

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

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**МЕЛАНОВА НАЗИРА РАШИДОВНА**

**ХУЖАЙРАЛАРДАН ГЛУТАТИОН МОДДАСИНИНГ ЧИҚИШ  
ТИЗИМИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

**03.00.02-Биофизика ва радиобиология**

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

**Тошкент - 2018**

**Биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси  
автореферати мундаражаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора философии  
(PhD) по биологическим наукам**

**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)  
on biological sciences**

**Меланова Назира Рашидовна**

Хужайралардан глутатион моддасининг чиқиш тизимини тадқиқ қилиш.....3

**Меланова Назира Рашидовна**

Исследование системы выброса глутатиона из клеток .....21

**Melanova Nazira Rashidovna**

Investigation of the system of glutathione release from cells.....39

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ

List of published works.....43

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

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**МЕЛАНОВА НАЗИРА РАШИДОВНА**

**ХУЖАЙРАЛАРДАН ГЛУТАТИОН МОДДАСИНИНГ ЧИҚИШ  
ТИЗИМИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ**

**03.00.02-Биофизика ва радиобиология**

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

**Тошкент – 2018**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2017.2.PhD/В79 рақами билан рўйхатга олинган.**

Диссертация Биоорганик кимё институтида бажарилган.

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

**Илмий раҳбар:**

**Сабилов Равшан Заирович**  
биология фанлари доктори, академик

**Расмий оппонентлар:**

**Арипов Тахир Фатихович**  
биология фанлари доктори, академик

**Урманова Гулбахор Урунбоевна**  
биология фанлари номзоди, доцент

**Етакчи ташкилот:**

**Андижон давлат университети**

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

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (\_\_\_\_\_ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч.,83. Тел.: 2623540, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: [asrarov54@mail.ru](mailto:asrarov54@mail.ru)).

Диссертация ва автореферат 2018 йил \_\_\_\_\_ кунни тарқатилди.  
(2018 йил \_\_\_\_\_ даги \_\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

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

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

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

## **КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)**

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Жаҳонда бугунги кунда аутокрин ва паракрин сигнал узатилиши жараёнида бирламчи мессенжер сифатида ҳужайра ички метаболитларининг иштирокини аниқлашга бағишланган тадқиқотлар сони ортиши кузатилмоқда. Жумладан, бу йўналишда бажарилган тадқиқотлар орасида АТР ва глутамат кислоталарининг ролини тадқиқ этишга катта эътибор қаратилмоқда. Маълумки, барча тирик ҳужайралар АТР молекуласини энергия манбаи сифатида турли биологик жараёнларда ишлатади. Лекин, оз миқдордаги АТР ҳужайрадан ташқарисига турли физиологик ҳолатларда чиқарилади. Деярли барча турдаги ҳужайралар сатҳида АТРни специфик тарзда боғловчи пуринаргик  $P_2$  рецепторлар мавжуд бўлиб, ҳужайрадан чиққан АТР шу рецепторлар билан боғланади ва натижада сигнал ҳужайра ичкарасига узатилади. Глутамат кислотаси ҳам ҳужайра ички метаболити бўлибгина қолмай, балки ҳужайра ташқарисига чиқарилади ва глутаматэргик ионотроп ва метаботроп рецепторлар орқали ҳужайралараро сигнал узатилишида иштирок этади. Пуринаргик ва глутаматэргик сигнал узатилиши турли хил физиологик ва патофизиологик ҳолатларда буйрак, юрак ва мия тўқималарда катта аҳамиятга эга.

Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида тирик ҳужайра цитоплазмасидаги метаболитлар ва уларнинг бирламчи мессенжер сигнал молекулалар сифатидаги роли тадқиқ қилинмоқда. Булардан бири – глутатион (GSH) – трипептид (гамма-глутамилцистеилглицин) тузилишига эга бўлиб, барча тирик ҳужайраларда учрайдиган эркин тиол ва қуйи молекуляр антиоксидант ҳисобланади. У бир қанча биологик жараёнларда иштирок этиб, ксенобиотикларни қайтарилишини таъминлайди, гидропероксидаза фаоллигини бартараф этади ва цитозол оқсилларидаги сульфидрил группаларнинг қайтарилган ҳолатини сақлаб туришда иштирок этади.

Мамлакатимизда ҳозирги кунда илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали усуллари яратилмоқда. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, оқсиллар ҳосил қиладиган нано-поралар, ион каналларини аниқлаш борасида натижаларга эришилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Харакатлар стратегиясида «илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш» такидланган, бунда ҳужайра ташқи муҳитидаги глутатионининг роли ва лимфоид ҳужайраларидан чиқиш йўллари аниқлаш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ва 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Харакатлар

стратегияси тўғрисида» ги Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида ҳужайра ички ва ташқи глутатионининг роли бўйича изланишлар олиб борилмоқда (Zhang, Forman, 2017; Franco, Cidlowski, 2014). Охирги йилларда глутатионнинг ҳужайрадаги функцияларини ва унинг ҳужайрадан чиқиш механизмларини ўрганишда сезиларли ютуқларга эришилди. Бу ривожланиш пэтч-кламп, флуоресцент ва ингибитор таҳлил каби янги тадқиқот усуллари ишлаб чиқилиши билан боғлиқ.

МДҲ давлатларида К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский, А.П. Баврина, В.А. Мочин, С.Л. Малиновская томонидан глутатионнинг имуномодуляторлик хусусияти билан боғлиқ илмий изланишлар олиб боришмоқда. Бироқ, эришилган ютуқларга қарамасдан, ҳужайралардан глутатион чиқиш механизмлари билан боғлиқ бир қатор саволлар ечимсиз қолмоқда

Республикамизда глутатион моддасининг ҳужайрадан чиқиш механизмлари тадқиқ қилинмаган. Хусусан, осмотик стресс шароитида фаолланувчи анион каналларининг манфий зарядланган глутатион моддасининг транспортидаги роли жаҳон адабиётида ёритилмаган ва шу сабабдан ушбу илмий изланишнинг асосий мавзусини ташкил этадиган тадқиқотларни амалга ошириш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-ФЗ-Т112 «Ҳайвонлар ва ўсимликлар ҳужайралари ҳажми бошқарилишининг биофизик механизмлари» (2007-2011) ҳамда ФТҚФ 43-10 «Тимоцитлардан глутатион ажралиш механизмида ион каналлари ва транспортерларнинг ролини ўрганиш» (2010-2011) мавзусидаги фундаментал лойиҳалар доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** ҳужайралардан глутатион моддасининг нормал ҳамда гипоосмотик стресс шароитида чиқиш жараёнини тавсифлаш ва ушбу жараёнда ион каналлари ва транспортерларнинг иштирокини аниқлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

осмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишини аниқлаш усулини йўлга қўйиш ва ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг нормал ва гипоосмотик стресс шароитларидаги миқдорини аниқлаш;

хужайра ташқарисидаги глутатион даражасини суспензиядаги хужайралар сони, осмотик градиент, инкубация вақтига, муҳитнинг ионлар таркиби ва муҳит ҳароратига боғлиқлигини аниқлаш;

ион каналлари ва транспортерларнинг глутатион чиқишидаги ролини ингибиторлар таҳлили орқали аниқлаш;

осмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишига аденилатциклаза тизимининг таъсирини аниқлаш;

турли хил хужайралардан глутатион чиқиш тавсифини таққослаш;

хужайра ташқарисидаги глутатионнинг хужайранинг физиологик функцияларига таъсирини аниқлаш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида зотсиз, 6-8 ҳафталик, ёш оқ каламушлардан ажратилган тимоцитлар, одам қизил қон хужайралари ва сичқон меланома тери рак хужайрасининг культураси (КМЛ линияси) олинди.

**Тадқиқотнинг предмети** нормал шароитда ва гипоосмотик стрессда глутатион чиқиш механизмларини аниқлаш ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тажрибаларда замонавий биофизик ва биокимиявий усуллардан фойдаланилди. Тимоцитлар ва қизил қон хужайралари стандарт методлар ёрдамида ажратилди. Глутатион чиқиши миқдори 5,5-дителиобис 2-нитробензой кислотасининг глутатион билан реакциясига асосланган колориметрик методи ёрдамида аниқланди. Хужайра ҳажми суспензиянинг ёруғликни ўтказиши бўйича аниқланди. Гемолиз миқдори спектрофотометрда гемоглобиннинг чиқиши бўйича аниқланди.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қўйидагилардан иборат:

тимоцит цитозолидан хужайра ташқи муҳитига нормал изотоник шароитида, ҳамда гипоосмотик стресс таъсирида катта миқдорда глутатионнинг чиқиши кўрсатилган ва ушбу жараён батафсил тавсифланган, осмореактив глутатион чиқарилишининг фаолланиш энергияси аниқланган;

тимоцитлардан глутатион чиқишида ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг асосий роли, ҳамда SLCO/OATP ва SLC22A/OAT транспортерларнинг сезиларли иштироки исботланган;

тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига хужайра ичидаги ц-АМФ нинг роли аниқланган;

осмотик стрессга сезгир глутатион транспорти бошқа хужайраларда (эритроцитлар ва меланома) ҳам мавжудлиги ва хужайра ташқарисидаги глутатионнинг хужайра физиологик функцияларига таъсири исботланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қўйидагилардан иборат:

тимоцит хужайраларидан нормал ва гипоосмотик стресс шароитларида катта миқдорда глутатион моддаси чиқиши аниқланган ва унинг умумий тавсифи берилган;

систематик тарзда хужайра ташқариси глутатион даражасининг хужайра суспензияси концентрациясига, осмотик градиент, инкубация вақтига, муҳит ионлар таркиби ва муҳит ҳароратига боғлиқлиги аниқланган;

гипоосмотик стресс шароитида глутатионнинг ҳажмга боғлиқ ион каналлари орқали чиқиши специфик фармакология воситасида аниқланди ва

бунда анион транспортерларининг иккиламчи роли кўрсатилган, аденилатциклаза фаоллашуви глутатион чиқарилишига манфий таъсир этиши намоён қилинган;

осмо-реактив глютион транспорти бошқа турдаги хужайраларда ҳам (эритроцитлар ва меланома) мавжудлиги ва хужайра ташқарисидаги глутатионнинг хужайранинг ҳажм бошқарилиши тизимини модуляциялаши исботланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончилиги** тадқиқотларни замонавий биофизик-биокимёвий тадқиқот усулларини қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Назорат ва тажрибада олинган ўртача қийматлар орасидаги фарқ Стюдент t-тести ёки вариацион таҳлил (ANOVA) бўйича ҳисобланди ва қийматлар фарқининг статистик ишончилиги  $P < 0,05$  даражасида ифодаланди, натижалар таҳлили ва расмларни чизиш OriginPro 7,5 (OriginLab Pro) компьютер дастури ёрдамида амалга оширилди. Олинган натижаларнинг исботи уларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси, натижалар рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши билан изоҳланади.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти тимокит цитозолидан хужайра ташқи муҳитига нормал изотоник шароитида, ҳамда гипоосмотик стресс таъсирида глутатионнинг чиқишини тушунишда аҳамиятга эга. Ушбу жараённинг кинетик параметрлари ҳамда унинг ҳароратга боғлиқлиги глутатион чиқишининг бир нечта турдаги механизмлари мавжудлигидан далолат беради. Глутатион чиқишида ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг асосий роли, ҳамда ABCG/MDR, SLCO/OATP ва SLC22A/OATP транспортерларнинг сезиларли иштироки аниқлаш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундаки тадқиқот натижалар асосида глутатион чиқишининг янги ва самарали таъсирга эга ингибиторларининг кашф этилиши мумкин. Тадқиқотимизда асосан қўлланилган тимокитлар тимусдаги иммун статусининг марказий иштирокчисидир. Ҳозирги пайтда хужайра ташқарисидаги глутатионнинг нормал физиологик шароитда ва патология жараёнидаги иммун жавобни шакиллантиришидаги роли ҳали яхши тушунилмаган. Глутатион чиқишининг фармакологик моддалар ёрдамида модуляцияси янги иммуностимулятор ва иммуносупрессорлар яратилиши ва патологик жараёнларда иммунотерапиянинг муҳим асоси бўлади. Демак, олинган натижалар амалий фармакология ва терапияда катта аҳамиятга эга. Бундан ташқари, натижалардан олий ўқув юртлари талабалари учун биофизика ва физиология фанларидан дарсликлар, ўқув қўлланмалари яратишда ва мазкур предметлардан дарс бериш жараёнида унумли фойдаланиш мумкин.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Хужайралардан глутатион моддасининг чиқиш тизимини тавсифлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:



тимоцитлардан глутатион чиқишида ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг асосий роли бўйича олинган маълумотлар хориждаги импакт-фактори юқори илмий журналларда ион каналларнинг хужайравий жараёнларида иштирокини таҳлил қилишда фойдаланилган (*Cellular Physiology and Biochemistry* 2013, V.32, ResearchGate, IF – 4.18; *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF – 3.33; *Journal of General Physiology* 2015, V.146, ResearchGate, IF – 1.51). Илмий натижаларнинг қўлланилиши ион каналлари хужайра физиологиясидаги иштирокини тафсифлаш имконини берган;

тимоцитлардан глутатион чиқишида SLCO/OATP ва SLC22A/OAT транспортерларнинг сезиларли иштироки бўйича олинган маълумотлар хориждаги импакт-фактори юқори илмий журналларда транспортерларнинг хужайравий жараёнларида иштирокини таҳлил учун фойдаланилган (*Current Drug Metabolism* 2015, V.468, ResearchGate, IF – 2.74; *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF – 3.33; *Neurotoxicology* 2014, V.41, ResearchGate, IF – 1.93;). Илмий натижаларнинг қўлланилиши транспортерларнинг хужайра физиологиясидаги иштирокини тафсифлаш имконини берган;

хужайралардан глутатион моддасининг чиқиш тизимини тавсифлаш бўйича олинган илмий натижалардан Ф-5-06 рақамли «Баъзи бир биорегуляторларнинг таъсир механизмини ўрганиш» илмий лойиҳасида (2012-2016) хужайралар ва органелларага биорегулятор моддаларнинг таъсирини таҳлил қилишда, ҳамда биорегулятор моддаларнинг организмга таъсир механизмларини аниқлашда фойдаланилган (Фан ва технологияларни ривожлантиришни мувофиқлаштириш қўмитасининг 2017 йил 20 ноябрдаги ФТА-02-11/1122–сон маълумотномаси). Илмий натижаларнинг қўлланилиши биорегулятор моддаларнинг организмга таъсир механизмларини аниқлаш имконини берган.

