ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.B.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

ЦИФЕРОВА НАРГИЗА АЛЕКСАНДРОВНА

КУЛЬТУРАДАГИ ҲУЖАЙРАЛАРНИНГ ПЛАЗМАТИК МЕМБРАНАСИДАГИ АНИОН ТРАНСПОРТИ ТИЗИМЛАРИ

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2020

УДК: 577.352.465

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

Циферова Наргиза Александровна
Культурадаги ҳужайраларнинг плазматик мембранасидаги анион транспорти тизимлари.....3

Циферова Наргиза Александровна
Системы транспорта анионов плазматических мембран клеток в культуре.....22

Tsiferova Nargiza Aleksandrovna
Anion transport systems of plasma membranes of cells in culture…….....41

Эълон қилинган ишлар рўйхати
Список опубликованных работ
List of published works.....45

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.B.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ

ЦИФЕРОВА НАРГИЗА АЛЕКСАНДРОВНА

КУЛЬТУРАДАГИ ҲУЖАЙРАЛАРНИНГ ПЛАЗМАТИК МЕМБРАНАСИДАГИ АНИОН ТРАНСПОРТИ ТИЗИМЛАРИ

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2020

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.1.PhD/B8 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифасида (www.ibb-nuu.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот–таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:	**Сабиров Равшан Заирович** биология фанлари доктори, академик
Расмий оппонентлар:	**Мирходжаев Улугбек Закирович** биология фанлари доктори, профессор
	Тонких Анатолий Константинович биология фанлари номзоди
Етакчи ташкилот:	**ЎзР ФА Геномика ва биоинформатика маркази**

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги DSc.03/30.12.2019.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «____» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент ш., Олмазор т., Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96.

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институти Ахборот–ресурс марказида танишиш мумкин (____ рақами билан рўйхатга олинган). 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96. e–mail: www.ibb-nuu@mail.ru.

Диссертация автореферати 2020 йил «___» _____куни тарқатилди.

(2020 йил «___» _____ даги №_____ рақамли реестр баённомаси).

Саатов Талъат Саатович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси ўринбосари, б.ф.д., академик

Асраров Музаффар Исламович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

Ахмеджанов Искандар Гулямович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Ҳозирги вақтда дунёда ҳар йили тери саратонининг 2 миллиондан 3 миллионгача меланомасиз ва юз мингдан ортиқ меланомали ҳолатлари қайд этилади. Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти маълумотларига кўра, саратоннинг ҳар бир учинчи диагнози – бу тери саратонидир. Меланома каби кимёвий терапияга қарши анча чидамлиликка эга бўлган онкологик касалликларни даволашда эришилган ютуқларга қарамасдан, уларнинг кечиши таҳдидли бўлиб қолмоқда. Шунинг учун ҳам янги кимёвий терапевтик воситаларни, ҳам янги нишонлар – ион каналларини излаш замонавий биофизика ва онкологиянинг ўта долзарб вазифаси ҳисобланади. Бундай нишонлардан бири бўлиб, ҳужайранинг анион транспорти системасига кирувчи ҳажм фаоллаштирадиган анион каналлари – макси-анион канали ва ҳажмга боғлиқ анион канали бўлиши мумкин.

Жаҳон илмий-тадқиқот фаолиятида ҳажм фаоллаштирадиган анион каналларини ўрганиш бўйича олиб борилаётган ишлар алоҳида ўринни эгаллайди. Ушбу каналлар ҳужайра ҳажмини бошқариш тизимига ҳамда онкогенез ва метастазлар ҳосил бўлишида катта ахамиятга эга бўлган пролиферация, миграция ва апоптоз жараёнларига катта ҳисса қўшади. Ҳажм фаоллаштирадиган анион каналлари физиологик ва патофизиологик жиҳатдан аҳамиятли эканлигига қарамай, улар меланома ҳужайраларида деярли ўрганилмаган ва ҳозирги кунга қадар етарли даражада паст концентрацияларда ҳажм фаоллаштирадиган анион каналларига таъсир қила оладиган кучли ингибитор ёки активатор мавжуд эмас. Шунинг учун ҳажм фаоллаштирадиган анион каналларининг янги селектив ва шу билан бирга токсиклиги паст бўлган ингибиторлари ёки активаторларини излаш ўта долзарб вазифа ҳисобланади.

