

**O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI BIOFIZIKA VA BIOKIMYO
INSTITUTI HUZURIDAGI ILMIY DARAJALAR BERUVCHI
DSs.03/30.12.2019.B.01.13 RAQAMLI ILMIY KENGASH**

BIOFIZIKA VA BIOKIMYO INSTITUTI

ABDULLAYEV ISKANDAR FATXULLAYEVICH

**YURAK-QON TOMIR VA SARATON KASALLIKLARI PATOGENEZIDA
ION KANALLARINING ROLI**

03.00.02 – Biofizika va radiobiologiya

BIOLOGIYA FANLARI DOKTORI (DSc) DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI

Toshkent – 2024

Fan doktori (DSc) dissertatsiyasi avtoreferati mundarijasi

Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)

Table of contents of the thesis abstract of Doctor of Science (DSc) dissertation

Abdullaev Iskandar Fatkhullaevich

Yurak-qontomir kasalliklari patogenezini va saratonda ion kanallarining roli..... 3

Абдуллаев Искандар Фатхуллаевич

Роль ионных каналов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний
и рака 31

Abdullaev Iskandar Fatkhullaevich

The role of ion channels in pathogenesis of cardiovascular diseases and cancer... 61

E'lon qilingan ishlar ro'yxati

Список опубликованных работ

Publication list..... 66

**O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI BIOFIZIKA VA BIOKIMYO
INSTITUTI HUZURIDAGI ILMiy DARAJALAR BERUVCHI
DSs.03/30.12.2019.B.01.13 RAQAMLI ILMiy KENGASH**

BIOFIZIKA VA BIOKIMYO INSTITUTI

ABDULLAYEV ISKANDAR FATXULLAYEVICH

**YURAK-QON TOMIR VA SARATON KASALLIKLARI PATOGENEZIDA
ION KANALLARINING ROLI**

03.00.02 – Biofizika va radiobiologiya

BIOLOGIYA FANLARI DOKTORI (DSc) DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI

Toshkent – 2024

Fan doktori (DSc) dissertatsiyasi mavzusi O‘zbekiston Respublikasi Oliy ta’lim, fan va innovatsiyalar vazirligi huzuridagi Oliy attestatsiya komissiyasida B2023.3.DSc/B197 raqam bilan ro‘yxatga olingan.

Dissertatsiya ishi O‘zbekiston Milliy universiteti huzuridagi Biofizika va biokimyo institutida bajarilgan.

Dissertatsiya avtoreferati uch tilda (o‘zbek, rus va ingliz (rezyume) Ilmiy kengashning veb-sahifasida (www.ibb-nuu.uz) va «ZiyoNet» Axborot-ta’lim portalida (www.ziynet.uz) joylashtirilgan.

Ilmiy maslahatchi:

Sabirov Ravshan Zairovich

biologiya fanlari doktori, akademik

Rasmiy opponentlar:

Mirxodjaev Ulugbek Zakirovich

biologiya fanlari doktori, professor

Kamburova Venera Seytumerovna

biologiya fanlari doktori

Yesimbetov Adilbay Tlepovich

biologiya fanlari doktori, professor

Yetakchi tashkilot:

Bioorganik kimyo instituti

Dissertatsiya himoyasi O‘zbekiston Milliy universiteti Biofizika va biokimyo instituti huzuridagi Ilmiy darajalar beruvchi DSc.03/30.12.2019.B.01.13 raqamli ilmiy kengashning 2024 yil «_____» _____ soat _____ dagi majlisida bo‘lib o‘tadi (Manzil: 100174, Toshkent shahri, Olmazor tumani, Talabalar shaharchasi, Universitet ko‘chasi, 174-uy. Tel.: (99871) 246–68–96).

Dissertatsiya bilan O‘zbekiston Milliy universiteti Biofizika va biokimyo instituti Axborot-resurs markazida tanishish mumkin (№ _____ raqami bilan ro‘yxatga olingan). Manzil: 100174, Toshkent shahri, Olmazor tumani, Talabalar shaharchasi, Universitet ko‘chasi, 174-uy. Tel.: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru; mamurjon2281@mail.ru.

Dissertatsiya avtoreferati 2024 yil «_____» _____ kuni tarqatildi.

(2024 yil «_____» _____ dagi № _____ raqamli reestr bayonnomasi).

Saatov Tal’at Saatovich

Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy kengash
raisi, b.f.d., akademik

Pozilov Ma’murjon Komiljonovich

Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy kengash
ilmiy kotibi, b.f.d.

Kurbannazarova Ra’noxon Sharapovna

Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy kengash qoshidagi
ilmiy seminar raisi o‘rinbosari, b.f.d., professor

KIRISH (fan doktori (DSc) dissertatsiyasi annotatsiyasi)

Dissertatsiya mavzusining dolzarbligi va zarurati. Jahon sog‘liqni saqlash tashkiloti ma'lumotlariga ko‘ra, saraton va yurak-qon tomir kasalliklari butun dunyo bo‘ylab, jumladan O‘zbekistonda ham insonlar o‘limning katta qismiga ikki asosiy sababdir. Dunyo bo‘ylab har yili taxminan 17,8 million kishi yurak-qon tomir kasalliklaridan vafot etadi (2022 yil ma'lumotlari). O‘zbekiston yurak-qon tomir kasalliklari oqibatidagi o‘lim ko‘rsatkichi bo‘yicha dunyoda to‘rtinchi o‘rinda turadi (100 ming kishiga 724 ta, bu jahon ko‘rsatkichlaridan 3 baravar yuqori). 2022-yilda dunyoda 9,7 million, O‘zbekistonda esa 22 000 ga yaqin kishi saraton kasalligidan vafot etgan. Saraton va yurak-qon tomir kasalliklarining molekulyar mexanizmlarini o‘rganish bemorlarning hayot sifatini sezilarli darajada yaxshilaydigan yangi istiqbolli farmakologik vositalarni ishlab chiqishga imkon beradi.

Ion kanallarining funktsiyalari dastlab qo‘zg‘aluvchan hujayralardagi elektr signallarini uzatish bilan cheklanadi deb hisoblangan. Biroq, keyinchalik ion kanallari butun dunyo bo‘ylab o‘limning ikkita asosiy sababi bo‘lgan saraton va yurak-qon tomir kasalliklari patogenezida asosiy elementlar ekanligi aniqlandi.

So‘nggi yillarda tadqiqotchilar saraton kasalligiga onkokanalopatiya sifatida yondashishni boshladilar. Darhaqiqat, ion kanallari hujayra ko‘payishi, migratsiya, invazivlik, hujayra siklini boshqarish va apoptotik signallarga befarqlik kabi ko‘plab hujayra hayotiy jarayonlarini modulyatsiya qiladi. Yurak va qon tomir kasalliklari – bu qon tomirlarining torayishi, berkilib qolishi yoki spazmi bilan rivojlanib, bir tomondan gipertoniya, yurakning patologik disfunktsiyasiga olib keladigan gipertrofiya va aritmiya kabi yurak kasalliklariga olib keladigan yurak-qon tomir kasalliklari guruhidir. Ion kanallari yurak-qon tomir tizimi va uning patologiyalarida asosiy rol o‘ynaydi. Misol uchun, aritmiyani davolashda L-tipli kaltsiy kanal blokatorlarining uchta sinfi qo‘llaniladi. Yuqoridagilardan kelib chiqqan holda, saraton va yurak-qon tomir kasalliklarini davolash uchun kanallarga ta’sir etuvchi yangi farmakologik maqsadlarni topish muhim ahamiyat kasb etadi.

O‘zbekiston Respublikasini yanada rivojlantirish bo‘yicha Harakatlar strategiyasida “...ilmiy-tadqiqot va innovatsiya faoliyatini rag‘batlantirish, ilmiy va innovatsiya yutuqlarini amaliyotga joriy etishning samarali mexanizmlarini yaratish”¹ ta’kidlangan va bu borada ion kanallarining rolini belgilash zarurligi yuqorida qayd etilgandek yurak-qon tomir va saraton kasalliklarining patogenezini o‘rganish muhim ilmiy va amaliy ahamiyatga ega. Mazkur dissertatsiya tadqiqoti O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 26.01.2022 yildagi “Yurak-qon tomir kasalliklarining oldini olish va davolash sifatini oshirish chora-tadbirlari to‘g‘risida”gi 103-son va 27.05.2021-yil “Aholiga gematologik va onkologik yordam ko‘rsatish tizimini yanada takomillashtirish to‘g‘risida”gi 5130-son qarori hamda ushbu sohada qabul qilingan boshqa me’yoriy hujjatlar belgilangan vazifalarni bajarishga ma’lum darajada xizmat qiladi..

Tadqiqotning respublika fan va texnikasini rivojlantirishning ustuvor yo‘nalishlariga muvofiqligi. Mazkur tadqiqot respublika fan va texnologiyalar

¹ O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining «O‘zbekiston Respublikasini yanada rivojlantirish Harakatlar strategiyasi to‘g‘risida»gi PF-4947-sonli –Farmoni

rivojlanishining VI “Tibbiyot va farmakologiya” ustuvor yo‘nalishlariga muvofiq bajarilgan.

Dissertatsiya mavzusi bo'yicha xorijiy ilmiy tadqiqotlarga sharhi. Hajimga bog‘liq anion kanali (HBAK yoki VRAC – Volume Regulated Anion Channel) ning ishemiya paytida miya shikastlanishidagi roli dunyoning Vashington universiteti tibbiyot maktabi (AQSh) va Albany tibbiyot markazi (AQSh) kabi yetakchi tadqiqot markazlarida o‘rganilmoqda. So‘nggi paytlarda VRACning miokard infarktidan keyin yurakning fibrotik qayta tuzilishiga va giperglikemiya paytida yurak shikastlanishidagi rolini o‘rganish bo‘yicha tadqiqotlar boshlandi (Xijing tibbiyot markazi, Xitoy). Illinoys tibbiyot kolleji (AQSh) va Virjiniya universitetining (AQSh) farmakologiya bo‘limida endoteliy va qon tomir silliq mushak hujayralarida depo-faollashtirilgan kaltsiy kanallarini faollanish mexanizmlari o‘rganilmoqda. Hozirgi vaqtda saraton patogenezida depo-faollashtirilgan kaltsiyni kiritish bo‘yicha ko‘plab tadqiqotlar olib borilmoqda (Templ universiteti qoshidagi Lyuis Kats tibbiyot maktabi (AQSh); Cheng Kung milliy universiteti (Tayvan); Biokimyo va molekulyar tibbiyot instituti, Bern universiteti (Shveysariya), Qirol Saud universiteti farmatsevtika kolleji (Saudiya Arabistoni) va boshqalar.

Muammoni o‘rganilganlik darajasi. Dunyoning yetakchi ilmiy tadqiqot markazlarida ishemik insult paytida shishgan astrositlardan glutamat ajralib chiqishining neyrotoksikligini tartibga solish mexanizmlarini yoritish bo‘yicha tadqiqotlar olib borilmoqda. Xususan, Zhou va boshqalar (2020) shuni ko‘rsatdiki, LRRC8A, VRAC kanallarining shakllanishida ishtirok etadigan oqsil, ishemiya bilan bog‘liq miya shikastlanishida va hipokamp neyronlariga glutamatotoksik ta'sir qilishda patologik rol o‘ynaydi.

So‘nggi yillardagi eng qiziqarli kashfiyotlardan biri zamonaviy tibbiyotda gipertenziyani davolashda keng qo‘llaniladigan L-tipli kaltsiy kanali ingibitorlari tomonidan depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi (SOSE – Store-Operated Calcium Entry) ning faollashishi bo‘ldi (Jonhson va boshq., 2020). SOCE ning bunday faollashuvi ilgari selektiv blokatorlar hisoblangan $Ca_v1.2$ kanali blokatorlarining barcha uchta sinf vakillariga xos ekanligi aniqlandi. Ushbu dissertatsiyada ko‘rsatilgandek, qon tomir silliq mushak hujayralari (QTSMH) patologiyada depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi kuchayishi tufayli proliferativ, ammo kamroq qisqaruvchi fenotipga olib keladigan o‘zgarishlarga uchraydi. L-tipli kaltsiy kanali ingibitorlari tomonidan bunday proliferativ QTSMHlarda SOCEni yanada kuchaytirish yurak-qon tomir kasalliklarida QTSMHlarning patologik transformatsiyasini yanada kuchaytirishi mumkin. Shuni ta'kidlash kerakki, L-tipli kaltsiy kanal blokatorlarini muntazam ravishda ishlatadigan bemorlarda boshqa antigipertenziv dorilarni qo‘llagan bemorlarga qaraganda yurak to‘xtab qolish xavfi yuqori. Endotelin-1 tomonidan qo‘zg‘atilgan tojsimon arteriya vazospazmi SOCE faollashuvidan kelib chiqqanligi aniqlandi va yuqori tuzli dietada boqiladigan kalamushlarda endoteliy retseptorlari ekspressiyasi oshadi (Xiao, 2023). SOCE shuningdek, astma kabi nafas olish kasalliklarida ham ishtirok etadi. Yaqinda o‘tkazilgan tadqiqotlar shuni ko‘rsatdiki, jismoniy mashqlar astmatik kalamushlarda IL-4 sekreitsiyasini va depo tomonidan boshqariladigan kaltsiy kirishini ingibirlash

orqali nafas yo'llarining silliq mushaklarining qisqarishini kamaytiradi (Huang va boshq., 2023).

Yaqinda o'tkazilgan tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, SOCE komponentlari ORAI1 va STIM1 ekspressiyasi saraton hujayralarining ko'p turlarida yuqori darajada oshadi, bu esa kaltsiyga bog'liq hujayra jarayonlarini, masalan, invazivlik, proliferatsiya va migratsiyani tezlashtiradi va kuchaytiradi.

Tadqiqotning dissertatsiya bajarilgan ilmiy-tadqiqot muassasining ilmiy-tadqiqot rejalari bilan bog'liqligi. Dissertatsiya tadqiqoti O'zbekiston Milliy universiteti huzuridagi Biofizika va biokimyo instituti ilmiy-tadqiqot ishlari rejasining F-OT-2021-157 "Hujayra hajm boshqarilish tizimining normal va rak hujayralari proliferatsiya va o'limidagi roli va uning farmakologiyasi" va Jahon banki MUNIS REPning "Ishemiya/reperfuzya shikastlanishi va yurakning patologik gipertrofiyasida VRAC va CRAC ion kanallari yangi farmakologik nishon sifatida" xalqaro grant doirasida bajarilgan.

Tadqiqotning maqsadi: VRAC, CRAC (SOCE) ion kanallari va kaltsiy bilan faollashuvchi K^+ kanallarining yurak-qon tomir tizimi va saraton kasalligining patogenezini rivojlanishidagi rolini o'rganishdan iborat.

Tadqiqot vazifalari:

ishemik insult jarayonida astrositlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni patologik chiqarishda VRAC rolini o'rganish;

miyokard infarktining *ex vivo* modelida global ishemiyadan keyin yurak ishemiya-reperfuzyon shikastlanishida VRAC rolini o'rganish;

ingibitorlar, RNK-interferentsiyasi va over-ekspressiya yordamida endotelial hujayralardagi depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishining molekulyar tabiatini o'rganish;

depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi rolini qon tomir silliq mushak hujayralarida tinchlik holati va proliferativ fenotipga patologik o'tish jarayonida o'rganish.

depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi va kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy transporti rolini inson multiform glioblastomasida o'rganish;

depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi rolini ko'krak bezi saratoni hujayralarida estrogen retseptorlari mavjudligi yoki yo'qligiga bog'liq holda o'rganish.

Tadqiqot ob'ektlari. HUVEC va HPAEC endotelial hujayralari, RBL-2H3 kalamush bazofil limfomasi, A7r5 qon tomir silliq mushak hujayralari, ko'krak saratoni MCF 10A, 184A1, MDA-MB231, BT-20, HCC 1937, HCC 150, BT-47, T47D, ZR-75-1 hujayralari, miya saratoni U251 MG, U87 MG hujayralari, GBM1, GBM8 birlamchi glioblastoma hujayralari, HPA birlamchi inson astrositlari.

Tadqiqot predmeti. 1) shishgan kalamush astrositlari va kalamush yuragi ishemik-reperfuzyon shikastlanishida VRACning biofizikaviy va farmakologik xossalari; 2) endotelial, qon tomir silliq mushak, ko'krak bezi va miya saratoni patogenezini hujayralarida depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishining biofizikaviy, farmakologik xususiyatlari va molekulyar asoslari.

Tadqiqot usullari. Tadqiqotni o'tkazish uchun quyidagi usullar qo'llanildi: 1) elektrofiziologiya ("butun hujayra" konfiguratsiyasidagi patch-clamp usuli); 2) flyuorescent kaltsiy tasvirlash; 3) real vaqt rejimidagi PZR; 4) Western blot; 5) shishgan astrositlardan radiobelgilangan aspartatning chiqarilishini o'lchash; 6)

RNK interferensiyasi; 7) hujayra proliferatsiyasi va migratsiyasi tahlillari; 8) saraton hujayralarining invazivligini tahlil qilish; 9) Langendorff usulida izolyatsiyalangan yurak retrograd perfuziyasi.

Dissertatsiya tadqiqotining ilmiy yangiligi quyidagilardan iborat:

VRAC, CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR va MDR-1 shishgan astrositlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarish yo'liga nomzod sifatida sinovdan o'tkazildi. Selektiv VRAC blokatori bo'lgan DCPIB yordamida VRAC kanali shishgan astrositlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarishning asosiy yo'li sifatida aniqlandi. Ishemik insultdan keyin shishgan astrositlardan glutamat chiqishi neyronlarning shikastlanishi bilan bog'liq bo'lganligi sababli, bu topilma ishemik insult oqibatlarini davolash uchun yangi farmakologik davolash usullarini ishlab chiqish uchun muhimdir;

VRAC ingibitori tamoksifen miyokard infarktining *ex vivo* modelida kalamushlarda global yurak ishemiyasidan so'ng ishemiya-reperfuziya shikastlanishini (IRSh) kamaytirishi aniqlandi, va bu IRSh rivojlanishida VRAC kanallarining rolini ko'rsatadi. Antiestrogen tamoksifen tibbiy amaliyotda rixsat etilgan bo'lib, yurak ishemik kasalligi va miokard infarktini davolashda perspektiv bo'lishi mumkin;

ilk marotaba CRAC kanallari hujayra proliferatsiyasi va migratsiyasi uchun muhim bo'lgan endotelial va silliq mushak hujayralarida depo-faollashtirilgan kaltsiyni kiritish vositachilari sifatida aniqlandi. Ushbu hujayralardagi CRAC kanallari Gd^{3+} va 2-APB ning yuqori dozalari bilan bloklangan, shuningdek, CRAC kanallarining odatiy xususiyati bo'lgan 2-APB ning past dozalari bilan kuchaytirilgan. Bundan tashqari, Orai1 va STIM1 ning RNK-interferensiyasi CRAC oqimlarini va depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishini sezilarli darajada kamaytirdi;

STIM1 va Orai1 birinchi marotaba bemorlarning jarrohlik namunalaridan yaratilgan ikkita birlamchi GBM hujayra liniyasida SOCE va CRAC ning muhim komponentlari sifatida aniqlandi; ilk marotaba STIM1 va Orai1 hujayra proliferatsiyasiga minimal ta'sir ko'rsatgan holda GBM hujayralari invazivligini regulatsiyasida muhim rol o'ynashi ko'rsatildi;

ilk marotaba kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanallari BK, IK1 glioma hujayralari U251, U87 va birlamchi GBM hujayralarida funktsional ravishda ekspressiyalangan aniqlandi. BK kanalining ingibitorlari Penitrem A va paxillin, va shuningdek, IK1 blokatorlari TRAM-34 va klotrimazol yuqori konsentratsiyalarda glioma hujayra liniyalari va birlamchi GBM hujayralarining ko'payish tezligini sezilarli darajada kamaytirdi. U251 hujayralarida RNK-interferensiyasi yordamida BK va IK1 ekspressiyasini kamaytirish elektrofizyologik tajribalarda kaliy oqimlarini sezilarli darajada pasaytirishi ko'rsatildi, ammo proliferatsiyaga hech qanday ta'sir ko'rsatmadi;

birinchi marta ko'krak bezi saratoni hujayralarida depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi estrogen retseptorlari mavjud bo'lganda STIM1/2 va Orai3 oqsillari vositasida amalga oshirilishi, ammo estrogen resteptorlari yo'q bo'lganda bu yo'l kanonik STIM1/Orai1 tomonidan kodlanadi.

Tadqiqotning amaliy natijalari quyidagilardan iborat:

Miya ishemiyasi jarayonida astrositlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarilishining asosiy transport yo'li sifatida VRAC hajmga bog'liq anion kanalini aniqlash ushbu kanalning selektiv inhibitorlarini ishemik insultni davolash uchun yangi istiqbolli farmakologik vositalar sifatida ko'rib chiqishga imkon beradi. Tibbiyotda foydalanish uchun ruxsat berilgan tamoksifen bu borada ayniqsa istiqbollidir.

VRAC kanali blokatori tamoksifenning yurak ishemiya-reperfuzion shikastlanishiga aniqlangan ijobiy ta'siri mazkur antiestrogeni yurak tomirlari kasalligi va miokard infarkti bo'lgan bemorlarni davolashda istiqbolli farmakologik vosita sifatida qaralishiga imkon beradi.

CRAC orqali kaltsiyning endotelial va silliq mushak hujayralariga, shuningdek, ko'krak va miya saratoni hujayralariga kirish jarayonida asosiy molekulyar nishonlarni aniqlanishi saraton va yurak-qon tomir kasalliklari bilan og'rigan bemorlarni davolash uchun yuqori samarali va minimal nojo'ya ta'sirga ega yangi farmakologik vositalarni kashf etishga imkon yaratadi.

Tadqiqot natijalarining ishonchliligi. Dissertatsiyada keltirilgan tadqiqotlar elektrofiziologiya, mikroskopiya, hujayra kulturalari va molekulyar biologiyaning zamonaviy usullaridan foydalangan holda amalga oshirildi, SCOPUS ma'lumotlar bazasining yuqori impakt faktorli Q1 jurnallarida chop etildi va 1100 dan ortiq iqtiboslarga ega.

Tadqiqot natijalarining ilmiy va amaliy ahamiyati. Shishgan astrositlardan glutamatning sitotoksik chiqarilishi VRAC orqali sodir bo'lishini ko'rsatilishi ishemik insult bilan og'rigan bemorlarni davolash uchun yangi farmakologik usullarni ishlab chiqishga imkon beradi. Dissertatsiyada keltirilgan tajribalar shuni ko'rsatadiki, ko'krak bezi saratoni bilan og'rigan bemorlarni farmakologik davolashda qo'llaniladigan tibbiyotda ma'lum bo'lgan tamoksifen preparati global ishemiyadan keyin yurakning ishemiya-reperfuzion shikastlanishini kamaytiradi, demak, ushbu preparatni miyokard infarkti bo'lgan bemorlarni davolashda qo'llash imkonini beradi. Depo-faollashtirilgan kaltsiyning endoteliyga kirishining tabiatini aniqlash bo'yicha tadqiqotlar qon tomirlarining qisqarishi va bo'shshishi mexanizmlarini tushunishga va gipertenziyani davolash uchun yangi dorilarni ishlab chiqishga yordam beradi.

Tomirlarning patologik proliferativ silliq mushak hujayralarida SOCening sezilarli darajada ko'payishi farmakologik vositalar yordamida patologiyada ushbu hujayralarning proliferativ potentsialini kamaytirishga va ularning qisqarishini yaxshilashga yordam beradi. Kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanali ingibitorlari saraton hujayralari proliofrasiyasini kamaytirishining aniqlanishi rak patologiyasi bilan kurash strategiyasini ishlab chiqishda muhim ahamiyatga ega.

Tadqiqot natijalarining joriy qilinishi. Yurak-qon tomir va saraton kasalliklari patogenezida ion kanallarining rolini aniqlash bo'yicha olingan ilmiy natijalar asosida:

VRAC kanalini shishgan astrositlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarishning asosiy yo'li sifatida aniqlashga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo'lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida miya ishemiyasida astrotistlar

metabolizmini tadqiq qilishda, epilepsiyadagi astrotsitlar rolini aniqlashda va leykoentsefalopatiya mexanizmlarini tahlilida (*Nature Neuroscience* (2007), 10(11), 1377-1386, IF – 25,0; *Neuron* (2008), 58 (2), 168-178), IF – 16,2; *Lancet Neurology* (2012), 11 (11), 973-985, IF – 48,0) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish astrotsitlar patofiziologiyasida VRAC kanalining ishtirokini tavsiflash imkonini bergan;

endotelial hujayralarning ko‘payishi va migratsiyasi uchun muhim bo‘lgan hujayra ichidagi zaxiralarning bo‘shashiga javoban kaltsiyning hujayra ichiga kirishining asosiy yo‘li sifatida CRAClarni aniqlashga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo‘lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida TRP kanallarining qon tomir tizimidagi rolini tavsiflashda, SPCA2 orqali Orail oqsilining ko‘krak bezi saratonida faollanishini aniqlashda, endogen TRPC kanali selektivligida Orail oqsilining rolini tadqiqida (*Physiological reviews*, (2015), 95(2), 645-690, IF – 33,6; *Cell* (2010), 143(1), 84-98, IF 64,5; *Circulation research* (2012), 110(11), 1435-1444, IF – 20,1) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish depo-faollashtirilgan kaltsiyning endoteliyga kirishi jarayonida CRAC kanalining rolini batafsil tahlil qilish imkonini berdi;

silliqliq mushak hujayralarining ko‘payishi va migratsiyasi uchun muhim bo‘lgan hujayra ichidagi depolarlarning bo‘shashiga javoban CRAClarni kaltsiyga kirish vositachisi sifatida aniqlashga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo‘lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida hujayra migratsiyasida ion kanallarining rolini tavsiflashda, ORAI2 oqsilining T-hujayralarga bog‘liq immunitetdagi rolini aniqlashda, STIM1 signallash tizimining yo‘naltirilgan hujayra migratsiyasida faolligini o‘rganishda (*Physiological reviews* (2012), 92(4), 1865-1913, IF – 33,6; *Nature Communications* (2017), 8(1), 14714, IF – 16,6; *Nature Cell Biology* (2012), 16(2), 133-144, IF – 21,3) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish depo-faollashtirilgan kaltsiyning qon tomir sillikliq mushaklariga kirishi jarayonida CRAC kanalining rolini batafsil tahlil qilish imkonini berdi;

miya saratoni hujayralarida va multiformali glioblastoma bemorlarining birlamchi kulturalaridagi CRACni tavsiflashga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo‘lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida ion kanallarining saratondagi rolini tavsiflashda, rak terapiyasini kaltsiy signallariga qaratish zaruratida, CRAC kanallarining fiziologik funksiyalarini ta’riflashda (*Physiological Reviews* (2018), 98(2), 559-621, IF – 33,6; *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2017), 7(1), 3-17, IF – 14,5; *Annual Review of Physiology* (2022), 84, 355-379, IF – 18,2) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish miya saratoni patogenezing sxemasini va undagi CRAC kanalining rolini tuzishga imkon berdi;

ORAI3ni ko‘krak bezi saratoni hujayralarida SOCEning molekulyar komponenti sifatida aniqlashga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo‘lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida saraton va kaltsiy signallashning bog‘liqligini aniqlashda, STIM oqsillarining kaltsiy signallarini uzatilishida ishtirokida va mazkur oqsillarning prostata saratonidagi rolini ta’riflashda (*Nature Reviews Cancer* (2017), 17(6), 373-380, IF – 78,5; *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012), 13(9), 549-565, IF – 112,7; *Cancer Cell* (2014), 26(1), 19-32, IF – 50,3) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish ko‘krak bezi saratoni patogenezingda

kaltsiyning depo-faollashtirilgan kaltsiyning kirishi jarayonida CRAC kanalining rolini batafsil molekulyar tavsiflash imkonini berdi;

miya saratoni hujayralarining ko‘payishida kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanallarining rolini o‘rganishga oid natijalardan impakt faktorli yuqori bo‘lgan xorijiy ilmiy jurnal maqolalarida kanallarning metastazdagi rolini tavsiflashda, kaliy kanallarining glioblastoma infiltratsiyasi va ximioirezistentligidagi ishtirokini aniqlashda (*Molecular Cancer* (2017), 16, 1-10, IF – 41,4; *Cell Death & Disease* (2013), 4(8), e773-e773, IF – 9,0; *Journal of Cellular Physiology* (2018), 233(9), 6866-6877, IF – 5,6) foydalanilgan. Ilmiy natijalardan foydalanish miya saratoni hujayralarining bo‘linishida glia kanallarining roli bo‘yicha adabiyotdagi kelishmovchiliklarni tushuntirishga imkon berdi.