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

**Тадқиқот натижаларнинг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 14 та илмий иши чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 7 та мақола, шундан 6 та республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация таркиби кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 102 бетни ташкил этган.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари

тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Хужайралар ички ва ташқи муҳитида глутатионинг аҳамияти ва унинг биосинтези»** деб номланган биринчи бобида глутатион моддасининг умумий характеристикаси ва унинг биосинтез йўли, хужайра ички ва ташқи муҳитидаги глутатион моддасининг биологик роли ҳақидаги маълумотлар келтирилган. Шунингдек хужайрадан хужайра ташқи муҳитига глутатион моддасининг чиқиши ва унинг механизми, бу жараёнда иштирок этувчи ион каналлари ва транспортёрлар тўғрисидаги сунги адабиётларда келтирилган маълумотлар берилган.

Диссертациянинг **«Хужайраларни ажратиб олиш, глутатионни миқдори ва таъсир механизмларини аниқлаш усуллари»** деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларни олиб бориш босқичлари, уларнинг бажарилишида фойдаланилган материаллар ва услублар келтирилган. Хусусан, тажрибаларимизда қуйидаги таркибли эритмалардан фойдаланилди. Нормал Рингер эритмаси таркиби (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 глюкоза, pH 7,4 (290±2 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Гипотоник эритмалар (40-290 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) нормал Рингер эритмасига турли хил миқдорда таркиби қуйида келтирилган буфер эритмани аралаштириб тайёрланди (мМ): 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 глюкоза, pH 7,4 (40±2 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Тажрибалар зотсиз (100-150 гр), виварийда оддий парҳезда боқилган, 6-8 ҳафталик оқ каламушларда олиб борилди. Тимоцитлар стандарт метод асосида ажратиб олинди ва яшовчанлигини аниқлашда кўк трипан эритмаси фойдаланилди. Тажрибаларимизда ўлик хужайралар сони 5%дан ошмади. Хужайралар Рингер эритмасида сақлаб, 3-5 соат ичда фойдаланилди. Глутатион чиқиши миқдорий колориметрик методи билан аниқланди. Бунда глутатион (GSH) 5,5-дитиобис 2-нитробензой кислота (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid, DTNB) реагенти таъсирида GSSG гача оксидланади ва 5-тио-2-нитробензой кислота (5-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB) ҳосил бўлади. Реакциянинг охириги маҳсулоти сариқ рангли TNB бўлиб, у спектрофотометрнинг 425 нмли тўлқин узунлигидаги ёруғликни ютилиши орқали ўлчанди. Глутатионредуктаза ва НАДФН хузурида GSSG узлуксиз равишда рециклизация бўлади. Шунинг учун умумлаштирилган реакцияда глутатион НАДФН ҳисобига DTNBнинг TNBга қайтарилишида катализатор ролини бажаради, ва бу реакциянинг тезлиги глутатион концентрациясига микромоляр диапазонда тўғри пропорционал.

Тажрибада хужайра ҳажмини ёруғлик ўтказувчанлиги бўйича қайд қилиш усули қўлланилган. Тимоцитлар ҳажми ўзгаришини микроколориметр МКМФ-1 ёрдамида қайд қилинди. Ютилиш максимуми 610 нм бўлган ёруғлик фильтри қўлланилди. Микроколориметрда ўлчанган сигнал У5-11

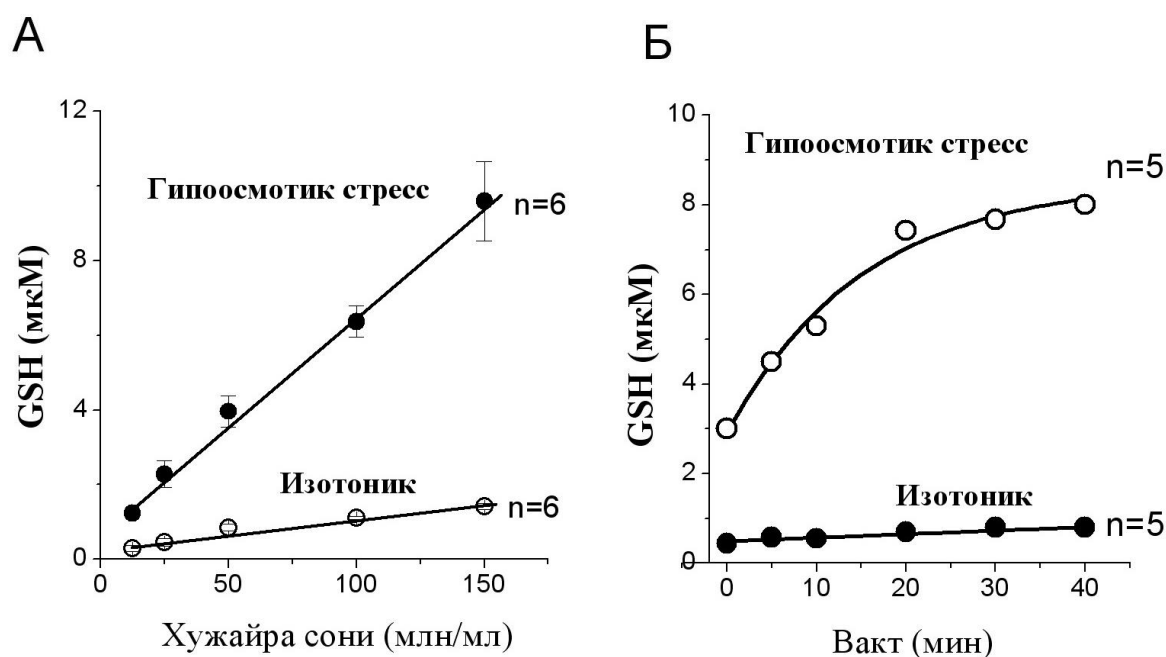
операцион кучайтиргичи ёрдамида кучайтирилди ва GO!Link (Qubit Systems, Канада) аналог-рақам конвертори орқали компьютерга (Pentium IV) узатилиб, Logger Lite (Qubit Systems, Канада) махсус дастури ёрдамида 100 Гц частотасида қайд қилинди.

Одам қони умумий усулда кўнгиллилардан олинди ва 4% ли суспензия тайёрланиб, 540 нм тўлқин узунлигида гемоглобин чиқиши аниқланди. Меланома тери рақ хужайралари культураси (КМЛ, патент № IAP 02729) ЎзФА Биоорганик кимё институти ходими Кузнецова Н.Н. томонидан тақдим этилди. Хужайраларни ўстириш учун RPMI-1640 (HIMEDIA) муҳитидан фойдаландик. Муҳитга 10% бузоқ эмбриони қони зардоби,  $\text{NaHCO}_3$ , антибиотиклар ва глутамин қўшилди. Хужайралар  $37^\circ\text{C}$  да оддий термостатда сақланди ва моноқават 2-3 кундан сўнг ҳосил бўлди.

Диссертациянинг «**Хужайралардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига таъсир этувчи омиллар ва механизмлари**» деб номланган учинчи бобда тимоцитлардан глутатион моддасини чиқиш системасининг умумий характеристикаси, жараённинг эритма ион таркибига боғлиқлиги, анион каналлари блакаторларининг таъсири, мембрана транспортёрларининг ва хужайра ичидаги цАМФ нинг роли, гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига ва қизил қон хужайралари коллоид-осмотик чидамлилигига хужайра ташқарисидаги глутатион моддасининг таъсири тадқиқ қилинди.

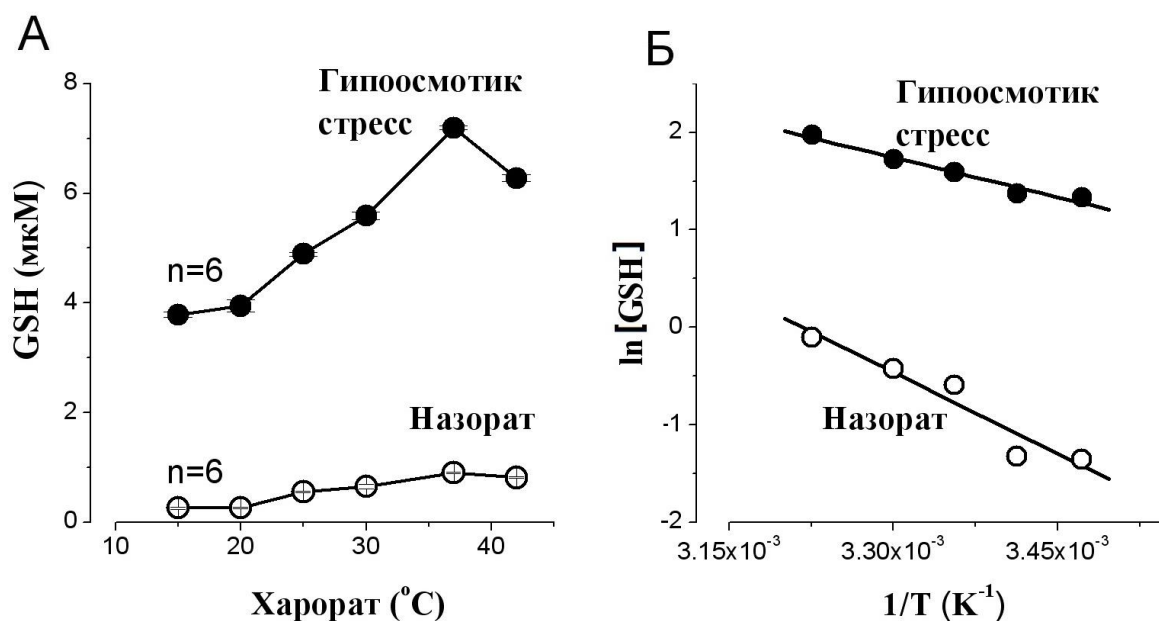
*Тимоцитлардан глутатион моддасини чиқиш системасининг умумий характеристикаси.* Биз тадқиқотларимизда тимоцитлардан хужайра ички суюқлигидаги глутатионнинг чиқишини ҳатто нормал изоосмотик шароитида инкубация давомида стимуляция бўлмаганда ҳам қайт этдик. Бунда нормал шароитида 12,5 млн/мл хужайрадан 10 минут давомида, хужайра ташқи муҳитига  $0,29 \pm 0,07$  мкМ ( $n=6$ ) глутатион ажралди, хужайра концентрацияси 100 млн/мл бўлганда эса  $1,11 \pm 0,04$  мкМ ( $n=6$ ) глутатион ажралиб чиқди. Гипоосмотик стресс ( $147 \text{ мОсм/кг H}_2\text{O}$ ) шароитида глутатион чиқиш тезлиги кескин ортганини кузатдик, яъни 12,5 млн/мл хужайрдан 10 минутда  $1,23 \pm 0,09$  мкМ ( $n=6$ ), 100 млн/мл да эса  $6,37 \pm 0,04$  мкМ ( $n=6$ ) глутатион ажралиб чиқди. Глутатионнинг хужайра ички суюқлигидан чиқишининг хужайра сонига боғлиқлиги гипоосмотик стресс шароитида ҳам, нормал шароитдаги каби чизикли кўринишга яқин бўлди, 1А-расмда кўрсатилган. Бу бизнинг тадқиқотларимизда хужайра ички суюқлигидан глутатион чиқиши манбаи айнан тимоцитлар эканлигини исботлайди.

Глутатион чиқиши кинетикаси изотоник ва гипотоник шароитида сезиларли даражада фарқ қилди. Бунда нормал изотоник шароитида глутатион чиқиши вақтга боғлиқ ҳолда аста секин ошишини кўзатилди, гипотоник муҳитга қўшилиши билан глутатион миқдори кескин орти ва вақт ўтиши билан хужайра ташқи муҳитидаги глутатион миқдори янада ошиб, тахминан 20 минут мобайнида стационар даражасига етди (1Б- расм). Бундай икки фаза кинетика глутатионнинг тимоцитлардан чиқарилишининг камида икки хил механизми мавжудлигидан далолат бериши мумкин



**1-расм. Нормал изотоник ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) шароитда тимоцит хужайраларидан хужайра сонига (А: инкубация вақти 10 минут) ва вақтга (Б: хужайра сони 100 млн/мл) боғлиқ ҳолда глутатион чиқиши. Тажрибалар 25°С ҳароратда олиб борилди, барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  (n=5).**

Тажриба муҳитининг ҳарорати нормал ҳолатда ҳам, гипоосмотик стресс шароитида ҳам глутатион чиқишига сезиларли таъсир кўрсатди. Тимоцитлардан глутатион чиқиш миқдори иккала шароитда ҳам ҳарорат ортиши билан 15<sup>0</sup>Сдан 37<sup>0</sup>Сгача бўлган диапазонда текис ортди. 42<sup>0</sup>С ҳароратда хужайрадан глутатион чиқиш тезлиги камайди, бу ҳолат температура шоки таъсирида глутатион чиқариш системасининг бузилишини ўзида акс эттиради (2А-расм). 15-37<sup>0</sup>С диапазондаги ҳароратга боғлиқлик Аррениус координаталарида чизиқли бўлиб, жараённинг фаоллашув энергияси изотоник глутатион чиқиш жараёни учун  $11,1 \pm 1,8$  ккал/моль, ва гипоосмотик стресс шароити учун  $5,4 \pm 0,6$  ккал/мольни ташкил этди (2Б-расм). Фаоллашув энергиясидаги бундай катта фарқ бу икки тажриба шароитидаги глутатион чиқиш механизмларнинг турлича эканлигидан далолат беради. Гипоосмотик шароитдаги нисбатан паст фаоллашув энергияси, осмотик босим таъсирида шишган хужайралар мембранасидаги ион каналлари иштироки билан амалга ошувчи глутатион транспортининг диффузион механизми борлигидан далолат беради.



