

ИММУНОЛОГИЯ ВА ИНСОН ГЕНОМИКАСИ ИНСТИТУТИ
ЎЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02.30.12.2019.Tib.50.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ
АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ

ИММУНОЛОГИЯ ВА ИНСОН ГЕНОМИКАСИ ИНСТИТУТИ

МАСАИДОВА ИРОДА БАХТИЁР КИЗИ

ЦЕРУЛОПЛАЗМИН БИОСИНТЕЗИГА ТАЪСИР
ҚИЛУВЧИ МОЛЕКУЛЯР ОМИЛЛАР

03.00.03 – Молекуляр биология. Молекуляр генетика.
Молекуляр биотехнология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БУЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2025

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

Масаидова Ирода Бахтиёр кизи

Церулоплазмин биосинтезига таъсир қилувчи молекуляр омиллар..... 3

Масаидова Ирода Бахтиёр кизи

Молекулярные факторы, влияющие на биосинтез церулоплазмина..... 21

Masaidova Iroda Bakhtiyor qizi

Molecular factors affecting ceruloplasmin synthesis..... 37

Эълон қилинган илмий ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 42

ИММУНОЛОГИЯ ВА ИНСОН ГЕНОМИКАСИ ИНСТИТУТИ
ЎЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02.30.12.2019.Tib.50.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ
АСОСИДАГИ БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ

ИММУНОЛОГИЯ ВА ИНСОН ГЕНОМИКАСИ ИНСТИТУТИ

МАСАИДОВА ИРОДА БАХТИЁР КИЗИ

ЦЕРУЛОПЛАЗМИН БИОСИНТЕЗИГА ТАЪСИР
ҚИЛУВЧИ МОЛЕКУЛЯР ОМИЛЛАР

03.00.03 – Молекуляр биология. Молекуляр генетика.
Молекуляр биотехнология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БУЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2025

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Олий таълим, фан ва инновациялар вазирлиги ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2024.2.PhD/B1155 рақам билан рўйхатга олинган.

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси Иммунология ва инсон геномикаси институтида бажарилган.

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

Илмий раҳбар:

Поляруш Светлана Витальевна
биология фанлари номзоди

Расмий оппонентлар:

Кадинова Дилбар Абдуллаевна
биология фанлари доктори, профессор
Душанова Гавхар Абдукаримовна
биология фанлари номзоди, доцент

Етакчи ташкилот:

Ўзбекистон миллий университети

Диссертация ҳимояси Иммунология ва инсон геномикаси институти ҳузуридаги DSc02.30.12.2019.Tib50.01-рақамли Илмий кенгашнинг 2025 йил «___» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100060, Тошкент шаҳри, Я.Ғуломов кўчаси, 74. Тел./факс (99871) 207-08-30, e-mail: immunology@immuno.uz).

Диссертация билан Иммунология ва инсон геномикаси институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100060, Тошкент шаҳри, Я.Ғуломов кўчаси, 74. Тел./факс (99871) 233-08-55.

Диссертация автореферати 2025 йил «___» _____ куни тарқатилди.
(2025 йил _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

Т.У.Арипова

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси
тиббиёт фанлари доктори, профессор, академик

Х.М.Хатамов

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, тиббиёт фанлари доктори (DSc)

А.А.Исмаилова

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси,
тиббиёт фанлари доктори, профессор

Кириш (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Сўнгги йилларда оксиллар биосинтезининг молекуляр-генетик механизмларини, айниқса кам учрайдиган ирсий касалликларни ташхислашда аниқлаш замонавий биотиббийётнинг энг долзарб йўналишларидан бири бўлиб қолмоқда. Бу борада церулоплазмин (ЦП) биосинтезини тадқиқ этишга алоҳида аҳамият берилмоқда. ЦП кўп функцияли ноёб оксил бўлиб, мис ва темир алмашинувида ҳал қилувчи ўрин тутади ва турли патологик ҳолатларнинг муҳим ташхисий маркери сифатида хизмат қилади. Мутахассислар маълумотиغا кўра, «...дунёда ацерулоплазминемиянинг учраш частотаси 1 миллион аҳолига 12,6 ҳолатга етмоқда, айрим этник гуруҳларда эса 1 миллионга 57,4 ҳолатгача тўғри келмоқда»¹. ЦП синтези бошқарилишининг нозик механизмларини аниқлаш, металллар алмашинуви бузилишларини ташхислаш ва даволашнинг инновацион ёндашувларини ишлаб чиқишнинг янги истиқболларни очиши билан жуда долзарбдир.

Жаҳон миқёсида ирсий касалликларини эрта босқичда ташхислаш, олдини олиш ва даволаш чора-тадбирларини такомиллаштиришга қаратилган илмий-тадқиқотларга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада ирсий касалликларини молекуляр-генетик ва иммунологик кўрсаткичлари ҳолатини аниқлаш, патогенезининг янги механизмларини аниқлаш, организмда церулоплазмин биосинтезига таъсир қилувчи молекуляр омилларни аниқлашга бағишланган изланишлар илмий-тадқиқотларнинг устивор йўналиши бўлиб қолмоқда. Шулар билан бир каторда орфан касалликларини эрта ташхислаш усулларини такомиллаштириш, айниқса молекуляр-генетик тадқиқотларини оптималлаштириш ва профилактика чора-тадбирларини ишлаб чиқиш ва амалиётга тадбиқ этиш соҳа мутахассислари олдида турган долзарб муаммолардан бири ҳисобланади.

Мамлакатимизда соғлиқни сақлаш тизимини такомиллаштириш бўйича амалга оширилаётган кенг кўламли чоралар орасида ирсий касалликларни эрта комплекс ташхислаш ва даволашга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада 2022-2026 йилларга мўлжалланган янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегиясининг еттита устувор йўналишига мувофиқ аҳолига тиббий хизмат кўрсатиш даражасини янги босқичга кўтаришда «...бирламчи тиббий-санитария хизматида аҳолига малакали хизмат кўрсатиш сифатини яхшилаш....»² каби вазифалар белгиланган. Бундан келиб чиққан ҳолда аҳолига тиббий хизмат кўрсатиш сифатини янги босқичга кўтариш, соғлом муҳит яратиш, айниқса, ирсий касалликлари бўлган беморларда серулоплазмин биосинтезининг турли жиҳатларини ҳар томонлама аниқлаш ва даволашга янги ёндашувлар ишлаб чиқиш, асоратланиш даражасини камайитириш алоҳида аҳамият касб қилмоқда.

¹ Зилиотто N., Ленчиони S., Чиринчяни M., Занарди A., Алессо M., Солдà G., Да Подззо E., Асселта R., Карикасоле A. Missense церулоплазмин вариантларини функционал тавсифлаш ва аҳоли маълумотлари асосида ацерулоплазминемия тарқалишини баҳолаш // EBioMedicine. 2025. 113-жилд. Мақола № 105625. DOI: 10.1016/j.ebiom.2025.105625.

² Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 28 январдаги «2022-2026 йилларга мўлжалланган янги Ўзбекистоннинг тараққиёт стратегияси тўғрисида»ги ПФ-60-сон Фармони

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2022 йил 28 январдаги ПФ–60-сонли “2022–2026 йилларга мўлжалланган Янги Ўзбекистонни ривожлантириш стратегияси тўғрисида”ги фармони, 2020 йил 12 ноябрдаги ПФ-6610-сонли фармон “Бирламчи тиббий-санитария ёрдами муассасалари фаолиятига мутлақо янги механизмларни жорий этиш ва соғлиқни сақлаш тизимидаги ислохотлар самарадорлигини ошириш бўйича қўшимча чоратадбирлар тўғрисида”, 2017 йил 20 июндаги ПҚ-3071-сон қарор “2017–2021 йилларда Ўзбекистонда ихтисослаштирилган тиббий ёрдамни такомиллаштириш бўйича қўшимча чоратадбирлар тўғрисида”, 2020 йил 12 ноябрдаги ПҚ-4891-сон қарор “Жамоат саломатлигини таъминлаш мақсадида тиббий профилактиканинг самарадорлигини ошириш бўйича қўшимча чоратадбирлар тўғрисида” ҳамда ушбу фаолиятга дахлдор бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгилаб қўйилган вазифаларни амалга оширишга мазкур диссертация доирасидаги ишлар маълум 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. Церулоплазмин гени плазмадаги асосий мис-боғловчи оксилни кодлайди, у мис ва темир алмашинуви учун зарур. Ацерулоплазминемия ва яққол гипоцерулоплазминемия ЦП генининг кодловчи участкаларидаги патоген вариантлар билан боғлиқ: кўплаб шарҳлар бундай мутациялар феррооксидаза фаолиятининг пасайиши/йўқолишига, темир билан ортиқча юкланишга ва хос клиник манзарага (анемия, ретинопатия, диабет, нейродегенерация) олиб келишини кўрсатади (Miyajima, 2003/2018; Kono, 2013; Marchi et al., 2019; GeneReviews). Сўнгги йилларда мутациялар спектри сезиларли равишда кенгайди: p.Pro477Leu ва p.Gly895Ala миссенс-вариантлари (Julia et al., 2021), c.2869delC делетсияси ва c.606dup мутацияси (Wan Qiu et al., 2021), шунингдек ўқиш рамкасини силжитувчи 13 та ўзига хос ўзгаришлар тасвирланган (Cuenca et al., 2020). Бу маълумотлар ЦПнинг тузилиши яхлитлиги оксилнинг барқарор секрецияси ва вазифаси учун ҳал қилувчи эканини таъкидлайди.

Тузилиш бузилишларидан ташқари, ЦПнинг транскрипцион назоратига ҳам катта эътибор қаратилмоқда. Промотор соҳаси (транскрипция бошланишидан олдинги ДНК участкаси, бу ерда транскрипция аппарати йиғилади) СААТ-бокслар, гормон рецепторлари сайтлари ва транскрипция омиллари мотивларини (жумладан YY1) ўз ичига олади (Gyulikhandanova et al., 2004). АТГдан –3,5 кбгача кенгайтирилган таҳлил эстроген билан боғлиқ оксиллар боғланиш участкаларини (–212, –358, –2260, –3775) ва –1966 позицияда функционал аҳамиятга эга Т→С алмашинувини аниқлади (Tsymbalenko et al., 2009).

Кўтарилган экспрессияга нисбатан, пасайган ЦП экспрессияси механизмлари етарлича ўрганилмаган: оксил микдорининг камайиши фақат экзон мутациялари билан эмас, балки цис-регулятор минтақалардаги

вариациялар билан ҳам боғлиқ бўлиб, улар транскрипция омиллари боғланишини ва транскрипция инициациясининг самарадорлигини ўзгартиради (Pelucchi et al., 2018; Cuenca et al., 2020).

Шу тариқа, ЦПнинг тузилиш нуқсонлари ва регулятор қурилиши ҳақидаги маълумотлар йиғиндиси келгусида темир ва мис алмашинуви бузилишларини ташхиси ва терапиясини такомиллаштиришда цис-элементларни ўрганишнинг юқори салоҳиятини кўрсатади. Бу механизмларни етарлича тавсифланмаган популяцияларда, жумладан республика пациентларида аниқлаш алоҳида қизиқиш уйғотади.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Иммунология ва инсон геномикаси институти илмий тадқиқот ишлари режасига мувофиқ ДИТҚ 1.4.1-сонли «Ўзбекистон геоклиматик шароитида аҳолининг иммунологик етишмовчилигини шакллантириш механизмлари» амалий лойихаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади церулоплазмин гени экспрессиясини тартибга солувчи молекуляр механизмларни ва уларнинг ацерулоплазминемия ҳамда гипоцерулоплазминемия ривожланишига таъсирини ўрганиш, шунингдек цис-регулятор элементларини (промотор, старт-кодон, энхансер ва ҳ.к.) устувор тарзда таҳлил қилишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

қон зардобидagi церулоплазмин миқдорини аниқлаш асосида беморлар бионамуналарининг клиник гуруҳларини шакллантириш ва фенотипи бўйича ранжирлаш;

церулоплазмин биосинтезини модуляция қилувчи молекуляр омилларни ўрганиш;

турли фенотипик гуруҳларга мансуб беморларда церулоплазмин гени қор промотори ва старт-кодони (цис-регулятор ҳудуди) соҳасидаги ДНК кетма-кетлигини олиш ва таҳлил қилиш;

аниқланган нуклеотид алмашинувларининг регулятор салоҳиятини қиёсий биоинформатик баҳолаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида 1 ёшдан 16 ёшгача бўлган церулоплазмин даражаси пасайишига шубҳа қилинган 120 нафар болалар ва 130 нафар амалий соғлом болалар танлаб олинган.