Tadqiqot natijalarining aprobatyasi. Tadqiqot natijalari 1 ta xalqaro va 11 ta milliy ilmiy-amaliy anjumanlarda muhokama qilindi.

Tadqiqot natijalarining e‘lon qilinganligi. Dissertatsiya mavzusi bo‘yicha 24 ta ilmiy ish chop etilgan. Shundan 12 ta ilmiy maqola, jumladan 1 tasi mahalliy va 11 tasi 1-chorak xalqaro jurnallarida SCOPUS ma‘lumotlar bazasiga kiritilgan, O‘zbekiston Respublikasi Oliy attestatsiya komissiyasi tomonidan doktorlik dissertatsiyalarining asosiy ilmiy natijalarini chop etish uchun tavsiya etilgan.

Dissertatsiyaning tuzilishi va hajmi. Dissertatsiya kirish, besh bob, xulosa va foydalanilgan adabiyotlar ro‘yxatidan iborat. Dissertatsiya hajmi 209 bet.

DISSERTASINING ASOSIY MAZMUNI

Dissertatsiyaning **kirish qismi** dissertatsiya mavzusining dolzarbligi va zarurligini asoslaydi, tadqiqotning respublika fan va texnologiya rivojlanishining ustuvor yo‘nalishlariga muvofiqligini ko‘rsatadi, tadqiqotning maqsad va vazifalarini, tadqiqot ob‘ekti va predmetini tavsiflaydi, muammoni bilish darajasini, tadqiqotning ilmiy yangiligi va amaliy natijalarini belgilaydi, olingan natijalarning ishonchligi haqida ma‘lumot beradi, nashr etilgan ishlar asosida tadqiqot natijalarini amaliyotga tatbiq etadi.

Dissertatsiyaning “**Ion channels in cardiovascular diseases and cancer**” deb nomlangan birinchi bobida yurak-qon tomir kasalliklari va saraton patogenezida ion kanallarining roli haqidagi adabiyotlar ko‘rib chiqiladi. Hajmga bog‘liq anion kanali (VRAC), kaltsiyning hujayra ichidagi dipoldardan (CRAC) chiqarilishi bilan faollashtirilgan kaltsiy kanallari va kaltsiyga bog‘liq kaliy kanallarining tuzilmalari va faollashuv mexanizmlarini tavsiflaydi.

Dissertatsiyaning “**Cells, materials and methods**” deb nomlangan ikkinchi bobida hujayra kulturalari va materiallari ro‘yxati hamda dissertatsiyada qo‘llaniladigan usullarning batafsil tavsifi berilgan. Tajribalarda qo‘llaniladigan usullar tasvirlangan, masalan, 1) elektrofiziologiya (“butun hujayra” konfiguratsiyasidagi patch-clamp); 2) lyuminesstent kaltsiy tasviri; 3) real vaqt rejimida PCR; 4) Western blot; 5) shishgan astrositlardan radiobelgilangan aspartatning chiqarilishini o‘lchash; 6) RNK interferensiyasi; 7) hujayra proliferatsiyasi va migratsiya tahlillari; 8) Matrigelda hujayra invazivligini tahlil qilish; va 9) Langendorff retrograd yurak perfuziyasi.

Dissertatsiyaning “**The role of VRACs in ischemic stroke and myocardial infarction**” deb nomlangan uchinchi bobida ishemik insult va miokard infarktida VRAC kanallarining roli ko‘rib chiqiladi.

Sichqon astrositlarida hajmga bog‘liq bo‘lgan glutamat chiqishi va xlorid oqimini farmakologik taqqoslash.

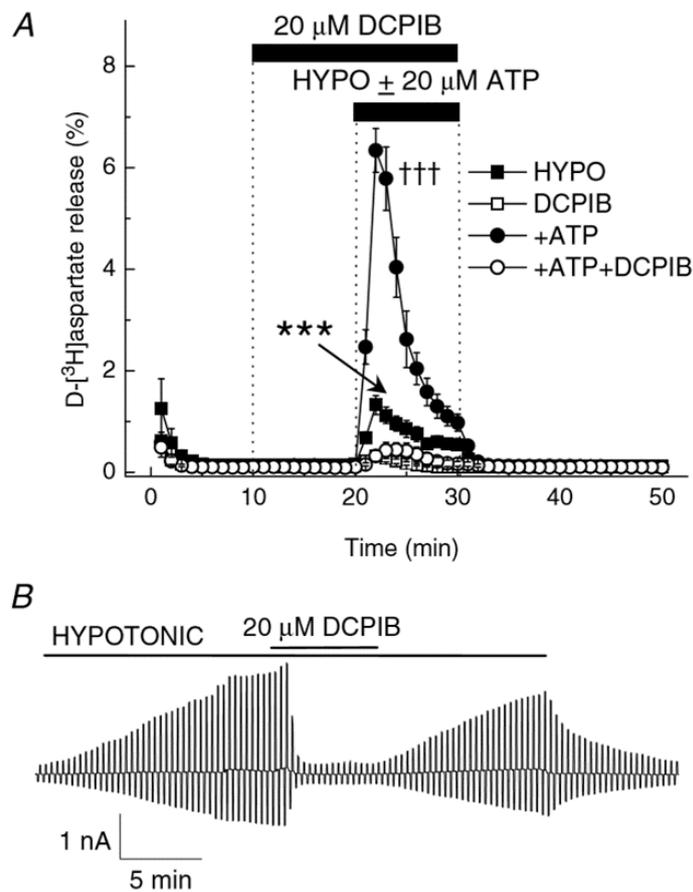
Shish bilan faollashtirilgan organik osmolit o‘tkazuvchanlik yo‘llari hozirgi kungacha o‘rganilgan eukaryotik hujayra turlarining aksariyatida mavjud. Ushbu yo‘llar hujayra hajmini tartibga solish, apoptoz, organik erituvchilarni tashish va biofaol organik moddalarni chiqarish orqali hujayralararo aloqani o‘z ichiga olgan ko‘plab hujayra funksiyalarida potentsial ishtirok etadi.

Ba‘zi miya patologiyalari, masalan, ishemiya, giponatremiya va travmatik miya shikastlanishi, asosan astrositlarda kuzatiladigan aniq hujayra shishishi bilan bog‘liq. Hujayra shishishi astrositlar kulturalarida glutamat va aspartat qo‘zg‘atuvchi aminokislotalar chiqarilishini faollashtirishi ko‘rsatilgan. Miyada qo‘zg‘atuvchi aminokislotalar glutamat retseptorlarini haddan tashqari faollashtirish orqali neyron hujayralarining shikastlanishiga hissa qo‘shishi mumkin.

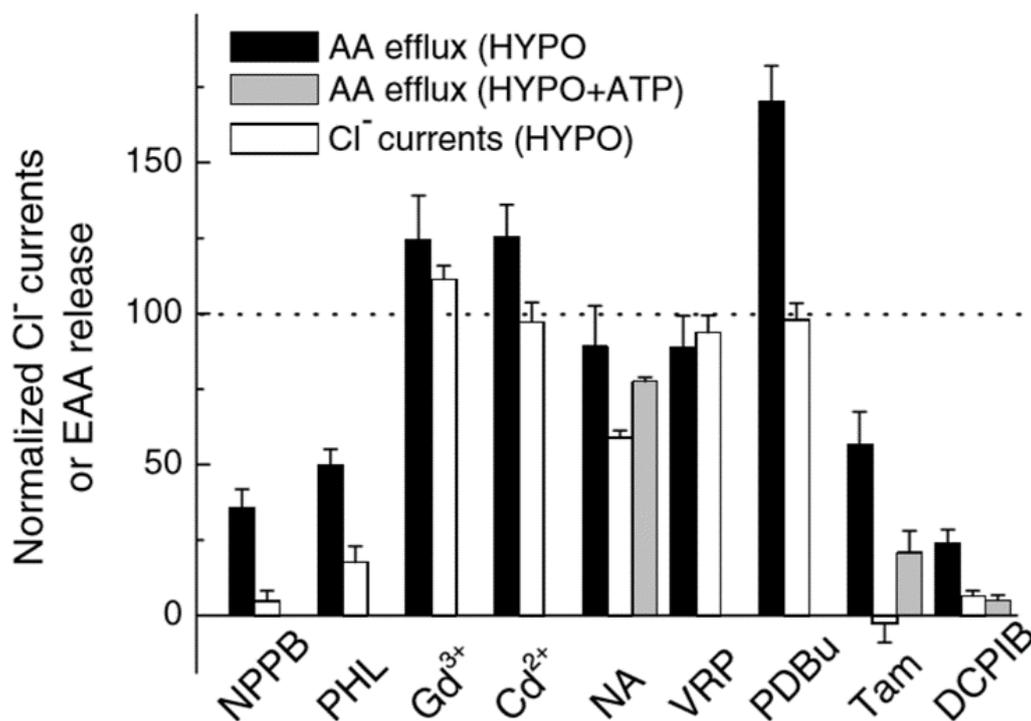
Organik osmolitlarning shishishi bilan faollashtirilgan chiqarilishining gipotetik yo‘llaridan biri bu hamma joyda ekspressiyalangan hajm bilan boshqariladigan anion kanali (VRAC) dir, u hujayra shishishi bilan faollashadi va turli noorganik hamda kichik organik anionlar, shu jumladan taurin, glutamat va aspartat aminokislotalari uchun o‘tkazuvchan hisoblanadi. Ushbu tadqiqotda birinchi marta shishgan astrositlardan belgilangan aspartatning chiqishi selektiv VRAC blokatori DCPIB tomonidan bloklanganligini ko‘rsatadi. Shishgan astrositlardan belgilangan aspartatning chiqishi 20 mkM ATF qo‘llash orqali kuchaytirilganda blokator effekti saqlanib qoldi (1-rasm).

CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC va MDR-1 kabi boshqa kanallar va tashuvchilardan ham organik osmolitlardan o‘tishi mumkin yoki VRACda o‘tishi qo‘llab quvvatlashi mumkin. 2-rasmdan ko‘rinib turibdiki, ekilgan kalamush astrositlarida shishish bilan faollashtirilgan xlorid oqimlari va qo‘zg‘atuvchi aminokislotalarning ajralib chiqishi o‘xshash farmakologik profilga ega. Xususan, yaqinda tavsiflangan selektiv VRAC blokatori DCPIB organik osmolitlarning hajmga bog‘liq bo‘lgan VRAC oqimlarini butunlay ingibirladi.

Boshqa Cl-kanal ingibitorlari bilan olingan ma‘lumotlar DCPIB selektivligi g‘oyasiga mos keladi va CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR va MDR-1 ning shishgan hujayralardan organik osmolitni chiqarishga qo‘shgan hissasini istisno qiladi. Shunday qilib, VRAC organik osmolitlarni chiqarish uchun asosiy nomzod yo‘lidir degan xulosaga kelish mumkin. Bundan tashqari, DCPIB VRAC ning in vivo va in vitro organik osmolitlarning fiziologik va patologik chiqarilishiga qo‘shgan hissasini o‘rganish uchun qimmatli vositadir. Xuddi shu natija zimozan tomonidan faollashtirilgandan so‘ng miya mikrogliazidan aspartatning chiqarilishini o‘rganishda ham olingan.



1-rasm. Selektiv VRAC blokatori DCPIB VRAC oqimlarini va astrositlar shishishi bilan faollashtirilgan d-[3H]aspartat chiqarilishini ingibirlanishi. A, 20 mkM DCPIB ning 20 mkM ATP mavjudligi yoki yo'qligida shishish bilan faollashtirilgan d-[3H] aspartat chiqarilishiga ta'siri. Hujayralar DCPIB borligida (\square , \circ) yoki yo'qligida (\blacksquare , $-$) ko'rsatilgandek 10 daqiqa davomida gipoosmotik muhitga ta'siri. B, 20 mkM DCPIB ning shishish bilan faollashtirilgan xlorid oqimlariga ta'siri.



2-rasm. Kultural kalamush astrositlarida shishish bilan faollashtirilgan aminokislotalarning ajralib chiqishi va xlorid oqimlariga turli ingibitorlarining ta'siri. Normallashtirilgan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarish qiymatlari sinovdan o'tgan barcha ingibitorlar ishtirokida normallashtirilgan VRAC oqimlari yonida ko'rsatiladi. PHL - floretin; NA - niflum kislotasi; VRP - verapamil; Tam - tamoksifen.

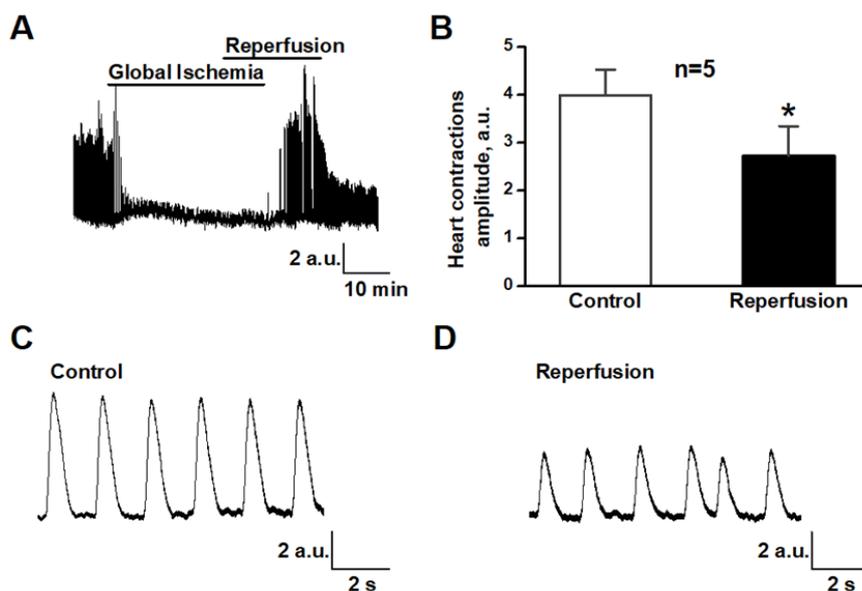
Miokard infarktida yurakning ishemiya-reperfuzion shikastlanishida VRAC ning roli. Miyokard ishemiyasi-reperfuzion shikastlanish (MIRI) miyokard infarkti vaqtida bloklangan koronar arteriyalar to'satdan reperfuziya qilinganida yuzaga keladi. Bunday yurak shikastlanishi patologik jarayonlarning murakkab kaskadining natijasidir. IRPMga olib keladigan patologik jarayonlar ishemiya bilan zaiflashgan kardiomyositlarni kislorod bilan ta'minlashni to'satdan tiklash bilan qo'zg'atiladi. Bu kislorodli erkin radikallar va hujayra ichidagi kaltsiyning ko'p miqdorda to'planishiga olib keladi, bu kardiomyositlarga qo'shimcha stress, ularning shishishi, qisqarish funksiyasini yo'qotishi va kaltsiyga bog'liq apoptozning boshlanishiga olib kelishi mumkin. IRI rivojlanishida ion kanallarining roli hali ham yaxshi o'rganilmagan soha bo'lib qolmoqda. Hajmga bog'liq anion kanali deyarli barcha hujayra turlarida, shu jumladan kardiomyositlarda ekspressiyalanadi va hajmi tartibga solish, apoptoz, proliferatsiya va migratsiya kabi ko'plab hujayra jarayonlarida rol o'ynaydi. VRAC hujayra shishishi bilan faollashadi, erkin kislorod radikallari bilan kuchayadi va apoptoz rivojlanishida ishtirok etadi. Shunday qilib, VRAC yurak ishemiyasi-reperfuziya shikastlanishining rivojlanishida rol o'ynashi mumkin.

38°C gacha qizdirilgan kislorodli Tyrode eritmasi bilan uzluksiz retrograd perfuziya paytida kalamush yuragida muntazam yurak urishi o'rnatilgandan so'ng, yurak qisqarishining to'xtashiga olib keladigan perfuzioning to'xtatilishi tufayli

global ishemiya paydo bo'ldi (3A, B-rasm). 30 daqiqadan so'ng reperfuziya global ishemiyadan oldingi nazorat bilan solishtirganda, ularning amplitudasining sezilarli pasayishi bilan yurak qisqarishlarining tiklanishiga olib keldi (nazoratning $66\% \pm 7\%$, $n = 5$, $p < 0,005$). Yurak qisqarishlari amplitudasining bu pasayishi yurakning qisqarish funksiyasi buzilganligining xarakterli ko'rsatkichidir.

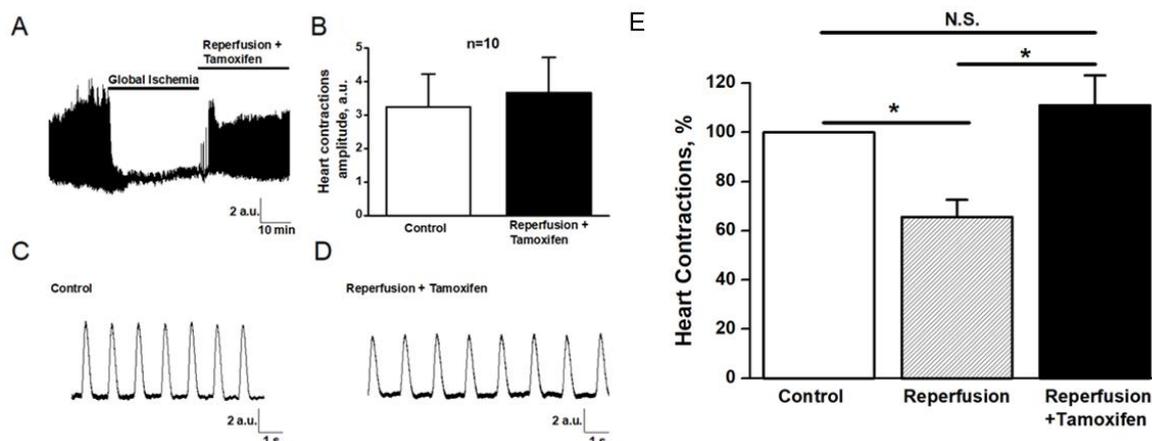
Keyingi tajribada, 30 daqiqalik global ishemiyadan keyin, doimiy qisqarishlarni o'rnatgandan so'ng (4-rasm) yurak 100 mkM tamoksifen ishtirokida reperfuziya qilindi, bu ishemiya-reperfuzion shikastlanishning rivojlanishiga to'sqinlik qildi (4-rasm).

Tamoksifen, onkologiyada keng qo'llaniladigan estrogen retseptorlari ingibitori, turli xil hujayralar, shu jumladan kardiomyositlarda VRAC ning kuchli, o'ziga xos bo'lmagan ingibitoridir. Shunday qilib, tibbiyotda allaqachon ma'lum bo'lgan va qo'llaniladigan tamoksifen preparati miokard infarkti bo'lgan bemorlarni davolashda ishemiya-reperfuzion zararni kamaytirish uchun ishlatilishi mumkin.



3-rasm. Global ishemiyadan so'ng kalamush yurakning ishemiya-reperfuzion shikastlanishi. A, Langendorff retrograd yurak perfuziyasi uchastkasi. B, global ishemiyadan oldin (nazorat) va keyin (reperfuziya) yurak tezligini taqqoslash. $n=5$, $*$, $p < 0,01$. C va D global ishemiyadan oldin yurak urish tezligi amplitudasi.

Dissertatsiyaning to'rtinchi bobi, “**CRACs in vasculature**” birinchi bo'lib ORAI1 kaltsiy kanali va STIM1 kaltsiy sensori endotelial va silliq mushak hujayralarida depoga bog'liq kaltsiy oqimining muhim komponentlari sifatida aniqlangan tadqiqotlarni tavsiflaydi.



4-rasm. Tamoksifen ishtirokida reperfuziya yurakning ishemiya-reperfuzion shikastlanishining rivojlanishiga to'sqinlik qilishi. A, Langendorff retrograd yurak perfuziyasi uchastkasi. B, global ishemiyadan oldin (nazorat) va keyin (reperfuziya + tamoksifen) yurak tezligini taqqoslash. n=10. C va D - tamoksifen ishtirokida reperfuziya bilan global ishemiyadan oldin va keyin yurak qisqarishining amplitudasi. E, Tamoksifenning yurak ishemiyasi-reperfuzion shikastlanishiga ta'sirining statistik tahlili.

Depoda ishlaydigan kaltsiy (Ca^{2+}) kirishi (SOCE) hujayralarga Ca^{2+} oqimini tartibga solish uchun keng tarqalgan va hamma joyda mavjud mexanizmdir.

Deyarli barcha hujayra turlarida endoplazmatik retikulum (ER) Ca^{2+} ning sarkoplazmatik/ER Ca^{2+} -ATPaza ingibitorlari, masalan, tapsigargin tomonidan kamayishi SOCE ni faollashtiradi. Fiziologik sharoitda SOCE inozitol 1,4,5-trisfosfat (IP3) vositachiligida ER Ca^{2+} fosfolipazasi C bilan bog'langan retseptorlari orqali ta'sir qiluvchi turli ogohlantirishlarga javoban kamayishi bilan boshlanadi. Eng yaxshi tavsiflangan SOC oqimi Ca^{2+} ajralib chiqishi bilan faollashtirilgan Ca^{2+} oqimidir (CRAC), avval kalamush bazofil leykemiya (RBL) semiz hujayralarida xabar qilingan va keyinchalik boshqa hujayra turlarida tasvirlangan. SOCE ERdagi Ca^{2+} ni to'ldirish uchun zarur va ko'plab Ca^{2+} ga bog'liq fiziologik jarayonlarning asosiy regulyatori hisoblanadi. Bir nechta laboratoriyalarda o'tkazilgan RNK-interferentsiyasi ikkita molekulani, STIM1 va Orailni semiz hujayralari, limfotsitlar va HEK293 hujayralarida depoga bog'liq kaltsiy kirishining asosiy komponentlari sifatida aniqladi.

ERda Ca^{2+} kamayganida, Ca^{2+} ga sezgir STIM1 oqsillari plazma membranasiga yaqin joylashadi va u yerda bir nechta nuqtalarga to'planadi. Qizig'i shundaki, Orail molekullari ER kaltsiyining kamayishi bilan bir xil STIM1 o'z ichiga olgan tuzilmalarga o'tadi va u erda Ca^{2+} kirishiga vositachilik qilish uchun ochiladi.

Endotelial hujayralardagi depoga bog'liq kaltsiy oqimi (CRAC). Endotelial ICRAC haqida ma'lumot beradigan tadqiqotlar juda kam uchraydi, bu, ehtimol, oqim zichligining juda pastligi bilan bog'liq (Jurkat yoki RBL hujayralariga qaraganda taxminan 6-10 baravar past. Ko'pgina hujayralar turlarida, xususan,

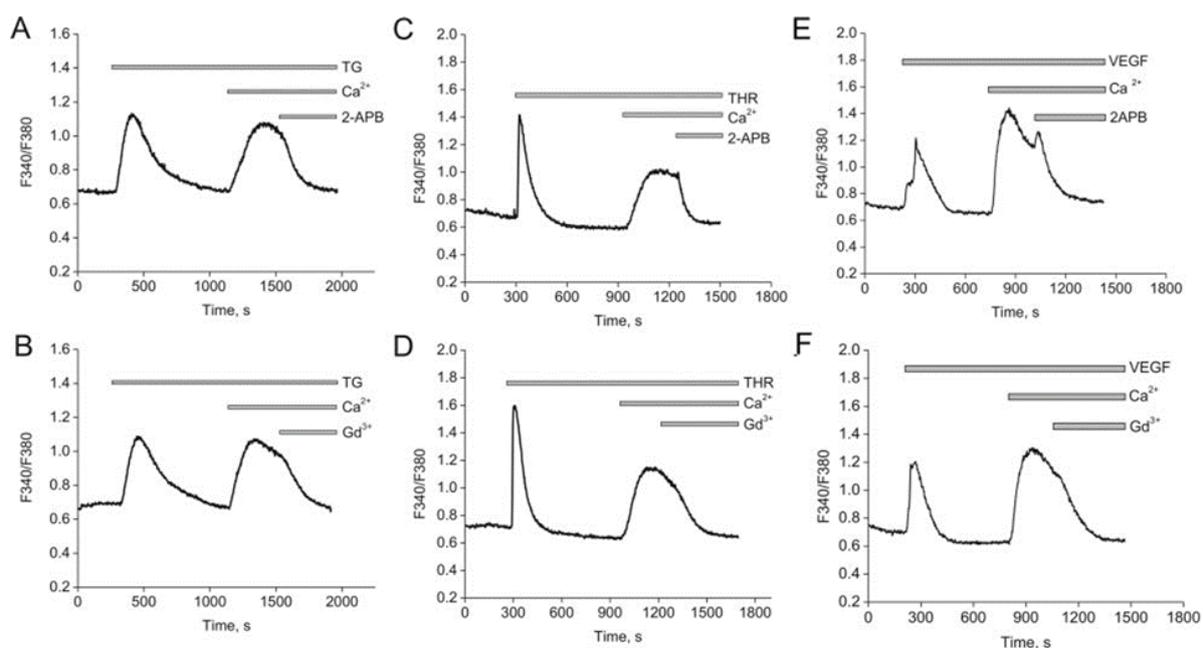
endotelial hujayralarda depo bilan qoplangan kaltsiy kanallarining molekulyar tarkibi saqlanib qoladi va juda munozarali mavzudir.

Bir nechta tadqiqotlar kanonik vaqtinchalik retseptorlar potentsiali (TRPC) yoki TRPC1 a'zolarini endotelial hujayralarda depoga bog'liq kaltsiy oqimi o'tadigan kanallar uchun nomzod sifatida taklif qildi. Biroq, selektiv bo'lmagan TRPC kanallari yuqori kaltsiy-selektiv ICRCn qanday kodlashi aniq emas. Dissertatsiyada RNK-interferentsiyasi TRPC1 va TRPC4 kanallarining ekspressiyasini sezilarli darajada kamaytirgan, depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi va CRAC kanallarida statistik jihatdan sezilarli darajada kamaygan tajribalar natijalari tasvirlangan.

Yaqinda Stim1 va Orai1 semiz hujayralari va limfotsitlarda ICRCning asosiy rol o'ynovchi sifatida kashf etilganligi sababli, ularning endotelial depoga bog'liq kaltsiy oqimidagi ishtiroki va ularning endotelial hujayra proliferatsiyasiga qo'shgan hissasi o'rganildi. 5-rasmdan ko'rinib turibdiki, HUVEC endotelial hujayralarida thapsigargin, trombin yoki VEGF tomonidan hujayra ichidagi depolarda kaltsiyning kamayishi depo-faollashtirilgan kaltsiyning kirishini 30 mkM 2-APB yoki 10 mkM gadoliny tomonidan to'liq ingibirlashga olib keldi. Ushbu farmakologik xususiyatlar Orai1 va Stim1 dan tashkil topgan CRACga xosdir.

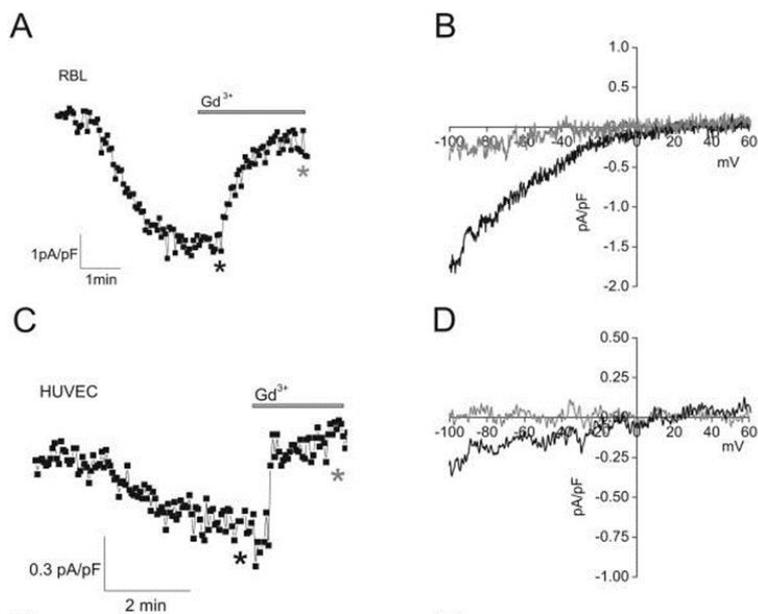
Elektrofiziologik tajribalarda, butun hujayra konfiguratsiyasida hujayra ichidagi depolar kaltsiy xelatatori BAPTA (20µM) tomonidan bo'shatildi, bu esa 2-APB va gadolinyga sezgir bo'lgan kaltsiy oqimlarining sekin faollashishiga olib keldi (6-rasm). Bu oqimlar juda aniq ichki rektifikatsiyaga ega bo'lib, kaltsiy va magniy eritmalarida, aniq tez inaktivatsiyaga ega bo'lgan (ma'lumotlar dissertatsiyada batafsilroq ko'rsatilgan). Ushbu elektrofiziologik va farmakologik xususiyatlar boshqa hujayra turlarida Orai1 va Stim1 tomonidan hosil qilingan kanonik depo-faollashtirilgan kaltsiy kanallariga xosdir.