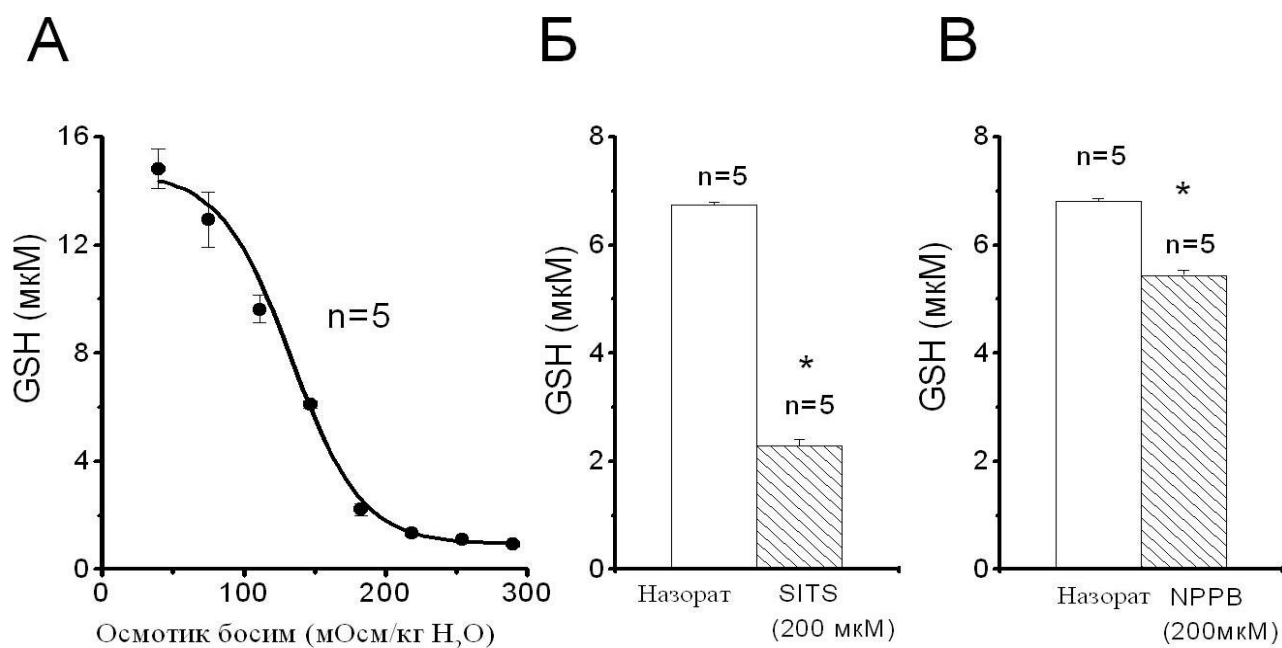
**2-расм.** Нормал изотоник ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) шароитда тимоцит хужайраларидан хароратига боғлиқ холда (А) оддий кордината (Б) Аррениус кардинатасида глутатион чиқиши. Хужайра сони 100 млн/мл, инкубатция вақти 10 мин. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n=6$ ).

Хужайра ички суюқлигидан глутатион чиқиши муҳитининг осмотик босимига боғлиқлиги сигмоид характерга эга бўлиб, 50% глутатион чиқиши муҳитининг осмотиклиги 125,1±4,3 мОсм/кг H<sub>2</sub>Oга тенглиги кузатилди (3А-расм). Кейинги тажрибаларда гипоосмотик эритма осмотиклиги 147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O дан иборат бўлди.

*Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқиши механизмини ўрганиш.* Глутатион молекуласи манфий зарядга эга ва шу сабабли назарий жихатдан анион транспорт системалари орқали хужайра ташқи муҳитига чиқарилиши мумкин. Дарҳақиқат, кенг таъсир спектрига эга бўлган анион транспорти блокаторлари SITS (4-ацетиамидо-4-изотиоцианатостилбен-2,2-дисульфон кислотаси) ва NPPB (5 нитро-2-(3-фенилпропиламино) бензой кислотаси) гипоосмотик стресс шароитида нормал изоосмотик шароитдаги каби глутатион чиқишини сезиларли даражада камайтирди. Бунда гипоосмотик стресс шароитида 200 мкМ концентрацияда SITS ва NPPB хужайри ички муҳитидан глутатион чиқишини назоратга нисбатан 66,0±5,3% ва 18,8±1,7%га камайтирди (3.Б- ва В-расм).

Маълумки, хужайраларда осмотик стресс ҳолатида асосан икки хил анион каналлари фаоллашади, улар: ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали ва макси-анион канали. Gd<sup>3+</sup> (50 мкМ) ионлари анион каналлари орасидан фақатгина макси-анион каналлини блоклаб, тимоцитларда глутатион чиқарилишига сезиларли таъсир ўтказмади, бу эса мазкур каналнинг глутатион чиқарилиш жараёнида иштирок этмаслигини кўрсатади. Айни вақтда ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали блокаторлари -

флоретин (200 мкМ), 4-(2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил 1-индан-1-он-5-ил) оксимой кислотаси (DCPIВ) (20 мкМ), тамоксифен (50 мкМ) ва глибенкламид (200 мкМ) тимоцитлардан глутатион чиқишини сезиларли даражада сусайтирди. Хусусан, гипоосмотик стресс шароитида флоретин моддаси глутатион чиқишини 61,9±2,3 %га ва DCPIВда 35,8±2,0 %га, глибенкламид эса 14,2±1,2 %га камайтирди 4 А,4 Б- ва 4 В-расмлар). Бу натижалар ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг глутатион транспортида асосий рол ўйнашини кўрсатади.

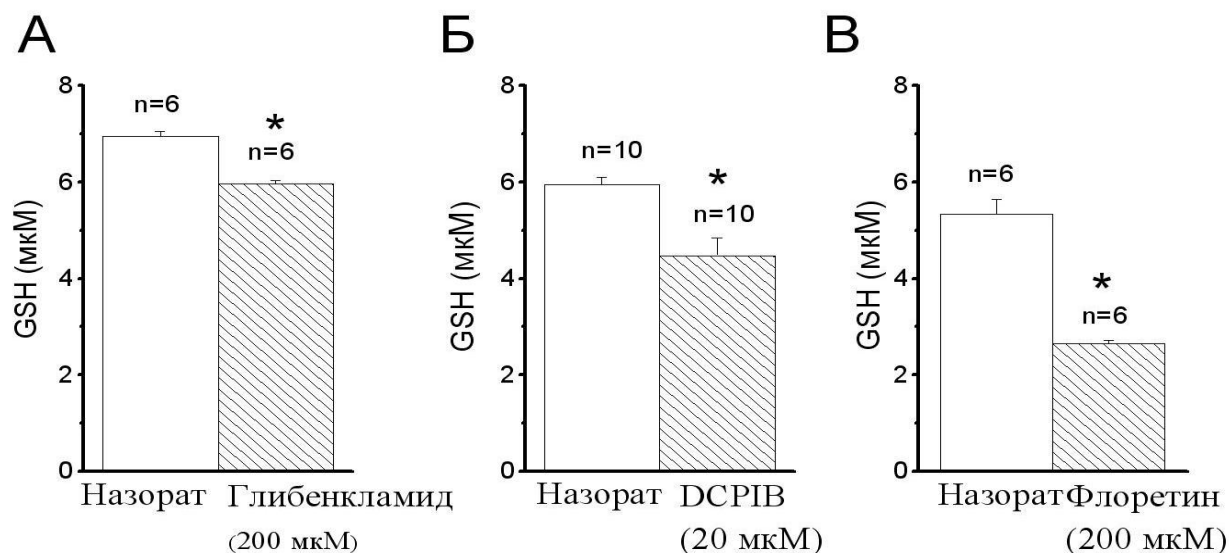


**3-расм. Глутатион чиқишига осмотик босимнинг (А) ва анион транспорти блокатори SITS (200мкМ) (Б), NPPB (200 мкМ) нинг (В) таъсири. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).**

Глутатионнинг трансмембрана ўтказилишида нафақат ион каналлари, балки анион транспортерлари ҳам иштирок этиши мумкин. Маълумки, ABCС/MRP мембрана оксиди АТФаза бўлиб, АТФ гидролизи ҳисобига ҳужайрадан органик анионларни чиқаради. Лекин тажрибаларимизда мазкур оксид субстратор бўлган ва ҳужайра ташқи томонидан кўшилиши орқали унинг функциясини бостирувчи пробенецид, глутатион чиқарилишини ингибирланиши эмас, балки 6,8±1,3% га стимулланишига олиб келди (5А-расм).

Бундай натижа бир томондан ABCС/MRPнинг глутатион чиқарилишидаги ролига қарши гувоҳлик берса, бошқа томондан бошқа анион транспортерининг мавжудлигини кўрсатади, ва у алмаштирувчи бўлиб, унинг фаоллиги мембрананинг ҳужайра ташқи томонида субстрат мавжудлигида ортади. Дарҳақиқат, пробенецид нафақат ABCС/MRP учун, балки органик анионлар транспортери SLCO/OATP учун ҳам субстрат бўлиб, улар мембранадан қарама-қарши томондан анионлар алмашади. Мазкур

транспортернинг ролини тасдиқлаш учун бошқа SLCO/OATP субстрати – тауроҳолат кислотаси иштирокидаги глутатион чиқишини тадқиқ қилдик. Тажрибаларимизда мазкур модда ҳам глутатион чиқишини  $13,2 \pm 2,1$  %га транс-стимуляциясини юзага келтирди (5Б-расм).

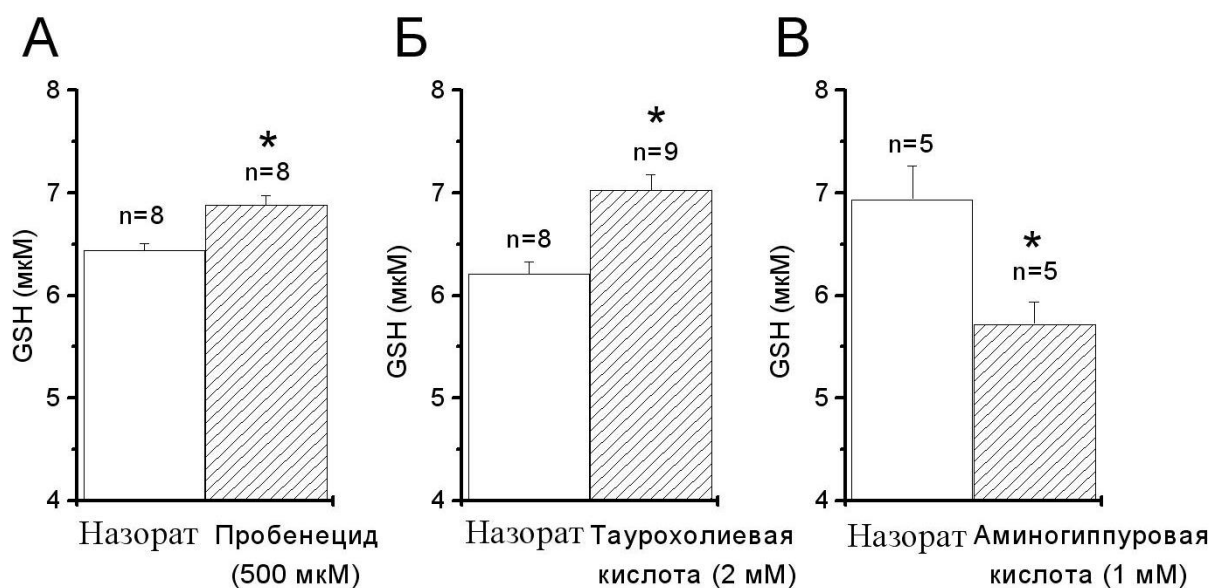


**4-расм. Тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори глибенкламид (200 мкМ) (А), DCPIB (20 мкМ) (Б) ва флоретин (200 мкМ) (В) нинг таъсири. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).**

SLC22A/OAT мембрана оксиди анионлар учун натрийга боғлиқ транспортерлар гуруҳига мансуб бўлиб, аминокислотадан ингибирланади. Тажрибаларимизда мазкур модда глутатион чиқишини  $17,5 \pm 3,8$  %га камайтирди (5В- расм). Шундай қилиб, олинган натижалар тимоцитлардан глутатион чиқарилиши гипоосмотик стресс шароитида бир неча транспорт йўлларида амалга оширилишини кўрсатади. Мазкур жараёнда асосий ролни ташқи ўтказувчан ҳажмий боғлиқ анион каналлари бажариб, глутатион чиқарилишининг 60%и айнан шу каналлар орқали содир бўлади. Қолган қисми эса хужайралардан SLCO/OATP ва SLC22A/OAT каби транспортерлар орқали амалга оширилиши мумкин. Кўринишича, бизнинг тажриба шароитларимизда ABCС/MRP АТФазаси глутатион чиқарилишида иштирок этмайди.