Тадқиқотнинг предмети сифатида бемор ва соғлом болаларнинг вена қони ва қон зардоби биокимёвий, биоинформацион ва молекуляр-генетик тадқиқотлар учун олинди.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотда биокимёвий, молекуляр-генетик, биоинформатик ва статистик тадқиқот усулларида фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор церулоплазмин даражаси бўйича болалар когортаси учун тўрт гуруҳ ишчи ранжирлаш таклиф этилган ($\approx 5,5-10$; ≤ 16 ; $17-25$; > 25 мг/дл) ва паст ЦПга эга бионамуналарини фақат чуқур молекуляр-генетик тадқиқотларида саралаш сифатида ишлатилиши асосланган;

илк бор ЦР генининг проксимал промотор қисмида ($-37A>G$, $-62T>C$,

–117C>T, –127A>T, –160A>G) нуклеотид алмашинувлари аниқланиши, улар назоратдагиларда учрамаслиги, эҳтимол, ЦПнинг барқарор паст қийматлари (~8,5–11,0 мг/дл) билан боғлиқлиги ҳамда ушбу позициялар кейинги функционал валидация шартлари бажарилган тақдирда таргет скрининг учун номзод сифатида қўлланилиши асосланган;

илк бор аминокислота алмашинувларида аниқланган 17T>G (Leu→Arg) ва 187G>A (Val→Ile) ўзгариши, эҳтимол, ЦП даражасининг пастроқ бўлиши (~8,5–16,7 мг/дл) билан кузатилиши, қолаверса, 17-кодонда АТА ва тахминан 30-кодон атрофида АСГ каби (кам учрайдиган) кодонлар аминокислота кетма-кетлигини ўзгартирмай трансляция тезлигини секинлаштириши мумкинлиги аниқланган;

илк бор протеаза ингибиторлари (PMSF / cocktail mini protease tablets)ни зардоб тайёрлаш босқичида қўшиш протеолизни камайтириши, ЦПнинг миқдорий аниқланишини ошириши ҳамда СРБ/СЕ ва яллиғланишдан ташқари такрорий ўлчашларни ҳисобга олган ҳолда талқин қилиш алгоритми ишлаб чиқилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

илк бор илгари одатий ташхислашда ҳисобга олинмаган яллиғланиш белгиларини ва қон ва сийдикдаги мис кўрсаткичларини мажбурий ҳисобга олган ҳолда церулоплазминни иммунотурбидиметрик аниқлаш асосланган;

зардобни тайёрлашда протеаз ингибиторларини қўшиш апоформ ва фрагментларнинг улушини камайтириб ЦП миқдорини ўлчаш аниқлигини ошириши исботланган;

«Nucleotide» базасида мавжуд бўлган NCBI GENBANK: PX394284-PX394295 да генетика шифокорлари ва лаборатория ходимлари учун амалий материаллар тайёрланган ва депонентлаштирилган кетма-кетликлар тўплами тақлиф этилган;

нуклеотид алмашинувлар (-160, -127, -117, -62, -37) ва АТГ га яқин кодловчи соҳадаги вариантлар аниқланган, улар АСМГ/АМР (PS3/BS3) мезонлари доирасида функционал тестлар билан тасдиқлангандан сўнг мақсадли панелларга киритиш учун номзодлар сифатида кўриб чиқилиши аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги қўлланилган ёндашув ва усуллар, олинган маълумотларнинг назарий маълумотларга мослиги, ўтказилган тадқиқотларнинг методологик тўғрилиги, тадқиқот намуналари сонининг етарлилиги, маълумотларни биокимёвий, молекуляр-генетик ва статистик усуллар билан ишлов бериш, шунингдек, чиқарилган хулосалар ва олинган натижаларнинг ваколатли ташкилотлар томонидан тасдиқланиши, ҳамда халқаро ва маҳаллий маълумотлар билан таққосланиши орқали асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти церулоплазмин биосинтезига таъсир қилувчи молекуляр омилларини аниқлаш бўйича паст ЦПга эга болаларнинг бионамуналарини фақат чуқур молекуляр-генетик тадқиқотлар воситасида саралаш сифатида ишлатилган церулоплазмин даражаси бўйича тўрт (~5,5–

10; ≤ 16 ; 17–25; > 25 мг/дл) гуруҳ ишчи ранжирлаш таклиф этилганлиги, ЦР генининг проксимал промотор қисмида ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$) нуклеотид алмашинувлари аниқланлиги, ЦПнинг барқарор паст қийматлари ($\sim 8,5$ – $11,0$ мг/дл) билан боғлиқлиги ва таргет скрининг учун номзод сифатида кўриб чиқиши асосланганлиги, аминокислота алмашинувларида аниқланган $17T>G$ (Leu $\rightarrow$ Arg) ва $187G>A$ (Val $\rightarrow$ Ile) ўзгариш, эҳтимол, ЦП даражасининг пастроқ бўлиши ($\sim 8,5$ – $16,7$ мг/дл) билан кузатилиши, 17-кодонда АТА ва тахминан 30-кодон атрофида АСГ каби (кам учрайдиган) кодонлар аминокислота кетма-кетлигини ўзгартирмай трансляция тезлигини секинлаштириши мумкинлиги аниқланганлиги, протеаза ингибиторлари (PMSF / cocktail mini protease tablets)ни зардоб тайёрлаш босқичида қўшиш протеолизни камайтириши ва ЦПнинг микдорий аниқланишини ошириши ва СРБ/СЕ ва яллиғланишдан ташқари такрорий ўлчашларни ҳисобга олган ҳолда талқин қилиш алгоритми ишлаб чиқилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти церулоплазмин биосинтезида илгари ҳисобга олинмаган яллиғланиш белгиларини ва қон ва сийдикдаги мис кўрсаткичларини мажбурий ҳисобга олган ҳолда церулоплазминни иммунотурбидиметрик аниқлаш асосланганлиги, зардобни тайёрлашда протеаз ингибиторларини қўшиш апоформ ва фрагментларнинг улушини камайтириб ЦП микдорини ўлчаш аниқлигини ошириши исботланганлиги, «Нуслеотиде» базасида мавжуд бўлган НСБИ ГенБанк: PX394284-PX394295 да генетика шифокорлари ва лаборатория ходимлари учун амалий материаллар тайёрланган ва депонентлаштирилган кетма-кетликлар тўплами таклиф этилганлиги ва нуклеотид алмашинувлар (-160 , -127 , -117 , -62 , -37) ва АТГ га яқин кодловчи соҳадаги вариантлар аниқланганлиги, улар АСМГ/АМР (PS3/BS3) мезонлари доирасида функционал тестлар билан тасдиқлангандан сўнг мақсадли панелларга киритиш учун номзодлар сифатида кўриб чиқиши аниқланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий этилиши. Церулоплазмин синтезига таъсир килувчи молекуляр омилларни аниқлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

биринчи илмий янгилиги: илк бор церулоплазмин даражаси бўйича болалар когортаси учун тўрт гуруҳ ишчи ранжирлаш таклиф этилган ($\sim 5,5$ – 10 ; ≤ 16 ; 17–25; > 25 мг/дл) ва паст ЦПга эга бионамуналарини фақат чуқур молекуляр-генетик тадқиқотларида саралаш сифатида ишлатилиши асосланганлиги бўйича «Ацерулоплазминемияда cis-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усуллари» услубий тавсияномаси ишлаб чиқилган (Иммунология ва инсон геномикаси институти Илмий кенгашининг 2025-йил 29-январдаги 1-сонли қарори) билан тасдиқланган. Мазкур таклиф Самарқанд давлат тиббиёт университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 1А-сонли ва Шароф Рашидов номидаги Самарқанд давлат университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 102-сонли буйруқлари билан амалиётларига жорий этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлиги

хузуридаги илмий техник кенгашининг 2025-йил 20-мартдаги 14/20-сонли хулосаси); *ижтимоий самарадорлиги*: илмий натижаларни амалиётга жорий этилиши, эрта ташхис қўйиш, профилактика тактикасини оптималлаштириш, асоратлар ривожланишини камайтириш, ногиронлик даражасини пасайтириш ва хаёт сифатини яхшилашга имкон яратади; *иқтисодий самарадорлиги*: илмий натижаларнинг Самарқанд давлат тиббиёт университети ва Самарқанд давлат университети амалий фаолиятларига жорий этилиши Ацерулоплазминемияда *cis*-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усулларини қўллаш орқали касаллик келиб чиқишининг ирсий табиатини аниқлаш, касаллик асоратлари камайтириш, ўз навбатида индивидуал даволаш тактикасини танлаш натижасида даволаш самарадорлиги ортишига ҳамда беморлар хаёт сифатини яхшилашга асосланган. *Хулоса*: церулоплазмин даражаси бўйича тўрт гуруҳ ишчи ранжирлаш таклиф этилганлиги ($\approx 5,5-10$; ≤ 16 ; $17-25$; > 25 мг/дл) ва паст ЦПга эга бионамуналарини фақат чуқур молекуляр-генетик тадқиқотларида саралаш сифатида ишлатилиши асосланган;

иккинчи илмий янгилиги: илк бор ЦР генининг проксимал промотор қисмида ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$) нуклеотид алмашинувлари аниқланиши, улар назоратдагиларда учрамаслиги, эҳтимол, ЦПнинг барқарор паст қийматлари ($\sim 8,5-11,0$ мг/дл) билан боғлиқлиги ҳамда ушбу позициялар кейинги функционал валидация шартлари бажарилган тақдирда таргет скрининг учун номзод сифатида қўлланилиши асосланганлиги бўйича «Ацерулоплазминемияда *cis*-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усуллари» услубий тавсияномаси ишлаб чиқилган (Иммунология ва инсон геномикаси институти Илмий кенгашининг 2025-йил 29-январдаги 1-сонли қарори) билан тасдиқланган. Мазкур таклиф Самарқанд давлат тиббиёт университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 1А-сонли ва Шароф Рашидов номидаги Самарқанд давлат университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 102-сонли буйруқлари билан амалиётларига жорий этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлиги хузуридаги илмий техник кенгашининг 2025-йил 20-мартдаги 14/20-сонли хулосаси); *ижтимоий самарадорлиги*: илмий натижаларни амалиётга жорий этилиши, эрта ташхис қўйиш, профилактика тактикасини оптималлаштириш, асоратлар ривожланишини камайтириш, ногиронлик даражасини пасайтириш ва хаёт сифатини яхшилашга имкон яратади; *иқтисодий самарадорлиги*: илмий натижаларнинг Самарқанд давлат тиббиёт университети ва Самарқанд давлат университети амалий фаолиятларига жорий этилиши Ацерулоплазминемияда *cis*-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усулларини қўллаш орқали касаллик келиб чиқишининг ирсий табиатини аниқлаш, касаллик асоратлари камайтириш, ўз навбатида индивидуал даволаш тактикасини танлаш натижасида даволаш самарадорлиги ортишига ҳамда беморлар хаёт сифатини яхшилашга асосланган. *Хулоса*: ЦР генининг проксимал промотор қисмида ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$) нуклеотид алмашинувлари аниқланиши, улар назоратдагиларда учрамаслиги, ЦПнинг барқарор паст

кийматлари (~8,5–11,0 мг/дл) билан боғлиқлиги асосланган;

учинчи илмий янгилиги: илк бор аминокислота алмашинувларида аниқланган 17T>G (Leu→Arg) ва 187G>A (Val→Ile) ўзгариш, эҳтимол, ЦП даражасининг пастроқ бўлиши (~8,5–16,7 мг/дл) билан кузатилиши, қолаверса, 17-кодонда АТА ва тахминан 30-кодон атрофида АСГ каби (кам учрайдиган) кодонлар аминокислота кетма-кетлигини ўзгартирмай трансляция тезлигини секинлаштириши мумкинлиги аниқланганлиги бўйича «Ацерулоплазминемияда cis-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усуллари» услубий тавсияномаси ишлаб чиқилган (Иммунология ва инсон геномикаси институти Илмий кенгашининг 2025-йил 29-январдаги 1-сонли қарори) билан тасдиқланган. Мазкур таклиф Самарқанд давлат тиббиёт университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 1А-сонли ва Шароф Рашидов номидаги Самарқанд давлат университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 102-сонли буйруқлари билан амалиётларига жорий этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлиги ҳузуридаги илмий техник кенгашининг 2025-йил 20-мартдаги 14/20-сонли ҳулосаси); *ижтимоий самарадорлиги:* илмий натижаларни амалиётга жорий этилиши, эрта ташхис қўйиш, профилактика тактикасини оптималлаштириш, асоратлар ривожланишини камайтириш, ногиронлик даражасини пасайтириш ва ҳаёт сифатини яхшилашга имкон яратади; *иқтисодий самарадорлиги:* илмий натижаларнинг Самарқанд давлат тиббиёт университети ва Самарқанд давлат университети амалий фаолиятларига жорий этилиши Ацерулоплазминемияда cis-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усуллари қўллаш орқали касаллик келиб чиқишининг ирсий табиатини аниқлаш, касаллик асоратлари камайтириш, ўз навбатида индивидуал даволаш тактикасини танлаш натижасида даволаш самарадорлиги ортишига ҳамда беморлар ҳаёт сифатини яхшилашга асосланган. *Ҳулоса:* аминокислота алмашинувларида аниқланган 17T>G (Leu→Arg) ва 187G>A (Val→Ile) ўзгариш, ЦП даражасининг пастроқ бўлиши (~8,5–16,7 мг/дл) билан кузатилиши, 17-кодонда АТА ва тахминан 30-кодон атрофида АСГ каби (кам учрайдиган) кодонлар аминокислота кетма-кетлигини ўзгартирмай трансляция тезлигини секинлаштириши мумкинлиги асосланган;

тўртинчи илмий янгилиги: илк бор протеаза ингибиторлари (PMSF / cocktail mini protease tablets)ни зардоб тайёрлаш босқичида қўшиш протеолизни камайтириши, ЦПнинг микдорий аниқланишини ошириши ҳамда СРБ/СЕ ва яллиғланишдан ташқари такрорий ўлчашларни ҳисобга олган ҳолда талқин қилиш алгоритми ишлаб чиқилганлиги бўйича «Ацерулоплазминемияда cis-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усуллари» услубий тавсияномаси ишлаб чиқилган (Иммунология ва инсон геномикаси институти Илмий кенгашининг 2025-йил 29-январдаги 1-сонли қарори) билан тасдиқланган. Мазкур таклиф Самарқанд давлат тиббиёт университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 1А-сонли ва Шароф Рашидов номидаги Самарқанд давлат университети бўйича 19.03.2025 йилдаги 102-сонли буйруқлари билан амалиётларига жорий этилган (Соғлиқни сақлаш вазирлиги ҳузуридаги илмий техник кенгашининг 2025-