Ўзбекистонда ҳозирги вақтда янги дори воситаларини ишлаб чиқариш амалиётига илмий ва инновацион ютуқларни қўллашга катта эътибор берилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «... илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш»[1] бўйича вазифалар белгиланган. Бундан ташқари, Ҳаракатлар стратегиясининг ижтимоий соҳани ривожлантиришнинг тўртинчи устувор йўналишида ҳам «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш»[1] каби муҳим вазифалар белгиланган. Мазкур контекстда, анион транспорти тизимини культурадаги ҳужайраларда, хусусан меланома ҳужайраларида ўрганиш ҳамда Ўзбекистонда ўсадиган ўсимликлардан ажратиб олинган моддалар орасидан ҳажм фаоллаштирадиган каналларнинг

[1] Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони

модуляторларини излаш терининг саратон касалликларини даволашнинг янги йўлларини белгилаш ва хавфли касалликларга қарши курашишда юқори самарали дори воситаларини ишлаб чиқариш имконини беради.

Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 30 декабрдаги ПҚ-4554-сон «Ўзбекистон Республикаси фармацевтика тармоғида ислоҳотларни чуқурлаштиришга доир қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида» ги Қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Ўзбекистон Республикаси фан ва технологияларни ривожлантиришнинг. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирги кунда дунё миқёсида меланома ҳужайралари пролиферативь хоссаларига ион каналларининг таъсирини ўрганиш бўйича олиб борилган илмий-тадқиқот ишларида асосан катион каналлари ёритилади. Кўрсатилишича, турли типдаги калий каналлари экспрессиясини ингибирлаш ҳужайра циклини тўхташига олиб келади [Lepple-Wienhues et al., 1996, Allen et al., 2010], кальцийга боғлиқ калий каналини фаоллашуви метастазлар ҳосил бўлишини стимуляциялайди [Schmidt et al, 2010], депога боғлиқ кальций оқими меланоманинг метастазланишида бевосита рол ўйнайди [Sun et al., 2014]. Бироқ, меланома ҳужайраларидаги анион каналлари ҳақида тўлиқ маълумотлар мавжуд эмас.

МДҲ мамлакатларида ҳужайра ҳажмини бошқариш жараёнларини ўрганиш Орлов С.Н. ва Максимов Г.В. ва уларнинг ходимлари ишларида акс этган. Жумладан, апоптоз, некроз ва пуринергик рецепторларни фаоллашишида ҳужайра ҳажмини бошқарилиши, ҳужайра ҳажмини ўзгариши билан боғлиқ ҳолда ион транспортининг роли, томир силлиқ мускул ҳужайраларининг қисқарувчи функциясини бошқарилиш механизмлари, лимфоид ҳужайраларининг фаоллашиши ва уларни дастурлашган ўлими жараёнларида плазматик мембраналардаги хлор каналларининг иштирокини таҳлил қилиш амалга оширилган. Михайлова И.Н. гуруҳи томонидан одам териси меланомаси моделларини яратиш ва уларни илмий ва клиник олди тадқиқотларда меланомага қарши воситалар кашф қилишда қўллаш бўйича ишлар олиб борилмоқда. Бироқ, анион транспорти тизими ва ҳужайра ҳажмини бошқариш жараёнларининг ўсмалар ҳосил бўлиши ва уларни метастазлар беришига қўшадиган ҳисссаси ўрганилмай қолмоқда.