Маълумки, аденилатциклаза тизими муҳим хужайра ички жараёнларини башқаради. Биз тадқиқотларимизда хужайра ичидаги цАМФ концентрациясини уч хил усулда кўпайтирдик: 1) цАМФнинг мембранадан ўтувчи ҳосиласи-дибутирил-цАМФ (0,1-1 мкМ) 2) аденилатциклаза активатори бўлган форсколин (10 мкМ) 3) фосфодиэстераза ингибитори теофиллин (3 мМ). Барча ҳолатларда биз глутатион чиқишини сезиларли даражада пасайишини кузатдик, яъни теофиллин 10% га дибутирил-цАМФ (0,1 мкМ) эса 32% гача камайтирди. Бу натижалар гипоосмотик стресс

шароитида глутатион ажралиш механизмида аденилатциклаза системалари билан (яъни цАМФга боғлиқ гармонал системаларга ) чамбарчас боғлиқлигини билдиради.



**5-расм. Тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига АВСС/MRP мембрана транспортери субстрати пробеницид (500 мкМ) (А), органик анион ташувчи полипептид SLCO/OATP субстрати таурохолат кислотаси (2 мМ) (Б), SLC22A/OAT мембрана оқили ингибитори аминогиппур кислотасининг 1 мМ) (В) таъсири. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n=5$ ).**

*Турли хил ҳужайралардан глутатион чиқиш характеристикасини таққослаш.* Юқоридаги олинган натижалар тимоцит хужайраларидан нормал шароитида ҳам, гипотоник стресс шароитида ҳам массив равишда глутатионнинг хужайрадан ташқарисига чиқарилишидан далолат беради.

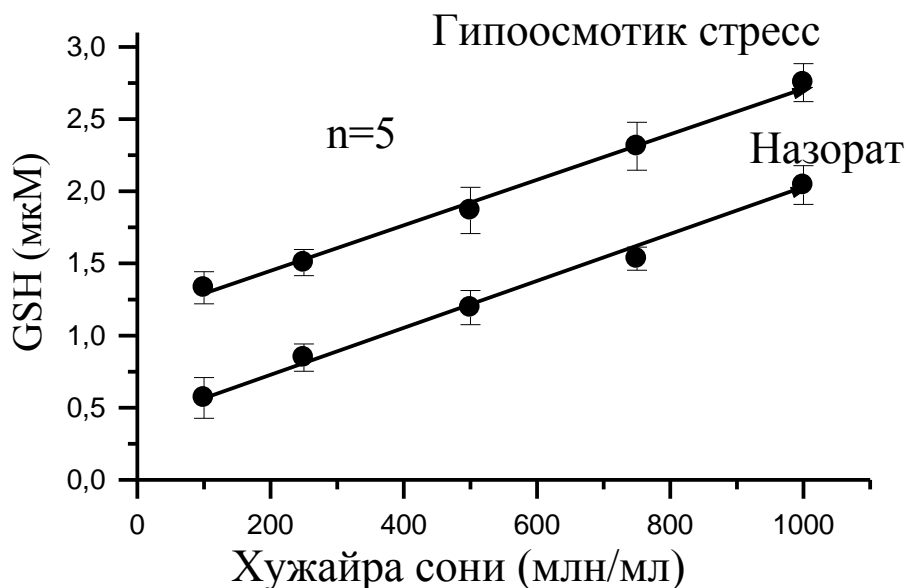
Таббий савол туғиладики, бошқа турдаги хужайралардан ҳам глутатион ташқарига чиқадими? Бу саволга жавоб бериш учун тадқиқотларимизда биз одам қизил қон хужайраларидан глутатион моддасининг чиқишини 20 минут давомида хужайра сонига боғлиқлиги аниқландик. Нормал шароитда хужайралар сони 100 млн/мл бўлганда хужайралардан  $0,57 \pm 0,14$  мкМ ( $n=5$ ) глутатион ажралган бўлса, гипоосмотик стресс шароитида  $1,33 \pm 0,11$  мкМ ( $n=5$ ) ажралди (6-расм). Хужайра сони 100 млн/мл дан 1 млрд/мл гача ўзгартирилганда хужайра ички глутатион концентрацияси чизикли тарзда ошиб борди.

Натижаларимиз таҳлилидан битта қизил қон хужайрадан глутатион чиқиш тезлиги нормал шароитда  $0,09 \times 10^{-15}$  г/мин, гипоосмотик стресс шароитида эса  $0,2 \times 10^{-15}$  г/минга тенглиги аниқланди. Олинган натижани тимоцит хужайраларида кузатилган глутатион чиқиш тезлиги билан таққослаш учун биз юқорида 1А-расмда қайд этилган натижаларни қайта таҳлил қилиб, битта хужайрага тўғри келувчи глутатион чиқиш тезлигини аниқладик. Олинган натижалар таҳлили битта хужайрадан нормал шароитда

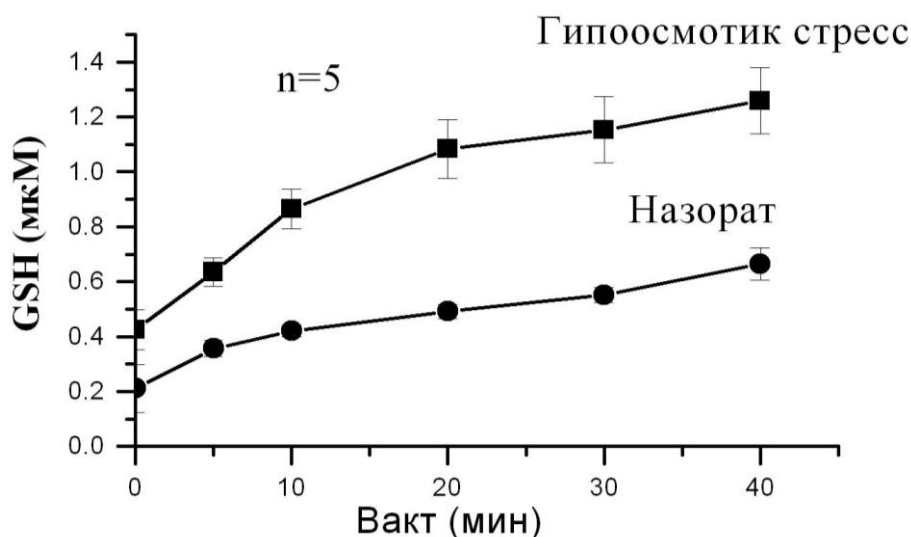


хужайра ташқи муҳитига  $0,34 \times 10^{-15}$  г/мин миқдорида глутатион чиқишини, гипоосмотик стресс шароитида эса  $1,96 \times 10^{-15}$  г/мин миқдорида глутатион чиқишини кўрсатди. Демак, одам қизил қон хужайраларидан глутатионнинг чиқиш тезлиги тимоцит хужайраларига нисбатан нормал шароитда 4 баробар ва гипоосмотик стресс шароитида 10 баробар паст. Албатта, қизил қон хужайраларининг умумий миқдори қонда анча кўп бўлишлиги туфайли кузатилган паст тезликдаги глутатион чиқиши ҳам физиологик миқдорларни бемалол таъминлаб бериши мумкин. Тимоцитлардан глутатионнинг катта тезлик билан чиқиши, ушбу молекуланинг тимусдаги интерстициал муҳитда кечувчи физиологик жараёнлардаги муҳим ролдан далолат беради.

Тажрибаларимизнинг кейинги босқичида биз меланома тери рак хужайрасининг культурасидан (КМЛ линияси) глутатион чиқишини кузатдик. Бунда хужайра культураси  $37^{\circ}\text{C}$  ҳароратда махсус идишлар (кареллар)да конфлуэнт ҳолатгача (яъни моноқават ҳосил бўлгун қадар) ўстирилди. Бу тажрибаларда, 40 минутлик инкубациядан сўнг, глутатионнинг муҳитдаги концентрацияси нормал шароитда  $0,66 \pm 0,06$  мкМни, ва гипоосмотик стресс шароитида  $1,26 \pm 0,012$  мкМ ни ташкил этди. Олинган натижа меланома рак хужайраларида ҳам глутатион чиқиш механизми мавжудлигидан ва хужайра ташқисидаги глутатион канцерогенез жараёнларида маълум рол ўйнаши мумкинлигидан далолат беради (7-расм)



**6-расм. Одам қизил қон хужайраларидан нормал (290 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ) ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг  $\text{H}_2\text{O}$ ) шароитида глутатион чиқиши. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n = 5$ ).**



**7-расм.** Сичқон меланома тери рак хужайрасининг культурасидан нормал (290 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) шароитида глутатион чиқиши. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан  $P < 0,05$  ( $n = 5$ ).

*Хужайранинг физиологик функцияларига хужайра ташқарисида глутатионнинг таъсири.* Хужайрадан чиққан глутатион ўз хужайраси ва атрофдаги бошқа хужайра ва тўқималарга аутокрин ва паракрин таъсир кўрсатиши мумкин, лекин ушбу жараён тимоцит ва эритроцит хужайраларида деярли ўрганилмаган. Шу мақсадда биз тадқиқотларимизда гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига ва одам қизил қон хужайралари коллоид-осмотик чидамлилигига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири ўргандик.

Биз тажрибаларимизда, тимоцитлар гипоосмотик стресс шароитида (назоратда) хужайра ҳажми  $78,1 \pm 5,6\%$ га ( $n=6$ ) қайтди. Глутатионнинг 0,1 мкМ концентрациясидан бошлаб тимоцит хужайралари ҳажмини бошқарилиши системаларига сезиларли таъсири кузатди, Лекин ҳатто энг баланд концентрацияда ҳам хужайра ҳажм бошқарилиши фақат қисмангина блокланди, хужайра ҳажми 10 мкМда  $69,05 \pm 1,3\%$ га ва 100 мкМда  $65,06 \pm 1,4\%$ гача қайтди. ярим-максимал эффект 1,3 $\pm$ 0,1 мкМда кўзатилди, Хилл коэффициенти 0,64 $\pm$ 0,31 га тенг.

Биз тажрибаларимизда глутатионнинг 01 мкМдан 1 мкМгача концентрацияда қизил қон хужайраларни нистатин (500 мкМ) ёрдамида чақирилган коллоид-осмотик лизисига таъсири сезиларли даражада йўқлиги аниқладик.

Якуний қисм: глутатион хужайра цитоплазмасидаги асосий антиоксидант булиб, шунингдек хужайра ички муҳити потинциалини сақлашда муҳим ҳисобланади. Оз миқдордаги глутатион хужайралараро муҳитда ҳам учраши мумкин, глутатион концентрацияси хужайра турига ва физиологик ҳолатига боғлиқ ҳолда ўзгариб туради. Тадқиқотларимизда биз

нормал изотоник муҳитда ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишини ўргандик. Биз биринчи марта тимоцитлар осмотик босим таъсирида шишганда юқори миқдорда глутатион ажралишини ўргандик. Жараёнга хужайра суспензиясининг концентрацияси ва вақтнинг боғлиқлиги аниқладик. Ҳарорат ўзгаришига боғлиқлигини ўрганишда хужайралар шиши билан экстракция механизмининг ўзгариши, жараённинг нисбатан паст фаоллашув энергияси ион каналлари иштироқи борлигидан далолат беради. Дарҳақиқат, глутатион чиқарилишининг фармакологиясини тадқиқ қилиш натижасида, осмотик босим таъсирида шишган хужайраларда ион каналларнинг иштироқини тасдиқлади. Макси-анион каналининг блокатори гадолинийум глутатион чиқишига сезиларли таъсир кўрсатмади ва бу натижа глутатион транспортида макси-анион канали иштирок этмаслигини кўрсатади. Ҳажмга боғлиқ анион каналлари глутатион чиқишининг ягона йули эмас. Олинган натижалар хужайрадан чиқаётган глутатионнинг 60% и шу каналлар орқали ташилишини тасдиқлади, глутатионнинг қолган қисмлари SLC22A/OAT ва SLCO/OATP, ABCB/MRP транспортер чиқиши мумкин. Глутатион чиқиш тизими аденилатциклаза тизимини орқали фаоллашиши, хужайра хажм бошқарилишига таъсири, хужайра ташқи глутатионнинг эффектив иммуномодулятор сифатида фаолият кўрсатишини, бу апоптоз ва пролифератция жараёнида энг керакли компонентлигини исботлайди. Олинган натижалар глутатион ҳам, АТФ ва глутамат кислотаси билан бир қаторда хужайра ташқи сигнал молекуласи сифатида фаоллик кўрсатишини кўрсатади. Глутатионнинг плазматик мембранадаги специфик рецепторлари ҳали аниқланмаган. Глутатион хужайраларидаги глутамат рецепторлари билан боғланиши ва уларнинг фаолиятини тартибга солиши маълум. G-оқсиллар туркумига мансуб орфант (яъни ҳали агонисти номаълум) рецепторларининг баъзилари глутатион рецепторлари сифатида фаоллик кўрсатиши эҳтимолдан ҳоли эмас.

## ХУЛОСАЛАР

1. Тимоцит хужайраларидан гипосмотик стресс шароитида глутатионнинг катта миқдорда ажралиб чиқиши аниқланди ва батафсил тавсифланди. Нормал шароитда якка тимоцит хужайрасидан ташқи муҳитига  $0,34 \times 10^{-15}$  г/мин, гипоосмотик стресс шароитида эса  $1,96 \times 10^{-15}$  г/мин глутатион чиқиши кўрсатилди. Ярим-максимал глутатион чиқиши муҳитининг осмотик босими  $125,1 \pm 4,3$  мОсм/кг  $H_2O$ га тенг бўлганда кузатилди.