Keyinchalik, Stim1 va Orai1 ning endotelial hujayralardagi saqlashga bog'liq kaltsiy oqimiga qo'shgan hissasini to'g'ridan-to'g'ri sinab ko'rish uchun Stim1 va Orai1 ning ekspressiyasi RNK-interferentsiyasi bilan buzildi. 7-rasmdan ko'rinib turibdiki, real vaqtda PCR va Western blot tahliliga asoslangan holda, HUVEC endotelial hujayralarining kichik interferent RNK (siRNA) bilan transfeksiyasi endogen mRNK (7A-rasm) va Stim1 va Orai1 oqsillari (7B-rasm) ekspressiyasini keskin bostirdi. Stim1 va Orai1 ekspressiyasining bu tarzda bostirilishi thapsigargin tomonidan ichki depolardagi kaltsiyning kamayishi natijasida depo-faollashtirilgan kaltsiy oqimining keskin pasayishiga olib keldi (7C-rasm). Bundan tashqari, mos keladigan oqsillar siRNK tomonidan o'chirilgan hujayralarda Stim1 va Orai1 ning haddan tashqari ko'payishi depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishining aniq tiklanishiga olib keldi (7D-rasm).

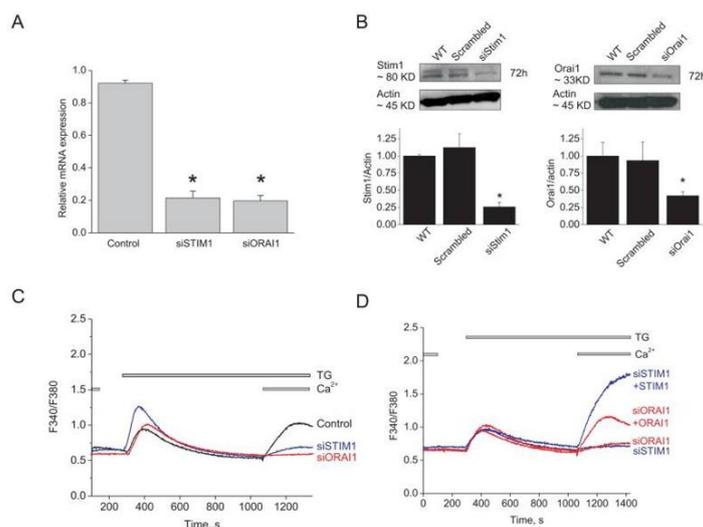


5-rasm. Hujayra ichidagi depolardagi kaltsiyning kamayishi, Orai1 va Stim1 dan tashkil topgan CRACning tipik ingibitorlari 2-APB va gadoliny tomonidan bloklangan depo faollashtirilgan kaltsiy kirishini faollashtirishi. A va B, 2 mkmol/L tapsigargin (TG) bilan hujayra ichidagi kaltsiyning kamayishi CRAC orqali kaltsiyning kirib kelishiga olib keladi va 30 mkmol/L 2-APB (A) va 10 mkmol/L Gd³⁺ (B) tomonidan ingibirlanadi. C va D, trombin (100 nmol / L) CRAC orqali kaltsiy oqimini keltirib chiqaradi va 2-APB (C) va Gd³⁺ (D) ning o'xshash konsentratsiyasi bilan inhibe qilinadi. E va F, shunga o'xshash natijalar VEGF (100 ng / ml) bilan olingan. Har bir paneldagi ma'lumotlar o'rtacha 4-12 hujayradan iborat va kamida 3 ta mustaqil tajribani ifodalaydi.

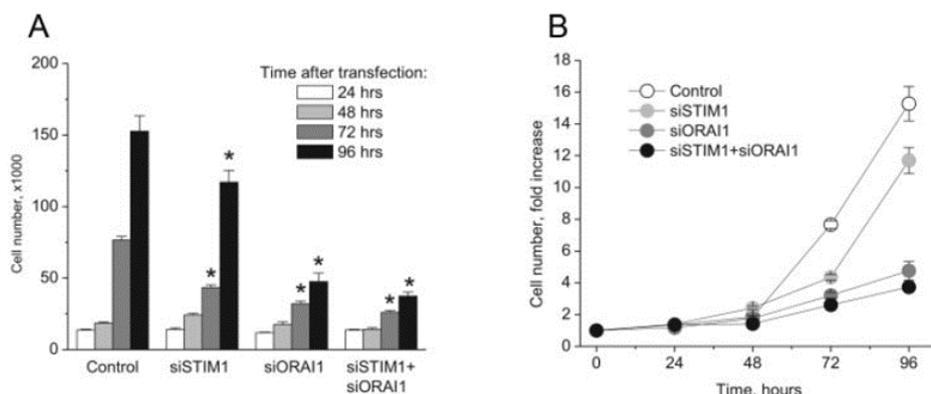
Inson limfotsitlarida depo-faollashtirilgan kaltsiyning kiritilishi antigen retseptorlari stimulyatsiyasiga javoban yagona Ca²⁺ kirishi hisoblanadi va limfotsitlar proliferatsiyasi uchun juda muhimdir. Shu sababli, keyingi tajribalarda Stim1 va Orai1 ning endotelial hujayra proliferatsiyasida ishtirokini sinab ko'rdik. Stim1, Orai1 yoki ikkalasining oqsil parchalanishi oldingi tajribada bo'lgani kabi siRNK yordamida olingan va o'sish muhitida HUVEC proliferatsiyasi o'lik hujayralarni tripan ko'k bo'yash orqali chiqarib tashlaganidan keyin transfeksiyadan keyin 24 soatlik intervalda hujayralarni hisoblash orqali baholangan. 8-rasmda ko'rinib turibdiki, ekilgandan keyin 96 soat o'tgach, Stim1 hujayra proliferatsiyasini 23,3% ± 5,39 ga ingibirlagan, Orai1 esa ancha katta ta'sirga ega (68,8% ± 3,8); Ikkala oqsilni nokdaun qilish faqat Orai1 nokdaunining ta'siriga (75,5% ± 1,7) o'xshash ingibirlovchi ta'sirga olib keldi. Qizig'i shundaki, Orai1 ekspressiyasining pastga regulyatsiyasi hujayra siklining S va G2 / M fazalarida hujayralarning ko'payishiga olib keldi (ma'lumotlar dissertatsiyada batafsil ko'rsatilgan va muhokama qilingan).



6-rasm. HUVEC endotelial hujayralari va RBL kalamush bazoleykemiya hujayralarida ICRAC ning elektrofizyologik xususiyatlari. A va C, mos ravishda RBL va HUVECda BAPTA bilan hujayra ichidagi dializda ICRAC faollashishi. -100 mV dan +60 mV gacha bo'lgan ramplar har 3 soniyada o'lchandi va ma'lumotlar nuqtalari -100 mV da olingan va chizilgan. B, D - mos ravishda A va C yulduzchalar bilan belgilangan vaqt nuqtalarida olingan vakillik ramplari. Qora yulduzchalar - Gd^{3+} dan foydalanishdan oldin; kulrang yulduzchalar - 10 mkmol / L Gd^{3+} qo'llangandan keyin.



7-rasm. Depo-faollashtirilgan kaltsiyning HUVEC endotelial hujayralariga kirishi Stim1 va Orai1 orqali sodir bo'lishi. A, Transfeksiyadan 72 soat o'tgach, Orai1 va Stim1 mRNK ekspressiyasining kamayganligini ko'rsatadigan real vaqtda PCR ma'lumotlari. B: Western blotting va densitometriya RNK-interferentsiyasidan 72 soat o'tgach, Stim1 (chapda) va Orai1 (o'ngda) oqsil ekspressiyasida sezilarli pasayishni ko'rsatadi. C, Stim1 va Orai1 ning ishdan chiqishi tapsigaringa javoban endotelial hujayralarga depo faollashtirilgan kaltsiy kirishini ingibirlaydi. D, Stim1 va Orai1 ning RNKi kamaytirilgan ekspressiyasi bo'lgan hujayralardagi depo bilan faollashtirilgan kaltsiyning kirishi mos ravishda eYFP-Stim1 va CFP-Orai1 ning haddan tashqari ko'payishi bilan tiklanishi mumkin.



8-rasm. Stim1 va Orai1 nokdaunlari HUVEC endotelial hujayra proliferatsiyasini ingibirlashi. A. Hujayralarning to'rtta guruhi: 1) nazorat, 2) Stim1, 3) Orai1 yoki 4) Stim1 + Orai1 siRNK bilan transfeksiya qilindi. 0 vaqtida har bir o'yiqa (9,6 sm²) taxminan 10 000 ta hujayra uch nusxada ekilgan. Belgilangan vaqtda hujayralar ajratildi va tripan ko'k bilan bo'yalgan o'lik hujayralar hisobga olinmagandan so'ng, har bir o'yiqdagi hujayralarning umumiy soni hisoblandi. B. "A" dagi ma'lumotlar 0 vaqtga nisbatan hujayralar sonining marta ko'payishi sifatida taqdim etiladi.

Depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi (Store-operated calcium entry, SOCE) va qon tomirlarining silliq mushak hujayralarida CRAC kanallari. Qon tomirlarning silliq mushak hujayralari (QTSMH) qon tomirlarining asosiy hujayra turlaridan biri bo'lib, ular tomir tonusini nazorat qilish va tomir devorining yaxlitligini saqlashda markaziy rol o'ynaydi. Biz siyanid bilan metabolik inhibitsiyaga, gipoksiya va norepinefrin ta'siriga javoban o'pka arteriyasining silliq mushaklarida hujayra ichidagi kaltsiyning chiqarilishini tasvirlab berdik.

SOCE ning depo-faollashtirilgan kaltsiyga kirishi QTSMH larda uzoq vaqtdan beri tasvirlangan bo'lsa-da, QTSMH funksiyasidagi SOCE ning molekulyar o'ziga xosligi va roli juda bahsli munozaralarga sabab bo'lib qolmoqda. Oldingi tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, kanonik selektiv bo'lmagan kation kanali TRPC1 QTSMH larda tapsigargin bilan faollashtirilgan SOCEda ishtirok etadi.

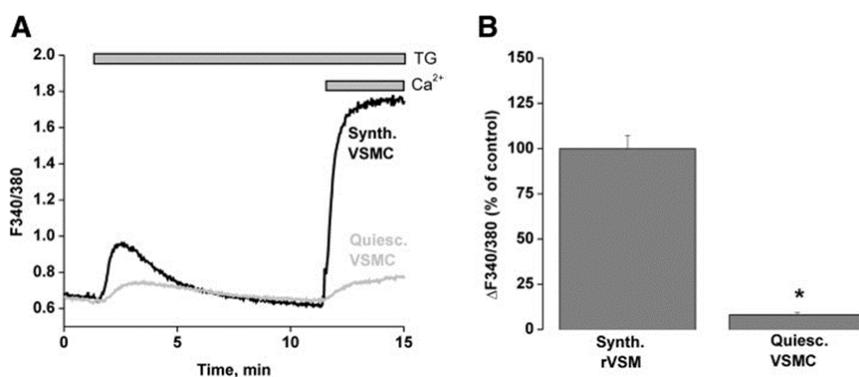
Hujayralarni anti-TRPC1 antikorlari bilan davolashdan so'ng, tapsigargin bilan faollashtirilgan Ca²⁺ oqimining biroz pasayishiga asoslanib, bu xulosa chiqarildi. SOCEda bir xil kichik pasayish TRPC1 ni o'chirgan siRNK bilan transfeksiyadan keyin kuzatildi. Patch-clamp usuli yordamida membrana oqimlari qayd etilgan hollarda, turli guruhlar va turli QTSMH turlari o'rtasida ushbu oqimlarning biofizik va farmakologik xususiyatlarida katta geterogenlik kuzatildi. Bundan tashqari, TRPC1 ning silliq mushak hujayralarida SOCEdagi ishtirokini TRPC1 nokaut sichqonlarining tomir silliq mushak hujayralarida buzilmagan SOCE topilishi bilan tushuntirish qiyin.

QTSMH in vivo qisqaruvchan hujayralar bo'lib, ular qon zardobida o'stirilgan "sintetik" QTSMH lardan farqli o'laroq, proliferativ va ko'chish xususiyatiga ega. Sintetik QTSMH lar ateroskleroz va restenoz kabi patologik qon tomir sharoitlarida kuzatilgan QTSMH larning ko'pgina xususiyatlarini takrorlaydi. In vitro, QTSMH larning tinch fenotipdan proliferativ va ko'chib yuruvchi fenotipga bo'lgan

deferentsiyasi fermentativ dispersiyadan so'ng kulturada taxminan 30 soatdan keyin to'liq amalga oshiriladi.

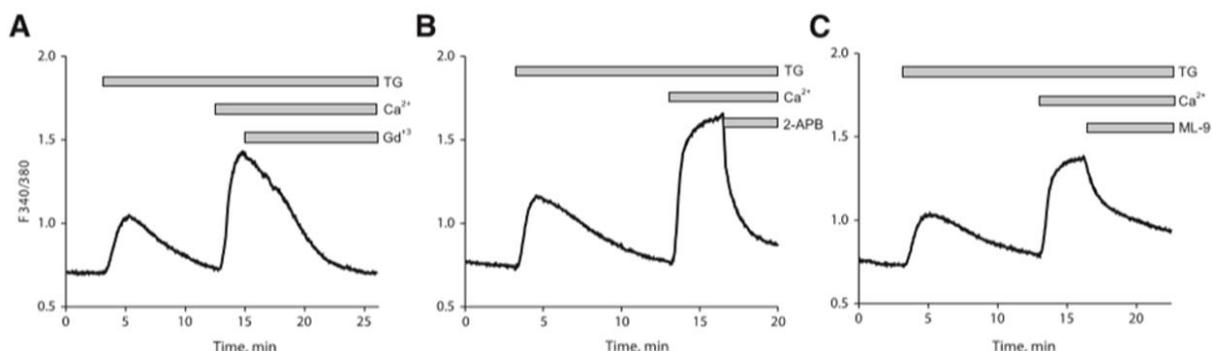
Ushbu dissertatsiyada sintetik kalamush aorta QTSMH larida tapsigargin (2 mkM) tomonidan qo'zg'atilgan SOCE amplitudasi Fura-2 Ca^{2+} tasviridan foydalangan holda yangi tarqalgan kalamush aorta QTSMH larining dam olish amplitudasi bilan taqqoslandi. 9-A,B-rasmda ko'rinib turganidek, SOCE sintetik QTSMH larda yangi tarqalgan QTSMH larga nisbatan sezilarli darajada yuqori edi.

Bu natijalar L-tipli Ca^{2+} kanal ingibitori verapamil (10 mkM) va Na^+ kanal ingibitori tetrodotoksin (0,5 mkM) ishtirokida olingan bo'lib, bu yangi izolyatsiya qilingan QTSMH larda kuzatilgan kichik Ca^{2+} oqimiga membrana depolarizatsiyasining hissasini istisno qiladi. Sintetik QTSMH larda depo-faollashtirilgan kaltsiyning kiritilishi kanonik SOCEga xos farmakologik xususiyatlarga ega edi: u 5 mkM gadoliniy, 50 mkM 2-APB va 50 mkM ML-9 tomonidan ingibirlandi (10-rasm) va Orai1 va Stim1 ishdan chiqqanidan keyin kamaydi (11-rasm). Proliferativ QTSMH larning migratsiyasini tahlil qilish shuni ko'rsatdiki, Orai1 va Stim1 oqsillarining ekspressiyasi RNK-interferentsiyasi bilan kamaygan hujayralar ko'paygan va nazorat hujayralariga qaraganda pastroq tezlikda ko'chib ketgan (12-rasm).

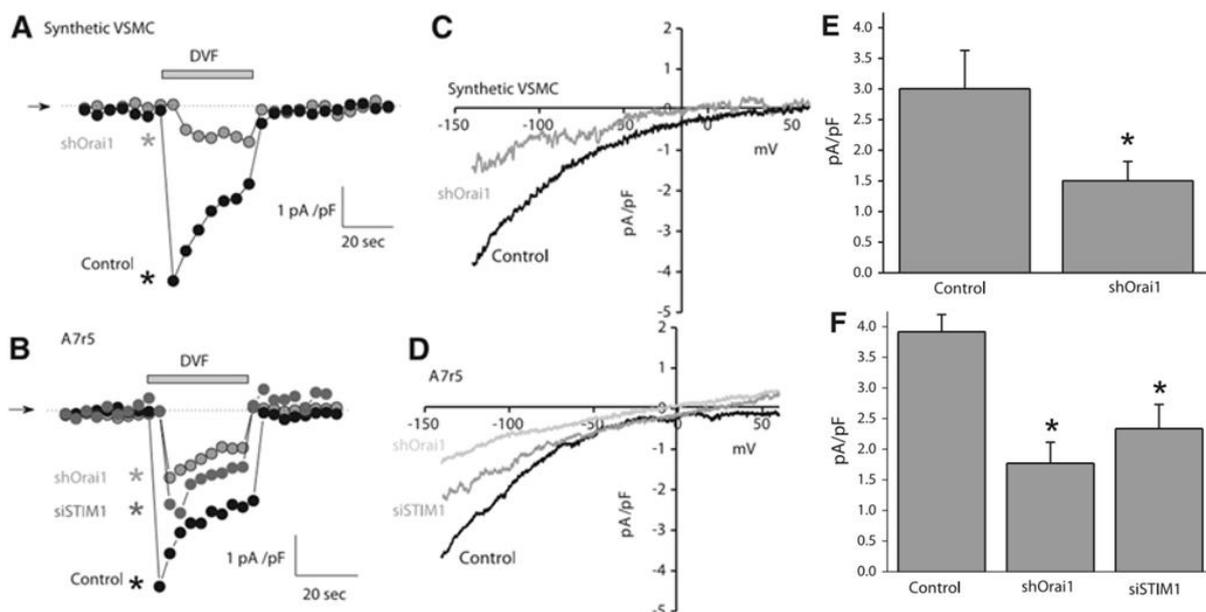


9-rasm. SOCE proliferativ va migratsiyali "sintetik" QTSMH larda ko'payishi.

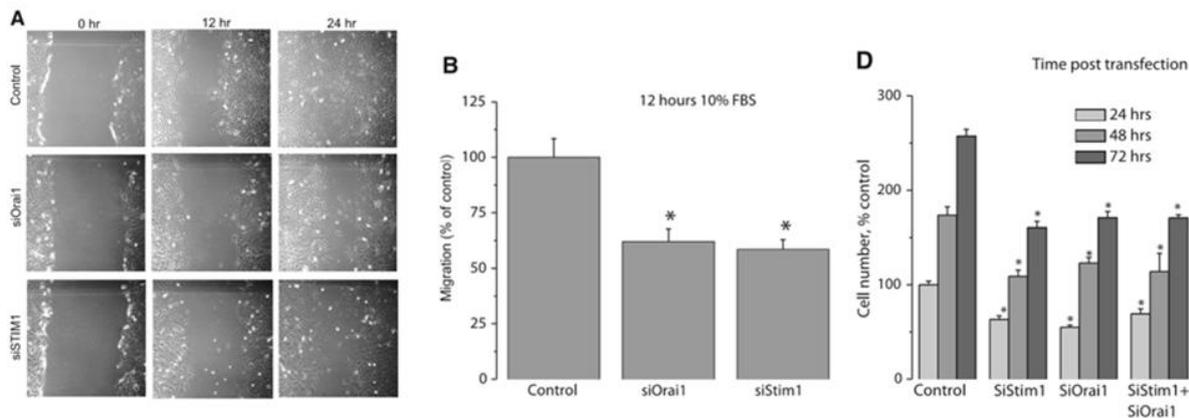
A, B, Tapsigargin (TG) (2 mkM) yangi tarqalgan QTSMH larga qaraganda sintetik QTSMH larda SOCE ni ancha faollashtiradi.



10-rasm. Sintetik QTSMH larda depo faollashtirilgan kaltsiy kirishining xususiyatlari. A) Tapsigargin (TG) (2 mkM) 5 mkM Gd^{3+} (n=72) ga sezgir sintetik QTSMH larda SOCE ni faollashtiradi. B, C) 50 mkM 2-APB (B) (n=49) va 50 mkM ML-9 (C) (n=26) bilan SOCEning o'xshash ingibirlanishiga erishildi.



11-rasm. Orai1 nokdaunti sintetik QTSMH va A7r5 hujayralarida ICRAC ni ingibirlashi. Orai1 ning RNK-interferentsiyasi sintetik QTSMH larda (A, C) kaltsiy va magniysiz eritmalarda qayd etilgan ICRACni ingibirlaydi. Bunday sharoitda ICRAC monovalent kationlarni o'tkazadi va xarakterli tez inaktivatsiyani ko'rsatadi. Shunga o'xshash natijalar A7r5 hujayralarida (B, D) olingan. E, F, Orai1 va Stim1 pastga regulyatsiyasining sintetik QTSMH (E) va A7r5 hujayralarida (F) ICRAC oqimlariga ta'sirining statistik tahlili.



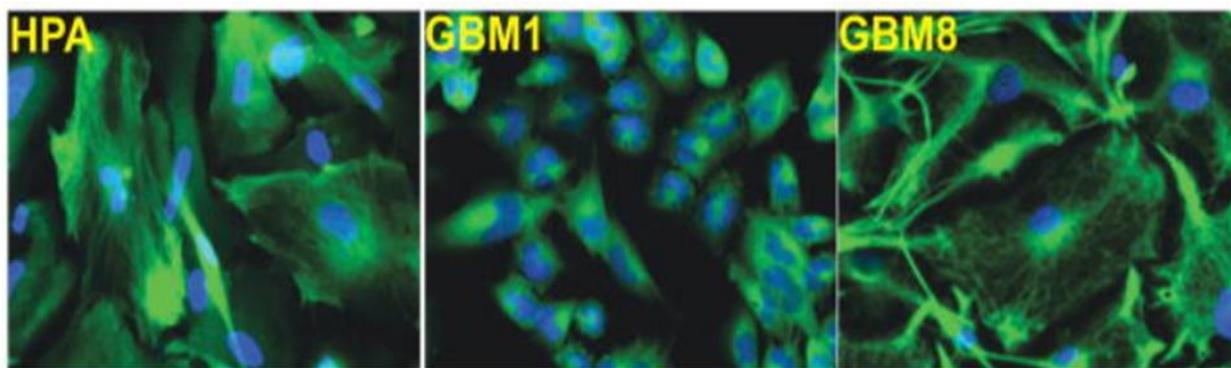
12-rasm. Stim1 va Orai1 ni nokdaun qilish sintetik QTSMH larning ko'payishi va migratsiyasini ingibirlashi. A) Stim1 yoki Orai1 ga qarshi nazorat siRNK yoki siRNK bilan transfeksiyalangan sintetik QTSMH larda migratsiya tahlili. D) Stim1 yoki Orai1 ga qarshi nazorat siRNK yoki siRNK bilan transfeksiyalangan QTSMH larda proliferatsiya.

Miya saraton hujayralarida saqlanadigan faollashtirilgan kaltsiy oqimlari (glioblastoma multiforme). Gliomalar va ayniqsa ularning eng tajovuzkor shakli, glioblastoma multiforme (GBM) birlamchi miya saratonining katta qismini tashkil qiladi. Miyaning birlamchi miya o'smalari orasida GBM juda yomon prognozga ega va davolashning barcha shakllariga, shu jumladan jarrohlik rezektsiya, radiatsiya terapiyasi va kimyoterapiya kombinatsiyasiga juda chidamli. GBM bilan og'rigan bemorlarning o'rtacha omon qolish muddati kamdan-kam hollarda bir yildan oshadi va so'nggi bir necha o'n yilliklarda sezilarli yaxshilanish kuzatilmadi. GBM ning

tajovuzkorligi ko'plab omillar bilan belgilanadi, jumladan, yuqori genetik xilmaxlilik, ortib borayotgan proliferativ va invaziv potentsial va hozirgi vaqtda mavjud bo'lgan dorilarga qarshilik ko'rsatish qobiliyati. Hozirgi vaqtda samarali davolash usullarining yo'qligi GBM biologiyasini yaxshiroq tushunish va GBM tarqalishi va ingibirlashni boshqaradigan yangi signalizatsiya yo'llarini tavsiflash uchun shoshilinch ehtiyojni keltirib chiqaradi. Ca^{2+} signalizatsiyasi hujayra funksiyalarning keng doirasini nazorat qiladi va Ca^{2+} kanallari yaqinda saraton patogenezida muhim o'yinchilar sifatida paydo bo'ldi. Depo tomonidan boshqariladigan Ca^{2+} kirishi (SOCE) - bu Ca^{2+} qo'zg'atmaydigan hujayralarga kirish yo'li bo'lib, u ichki Ca^{2+} zahiralari tugashi bilan faollashadi. Fiziologik sharoitda turli xil o'sish omillari retseptorlari, shu jumladan G-oqsil bilan bog'langan retseptorlari va tirozin kinaza retseptorlari bilan bog'langan agonistlar fosfolipaza C (PLC) fermentlarining faollashuvini qo'zg'atadi va fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP2) hamda inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) ning gidrolizlanishiga olib keladi. IP3 endoplazmatik retikulumdan (ER) Ca^{2+} ning chiqarilishiga va keyinchalik zahiralarning kamayishiga olib keladi. Keyin zahiralarning kamayishi stromal o'zaro ta'sir qiluvchi molekula 1 (STIM1) tomonidan seziladi, u to'planadi va Orai1 oqsili bilan bevosita o'zaro ta'sir qilish uchun ER-plazma membranasi birikmasining alohida hududlariga o'tadi. Orai1 - SOCE kanalining pora hosil qiluvchi birligi bo'lib, u yuqori selektiv Ca^{2+} -ajratib yuboruvchi Ca^{2+} oqimi (CRAC) ga vositachilik qiladi.

Sutemizuvchilar hujayralarida Orai1, Orai3 bilan birgalikda, Stim1 tomonidan boshqariladigan va araxidon kislotasi (AA) yoki uning metaboliti, leykotrien C4 (LTC4) tomonidan boshqariladigan depodan mustaqil Ca^{2+} ga selektiv kanallarini kodlaydi.

So'nggi paytlarda Stim/Orai komplekslari ko'krak, prostata va bachadon bo'yni saratoni kabi bir qator inson saratonlarining migratsiya va hujayra siklining rivojlanishida muhim rol o'ynashi ko'rsatildi. Bundan tashqari, ayrim tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, Ca^{2+} ning Orai1 kanallari orqali kirishi kalamush glioblastoma C6 hujayra liniyasining ko'payishi va omon qolishi uchun muhim ahamiyatga ega. Ushbu maqolada Stim1/Orai1 ning jarrohlik bemor namunalaridan olingan ikkita asosiy glioblastoma hujayra liniyasidagi GBM1 va GBM8dagi roli ko'rib chiqildi (13-rasm).