йил 20-мартдаги 14/20-сонли хулосаси); *ижтимоий самарадорлиги*: илмий натижаларни амалиётга жорий этилиши, эрта ташхис қўйиш, профилактика тактикасини оптималлаштириш, асоратлар ривожланишини камайтириш, ногиронлик даражасини пасайтириш ва ҳаёт сифатини яхшилашга имкон яратади; *иқтисодий самарадорлиги*: илмий натижаларнинг Самарқанд давлат тиббиёт университети ва Самарқанд давлат университети амалий фаолиятларига жорий этилиши Ацерулоплазминемида cis-регулятор элементларини таҳлил қилишнинг молекуляр усулларини қўллаш орқали касаллик келиб чиқишининг ирсий табиатини аниқлаш, касаллик асоратлари камайтириш, ўз навбатида индивидуал даволаш тактикасини танлаш натижасида даволаш самарадорлиги ортишига ҳамда беморлар ҳаёт сифатини яхшилашга асосланган. *Хулоса*: протеаза ингибиторлари (PMSF / cocktail mini protease tablets)ни зардоб тайёрлаш босқичида қўшиш протеолизни камайтириши, ЦПнинг миқдорий аниқланишини ошириши ҳамда СРБ/СЕ ва яллиғланишдан ташқари такрорий ўлчашларни ҳисобга олган ҳолда талқин қилиш алгоритми асосланган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари жами 6 та, жумладан 3 та халқаро ва 3 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокама қилинган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 14 та илмий иш, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда 8 та мақола, жумладан, 2 таси республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хотима, хулоса, амалий тавсиялар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан ва иловадан иборат. Диссертациянинг ҳажми 115 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва талаб этилиши асосланган, мақсад ва вазифалар шакллантирилган, шунингдек тадқиқотнинг объекти ва предмети кўрсатилган. Ўзбекистон Респ убликасида фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига тадқиқотнинг мослиги баён этилган, илмий янгилик ва амалий натижалар очиб берилган, олинган маълумотларнинг назарий ва амалий аҳамияти кўрсатилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, эълон қилинган ишлар ва диссертациянинг тузилиши ҳақида маълумот берилган.

Диссертациянинг «**Церулоплазмин гени фаолиятининг молекуляр асослари (адабиётлар шарҳи)**» деб номланган биринчи бобида ЦПнинг тузилиши ва функциялари, мис алмашинувининг маълум генетик шакллари, ЦП промоторининг архитектураси, цис-регулятор элементлар ва транскрипция омилларининг транскрипцияни бошқаришдаги роли,

шунингдек, ЦП даражасини аниқлаш методологик жиҳатлари кўриб чиқилган.

Диссертациянинг «Тадқиқот материалларининг тавсифи ва фойдаланилган тадқиқот усуллари» деб номланган иккинчи бобида беморларнинг биологик намунасида асосий биокимёвий кўрсаткичлар ва қўлланилган лаборатория ҳамда молекуляр-генетик усуллар батафсил ёритилган. Тадқиқот предмети — церулоплазмин даражаси пасайиши гумон қилинган беморлар бионамуналари бўлиб, улар Тошкент шаҳридаги бир қатор диагностик марказлардан олинган. Барча процедуралар Хельсинки декларацияси принципларига мувофиқ ўтказилган. Ҳар бир боланинг намунасида фойдаланиш учун ота-онаси ёки қонуний вакилидан ёзма розилик олинган. Когорта тасодиқий танлов усули билан шакллантирилган. Жами 250 нафар 1 ёшдан 16 ёшгача бўлган болаларнинг бионамуналари тадқиқотга киритилган. Танланмада ўғил болалар устун — 63% (n=158), қизлар — 37% (n=92) эди. Ёш оралиғи 1–16 ёш, ўртача ёш — $8,4 \pm 3,2$ йил. Ёш гуруҳлари бўйича тақсимот: 1–5 ёш — 28,8% (n=72), 6–10 ёш — 38,0% (n=95), 11–16 ёш — 33,2% (n=83). Намунанинг катта қисми 6–10 ва 11–16 ёш гуруҳларига тўғри келиб, клиник белгилари мактаб ва ўсмирлик даврида кўпроқ аниқланганини кўрсатади.

Тадқиқот бошланғич босқичида ЦП миқдорини аниқлаш учун ELISA усули қўлланилди, бироқ усул барқарор эмаслиги намоён бўлди: назорат қийматларининг силжиши кузатилди; шу сабабли асосий таҳлил учун ELISA қўлланилмади.

Асосий усул сифатида иммунотурбидиметрия танланди — антитаналарнинг оксил билан реакциясидан сўнг юзага келадиган хираланишни қайд этувчи рутин ёндашув. Ушбу усул барқарор калибровкани ва тахминан 3–35 мг/дл диапазонида ишончли чизиқлилиқни таъминлаб, натижаларнинг ўзаро таққосланишини кафолатлади. Шу билан бирга, ЦП қийматиға ўткир фаза таъсирини истисно этиш мақсадида яллиғланиш маркёрлари — С-реактив оксил (СРБ) ва эритроцитлар чўкиш тезлиги (СОЭ) баҳоланди. Қўшимча тарзда протеаза ингибиторларининг (PMSF ва комплекс коктейл) ЦП молекуласи спонтан диссоциациясига таъсири синовдан ўтказилди.

Кейинги босқичда церулоплазмин даражаси барқарор паст бўлган беморлар намуналари танлаб олинди; ушбу беморларда Сэнгер-секвенирлаш усули орқали СР генининг АТГ старт-кодониға нисбатан –200...+295 нт оралиғидаги фрагменти тадқиқ этилди. Олинган промотор соҳаси кетма-кетликлари транскрипция омиллари боғланиш сайтларини аниқлаш мақсадида JASPAR 2024 CORE матрицалари ва FIMO (MEME Suite) алгоритмидан фойдаланган ҳолда, score, p- ва *q-қийматларини ҳисоблаш орқали таҳлил қилинди; башоратлар тўғрилиғи SynBio Technologies ташки ҳисоботи (Certificate of Analysis, Project ID S040263-01) билан тасдиқланди, бу эса статистик жиҳатдан аҳамиятли регулятор ДНК участкаларини ажратиб кўрсатиш имконини берди.

Праймерлар кетма-кетликлари ва хоссалари: тескари праймер S035367-R-300 — узунлиги 22 нт, отжиг температураси $T_m \approx 60^\circ\text{C}$, GC 55 % (кетма-кетлик: 5'-GAAGCCTGACCAACGACTG-3'); тўғри праймер S035367-F-300 — узунлиги 23 нт, $T_m \approx 61^\circ\text{C}$, GC 57 % (кетма-кетлик: 5'-GTAAGTACCTGATCCTACC-3').

ПЦР шароити: реакциялар термоциклерда қуйидаги цикл профили билан ўтказилди — пешона (олдинги) денатурация 95°C , 5 дақиқа; сўнг 35 цикл: денатурация 95°C , 30 с, праймерларнинг отжиги 60°C , 30 с, занжирларни узайтириш (элонгация) 72°C , 1 дақиқа; охирида финал узайтириш 72°C , 10 дақиқа.

Реакция аралашмаси стандарт таркибда тайёрланди: Taq ДНК-полимераза, Mg^{2+} ли буфер, дНТФ, праймерлар 0,3 мкМ, матритса ДНК ≈ 100 нг (умумий ҳажм 25 мкл).

Амплификация қилинган маҳсулотлар агароза гелида электрофорез орқали текширилиб, тахминан 500 bp мос тасма олинди; сўнг секвенирлашдан олдин ферментатив тозалаш амалга оширилди.

Диссертациянинг «Церулоплазмин даражаси бўйича фенотипик гуруҳлар ва лаборатор-клиник жиҳатлар» деб номланган учинчи бобида беморларнинг бионамуналари биокимёвий таҳлил натижаларига кўра гуруҳларга ажратилди. Бундай бўлиш ЦП етишмовчилиги даражасини англаш, яллиғланиш фонида «ёлғон» пасайишни ҳақиқий пасайишдан фарқлаш ва молекуляр-генетик таҳлил учун намуна танлаш имконини берди.

ЦП молекуласи барқарор эмас. Қон олинишидан сўнг молекулаларнинг бир қисми апо-формага ўтиши ва фрагментларга парчаланиши мумкин; бундай фрагментлар антителолар томонидан ҳануз танийди ва ўлчов натижасини сунъий равишда ошириб кўрсатади. Шу сабабли ЦП миқдорини аниқлашда сийровоткани тайёрлаш босқичида протеаза ингибиторларини қўшиш мақсадга мувофиқ, бу постаналитик парчаланишни минималлаштириш имконини беради. Сийровоткани тайёрлашнинг уч хил вариантини таққослашда ЦП концентрациясининг қуйидаги қийматлари олинди: протеаза ингибиторисиз — $27,3 \pm 2,4$ мг/дл, PMSF қўшилган ҳолда — $20,0 \pm 1,9$ мг/дл, Complete коктейли билан — $23,9 \pm 2,2$ мг/дл. Шундай қилиб, PMSF қўшилиши ингибитор қўлланилмаган назоратга нисбатан ўлчанган ЦП даражасининг тахминан 27 % га пасайиши, Complete коктейли эса тахминан 12 % га камайиши билан намоён бўлди. Шу билан бирга, натижалар вариабеллиги энг паст даражада айнан PMSF гуруҳида кузатилди, бу протеолизни барқарорроқ сусайтиришга ишора қилади. Умуман олганда, ANOVA натижалари ($p < 0,00001$) ва ЦПнинг ўртача қийматлари пасайиши оксилнинг постаналитик деградацияси якуний натижага сезиларли таъсир кўрсатишини ҳамда намуна тайёрлашда протеаза ингибиторларидан фойдаланиш асосли эканини кўрсатади.

Церулоплазмин даражаси СРБ ва СОЭ кўрсаткичлари билан бир вақтнинг ўзида аниқланди; яллиғланиш белгилари мавжуд бўлганда тадқиқот 3–6 ойдан сўнг, клинко-лаборатор ремиссия даврида такрорланди. Динамик кузатиш маълумотларига кўра, ўткир фаза даврида СРБнинг ўртача

қийматлари $20,9 \pm 11,9$ мг/л ни ташкил этди, ремиссияда эса $5,0 \pm 1,7$ мг/л гача камайди (тахминан 75–80 % га пасайиш; $p \leq 0,05$); СОЭ мос равишда $25,2 \pm 2,5$ ва $12,4 \pm 3,2$ мм/соат (тахминан 50–65 % га камайиш; $p \leq 0,05$), церулоплазмин эса $27,9 \pm 5,8$ ва $14,6 \pm 6,0$ мг/дл (тахминан 25–35 % га камайиш; $p \leq 0,05$) ни ташкил этди. Ушбу кузатишлар тадқиқ этилган когортада церулоплазмин ўткир фазанинг мусбат оксиди сифатида намоён бўлишини кўрсатади, шунинг учун ЦП дефицитини верификация қилишда фақат ўткир фаза ташқарисида, СРБ ва СОЭ мажбурий назорати шароитида олинган қийматлар ҳисобга олинди.

Асосий гуруҳдаги болаларда ёшга мос назорат гуруҳига нисбатан мис алмашинуви кўрсаткичларининг бир йўналишда силжиши қайд этилди. Маълумотларга кўра, ЦПнинг ўртача даражаси мг/дл ҳисобида тахминан уч барабар паст эди ($11,47 \pm 4,01$ га қарши $33,36 \pm 7,06$; $p \leq 0,05$), сийровоткадаги мис миқдори мг/дл бўйича деярли икки барабар паст ($8,83 \pm 3,35$ га қарши $19,66 \pm 4,52$; $p \leq 0,05$), шу билан бирга пешоб орқали суткалик мис экскрецияси мкг/сут ўртача ҳолда тахминан тўрт барабар юқори ($65 \pm 5,5$ га қарши 15 ± 3 ; $p \leq 0,05$) эди. АЛТ фаоллиги Е/л бирликларда юқори (85,3 $\pm$ 38,1 га қарши 43,1 $\pm$ 15,7; $p \leq 0,05$), худди шу тарзда АСТ фаоллиги Е/л (70,0 $\pm$ 34,1 га қарши 32,4 $\pm$ 11,9; $p \leq 0,05$), ЛДГ кўрсаткичлари еса Е/л (706,0 $\pm$ 276,8 га қарши 409,8 $\pm$ 41,7; $p \leq 0,05$) бўлди. Умумий ҳолда бу биохимик профилни шакллантиради: сийровоткада церулоплазмин ва мис дефицити, шу билан бирга мис экскрециясининг кучайиши ва цитоллиз белгилари, бу эса жигар иштирокидаги мис алмашинуви бузилишини кўрсатади.