2. Хужайралардан глутатион чиқишининг 15-37°C диапазонда фаоллашув энергияси нормотоник шароитда  $11,1 \pm 1,8$  ккал/моль, ва гипоосмотик стресс шароитида  $5,4 \pm 0,6$  ккал/моль ни ташкил этди. Икки хил фаоллашув энергияси ва икки фазали кинетика глутатион чиқишининг камида икки хил механизмдан далолат берди.

3. Гипоосмотик шароитда глутатионнинг асосий қисми хажмга боғлиқ анион каналлари орқали хужайрадан чиқади, қолган қисми эса SLCO/OATP

ва SLC22A/OAT мембрана транспортерлари иштирокида ташилади. ABCС/MRP транспортери ва макси-анион канали бу жараёнда иштирок этмайди.

4. Аденилатциклаза тизимининг фаоллашуви тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишини пасайтиради.

5. Одам эритроцитлари ва сичқон меланома тери рақ хужайраларида ҳам тимоцитлар каби глутатион чиқиш механизми мавжуд. Эритроцитлардан глутатион чиқиши нормотоник шароитда тимоцитларга нисбатан 4 баробар, ва гипоосмотик шароитда 10 баробар пастлиги аниқланди.

6. Хужайра ташқарисидаги глутатион микромоляр миқдорда тимоцитларнинг ҳажм бошқарилишини сезиларли даражада пасайтириши аниқланди, лекин эритроцитларнинг коллоид-осмотик лизисига таъсир этмади.

7. Глутатионнинг янги хужайралар аро сигнал молекуласи функцияси гипотезаси таклиф қилинди.

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

---

**ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**МЕЛАНОВА НАЗИРА РАШИДОВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ВЫБРОСА ГЛУТАТИОНА ИЗ  
КЛЕТОК**

**03.00.02-Биофизика и радиобиология**

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

**Ташкент-2018**

**Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.2.PhD/B79**

Диссертации выполнена в Институте биоорганической химии.

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

**Научный руководитель:** **Сабилов Равшан Заирович**  
доктор биологических наук, академик

**Официальные оппоненты:** **Арипов Тахир Фатихович**  
доктор биологических наук, академик

**Урманова Гулбахор Урунбоевна**  
кандидат биологических наук, доцент

**Ведущая организация:** **Андижанский государственный университет**

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

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Институте биоорганической химии (регистрационный номер № \_\_\_\_\_). (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: [asrarov54@mail.ru](mailto:asrarov54@mail.ru)).

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года  
(реестр протокола рассылки № «\_\_» от \_\_\_\_\_ 2018).

**Ш.И.Салихов**  
Председатель Научного совета по присуждению  
ученых степеней, д.б.н., академик

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

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

## **ВВЕДЕНИЕ (Аннотации диссертации доктора философии (PhD))**

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** В последнее время в мире увеличивается количество исследований, в которых показано, что метаболиты клетки могут участвовать в аутокринной и паракринной межклеточной сигнализации в качестве первичных мессенджеров. Особая роль при этом была установлена для АТФ и глутаминовой кислоты. Известно, что все живые клетки используют АТФ в качестве источника энергии в различных биологических процессах. В ответ на физиологические стимулы, такие как нервная стимуляция, механический, осмотический и ишемический стресс, небольшие количества АТФ выбрасываются во внеклеточную среду. На поверхности практически всех типов клеток имеются пуриnergические  $P_2$  рецепторы, которые специфически связывают вышедший из клеток АТФ и передают сигнал внутрь клетки. Глутаминовая кислота также является не только внутриклеточным метаболитом, но и может выбрасываться во внеклеточную среду принимая участие в процессах передачи сигнала между клетками через глутаматергические ионотропные и метаботропные рецепторы. Пуриnergическая и глутаматергическая сигнализация играют важную роль в различных физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в почках, в сердце и в клетках мозга.

В настоящее время в мировых исследовательских центрах изучаются метаболиты в цитоплазме живой клетки и первичные мессенджеры. Один из них – это молекула глутатиона. Глутатион (GSH) – это трипептидный низкомолекулярный антиоксидант (гамма-глутамилцистеилглицин), который является основным свободным тиолом, присутствующим в цитоплазме всех живых клеток. Он участвует во многих биологических процессах: обеспечивает восстановление ксенобиотиков, инактивирует гидропероксидазу и участвует в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп цитозольных белков.

В настоящее время в нашей стране создание эффективных методов внедрения научных и инновационных достижений в практику. На основе программных мер, осуществлённых в данных направлениях, были разработаны методы определения размеров нанопор и ионных каналов. В Стратегии действия и развития Узбекистана подчеркивается стимулирование научно-исследовательской и инновационной деятельности, создание эффективных механизмов внедрения научных и инновационных достижений в практику. Поэтому изучение функции внеклеточного глутатиона и пути его выхода из лимфоидных клеток имеет важное научно-практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 28 ноября 2011г № ПП-1652 «О мерах по дальнейшему углублению реформирования системы здравоохранения», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947

«О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

**Степень изученности проблемы.** В настоящее время во многих исследовательских и научных центрах мира ведутся исследования по изучению роли глутатиона внутри клеток и во внеклеточной среде (Zhang, Forman 2017; Franco, Cidlowski 2014). В последние годы достигнуты заметные успехи в изучении функции глутатиона на клеточном уровне, что обусловлено разработкой новых современных методов анализа, таких как пэтч-кламп, флуоресцентный и ингибиторный анализ.

В странах СНГ К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский, А.П. Баврина, В.А. Мочин, С.Л. Малиновская проводят исследования иммуномодулирующих свойств глутатиона. Но, несмотря на достигнутые успехи, ряд вопросов, связанных с механизмами выхода глутатиона из клеток, остаются нерешенными.

Механизмы выхода глутатиона из клеток в нашей Республике не исследовались. В частности, роль анионных каналов, активирующихся при осмотическом стрессе, в транспорте отрицательно заряженного глутатиона в мировой литературе не освещалась, и по этой причине осуществление исследований, составляющих основную тему настоящей работы является актуальным и имеет научно-практическую значимость.

**Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация.** Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментальных проектов Института биоорганической химии ФА-ФЗ-Т112 «Биофизические механизмы управления объема клеток животных и растений» (2007-2011) и ФПФИ 43-10 «Изучение роли ионных каналов и транспортеров в механизме выделения глутатиона из тимоцитов» (2010-2011).

**Целью исследования** является характеристика процесса выхода глутатиона из клеток в норме и в условиях гипоосмотического стресса, а также выяснение роли ионных каналов и транспортеров в этом процессе.

**Задачи исследования:**

разработка способа определения выхода глутатиона при осмотическом стрессе и определение количества глутатиона во внеклеточной среде в нормальном состоянии и при гипоосмотическом стрессе;

определение зависимости уровня глутатиона во внеклеточной среде от количества клеток в суспензии, осмотического градиента, времени инкубации, ионного состава среды и температуры;

определение роли ионных каналов и транспортеров в выходе глутатиона посредством ингибиторного анализа;



определение роли аденилатциклазной системы в выходе глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе;

сопоставление характеристик процесса выхода глутатиона из различных типов клеток;

определение влияния внеклеточного глутатиона на физиологические функции клеток.

**Объектом исследования** являются тимоциты, выделенные из беспородных белых крыс 6-8 недельного возраста, красные кровяные клетки человека и культура клеток меланомы мыши (линия КМЛ).

**Предметом исследования** является механизм выброса глутатиона в нормальном состоянии и при гипоосмотическом стрессе.

**Методы исследования.** В экспериментах использовались современные биофизические и биохимические методы. Тимоциты и эритроциты выделялись с помощью стандартных методов. Выход глутатиона определялся с помощью метода количественной колориметрии, основанном на реакции 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислоты с глутатионом. Изменения объема клеток определялись по светопропусканию клеточной суспензии. Уровень гемолиза определялся по выходу гемоглобина спектрофотометрически.

**Научная новизна диссертационного исследования** состоит в следующем:

охарактеризован выход значительных количеств глутатиона из цитозоля тимоцитов в нормальной изотонической среде и в условиях гипоосмотического стресса, дано подробное описание этого процесса, определена энергия активации осмореактивного выхода глутатиона;

доказана ведущая роль объем-зависимого анионного канала в выходе глутатиона из тимоцитов, а также заметное участие транспортеров SLCO/OATP и SLC22A/OAT;

определена влияние внутриклеточного цАМФ на выход глутатиона из клеток при гипоосмотическом стрессе;

доказано наличие осмо-чувствительного транспорта глутатиона в других типах клеток (эритроциты, меланома), а также влияние внеклеточного глутатиона на физиологические функции клеток.

**Практические результаты исследования** заключаются в следующем:

продемонстрированы процессы выхода глутатиона из тимоцитов в нормальном состоянии и в условиях гипоосмотического стресса и дана его общая характеристика;

систематически исследована зависимость уровня внеклеточного глутатиона от количества клеток в суспензии, осмотического давления, времени инкубации, ионного состава среды и температуры;

посредством специфической фармакологии, продемонстрирован преимущественный выход глутатиона через объем-зависимый анионный канал и показано, что анионные транспортеры при этом играют второстепенную роль, показано, что активация аденилатциклазной системы оказывает негативное влияние на выход глутатиона из тимоцитов;

показано присутствие осмо-реактивного транспорта глутатиона в других типах клеток (эритроциты и меланома), а также модуляция регуляции клеточного объема внеклеточным глутатионом;

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что они получены с применением современных биофизических и биохимических методов исследований. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи критерия Стьюдента или вариационного анализа (ANOVA) с использованием компьютерной программы OriginPro7.5 (OriginLab Corporation, США) при уровне доверительной вероятности  $P < 0,05$ . Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение их на республиканских и международных конференциях, и публикация результатов исследования в рецензируемых научных журналах.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.** Научная значимость результатов исследования заключается в том, что они объясняют механизм выхода глутатиона из клеток в норме и под воздействием гипоосмотического стресса. Кинетические параметры данного процесса и его зависимость от температуры указывают на наличие нескольких механизмов выхода глутатиона. Показана основная роль объем-зависимого анионного канала и заметное участие транспортеров ABC/MDR, SLCO/OATP и SLC22A/OAT в выходе глутатиона.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что они могут служить основой для открытия новых и перспективных ингибиторов выхода глутатиона. Тимоциты, использованные в нашем исследовании, являются основным фактором, определяющим иммунный статус тимуса. В настоящее время роль внеклеточного глутатиона в формировании иммунного ответа в норме и при патологии совершенно не изучена. Однако очевидно, что модуляция выхода глутатиона с помощью фармакологических препаратов может стать важной основой для создания новых иммуностимуляторов и иммуносупрессоров, а также при иммунотерапии патологических процессов. Следовательно, полученные результаты имеют важное практическое значение в фармакологии и терапии. Кроме того, полученные результаты могут быть успешно использованы при создании учебников, учебных пособий и в преподавании биофизики и физиологии в ВУЗах.

**Внедрение результатов исследования.** На основании полученных научных результатов по характеристике системы выхода глутатиона из клеток:

данные о ведущей роли объем-зависимого анионного канала наружного выпрямления в выходе глутатиона из тимоцитов были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при анализе роли ионных каналов в клеточных процессах (*Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF – 3.33; *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013, V.32, ResearchGate, IF – 4.18; *Journal of General Physiology*

2015, V.146, ResearchGate, IF – 1.51). Применение научных результатов дало возможность характеристики роли ионных каналов в клеточной физиологии;

данные об участии транспортеров SLCO/OATP и SLC22A/OAT в выходе глутатиона из тимоцитов использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при анализе роли транспортеров в клеточных процессах (*Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF – 3.33; *Neurotoxicology* 2014, V.41, ResearchGate, IF – 1.93; *Current Drug Metabolism* 2015, V.468, ResearchGate, IF – 2.74). Применение научных результатов дало возможность характеристики роли транспортеров в клеточной физиологии;

научные результаты по механизму выхода глутатиона из тимоцитов использованы в рамках научного проекта Ф-5-06 “Изучение механизма действия некоторых биорегуляторов” (2012-2016) при анализе действия биорегуляторных соединений на клетки и органеллы, а также для прояснения механизма действия биорегуляторных агентов на уровне организма (справка Агентства по науке и технологиям ФТА-02-11/112 от 20 ноября 2017г.). Использование научных результатов дало возможность характеристики механизма действия биорегуляторных агентов на уровне организма.

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

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано всего 14 печатных работ, из них 7 научных статей, в том числе 6 в республиканских и 1 в зарубежном журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

**Структура и объем диссертации.** Структура диссертации состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 102 страниц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

В первой главе диссертации «**Значения глутатиона во внутренней и внешней среде клеток и его биосинтез**» приведены общие характеристики глутатиона и пути его биосинтеза, биологическая роль глутатиона во внутренней и внешней среде клеток. Также даны новейшие сведения из

литературы о выбросе глутатиона из клеток и его механизме, а также роли ионных каналов и транспортеров, принимающих участие в этом процессе.

Во второй главе диссертации **«Методы выделения клеток, определения глутатиона и механизмов его действия»** описаны основные стадии экспериментов, материалы и методы. В частности, нормальный раствор Рингера содержал (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 глюкозы, pH 7,4 (290±2 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Гипотонические растворы различной осмоляльности (от 40 до 290 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) готовились путем разведения нормального раствора Рингера в различных соотношениях буфером следующего состава (мМ): 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 глюкозы, pH 7,4 (40±2 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Опыты проводили на 6-8 недельных белых беспородных крысах. Выделение тимоцитов проводили по стандартной методике, как описано ранее и их жизнеспособность определяли по исключению трипанового синего. Конечную суспензию, содержащую не более 5% погибших клеток, хранили в растворе Рингера и использовали в течение 3-5 ч. Количественное колориметрическое определение глутатиона проводили по методу, основанному на окислении GSH до дисульфида GSSG при взаимодействии с 5,5'-дитиобис 2-нитробензойной кислотой (5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid, DTNB), который при этом восстанавливается до 5-тио-2-нитробензойной кислоты (5-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB). Продукт реакции (TNB) имеет жёлтую окраску и определяется фотометрически при 425 нм. В присутствии глутатионредуктазы и НАДФН происходит непрерывная рециклизация GSSG, который при этом восстанавливается до исходного GSH. Поэтому, в комбинированной реакции глутатион играет роль катализатора в общей реакции восстановления DTNB до TNB за счет НАДФН, скорость которой прямо пропорциональна концентрации глутатиона в микромолярном диапазоне.