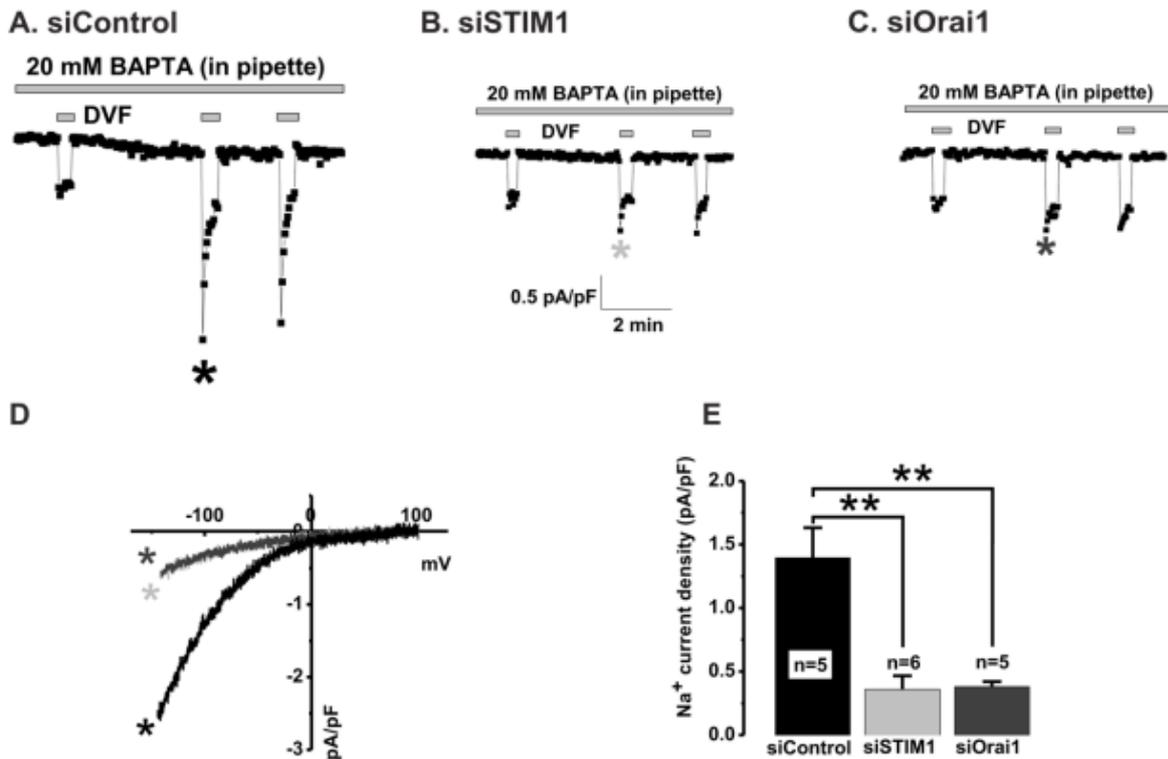


13-rasm. Glioblastoma multiformasi jarrohlik namunalariidan olingan birlamchi inson astrositlari (HPA) va birlamchi glioblastoma hujayra liniyalari (GBM1 va GBM8) immuno-bo'yalishi. Hujayralar o'rnatildi va astroglial hujayra markerini, GFAP oqsilini (yashil) taniydigan antitana bilan bo'yaldi. Hujayra yadrolari DAPI (ko'k) bilan bo'yalgan. Barcha tasvirlar Zeiss LSM510META-NLO konfokal mikroskop yordamida bir xil kattalashtirishda olingan. Barcha kulturalarda hujayralarning > 95% GFAP musbat bo'lib, astroglial kelib chiqishini ko'rsatadi.

Birlamchi glioblastoma kulturalarining depo-faollashtirilgan kaltsiyga kirishining qiyosiy farmakologik tahlili o'tkazildi. GBM1, GBM8, shuningdek, sotuvda mavjud bo'lgan va keng qo'llaniladigan inson glioblastoma hujayra liniyasi U251 va birlamchi inson astrositlarida (HPA) depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi kanonik Orai1/Stim1 yo'li orqali sodir bo'lganligi aniqlandi.

Depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishining kattaligi GBM1, GBM8 va U251 da HPA bilan solishtirganda 2 baravar yuqori edi. siRNA nokdaunti GBM1 hujayralaridagi ICRAC Stim1 va Orai1 tomonidan kodlanganligini aniqladi (14-rasm). Elektrofiziologik tajribalar shuni ko'rsatdiki, 20 mkM BAPTA bilan hujayra ichidagi kalsiy zahiralarning passiv tugaganidan so'ng, GBM1 hujayralarida yuqori darajada Ca^{2+} selektiv CRAC oqimi faollashdi, bu RNK-interferentsiyasi bilan Stim1 va Orai1 ekspressiyasini kamaytirish orqali kuchli kamaydi (14-rasm).

Matrigelda hujayra invazivligini tahlil qilishdan foydalanib, Stim1 va Orai1 ning nokdaunatsiyasi astrositlarga ta'sir qilmasdan GBM1 va GBM8 hujayralarining invaziyasini sezilarli darajada kamaytirishga olib kelishi aniqlandi (15-rasm).

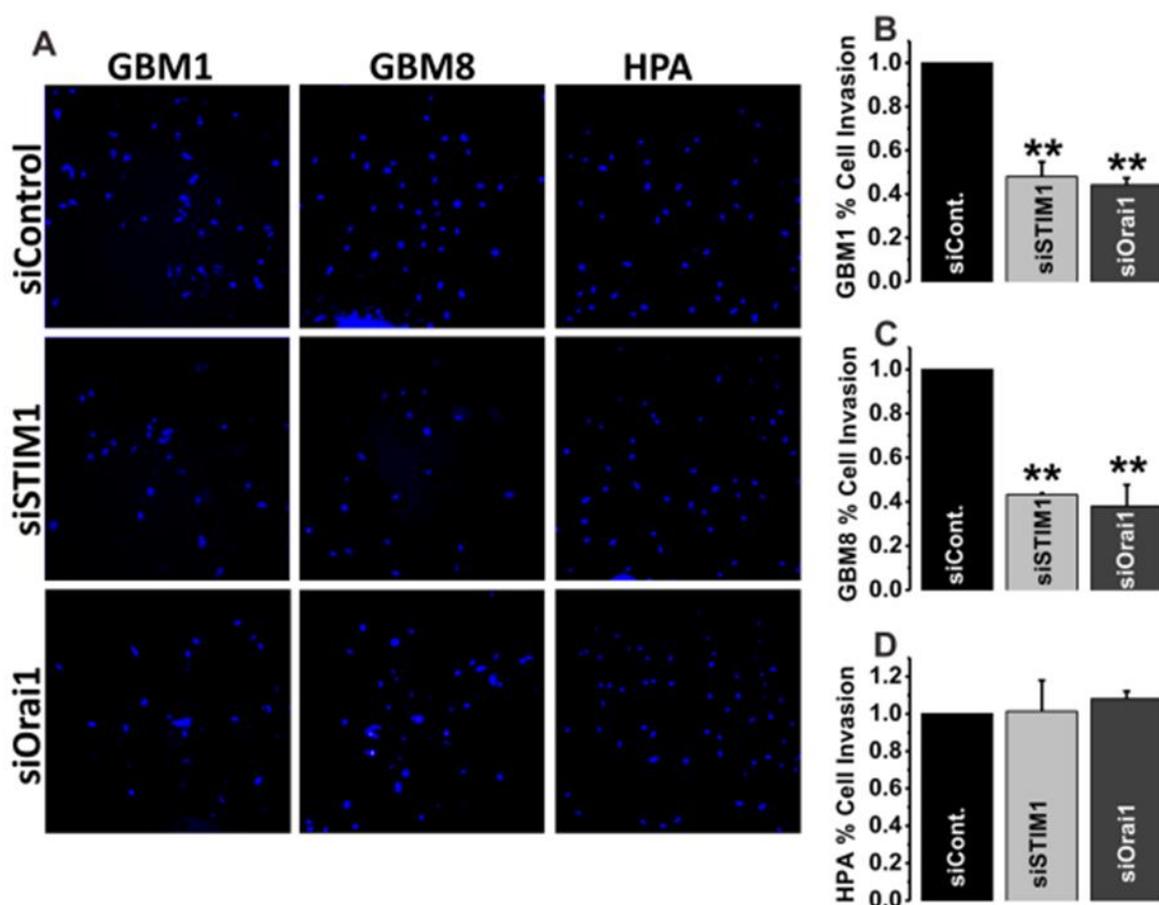


14-rasm. GBM1 hujayralarida depo faollashtirilgan kaltsiy kirishi kanonik Stim1 va Orai1 yo'llari orqali sodir bo'lishi.

Ko'krak bezi saratoni ayollarda eng ko'p uchraydigan saraton bo'lib, G'arb mamlakatlaridagi ayollar orasida yangi saraton holatlarining deyarli uchdan bir qismini tashkil qiladi. Ko'pincha ko'krak saratoni gormon retseptorlarini, birinchi navbatda estrogen retseptorlari (ER) 2 ni ekspressiyalaydi va ularning o'sishi ushbu gormonlarga bog'liq bo'lsa-da, barcha holatlarning 15-20% uch marta salbiy ekanligi taxmin qilinadi (estrogen retseptorlari / progesteron retseptorlari / epidermal o'sish omili retseptorlari) 2-salbiy fenotip. Ko'krak bezi saratoni o'smalari juda xilma-xil bo'lsa-da, ko'krak o'smalari hujayralarida estrogen retseptorlarining mavjudligi yoki yo'qligi asosiy mezonlardan biridir, gormonal va kimyoterapiya preparatlarini prognoz qilish va tanlash uchun ishlatiladi.

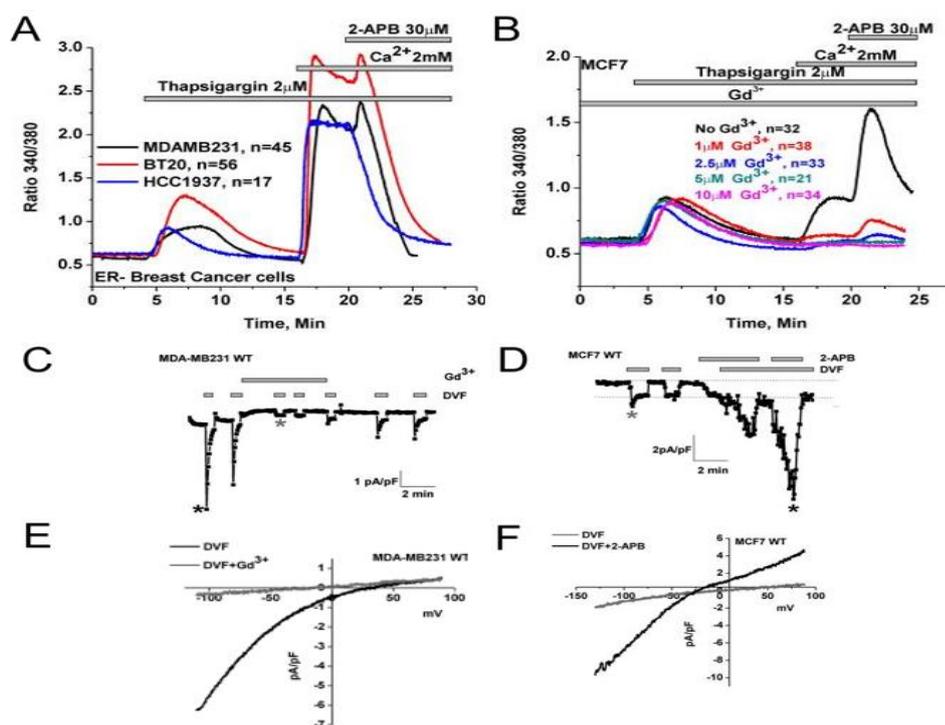
Estrogen-musbat va estrogen-manfiy ko'krak saratoni hujayralarida depo faollashtirilgan kaltsiy oqimlari. Boshqa guruhlar tomonidan olib borilgan ko'plab tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, Orai1 Stim1 bilan birgalikda ko'plab hujayralar, shu jumladan T hujayralari, B hujayralari, ustun hujayralari, trombositlar, endothelial hujayralar, silliq mushak hujayralari, mikrogliallar va va embrion hujayralar. buyrak hujayralari (HEK293), gepatotsitlar, oositlar va boshqalarga depo-faollashtirilgan kaltsiyning kirib borishiga asosiy hissa qo'shadi. Biroq, Orai2 va Orai3 ning mahalliy SOCE yo'llari va CRAC oqimlari vositachiligidagi roli noma'lumligicha qolmoqda. Ushbu dissertatsiyada ko'krak saratoni hujayralarida depoga bog'liq kaltsiy mavjudligi va Orai3 orqali vositachilik qilingan mahalliy SOCE / ICRAC yo'lining mavjudligi uchun birinchi dalilni taqdim etdi. Estrogen-musbat ko'krak saratoni hujayralarida depo-faollashtirilgan SOCE kaltsiyining kirishi Stim1/2 va Orai3 orqali sodir bo'lishi ko'rsatilgan, kanonik STIM1/Orai1 yo'li

esa estrogen-manfiy ko'krak saratoni hujayralarida SOCE yo'lini kodlaydi (16- va 17-rasmlar).

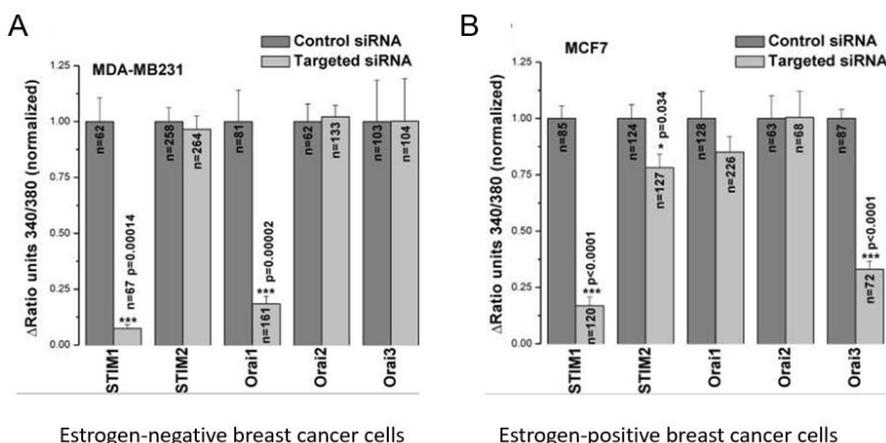


15-rasm. Stim1 va Orail glioblastoma hujayralari GBM1 va GBM8 birlamchi kulturalarining invaziyasini tartibga soladi, lekin inson astrositlariga ta'sir etmaydi. Stim1 yoki Orail ning ishdan chiqishi zardobga (A-C) javoban GBM1 va GBM8 ning invazivligini sezilarli darajada kamaytirdi, HPA (A, D) uchun hech qanday ta'sir kuzatilmadi.

Kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanallarining miya saraton hujayralarining ko'payishiga qo'shgan hisyasi (glioblastoma multiformasi). Ca²⁺-faollashgan K⁺ kanallari xatarli va kamxatarli hujayralarning ko'payishida muhim rol o'ynaydi. Bu kanallar katta o'tkazuvchanlikdagi K⁺ kanallariga (katta yoki maksimal) (BK), o'rta o'tkazuvchanlikning K⁺ kanallariga (IK1) va kichik o'tkazuvchanlikning K⁺ kanallariga (SK) bo'linadi. Ushbu kichik sinflarning har birini biofizik va farmakologik xususiyatlariga qarab ajratish mumkin. SLO1 deb ham ataladigan BK kanallari turli to'qimalarda keng tarqalgan, ammo qo'zg'aluvchan va ekzokrin hujayralardagi membrana potentsialini tartibga solishda alohida funktsional ahamiyatga ega. Paxillin, Penitrem A, iberiotoksin va past konsentratsiyali tetraetilamonium BK ning kuchli va o'ziga xos ingibitorlari hisoblanadi. KCa3.1 yoki SK4 sifatida ham tanilgan IK1 kanallari KCNN4 genining mahsulotidir. Ular, shuningdek, turli to'qimalarda ekspressiyalangan va turli fiziologik rol o'ynaydi. BK dan farqli o'laroq, IK1 kanallari qat'iy Ca²⁺ ga bog'liq, chunki ularning kanal hosil qiluvchi subbirligi to'g'ridan-to'g'ri kalmodulin bilan bog'liq. Klotrimazol va uning hosilasi TRAM-34 IK1 ning kuchli ingibitorlari bo'lib, uni boshqa Ca²⁺-faollashgan K⁺ kanallaridan ajratib turadi.



16-rasm. 2-APB estrogen-salbiy hujayralardagi (Orai1 uchun xarakterli) dipo faollashtirilgan kaltsiy kirishini bostiradi va estrogen-musbat ko'krak saratoni hujayralarida (Orai3 xarakterli) uni oshirishi. A, C, E, estrogen-salbiy hujayralar; B, D, F, estrogen-musbat hujayralar. DVF (divalentsiz), ikki valentli kaltsiy va magniy kationlarini o'z ichiga olmaydi. Bunday sharoitda ICRCAC natriy o'tkazuvchan bo'ladi va amplituda bir necha marta ortadi, bu oqimlarni qayd qilishni osonlashtiradi.



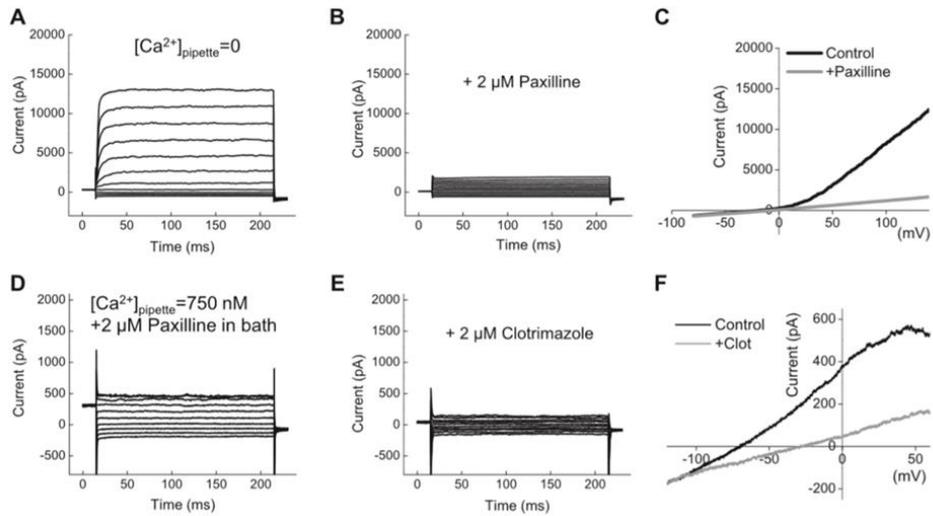
17-rasm. RNK interferensiyasi bilan Orai1/Stim1 ekspressiyasining kamayishi estrogen-manfiy hujayralardagi depo faollashtirilgan kaltsiy kirishini ingibirlaydi, estrogen-musbat hujayralardagi SOCE esa Orai3/Stim1/Stim2 tomonidan boshqariladi.

BK kanali bachadon bo'yni, tuxumdon, prostata va ko'krak saratoni hujayralarining o'sishini nazorat qilish bilan bog'liq. Glioblastoma uchun ma'lumotlar qarama-qarshidir. Bir tomondan, bir nechta tadqiqotlar BK kanallarining glioblastoma hujayralarining ko'payishi va migratsiyasida ishtirok etishini ko'rsatdi. Biroq, bir qator boshqa tadqiqotlar bu ma'lumotlarga zid keladi va BK kanallari ko'payish uchun talab qilinmaydi yoki hatto glioma hujayralarida, shu jumladan, rakga qarshi xususiyatlarga ega. BK dan tashqari, Ca^{2+} bilan

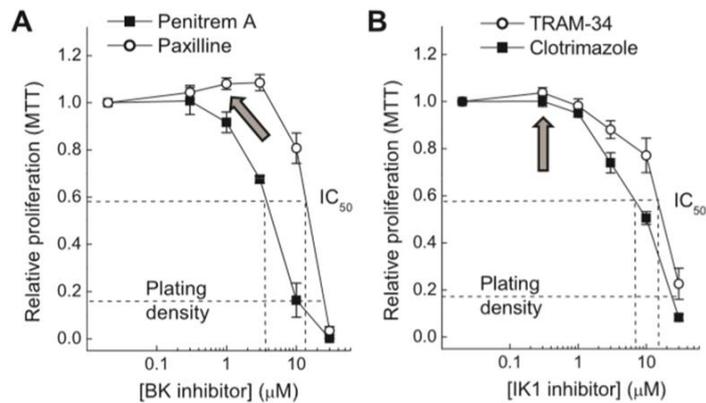
faollashtirilgan oraliq o'tkazuvchanlik K^+ kanallari (IK1) ko'plab turdagi xavfli va kam xavfli sutemizuvchilar hujayralarida o'sish tezligini tartibga solishi taklif qilingan. Bundan tashqari, IK1 ingibitori klotrimazol bir nechta saraton turlarida, shu jumladan GBMda in vivo sharoitida o'simta o'sishini va metastazni sezilarli darajada kamaytiradi. Shuni ta'kidlash kerakki, ba'zi tadqiqotlar gliomalarda IK1 kanallarining funktsional ekspressiyasini shubha ostiga qo'yadi. Patch-clamp usulida olingan 18-rasmdan ko'rinib turibdiki, "butun hujayra" konfiguratsiyasidagi birlamchi kulturadan olingan glioblastoma hujayralarida kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy oqimlari BK blokatori paxillin yoki IK1 blokatori klotrimazol tomonidan ingibirlanadi va bu kanallarning funktsional ekspressiyasini ko'rsatadi.

BK ni IK1 dan ajratib olish uchun quyidagi usullardan foydalanildi: depolarizatsiya bilan kaltsiysiz faollashishi mumkin bo'lgan BK bilan tajribalarda kaltsiy pipetka eritmasidan butunlay olib tashlandi. IK1 bilan o'tkazilgan tajribalarda pipetkaga 750 nM erkin kaltsiy qo'shildi va hujayradan tashqari eritmada 2 mkM BK inhibitori paxillin mavjud (18-rasm). BK blokatorlari, paxillin va penitrem A, dozaga bog'liq holda U251 proliferatsiyasini ingibirladi (19-rasm). Tekshirilgan eng yuqori konsentratsiyada (30 mkM) ikkala blokator ham ham sitotoksik edi, ya'ni ekilgan zichligi ostidagi hujayralar sonini kamaytirdi. Ikkala inhibitor uchun IC_{50} qiymatlari BK oqimlarini ingibirlash uchun yetarli bo'lganidan sezilarli darajada yuqori edi. Paxillin $\sim 13 \mu M$ da hujayra proliferatsiyasini 50% ga blokladi (19-rasm), holbuki butun hujayra oqimlarini ingibirlash uchun $IC_{50} \sim 30$ nM ni tashkil qiladi. Penitrem A biroz kuchliroq va $IC_{50} \sim 3,5$ mkM bo'lgan proliferatsiyani ingibirlagan, ammo bu qiymat MV faolligini yarim maksimal ingibirlash uchun zarur bo'lgan ~ 10 nM konsentratsiyasidan sezilarli darajada yuqori edi. IK1 ingibitorlari klotrimazol va TRAM-34 mos ravishda ~ 6 va 14 mkM konsentratsiyalarda hujayra proliferatsiyasini 50% ga kamaytiradi (19-rasm). Ushbu qiymatlar boshqa tadqiqotchilar tomonidan elektrofiziologik tajribalarda olingan 70 nM (klotrimazol) va 20 nM (TRAM-34) IC_{50} qiymatlaridan sezilarli darajada yuqori edi. Proliferatsiyani ingibirlash va kanal faolligining IC_{50} qiymatlari o'rtasidagi nomuvofiqlik sinov moddalarining kultura muhitda parchalanishi ($36^\circ C$ haroratda bir necha kun) yoki uzoq vaqt inkubatsiya paytida dorilarning hujayra muhiti tomonidan o'ziga xos bo'lmagan so'rilishi bilan izohlanishi mumkin. Ushbu imkoniyatni bartaraf etish uchun nominal 10 mkM paxillin yoki klotrimazolni o'z ichiga olgan kultura muhitining inhibitiv xususiyatlari hujayra proliferatsiyasi tahlillarida 24 soatlik inkubatsiyadan so'ng sinovdan o'tkazildi. Inhibitorni o'z ichiga olgan kultura muhitning alikvotlari elektrofiziologik hujayradan tashqari eritma bilan 10 marta suyultirildi va elektrofiziologik tajribalar davomida qo'shildi. Ushbu suyultirish hujayra kultura muhiti va hujayradan tashqari eritma o'rtasidagi farqlarni kamaytirish uchun zarur edi. Paxillin va klotrimazolning yakuniy nominal konsentratsiyasi 1 mkM edi. Kultura muhitida 24 soat davomida saqlanadigan paxillin va klotrimazol eritmaları kimyoviy xossalarini saqlab qolgan va BK va IK1 oqimlarini mos ravishda $>90\%$ va $>70\%$ ga ingibirlagan. Ta'kidlash joizki, 1 mkM nominal konsentratsiyada na paxillin, na klotrimazol hujayra proliferatsiyasiga ta'sir ko'rsatmadi. Bundan tashqari, RNK interferensiyasi bilan BK va IK1 ekspressiyasini kamaytirish ham proliferatsiyaga ta'sir qilmadi (dissertatsiyadagi rasmga qarang).

Shunday qilib, paxillin va klotrimazolning (shuningdek, kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanallarining boshqa ingibitorlari) hujayra proliferatsiyasiga ta'siri ularning BK va IK1 faolligiga ta'siri bilan bog'liq bo'lishi dargumon.



18-rasm. Kaltsiy bilan faollashtirilgan kaliy kanallari BK va IK1 funksional ravishda birlamchi glioblastoma hujayralari GBM1da ekspressiyalanishi A-C, BK kanalining elektrofiziologik va farmakologik xususiyatlari. D-F, IK1 kanalining elektrofiziologik va farmakologik xususiyatlari.



19-rasm. Ca²⁺ faollashtirilgan kaliy kanal blokatorlari BK va IK1 dozaga bog'liq holda U251 hujayralarining ko'payishini ingibirlaydi.

(A) BK kanali ingibitorlari, paxillin va Penitrem A ning U251 glioma hujayralarining ko'payishiga dozaga bog'liq ta'siri. Strelka elektrofiziologik tajribalarda K⁺ oqimlarini butunlay bloklash uchun ishlatilgan paxillin konsentratsiyasini ko'rsatadi. (B) IK1 kanali ingibitorlari klotrimazol va TRAM-34 ning U251 hujayra proliferatsiyasiga doza-javob ta'siri. Strelka elektrofiziologik tajribalarda K⁺ oqimlarini to'liq bloklash uchun ishlatiladigan klotrimazol konsentratsiyasini ko'rsatadi.

XULOSALAR

1. Bir qator kanallar va tashuvchilar (VRAC, CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR va MDR-1) shishgan astrotsitlardan qo'zg'atuvchi aminokislotalarni chiqarilishining molekulyar yo'lga nomzod sifatida batafsil o'rganildi. VRAC hajmga bog'liq anion kanalining selektiv blokatorlari – DCPIB va tamoksifen

yordamida VRAC ishemik insult jarayonida shishgan astrositlardan qo‘zg‘atuvchi aminokislotalarni chiqarilishining asosiy transport yo‘li ekanligi isbotlandi.

2. Birinchi marta VRAC inhibitori tamoksifen miyokard infarktining *ex vivo* modelida global ishemiyadan keyin kalamush yuragidagi ishemiya-reperfuzion shikastlanishni (IRSh) yengillashtirishi aniqlandi. Demak, tibbiy amaliyotda foydalanish uchun ruxsat etilgan antiestrogen tamoksifen yurak-qon tomir kasalliklari va miyokard infarkti bo‘lgan bemorlarni davolashda istiqbolli farmakologik vositasi bo‘lishi mumkin.

3. Ilk marotaba endotelial hujayralarda vaqtinchalik hosil bo‘lgan Orai1 va STIM1 oqsil komplekslaridan tashkil topgan CRAC kaltsiy kanallari depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi (Store-operated Calcium Entry, SOCE) vositachisi sifatida aniqlandi va ularning hujayra proliferatsiyasidagi asosiy roli ko‘rsatildi.

4. TRPC kanallari endotelial va qon tomir silliq mushak hujayralarida SOCEda ishtirok etmasligi aniqlandi va bu hujayralardagi SOCEning molekulyar tabiati haqidagi ko‘p yillik munozaralarga yakun yasadi.

5. Birinchi marta qon tomir silliq mushak hujayralari (QTSMH) tinchlik holatida depo-faollashtirilgan kaltsiyning kirishi minimal bo‘lishi, lekin QTSMHlarning tinchlik fenotipidan proliferativ holatiga patologik o‘tish davrida keskin oshishi aniqlandi. Proliferativ QTSNHlarda depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishi kanonik Orai1/STIM1 yo‘li orqali sodir bo‘lishi hamda proliferatsiya va migratsiyada muhim rol o‘ynashi ko‘rsatildi.