Церулоплазмин даражасининг яллиғланишга боғлиқлиги ва биохимик профилнинг ранг-баранглигини ҳисобга олган ҳолда, ўткир фаза ташқарисида аниқланган сийровотка ЦП даражасига кўра беморларни аниқ лаборатор ранжирлаш зарур бўлди. Ҳақиқатан паст, чегаравий ва меъёрий қийматларни фарқлаш мақсадида ЦП даражалари бўйича фенотипик таксимот схемаси ишлаб чиқилди.

1- жадвал

ЦП даражаси бўйича фенотипик гуруҳлар ва тактика

Гуруҳ	ЦП, мг/дл	Клиник тактика
I	$\approx 5,5-10$	Барқарор паст
II	11-16	Паст
III	17-25	Чегаравий
IV	>25	юқори

Тадқиқот мақсадида бемор бионамуналари ЦП даражасига кўра тўртта фенотипик гуруҳга бўлинди. Бу эса ҳақиқий паст ЦПга эга бўлган 18 бемор намунасини аниқлаб, молекуляр-генетик таҳлил учун мақсадли танлаш имконини берди ва намуна тозалиги ҳамда ахборот қийматини оширди.

Шу тариқа, ЦП даражаси бўйича беморларни фенотипик гуруҳларга ажратиш ҳақиқий паст кўрсаткичларни яллиғланишга боғлиқ вақтинчалик

ўзгаришлардан ажратиш имконини берди. Солиштирма таҳлил кўрсатдики, ЦП паст бўлган болаларда медь даражаси камайиши ва бир вақтда цитоллиз ферментлари ошиши кузатилади. Бу ҳолат медь алмашинуви бузилишини ва жигарнинг жалб этилишини кўрсатиб, ранжирлаш усулининг ташхисий аҳамиятини янада мустаҳкамлади.

Диссертациянинг «Беморлар намуналарида церулоплазмин гени экспрессияси» деб номланган тўртинчи бобида церулоплазмин даражаси барқарор равишда паст (8,5–16,0 мг/дл) бўлган 18 нафар бола ва нормал ЦПга эга 6 нафар назорат гуруҳи намунаслари ўрганилиб, олинган секвенс натижалари геннинг референс кетма-кетлиги билан таққосланди.

Текширув кор промотор қисми (≈ -200 нт АТГдан олдин) ва унга туташ кодловчи сегмент (+ до ~ 295 нт)ни қамраб олди. Секвенирлаш натижасида назоратда учрамаган бешта такрорий промотор алмашинувлари аниқланди: $-37A>G$ ($n=6$), $-62T>C$ ($n=2$), $-107A>C$ ($n=3$), $-117C>T$ ($n=2$), $-127A>T$ ($n=2$). Бу вариантларга эга барча беморларда сывороткадаги ЦП даражаси барқарор паст ($\sim 8,5-11,0$ мг/дл) бўлиб қолди. Бу ҳолат ушбу нуқталарда транскрипция факторлари боғланиши бузилиши мумкинлигини кўрсатади.

2- жадвал

Аниқланган нуклеотид вариантлари ва церулоплазмин даражалари

Ген участкаси	Нуклеотид позицияси	Нуклеотид алмашинуви	АК алмашинуви	Беморлар, n	ЦП, мг/дл
Промоторнинг цис-тартибга солувчи соҳаси (АТГ старт-кодониғача)	-160	A→G	—	3	8,5–11,0
	-127	A→T	—	2	8,5–11,0
	-117	C→T	—	2	8,5–11,0
	-62	T→C	—	3	8,5–11,0
	-37	A→G	—	6	8,5–11,0
Кодловчи соҳаси (АТГ старт-кодонидан кейин)	+17	T→G	Leu→Arg	2	8,5–11,0
	+28	C→T	—	2	8,5–16,7
	+187	A→G	Val→Ile	4	8,5–16,7
	+291	T→C	—	2	8,5–11,0

Старт-кодонга яқин кодловчи соҳада икки миссенс алмашинув топилди: с.17T>G (p.Leu6Arg; $n=2$), с.187G>A (p.Val63Ile; $n=4$).

Иккаласи ҳам ЦПнинг пасайган кўрсаткичлари ($\sim 8,5-16,7$ мг/дл) билан боғлиқ эди. Бу ерда p.Val63Ile нисбатан консерватив алмашинув саналса,

p.Leu6Arg — неконсерватив бўлиб, оксилнинг эрта фолдинг ва секреция жараёнларига таъсир кўрсатиши мумкин. Шу билан бирга, c.177A>C синоним ўзгариши аниқланди, аммо клиник аҳамиятга эга эмас деб баҳоланди.

Олинган натижалар шундан далолат бердики, гипоцерулоплазминемиа билан оғриган айрим беморларда белок даражасининг пасайиши кодловчи мутациялар билан бир қаторда, проксимал промотор соҳасидаги нуклеотид алмашинувлари билан ҳам боғлиқ бўлиши мумкин. Промотор вариантлари транскрипция жараёнини сусайтириши эҳтимолдан холи эмас, миссенс алмашинувлар эса оксилнинг эрта шаклланиши ва секрециясига таъсир қилиши мумкин. Синоним ўзгаришлар эса эҳтимол клиник аҳамиятга эга эмас. Шу тариқа, промотор ва кодловчи алмашинувларнинг биргаликдаги иштироки ЦП паст фенотипини шакллантиришда муҳим ўрин тутди, аммо уларнинг функционал аҳамиятини тўлиқ тасдиқлаш учун кенгрок когорталарда ва тажрибавий моделларда қўшимча валидация зарур.

2025 йил 7 февраль ҳолатига кўра, саккизта нуклеотид алмашинуви (−160A>G, −127A>T, −117C>T, −62T>C, −37A>G, +17T>G, +28C>T, +291T>C) бўйича ClinVar, dbSNP ва gnomAD базаларида ҳеч қандай ёзув топилмади. Фақат битта вариант бўйича маълумот аниқланди — +187G>A; у rs3736282 га мос келади ва ClinVar маълумотлар базасида доброкачественный полиморфизм (benign) сифатида таснифланган.

Олинган маълумотлар болаларнинг бир қисмда церулоплазминемиа даражасининг пасайиши ҳам регулятор промотор вариантлари, ҳам аминокислота алмашинувлари билан боғлиқ бўлиши мумкинлигини кўрсатади; ҳар иккала механизм ҳам етук оксил чиқишини эҳтимолан камайтиради. Промотор соҳасида такрорланувчи нуклеотид алмашинувлари, эҳтимол, транскрипция омилларининг боғланишини бузади ва шу орқали ЦП гени транскрипциясини инициация қилиш самарадорлигини пасайтиради. Сабаб-оқибат боғланишини якуний тасдиқлаш учун функционал валидация (репортёр тестлари, экспрессияни ўрганиш ва бошқалар) талаб этилади.

Диссертациянинг **«Бионазорат усулларида фойдаланиб текширилган намуна нуклеотид кетма-кетлигини таҳлил қилиш»** деб номланган бешинчи бобида ЦП генининг промотор қисми ва унга ёнма-ён ҳудуди ATG старт-кодониға нисбатан −200...+295 нт оралиқда кўриб чиқилди. Ушбу фрагментда жами 38 та потенциал цис-регулятор мотив аниқланди, шу фон доирасида референс кетма-кетлик ва беморлар маълумотлари ўзаро таққосланди. Жами 15 та нуклеотид алмашинуви қайд этилди, шундан 11 таси цис-регулятор элементлар ва промотор ядроси (ATG атрофи) соҳаларига тўғри келади, яъни транскрипция инициациясига таъсир кўрсатиши эҳтимоли энг юқори бўлган участкаларга жойлашган. Қатор вариантлар хроматиннинг очилиши, ДНКнинг архитектур эгилиши, циркад ва стрессга боғлиқ транскрипция назорати билан боғлиқ бўлган FOX, SOX/HMG, PAR bZIP ва CHOP::C/EBP оилалари мотивларини қоплайди. Айрим алмашинувлар эса TATA-ўхшаш ҳудуд ва Inr/-core-промотор зоналарида локаллашган бўлиб, бу ерда элементлар ўртасидаги аниқ

позициялар ва масофалар айниқса танқидий аҳамиятга эга. Клиник жиҳатдан аҳамиятли вариантлар ва улар қоплайдиган мотивлар бўйича жамланма тавсиф жадвалда келтирилган.

3- жадвал

**Клиник вариантлар қоплаган транскрипция омиллари
мотивларининг предикцияси (hg38)**

Вариант (ATGга нисбатан)	hg38 координатаси*	Қопланган мотив (оила; JASPAR ID)	Мотив диапазо ни (ATGга нисбатан)	Score	p- qiy mat	q- qiy mat
–160 A>G	chr3:149,221, 952	ЭНГ яқин FOX/Forkhead (масалан, Foxq1; MA0040.2)	–170...– 165	15.2857	4.00 E–06	0.00303
–127 A>T	chr3:149,221, 919	SRY (SOX/HMG; MA0084.2)	–127...– 121	10.9000	9.66 E–05	0.0372
–117 C>T	chr3:149,221, 909	HLF (bZIP; MA0043.4)	кластер –115...– 103	11.8919	5.50 E–05	0.0463
–117 C>T	chr3:149,221, 909	Ddit3::Cebpa (bZIP; MA0019.2)	кластер –115...– 103	10.7889	8.99 E–05	0.0898
–62 T>C	chr3:149,221, 854	ТАТА’га ўхшаш бокс (core-зона)	–62...–5 6	12.8329	4.61 E–05	0.0272
–37 A>G	chr3:149,221, 829	проксимал ядро (core- элементлар)	–39...–3 5	14.7619	5.10 E–05	0.0479

* ЦП координаталар манбаси: UCSC/GENCODE (hg38).

Ушбу промотор вариантларининг функционал аҳамиятини баҳолаш учун уларнинг транскрипция омиллари билан боғланишга ва промотор ядроси ишлашга таъсири бўйича in silico-таҳлил ўтказилди. JASPAR/FIMO ва motifbreakR/plotMB маълумотларига кўра, бешта асосий алмашинув (–160 A>G, –127 A>T, –117 C>T, –62 T>C ва –37 A>G) учун референс аллелига

нисбатан тегишли омилларнинг прогноз қилинган аффинитети бир йўналишда пасайиши кўрсатилди. Шундай қилиб, биоИнформатик таҳлил шуни кўрсатадики, ушбу вариантлар оксил тузилишини ўзгартирмаган ҳолда ЦП гени промоторида регулятор «кучайишсиз» (сустлаштирувчи) алмашинувлар сифатида ҳаракат қилади ва барқарор паст сийровотка церулоплазмани фенотипини шакллантиришга ҳисса қўшиши мумкин.

Қўшимча равишда қатор намунада «кам учрайдиган» эрта кодонлар (17-кодонда АТА ва 30-кодон яқинида АСГ) қайд этилди, улар потенциал равишда трансляциянинг бошланғич босқичлари самарадорлигини ва мРНК барқарорлигини пасайтириши мумкин.

Ишнинг якуний қисмида тадқиқотнинг барча босқичлари бўйича олинган маълумотлар умумлаштирилди. Тузилган церулоплазм даражаси бўйича лаборатор ранжирлаш кетма-кет диагностик маршрутни шакллантириши кўрсатилди: бошланғич биохимик скринингдан (ЦПни С-реактив оксил, СОЭ, мис кўрсаткичлари ва жигар ферментлари билан бирга баҳолаш) юқори хавф гуруҳи когортасини ажратиб олишгача (I–II фенотипик гуруҳлар) ва шундан кейин ЦП гени регулятор соҳасини таргет сиквенирлашгача. Бундай ёндашув қимматбаҳо молекуляр-генетик таҳлилни ЦП барқарор пас даражасига эга бўлган беморлар билан чеклашга ва тадқиқотнинг диагностик самарадорлигини оширишга имкон беради.

Олинган СР гени промотор участкаси нуклеотид кетма-кетликлари халқаро GenBank базасига (NCBI; accession PX394284–PX394295) депонир қилинди, бу эса маълумотларга очиқ киришни ва улардан таргет панеллар яратишда ҳамда таққослама популяцион тадқиқотларда фойдаланиш имконини таъминлайди.

Шу тариқа, олинган натижалар кейинги тадқиқотлар учун аниқ йўналиш белгилайди: аниқланган промотор ва кодловчи вариантларнинг СР гени экспрессиясига таъсирини экспериментал тасдиқлаш ҳамда таҳлилни мис алмашинуви тизимининг бошқа генларига кенгайтириш.

ХУЛОСА

1. Церулоплазм концентрацияси (5,5–10; 11–16; 17–25; >25 мг/дл) бўйича тўртта фенотипик гуруҳни ажратган ҳолда беморлар бионамуналарини лаборатор ранжирлаш таклиф этилди; бу молекуляр-генетик тадқиқотни ЦП барқарор паст даражасига эга когортага йўналтириш ва генетик регулятор вариантларни аниқлаш самарадорлигини оширишга имкон беради.

2. Яллиғланиш церулоплазм даражасини ўртача 35 % атрофида ошириши кўрсатилди, шунинг учун ЦП дефицити ўткир фаза ташқарисида, СРР ва СОЭни мажбурий ҳисобга олган ҳолда баҳоланиши лозим. Шу билан бирга, протеаза ингибиторлари қўшилган иммунотурбидиметрия ЦП миқдорини аниқлашнинг афзал қўрилган усули сифатида асосланди.

