	Подавление роста клеток, %
ЛПБ ₅₀	10	52,4 ± 1,4	48,3 ± 0,9
Этопозид	10	48,8 ± 0,8	50,0 ± 1,4
Колхицин	1	49,4 ± 1,1	48,0 ± 0,9
Этопозид+Колхицин	10 +1	83,4 ± 0,3	80,1 ± 0,5
ЛПБ ₅₀ + Этопозид	10+10	62,3 ± 2,4	61,0 ± 1,9
ЛПБ ₅₀ + Колхицин	10+1	78,2 ± 1,5	77,8 ± 0,6
Цисплатин	1	47,6 ± 1,4	45,2 ± 0,8

Как видно из таблицы 6, в логарифмической фазе роста клеток при совместном действии этопозиде с колхицином наблюдается 83% подавление пролиферации клеточного роста, что свидетельствует о цитотоксическом действии препаратов, захватывающих 2 фазы деления клетки - S период (репликации ДНК) и митоз.

При сочетанном действии ЛПБ₅₀ и этопозиде, взятых в 50% дозах (10 и 10 мкг/мл, соответственно), наблюдается подавления роста клеток на 62%, т.е. ЛПБ₅₀ также как и этопозид действует на S – период. В случае ЛПБ₅₀ с колхицином, эффект подавления аналогичен по своему значению действию этопозиде с колхицином. Следовательно ЛПБ₅₀ и колхицин подавляют рост клеток в двух фазах - S периоде и митозе.

Следует отметить, что при сочетанном действии ЛПБ₅₀ с этопозидом наблюдается более выраженное подавления роста клеток, нежели взятых по отдельности, т. е ЛПБ усиливает действие этопозиде.

Полученные результаты дают основу применения клеточных культур для целенаправленного подбора лекарственных средств при воздействии на данную опухоль.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований обнаружено, что действие ЛПБ₅₀ на клетки зависит от дозы белка. Результаты по совместному действию ЛПБ₅₀ с этопозидом и колхицином, дают возможность предположить, что ЛПБ₅₀ преимущественно действует на S - период клеточного деления.

Определение активности лактатдегидрогеназы.

Одним из тестов целостности мембран клеток является также оценка уровня цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой в культуральную среду из поврежденной мембраны. Этот тест может быть использован как маркер нарушения целостности клеточной мембраны.

Негативное воздействие веществ оценивают по величине их воздействия на целостность мембран клеток, измеряемой по активности появляющейся во внеклеточной среде ЛДГ.

Лактатдегидрогеназную активность оценивали на двух линиях клеток HeLa и U937 (табл. 7)

Таблица 7.

Действие ЛПБ *Cuscuta europea* на выход лактатдегидрогеназы из клеток HeLa ($M \pm m, n = 3, P < 0,05$)

Вещества	Активность ЛДГ, %		
	100 мкг/мл	10 мкг/мл	1 мкг/мл
Σ фракция	26,3±0,2	8,3±0,0	3,2±0,1
C ₂₀	23,4±0,2	5,4±0,1	4,3±0,2
C ₅₀	25,2±0,1	5,2±0,2	3,8±0,1
ЛПБ ₂₀	27,3±0,2	7,1±0,2	5,7±0,2
ЛПБ ₅₀	28,6±0,0	9,7±0,1	5,6±0,1
цисплатин	30,2±0,2	22,4±0	5,5±0,1

Как следует из таблиц 7, как суммарная фракция ЛПБ, так и ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ проявляют высокую активность ЛДГ, что свидетельствует о повреждаемости мембран клеток. Такие же данные были получены и на клетках U937. Эти данные коррелируются с полученными данными по цитотоксической активности этих белков.

Влияние гликопротеидов повилки на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. Одним из фундаментальных свойств клетки является способность к активному поддержанию постоянства объема в условиях меняющейся осмотичности среды.

Ранее изучены мембраноактивные свойства экстрактов повилки (ЭП) на плоских бислойных мембранах, где в качестве фосфолипида был использован яичный фосфатидилэтаноламин и показано что разрыв мембраны под действием ЭП связан с проводимостью одиночных калиевых каналом. Работа выполнена совм. с д. б. н Салахутдиновым Б.А. по гранту 4Ф – 419 «Исследование природных соединений с канцеролитической активностью и создание на их основе противоопухолевых средств»

Изучено влияние ЛПБ повилки на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.