6. Ilk marotaba multiform glioblastoma tashxisi qo‘yilgan bemorlarning jarrohlik namunalardan olingan miya saratoni hujayralarining birlamchi kulturalarida STIM1 va Orai1 depo-faollashtirilgan kaltsiy kirishining molekulyar komponentlari sifatida aniqlandi. Orai1/STIM1 kompleksi birlamchi glioblastoma hujayralarining invazivligida hal qiluvchi rol o‘ynashi ko‘rsatildi.

7. Kaltsiy bilan faollashuvchi BK va IK1 kaliy kanallari funksional ravishda birlamchi glioblastoma hujayralarida, va shuningdek, U251, U87 glioma hujayralarida ekspressiyalanishi aniqlandi. BK kanali inhibitorlari penitrem A va paxillin, shuningdek, IK1 blokatorlari TRAM-34 va klotrimazol yuqori konsentratsiyalarda birlamchi glioblastoma hujayralari va glioma hujayra liniyalari ko‘payish tezligini keskin kamaytiradi. Biroq, pastroq (lekin kanallarni to‘liq inhibirlovchi) konsentratsiyalarda bu blokatorlar hujayra proliferatsiyasiga ta’sir qilmaydi. U251 hujayralarida RNK-interferentsiyasi yordamida BK va IK1 ekspressiyasini kamaytirish elektrofizyologik tajribalarda kaliy oqimlarini sezilarli darajada pasaytirishi ko‘rsatildi, ammo proliferatsiyaga ta’sir ko‘rsatmadi.

8. Ilk marotaba ko‘krak saratoni hujayralarida estrogen retseptorlari (ER) mavjudligi yoki yo‘qligiga qarab depo-faollashtirilgan kaltsiy kirish tizimi molekulyar komponentlari ekspressiyasining geterogenligi aniqlandi. ER-manfiy hujayralarda SOCE kanonik Orai1/STIM1 yo‘li orqali sodir bo‘lishi, ER-musbat hujayralarda esa SOCE Orai3/STIM1/2 kompleksiga "o‘tishi" birinchi marta ko‘rsatildi.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И
БИОХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ

АБДУЛЛАЕВ ИСКАНДАР ФАТХУЛЛАЕВИЧ

**РОЛЬ ИОННЫХ КАНАЛОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-
СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА**

03.00.02 – Биофизика и радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК (DSc)**

Ташкент – 2024

Тема диссертации доктора наук (DSc.) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан за номером B2023.3.DSc/B197.

Диссертационная работа выполнена в Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана имени Мирзо Улугбека.

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

Научный консультант:

Сабилов Равшан Заирович

доктор биологических наук, академик

Официальные оппоненты:

Мирходжаев Улугбек Заирович

доктор биологических наук, профессор

Камбурова Венера Сейтумеровна

доктор биологических наук

Есимбетов Адилбай Тлепович

доктор биологических наук, профессор

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 г. в ___ часов на заседании Научного Совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 по присуждению ученых степеней при Институте биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана. (Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел. (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru; mamurjon2281@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана (зарегистрированной за № ____). Адрес: 100174. г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru; mamurjon2281@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2024 года.

(Реестр протокола рассылки № «___» от _____ 2024 года).

Саатов Таълат Саатович

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

Позилов Маъмуржон Комилжонович

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

Курбанназарова Раънохон Шараповна

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

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются двумя основными причинами, на долю которых приходится подавляющая часть смертности во всем мире и, в том числе, в Узбекистане. В мире, около 17,8 млн. человек умирает от сердечно-сосудистых заболеваний ежегодно (данные 2022 года). Узбекистан находится на четвертом месте в мировом рейтинге смертности от болезней сердечно-сосудистой системы (724 на 100 000 человек, что в три раза выше среднемировых значений). В 2022 году от рака в мире скончалось 9,7 млн. человек, а в Узбекистане – около 22 000 человек. Изучение молекулярных механизмов онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний позволяет разработать новые перспективные фармакологические агенты, которые значительно улучшат качество жизни пациентов.

Функции ионных каналов изначально считались ограниченными только передачей электрических сигналов в возбудимых клетках. Однако, впоследствии было обнаружено, что ионные каналы – это ключевые элементы в патогенезе рака и сердечно-сосудистых заболеваний, двух основных причин смертности во всем мире.

В последние годы исследователи начали подходить к раку как к онкоканоопатиям. Действительно, ионные каналы модулируют многие жизненно важные клеточные процессы, такие как пролиферация, миграция, инвазивность, контроль клеточного цикла и нечувствительность к апоптотическим сигналам.

Болезни сердца и сосудов – это группа сердечно-сосудистых заболеваний, которые развиваются при сужении, закупорке или спазме сосудов, приводящих к гипертензии, с одной стороны, и болезням сердца, таких как гипертрофия и аритмия, приводящим к патологической дисфункции сердца с другой. Ионные каналы играют ключевую роль в сердечно-сосудистой системе и ее патологиях. Например, три класса блокаторов кальциевых каналов L-типа используются при терапии аритмии. Исходя из вышеперечисленного, крайне важно найти новые фармакологические мишени для лечения рака и сердечно-сосудистых заболеваний.

В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан отмечена необходимость «поощрять научно-исследовательскую и инновационную деятельность, создавать эффективные механизмы внедрения в практику научно-исследовательских и инновационных достижений»², и в этом плане установление роли ионных каналов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и рака имеет важное научно-практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, поставленных в Указах Президента Республики Узбекистан №103 от 26.01.2022 г. «О мерах по профилактике и повышению

¹ Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан».

качества лечения сердечно-сосудистых заболеваний» и №5130 от 27.05.2021 г. «О дальнейшем совершенствовании системы оказания гематологической и онкологической помощи населению», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации. Роль объем-зависимых анионных каналов (ОЗАК или VRAC – Volume Regulated Anion Channel) в повреждении головного мозга при ишемии изучается в ведущих научно-исследовательских центрах мира, таких как Медицинский факультет Вашингтонского университета (США) и Олбанский медицинский центр (США). Сравнительно недавно начато изучение вклада VRAC в фиброзное ремоделирование сердца после инфаркта миокарда и повреждение сердца при гипергликемии (Медицинский центр Сицзин, Китай). Механизмы активации депо-активируемых кальциевых каналов в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов изучается в медицинском колледже Иллинойского Университета (США) и факультете фармакологии Вирджинского Университета (США). В настоящее время проводятся многочисленные исследования участия депо-активируемого входа кальция в патогенезе рака (The Lewis Katz School of Medicine at Temple University (США); National Cheng Kung University (Тайвань); Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Bern (Швейцария); College of Pharmacy, King Saud University (Саудовская Аравия) и другие.

Степень изученности проблемы. В настоящее время в ведущих научных центрах мира проводятся исследования по выяснению механизмов регуляции нейротоксичности выброса глутамата из набухших астроцитов при ишемическом инсульте. В частности, Zhou et al. (2020) показали, что LRRC8A, белок, участвующий в формировании поры VRAC, играет патологическую роль в индуцированном ишемией повреждении головного мозга и последующем токсично-глутаматергическом воздействии на нейроны гиппокампа.

Одним из самых интересных открытий недавних лет было обнаружение активации депо-активируемого входа кальция SOCE (Store-Operated Calcium Entry), который опосредуется каналом CRAC (Calcium Release Activated Channel), ингибиторами кальциевых каналов L-типа (Johnson et al., 2020), широко используемыми в современной медицине при лечении гипертензии. Было выяснено, что такая активация SOCE была характерна для представителей всех трех классов блокаторов $Ca_v1.2$ каналов, ранее считавшихся высокоспецифическими. Как показано в данной диссертации, сосудистые гладкомышечные клетки (СГМК) в патологии претерпевают изменения, приводящие к пролиферативному, но гораздо менее сократимому фенотипу, за счет усиления депо-активированного входа кальция. Дальнейшее усиление SOCE в таких пролиферативных СГМК ингибиторами кальциевых

каналов L-типа может еще больше усугубить патологическое преобразование СГМК при сердечно-сосудистых заболеваниях. Следует отметить, что пациенты, регулярно использующие блокаторы кальциевых каналов L-типа, более подвержены риску остановки сердца, чем пациенты, использующие другие антигипертензивные препараты.

Было обнаружено, что вазоспазмы коронарных артерий, индуцированные эндотелином-1, вызываются за счет активации SOCE, и экспрессия эндотелиновых рецепторов увеличена у крыс, содержащихся на высокосолевого диеты (Xiao, 2023).

SOCE также принимает участие в такой патологии дыхательных путей, как астма. В недавних исследованиях было установлено, что физические упражнения уменьшают сократимость гладких мышц дыхательных путей у астматичных крыс за счет ингибирования секреции IL-4 и депо-управляемого входа кальция (Huang et al., 2023).

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана НИР Института биофизики и биохимии: Ф-ОТ-2021-157 «Роль системы регуляции клеточного объема в пролиферации и смерти нормальных и раковых клеток и ее фармакология» и международного гранта Мирового банка MUNIS REP «Ion Channels VRAC and CRAC as Novel Pharmacological Targets in Ischemia/Reperfusion Injury and Pathological Hypertrophy of the Heart».

Целью исследования является изучение роли ионных каналов VRAC, CRAC (SOCE) и кальций-активируемых K^+ каналов в развитии патогенеза сердечно-сосудистой системы и онкологических заболеваний.

Задачи исследования:

изучение роли VRAC в патологическом выбросе возбуждающих аминокислот из астроцитов при ишемическом инсульте;

изучение роли VRAC при ишемически-реперфузионном повреждении сердца после глобальной ишемии в модели инфаркта миокарда *ex vivo*;

исследовать молекулярную природу депо-активируемого входа кальция в эндотелиальных клетках с использованием ингибиторов, а также РНК-интерференции и оверэкспрессии;

исследовать роль депо-активируемого входа кальция в сосудистых гладкомышечных клетках в покое и при патологическом переходе к пролиферативному фенотипу.

исследовать роль депо-активируемого входа кальция и кальций-активируемого калиевого транспорта в мультиформной глиобластоме человека;

исследовать роль депо-активируемого входа кальция в клетках рака молочной железы в зависимости от присутствия или отсутствия эстрогенных рецепторов.

Объектами исследования являются эндотелиальные клетки HUVEC, HPAEC, базофильная лимфома крысы RBL-2H3, сосудистые гладкомышечные клетки A7r5, клетки рака молочной железы MCF 10A,

184A1, MDA-MB231, BT-20, HCC 1937, HCC 1500, MCF7, BT-474, T47D, ZR-75-1, клетки глиомы U251 MG, U87 MG, первичная культура клеток глиобластомы человека GBM1, GBM8, первичные астроциты человека HPA.

Предметом исследования являются 1) биофизические и фармакологические свойства VRAC в набухших астроцитах крысы и ишемически-реперфузионном повреждении сердца крысы; 2) биофизические и фармакологические свойства и молекулярные основы депо-управляемого входа кальция в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, а также в клетках головного мозга и рака молочной железы.

Методы исследования. При выполнении исследований были использованы следующие методы: 1) электрофизиология (пэтч кламп в конфигурации 'whole cell'); 2) флуоресцентная визуализация кальция; 3) ПЦР в реальном времени; 4) вестерн блот; 5) измерение выброса радиомеченного аспартата из набухших астроцитов; 6) РНК-интерференция; 7) клеточные методы регистрации пролиферации и миграции клеток; 8) клеточные методы регистрации инвазивности раковых клеток; 9) ретроградная перфузия изолированного сердца по Лангендорфу.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

VRAC, CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR и MDR-1 были протестированы в качестве кандидатов на путь выброса возбуждающих аминокислот из набухших астроцитов. Используя селективные блокаторы, канал VRAC был идентифицирован как основной путь высвобождения возбуждающих аминокислот из набухших астроцитов. Поскольку высвобождение глутамата из набухших астроцитов после ишемического инсульта связано с повреждением нейронов, это открытие важно для разработки новых фармакологических методов лечения последствий ишемического инсульта;

было обнаружено, что ингибитор VRAC тамоксифен уменьшает ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) после глобальной ишемии сердца крыс в модели инфаркта миокарда *ex vivo*, что указывает на важную роль каналов VRAC в развитии ИРП. Антиэстроген тамоксифен, уже разрешенный для применения в медицинской практике, может быть перспективен в терапии ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда;

впервые CRAC каналы были идентифицированы как медиаторы депо-активированного входа кальция в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, важного для пролиферации и миграции клеток. CRAC каналы в этих клетках блокировались Gd^{3+} и высокими дозами 2-APB, а также потенцировались низкими дозами 2-APB, что является типичным свойством CRAC каналов. Кроме того, РНК-интерференция Orai1 и STIM1 заметно снижала как токи CRAC, так и депо-активированный вход кальция;

STIM1 и Orai1 были впервые идентифицированы как важные компоненты SOCE и CRAC в двух первичных клеточных линиях глиобластомы, созданных из хирургических образцов пациентов; впервые показана критическая роль

STIM1 и Orai1 в регуляции инвазивности клеток глиобластомы при минимальном влиянии на пролиферацию клеток;

впервые было обнаружено, что кальций-активируемые калиевые каналы BK, IK1 функционально экспрессируются в клеточных линиях глиомы U251, U87 и первичных клетках глиомы человека. Ингибиторы BK-каналов пенитрем А и паксиллин, а также блокаторы IK1 TRAM-34 и клотримазол значительно снижали скорость пролиферации клеточных линий глиомы и первичной глиобластомы при высоких концентрациях. Показано, что снижение экспрессии BK и IK1 РНК-интерференцией в клетках U251 значительно подавляет калиевые токи в электрофизиологических экспериментах, но не оказывает влияние на пролиферацию;

впервые для клеток рака молочной железы продемонстрировано, что депо-активированный вход кальция опосредован белками STIM1/2 и Orai3 при наличии эстрогенного рецептора, тогда как в его отсутствии этот путь кодируется каноническим STIM1/Orai1;

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

Идентификация объем-зависимого анионного канала VRAC в качестве основного транспортного пути для выброса возбуждающих аминокислот из астроцитов при ишемии мозга позволяет рассматривать специфические ингибиторы этого канала в качестве новых перспективных фармакологических средств для терапии ишемического инсульта. Особенно перспективен в этом плане тамоксифен, который уже разрешен для применения в медицине.

Обнаруженное положительное влияние блокатора канала VRAC тамоксифена при ишемически-реперфузионном повреждении сердца позволяет рассматривать этот антиэстроген как перспективное фармакологическое средство в терапии пациентов с ишемической болезнью сердца и при инфаркте миокарда.

Идентификация основных молекулярных мишеней в процессе входа кальция через CRAC в эндотелиальные и гладкомышечные клетки, а также раковые клетки молочной железы и мозга позволит разработать новые фармакологические средства с высокой эффективностью и минимальными побочными эффектами для лечения пациентов с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Достоверность результатов исследования. Результаты, описанные в диссертации, получены с использованием современных методов электрофизиологии, микроскопии, клеточных культур и молекулярной биологии и опубликованы в журналах с высоким импакт-фактором Q1 базы данных SCOPUS с более чем 1100 цитирований.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Демонстрация того, что нейротоксический выброс глутамата из набухших астроцитов происходит через VRAC, может позволить разработать новые фармакологические методы для терапии и лечения пациентов, перенесших ишемический инсульт. Исследования, описанные в диссертации, указывают на то, что известный в медицине препарат тамоксифен, применяемый в

фармакологической терапии пациентов с раком молочной железы, также уменьшает ишемически-реперфузионное повреждение сердца после глобальной ишемии, что может позволить использовать этот препарат при терапии пациентов с инфарктом миокарда. Исследования в области идентификации природы депо-активированного входа кальция в эндотелии позволят понять механизмы сокращения и релаксации кровеносных сосудов и окажутся полезными в разработке новых фармакологических средств для лечения гипертензии. Открытие того, что депо-активированный вход кальция сильно увеличивается в патологически пролиферативных гладкомышечных клетках сосудов поможет уменьшить пролиферативный потенциал этих клеток в патологии фармакологическими способами и улучшить их контрактильность. Открытие того, что ингибиторы кальций-активируемых калиевых каналов уменьшают пролиферацию раковых клеток вне зависимости от экспрессии белковых компонент, имеет важное значение при разработке стратегии борьбы с раковой патологией.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов о роли ионных каналов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и рака:

результаты, определившие канал VRAC как основной путь высвобождения возбуждающих аминокислот из набухших астроцитов, использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором при исследовании метаболизма астроцитов при ишемии мозга, определении роли астроцитов при эпилепсии и анализе механизмов лейкоэнцефалопатии (*Nature neuroscience* (2007), 10(11), 1377-1386, IF – 25,0; *Neuron* (2008), 58(2), 168-178), IF – 16,2; *The Lancet Neurology* (2012), 11(11), 973-985, IF – 48,0). Использование научных результатов дало возможность характеристики участия канала VRAC в патофизиологии астроцитов;

результаты, идентифицирующие CRAC как основной путь входа кальция в клетку в ответ на опустошение внутриклеточных депо, важного для пролиферации и миграции клеток эндотелия, использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором при описании роли каналов TRP в сосудистой системе, при определении механизма активации белка Orai1 при раке молочной железы через SPCA2, при исследовании роли белка Orai1 в селективности эндогенного канала TRPC (*Physiological reviews*, (2015), 95(2), 645-690, IF – 33,6; *Cell* (2010), 143(1), 84-98, IF 64,5; *Circulation research* (2012), 110(11), 1435-1444, IF – 20.1). Использование научных результатов дало возможность детального анализа роли канала CRAC в процессе депо-активированного входа кальция в эндотелии;

результаты, идентифицирующие CRACи как медиаторы входа кальция в ответ на опустошение внутриклеточных депо, важного для пролиферации и миграции клеток гладкой мускулатуры использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором для описания роли ионных каналов в клеточной миграции, при определении роли белка ORAI2 в Т-клеточном иммунитете, для изучения активности сигнальной системы STIM1 в направленной клеточной миграции (*Physiological reviews* (2012), 92(4), 1865-

1913, IF – 33,6; *Nature communications* (2017), 8(1), 14714, IF – 16,6; *Nature cell biology* (2012), 16(2), 133-144, IF – 21,3). Использование научных результатов дало возможность детального анализа роли канала CRAC в процессе депо-активированного входа кальция в гладкой мускулатуре сосудов;

результаты, характеризующие CRACs в клетках рака мозга и первичных культурах пациентов с мультиформной глиобластомой, использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором при описании роли ионных каналов при раке, при необходимости ориентации терапии рака на сигналы кальция, при описании физиологических функций каналов CRAC (*Physiological reviews* (2018), 98(2), 559-621, IF – 33,6; *Acta pharmaceutica sinica B* (2017), 7(1), 3-17, IF – 14,5; *Annual Review of Physiology* (2022), 84, 355-379, IF – 18,2). Использование научных результатов дало возможность построения схемы патогенеза в раке мозга и роли в нем канала CRAC;

результаты, идентифицирующие ORAI3 как молекулярный компонент SOCE в клетках рака молочной железы, использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором при определении взаимосвязи рака и кальциевой сигнализации, исследовании участия белков STIM в передаче сигналов кальция и при описании роли этих белков в раке предстательной железы (*Nature Reviews Cancer* (2017), 17(6), 373-380, IF- 78,5; *Nature reviews Molecular cell biology* (2012), 13(9), 549-565, IF – 112,7; *Cancer cell* (2014), 26(1), 19-32, IF – 50,3). Использование научных результатов дало возможность детальной молекулярной характеристики роли канала CRAC в процессе депо-активированного входа кальция в патогенезе рака молочной железы;

результаты исследования роли кальций-активируемых калиевых каналов в пролиферации клеток рака мозга использованы в зарубежных научных журналах с высоким импакт-фактором при описании роли ионных каналов в метастазировании, при определении участия калиевых каналов в инфильтрации и химиорезистентности глиобластомы (*Molecular cancer* (2017), 16, 1-10, IF – 41,4; *Cell death & disease* (2013), 4(8), e773-e773, IF – 9,0; *Journal of Cellular Physiology* (2018), 233(9), 6866-6877, IF – 5,6). Использование научных результатов дало возможность объяснить имеющиеся в литературе разногласия по поводу роли калиевых каналов в пролиферации раковых клеток мозга.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования обсуждались на международных (1 тезис) и республиканских (11 тезисов) научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 24 научных работ. Из них 12 научных статей, в том числе 1 в отечественных и 11 в международных журналах квартиля Q1, входящих в базу данных SCOPUS, рекомендованных ВАК Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 209 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении диссертации обосновывается актуальность и востребованность темы диссертации, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, характеризуется цель и задачи исследования, объект и предмет исследования, излагаются степень изученности проблемы, научная новизна и практические результаты исследования, приводятся сведения о достоверности полученных результатов, внедрении в практику результатов исследования по опубликованным работам.

В первой главе диссертации, озаглавленной «**Ion channels in cardiovascular diseases and cancer**», дается обзор литературы о роли ионных каналов в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и рака, описываются структуры и механизмы активации объем-зависимого анионного канала (VRAC/ОЗАК), кальциевых каналов, активирующихся высвобождением кальция из внутриклеточных депо (CRAC) и кальций-зависимых калиевых каналов.

Во второй главе диссертации, озаглавленной «**Cells, materials and methods**», приведен список клеточных культур и материалов, а также подробное описание методов, использованных в диссертации. Описаны использованные в экспериментах методы, такие как: 1) электрофизиология (пЭтч кламп в конфигурации 'whole cell'); 2) флуоресцентная визуализация кальция; 3) ПЦР в реальном времени; 4) вестерн блот; 5) измерение выброса радиомеченного аспартата из набухших астроцитов; 6) РНК-интерференция; 7) клеточные методы регистрации и анализы пролиферации и миграции клеток; 8) клеточные методы регистрации и анализы инвазивности клеток; и 9) ретроградная перфузия сердца по Лангендорфу.

В третьей главе диссертации, озаглавленной «**The role of VRACs in ischemic stroke and myocardial infarction**», исследована роль VRAC в ишемическом инсульте и инфаркте миокарда.

Фармакологическое сравнение объем-зависимого выброса глутамата и хлорного тока в астроцитах крысы. Активируемые набуханием пути проницаемости для органических осмолитов присутствуют в подавляющем большинстве изученных на сегодняшний день типов эукариотических клеток. Эти пути потенциально участвуют во многих клеточных функциях, включая регуляцию объема клетки, апоптоз, транспорт органических растворителей и межклеточную коммуникацию через высвобождение биологически активных органических веществ. Некоторые патологии мозга, такие как ишемия, гипонатриемия и черепно-мозговая травма, связаны с выраженным набуханием клеток, которое наблюдается преимущественно в астроцитах. Было показано, что набухание клеток активирует высвобождение возбуждающих аминокислот, глутамата и аспартата в культурах астроцитов. В мозге возбуждающие аминокислоты могут способствовать повреждению клеток нейронов через чрезмерную активацию глутаматных рецепторов. Одним из гипотетических путей активируемого набуханием высвобождения

органических осмолитов является повсеместно экспрессируемый объемно-зависимый анионный канал (VRAC/ОЗАК), который активируется при набухании клетки и проницаем для различных неорганических и малых органических анионов, включая аминокислоты таурин, глутамат и аспартат. В данном исследовании было впервые показано, что выброс меченого аспартата из набухших астроцитов ингибируется селективным блокатором VRAC – DCPIB. Эффект блокатора сохранялся при потенциации выброса меченого аспартата из набухших астроцитов аппликацией 20 μ M АТФ (Рис.1).

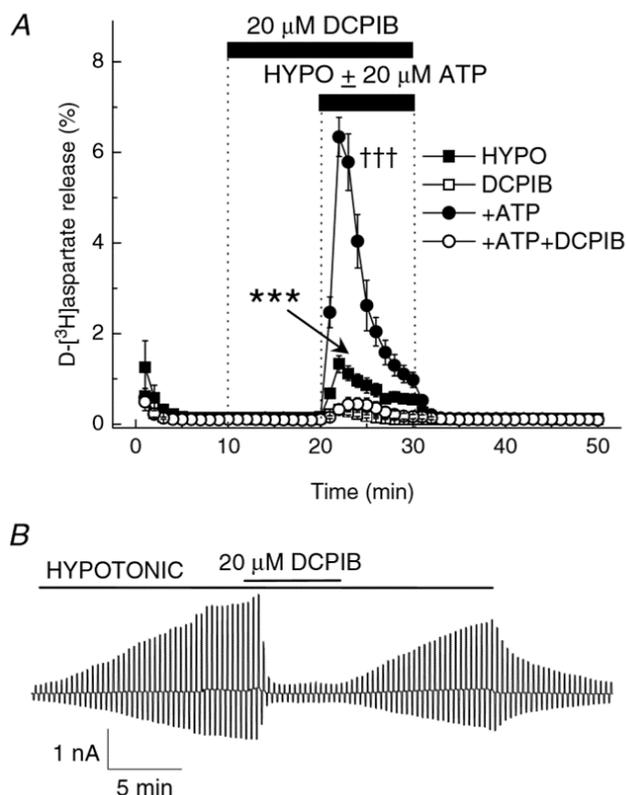


Рис. 1. Селективный блокатор VRAC DCPIB ингибирует токи VRAC и высвобождение d-[³H]аспартата, активированное набуханием астроцитов. А, влияние 20 мкМ DCPIB на активированное набуханием высвобождение d-[³H]аспартата в присутствии или в отсутствие 20 мкМ АТФ. Клетки подвергали воздействию гипоосмотической среды в течение 10 мин, как указано, в присутствии (□, ○) или в отсутствие (▪, -) DCPIB. В, влияние 20 мкМ DCPIB на хлорные токи в астроцитах, активируемые набуханием.

Другие каналы и транспортеры, такие как ClC-2, ClC-3, p-VDAC, CaCC, и MDR-1, также могут пропускать органические осмолиты или являлись кандидатурами на VRAC. Как видно из Рис.2, в культивируемых астроцитах крысы хлорные токи, активируемые набуханием, и высвобождение возбуждающих аминокислот имеют сходный фармакологический профиль. В частности, недавно охарактеризованный селективный блокатор VRAC – DCPIB практически полностью ингибировал объемно-зависимое высвобождение органических осмолитов, а также ионные токи VRAC. Данные, полученные с другими ингибиторами Cl-каналов, согласуются с идеей селективности DCPIB и исключают вклад ClC-2, ClC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR и MDR-1 в выбросе органического осмолита из набухших клеток. Таким

образом, можно сделать заключение, что VRAC является основным путем для высвобождения органических осмолитов. Такой же результат был получен и при исследовании выброса аспартата из микроглии мозга после ее активации зимозаном

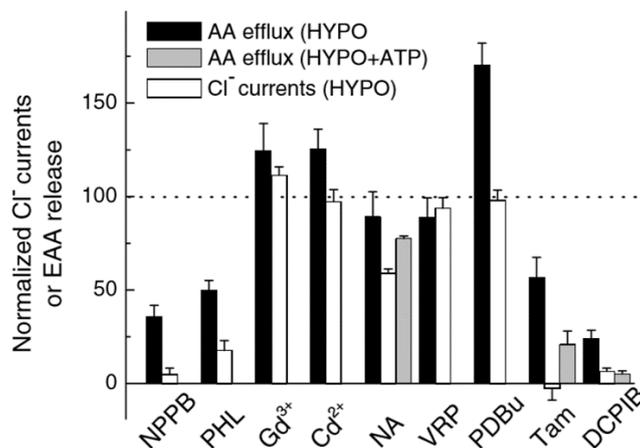


Рис. 2. Обобщение эффектов различных ингибиторов на активированный набуханием выброс возбуждающей аминокислоты и хлорные токи в культивированных астроцитах крысы. Нормированные значения выброса возбуждающей аминокислоты показаны рядом с нормализованными токами VRAC в присутствии всех протестированных ингибиторов. PHL - флоретин; NA - нифлумовая кислота; VRP - верапамил; Tam – тамоксифен.

Роль VRAC в ишемически-реперфузионном повреждении сердца при инфаркте миокарда. Ишемически-реперфузионное повреждение миокарда (ИРПМ) возникает при внезапной реперфузии заблокированных коронарных артерий при инфаркте миокарда. Подобное повреждение сердца является результатом сложного каскада патологических процессов. Патологические процессы, приводящие к ИРПМ, провоцируются внезапным восстановлением снабжения кислородом ослабленных ишемией кардиомиоцитов. Это вызывает накопление большого количества свободных радикалов кислорода и внутриклеточного кальция, что может привести к дополнительному усилению стресса кардиомиоцитов, их набуханию, потере сократительной функции и запуску кальций-зависимого апоптоза.