Изменение объема тимоцитов исследовали по величине светопропускания при 610 нм. Сигнал, измеренный с помощью микроколориметра МКМФ-1, усиливали с помощью усилителя У5-11, оцифровывали с помощью преобразователя GO!Link (Qubit Systems, Канада) и записывали на жёсткий диск компьютера (Pentum IV) с помощью программы Logger Lite (Qubit Systems, Канада) при частоте стробирования 100 Гц.

Человеческую кровь получали у добровольцев (Кост Е.А. 1975) и степень гемолиза определяли по выходу гемоглобина из 4%-й суспензии эритроцитов фотометрически при 540 нм. Культуру раковых клеток меланомы мыши (линия КМЛ, любезно предоставленная к.м.н. Кузнецовой Н.Н., Институт биоорганической химии АН РУз) выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки теленка с добавкой NaHCO<sub>3</sub>, антибиотиков и глутамина при 37°C.

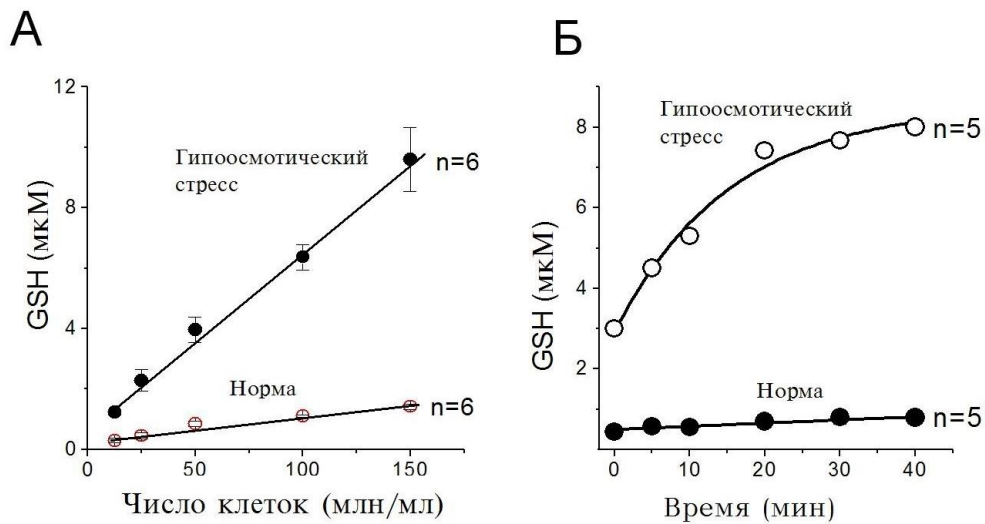
В третьей главе диссертации **«Факторы, влияющие на выход глутатиона из клеток в нормальных условиях и при гипоосмотическом стрессе и его механизмы»** дана общая характеристика системы выхода

глутатиона из клеток, исследованы зависимость этого процесса от ионного состава среды, влияние на него блокаторов анионных каналов и роль в нем мембранных транспортеров и внутриклеточного цАМФ, а также действие внеклеточного глутатиона на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе и коллоидно-осмотическую резистентность эритроцитов.

*Общая характеристика системы выброса глутатиона из тимоцитов.* В наших экспериментах мы зарегистрировали заметные количества глутатиона во внеклеточной среде даже в отсутствии стимуляции при инкубации тимоцитов в нормальных изоосмотических условиях. Базовый выход глутатиона составил  $0,29 \pm 0,07$  мкМ при концентрации клеток в суспензии, равной 12,5 млн/мл и  $1,11 \pm 0,04$  мкМ в суспензии, содержащей 100 млн/мл клеток после 10-мин инкубации. В условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) мы наблюдали резкое увеличение выброса глутатиона, который составил  $1,23 \pm 0,09$  мкМ и  $6,37 \pm 0,04$  мкМ в суспензии с концентрацией клеток 12,5 млн/мл и 100 млн/мл после 10-минутной инкубации, соответственно. Зависимость содержания глутатиона во внеклеточной среде от числа клеток в суспензии была близка к линейной как при нормальных изотонических условиях, так и в условиях гипоосмотического стресса, как это показано на рис. 1А. Это является доказательством того, что именно тимоциты являются источником глутатиона во внеклеточной среде в наших экспериментальных условиях.

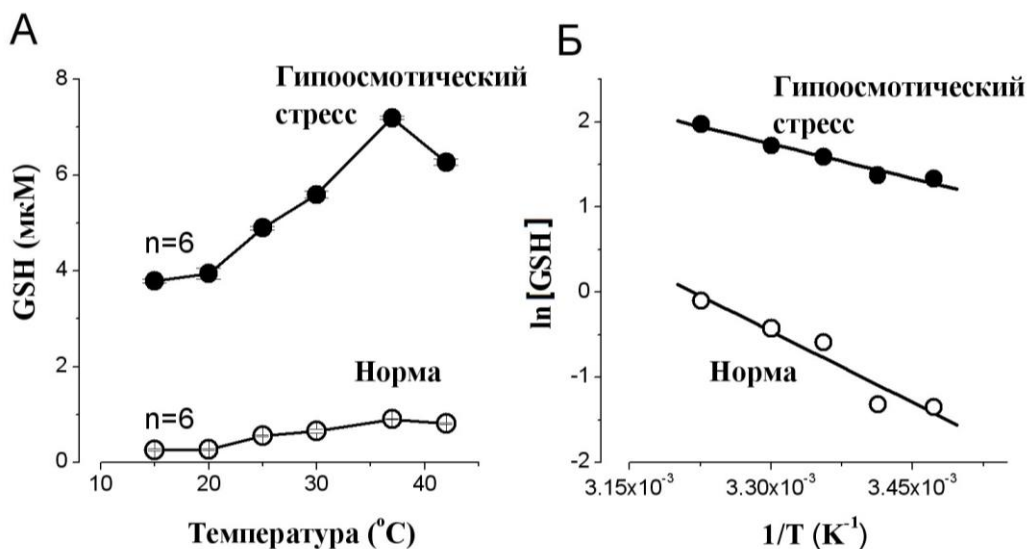
Кинетика выхода глутатиона заметно отличалась в изотонических и гипотонических условиях. Так, если базовый выход глутатиона в нормальных условиях плавно увеличивался во времени, то при гипоосмотическом стрессе мы наблюдали, резкое скачкообразное увеличение содержания глутатиона в среде в начальный момент времени, которое затем сменялось плавным ростом до примерно постоянного уровня, которое достигалось после 20-минутной инкубации (рис. 1Б). Такая двухфазная кинетика, по-видимому, может свидетельствовать о наличии, по крайней мере, двух механизмов выхода глутатиона из тимоцитов с различными кинетическими параметрами.

Температура среды инкубации оказывала существенное влияние на выход глутатиона как в нормальных условиях, так и в условиях гипоосмотического стресса. Выход глутатиона из тимоцитов плавно увеличивался с повышением температуры в диапазоне от 15°C до 37°C при обоих условиях эксперимента. При 42°C рост выхода глутатиона сменялся его падением, что возможно отражает нарушение функционирования системы выброса глутатиона в условиях температурного шока (рис. 2А). Температурные зависимости в диапазоне 15-37°C были линейными в координатах Аррениуса, а кажущаяся энергия активации процесса составила  $11.1 \pm 1.8$  ккал/моль и  $5.4 \pm 0.6$  ккал/моль для базового выхода глутатиона и его выхода при гипоосмотическом стрессе, соответственно (рис. 2Б).



**Рис. 1.** Выход глутатиона в нормальной изотонической среде и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) в зависимости от концентрации клеток в суспензии (А: время инкубации 10 мин) и времени (Б: концентрация клеток 100 млн/мл). Эксперименты проведены при 25°С. Во всех случаях  $P < 0,05$  относительно нормы (контроль).

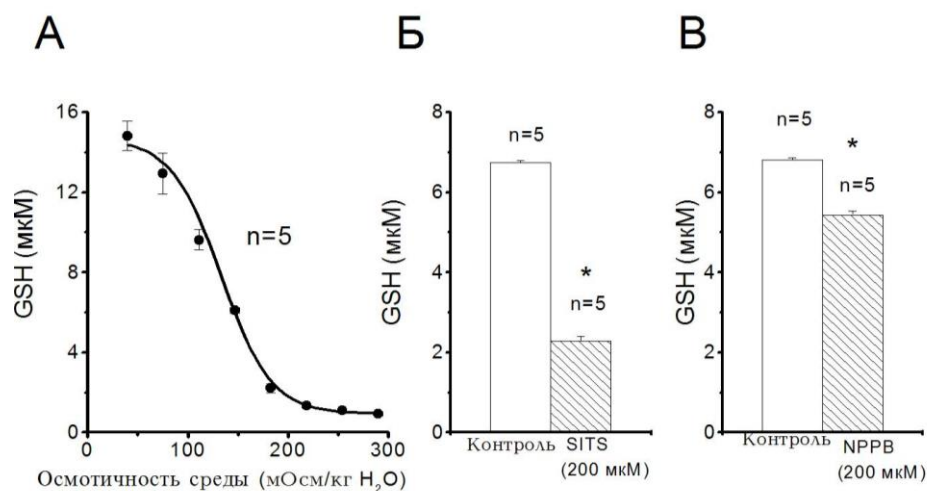
Столь различная величина энергии активации, по-видимому, свидетельствует о различии механизмов выхода глутатиона при этих двух условиях эксперимента. Относительно низкая энергия активации, полученная в гипоосмотических условиях, может свидетельствовать в пользу диффузионного механизма транспорта глутатиона через мембрану осмотически набухших клеток с участием ионных каналов.



**Рис. 2.** Выход глутатиона в нормальной изотонической среде и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг Н<sub>2</sub>О) в зависимости от температуры в обычных координатах (А) и координатах Аррениуса (Б). Концентрация клеток 100 млн/мл. Время инкубации 10 мин. Во всех случаях  $P < 0,05$  относительно контроля.

Зависимость выхода глутатиона от осмотического давления среды имела сигмовидный характер, а 50%-й выход глутатиона наблюдался при осмотичности среды, равной  $125.1 \pm 4.3$  мОсм/кг H<sub>2</sub>O (Рис.3А). В дальнейших экспериментах осмотичность гипотонического раствора составляла 147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O.

*Исследование механизма выхода глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе.* Молекула глутатиона имеет отрицательный заряд и поэтому теоретически может транспортироваться через системы анионного транспорта. Действительно, блокаторы анионного транспорта широкого спектра действия, SITS (4-ацетамидо-4-изотиоцианатостиблен-2,2-дисульфоновая кислота) и NPPB (5 нитро-2-(3-фенилпропиламино)-бензойная кислота) значительно подавляли выход глутатиона в условиях гипоосмотического стресса. Так, выброс глутатиона ингибировался на  $66,0 \pm 5,3$  % и  $18,8 \pm 1,7$  % по сравнению с его контрольным значением в присутствии в среде SITS и NPPB при концентрации 200 мкМ, соответственно (Рис.3, Б и В).

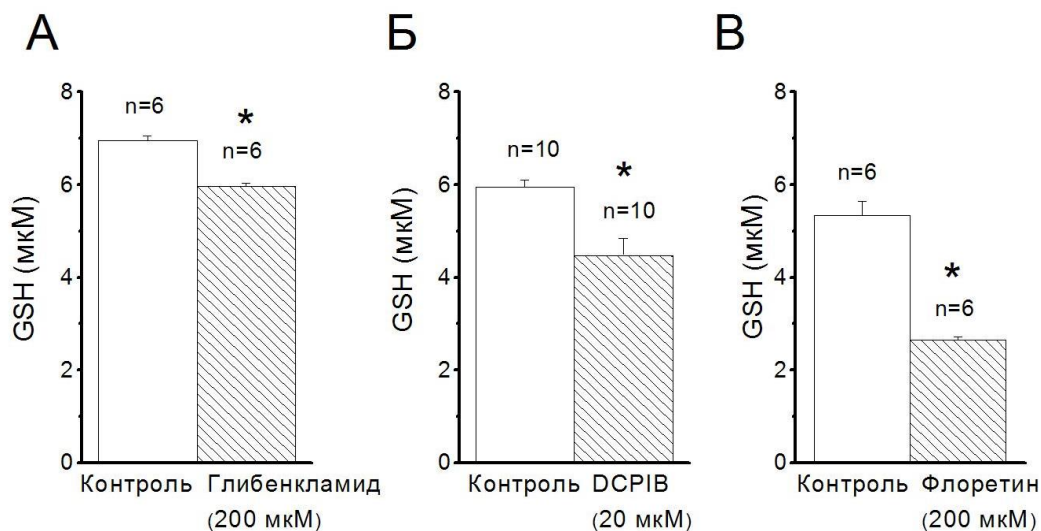


**Рис 3. Зависимость выхода глутатиона от осмотического давления среды (А) и от присутствия в среде ингибиторов анионного транспорта SITS (200 мкМ) (Б) и NPPB (200 мкМ) (В). Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0.05$ .**

Известно, что при осмотическом набухании клеток в основном активируются два типа анионных каналов: это объём-зависимый анионный канал наружного выпрямления с промежуточной проводимостью и макси-анионный канал. Ионы  $Gd^{3+}$  (50 мкМ), которые среди анионных каналов блокируют только макси-анионный канал, не оказывали существенного влияния на выброс глутатиона из тимоцитов, что указывает на то, что этот канал не участвует в процессе выхода глутатиона. В то же время, блокаторы объём-зависимого анионного канала наружного выпрямления – флоретин (200 мкМ), 4-(2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил 1-индан-1-он-5-ил)-оксимасляная кислота (DCPIB) (20 мкМ), и глибенкламид (200 мкМ) значительно подавляли выход глутатиона из тимоцитов. Так, выброс глутатиона ингибировался в присутствии в среде флоретина на  $61,9 \pm 2,3$  %,

ДСРІВ на  $35,8 \pm 2,0$  %, и глибенкламида на  $14,2 \pm 1,2$  %, соответственно. (Рис. 4А, Б и В). Этот результат прямо указывает на ведущую роль этого канала в транспорте глутатиона в гипоосмотических условиях.