Выделение тимоцитов из 6-8 недельных белых беспородных крыс проводили по стандартной методике и жизнеспособность клеток определяли по включению трипанового синего. В работе использовали метод

регистрации клеточного объема по величине светопропускания. Изменение объема тимоцитов регистрировали в проходящем свете в термостатированной кювете при 25°C и конечной концентрации клеток $10^4 \cdot 10^6$ кл/мл. Использовали светофильтр с максимумом пропускания при 610 нм. Сигнал, измеренный с помощью микроколориметра МКМФ-1, усиливали с помощью усилителя У5-11, оцифровывали с помощью аналого-цифрового преобразователя GO!Link (Qubit Systems, Канада) и записывали на жёсткий диск компьютера (Pentium IV) с помощью программы Logger Lite (Qubit Systems, Канада) при частоте стробирования 100 Гц. Регуляторное уменьшение объема (RVD, regulatory volume decrease) рассчитывали по формуле:

$$RVD = (T_{max} - T_0) / (T_{max} - T_{15}) * 100\%$$

где T_0 и T_{max} – начальное и максимальное значение светопропускания, T_{15} – значение светопропускания, измеренное через 15 минут после начала гипотонического стресса.

При полном восстановлении клеточного объема до исходного уровня $RVD = 100\%$. При полном подавлении регуляции объема $RVD = 0$.

Внесение в гипотонический раствор ЛПБ в концентрации 100 мкг/мл не оказывало существенного влияния на степень восстановления объема тимоцитов в гипоосмотической среде. В следующей серии экспериментов концентрация фракций ЛПБ была повышена до 100 мкг/мл. Полученные данные представлены на рис. 3.

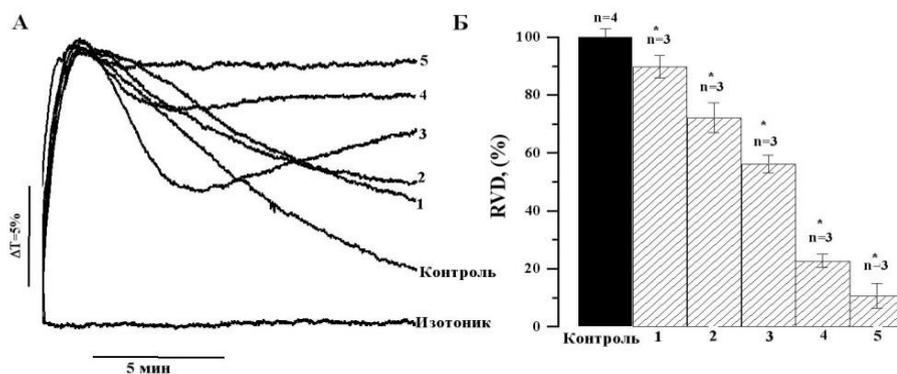


Рис.3. Влияние ЛПБ (100 мкг/мл) на кинетику изменения клеточного объема тимоцитов.

Слева - показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии тимоцитов (А); Справа - показан процент восстановления клеточного объема после набухания в гипотонической среде (Б).

Обозначения: 1-супернатант при 50%-ном осаждении $(NH_4)_2SO_4$; 2-супернатант при 20%-ном осаждения $(NH_4)_2SO_4$; 3-суммарные белки; 4- осадок после 50%-ного осаждения $(NH_4)_2SO_4$; 5- осадок после 20%-ного осаждения $(NH_4)_2SO_4$;

Как следует из данных рис. 3, в этих условиях все исследованные фракции оказывали статистически значимое ингибирующее влияние на регуляцию объема тимоцитов. При этом наиболее активными оказались

фракции ЛПБ₅₀ и ЛПБ₂₀, для которых регуляторное уменьшение объема составило $14.9 \pm 1.5\%$ и $7.1 \pm 1.5\%$ от контроля, соответственно.

Таким образом, впервые показано, что лектиноподобные белки из семян повилики *Cuscuta evropea* оказывают подавляющее влияние на регуляцию объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса. Механизм действия исследованных вещества на RVD может быть связан с их влиянием на объем-активируемые калиевые каналы.