Роль ионных каналов в развитии ИРПМ остается малоизученной областью. Объем-зависимый анионный канал (VRAC) экспрессируется практически во всех типах клеток, включая кардиомиоциты, и играет роль во многих клеточных процессах, таких как регуляция объема, апоптоз, пролиферация и миграция. VRAC активируется при набухании клеток, потенцируется свободными радикалами кислорода и участвует в развитии апоптоза. Таким образом, VRAC может играть роль в развитии ишемически-реперфузионного повреждения сердца.

В наших экспериментах после стабилизации сердцебиения изолированного сердца крысы при непрерывной ретроградной перфузии оксигенированным раствором Тирода, нагретым до 38°C, глобальная ишемия

была вызвана остановкой перфузии, что привело к полному прекращению сердечных сокращений (Рис. 3А, Б). Реперфузия через 30 минут приводила к восстановлению сокращений сердца с выраженным снижением их амплитуды по сравнению с контролем (до глобальной ишемии) (66 ± 7 % контроля, $n=5$, $p < 0,005$). Такое уменьшение амплитуды сердечных сокращений является характерным показателем нарушения сократительной функции сердца.

В следующей серии экспериментов, после установления устойчивых сокращений (рис. 4) через 30 минут глобальной ишемии, сердце реперфузировали в присутствии 100 мкМ тамоксифена, что привело к предотвращению развития ишемически-реперфузионного повреждения (Рис. 4). Тамоксифен, ингибитор рецепторов эстрогена, широко используемый в онкологии, является сильным, хотя и неспецифическим ингибитором VRAC в различных типах клеток, включая кардиомиоциты. Таким образом, уже известный и применяемый в медицине препарат тамоксифен можно использовать для возможного уменьшения ишемически-реперфузионного повреждения при терапии пациентов с инфарктом миокарда.

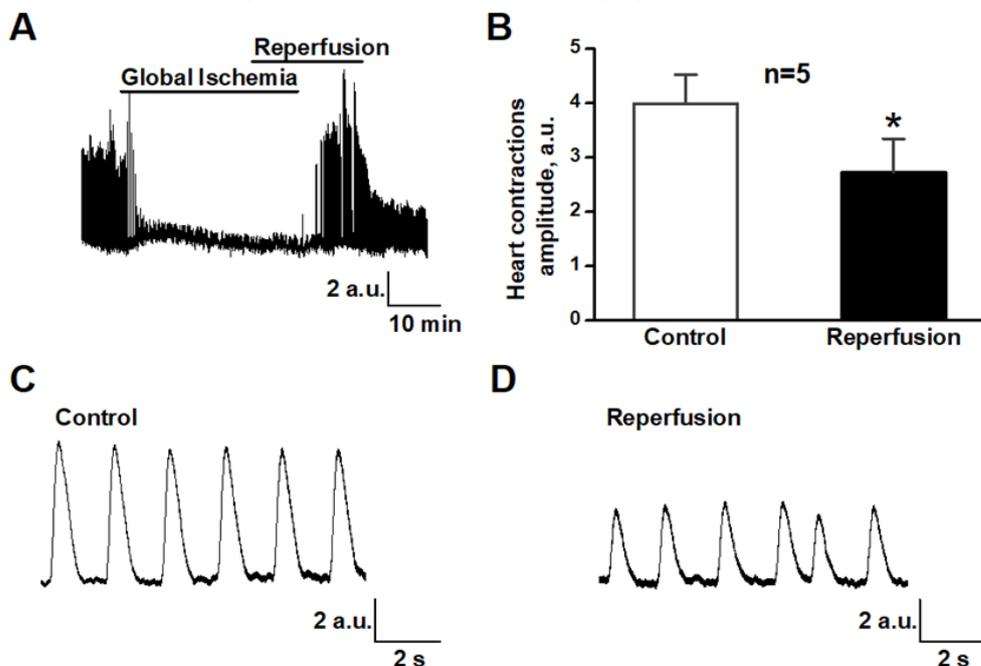


Рис. 3. Ишемически-реперфузионное повреждение сердца крысы после глобальной ишемии. А, Репрезентативный график ретроградной перфузии сердца по Лангендорфу. В, Сравнение частоты сердечных сокращений до (контроль) и после (реперфузия) глобальной ишемии. $n=5$, $*p < 0,01$. С и D — амплитуда сердечных сокращений до (С) и после (D) глобальной ишемии.

В четвертой главе диссертации “**CRACs in vasculature**” описаны исследования, впервые идентифицирующие кальциевые каналы ORA11 и кальциевые сенсоры STIM1 как необходимые компоненты депо-зависимого кальциевого тока в эндотелиальных клетках и клетках гладкой мускулатуры.

Депо-управляемый вход кальция (Ca^{2+}) (SOCE) представляет собой распространенный и повсеместный механизм регуляции притока Ca^{2+} в клетки. Практически во всех типах клеток истощение содержания Ca^{2+} в

эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) с помощью ингибиторов Ca^{2+} -АТФазы саркоплазмы, таких как тапсигаргин, активирует SOCE. В физиологических условиях SOCE инициируется инозитол-1,4,5-трифосфатом (IP_3), т.е. IP_3 -опосредованным истощением ионов Ca^{2+} в ЭР в ответ на множество стимулов, действующих через рецепторы, связанные с фосфолипазой С. Наиболее охарактеризованным током SOCE является ток Ca^{2+} , активированный высвобождением Ca^{2+} (CRAC), впервые зарегистрированный в тучных клетках базофильного лейкоза крыс (RBL), а позже описано и в других типах клеток.

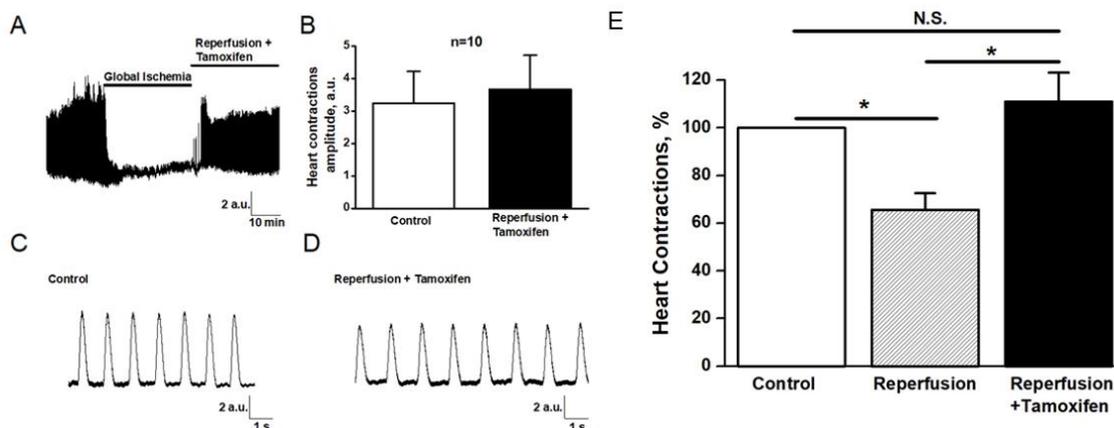


Рис. 4. Реперфузия в присутствии тамоксифена предупреждает развитие ишемически-реперфузионного повреждения сердца. А, Репрезентативный график ретроградной перфузии сердца по Лангендорфу. В, Сравнение частоты сердечных сокращений до (контроль) и после (реперфузия + тамоксифен) глобальной ишемии. $n=10$. С и D - амплитуда сердечных сокращений до и после глобальной ишемии с реперфузией в присутствии тамоксифена. Е, Статистический анализ действия тамоксифена на ишемически-реперфузионное повреждение сердца.

SOCE необходим для пополнения содержания Ca^{2+} в ЭР и является ключевым регулятором многих Ca^{2+} -зависимых физиологических процессов. Скрининги РНК-интерференции, проведенные в нескольких лабораториях, идентифицировали две молекулы, STIM1 и ORAI1, как ключевые компоненты депо-зависимого кальциевого входа в тучных клетках, лимфоцитах и клетках HEK293. При истощении Ca^{2+} в ЭР Ca^{2+} -чувствительные белки STIM1 перемещаются к непосредственной близости от плазматической мембраны, где они агрегируются в множественные точки. Интересно, что порообразующие молекулы ORAI1 также перемещаются в те же самые структуры, содержащие STIM1, при истощении запасов кальция в ЭР, где они соединяются с STIM1 и открываются, опосредуя вход Ca^{2+} .

Депо-зависимый кальциевый ток (CRAC) в эндотелиальных клетках. Сообщения об исследованиях эндотелиального I_{CRAC} , очень редки, вероятно, из-за чрезвычайно низких плотностей тока (примерно в 6-10 раз ниже, чем в клетках Jurkat или RBL). Молекулярный состав депо-зависимых кальциевых каналов во многих типах клеток, и в частности в эндотелиальных клетках, остается весьма спорной темой. В нескольких исследованиях были предложены члены канонического семейства транзиторных рецепторных потенциалов (TRP), такие как TRPC1, как кандидаты в каналы, через которые проходит депо-зависимый кальциевый ток в эндотелиальных клетках. Однако

неясно, как неселективные каналы TRPC могут кодировать высококальциево-селективный I_{CRAC} . В диссертации описаны результаты экспериментов, в которых путем РНК интерференции сильно уменьшалась экспрессия каналов TRPC1 и TRPC4 без статистически значимого уменьшения депо-активируемого кальциевого входа и тока CRAC каналов.

В свете недавнего открытия STIM1 и ORAI1 как ключевых компонент I_{CRAC} в тучных клетках и лимфоцитах, было исследовано их участие в эндотелиальном депо-зависимом кальциевом токе и их вклад в пролиферацию эндотелиальных клеток. Как видно из Рис. 5, в эндотелиальных клетках HUVEC, кальциевое истощение внутриклеточных депо тапсигаргином, тромбином или VEGF вызывало активацию депо-активированного кальциевого входа, который полностью ингибировался 30 μM 2-APB или 10 μM гадолиния. Эти фармакологические свойства типичны для CRAC, состоящего из ORAI1 и STIM1.

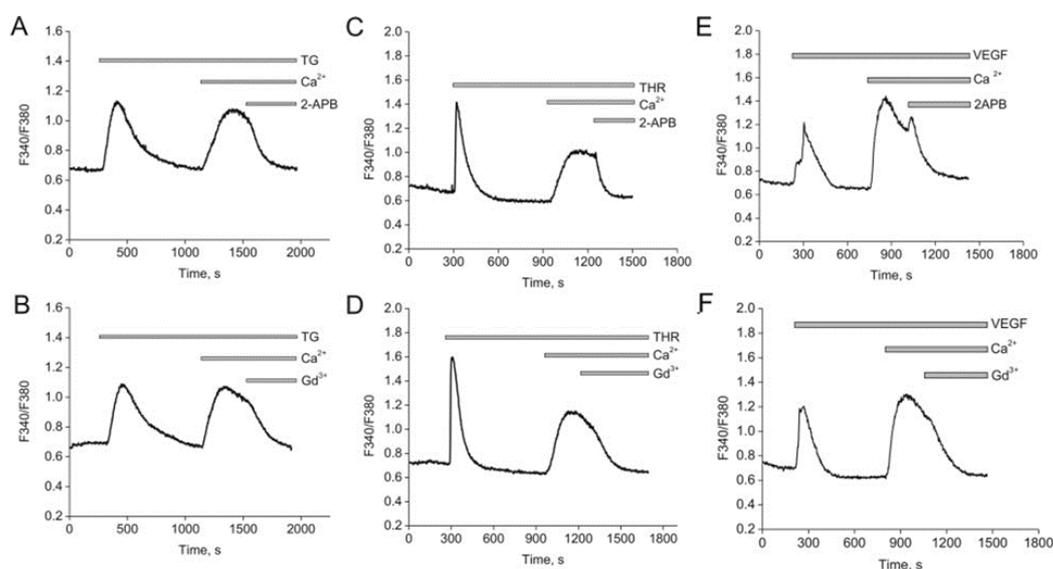


Рис. 5. Кальциевое опустошение внутриклеточных депо активирует депо-активируемый вход кальция, который блокируется 2-APB и гадолинием, типичными ингибиторами CRAC, состоящего из ORAI1 и STIM1. А и В, кальциевое истощение внутриклеточных депо тапсигаргином в концентрации 2 μM (TG) индуцирует вход кальция через CRAC, и ингибируется 30 μM 2-APB (А) и 10 μM Gd^{3+} (В). С и D, тромбин (100 нМ) индуцирует вход кальция через CRAC и ингибируется аналогичными концентрациями 2-APB (С) и Gd^{3+} (D). Е и F, Аналогичные результаты были получены с VEGF (100 нг/мл). Данные на каждой панели представляют собой среднее значение для 4–12 ячеек и репрезентативны как минимум для 3 независимых экспериментов.

В электрофизиологических экспериментах в конфигурации whole cell, внутриклеточные депо опустошались посредством кальциевого хелатора ВАРТА (20 μM), что приводило к медленной активации кальциевых токов, также чувствительных к 2-APB и гадолинию (Рис.6). Эти токи имели очень выраженное внутреннее выпрямление и потенцировались в растворах, свободных от кальция и магния, с выраженной быстрой инактивацией (данные более подробно показаны в диссертации). Эти электрофизиологические и фармакологические свойства типичны для канонических депо-активируемых кальциевых каналов, сформированных ORAI1 и STIM1 в других типах клеток.

Далее, для того чтобы прямо проверить вклад Stim1 и Orai1 в депо-зависимый кальциевый ток в эндотелиальных клетках, экспрессия STIM1 и ORAI1 была подавлена РНК-интерференцией. Как видно из Рис. 7, по данным ПЦР в реальном времени и вестерн блоттинга, трансфекция эндотелиальных клеток HUVEC малыми интерференционными РНК (миРНК, siRNA) резко подавила как экспрессию эндогенных мРНК (Рис. 7А), так и белков Stim1 и Orai1 (Рис. 7В). Такое подавление экспрессии Stim1 и Orai1 привело к резкому снижению депо-активированного кальциевого тока, вызванного кальциевым опустошением внутренних депо тапсигаргином (Рис. 7С). Более того, оверэкспрессия Stim1 и Orai1 в клетках, в которых соответствующие белки были подавлены миРНК, привела к выраженному восстановлению депо-активированного входа кальция (Рис. 7D).

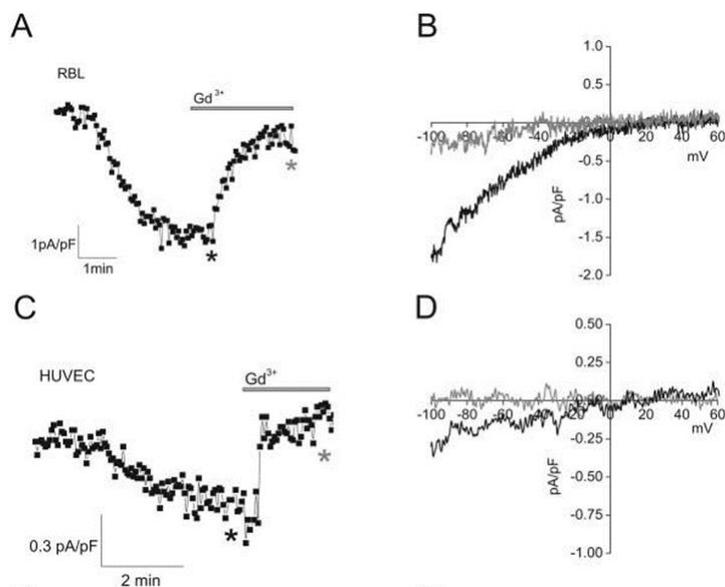


Рис. 6. Электрофизиологические характеристики I_{CRAC} в эндотелиальных клетках HUVEC и клетках базилейкемии крысы RBL.

А и С — активация I_{CRAC} при внутриклеточном диализе с ВАРТА в клетках RBL и HUVEC, соответственно. Токвые ответы на треугольные рампы от -100 мВ до $+60$ мВ измерялись через каждые 3 секунды, и экспериментальные точки на графиках измерялись при -100 мВ. В, D — репрезентативные вольт-амперные характеристики в ответ на рампы, измеренные в моменты времени, отмеченные звездочками на А и С, соответственно. Черные звездочки — до применения Gd^{3+} ; серые звездочки — после применения 10 мкМ Gd^{3+} .

Считается, что в лимфоцитах человека депо-активированный вход кальция является единственным способом транспорта ионов Ca^{2+} в ответ на стимуляцию антигенных рецепторов и жизненно важным для пролиферации лимфоцитов. Поэтому, в последующих экспериментах было протестировано участие Stim1 и Orai1 в пролиферации эндотелиальных клеток. Нокдаун белка Stim1, Orai1 или обоих был осуществлен с использованием миРНК, так же, как и в предыдущем эксперименте, а пролиферацию HUVEC в питательной среде оценивали путем подсчета клеток через 24-часовые интервалы после трансфекции. На рис. 8 показано, что через 96 часов, нокдаун Stim1 ингибировал пролиферацию клеток на $23,3 \pm 5,4$ %, тогда как нокдаун Orai1

имел гораздо больший эффект ($68,8 \pm 3,8$ %). Нокдаун обоих белков вызывал ингибирующий эффект, сравнимый с эффектом нокдауна Orai1 в отдельности ($75,5 \pm 1,7$ %). Интересно, что даунрегуляция экспрессии Orai1 вызывала увеличение доли клеток в фазах S и G2/M клеточного цикла (данные подробно показаны и обсуждены в диссертации).

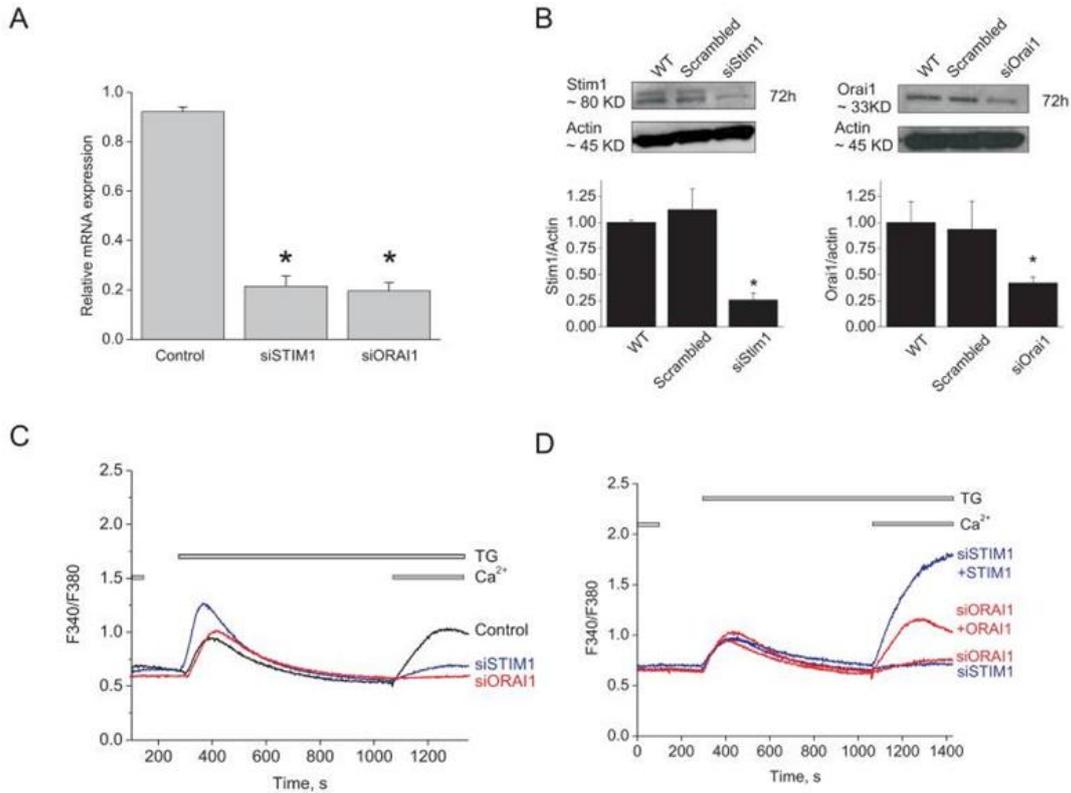


Рис. 7. Депо-активируемый вход кальция в эндотелиальных клетках HUVEC осуществляется через Stim1 и Orai1.

А, данные ПЦР в реальном времени, показывающие снижение экспрессии мРНК Orai1 и Stim1, через 72 часа после трансфекции миРНК. В, вестерн-блоттинг и денситометрия показывают значительное снижение экспрессии белков Stim1 (слева) и Orai1 (справа) через 72 часа после РНК интерференции. С, нокдаун Stim1 и Orai1 ингибирует депо-активируемый вход кальция в эндотелиальных клетках в ответ на тапсигаргин. D, депо-активируемый вход кальция в клетках с пониженной РНК-интерференцией экспрессией Stim1 и Orai1, восстанавливается в результате оверэкспрессии eYFP-Stim1 и CFP-Orai1, соответственно.

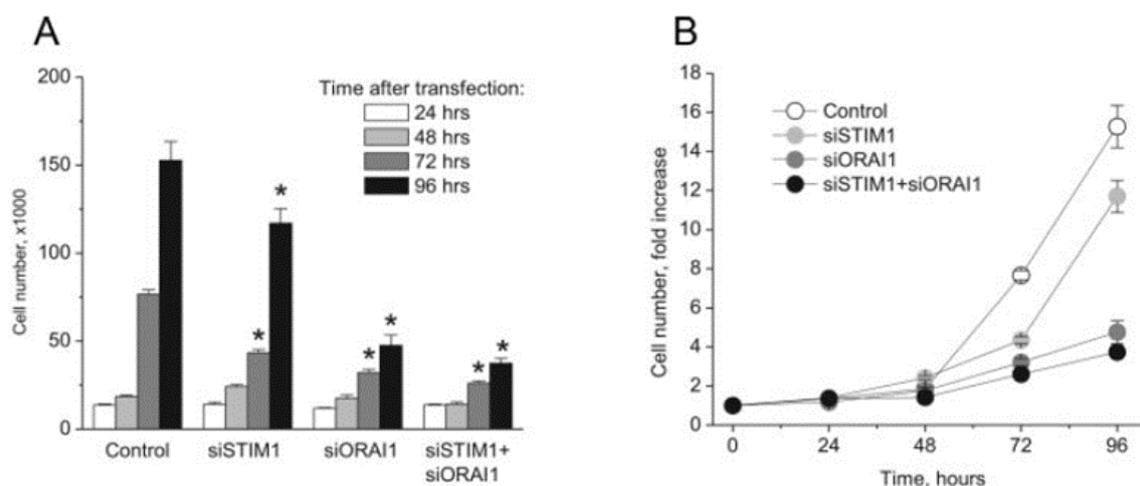


Рис. 8. Нокаунд Stim1 и Orai1 ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток HUVEC

А, Четыре группы клеток были трансфицированы: 1) контрольной некодирующей миРНК, 2) Stim1, 3) Orai1 или 4) Stim1+Orai1 миРНК. В момент времени 0, примерно 10 000 клеток высевали в лунку (9,6 см²) в трех экземплярах. В указанное время, клетки отделяли и подсчитывали общее число клеток на лунку после исключения мертвых клеток, окрашенных трипановым синим. В. Данные в (А) представлены как кратное увеличение количества клеток по сравнению со временем 0.

Депо-активируемый кальциевый вход (Store-operated calcium entry, SOCE) и CRAC каналы в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов. Сосудистые гладкомышечные клетки (СГМК) являются одним из основных типов клеток кровеносных сосудов, которые играют ключевую роль в контроле сосудистого тонуса и поддержании целостности сосудистой стенки. Нами описан выброс внутриклеточного кальция в гладкой мускулатуре легочных артерий в ответ на метаболическое ингибирование цианидом, а также при гипоксии и действии норэпинефрина.

Хотя depo-активируемый кальциевый вход SOCE уже давно описан для СГМК, молекулярная идентичность и роль SOCE в функции СГМК остаются спорными. Предыдущие исследования показали, что канонический неселективный катионный канал TRPC1 участвует в активируемом тапсигаргином SOCE в СГМК. Этот вывод был сделан на основании небольшого снижения, активированного тапсигаргином входа Ca²⁺ после обработки клеток антителами против TRPC1. Такое же небольшое снижение SOCE наблюдалось после трансфекции миРНК, подавляющей экспрессию TRPC1. При регистрации мембранных токов методом пЭТЧ-кламп наблюдалась большая гетерогенность биофизических и фармакологических свойств этих токов между разными группами исследователей и разными типами СГМК. Более того, участие TRPC1 в SOCE в гладкомышечных клетках трудно объяснить после того, как интактные SOCE были обнаружены в гладкомышечных клетках сосудов мышей, нокаутных по TRPC1.

СГМК *in vivo* — это сократительные клетки, которые находятся в состоянии пролиферативного покоя, в отличие от тех же клеток (называемых “синтетическими СГМК”), культивируемых в питательной среде в

присутствии сыворотки, которые являются пролиферативными и мигрирующими. Синтетические СГМК проявляют большинство свойств СГМК, наблюдаемых во время патологических состояний сосудов, таких как атеросклероз и рестеноз. *In vitro* дедифференцировка СГМК от покоящегося фенотипа к пролиферативному и мигрирующему фенотипу полностью достигается примерно через 30 часов в культуре. В данной диссертации амплитуда SOCE, стимулированного тапсигаргином (2 мкМ) в синтетических СГМК аорты крысы, была сравнена с амплитудой покоящихся свежедиспергированных СГМК из аорты крысы с использованием метода Fura-2 Ca²⁺-визуализации. Как видно на Рис. 9А и В, SOCE был существенно выше в синтетических СГМК по сравнению с покоящимися свежедиспергированными СГМК. Эти результаты были получены в присутствии ингибитора Ca²⁺-каналов L-типа верапамила (10 мкМ) и ингибитора Na⁺-каналов тетродотоксина (0,5 мкМ), что исключает вклад деполяризации мембраны в небольшой вход Ca²⁺, наблюдаемый в свежewedеленных СГМК.

Депо-активированный вход кальция в синтетических СГМК имел типичные для канонического SOCE фармакологические свойства: он ингибировался 5 мкМ гадолиния, 50 мкМ 2-APB и 50 мкМ ML-9 (Рис.10) и уменьшался после нокдауна *Orai1* и *Stim1* (Рис. 11). Анализ миграции пролиферативных СГМК показал, что клетки, в которых экспрессия белков *Orai1* и *Stim1* была понижена РНК-интерференцией, размножались и мигрировали с меньшей скоростью, чем контрольные клетки (Рис. 12).

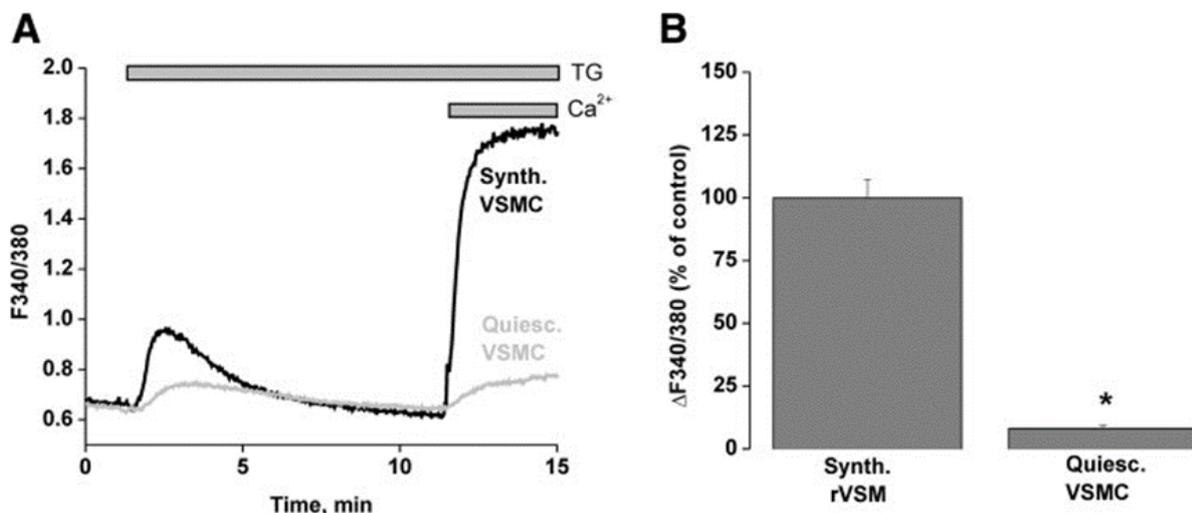


Рис. 9. SOCE повышен в пролиферативных и мигрирующих «синтетических» СГМК.