3. Илк бор ЦП гени промоторида бешта цис-регулятор элемент варианты (–37A>G, –62T>C, –117C>T, –127A>T, –160A>G) ва кодловчи қисми бошланғич қисмида икки нуклеотид алмашинуви (с.17T>G, p.Leu6Arg; с.187A>G, p.Val63Ile) тавсифланди; улар амалда соғлом контролларда учрамайди ва барқарор паст сийровотка церулоплазмини билан ассоциацияланган. Шу тариқа, олинган маълумотлар ушбу вариантларни клиник жиҳатдан аҳамиятли ўзгаришлар учун эҳтимолий номзод сифатида кўриб чиқиш имконини беради.

4. Биоинформатик таҳлил аниқланган нуклеотид алмашинувлар SOX/HMG, PAR-bZIP, CHOP:C/EBP каби асосий цис-регулятор элементлар мотивларини, шунингдек ЦП промотори кор зонасини қамраб олишини кўрсатди ва улар сезиларли супрессор регулятор таъсир кўрсатиши мумкинлигини кўрсатди; бу эса кейинчалик функционал валидация ўтказиш зарурлигини белгилайди.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ НА ОСНОВЕ НАУЧНОГО СОВЕТА
DSC.02/30.12.2019.TIB.50.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ
ПРИ ИНСТИТУТЕ ИММУНОЛОГИИ И ГЕНОМИКИ ЧЕЛОВЕКА
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ГЕНОМИКИ ЧЕЛОВЕКА**

МАСАИДОВА ИРОДА БАХТИЕР КИЗИ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ ВЛИЯЮЩИЕ НА БИОСИНТЕЗ
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА**

**03.00.03 – Молекулярная биология. Молекулярная генетика.
Молекулярная биотехнология.**

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

ТАШКЕНТ – 2025

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан за B2024.2.PhD/B1155

Диссертация доктора философии (PhD) выполнена в Институте иммунологии и геномики человека.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице научного совета (www.immuno.uz) и информационно-образовательном портале “ZiyoNet” (www.ziynet.uz).

Научный руководитель:	Поляруш Светлана Витальевна кандидат биологических наук
Официальные оппоненты:	Кадилова Дилбар Абдуллаевна доктор биологических наук, профессор Душанова Гавхар Абдукаримовна доктор кандидат биологических наук, доцент
Ведущая организация:	Национальный университет Узбекистана

Защита состоится «__» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании Научного совета DSc.02.30.12.2019.Tib50.01 при Институте иммунологии и геномики человека (Адрес: 100060, г.Ташкент, ул. Я. Гулямова,74. Тел/факс.: (99871) 207-08-30; e-mail: immunologiya@qip.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Институте иммунологии и геномики человека (зарегистрирована за № _____) (Адрес: 100060, г. Ташкент, ул. Я.Гулямова, 74). Тел./факс: (99871) 207-08-30)

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2025 года.
(реестр протокола рассылки № _____ от «__» _____ 2025 года).

Т.У.Арипова

Председатель научного совета по
присуждению ученых степеней,
доктор медицинских наук, профессор, академик

Х.М.Хатамов

Ученый секретарь научного совета по
присуждению ученых степеней,
доктор медицинских наук (DSc)

А.А.Исмаилова

Председатель научного семинара при научном
совете по присуждению ученых степеней,
доктор медицинских наук, профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В последние годы выявление молекулярно-генетических механизмов биосинтеза белков, особенно в контексте диагностики редких наследственных заболеваний, остаётся одним из наиболее актуальных направлений современной биомедицины. В этом контексте особое внимание уделяется исследованию биосинтеза церулоплазмينا (ЦП). ЦП — уникальный многофункциональный белок, играющий ключевую роль в обмене меди и железа и служащий важным диагностическим маркером при различных патологических состояниях. По данным специалистов, «...в мире частота ацерулоплазминемии достигает 12,6 случая на 1 миллион населения, а в отдельных этнических группах — до 57,4 случая на 1 миллион»³. Выявление механизмов регуляции синтеза ЦП имеет высокую актуальность, поскольку открывает новые перспективы для диагностики нарушений обмена металлов и разработки инновационных лечебных подходов.

На мировом уровне уделяется особое внимание научным исследованиям, направленным на совершенствование мер по ранней диагностике, профилактике и лечению наследственных заболеваний. В этой связи приоритетными остаются работы по оценке молекулярно-генетических и иммунологических показателей при наследственных патологиях, по выявлению новых механизмов патогенеза, а также молекулярных факторов, влияющих на биосинтез церулоплазмينا в организме. Наряду с этим одной из актуальных задач специалистов является совершенствование методов ранней диагностики орфанных заболеваний, в частности оптимизация молекулярно-генетических исследований, разработка профилактических мероприятий и их внедрение в практику.

В нашей стране среди масштабных мер по совершенствованию системы здравоохранения особое внимание уделяется ранней комплексной диагностике и лечению наследственных заболеваний. В соответствии с семью приоритетными направлениями Стратегии развития «Новый Узбекистан» на 2022–2026 годы поставлены задачи по выводу медицинского обслуживания населения на новый уровень, включая «...улучшение качества квалифицированной помощи в системе первичной медико-санитарной службы...»⁴. Исходя из этого, особую значимость приобретают повышение качества медицинских услуг, формирование здоровой среды и, в частности, всестороннее изучение различных аспектов биосинтеза церулоплазмينا у пациентов с наследственными заболеваниями, разработка новых подходов к лечению и снижение частоты осложнений.

Указ Президента Республики Узбекистан от 28 января 2022 года ПФ–60

³ Ziliotto N., Lencioni S., Cirinciani M. [и др.]. Functional characterisation of missense ceruloplasmin variants and real-world prevalence assessment of Aceruloplasminemia using population data // EBioMedicine. — 2025. — Т. 113. — Статья 105625. — DOI 10.1016/j.ebiom.2025.105625.

⁴ Указ Президента Республики Узбекистан от 28 января 2022 г. № ПФ-60 «О Стратегии развития Нового Узбекистана на 2022–2026 годы» — Офиц. текст: Нац. база данных законодательства РУз — LEX.UZ. — Дата обращения: 24.10.2025.

«О стратегии развития нового Узбекистана на 2022-2026 годы» и указ от 12 ноября 2020 года ПФ-6610 «О внедрении совершенно новых механизмов в деятельность учреждений первичной медицинской и санитарной помощи и дополнительных мерах по повышению эффективности реформ в системе здравоохранения», а также постановление от 20 июня 2017 года ПК-3071 «О дополнительных мерах по совершенствованию специализированной медицинской помощи населению в Узбекистане на 2017-2021 годы» и указ от 12 ноября 2020 года ПК-4891 «О дополнительных мерах по повышению эффективности медицинской профилактики для обеспечения общественного здоровья», а также других нормативно-правовых актов, связанных с данной деятельностью, ставят перед собой задачи, реализации которых в определенной степени будет способствовать проводимое в диссертации исследование.

Соответствие исследования приоритетам развития науки и технологии Республики Узбекистан. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. Ген церулоплазмينا кодирует ключевой медьсвязывающий белок плазмы, необходимый для обмена меди и железа. Ацерулоплазминемия и выраженная гипоцерулоплазминемия ассоциированы с патогенными вариантами в кодирующих областях гена ЦП: многочисленные обзоры показывают, что такие мутации ведут к снижению/утрате ферроксидазной активности, перегрузке железом и типичной клинике (анемия, ретинопатия, диабет, нейродегенерация) (Miyajima, 2003/2018; Kono, 2013; Marchi et al., 2019; GeneReviews). В последние годы спектр мутаций существенно расширен: описаны миссенс-варианты p.Pro477Leu и p.Gly895Ala (Julia et al., 2021), делеция c.2869delC и мутация c.606dup (Wan Qiu et al., 2021), а также 13 уникальных изменений, включая сдвиги рамки считывания (Cuenca et al., 2020). Эти данные подчёркивают критическую роль структурной целостности ЦП для стабильной секреции и функции белка.

Помимо структурных нарушений, большое внимание уделяется транскрипционному контролю ЦП. Промоторная область (участок ДНК перед стартом транскрипции, где собирается транскрипционный аппарат) содержит СААТ-боксы, сайты гормональных рецепторов и мотивы факторов транскрипции (в т. ч. YY1) (Gyulikhandanova et al., 2004). Расширенный анализ до -3,5 кб от АТГ выявил участки связывания эстроген-ассоциированных белков (-212, -358, -2260, -3775) и функционально значимую замену Т→С на позиции -1966 (Tsymbalenko et al., 2009).

В отличие от повышенной, механизмы пониженной экспрессии гена ЦП изучены недостаточно: снижение уровня белка может быть обусловлено не только экзонными мутациями, но и вариациями в cis-регуляторных областях, которые изменяют связывание транскрипционных факторов и эффективность инициации транскрипции. (Pelucchi et al., 2018; Cuenca et al., 2020).

Таким образом, совокупность данных по структурным дефектам и

регуляторному строению ЦП указывает на высокий потенциал исследований cis-регуляторных элементов для совершенствования диагностики и терапии нарушений обмена железа и меди в будущем. Особый интерес представляет изучение этих механизмов в недостаточно охарактеризованных популяциях, включая пациентов республики.

Связь темы диссертационного исследования с планами научных исследований научно исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научных исследований Института иммунологии и геномики человека в рамках практического проекта ГКНТ 1.4.1 «Механизмы формирования иммунологической недостаточности населения в геоклиматических условиях Узбекистана».

Целью исследования является изучение молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию гена церулоплазмينا, и их влияние на развитие ацерулоплазминемии и гипocerулоплазминемии с преимущественным изучением cis-регуляторных элементов (промотор, старт кодон, энхансер и т.д.).

Задачи исследования:

ранжирование клинических групп пациентов по фенотипу на основе количественного определения сывороточного церулоплазмينا;

изучение молекулярных факторов модулирующих биосинтез церулоплазмينا;

получение и анализ последовательности ДНК у пациентов разных фенотипических групп в области корового промотора и старт-кодона гена церулоплазмينا (cis-регуляторной области);

выполнение сравнительной биоинформатической оценки регуляторного потенциала выявленных нуклеотидных замен.

Объектом исследования явились 120 детей в возрасте от 1 года до 16 лет со сниженным уровнем церулоплазмينا, а также 130 практически здоровых детей, составивших контрольную группу.

Предметом исследования являлись венозная кровь и сыворотка крови больных и здоровых детей для проведения биохимических, биоинформационных и молекулярно-генетических исследований.

Методы исследования. В исследовании использовались биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы исследования.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые предложено рабочее ранжирование (четыре группы) для педиатрической когорты по уровням церулоплазмينا ($\approx 5,5-10$; $11-16$; $17-25$; >25 мг/дл) и обосновано использование биообразцов с низким ЦП исключительно как критерия отбора для углублённых молекулярно-генетических исследований;

выявлены нуклеотидные замены в промоторной области гена ЦП ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$); показано, что они не встречались в контроле и, вероятно, ассоциированы со стабильно низкими

значениями ЦП (~8,5–11,0 мг/дл); обосновано рассмотрение этих позиций как кандидатов для последующей функциональной валидации;

показано, что обнаруженные аминокислотные замены 17T>G (Leu→Arg) и 187G>A (Val→Ile) вероятно сопровождаются более низкими уровнями ЦП (~8,5–16,7 мг/дл); кроме того, наличие редких кодонов (ATA на уровне ~17-го кодона и ACG в области ~30-го кодона) может замедлять скорость трансляции без изменения аминокислотной последовательности;

установлено, что добавление ингибиторов протеаз (PMSF / cocktail mini protease tablets) на этапе подготовки сыворотки снижает протеолиз и повышает точность количественного определения ЦП; разработан алгоритм интерпретации с учётом СРБ/СОЭ и повторных измерений вне воспаления.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

предложен подход к оценке церулоплазмина, основанный на иммунотурбидиметрическом определении с обязательным учётом признаков воспаления, а также показателей меди в крови и моче, которые ранее в рутинной диагностике не учитывались;

показано, что добавление ингибиторов протеаз на этапе подготовки сыворотки снижает долю апоформ и фрагментов, повышая точность количественного измерения ЦП;

подготовлены практические материалы для лабораторных специалистов; набор полученных нуклеотидных последовательностей депонирован в базу данных NCBI GenBank (раздел «Nucleotide»): Accession PX394284–PX394295;

выявлены нуклеотидные замены (–160, –127, –117, –62, –37) и варианты в кодирующем участке, прилежащем к ATG старт кодону; после подтверждения функциональными тестами предложены рассматривать как кандидатов для включения в таргетные панели.

Достоверность результатов исследования подтверждена применением методов и подходов в исследованиях, соответствием теоретических данных полученным результатам, методологической точностью проведенных исследований, адекватностью количества участников исследования, основанных на биохимических, молекулярно генетических, биоинформатических и статистических методах исследования; сравнением результатов с международными и отечественными исследованиями, утверждением проведенных выводов и полученных результатов уполномоченными структурами. Применение статистических методов обеспечило достоверность полученных результатов.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость работы заключается в обосновании практической схемы ранжирования детей по уровню церулоплазмина (~5,5–10; 11–16; 17–25; >25 мг/дл) и в демонстрации того, что для молекулярно-генетического анализа целесообразно отбирать только пациентов с устойчиво низким ЦП вне воспаления и при наличии клинических признаков либо других биомаркеров нарушения обмена меди. Такой подход позволяет не расходовать ресурсы на нерелевантные случаи, а концентрироваться на наиболее информативных образцах, повышая диагностическую отдачу молекулярного исследования.