Антиоксидантная активность лектиноподобных белков повилики. Как известно, лектиноподобные белки выполняют защитные функции в растениях. С другой стороны токсичные полифенолы (госсипол) проявляет антиоксидантные свойства.

В связи с этим нами изучено влияние ЛПБ, выделенных из паразитирующего растения *Cuscuta europa*, на нарастание вторичных продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА), а также на активность фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД).

Нами впервые было показано, что суммарная фракция белков, а также фракции С₅₀ и ЛПБ₅₀ повилики семян, проявляли менее выраженные антиоксидантные свойства, снижая уровень МДА, а также активируя ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазу

Динамика гибели клеток под действием ЛПБ₅₀. Далее была исследована динамика гибели клеток в зависимости от времени инкубации. Для этого клетки рассеивали в 96-луночные платы в количестве 20 тыс./мл клеток по 100 мкл в лунку, затем вводили в лунку по 10 мкг ЛПБ₅₀ (конц. 100 мкг./мл). Затем через каждые 12 часов считали количество клеток с помощью трипанового синего в камере Горяева.

Данные представлены на рис.4.

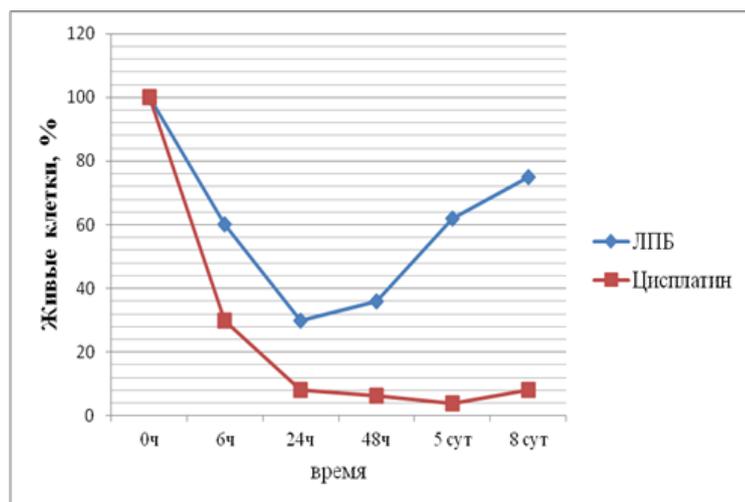


Рис. 4. Динамика гибели клеток Акат под действием ЛПБ.

Максимальная гибель клеток наблюдается через 24 часа (70%), при дальнейшем культивировании количество жизнеспособных, колониеобразующих клеток возрастает, образуя монослой клеток. Что касается цисплатина, то через 24 часа наблюдается около 90% гибели клеток,

на 5 сутки наблюдается практически 100% гибель клеток, что означает пролонгированное действие препарата. На 8 сутки культивирования клеток наблюдаем рост единичных клеток с образованием колонии. Этот факт свидетельствует о том, что оставшаяся жизнеспособным хотя бы одна клетка при благоприятных условиях может удваиваться и дать новые колонии клеток.

ВЫВОДЫ

1. Выведена и охарактеризована новая стабильная перевиваемая культура клеток аденокарциномы тонкого кишечника мыши, названная нами Акат.

2. Создана эффективная тест-система на основе клеточной линии Акат для скрининга широкого круга низкомолекулярных веществ, экстрактов, соединений белково-пептидной природы, включая противоопухолевые.

3. Нами впервые выделены и охарактеризованы лектиноподобные белки *Cuscuta europea*, паразитирующей на *Alhagi. L.* Установлено, что лектиноподобные белки *Cuscuta europea*, осажденные 20% и 50% сульфатом аммония проявляют высокую дозозависимую цитотоксическую активность на различных линиях клеток. Наиболее чувствительны клеточные культуры меланомы, Акат и рака шейки матки, нежели клетки рака груди (С127).

Установлено, что ЛПБ усиливает действие противоопухолевых препаратов. Показано, что ЛПБ действует преимущественно на G2- фазу, а также S- период клеточного деления.

4. Установлено, что под действием лектиноподобных белков возрастает активность лактатдегидрогеназы и более выраженный характер наблюдается в случае ЛПБ₅₀.