А, В, Тапсигаргин (TG) (2 мкМ) активирует гораздо больший SOCE в синтетических СГМК, чем в покоящихся свежедиспергированных СГМК.

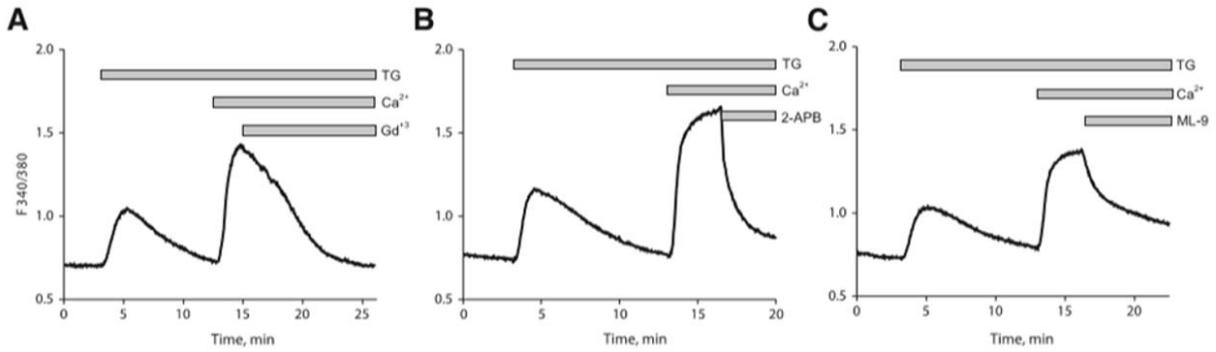


Рис. 10. Характеристика депо-активированного входа кальция в синтетических СГМК. А, Тапсигаргин (TG) (2 мкМ) активирует SOCE в синтетических СГМК, чувствительных к 5 мкМ Gd^{3+} (n=72). В, С, Аналогичное ингибирование SOCE было достигнуто с помощью 50 мкМ 2-АПВ (В) (n=49) и 50 мкМ ML-9 (С) (n=26).

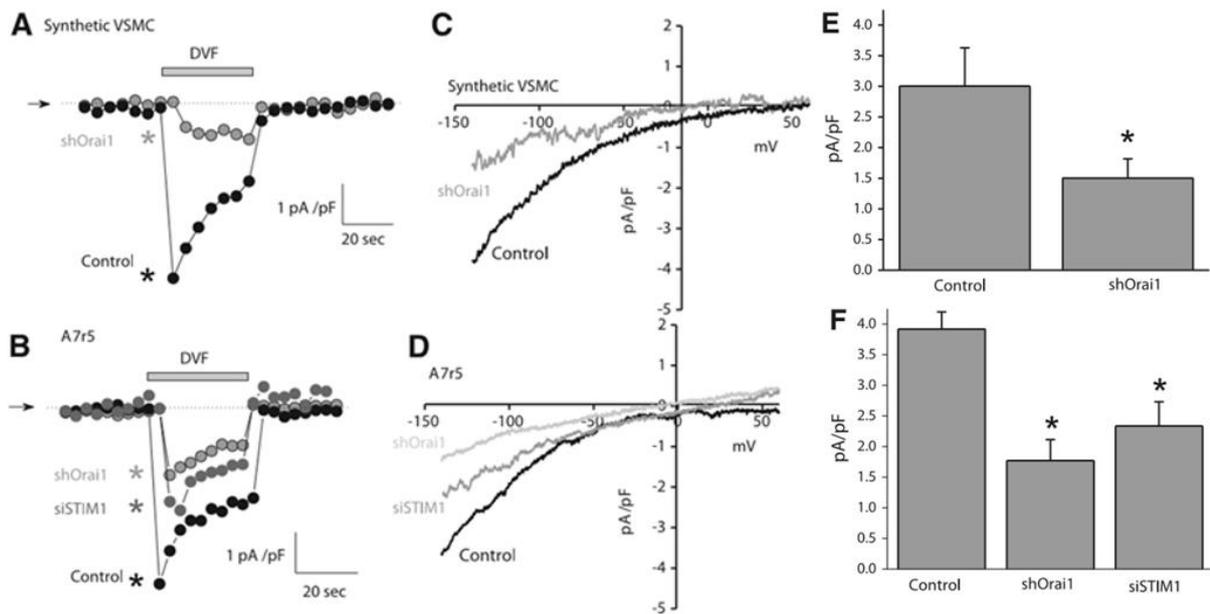


Рис. 11. Нокадаун Orai1 ингибирует I_{CRAC} в синтетических СГМК и клетках A7r5. РНК-интерференция Orai1 ингибирует I_{CRAC} , зарегистрированный в растворах без кальция и магния в синтетических СГМК (А, С). В этих условиях I_{CRAC} проводит моновалентные катионы и приобретает характерную быструю инактивацию. Аналогичные результаты были получены на клетках A7r5 (В, D). Е, F, Статистический анализ эффекта даунрегуляции Orai1 и Stim1 на I_{CRAC} токи в синтетических СГМК (Е) и клетках A7r5 (F).

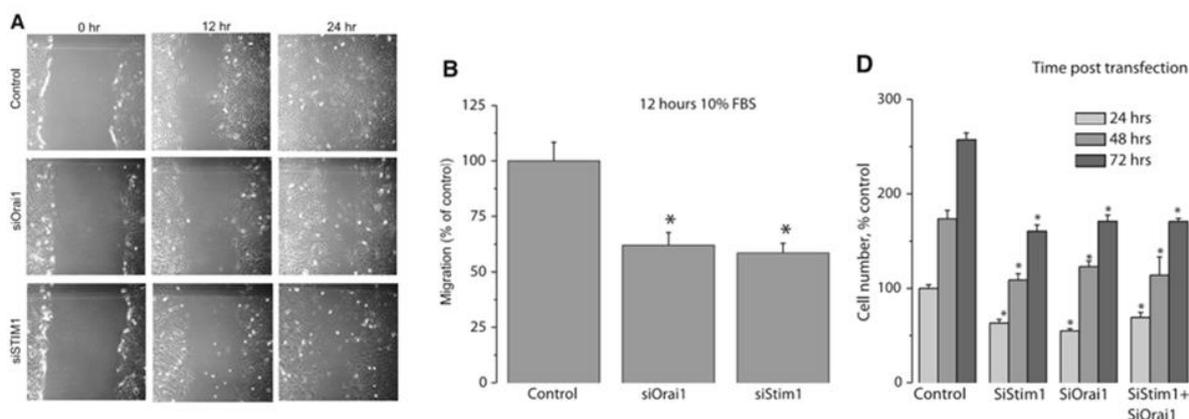


Рис. 12. Нокадаун STIM1 и Orai1 ингибирует пролиферацию и миграцию синтетических VSMC. А) Анализ миграции в синтетических СГМК, трансфицированных либо контрольной миРНК, либо миРНК против STIM1 или Orai1. В, Даунрегуляция Orai1 и Stim1 подавляет миграцию СГМК. Д) Пролиферация в СГМК, трансфицированных контрольной миРНК, либо миРНК против STIM1 или Orai1.

Депо-активированные кальциевые токи в клетках рака головного мозга (мультиформной глиобластоме).

Глиомы, и особенно их наиболее агрессивная форма – мультиформная глиобластома (ГБМ), представляют собой подавляющее большинство первичных опухолей головного мозга. Среди первичных злокачественных новообразований головного мозга ГБМ характеризуется крайне плохим прогнозом и высокой резистентностью ко всем формам лечения, включая сочетание хирургической резекции, лучевой терапии и химиотерапии. Медиана выживаемости пациентов с ГБМ редко превышает один год и за последние несколько десятилетий не наблюдалось существенного улучшения. Агрессивность ГБМ определяется многочисленными факторами, включая высокое генетическое разнообразие, повышенный пролиферативный и инвазивный потенциал, а также способность развивать устойчивость к доступным в настоящее время препаратам. Нынешнее отсутствие эффективных методов лечения создает острую необходимость в более глубоком понимании биологии ГБМ и характеристике новых сигнальных путей, которые контролируют пролиферацию и инвазию ГБМ.

Передача сигналов Ca^{2+} контролирует широкий спектр клеточных функций, а каналы для ионов Ca^{2+} , как было выяснено недавно, играют важную роль в патогенезе рака. Депо-управляемый вход Ca^{2+} (SOCE) представляет собой путь входа Ca^{2+} в невозбудимые клетки, который активируется при истощении внутренних запасов Ca^{2+} . В физиологических условиях агонисты, связывающиеся с различными рецепторами факторов роста, включая рецепторы, связанные с G-белками, и рецепторные тирозинкиназы, запускают активацию ферментов фосфолипазы C (PLC) и приводят к гидролизу фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) до диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). IP₃ вызывает высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭР) и последующее истощение его запасов. Истощение запасов затем воспринимается

стромальной взаимодействующей молекулой 1 (STIM1), которая агрегирует и перемещается в дискретные области мембраны ЭР для непосредственного взаимодействия с белком Orai1, который локализуется в плазматической мембране. Orai1 является порообразующей единицей канала SOCE, которая обеспечивает высокоселективный вход Ca^{2+} (CRAC). В клетках млекопитающих Orai1 в сочетании с Orai3 может также кодировать независимые от депо Ca^{2+} -селективные каналы, которые регулируются STIM1 и контролируются либо арахидоновой кислотой (AA), либо ее метаболитом, лейкотриеном C4 (LTC4).

Недавно было установлено, что комплексы STIM/Orai играют ключевую роль в миграции и прогрессировании клеточного цикла ряда видов рака человека, включая злокачественные новообразования молочной железы, простаты и шейки матки. Более того, одно исследование показало, что вход Ca^{2+} через каналы Orai1 важен для пролиферации и выживания линии клеток глиобластомы крысы C6. В настоящей диссертации была исследована роль STIM1/Orai1 в двух линиях первичных клеток глиобластомы GBM1 и GBM8, полученных из хирургических образцов пациентов (Рис.13).

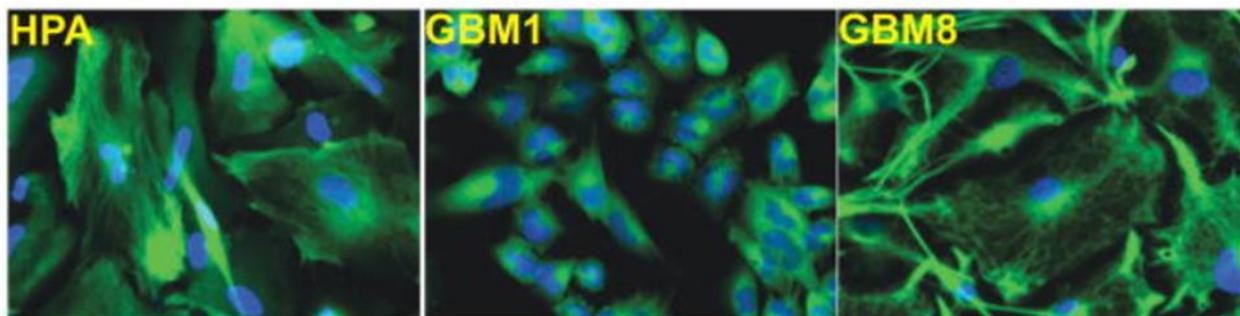


Рис. 13. Иммуноокрашивание первичных астроцитов человека (HRA) и клеточных линий первичной глиобластомы (GBM1 и GBM8), полученных из хирургических образцов мультиформной глиобластомы.

Клетки фиксировали и окрашивали антителом, распознающим маркер астроглиальных клеток, белок GFAP (зеленый). Ядра клеток окрашивали DAPI (синий). Все изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM510META-NLO при одинаковом увеличении. Во всех культурах >95% клеток были GFAP-положительными, что указывает на их астроглиальное происхождение.

Нами был проведен сравнительный фармакологический анализ депо-активируемого входа кальция первичных культур глиобластом с нормальными первичными астроцитами человека (HRA). Было установлено, что в GBM1, GBM8, а также в коммерчески доступных и широко используемых линиях клеток глиобластомы человека U251, так же, как и в нормальных первичных астроцитах человека (HRA) депо-активируемый вход кальция происходит через канонический путь Orai1/Stim1. Однако, величина депо-активируемого входа кальция была в 2 раза выше в GBM1, GBM8 и U251 по сравнению с HRA. Нокдаун миРНК показал, что I_{CRAC} в клетках GBM1 кодируется STIM1 и Orai1 (Рис. 14). Электрофизиологические эксперименты показали, что после пассивного истощения внутриклеточных запасов кальция

с помощью 20 мкМ ВАРТА, в GBM1 клетках активируется высокоселективный Ca^{2+} ток CRAC, который сильно уменьшался при снижении экспрессии STIM1 и Orai1 РНК-интерференцией (Рис. 14). С помощью анализа клеточной инвазивности в матрикеле было установлено, что нокдаун STIM1 и Orai1 вызывает значительное снижение инвазии клеток GBM1 и GBM8, но не нормальных астроцитов (Рис. 15).

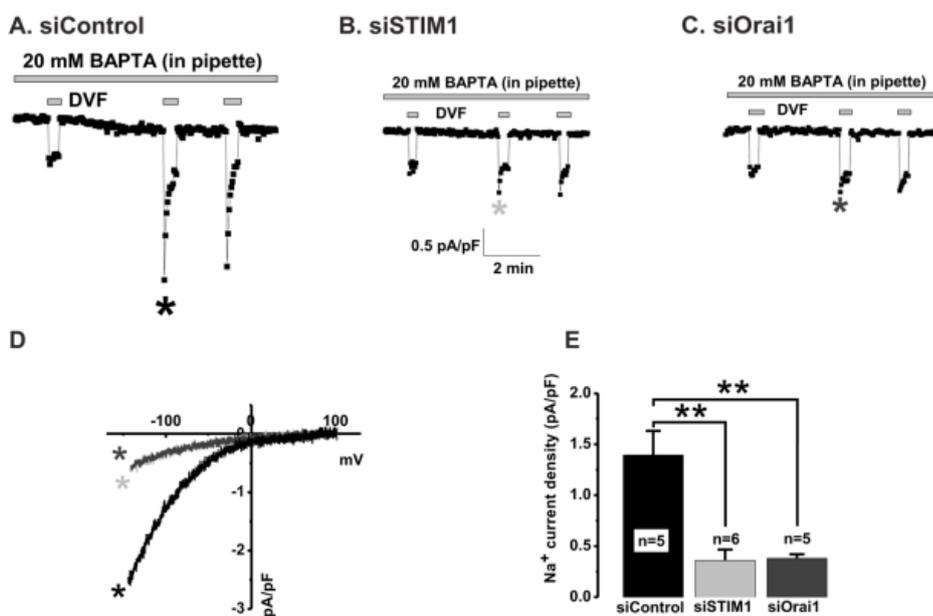


Рис. 14. Депо-активируемый вход кальция в клетках GBM1 происходит через канонический путь STIM1 и Orai1.

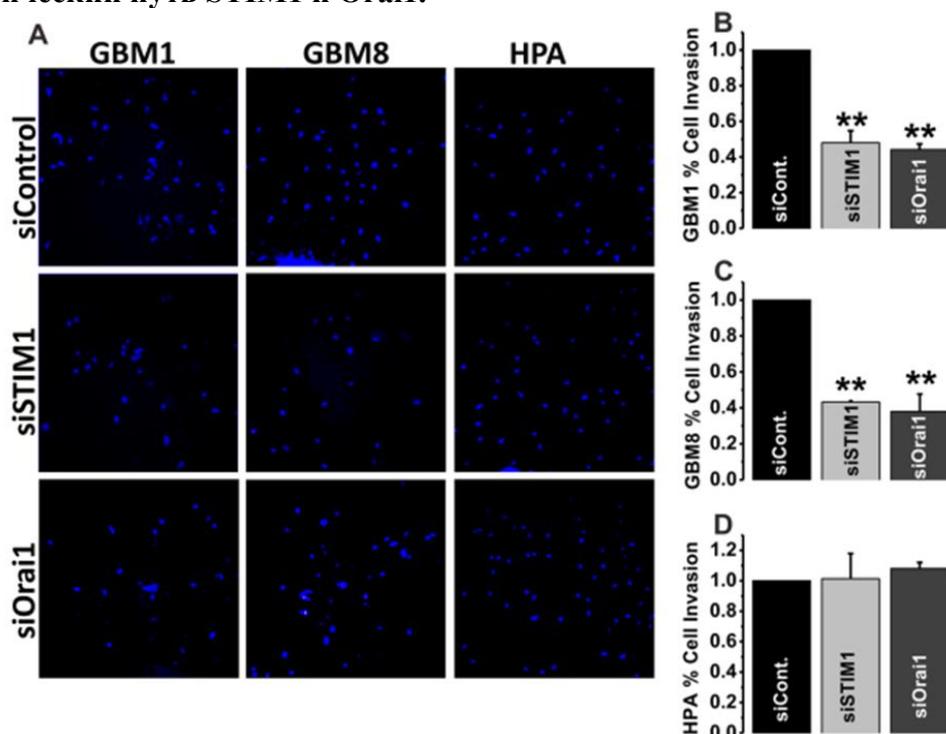


Рис. 15. STIM1 и Orai1 регулируют инвазию первичных культур клеток глиобластомы GBM1 и GBM8, но не человеческих астроцитов. Нокдаун STIM1 или Orai1 значительно снизил инвазивность GBM1 и GBM8 в ответ на сыворотку (A–C), тогда как для HPA эффекта не наблюдалось (A, D).

Депо-активированные кальциевые токи в эстроген-позитивных и эстроген-негативных клетках рака молочной железы.

Рак молочной железы является наиболее распространенным раком у женщин, и на него приходится почти треть всех новых случаев рака среди женщин в западных странах. В большинстве случаев рака молочной железы, клетки новообразования экспрессируют рецепторы гормонов, и в первую очередь рецепторы эстрогена ER2, и поэтому их рост зависит от этих гормонов. В то же время, по некоторым оценкам, в 15–20% случаев наблюдается тройной негативный фенотип, при котором отсутствуют рецептор эстрогена, рецептор прогестерона и рецептор эпидермального фактора роста. Хотя опухоли рака молочной железы крайне гетерогенны, наличие или отсутствие рецепторов эстрогена на клетках опухоли молочной железы представляет собой один из основных критериев, используемых для прогноза и выбора гормональных и химиотерапевтических препаратов. Многочисленными исследованиями других групп исследователей было показано, что Orai1 вместе со STIM1 вносят основной вклад в депо-активируемый вход кальция во многих типах клеток, включая Т-клетки, В-клетки, тучные клетки, тромбоциты, эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, микроглию, эмбриональные клетки человека, клетки почек (HEK293), гепатоциты и ооциты. Однако роль Orai2 и Orai3 в обеспечении нативных путей SOCE и токов CRAC остается неизвестной. В настоящей диссертации были получены первые доказательства существования депо-зависимого кальциевого входа в клетках рака молочной железы и нативного пути SOCE/ICRAC, опосредованного через Orai3. В наших экспериментах было продемонстрировано, что в эстроген-позитивных клетках рака молочной железы депо-активированный кальциевый вход SOCE осуществляется через STIM1/2 и Orai3, тогда как канонический путь STIM1/Orai1 кодирует путь SOCE только в эстроген-негативных клетках рака молочной железы (Рис. 16-17).

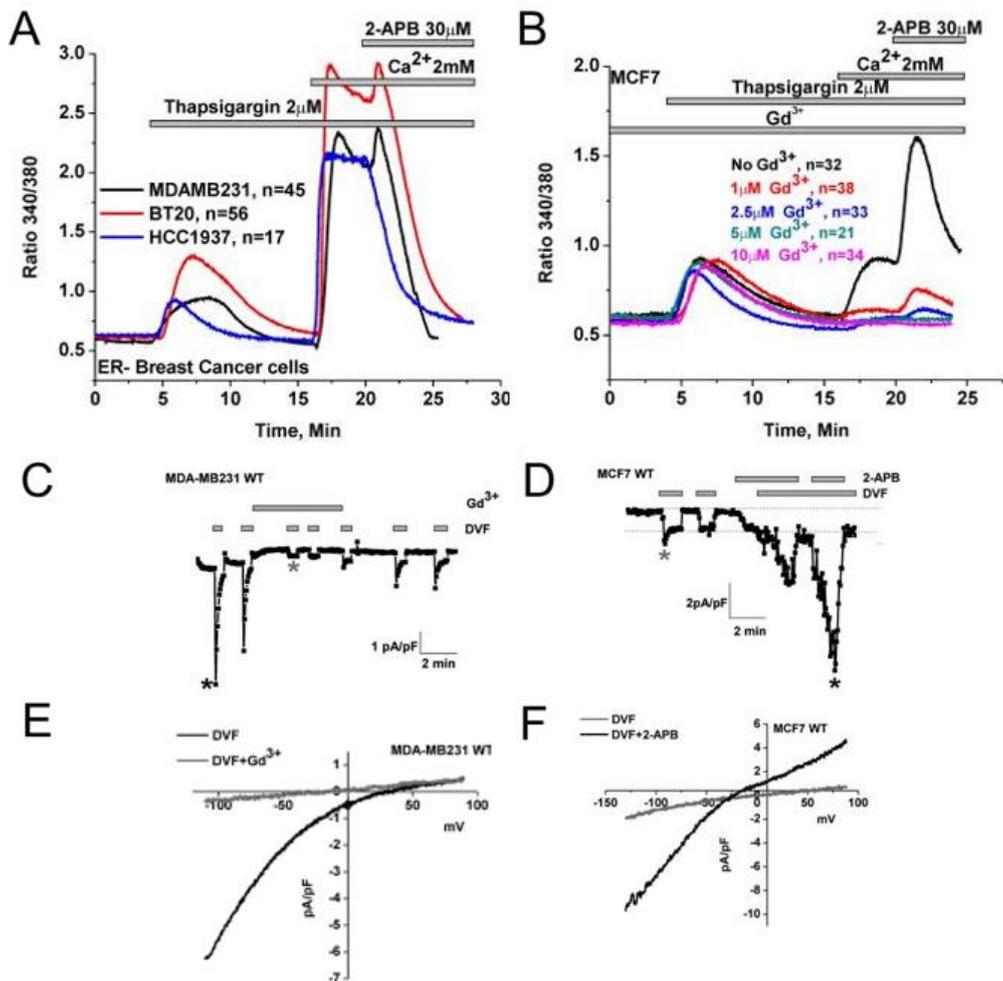


Рис. 16. 2-АРВ подавляет депо-активированный вход кальция в эстроген-негативных клетках (что характерно для *Orai1*) и увеличивает в эстроген-позитивных клетках рака молочной железы (что характерно для *Orai3*). А, С, Е, эстроген-отрицательные клетки; В, D, F, эстроген-позитивные клетки. DVF (divalent-free), раствор, не содержащий двухвалентных катионов кальция и магния. В этих условиях I_{CRAC} становится проницаемым по натрию и в несколько раз увеличивается в амплитуде, что облегчает регистрацию токов.

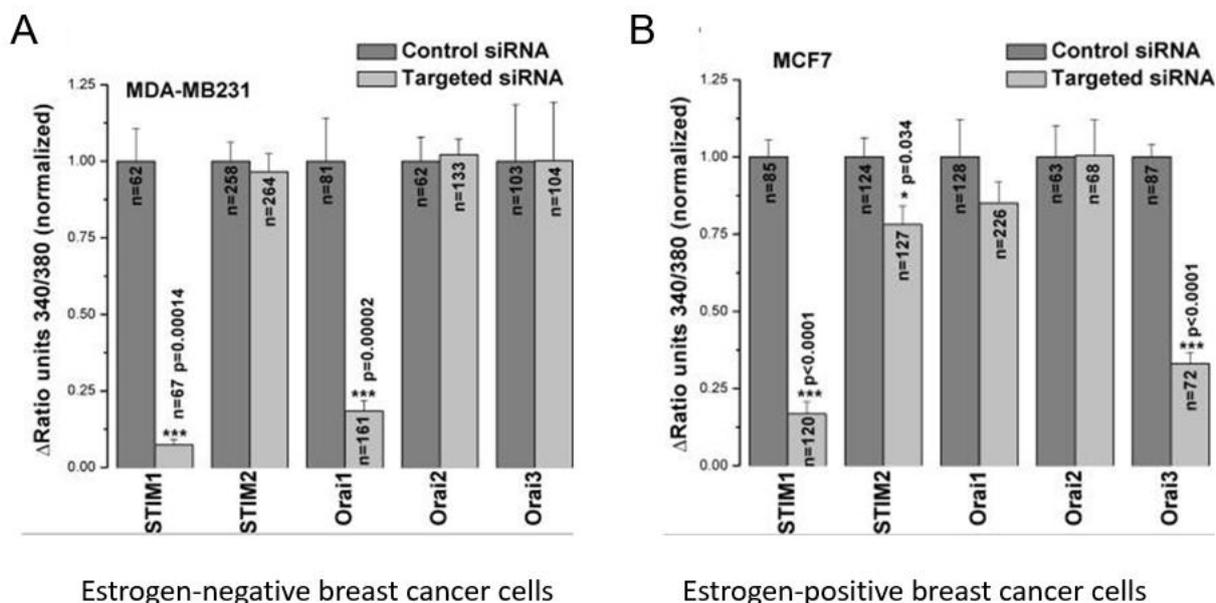


Рис. 17. Снижение экспрессии Orai1/Stim1 РНК-интерференцией подавляет депо-активируемый вход кальция в эстроген-негативных клетках, в то время как в эстроген-позитивных клетках SOCE контролируется Orai3/Stim1/Stim2.

Вклад кальций-активируемых калиевых каналов в пролиферацию клеток рака головного мозга (мультиформной глиобластомы).

Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы играют существенную роль в пролиферации как злокачественных, так и доброкачественных клеток. Эти каналы подразделяют на K⁺ каналы большой проводимости (большие или макси-, BK), K⁺ каналы средней проводимости (IK1) и K⁺ каналы малой проводимости (SK). Каждый из этих подклассов можно разделить на основе их биофизических и фармакологических свойств. BK-каналы, также известные как SLO1, широко экспрессированы в различных тканях, но имеют особое функциональное значение для регуляции мембранного потенциала в возбудимых и экзокринных клетках. Паксиллин, пенитрем А, ибериотоксин и низкие концентрации тетраэтиламмония являются сильными и специфическими ингибиторами BK. Каналы IK1, также известные как KCa3.1 или SK4, являются продуктом гена KCNN4. Они также экспрессированы в различных тканях и играют разнообразные физиологические роли. В отличие от BK, каналы IK1 строго Ca²⁺-зависимы, поскольку их каналобразующая субъединица прямо связана с кальмодулином. Клотримазол и его производное TRAM-34 являются сильными ингибиторами IK1, отличая его от других Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов.

BK канал связан с контролем роста клеточных линий рака шейки матки, яичников, предстательной железы и молочной железы. Для глиобластомы имеющиеся в литературе данные противоречивы. С одной стороны, несколько исследований показали участие BK-каналов в пролиферации и миграции клеток глиобластомы. Однако ряд других исследований противоречат этим данным и предполагают, что BK-каналы не обязательны для пролиферации или даже обладают противоопухолевыми свойствами, в том числе в клетках глиомы. Было предложено, что помимо BK, Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы

промежуточной проводимости (IK1) регулируют скорость роста во многих типах злокачественных и незлокачественных клеток млекопитающих. Более того, ингибитор IK1 клотримазол значительно снижал опухолевую нагрузку и метастазы *in vivo* при нескольких типах рака, включая GBM. Следует отметить, что некоторые исследования ставят под сомнение функциональную экспрессию IK1 каналов в глиомах. Как видно из Рис.18, кальций-активируемые калиевые токи в клетках глиобластом из первичной культуры в пэтч-кламп конфигурации 'whole cell' ингибируются блокаторами ВК паксиллином или блокатором IK1 клотримазолом, что указывает на функциональную экспрессию этих каналов.