Выявлены нуклеотидные замены в промоторе гена ЦП (–37A>G, –62T>C, –117C>T, –127A>T, –160A>G) и возможное рассмотрение этих позиций как кандидатов для таргет-скрининга при условии последующей функциональной валидации. Показано, что аминокислотные замены 17T>G (Leu→Arg) и 187G>A (Val→Ile), вероятно, сопровождаются более низкими уровнями ЦП (~8,5–16,7 мг/дл); кроме того, наличие редких кодонов (ATA на уровне ~17-го кодона и ACG в области ~30-го кодона) может замедлять скорость трансляции без изменения аминокислотной последовательности. Установлено, что добавление ингибиторов протеаз на этапе подготовки сыворотки снижает протеолиз и повышает точность количественного определения ЦП; разработан алгоритм интерпретации с учётом СРБ/СОЭ и повторных измерений вне воспаления.

Практическая значимость работы проявляется в том, что обосновано иммунотурбидиметрическое определение церулоплазмينا с обязательным учётом признаков воспаления, а также показателей меди в крови и моче, ранее не учитывавшихся в рутинной диагностике. Доказано, что добавление ингибиторов протеаз при подготовке сыворотки, уменьшая долю апоформ и фрагментов, повышает точность количественного измерения ЦП. Подготовлены практические материалы для врачей-генетиков и сотрудников лабораторий и депонирован набор последовательностей в базе NCBI GenBank (раздел Nucleotide): PX394284–PX394295. Выявленные нуклеотидные замены (–160, –127, –117, –62, –37) и варианты в кодирующем участке, прилежащем к ATG, после подтверждения функциональными тестами в рамках критериев ACMG/AMP целесообразно рассматривать как будущих кандидатов для включения в таргетные панели.

Внедрение результатов исследования. На основе научных результатов, полученных в ходе изучения молекулярных механизмов, влияющих на синтез церулоплазмينا, были сделаны следующие выводы.

первая научная новизна: предложено рабочее ранжирование биообразцов детей по уровням церулоплазмينا на четыре группы (~5,5–10; 11–16; 17–25; >25 мг/дл) и обосновано использование биообразцов с низким ЦП исключительно как критерия отбора для углублённых молекулярно-генетических исследований. По данному направлению разработаны методические рекомендации «Молекулярные методы анализа cis-регуляторных элементов при ацерулоплазминеми», утверждённые решением Учёного совета Института иммунологии и геномики человека от 29 января 2025 г. № 1. Предложение внедрено в практику Самаркандского государственного медицинского университета (приказ от 19.03.2025 № 1-а) и Самаркандского государственного университета им. Ш. Рашидова (приказ от 19.03.2025 № 102); подтверждено заключением Научно-технического совета при Минздраве РУз от 20.03.2025 № 14/20; *социальная эффективность:* в перспективе внедрение полученных научных результатов может способствовать более ранней диагностике, оптимизации профилактической тактики, снижению частоты осложнений, уменьшению инвалидизации и потенциальному улучшению качества жизни пациентов; *экономическая*

эффективность: в будущем применение в практической деятельности СГМУ и СамГУ методов молекулярного анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминемии может быть использовано для уточнения наследственной природы заболевания и более индивидуализированного выбора тактики ведения, что создаёт предпосылки для повышения эффективности лечения и рационального использования ресурсов здравоохранения. *Вывод:* предложено четырёхуровневое ранжирование по уровню ЦП ($\approx 5,5$ –10; 11–16; 17–25; >25 мг/дл) и обосновано использование образцов с низким ЦП как критерия отбора для углублённых молекулярно-генетических исследований.

вторая научная новизна: выявлены нуклеотидные замены в промоторе гена ЦП ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$), отсутствующие в контрольной группе; вероятно, связаны со стабильно низкими значениями ЦП ($\sim 8,5$ –11,0 мг/дл) и, при выполнении условий последующей функциональной валидации, могут рассматриваться как кандидаты для таргет-скрининга. По данному направлению разработаны и утверждены (решение Учёного совета ИИиГЧ от 29.01.2025 № 1) методические рекомендации «Молекулярные методы анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминемии». Предложение внедрено (СГМУ: приказ 19.03.2025 № 1-а; СамГУ им. Ш. Рашидова: приказ 19.03.2025 № 102); подтверждено заключением НТС МЗ РУз от 20.03.2025 № 14/20; *социальная эффективность:* в перспективе внедрение полученных результатов может способствовать более ранней диагностике, снижению частоты осложнений и уменьшению инвалидизации, что потенциально улучшит качество жизни пациентов; *экономическая эффективность:* в будущем использование методов молекулярного анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминемии в практике СГМУ и СамГУ может уточнять наследственную природу заболевания и индивидуализировать тактику ведения, создавая предпосылки для повышения эффективности лечения и более рационального использования ресурсов здравоохранения. *Вывод:* выявлены промоторные замены ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$), не встречающиеся в контроле и возможно ассоциированные со стабильно низким уровнем ЦП, требуются функциональные тесты.

третья научная новизна: показано, что обнаруженные аминокислотные замены 17T>G (Leu→Arg) и 187G>A (Val→Ile) вероятно сопровождаются более низким уровнем ЦП ($\sim 8,5$ –16,7 мг/дл); кроме того, наличие редких кодонов — АТА на уровне ~ 17 -го кодона и АСГ в области ~ 30 -го — может замедлять скорость трансляции без изменения аминокислотной последовательности. По данному направлению разработаны и утверждены методические рекомендации «Молекулярные методы анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминемии» (решение Учёного совета ИИиГЧ от 29.01.2025 № 1). Внедрение: СГМУ (приказ 19.03.2025 № 1-а) и СамГУ им. Ш. Рашидова (приказ 19.03.2025 № 102); подтверждение — заключение НТС МЗ РУз от 20.03.2025 № 14/20; *социальная эффективность:* в перспективе внедрение полученных результатов может

способствовать более ранней диагностике, снижению частоты осложнений и уменьшению инвалидизации, что потенциально улучшит качество жизни пациентов; *экономическая эффективность*: в будущем использование методов молекулярного анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминеми в практике СГМУ и СамГУ может уточнять наследственную природу заболевания и индивидуализировать тактику ведения, создавая предпосылки для повышения эффективности лечения и более рационального использования ресурсов здравоохранения. *Вывод*: возможна связь замен с.17T>G (p.Leu6Arg) и с.187G>A (p.Val63Ile) с низким уровнем церулоплазмينا; кроме того, наличие редких ранних кодонов АТА (~17-го) и АСГ (~30-го) может замедлять трансляцию без изменения аминокислотной последовательности.

четвёртая научная новизна: показано, что добавление ингибиторов протеаз (PMSF / cocktail mini protease tablets) на этапе подготовки сыворотки снижает протеолиз и повышает точность количественного определения ЦП; разработан алгоритм интерпретации результатов с учётом СРБ/СОЭ и повторных измерений вне воспаления. По данному направлению подготовлены и утверждены методические рекомендации «Молекулярные методы анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминеми» (решение Учёного совета ИИиГЧ от 29.01.2025 № 1). Внедрение: СГМУ (приказ 19.03.2025 № 1-а) и СамГУ им. Ш. Рашидова (приказ 19.03.2025 № 102); подтверждение — заключение НТС МЗ РУз от 20.03.2025 № 14/20; *социальная эффективность*: в перспективе внедрение полученных результатов может способствовать более ранней диагностике, снижению частоты осложнений и уменьшению инвалидизации, что потенциально улучшит качество жизни пациентов; *экономическая эффективность*: в будущем использование методов молекулярного анализа *cis*-регуляторных элементов в практике СГМУ и СамГУ может уточнять наследственную природу заболевания и индивидуализировать тактику ведения, создавая предпосылки для повышения эффективности лечения и более рационального использования ресурсов здравоохранения. *Вывод*: изучено, что добавление ингибиторов протеаз может снижать протеолиз и повышать надёжность количественного определения ЦП; предложен алгоритм интерпретации с учётом СРБ/СОЭ и повторных измерений вне воспаления.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были представлены на 6 конференциях, в том числе на 3 международных и 3 республиканских научно-практических конференциях.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 8 журнальных статей, в том числе 2 - в республиканских и 1 - в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Объем диссертации составляет 115 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

В первой главе **«Молекулярные основы функционирования гена церулоплазмينا: обзор литературы»** диссертации рассмотрены структура и функции ЦП; известные генетические формы нарушений обмена меди; особенности структурно-функциональной организации промоторной области ЦП, роль цис-регуляторных элементов и транскрипционных факторов в регуляции транскрипции; методологические аспекты определения уровня ЦП.

Во второй главе **«Характеристика материалов и использованные методы исследования»** диссертации описаны основные биохимические показатели биологических образцов пациентов и детально изложены использованные лабораторные и молекулярно-генетические методы. Предметом исследования являются пациенты с подозрением на нарушение синтеза церулоплазмينا, которые были отобраны и направлены высококвалифицированными врачами из ряда диагностических центров г.Ташкента. Все процедуры соответствовали принципам Хельсинкской декларации. На использование биообразца каждого ребёнка в исследовании было получено информированное письменное согласие. Когорта была сформирована методом случайной выборки и состояла из 250 детей: 120 детей с подозрением на снижение уровня церулоплазмينا и 130 практически здоровых детей.

Среди всей выборки преобладали мальчики — 63% ($n = 158$), девочки составили 37% ($n = 92$). Возраст обследованных варьировал от 1 года до 16 лет (средний возраст — $8,4 \pm 3,2$ года). Распределение по возрастным группам показало, что 28,8% ($n = 72$) составили дети 1–5 лет, 38,0% ($n = 95$) — дети 6–10 лет, и 33,2% ($n = 83$) — дети 11–16 лет. Наибольшая часть выборки приходилась на возрастные группы 6–10 лет.

Для измерения ЦП на начальном этапе исследования был использован метод ELISA, однако метод продемонстрировал нестабильность: наблюдалось смещение контрольных значений; поэтому для основного анализа ELISA не применялся.

Базовым методом была выбрана иммунотурбидиметрия — рутинный подход, фиксирующий помутнение после реакции антител с белком. Метод обеспечивал стабильную калибровку и надёжную линейность в диапазоне ≈ 3 –35 мг/дл, обеспечивая сопоставимость результатов. Параллельно оценивали маркёры воспаления С-реактивный белок (СРБ) и СОЭ, чтобы

исключить влияние острой фазы на значение ЦП. Дополнительно протестировано влияние ингибиторов протеаз (PMSF и комплексный коктейль) на спонтанную диссоциацию молекулы ЦП.

На следующем этапе были отобраны образцы пациентов с устойчиво низким уровнем церулоплазмينا; у них методом Сэнгер-секвенирования исследовали фрагмент $-200...+295$ нт относительно старт-кодона ATG гена СР. Полученные последовательности промоторной области анализировали на сайты связывания транскрипционных факторов с использованием матриц JASPAR 2024 CORE и алгоритма FIMO (MEME Suite) с расчётом score, p- и *q-значений; корректность предсказаний подтверждена внешним отчётом SynBio Technologies (Certificate of Analysis, Project ID S040263-01), что позволило выделить статистически значимые регуляторные участки ДНК.

В третьей главе **«Фенотипические группы по уровню церулоплазмينا и лабораторно-клинические аспекты»** диссертации проведено распределение пациентов на группы по результатам сывороточного церулоплазмينا. Такое ранжирование позволяет отделить истинно низкие значения церулоплазмينا от ложнонормальных показателей на фоне воспаления и целенаправленно отбирать образцы для последующего молекулярно-генетического исследования.

Молекула ЦП не стабильна. После взятия крови часть молекул может переходить в апо-форму и распадаться на фрагменты, которые продолжают распознаваться антителами и искусственно завышают результат. Поэтому при определении ЦП целесообразно добавлять ингибиторы протеаз на этапе подготовки сыворотки, чтобы минимизировать постаналитический распад. При сравнении трёх вариантов подготовки сыворотки получены следующие значения концентрации ЦП: без ингибитора протеаз — $27,3 \pm 2,4$ мг/дл, с PMSF — $20,0 \pm 1,9$ мг/дл, с коктейлем Complete — $23,9 \pm 2,2$ мг/дл. Таким образом, добавление PMSF сопровождалось снижением измеряемого уровня ЦП примерно на 27 % по сравнению с контролем без ингибитора, а Complete — примерно на 12 %. При этом вариабельность результатов была минимальной именно в группе PMSF, что указывает на более стабильное подавление протеолиза. В совокупности данные ANOVA ($p < 0,00001$) и снижение средних значений ЦП свидетельствуют о заметном влиянии постаналитической деградации белка на итоговый результат и обоснованности использования ингибиторов протеаз при подготовке образцов.

Уровень церулоплазмينا определяли параллельно с СРБ и СОЭ; при наличии признаков воспаления исследование повторяли через 3–6 месяцев, в период клинико-лабораторной ремиссии. По данным динамического наблюдения в острую фазу средние значения СРБ составляли $20,9 \pm 11,9$ мг/л против $5,0 \pm 1,7$ мг/л в ремиссии (снижение примерно на 75–80 %;) ($p \leq 0,05$), СОЭ — $25,2 \pm 2,5$ и $12,4 \pm 3,2$ мм/ч (снижение около 50–65 %;) ($p \leq 0,05$), церулоплазмينا — $27,9 \pm 5,8$ и $14,6 \pm 6,0$ мг/дл соответственно (уменьшение порядка 25–35 %;) ($p \leq 0,05$). Эти наблюдения указывают на то, что в

изученной когорте церулоплазмин проявляет свойства положительного белка острой фазы, поэтому для верификации дефицита ЦП учитывались только значения, полученные вне острой фазы, при обязательном контроле СРБ и СОЭ.