5. Впервые показано, что лектиноподобные белки из семян *Cuscuta evropea* оказывают подавляющее влияние на регуляцию объема тимоцитов в условиях гипосмотического стресса. Показано, что суммарная фракция белков, а также фракции С₅₀ и ЛПБ₅₀ повилики семян, проявляли менее выраженные антиоксидантные свойства, снижая уровень МДА, а также активируя ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазу.

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

INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

KAKHOROVA KOMOLA AZAMATOVNA

**APPLICATION OF CELL CULTURE MODELS IN DESCRIPTION OF
BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PROTEIN-PEPTIDE
NATURE**

**02.00.10-Bioorganic chemistry
(biological sciences)**

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

Tashkent – 2018

This dissertation of PhD has been registered with the number B2017.2.PhD/B83 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

The dissertation has been prepared at the Institute of Bioorganic Chemistry.

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:

Khashimova Zaynat Sattarovna
Doctor of biological sciences

Official opponents:

Xushbaktova Zaynap Abdurahmanovna
Doctor of biological sciences, professor

Levitskaya Yuliya Vladimirovna
Candidate of biological sciences

Leading organisation:

Tashkent Pharmaceutical institute

The defence of the dissertation will take place on "____" _____ 2018 year ____ at the meeting of the Scientific council DSc27.06.2017.K/B/T.37.01. on award of scientific degrees at the Institute of Bioorganic Chemistry and 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 Institute of Bioorganic Chemistry (registration number____). (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262-35-40; fax: (99871)-262-70-63 e-mail: asrarov54@mail.ru).

Abstract of dissertation is distributed on "____" _____ 2018 year
(Protocol at the register _____ on "____" _____ 2018 year.

Sh.I. Salikhov

Chairman of once-only Scientific council on award of scientific degress, D.B.Sc., academician

M.I. Asrarov

Scientific secretary of once-only Scientific council on award of scientific degress, D.B.Sc., professor

Sh.U. Turdikulova

Chairman of once-only Scientific seminar under once-only Scientific council on award of scientific degress, D.B.Sc.

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work is isolation and characterization of glycoproteins of *Cuscuta europeae* and studying cytotoxic activity in cell culture models Acat, B-16, KML, HeLa, C127, U937.

The objects of the investigation are lectin-like proteins of *Cuscuta europeae*, cell cultures of Acat, B-16, KML, HeLa, C127, U937, thymocytes isolated from mongrel white rats of 6-8 weeks age, red blood cells of a rabbit.

Scientific novelties of the research work are the following:

a new transmissible cell culture of adenocarcinoma of the small intestine of the mouse (Acat) from the tumor of the mouse Akaton was established. The characteristics of the obtained cell culture were studied;

efficient test-system, on the basis of established cell lines, for screening of a wide range of biologically active compounds was created;

lectin-like proteins from *Cuscuta europeae* parasitizing in *Alhagi L.* were isolated and characterized for the first time;

biological activities of isolated proteins including cytotoxicity on different lines of cell cultures, outcomes of lactate dehydrogenase from cells which determines the disruption degree of cell membrane, effects of lectin-like proteins from dodder on regulation of thymocytes volume during hypo-osmotic stress, antioxidative activity of lectin-like proteins were studied.

Implementation of the research results: On the basis of obtained results by developing new culture cells Akat:

strains of cultured cancer cells of small intestines of mice Acat, clone E7 has been protected by a patent for invention of Agency for Intellectual Property of Republic of Uzbekistan ((№ IAP 05428, 2017).

cell lines Akat and Caco-2 were used in the frame of scientific project T.4-16 “Search of microorganisms-producers of bacteriocins and evaluation of usage in the food industry” (2016-2017) to estimate lactobacilli in intestinal adhesion *in vitro* (Reference Letter from Academy of Science of the Republic of Uzbekistan No. 4/1255-1946 dated July 24, 2018). Obtained scientific data enabled to characterize lactobacilli and further use them in food industry.