Республикамизда академиклар Ташмухамедов Б.А., Арипов Т.Ф. ва Сабиров Р.З. ҳамда профессорлар Усманов П.Б., Асраров М.И., Мирходжаев

У.З. лабораторияларида мембраналар биофизикаси, ион каналари ва транспортерларнинг ҳужайра физиологияси бўйича кенг кўламли тадқиқотлар амалга ошилмоқда. Кальций транспорти тизимларининг юрак ва силлиқ мускулларининг қисқаришидаги роли, мегапоранинг митохондриялардаги роли ва ҳужайра энергетикасини табиий биологик фаол моддалар ёрдамида коррекциялаш, краун-эфирларнинг мембрана фаоллиги борасида илмий изланишлар олиб борилмоқда.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот ташкилотининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти ЎзМУ ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф5-Т080 «Ҳажм фаоллаштирадиган анион транспортининг молекуляр физиологияси ва биофизикаси» (2012-2016), ФА-А11-Т060 «Перспектив иммуномодулятор ва саратонга қарши препаратлар сифатида ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ анион каналларининг янги модуляторларини излаш» (2015-2017), ФА-Ф5-014 «Ҳажмга боғлиқ анион каналларининг биофизикавий фенотипи ва ҳужайра ҳажм бошқарилиш механизмидаги функцияларини ўрганиш» (2017-2020) ва ПЗ-2017-0920-49 «Маҳаллий хом-ашё асосида ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ мембрана транспорти модуляторлари бўлган янги перспектив субстанцияларни тадқиқи» (2018-2020) мавзусидаги илмий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади культурада ўстирилаётган ҳужайралар плазмалеммасидаги ҳажм фаоллаштирадиган анион транспорти тизимларининг биофизикавий тавсифларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

КМЛ меланомаси ҳужайралари культурасида макси-анион каналининг биофизикавий профили (фаоллашуви, амплитудаси, вольт-ампер характеристикалари, потенциалга боғлиқлик, танловчанлик, АТФ учун ўтказувчанлик) ва фармакологик хоссаларини аниқлаш;

КМЛ меланомаси ҳужайралари культурасида ҳажмга боғлиқ анион каналининг биофизикавий профили (фаоллашуви, амплитудаси, вольт-ампер характеристикалари, потенциалга боғлиқлик, танловчанлик) ва фармакологик хоссаларини аниқлаш;

КМЛ меланомаси ҳужайралари ўстириш муҳитининг ҳажмга боғлиқ анион канали биофизикавий хоссаларига таъсирини аниқлаш;

ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаолиятида LRRC8A оқсилининг ролини тадқиқ қилиш;

ҳажмга боғлиқ анион канали фаоллигини модуляторлари сифатида биологик фаол моддаларни *in vitro* скрининг қилиш учун мос келадиган ҳужайра моделларини аниқлаш, шунингдек Ўзбекистон Республикаси флорасидан ажратиб олинган ўсимликлар асосида каналнинг истиқболли блокаторларини топиш.

Тадқиқотнинг объекти КМЛ сичқон меланомаси, HeLa одам аденокарциномаси, HCT116 одам йўғон ичак саратони, KB одам

аденокарциномаси ва унинг цисплатинга чидамли варианти, KCP-4 ҳужайра культура линиялари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети культурада ўстирилаётган ҳужайралар мембранасидаги макси-анион ва ҳажмга боғлиқ анион каналларининг биофизикавий ва фармакологик хоссалари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертация тадқиқотида биофизика, электрофизиология ва молекуляр биологиянинг замонавий методлари: электрофизиологик тадқиқотлар учун токларни микролокал ўлчаш методи – пэтч-кламп; оқсиллар экспрессияси даражасини ген учун учун хос ҳолда сусайтириш (нокдаун) учун РНК-интерференцияси методи; генларнинг тўлиқ тўпламини экспрессияланиш даражасини аниқлаш учун микроматрицали таҳлил; *Lrrc8a* экспрессиясини миРНК ёрдамида нокдаун қилишни баҳолаш учун тескари транскрипция билан полимеразали занжирли реакция методи.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

КМЛ ҳужайралари катта ўтказувчанликдаги анион каналини экспрессиялаши аниқланган, меланомадаги макси-анион каналининг биофизикавий профили ва унинг фармакологик хоссалари батафсил аниқланган;

осмотик стресснинг КМЛ ҳужайраси мембранасида оралиқ ўтказувчанликдаги ҳажмга боғлиқ анион каналини фаоллаштириши аниқланган, ҳажмга боғлиқ анион каналининг биофизикавий профили ва унинг фармакологик хоссалари батафсил ёритиб берилган, культурани ўстириш муҳитининг канал биофизикавий хоссаларига кескин таъсир кўрсатиши аниқланган;