В основной группе детей по сравнению с возрастно-сопоставимой контрольной группой отмечен согласованный сдвиг показателей медного обмена. По данным средний уровень ЦП мг/дл был примерно втрое ниже ($11,47 \pm 4,01$ против $33,36 \pm 7,06$) ($p \leq 0,05$), сывороточная медь мг/дл — почти вдвое ниже ($8,83 \pm 3,35$ против $19,66 \pm 4,52$) ($p \leq 0,05$), тогда как суточная экскреция меди с мочой мкг/сут, напротив, в среднем примерно в четыре раза выше ($65 \pm 5,5$ против 15 ± 3) ($p \leq 0,05$). Активность АЛТ Е/л; была выше ($85,3 \pm 38,1$ против $43,1 \pm 15,7$) ($p \leq 0,05$), аналогично АСТ Е/л; ($70,0 \pm 34,1$ против $32,4 \pm 11,9$) ($p \leq 0,05$). Показатели ЛДГ Е/л ($706,0 \pm 276,8$ против $409,8 \pm 41,7$) ($p \leq 0,05$). В совокупности это формирует типичный биохимический профиль: дефицит церулоплазмينا и меди в сыворотке на фоне усиленной экскреции меди и признаков цитолиза, что указывает на нарушение медного обмена с вовлечением печени.

Учитывая зависимость уровня церулоплазмينا от воспаления и разнородность биохимического профиля, потребовалось чёткое лабораторное ранжирование пациентов по сывороточному уровню ЦП, определённого вне острой фазы. Для разграничения истинно низких, пограничных и нормальных значений была разработана схема фенотипического распределения по уровням ЦП (табл. 1).

Таблица 1

Ранжирование биообразцов пациентов на фенотипические группы по уровню сывороточного ЦП

Группа	Уровень ЦП (мг/дл)	
I	$\approx 5,5-10$	Стабильно низкий
II	11-16	Низкий
III	17-25	Пограничный
IV	>25	Повышенный

Выделение четырёх фенотипических групп по сывороточному церулоплазмину позволило чётко отделить устойчивый дефицит от транзиторных изменений на фоне воспаления и сосредоточить молекулярно-генетический анализ на наиболее информативных биообразцах. Ген ЦП локализован на длинном плече 3-й хромосомы (3q25-q26) и состоит из 20 экзонов.

В четвёртой главе «Экспрессия гена церулоплазмينا в образцах пациентов» диссертации представлены результаты таргетного Сэнгер-секвенирования ядра промотора (≈ -200 нт от ATG) и прилегающего

кодирующего сегмента (+ до 295 нт) гена ЦП у 18 детей со стабильным снижением церулоплазмина (5,5–16,0 мг/дл) и 6 детей контрольной группы. Всего выявлено 15 нуклеотидных замен, из которых 9 обнаружены только у пациентов основной группы и не встречались в контроле. Часть вариантов локализована в цис-регуляторной области промотора (до старт-кодона ATG), часть — в примыкающем кодирующем сегменте; при этом две замены после ATG (с.17T>G и с.187G>A) приводят к несинонимичным аминокислотным заменам p.Leu6Arg и p.Val63Ile.

Для наглядности все выявленные варианты сгруппированы по области, позиции относительно ATG, типу нуклеотидной и аминокислотной замены и сопоставлены с диапазонами сывороточного уровня церулоплазмина у соответствующих пациентов (табл. 2).

Таблица 2

Резюме выявленных вариантов нуклеотидных замен и уровней церулоплазмина

Область	Позиция (отн. ATG)	Нуклеотидная замена	Аминокислотный эффект (HGVS p.)	n (пац.)	Уровень ЦП (мг/дл)
Цис-регуляторная область промотора (до ATG старт кодона)	–160	A→G	—	3	8,5–11,0
	–127	A→T	—	2	8,5–11,0
	–117	C→T	—	2	8,5–11,0
	–62	T→C	—	3	8,5–11,0
	–37	A→G	—	6	8,5–11,0
Кодирующая область (после ATG старт кодона)	+17	T→G	Leu→Arg	2	8,5–11,0
	+28	C→T	—	2	8,5–16,7
	+187	G→A	Val→Ile	4	8,5–16,7
	+291	T→C	—	2	8,5–11,0

По состоянию на 7 февраля 2025 г. для восьми нуклеотидных замен (–160A>G, –127A>T, –117C>T, –62T>C, –37A>G, +17T>G, +28C>T, +291T>C) записей в базах ClinVar, dbSNP и gnomAD не обнаружено. Единственный вариант, для которого найдена информация, — +187G>A; он соответствует rs3736282 и в ClinVar классифицируется как доброкачественный полиморфизм (benign).

Полученные данные позволяют предположить, что у части детей снижение уровня церулоплазмина связано как с регуляторными промоторными вариантами, так и с аминокислотными заменами; оба механизма потенциально уменьшают выход зрелого белка. Повторяющиеся нуклеотидные замены в промоторной области, вероятно, нарушают

связывание транскрипционных факторов и тем самым снижают эффективность инициации транскрипции гена ЦП. Окончательное подтверждение причинно-следственной связи требует функциональной валидации (репортёрные анализы, исследование экспрессии и др.).

В пятой главе «Анализ нуклеотидной последовательности исследуемых образцов с использованием биоинформационных подходов» диссертации рассмотрен промоторный и прилегающий участок гена ЦП в диапазоне –200...+295 нт относительно старт-кодона ATG. В этом фрагменте идентифицировано 38 потенциальных цис-регуляторных мотивов, на фоне которых сопоставлялись референсная последовательность и данные пациентов. Сводная характеристика вариантов и перекрываемых ими мотивов представлена в таблице.

Таблица 3

Предсказанные мотивы факторов транскрипции, перекрываемые клиническими вариантами (hg38)

Вариант (отн. ATG)	hg38 координата*	Перекрываемый мотив (семейство; JASPAR ID)	Диапазон мотива (отн. ATG)	Score	p-value	q-value
–160 A>G	chr3:149,22 1,952	ближайший FOX/Forkhead (Foxq1; MA0040.2)	–170...–1 65	15.285 7	4.00E–0 6	0.0030 3
–127 A>T	chr3:149,22 1,919	SRX (SOX/HMG; MA0084.2)	–127...–1 21	10.900 0	9.66E–0 5	0.0372
–117 C>T	chr3:149,22 1,909	HLF (bZIP; MA0043.4)	кластер –115...–1 03	11.891 9	5.50E–0 5	0.0463
		Ddit3::Cebpa (bZIP; MA0019.2)	кластер –115...–1 03	10.788 9	8.99E–0 5	0.0898
–62 T>C	chr3:149,22 1,854	TATA-подобный бокс (core-зона)	–62...–56	12.832 9	4.61E–0 5	0.0272
–37 A>G	chr3:149,22 1,829	проксимальное ядро (коровые элементы)	–39...–35	14.761 9	5.10E–0 5	0.0479

Примечание: * источник координат ЦП: UCSC/GENCODE (hg38).

Всего выявлено 15 нуклеотидных замен, из них 11 приходятся на зоны цис-регуляторных элементов и ядра промотора (окрестность ATG), то есть на участки, наиболее вероятно влияющие на инициацию транскрипции. Часть вариантов перекрывает мотивы семейств FOX, SOX/HMG, PAR bZIP и

СНОР::С/ЕВР, связанных с открытием хроматина, архитектурным изгибанием ДНК, циркадной и стресс-зависимой регуляцией транскрипции. Отдельные замены локализуются в ТАТА-подобной области и Inr-/коровую зону промотора, где особенно критичны точные позиции и расстояния между элементами.

Для оценки функционального значения этих промоторных вариантов проведён *in silico*-анализ их влияния на связывание транскрипционных факторов и работу ядра промотора. Сканирование по матрицам JASPAR/FIMO выполнялось с жёстким порогом значимости ($q < 0,05$). По данным JASPAR/FIMO и motifbreakR/plotMB для пяти ключевых замен (–160 А>G, –127 А>Т, –117 С>Т, –62 Т>С и –37 А>G) получено согласованное снижение прогнозируемой аффинности соответствующих факторов по сравнению с референсным аллелем. Тем самым биоинформационный анализ указывает, что эти варианты, не изменяя структуру белка, функционируют как регуляторные «ослабляющие» варианты промотора гена ЦП и могут вносить вклад в формирование фенотипа устойчиво низкого сывороточного церулоплазмينا. Корректность биоинформатического поиска мотивов дополнительно подтверждена внешним отчётом SynBio Technologies (Certificate of Analysis, Project ID S040263-01).

Дополнительно в ряде образцов зарегистрированы «редкие» ранние кодоны (АТА на 17-м и АСG вблизи 30-го кодона), которые потенциально снижают эффективность начальных этапов трансляции и стабильность мРНК.

В заключительной части работы проведено обобщение полученных данных по всем этапам исследования. Показано, что разработанное лабораторное ранжирование по уровню церулоплазмينا формирует последовательный диагностический маршрут: от первичного биохимического скрининга (ЦП в сочетании с С-реактивным белком, СОЭ, показателями меди и печёночными ферментами) к выделению когорты высокого риска (I–II фенотипические группы) и последующему таргетному секвенированию регуляторной области гена ЦП. Такой подход позволяет ограничить дорогостоящий молекулярно-генетический анализ пациентами со стойким снижением ЦП и повышает диагностическую отдачу исследования.

Полученные нуклеотидные последовательности промоторного участка гена СР, депонированы в международной базе GenBank (NCBI; accession PX394284-PX394295), что обеспечивает открытый доступ к данным и возможность их использования при создании таргетных панелей и сравнительных популяционных исследований.

Таким образом, полученные результаты задают чёткое направление для дальнейших исследований: экспериментального подтверждения влияния выявленных промоторных и кодирующих вариантов на экспрессию гена СР и расширения анализа на другие гены системы обмена меди.

ВЫВОДЫ

1. Предложено лабораторное ранжирование биообразцов пациентов с выделением четырёх фенотипических групп по концентрации церулоплазмينا (5,5–10; 11–16; 17–25; >25 мг/дл), что позволяет фокусировать молекулярно-генетическое исследование на когорте со стойким снижением ЦП и повышать информативность поиска генетических регуляторных вариантов.

2. Показано, что воспаление повышает уровень церулоплазмينا в среднем на 35 %, поэтому дефицит ЦП должен оцениваться вне острой фазы с обязательным учётом CRP и СОЭ. При этом иммунотурбидиметрия с добавлением ингибиторов протеаз обоснована как предпочтительный метод количественного определения ЦП.

3. Впервые описаны пять вариантов цис-регуляторных элементов в промоторе гена ЦП (–37A>G, –62T>C, –117C>T, –127A>T, –160A>G) и две нуклеотидные замены в начале кодирующего участка (с.17T>G, р.Leu6Arg; с.187A>G, р.Val63Ile), отсутствующие у практически здоровых контролей и ассоциированные с устойчиво низким уровнем сывороточного церулоплазмينا; таким образом, полученные данные позволяют рассматривать эти варианты как вероятные кандидаты на клинически значимые изменения.

4. Биоинформационный анализ показал, что выявленные нуклеотидные замены охватывают мотивы ключевых цис-регуляторных элементов (SOX/HMG, PAR-bZIP, CHOP:C/EBP, коровая зона промотора ЦП) и могут оказывать значимый супрессорный регуляторный эффект, что требует дальнейшей функциональной валидации.

**ONE -TIME SCIENTIFIC COUNCIL BASED ON THE SCIENTIFIC
COUNCIL DSc.02/30.12.2019.Tib.50.01 FOR AWARDING SCIENTIFIC
DEGREES AT THE INSTITUTE OF HUMAN IMMUNOLOGY AND
GENOMICS**

INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND HUMAN GENOMICS

MASAIDOVA IRODA BAKHTIYOR QIZI

MOLECULAR FACTORS AFFECTING CERULOPLASMIN SYNTHESIS

**03.00.03 – Molecular Biology. Molecular Genetics.
Molecular Biotechnology**

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

TASHKENT-2025

The topic of the dissertation of Doctor of Philosophy (PhD) is registered in the Higher Attestation Commission at the Ministry of Higher Education, Science and Innovations of the Republic of Uzbekistan B2024.2.PhD/B1155.

The dissertation of Doctor of Philosophy (PhD) was completed at the Institute of Immunology and Human Genomics.

An abstract of the dissertation in three languages (Uzbek, Russian, English (summary)) is available on the website of the Scientific Council (www.immuno.uz) and the Information and Educational Portal "ZiyoNET" (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor:	Polyarush Svetlana Vitalyevna Candidate of Biological Sciences, LBM med. centre
Official opponents:	Kadirova Dilbar Abdullaevna Doctor of Biological sciences, Professor Dushanova Gavhar Abdukarimovna Candidate of Biological Sciences, Associate Professor
Leading organization:	National University of Uzbekistan

The defense of the dissertation will be held on "____" _____ 2025 at ____ o'clock at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12. 2019.Tib.50.01 at the Institute of Immunology and Human Genomics (Address: 100060, Tashkent, str. Academician Y. Gulyamov, 74. Tel/Fax: (+99871) 207-08-30, e-mail: immunology@immuno.uz).

The dissertation can be looked through in the Information Resource at the Institute of Immunology and Human Genomics (registered under No____). Address: 74, Y.Gulyamov str., 100060, Tashkent. Tel/Fax: (+99871) 207-08-30.