Для того, чтобы отделить ВК от IK1, была применена следующая тактика: в экспериментах с ВК, который может активироваться и без кальция только путем деполяризации, кальций полностью убирался из пипеточного раствора. В экспериментах с IK1, 750 нМ свободного кальция добавлялось в пипетку, а внеклеточный раствор содержал 2 мкМ ингибитора ВК паксиллина (Рис. 18). В этих экспериментах, блокаторы ВК, паксиллин и пенитрем А, ингибировали пролиферацию U251 дозозависимым образом (Рис. 19). В самой высокой протестированной концентрации (30 мкМ) оба ингибитора были цитотоксичными, т.е. снижали количество клеток ниже плотности посева. Значения IC_{50} для обоих ингибиторов были значительно выше, чем необходимых для ингибирования токов ВК. Паксиллин блокировал пролиферацию клеток на 50% при ~13 мкМ (Рис. 19), тогда как литературные данные для IC_{50} для ингибирования токов составляет ~30 нМ. Пенитрем А был несколько более эффективен и ингибировал пролиферацию уже при IC_{50} ~3,5 мкМ, но это значение также значительно превышало концентрацию (~10 нМ), необходимую для полумаксимального ингибирования активности ВК. Ингибиторы IK1 клотримазол и TRAM-34 снижали пролиферацию клеток на 50% в концентрациях ~6 и 14 мкМ, соответственно (Рис. 19). Эти значения существенно превышали значения IC_{50} 70 нМ (клотримазол) и 20 нМ (TRAM-34), полученные в электрофизиологических экспериментах другими исследователями.

Несоответствие значений IC_{50} ингибирования пролиферации и активности каналов можно объяснить разложением тестируемых веществ в культуральных средах (при 36°C в течение нескольких дней) или неспецифической абсорбцией препаратов клеточной средой при длительной инкубации. Чтобы учесть эту возможность, ингибирующие свойства культуральной среды, содержащей номинально 10 мкМ паксиллина или клотримазола были протестированы после 24-часовой инкубации в анализах пролиферации клеток. Аликвоты культуральной среды, содержащей ингибитор, были разбавлены в 10 раз электрофизиологическим внеклеточным раствором и добавлялись при электрофизиологических экспериментах. Такое разбавление было необходимо для минимизации различий между средой для культивирования клеток и внеклеточным раствором. Конечные номинальные концентрации паксиллина и клотримазола составляли 1 мкМ. Растворы паксиллина и клотримазола, продержавшиеся 24 часа в культуральной среде,

сохранили свои химические свойства и ингибировали токи ВК и ИК1 на >90% и >70% соответственно. Примечательно, что при номинальной концентрации 1 мкМ ни паксиллин, ни клотримазол не влияли на пролиферацию клеток. Более того, снижение экспрессии ВК и ИК1 РНК-интерференцией также не оказало действия на пролиферацию (см. Рис в диссертации).

Таким образом, влияние паксиллина и клотримазола (как и других ингибиторов кальций-активируемых калиевых каналов) на пролиферацию клеток вряд ли связано с их действием на активность ВК и ИК1.

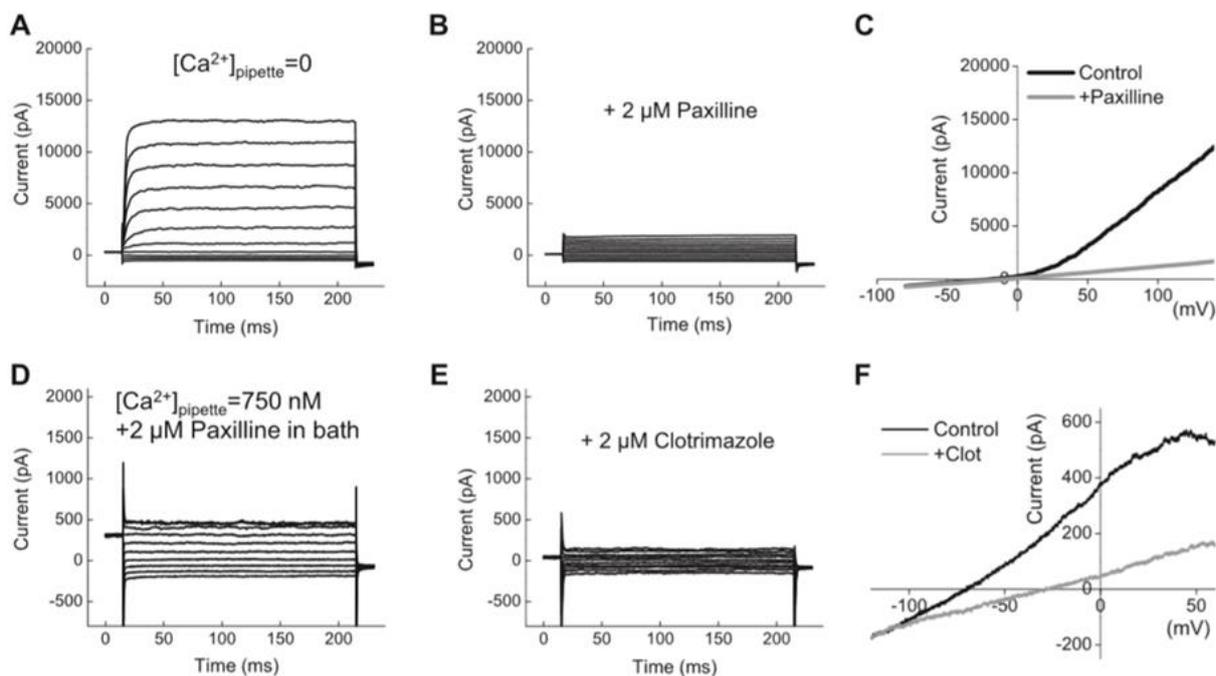


Рис. 18. Кальций-активируемые калиевые каналы ВК и ИК1 функционально экспрессированы в первичных клетках глиобластомы GBM1. А-С, электрофизиологические и фармакологические свойства ВК канала. D-F, электрофизиологические и фармакологические свойства ИК1 канала.

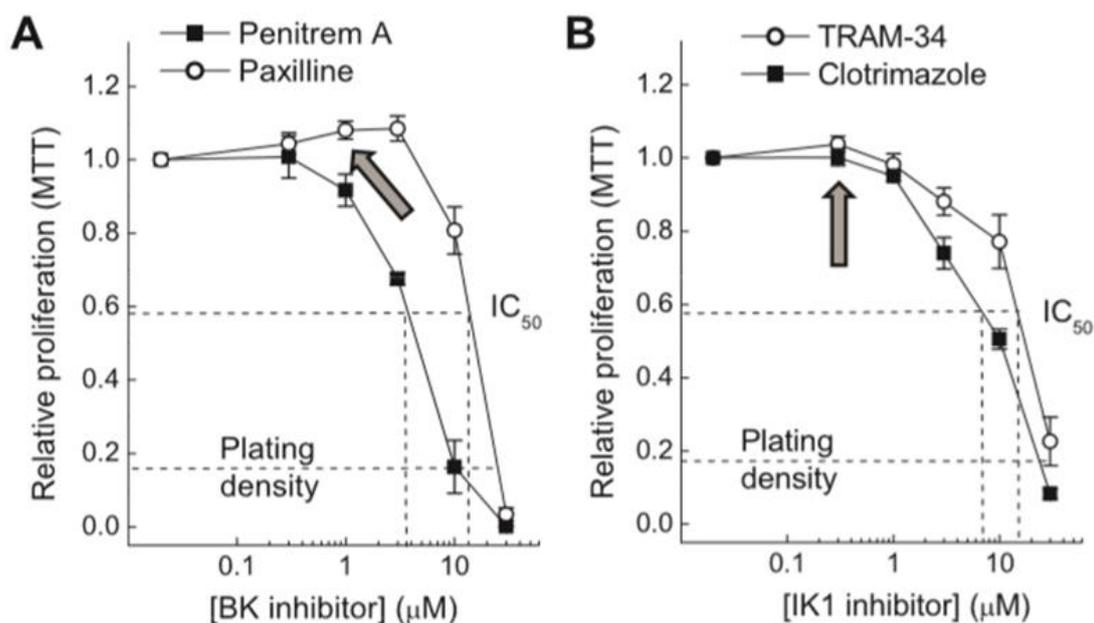


Рис. 19. Блокаторы Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов BK и IK1 дозозависимо подавляют пролиферацию клеток U251.

(А) Дозозависимый эффект действия ингибиторов BK-каналов, паксиллина и пенитрема А, на пролиферацию клеток глиомы U251. Стрелка указывает на концентрацию паксиллина, которая использовалась для полного блокирования токов K^+ в электрофизиологических экспериментах. (В) Дозо-зависимость воздействия ингибиторов каналов IK1, клотримазола и TRAM-34, на пролиферацию клеток U251. Стрелкой указана концентрация клотримазола, использованная для полной блокировки K^+ токов в электрофизиологических экспериментах.

ВЫВОДЫ

1. Детально исследован ряд каналов и транспортеров (VRAC, CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR и MDR-1) в качестве кандидатов для молекулярного пути выброса возбуждающих аминокислот из набухших астроцитов при ишемическом инсульте. Используя селективные блокаторы объем-зависимого анионного канала VRAC – DCPIB и тамоксифен, доказано, что именно VRAC является основным транспортным путем для выброса возбуждающих аминокислот из набухших астроцитов при ишемическом инсульте.

2. Впервые установлено, что ингибитор VRAC тамоксифен облегчает ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) сердца крысы после глобальной ишемии в модели инфаркта миокарда *ex vivo*. Следовательно, антиэстроген тамоксифен, уже разрешенный для применения в медицинской практике, может быть перспективен в терапии пациентов с ишемической болезнью сердца и при инфаркте миокарда.

3. Кальциевые каналы CRAC, состоящие из временно формирующихся комплексов белков Orai1 и STIM1, впервые идентифицированы как медиаторы депо-активируемого входа кальция (Store-operated Calcium Entry, SOCE) в эндотелиальных клетках, играющих ключевую роль в их пролиферации.

4. Установлено, что TRPC каналы не участвуют в SOCE в эндотелиальных и сосудистых гладкомышечных клетках, что положило конец многолетним спорам о молекулярной природе SOCE в этих клетках.

5. Впервые установлено, что в сосудистых гладкомышечных клетках (СГМК) в состоянии покоя депо-активированный вход кальция минимален, но сильно возрастает при патологическом переходе СГМК из покоящегося фенотипа к пролиферативному. Показано, что в пролиферирующих СГМК депо-активируемый вход кальция происходит через канонический путь Orai1/STIM1 и играет важную роль в пролиферации и миграции.

6. В первичных культурах клеток рака головного мозга, полученных из хирургических образцов пациентов с диагностированной мультиформной глиобластомой, STIM1 и Orai1 впервые идентифицированы как молекулярные компоненты депо-активируемого входа кальция. Установлено, что комплекс Orai1/STIM1 играет критическую роль в инвазивности первичных клеток глиобластомы.

7. Установлено, что кальций-активируемые калиевые каналы BK и IK1 функционально экспрессированы в первичных клетках глиобластомы, а также в клеточных линиях глиомы U251, U87. Ингибиторы BK каналов пенитрем А и паксиллин, а также блокаторы IK1 TRAM-34 и клотримазол значительно снижают скорость пролиферации первичных клеток глиобластомы и клеточных линий глиомы и при высоких концентрациях. Однако, при более низких (но достаточных для полного ингибирования каналов) концентрациях эти блокаторы не влияют на пролиферацию клеток. Показано, что снижение экспрессии BK и IK1 РНК-интерференцией в клетках U251 значительно подавляет калиевые токи в электрофизиологических экспериментах, но не оказывает влияние на пролиферацию.

8. В клетках рака молочной железы была впервые обнаружена гетерогенность экспрессии молекулярных компонентов депо-активируемого входа кальция в зависимости от присутствия или отсутствия эстрогенных рецепторов (ER). Впервые показано, что в ER-отрицательных клетках SOCE происходит через канонический путь Orai1/STIM1, тогда как в ER-положительных клетках SOCE «переключается» на комплекс Orai3/STIM1/2.

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

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

ABDULLAEV ISKANDAR FATKHULLAEVICH

**ROLE OF ION CHANNELS IN THE PATHOGENESIS OF
CARDIOVASCULAR DISEASES AND CANCER**

03.00.02 – Biophysics and radiobiology

**ABSTRACT OF THE DISSERTATION FOR THE DEGREE OF DOCTOR
OF SCIENCES (DSc) OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2024

The dissertation of D.Sc. has been registered with number B2023.3.DSc/B197 at the Supreme Attestation Commission at the Ministry of higher education, science and innovations of the Republic of Uzbekistan.

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

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

Scientific consultant:

Sabirov Ravshan Zairovich

doctor of biological sciences, academician

Official opponents:

Mirkhodjaev Ulugbek Zakirovich

doctor of biological sciences, professor

Kamburova Venera Seytumerovna

doctor of biological sciences

Esimbetov Adilbay Tlepovich

doctor of biological sciences, professor

Leading organization:

Institute of Bioorganic Chemistry

The dissertation will be defended on _____ 2024 year ____ at the meeting of the Scientific Council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 at the Institute of Biophysics and Biochemistry, at the National University of Uzbekistan at the following address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student`s town, University st., 174. Phone: (99871) 246-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of Biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number № ____). Address: 100174, Tashkent city, Olmazor district, Student`s town, University st., 174. Phone: (99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru; mamurjon2281@mail.ru.

The abstract of the dissertation has been distributed on « ____ » _____ 2024.

(Protocol at the register № ____ dated « ____ » _____ 2024).

Saatov Tal'at Saatovich

Vice-Chairman of Scientific Degrees Awarding
Scientific Council, D.B.Sc., academician

Pozilov Ma'murjon Komiljonovich

Scientific secretary of Scientific Degrees
Awarding Scientific Council, D.B.Sc.

Kurbannazarova Ranoxon Sharapovna

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

INTRODUCTION (abstract of DSc dissertaion)

The aim of the research work is to investigate the role of ion channels VRAC, CRAC (SOCE) and calcium-activated K⁺ channels in the development of the pathogenesis of the cardiovascular system and cancer disease.

The objects of the research work: Endothelial cells HUVEC, HPAEC, rat basophilic lymphoma RBL-2H3, vascular smooth muscle A7r5, breast cancer MCF 10A, 184A1, MDA-MB231, BT-20, HCC 1937, HCC 1500, MCF7, BT-474, T47D, ZR-75-1, brain cancer U251 MG, U87 MG, primary glioblastoma cells GBM1, GBM8, human primary astrocytes HPA.

Scientific novelty of the dissertation research is as follows:

VRAC, CIC-2, CIC-3, p-VDAC, CaCC, CFTR and MDR-1 were tested as candidates for the excitatory amino acid release pathway from swollen astrocytes. Using selective blockers, the VRAC channel was identified as a major pathway for the release of excitatory amino acids from swollen astrocytes. Because glutamate release from swollen astrocytes after ischemic stroke is associated with neuronal damage, this finding is important for the development of new pharmacological treatments for the consequences of ischemic stroke;

the VRAC inhibitor tamoxifen was found to reduce ischemia-reperfusion injury (IRI) after global cardiac ischemia in rats in *ex vivo* model of myocardial infarction, indicating an important role of VRAC channels in the development of IRI. The antiestrogen tamoxifen, already approved for medical use practice, may be promising in the treatment of coronary heart disease and myocardial infarction;

for the first time, CRAC channels were identified as mediators of store-activated calcium entry in endothelial and smooth muscle cells, important for cell proliferation and migration. CRAC channels in these cells were blocked by Gd³⁺ and high doses of 2-APB, and were also potentiated by low doses of 2-APB, which is a typical property of CRAC channels. In addition, RNA interference of Orai1 and STIM1 markedly reduced both CRAC currents and store-activated calcium entry;

for the first time, STIM1 and Orai1 were identified as important components of SOCE and CRAC in two primary glioblastoma cell lines generated from patient surgical specimens; for the first time, the critical role of STIM1 and Orai1 was demonstrated in regulating the invasiveness of glioblastoma cells with minimal effects on cell proliferation;

for the first time, calcium-activated potassium channels BK, IK1 were found to be functionally expressed in glioma cell lines U251, U87 and primary human glioma cells. The BK channel inhibitors penitrem A and paxillin, as well as the IK1 blockers TRAM-34 and clotrimazole, significantly reduced the proliferation rate of glioma and primary glioblastoma cell lines at high concentrations. Reducing the expression of BK and IK1 by RNA interference in U251 cells was shown to significantly suppress potassium currents in electrophysiological experiments, but had no effect on proliferation;

for the first time, it was demonstrated in breast cancer cells that store-activated calcium entry is mediated by the STIM1/2 and Orai3 proteins in the presence of the estrogen receptor, whereas in its absence this pathway is encoded by the canonical STIM1/Orai1.

Implementation of the research results. Based on the scientific results on the role of ion channels in the pathogenesis of cardiovascular diseases and cancer:

the results that identified VRAC channel as a major pathway for excitatory amino acid release from swollen astrocytes were referenced in journals with high impact factor in studying astrocyte metabolism in brain ischemia, determining the role of astrocytes in epilepsy, and analyzing the mechanisms of leukoencephalopathy (*Nature Neuroscience* (2007), 10(11), 1377-1386, IF – 25,0; *Neuron* (2008), 58(2), 168-178), IF – 16,2; *The Lancet Neurology* (2012), 11(11), 973-985, IF – 48,0). The use of scientific results made it possible to characterize the participation of the VRAC channel in the pathophysiology of astrocytes;

the results that identified CRACs as mediators of store-operated calcium entry (SOCE) important for cell proliferation and migration of endothelial cells were referenced in journals with high impact factor in characterizing the role of TRP channels in the vascular system, in determining the mechanism of Orai1 protein activation in breast cancer via SPCA2, and in investigating the role of Orai1 protein in endogenous TRPC channel selectivity (*Physiological Reviews*, (2015), 95(2), 645-690, IF – 33,6; *Cell* (2010), 143(1), 84-98, IF – 64,5; *Circulation Research* (2012), 110(11), 1435-1444, IF – 20,1). The use of scientific results made it possible to analyze in detail the role of the CRAC channel in the process of store-activated calcium entry into the endothelium;

the results that identified CRACs as mediators of store-operated calcium entry (SOCE) important for cell proliferation and migration of blood vessel smooth muscle cells were referenced in journals with high impact factor to describe the role of ion channels in cell migration, to determine the role of ORAI2 protein in T-cell immunity, to study the activity of STIM1 signaling system in directed cell migration (*Physiological reviews* (2012), 92(4), 1865-1913, IF – 33,6; *Nature Communications* (2017), 8(1), 14714, IF – 16,6; *Nature Cell Biology* (2012), 16(2), 133-144, IF – 21,3). The use of scientific results made it possible to conduct a detailed analysis of the role of the CRAC channel in the process of store-activated calcium entry into vascular smooth muscle;

the results that characterize CRACs in brain cancer cells and primary cultures from patients with glioblastoma multiforme were referenced in journals with high impact factor in describing the role of ion channels in cancer, the need to target cancer therapy to calcium signaling, and the physiological functions of CRAC channels (*Physiological Reviews* (2018), 98(2), 559-621, IF – 33,6; *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2017), 7(1), 3-17, IF – 14,5; *Annual Review of Physiology* (2022), 84, 355-379, IF – 18,2). The use of scientific results made it possible to construct a diagram of pathogenesis in brain cancer and the role of the CRAC channel in it;

the results identifying ORAI3 as molecular components of SOCE in breast cancer cells were referenced in journals with high impact factor in determining the relationship between cancer and calcium signaling, in investigating the involvement of STIM proteins in calcium signaling, and in describing the role of these proteins in prostate cancer (*Nature Reviews Cancer* (2017), 17(6), 373-380, IF- 78,5; *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012), 13(9), 549-565, IF – 112,7; *Cancer Cell* (2014), 26(1), 19-32, IF – 50,3). The use of scientific results made it possible to detailed molecular characterization of the role of the CRAC channel in the process of store-activated calcium entry in the pathogenesis of breast cancer;

the results investigating the role of calcium-activated potassium channels in proliferation of brain cancer cells were referenced in journals with high impact factor in describing the role of ion channels in metastasis, in determining the involvement of potassium channels in glioblastoma infiltration and chemoresistance (*Molecular Cancer* (2017), 16, 1-10, IF – 41,4; *Cell Death & Disease* (2013), 4(8), e773-e773, IF – 9,0; *Journal of Cellular Physiology* (2018), 233(9), 6866-6877, IF – 5,6). The use of scientific results made it possible to explain the discrepancies in the literature regarding the role of K⁺ channels in the proliferation of brain cancer cells.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of Introduction, five chapters, Conclusions, and References. The volume of the thesis is 209 pages.

E'LON QILINGAN ISHLAR RO'YXATI
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I bo'lim (I часть; I part)

1. Wang Y.X., Zheng Y.M., Abdullaev I.F., Kotlikoff M.I. Metabolic inhibition with cyanide induces intracellular calcium release in pulmonary artery myocytes and *Xenopus* oocytes. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2003. – 284 (2): P. 378–388 (Scopus Cite Score 9.1; Q1)

2. Zheng Y.M., Mei Q.B., Wang Q.S., Abdullaev I.F., Lai F.A., Xin H.B., Kotlikoff M.I., Wang Y.X. Role of FKBP12.6 in hypoxia- and norepinephrine-induced Ca²⁺ release and contraction in pulmonary artery myocytes. // *Cell Calcium* – 2004. – 35(4): P. 345-55 (Scopus Cite Score 8.7; Q1)

3. Abdullaev I.F., Rudkouskaya A., Schools G.P., Kimelberg H.K., Mongin A.A. Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl⁻ currents in cultured rat astrocytes. // *J. Physiol.* – 2006. – Т. 572. № Pt 3. - P. 677-89 (Scopus Cite Score 9.7; Q1)

4. Harrigan T.J., Abdullaev I.F., Jourdain D., Mongin A.A. Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. // *J. Neurochem.* – 2008. – Т. 106. № 6. – P. 2449-62 (Scopus Cite Score 9.3; Q1)

5. Abdullaev I.F., Bisailon J.M., Potier M., Gonzalez J.C., Motiani R.K., Trebak M. Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. // *Circ. Res.* – 2008. – Т. 103. № 11. – P. 1289-99 (Scopus Cite Score 29.6; Q1).

6. Potier M., Gonzalez J.C., Motiani R.K., Abdullaev I.F., Bisailon J.M., Singer H.A., Trebak M. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. // *FASEB J.* 2009. – Т. 23. № 8. – P. 2425-37 (Scopus Cite Score 9.2; Q1)

7. Motiani R.K., Abdullaev I.F., Trebak M. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Т. 285. №25. – P. 19173-83 (Scopus Cite Score 8.5; Q1)

8. Wang Z., Ginnan R., Abdullaev I., Trebak M., Vincent P.A., Singer H.A. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II delta 6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Т. 285. № 28. – P. 21303-12 (Scopus Cite Score 8.5; Q1)

9. Abdullaev I., Rudkouskaya A., Mongin A.A., Kuo Y.H. Calcium-activated potassium channels BK and IK1 are functionally expressed in human gliomas but do not regulate cell proliferation. // *PLoS One* – 2010. – Т. 5. № 8. – P. e12304 (Scopus Cite Score 6.2; Q1)

10. Shinde A.V., Motiani R.K., Zhang X., Abdullaev I.F., Adam A.P., Gonzalez-Cobos J.C., Zhang W., Matrougui K., Vincent P.A., Trebak M. STIM1

controls endothelial barrier function independently of Orai1 and Ca²⁺ entry. // *Sci. Signal.* – 2013. – Т. 6. № 267. – P. ra18 (Scopus Cite Score 9.5; Q1)

11. Motiani R.K., Hyzinski-Garcia M.C., Zhang X., Henkel M.M., Abdullaev I.F., Kuo Y.H., Matrougui K., Mongin A.A., Trebak M. STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. // *Pflugers Arch.* – 2013. – Т. 465. № 9. P. 1249-60 (Scopus Cite Score 8.8; Q1)

12. Олжаев Н.Д., Ризакулов У.Ж., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Максудов М.З., Иногамов У.К., Сабиров Р.З., Абдуллаев И.Ф. Ингибитор объем-зависимого анионного канала тамоксифен уменьшает ишемически-реперфузионное повреждение сердца крысы после глобальной ишемии *ex vivo*. // *Узб. Биол. Ж.* – 2023. – (2): С. 9-12.

II bo'lim (II часть; II part)

13. Abdullaev I.F., Pirmatova N.G., Ermanova M.SH. Kalamushlarda bir tomonlama uyqu arteriyasini permanentli okklyuziya qilib, miyada ishemik insultni kuzatish. «Проблемы биофизики и биохимии – 2022». 20 мая 2022 года в г. Ташкент, Стр.3.

14. U.K. Inogamov., I.F. Abdullaev., P.G. Merzlyak., R.Z. Sabirov. Oxidized cellulose suspension as a stimulator of intensive antibody formation. XIV international symposium Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds. October 7-8, 2021. Tashkent, Uzbekistan. P.192

15. Олжаев Н.Д., Ризакулов У.Ж., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Максудов М.З., Иногамов У.К., Сабиров Р.З., Абдуллаев И.Ф. (2023) Реперфузия в присутствии антиоксидантного ингибитора объем-зависимого анионного канала куркумина восстанавливает сократительную функцию сердца крысы после глобальной ишемии *ex vivo* // Биофизика ва биокимё муаммолари – 2023 илмий конференция материаллари, 19 май, Тошкент 2023 йил. Б.75-76.

16. Олжаев Н.Д., Ризакулов У.Ж., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Максудов М.З., Иногамов У.К., Сабиров Р.З., Абдуллаев И.Ф. (2023) Лангендорфф усули орқали юрак ишемияси ва реперфузия ҳолатларини ўрганиш // Биофизика ва биокимё муаммолари – 2023 илмий конференция материаллари, 19 май, Тошкент 2023 йил. С.176-177.

17. Абдуллаев И.Ф., Артикходжаева Б.А., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Чарышникова О.С., Сабиров Р.З. Восстановление полной реперфузии общей сонной артерии модификацией метода временной окклюзии средней церебральной артерии крысы. // Материалы научной конференции «Проблемы биофизики и биохимии – 2020». Ташкент 22 мая 2020 г., стр. 25.

18. Сабиров Р.З., Мерзляк П.Г., Курбанназарова Р.Ш., Иногамов У.К., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Циферова Н.А., Чориева Н.М., Файзиев Д.Д., Тоштемирова Г.А., Рахимова М.Б., Абдуллаев И.Ф. Биофизика и фармакология объем-зависимых анионных каналов.// Материалы научной

конференции «Проблемы биофизики и биохимии – 2020». Ташкент 22 мая 2020 г., стр. 130.

19. Irisqulov B.U., Abdullaev I.F., Makhmudov A.R., Baev A.Yu., Sariev A.U (2022). Review of methods for modelling ischemic stroke in vivo// Journal of educational and scientific medicine №1 (05), p. 24-31

20. Жумабоева М.Б., Иногамов У.К., Сабилов Р.З., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Абдуллаев И.Ф //Модель *in vivo* инфаркта миокарда у лабораторных крыс// Проблемы биофизики и биохимии – 2024 24-мая стр-78-79

21. Олжаев Н.Д., Жумабоева М.Б., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдуллаев И.Ф., Сабилов Р.З. //Хажмга боғлиқ анион канали блокаторининг лангендорфф усулида перфузияланган каламуш юрагига таъсири // Проблемы биофизики и биохимии – 2024 24-мая стр. 169

22. Олжаев Н.Д., Йўлчиев С.С., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдуллаев И.Ф., Сабилов Р.З. // Лангендорфф усули билан перфузияланган нормал ва диабетик каламушларда юрак ишемияси ва реперфузия ҳолатларини ўрганиш // Проблемы биофизики и биохимии – 2024 24-мая стр.170

23. Хамидова О.Ж., Йўлчиев С.С., Ризакулов У.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдуллаев И.Ф., Сабилов Р.З. //Диабетик каламуш моделларида тимоцитлар хажм бошқарилишини ўрганиш// Проблемы биофизики и биохимии – 2024 24-мая стр. 184-185

24. Хамидова О.Ж., Йўлчиев С.С., Файзуллаева Л.Х., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдуллаев И.Ф., Сабилов Р.З //Қандли диабетга чалинган каламуш эритроцитларнинг осмотик ва коллоид-осмотик стрессга чидамлилиги // Проблемы биофизики и биохимии – 2024 24-мая стр.185-186

Avtoreferat «O‘zbekiston biologiya jurnali» ilmiy jurnali tahririyatida
tahrirdan o‘tkazildi.

Adadi 100 nusxa. Bichimi 60x84 ¹/₁₆
Bosma tabog‘i 4,2. «Times New Roman» garniturasida.
“BOOKMANY PRINT” MCHJ bosmaxonasida chop etildi.
Toshkent shahri, Uchtepa tumani, 22-mavze, 17-b uy.