LRRC8A оқсили ҳажмга боғлиқ анион каналининг алмаштириб бўлмайдиган компоненти эканлиги, лекин унинг цисплатинга чидамли саратон ҳужайраларидаги каналнинг фаоллиги учун етарли эмаслиги аниқланган;

HeLa ва HCT116 ҳужайра линиялари ҳажмга боғлиқ анион каналининг янги модуляторларини излашда адекват модели эканлиги кўрсатилган, ўсимлик моддалари орасидан каналнинг истиқболли ингибиторлари аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

ҳажмга боғлиқ анион канали меланомани даволаш учун саратонга қарши препаратларни излашда янги нишон бўлиши асосланган;

ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллигини самарали сусайтира оладиган, токсиклиги кам бўлган кардио- ва нейропротекторлар ва саратонга қарши янги препаратларни яратиш учун асос бўлиб хизмат қила оладиган, ўсимликлардан ажратилган янги блокаторлар аниқланган.

Тадқиқот натижаларинин г ишончлилиги тадқиқотларда замонавий биофизикавий усуллар ва молекуляр биологиянинг методларини қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Хулосалар Стьюдент критерийси ёки вариацион анализдан (ANOVA) фойдаланган ҳолда OriginPro, 5-8 версияси (OriginLab Corporation, АҚШ) компьютер дастурини қўллаб,

ишончлилик эҳтимоли *P*<0,05 бўлган даражада, замонавий математик статистика методлари ёрдамида таҳлил қилинган натижалар асосида чиқарилган. Олинган натижаларнинг ишончлилигининг исботи бўлиб, мутахассисларнинг берган эксперт баҳолари, олинган натижаларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокама қилинганлиги, ва тадқиқот натижаларининг рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларнинг илмий аҳамияти меланома ҳужайраларида ҳужайранинг энг муҳим физиологик вазифаларидан бири – ҳужайра ҳажмининг бошқарилиши учун масъул бўлган анион каналлари, макси-анион канали ва ҳажмга боғлиқ анион каналлари экспрессиясининг аниқланганлиги ва биринчи бор меланома ҳужайраларидаги анион каналларининг биофизикавий тавсифи ва фармакологик профили батафсил таърифлангани билан изохланади.

Тадқиқот натижаларнинг амалий аҳамияти, биз аниқлаган меланомадаги каналлар саратонга қарши препаратларнинг янги истиқболли авлоди ва таъсир механизмини ёритиш учун янги самарали нишон бўлиши мумкинлиги билан изохланади.

Тадқиқот натижаларнинг жорий қилиниши. Культурадаги ҳужайраларда анион транспорти системаси ҳақида олинган илмий натижалар асосида:

ҳажмга боғлиқ анион каналининг пора ҳосил қилишига LRRC8A оқсилининг қўшган ҳиссаси ҳақидаги маълумотлар импакт-фактори юқори бўлган хорижий журналларда канал суббирликларининг структураларини аниқлашда фойдаланилган (*eLife* 2019, V.8, Scopus CiteScore 6.99; *Biophysical Journal* 2019, V. 116, Scopus CiteScore - 3.26; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 177-203, Scopus CiteScore – 3.29; *Oncology Reports* 2018, V.40, Scopus CiteScore – 3.07).Натижалар ҳажмга боғлиқ анион каналининг уч ўлчамли структурасидаги LRRC8A оқсилининг ҳолатини тавсифлаш имконини берган;

ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллигини қайд этиш учун LRRC8 оиласига кирувчи оқсиллардан ташқари номаълум регулятор компонентнинг экспрессияси ҳам зарурлиги ҳақидаги маълумотлар импакт-фактори юқори бўлган хорижий журналларда ҳажмга боғлиқ анион канали порасининг регуляторларини излашда фойдаланилган (*Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 183-215, Scopus CiteScore –2.67; *Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 131-133, Scopus CiteScore –2.67; *EMBO Journal* 2017, V. 36, Scopus CiteScore – 8.28). Натижалар ҳажмга боғлиқ анион каналлари пораларининг регуляторларини излаш борасидаги тадқиқотларни давом эттириш имконини берган;