Abstract of the dissertation was distributed on «____» _____ 2025 y.
(Mailing report number ____ on «____» _____ 2025 y).

T.U. Aripova
Chairman of the Scientific Council for the
Awarding of Academic degrees, Doctor of
medical Sciences, Professor, Academician

X.M.Khatamov
Scientific Secretary of the Scientific Council
for the Awarding of Academic degrees,
Doctor of medical Sciences (DSc)

A.A. Ismailova
Chairman of the scientific seminar at the
Scientific Council for the Awarding of Academic
degrees, Doctor of medical Sciences, Professor

INTRODUCTION (dissertation abstract of Philosophy doctor (PhD))

The purpose of the scientific work is to identify molecular mechanisms regulating ceruloplasmin (CP) gene expression—focusing on cis-regulatory promoter elements and ATG-proximal coding variants—and to determine their impact on the development of hypoceruloplasminemia/aceruloplasminemia.

The object of the study were 120 children (≈ 1 –16 years) with suspected low CP observed in Tashkent during 2021–2024 and 130 practically healthy children as controls were included.

The scientific novelty of the study is as follows:

a four-tier CP stratification (≈ 5.5 –10; ≤ 16 ; 17–25; > 25 mg/dL) was proposed and used exclusively as a selection tool, yielding 18 highly informative cases for sequencing;

proximal promoter variants absent in controls— $-37A>G$, $-62T>C$, $-107A>C$, $-117C>T$, $-127A>T$ —were associated with persistently low CP (~ 8.5 –11.0 mg/dL) and represent candidates for targeted screening pending functional validation;

ATG-proximal coding variants $c.17T>G$ (p.Leu6Arg) and $c.187G>A$ (p.Val63Ile) co-occurred with lower CP (~ 8.5 –16.7 mg/dL); rare early codons (ATA at codon 17; ACG near ~ 30) may slow translation without altering the amino-acid sequence;

analytical optimization showed that adding protease inhibitors (PMSF/protease-cocktail) during serum preparation reduces proteolysis and improves accuracy of CP quantification; an interpretation algorithm. A practical sequence package was prepared for NCBI deposition.

Implementation of Research Results. Based on the scientific results obtained on molecular regulation of CP synthesis, the following conclusions were made

the first scientific novelty: a working ranking of the pediatric cohort by ceruloplasmin levels into four groups (≈ 5.5 –10; ≤ 16 ; 17–25; > 25 mg/dL) and justified the use of biosamples with low CP exclusively as a selection criterion for in-depth molecular genetic studies. In this area, methodological recommendations have been developed for “Molecular methods for analyzing cis-regulatory elements in ceruloplasminemia,” approved by decision of the Academic Council of the Institute of Immunology and Human Genomics on January 29, 2025, No. 1. The proposal has been implemented at Samarkand State Medical University (Order No. 1-a dated March 19, 2025) and Samarkand State University named after Sh. Rashidov (Order No. 102 dated March 19, 2025). confirmed by the conclusion of the Scientific and Technical Council under the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan dated March 20, 2025, No. 14/20; *social effectiveness:* the implementation of scientific results contributes to early diagnosis, optimization of preventive tactics, reduction of the frequency of complications, reduction of disability, and improvement of quality of life; *economic effectiveness:* the use of molecular analysis methods for cis-regulatory elements in aceruloplasminemia in the practical activities of the SSMU and SamSU allows for clarification of the

hereditary nature of the disease, reduction of the risk of complications, and improvement of treatment effectiveness through individualization of tactics, which ultimately improves the quality of life of patients. *Conclusion:* A four-level ranking based on CP level ($\sim 5.5-10$; ≤ 16 ; $17-25$; >25 mg/dL) is proposed, and the use of samples with low CP as a selection criterion for in-depth molecular genetic studies is justified.

the second scientific novelty: nucleotide substitutions in the proximal promoter of the CP gene ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$) absent in the control group have been identified for the first time. They are likely to be associated with consistently low CP values ($\sim 8.5-11.0$ mg/dL) and, subject to subsequent functional validation, may be considered as candidates for target screening. In this area, methodological recommendations “Molecular methods for the analysis of cis-regulatory elements in aceruloplasminemia” have been developed and approved (decision of the Academic Council of the Institute of Immunology and Genetics of January 29, 2025, No. 1). The proposal has been implemented (SMU: order No. 1-a dated March 19, 2025; Rashidov SamSU: order No. 102 dated March 19, 2025); confirmed by the conclusion of the Scientific and Technical Council of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan No. 14/20 dated March 20, 2025; *social effectiveness:* the implementation of scientific results contributes to early diagnosis, optimization of preventive tactics, reduction of complications, reduction of disability, and improvement of quality of life; *economic effectiveness:* the use of molecular analysis methods for cis-regulatory elements in aceruloplasminemia in the practical activities of the SSMU and SamSU allows for clarification of the hereditary nature of the disease, reduction of the risk of complications, and improvement of treatment effectiveness through individualization of tactics, which ultimately improves quality reduce the risk of complications and increase the effectiveness of treatment by individualizing tactics, which ultimately improves the quality of life of patients. *Conclusion:* Promoter substitutions ($-37A>G$, $-62T>C$, $-117C>T$, $-127A>T$, $-160A>G$) were identified that are not found in the control group and are associated with consistently low CP levels ($\sim 8.5-11.0$ mg/dL).

the third scientific novelty: it has been shown for the first time that the detected amino acid substitutions $17T>G$ (Leu $\rightarrow$ Arg) and $187G>A$ (Val $\rightarrow$ Ile) are likely to be accompanied by lower CP levels ($\sim 8.5-16.7$ mg/dL). In addition, the presence of rare codons – ATA at the level of ~ 17 th codon and ACG in the region of ~ 30 th — may slow down the translation rate without changing the amino acid sequence. In this area, methodological recommendations have also been developed and approved: “Molecular methods for the analysis of cis-regulatory elements in aceruloplasminemia” (decision of the Academic Council of the Institute of Immunology and Genetics, No. 1, dated January 29, 2025). Implementation: SSMU (order No. 1-a dated March 19, 2025) and SamSU named after Sh. Rashidov (order No. 102 dated March 19, 2025); confirmation — conclusion of the Scientific and Technical Council of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan No. 14/20 dated March 20, 2025; *social effectiveness:* the

implementation of scientific results contributes to early diagnosis, optimization of preventive tactics, reduction of complications, reduction of disability, and improvement of quality of life. *economic effectiveness*: the use of molecular analysis methods for cis-regulatory elements in aceruloplasminemia in the practical activities of the SSMU and SamSU allows for clarification of the hereditary nature of the disease, reduction of the risk of complications, and improvement of the effectiveness of treatment. Conclusion: The association between the 17T>G (Leu →Arg) and 187G>A (Val→Ile) substitutions and lower CP levels (~8.5-16.7 mg/dL) is justified; rare codons ATA (~17th) and ACG (~30th) may slow down translation without changing the amino acid sequence.

the fourth scientific novelty: it has been established for the first time that the addition of protease inhibitors (PMSF / cocktail mini protease tablets) at the serum preparation stage reduces proteolysis and increases the accuracy of CP quantification; an algorithm for interpreting results has been developed, taking into account CRP/ESR and repeated measurements outside of inflammation. In this area, methodological recommendations have been prepared and approved: “Molecular methods for the analysis of cis-regulatory elements in aceruloplasminemia” (decision of the Academic Council of the Institute of Immunology and Genetic Medicine No. 1 of January 29, 2025). Implementation: SSMU (order No. 1-a dated March 19, 2025) and SamSU named after Sh. Rashidov (order No. 102 dated March 19, 2025); confirmation — conclusion of the Scientific and Technical Council of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan No. 14/20 dated March 20, 2025; *social effectiveness*: the implementation of scientific results contributes to early diagnosis, optimization of preventive tactics, reduction of complications, reduction of disability, and improvement of quality of life; *economic effectiveness*: the use of molecular analysis methods for cis-regulatory elements in aceruloplasminemia in the practical activities of the SSMU and SamSU allows for clarification of the hereditary nature of the disease, reduction of the risk of complications, and improvement of treatment effectiveness through individualization of tactics, which ultimately improves the quality of life of patients. Conclusion: It has been proven that adding protease inhibitors during serum preparation reduces proteolysis and increases the accuracy of CRP quantification. An interpretation algorithm has been developed that takes into account CRP/ESR and repeat measurements outside of inflammation.

The volume and structure of the dissertation. The dissertation consists of an introduction, 5 chapters, a conclusion, a list of references, and an appendix. The volume of the dissertation is 115 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙҲАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Influence of various factors on determination of ceruloplasmin level in human blood plasma in clinical diagnostics // Клиник ва назарий тиббиёт журнали -Ташкент- 2024.- №6- С. 54–57. (03.00.00. №4)
2. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Факторы, влияющие на определение концентрации церулоплазмينا в плазме крови человека в клинической диагностике // Universum: химия и биология. Минск, Беларусь- 2024. № 12(126). С. 29–38. (03.00.00, № 2.)
3. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т., Пак А.А. Идентификация cis-регуляторных элементов промотора гена церулоплазмينا в образцах пациентов Узбекистана // Хоразм Маъмун академияси ахборотномаси: илмий журнал. -Хоразм.- 2024. .-№4/6 - С. 129-133. (03.00.00. №12)

II бўлим (II часть; II part)

4. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. A novel approach to ceruloplasmin stability: putting protease inhibitors into practice // British Journal of Global Ecology and Sustainable Development. — Илфорд, Великобритания, 2024. — Vol. 35. — P. 1–6.
5. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Qon plazmasida seruloplazminning o'Ichoviga turli jihatlarining ta'siri // Ilmiy tadqiqotlar va ularning yechimlari jurnali. — Андижан, Узбекистан, 2024. — Vol. 2, Issue 2. — С. 3–4.
6. Масаидова И.Б., Поляруш С.В. Proteoliz inhibitorlari orqali klinik amaliyotda seruloplazmin darajasining aniqligini o'rganish // Universal Journal of Medical and Natural Sciences. — Ташкент, Узбекистан, 2024. — Vol. 2, Issue 18 (November). — С. 83–87.
7. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Understanding the relationship between ceruloplasmin levels and inflammatory responses: a clinical insight // American Journal of Technology and Applied Sciences. — Плейно (TX), США, 2024. — Vol. 31 (December). — P. 29–32.
8. Masaidova I.B., Polyarush S.V., Ryskulov F.T. Comparative Analysis of Ceruloplasmin Detection Methods: Searching for an Optimal Solution // Respublika ilmiy-amaliy IV-sonli onlayn konferensiyasi “Ta’lim-tarbiya jarayoniga innovatsion yondashuvlar: muammo va yechimlar”. — Ташкент, Узбекистан, апрель 2025. — В. 59–83.
9. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Оценка надёжности методов анализа церулоплазмينا: поиск баланса между точностью и эффективностью // PEDAGOGIK ISLOHOTLAR VA ULARNING

YESHIMLARI— Ташкент, Узбекистан, 2025. — Vol. 13, No. 02. — С. 266–268. — (Материалы онлайн-конференции).

10. Масаидова И.Б., Поляруш С.В. Enhancing the accuracy of ceruloplasmin level determination in clinical practice through proteolysis inhibitors // Материалы XXXIV Междунар. науч. конф. «Информационное пространство современной науки» — Научный потенциал. — Москва, Россия, 2024. — № 4(47). — Ч. 1. — С. 51–53.

11. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Оптимизация количественного определения церулоплазмينا: сравнительный анализ ELISA и иммунотурбидиметрии // Всерос. науч.-практ. конф. «Образование, наука и инновации: современные вызовы». — Мелитополь, Украина, 12–13 дек. 2024. — С. 567–569. — (Материалы конференции).

12. Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т., Масаидова И.Б., Пак А.А. Сравнительное изучение *cis*-регуляторных элементов промотора гена церулоплазмينا у пациентов Узбекистана // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: Сб. тезисов Респ. научной конференции — Ташкент, Узбекистан, 15.05.2025. — С. 127–128.

13. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т., Пак А.А. Ранжирование пациентов с генетическими нарушениями биосинтеза церулоплазмينا по фенотипическим группам // Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: Сб. тезисов Респ. научной конференции — Ташкент, Узбекистан, 15.05.2025. — С. 128–129.

14. Масаидова И.Б., Поляруш С.В., Рыскулов Ф.Т. Молекулярные методы анализа *cis*-регуляторных элементов при ацерулоплазминемии: методическое пособие. — Ташкент, Узбекистан, 2025. — 23

15. Masaidova I., Polyarush S., Farrux R. Homo sapiens isolate UZB_CPprom_PB01 ceruloplasmin (CP) gene, promoter region and 5' UTR. GenBank, accession PX394284, 2025.

Avtoreferat “TDYU Yuridik fanlar Axborotnomasi” jurnali tahririyatida tahrirdan o‘tkazilib,
o‘zbek, rus va ingliz tillaridagi matnlar o‘zaro muvofiqlashtirildi

Bosishga ruxsat etildi: 21.11.2025
Bichimi: 60x84 1/8 «Times New Roman»
Garniturada 14 raqamli bosma usulda bosildi.
Shartli bosma tabog‘i 3,25. Adadi: 100, Buyurtma: №141
100060, Toshkent, Ya. G‘ulomov ko‘chasi, 74.
Tel.: +998 90 9722279, www.tiraj.uz
«TOP IMAGE MEDIA» bosmaxonasida chop etildi.