В трансмембранном переносе глутатиона могут принимать участие не только ионные каналы, но также и анионные транспортеры. Так, известно, что мембранный белок АВСС/MRP является АТФазой, которая активно выбрасывает из клеток органические анионы за счет гидролиза АТФ. Однако в наших экспериментах, пробенецид, который является субстратом этого белка и способен подавлять его функцию при добавлении с внеклеточной стороны, приводил не к ингибированию, а к стимуляции выброса глутатиона на  $6,8 \pm 1,3$ % (Рис. 5А). Этот результат, с одной стороны, свидетельствует против роли АВСС/MRP в процессе выброса глутатиона, и с другой стороны, может указывать на присутствие другого анионного транспортера, а именно – обменника, активность которого будет расти в присутствии субстрата с внеклеточной стороны мембраны. Действительно, пробенецид является субстратом не только для АВСС/MRP, но и для транспортера органических анионов SLCO/OATP, который обменивает анионы с противоположных сторон от мембраны. Чтобы подтвердить роль этого транспортера, мы исследовали выброс глутатиона в присутствии другого субстрата SLCO/OATP – таурохолиевой кислоты. В наших экспериментах это вещество также вызывало транс-стимуляцию выброса глутатиона на  $13,2 \pm 2,1$  % (Рис. 5Б).



**Рис 4. Действие блокаторов объём зависимого анионного канала наружного выпрямления – глибенкламида (200 мкМ) (А), ДСРІВ (20 мкМ) (Б) и флоретина (200 мкМ) (В) на выход глутатиона из тимоцитов. Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0.05$ .**

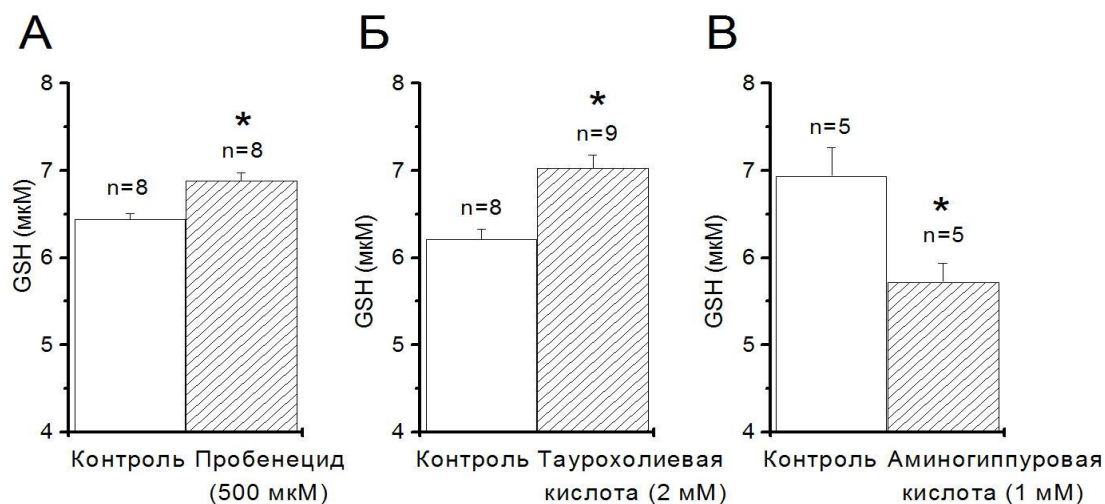
Мембранный белок SLC22A/OAT относится к группе натрий-зависимых транспортеров для анионов и ингибируется аминокислотной



кислотой. В наших экспериментах, это вещество подавляло выброс глутатиона на  $17,5 \pm 3,8\%$  (Рис. 5В).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что выход глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе осуществляется с участием нескольких транспортных путей. Ведущую роль в этом процессе играет объём-зависимый анионный канал наружного выпрямления, который может обеспечивать до 60% от всего выброса глутатиона. Остальная часть общего пула глутатиона может выходить из клеток через транспортеры, такие как SLCO/OATP и SLC22A/OAT. АТФаза АВСС/MRP, по-видимому, не принимает участия в выбросе глутатиона из клеток в наших экспериментальных условиях.

Известно, что аденилатциклазная система контролирует большинство внутриклеточных процессов. В наших экспериментах мы увеличивали концентрацию внутриклеточного цАМФ тремя различными способами: 1) путем внесения в среду мембранопроникающего аналога – дибутирил-цАМФ (0,1-1 мкМ), 2) путем активации аденилатциклазы форсколином (10 мкМ) и 3) путем ингибирования фосфодиэстеразы теофиллином (3 мМ). Во всех случаях мы наблюдали статистически значимое подавление выброса глутатиона, которое составило от 10% для теофиллина до 32% для дибутирил-цАМФ (0,1 мкМ). Этот результат свидетельствует о том, что имеется тесная связь между аденилатциклазной системой (а значит и цАМФ-зависимыми гормональными системами) и выбросом глутатиона при гипоосмотическом стрессе.



**Рис. 5.** Действие субстрата мембранного транспортера АВСС/MRP, пробенецида (500 мкМ) (А), субстрата мембранного транспортера SLCO/OATP, таурохолиевой кислоты (2 мМ) (Б) и ингибитора мембранного транспортера SLC22A/OAT, аминогиппуровой кислоты (1 мМ) (В) на выход глутатиона из тимоцитов. Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0.05$ .

*Сравнительная характеристика выхода глутатиона из различных типов клеток.* Изложенные выше результаты свидетельствуют о массовом выбросе глутатиона из тимоцитов во внеклеточную среду, как в нормальных условиях, так и при гипоосмотическом стрессе. Присутствует ли аналогичная система регулируемого выброса глутатиона в других типах клеток? Для ответа на этот вопрос мы исследовали выход глутатиона из нормальных человеческих эритроцитов после 20 минутной инкубации в среде с различной тоничностью при варьировании числа клеток в суспензии. Было установлено, что концентрация глутатиона во внеклеточной среде в суспензии эритроцитов с концентрацией 100 млн/мл составляет  $0.57 \pm 0.14$  мкМ ( $n=5$ ) при изотонических условиях и  $1.33 \pm 0.11$  мкМ ( $n=5$ ) в гипоосмотической среде. Концентрация внеклеточного глутатиона росла линейно с ростом числа клеток в суспензии в диапазоне от 100 млн/мл до 1 млрд/мл (Рис. 6).

В расчете на одну клетку, скорость выхода глутатиона из эритроцитов составила в нормальной среде  $0,09 \times 10^{-15}$  г/мин, а и при гипоосмотическом стрессе  $0,2 \times 10^{-15}$  г/мин. Для сравнения этих величин со скоростью выброса глутатиона из тимоцитов мы пересчитали данные, приведенные на рисунке 1А, в расчете на одну клетку. Анализ данных показал, что скорость выхода глутатиона из тимоцитов составляет  $0,34 \times 10^{-15}$  г/мин и  $1,96 \times 10^{-15}$  г/мин в нормальных и гипоосмотических условиях, соответственно. Сравнение этих величин с данными для эритроцитов показывает, что скорость выброса глутатиона из красных кровяных клетках примерно в 4 раза медленнее, чем из тимоцитов в нормальной среде и практически в 10 раз медленнее в условиях гипоосмотического стресса. Хотя скорость выброса глутатиона из эритроцитов оказалась достаточно низкой по сравнению с тимоцитами, однако, учитывая то, что эритроциты составляют основную массу форменных элементов крови, этой скорости, по-видимому, вполне достаточно для того, чтобы обеспечить физиологический уровень глутатиона в плазме. Высокая скорость выхода глутатиона из тимоцитов может свидетельствовать о важной роли этой молекулы в физиологических процессах, протекающих во внеклеточной среде тимуса.

На следующем этапе экспериментов мы исследовали выход глутатиона из раковых клеток меланомы в культуре (линия КМЛ). Клетки выращивались в стеклянных карелях при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  до конfluэнтного состояния (т.е. до формирования клеточного монослоя). В этих экспериментах концентрация внеклеточного глутатиона монотонно росла во времени (рис. 7) и после 40 минут инкубации составила  $0,66 \pm 0,06$  мкМ ( $n=5$ ) в нормальных условиях и  $1,26 \pm 0,012$  мкМ ( $n=5$ ) при гипоосмотическом стрессе. Полученные результаты показывают наличие механизма выхода глутатиона в раковых клетках меланомы и о его возможной роли в процессе канцерогенеза.

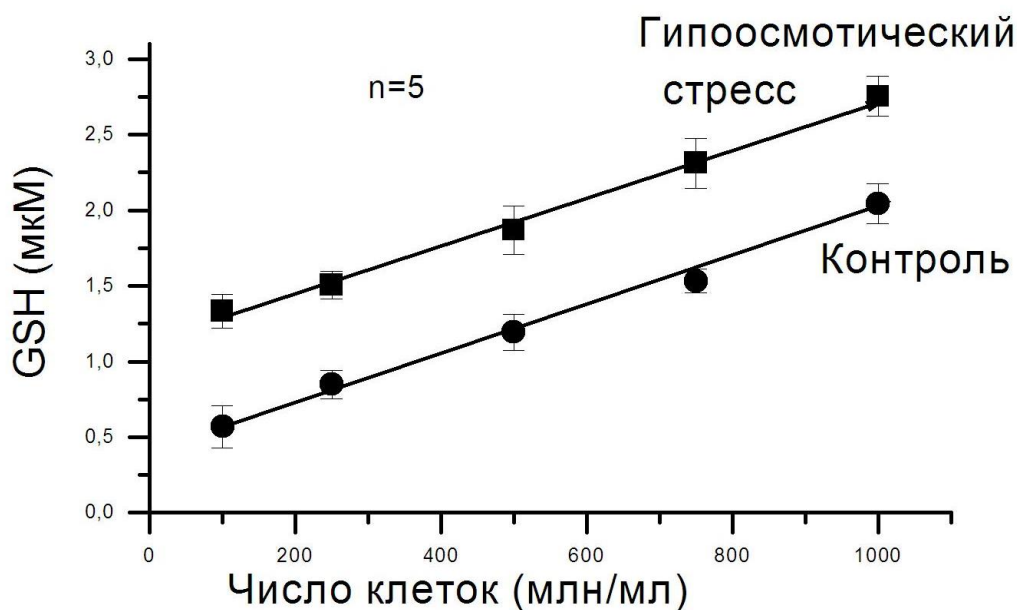


Рис. 6. Выход глутатиона из красных кровяных клеток человека в нормальном состоянии (290 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0.05$ .

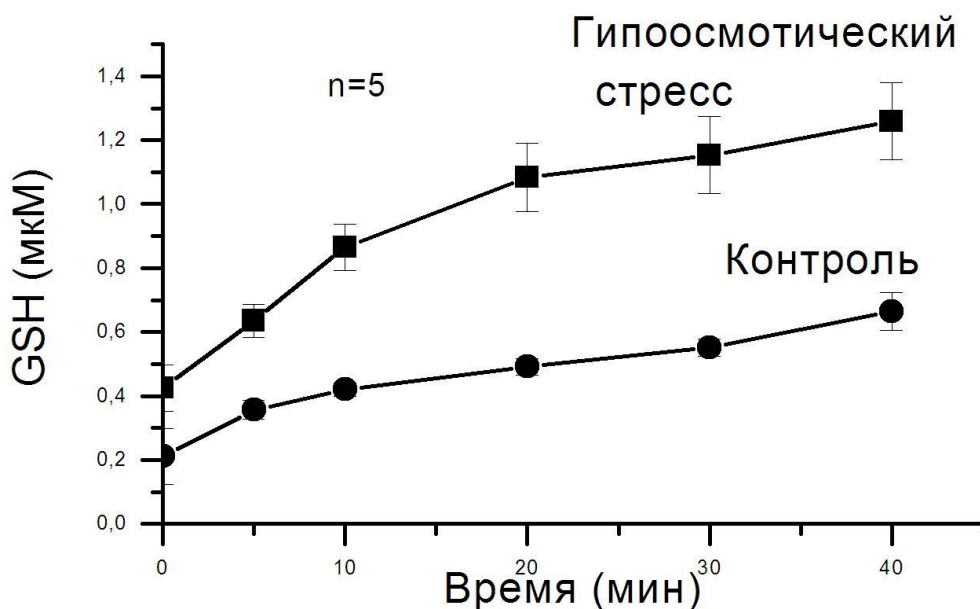


Рис. 7. Выход глутатиона из культуры раковых клеток меланомы в нормальном состоянии (290 мОсм/кг H<sub>2</sub>O) и в условиях гипоосмотического стресса (147 мОсм/кг H<sub>2</sub>O). Звёздочки означают статистически значимое отличие от контроля на уровне  $P < 0.05$ .