Structure of the dissertation compiles introduction, three sections, conclusions and list of references. Volume of the dissertation makes up 104 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть, I part)

1. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Изучение цитотоксической активности экстрактов *Cuscuta europeae* // Фармацевтический журнал. –Ташкент, –2013.–№3. –С. 97-100.(03.00.00, №2).
2. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Биологик фаол моддаларни ўрганишда хужайра культураси моделларининг қўлланилиши // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, –2013. –№4. –Б. 8-10. (03.00.00, №5).
3. Кахорова К.А. Гемагглютинирующая активность гликопротеидов из семян *Cuscuta europeae* // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, –2014. –№5. –С. 3-5. (03.00.00, №5).
4. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Цитотоксическая активность лектинподобных белков *Cuscuta europeae* // Журнал теоретической и клинической медицины. –Ташкент, –2015. –№1. –С. 32-36. (03.00.00, №4).
5. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж., Рустамова С.И., Сабиров Р.З. Влияние гликопротеидов повилики на регуляцию объема эритроцитов при гипоосмотическом стрессе // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, –2015, –№ 3. –С. 3-5 (03.00.00, №5).
6. Кахорова К.А., Хашимова,З.С., Терентьева Е.О., Сагдиев.Н.Ж. Изучение антиоксидантной активности биологически активных веществ компонентов *Cuscuta europeae* // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, –2016. –№5. –С. 3-7. (03.00.00, №5).
7. Khashimova Z.S., Kakhorova K.A., Sagdiyev N.J. Cell culture models in the study of biological activity of substances // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, –2017. –№5. –С. 3-7. (03.00.00, №5).
8. Kakhorova K.A., Khashimova Z.S., Terenteva E.O. Studies on cytotoxicity and antioxidant activities of lectin-like proteins from phytoparasites (*Cuscuta europeae*) // Asian Journal Pharmacy and Pharmacology. –India, –2018. –V.4. –№3. –P. 265-270. (№17 OAJI, IF 0.101).
9. Хашимова З.С., Кахорова К.А., Сагдиев Н.Ж., Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Тураев А.С., Салихов Ш.И. Штамм культивируемых клеток рака тонкой кишки мышей АКАТ, клон Е7 // Патент на изобретение РУз №IAP 05428 от 06.06.2017.

II бўлим (II часть, II part)

10. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Терентьева Е.О., Сагдиев Н.Ж. Действие лектинподобных белков *Cuscuta europaeae* на метаболизм клетки // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А.Овчинникова. –Москва, –2016. –Т.12. –№ 3. –С. 29-31.(IF-0,101РПАЦ).

11. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Лектинподобные белки повилики: характеристика и биологическая активность // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). –Москва, –2016. –№3(24). –С. 40-43.

12. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Биологически активные компоненты повилики // Международная научная конференция актуальные проблемы развития биоорганической химии. –Ташкент, –2013. –С. 63-64.

13. Kakhorova K.A., Khashimova Z.S., Sagdiyev.N.J. Cytotoxic activity of *Cuscuta* // Thesis oral presentations on 10th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. –Tashkent, –2013. –p.64.

14. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Использование клеточных культур для выявления биологически активных веществ // Материалы научно-практической конференции «Интеграция образования, науки и производства в фармации». –Ташкент. –2012. –С. 283-284.

15. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Гликопротеиды паразитирующих растений (*Cuscuta Europaea*) // Кн. посвященная памяти акад. В.П.Макеева «Фундаментальные и прикладные проблемы науки». –Москва, –2014. –С. 122-128.

16. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж., Сабиров Р.З. Действие гликопротеидов повилики на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы физико-химической биологии», посв.80-летию акад.АНРУз Ташмухамедова Б.А. –Ташкент, –2015. –С. 160-162.

17. Кахорова К.А., Хашимова З.С., Сагдиев Н.Ж. Биологическая активность белковых компонентов повилики // Республиканская научная конференция “Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии”. –Ташкент, –2017. –С.156.

18. Кахорова К.А. Действие лектинподобных белков *Cuscuta europaeae* на культуру клеток // Международный Симпозиум по химии природных соединений. –Ташкент, –2015. –С.209.

19. Кахорова К.А., Хашимова З.С. Цитотоксическая активность белковых компонентов *Cuscuta europaeae* // 22-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. «Биология-наука XXI века». –Пушино, –2018. –С. 221-222.

Афтореферат «Ўзбекистон биология журналы» таҳририятида таҳрирдан ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 07.11.2018 йил
Бичими 60x84 ^{1/16}. «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулда чоп этилди.
Шартли босма табағи 2,9. Адади 100. Буюртма №22-10

«IMPRESS MEDIA» MChJ босмахонасида чоп этилди.
Тошкент шаҳри, Қушбеги кўчаси, 6-уй.