*Действие внеклеточного глутатиона на физиологические функции клеток.* Вышедший из клеток глутатион может оказывать аутокринное и паракринное воздействие на клетки-эмитенты и на окружающие клетки и ткани, однако этот вопрос в случае тимоцитов и эритроцитов практически не изучен. С этой целью мы исследовали действие внеклеточного глутатиона на процесс регуляции клеточного объема тимоцитов в условиях гипосмотического стресса, а также на коллоидно-осмотический лизис эритроцитов.

В наших экспериментах, тимоциты, погруженные в гипосмотическую среду, эффективно восстанавливали свой объем на  $78,1 \pm 5,6\%$  ( $n=6$ ) в контроле. Глутатион уже в концентрации  $0,1$  мкМ заметно подавлял регуляторное уменьшение объема тимоцитов, однако даже при больших концентрациях вещества эффект был неполным, и клетки были способны восстанавливать свой объем на  $69,05 \pm 1,3\%$  ( $n=6$ ) при  $10$  мкМ и на  $65,06 \pm 1,4\%$  ( $n=6$ ) при  $100$  мкМ. Полумаксимальный эффект наблюдался при  $1,3 \pm 0,1$  мкМ, а коэффициент Хилла составил  $0.64 \pm 0.31$ .

В наших экспериментах глутатион, добавленный во внеклеточную среду в диапазоне концентраций от  $0,1$  до  $1000$  мкМ, не оказывал заметного влияния на процесс коллоидно-осмотического лизиса эритроцитов под действием нистатина ( $500$  мкМ).

В Заключительной части отмечается, что глутатион является основным антиоксидантом цитоплазмы клетки, который обеспечивает высокий уровень восстановительного потенциала во внутриклеточной среде. Внеклеточная среда также может содержать небольшое количество глутатиона, концентрация которого сильно варьирует в зависимости от физиологического состояния и типа клеток. В нашем исследовании мы изучили выброс глутатиона как в нормальной изоосмотической среде, так и в условиях гипосмотического стресса. Мы впервые обнаружили, что набухание тимоцитов сопровождается массовым выбросом глутатиона во внеклеточное пространство. Процесс зависел линейно от концентрации клеток в суспензии и насыщался со временем. Изучение температурной зависимости показало, что механизм выброса меняется с набуханием клетки, а низкая энергия активации процесса свидетельствует о вкладе ионных каналов в этот процесс. Действительно, фармакологическое исследование процесса выброса глутатиона показало, что основной вклад в процесс оказывает анионный канал, который активируется при осмотическом набухании клеток. Вклад макси-анионного канала в этот процесс, по-видимому, минимален, так как выброс глутатиона был практически нечувствителен к ионам гадолия. Объем-зависимый анионный канал не является единственным транспортным путем для глутатиона. Хотя он и обеспечивает до  $60\%$  от всего выброса глутатиона, остальная часть может выходить из клеток через транспортеры, такие как SLC22A/OAT и SLCO/OATP. АТФаза ABCB/MRP, по-видимому, не принимает участия в выбросе глутатиона из клеток при наших экспериментальных условиях.

Система выброса глутатиона контролируется аденилатциклазной системой, а сам внеклеточный глутатион способен модулировать иммунный статус организма путем воздействия на систему регуляции клеточного объема, который в свою очередь является важнейшим компонентом процессов пролиферации и апоптоза. Таким образом, наши результаты позволяют сформулировать новую гипотезу о том, что глутатион, являясь важнейшим цитоплазматическим метаболитом, может выбрасываться из клеток наружу и, наряду с АТФ и глутаматом, способен функционировать в качестве внеклеточного мессенджера в процессах межклеточной сигнализации. Специфические рецепторы для глутатиона на плазматической мембране в настоящее время еще не идентифицированы. Известно, что глутатион способен связываться с глутаматными рецепторами и модулировать их активность. Возможно также, что в качестве глутатионных рецепторов функционируют некоторые из Ж-белок-зависимых орфантных рецепторов, которые в настоящее время идентифицированы на уровне генов, однако их физиологическая роль еще не определена.

## ВЫВОДЫ.

1. В показан массовый выброс глутатиона из тимоцитов и дано детальное описание этого процесса. Установлено, что скорость выхода глутатиона в расчете на одну клетку составляет  $0,34 \times 10^{-15}$  г/мин в нормальной среде и  $1,96 \times 10^{-15}$  г/мин при гипоосмотическом стрессе. Полумаксимальный выход глутатиона наблюдается при осмотическом давлении среды, равном  $125.1 \pm 4.3$  мОсм/кг  $H_2O$ .

2. Энергия активации выхода глутатиона в температурном диапазоне  $15-37^\circ C$  составляет  $11.1 \pm 1.8$  ккал/моль в нормотонической среде и  $5.4 \pm 0.6$  ккал/моль в условиях гипоосмотического стресса. Две величины энергии активации и двухфазная кинетика выхода глутатиона свидетельствуют о наличии, по меньшей мере, двух механизмов выхода глутатиона.

3. При гипоосмотическом стрессе основная часть глутатиона выходит через объём-зависимый анионный канал, а остальная часть переносится с участием мембранных транспортеров SLCO/OATP и SLC22A/OAT, но не ABCС/MRP. Макси-анионный канал в этом процессе не участвует.

4. Активация аденилатциклазной системы приводит к подавлению процесса выхода глутатиона из тимоцитов.

5. Аналогично тимоцитам, механизм выброса глутатиона присутствует также и в эритроцитах человека и раковых клетках меланомы мыши. Установлено, что скорость выброса глутатиона из эритроцитов примерно в 4 раза медленнее, чем из тимоцитов в нормальной среде и в 10 раз медленнее в условиях гипоосмотического стресса.

6. Показано, что внеклеточный глутатион в микромолярных концентрациях существенно подавляет регуляцию объема тимоцитов, но не оказывает влияния на коллоидно-осмотический лизис эритроцитов.

7. Предложена новая гипотеза функции глутатиона в качестве сигнальной молекулы в процессах межклеточной сигнализации.

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

---

**INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY**

**MELANOVA NAZIRA RASHIDOVNA**

**INVESTIGATION OF THE SYSTEM OF GLUTATHIONE  
RELEASE FROM CELLS**

03.00.02-Biophysics and radiobiology

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

**Tashkent – 2018**

**This dissertation of PhD has been registered with the number B2017.2.PhD/B79 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan**

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

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council ([ww.biochem.uz](http://ww.biochem.uz)) and on the website of “ZiyoNet” information and educational portal ([www.ziyo.net](http://www.ziyo.net)).

**Scientific supervisor:**

**Sabirov Ravshan Zairovich**  
doctor of biological sciences, academician

**Official opponents:**

**Aripov Taxir Fatixovich**  
doctor of biological sciences, academician

**Urmanova Gulbaxor Urinboyevna**  
Doctor of Philosophy of biological sciences

**Leading organisation:**

**Andijan state university**

The defence of the dissertation will take place on “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2018 year \_\_\_\_ at the meeting of the Scientific council DSc27.06.2017.K/B/T.37.01. on award of scientific degrees at the Institute of Bioorganic Chemistry and National University of Uzbekistan and the Institute of Chemistry of Plant Substances at the following (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262-35-40; fax: (99871)-262-70-63).

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

Abstract of dissertation is distributed on “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2018 year  
(Protocol at the register \_\_\_\_\_ on “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2018 year.

**Sh.I.Salikhov**

Chairman of scientific council on award of scientific degrees, D.B.Sc., academician

**M.I.Asrarov**

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

**Sh.U.Turdikulova**

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



## INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

**The aim of the research work** is a detail characterization of the process of glutathione release from cells in normal conditions and under hypoosmotic stress, and elucidation of the role of ion channels and transporters in this process.

**The objects of the research work** rat thymocytes, red blood cells, and culture of mouse melanoma cells (KML line).

**Scientific novelty of the research work** is as follows:

in this study, for the first time, the process of release of glutathione from thymocytes in normal conditions and under hypoosmotic stress has been demonstrated;

using specific pharmacology, it was demonstrated for the first time that glutathione is released predominantly via volume-sensitive anion channel, whereas anion transporters of SLCO/OATP and SLC22A/OAT play a secondary role.

it was shown that activation of adenylyl cyclase system causes a negative effect on the release of glutathione from thymocytes.

the presence of the osmo-reactive transport of glutathione was also found in other types of cells (erythrocytes and melanoma), and the modulation of the cell volume regulation by extracellular glutathione was shown.

**Implementation of the research results:** On the basis of the obtained new scientific results on the characterisation of the glutathione release system from cells:

data on the leading role of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel in the release of glutathione from thymocytes were used by international journals with high impact factor for the analysis of the role of ion channels in the cellular processes (*Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF - 3.33; *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013, V.32, Research Gate, IF-3.84; *Journal of General Physiology* 2015, V.146, ResearchGate, IF-1.51). The application of the scientific results enabled characterization of the role of ion channels in cell physiology;

data on the participation of SLCO/OATP and SLC22A/OAT transporters in the release of thymocyte glutathione has been used by international journals with a high impact factor for the analysis of the role of transporters in the cellular processes (*Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2016, V.468, ResearchGate, IF-3.33, *Neurotoxicology* 2014, V.41, ResearchGate, IF - 1.93; *Current Drug Metabolism* 2015, V.468, ResearchGate, IF - 2.74). The application of the scientific results enabled characterization of the role of transporters in cell physiology;

scientific results on the mechanism of the release of glutathione from thymocytes were used within the framework of the scientific project F-5-06 "Studying the mechanism of action of some bioregulators" (2012-2016) in analyzing the effect of bioregulatory compounds on cells and organelles, and also for clarifying the mechanism of action of bioregulatory agents at the level of the whole body (Certificate of the Agency for Science and Technology AST-02-11 / 112 dated Nov 20, 2017). The use of scientific results has enabled the

characterization of the mechanism of action of bioregulatory agents at the level of the organism.

**The structure and volume of the thesis.** The dissertation consists of introduction three chapters, conclusion and list of used literature. The volume of the thesis is 102 pages

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; Part I)**

1. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Выброс глутатиона из тимоцитов в норме и при гипоосмотическом стрессе // Доклады Академии наук Республики Узбекистан. Ташкент, 2011, № 2. – С.63-66.(03.00.00, № 6)
2. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Фармакологический анализ механизма выброса глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе // Узбекский биологический журнал. Ташкент, 2011, № 4. – С.11-14.(03.00.00, № 5)
3. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Кузнецова Н.Н., Окада Я., Сабилов Р.З. Турли хил хужайралардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқиши // ЎЗМУ хабарлари. Ташкент, 2011, Махсус сон. – Б.14-15. (03.00.00, № 9)
4. Sabirov R.Z., Kurbannazarova R.S., Melanova N.R. and Okada Y. Volume-Sensitive Anion Channels Mediate Osmosensitive Glutathione Release From Rat Thymocytes.// *PLOS ONE*. -2013. -8(1). -P.e55646. (№40, ResearchGate, IF – 4.49)
5. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишининг эритма ион таркибининг боғлиқлиги // ЎЗМУ хабарлари. Тошкент, 2015, № 3/1. – Б.75-77. (03.00.00, № 9)
6. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига хужайра ичидаги ц АМФ нинг таъсири // ҚарДУ хабарлари. Қарши, 2016, №3. – Б. 23-25. (03.00.00, № 11)
7. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири // ЎЗМУ Хабарлари. Тошкент, 2017, № 3/1. – Б.103-106. (03.00.00, № 9)

**II бўлим (II часть; Part II)**

8. Курбанназарова Р.Ш., Меланова Н.Р., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Фармакологическое исследование механизма регуляции объема лимфоцитов тимуса при гипоосмотическом стрессе // Науч. практ. конф. с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика С.Ю.Юнусова «Актуальные проблемы химии природных соединений». Ташкент, 2009. – С.62.
9. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Рустамова С.И., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Тимоцитлардан глутатион чиқиши ва унинг гипоосмотик стрессда хужайра ҳажм бошқарилишига таъсири // Материалы

Республиканской науч. конф, посвященной 75-летию академика Ташмухамедова Б.А. «Актуальные проблемы современной физиологии и биофизики». Ташкент, 2010. – Б.103.

10. Sabirov R.Z., Kurbannazarova R.S., Melanova N.R. and Okada Y. Swelling-induced release of glutathione from rat thymocytes // The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of the PSJ,- Marioka, 2010. - J. Physiol. Sci. – V.60 (Suppl.) – S13.

11. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Фармакологическое исследование механизма выброса глутатиона из тимоцитов при гипоосмотическом стрессе // Тезисы, докладов конференции молодых ученых «Актуальные проблемы химии природных соединений». Ташкент, 2011. – С.73.

12. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Кузнецова Н.Н., Окада Я., Сабилов Р.З. Тимоцит, эритроцит ва меланома хужайраларидан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишини ўрганиш // «Ботаника, биоэкология, ўсимликлар физиологияси ва биокимёси муаммолари». Республика илмий-амалий анжумани. Тошкент, 2011. – Б.81.

13. Меланова Н.Р. Изучение выхода глутатиона из тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса // Международная конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» сборник тезисов. Пущино (Россия), 2015. – С.87-88.

14. Меланова Н.Р., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Окада Я., Сабилов Р.З. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига хужайра ичидаги цАМФ нинг таъсири // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы физико-химической биологии», посв. 80-летию акад. АН РУз Ташмухамедова Б.А. Ташкент, 2015. –С. 186-187.

Автореферат «Ўзбекистон биология» журнали таҳририятида таҳрир қилинди. (24.01.2018)

Босишга рухсат этилди: 07.02.2018 йил.  
Бичими 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>, «Times New Roman»  
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.  
Шартли босма табағи: 3. Адади 65. Буюртма №27.  
Тошкент тўқимачилик ва енгил саноат институти босмаҳонаси.  
Босмаҳона манзили: 100100, Тошкент ш., Шохжаҳон-5