АТФ молекулаларини ҳажм фаоллаштирадиган каналлар орқали ташилиши ҳақидаги маълумотлар импакт-фактори юқори бўлган хорижий журналларда ҳажмга боғлиқ анион каналининг ион ташувчи хоссаларини тавсифлашда фойдаланилган (*International Journal of Molecular Sciences* 2018,

V.19, P. 808, Scopus CiteScore – 4.32; *Pharmacological Reviews* 2019, V.71, P. 49-88, Scopus CiteScore – 18.73; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 125-176, Scopus CiteScore – 3.29). Натижалар АТФ молекулаларини ҳажм фаоллаштирадиган каналлар орқали ташилишини тавсифлаш имконини берган;

ферутининнинг одам аденокарциномаси HeLa ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллигига таъсири ҳақидаги натижалар Ф-5-06 «Айрим биорегуляторларнинг таъсир механизмини ўрганиш» фундаментал лойиҳасида фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлигининг 2019 йил 3 октябрдаги 89-03-3705-сон маълумотномаси). Натижалар ферутининнинг бир қатор ҳужайра ички жараёнлардаги ролини, жумладан, ҳужайралардаги кальций сигнализациясини ферутинин ёрдамида модуляциялаш механизмини очиб бериш, ферутининнинг мембранафаол хоссаларини аниқлаш ва унинг ҳажмга боғлиқ анион каналига таъсирининг самарасини тавсифлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 7 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокама қилинган.

Тадқиқот натижаларнинг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 22 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация коммиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 8 та мақола, шундан 5 та республика ва 3 та хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, олтита боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 105 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

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

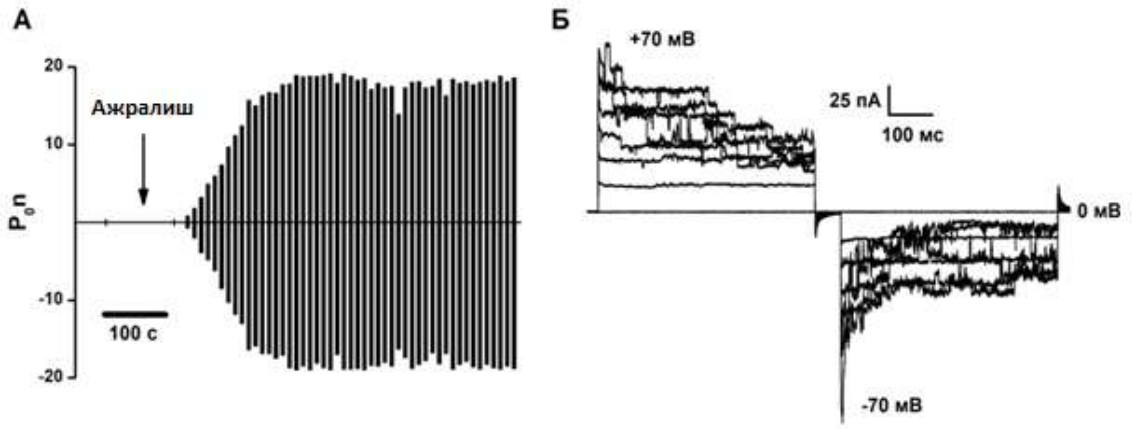
Диссертациянинг **«Ҳажм фаоллаштирадиган анион каналларининг хоссалари»** деб номланган биринчи бобида макси-анион канали ва ҳажмга боғлиқ анион канали (ҲБАК)нинг биофизикавий, фармакологик характеристикалари, ўрганилаётган каналларнинг турли типдаги ҳужайраларда фаоллашуви ва экспрессияси, каналларнинг асосий хоссаларини ҳужайра типига боғлиқлиги ҳақидаги замонавий адабиётлар маълумотлари берилган. Каналларнинг молекуляр структураси, ҳажмга

боғлиқ каналнинг канал пораси суббирлик таркибига боғлиқ ҳолдаги биофизикавий характеристикалари, макси-анион каналининг простагландинларни транспортери сифатида ҳамда АТФ-ўтказувчи канал сифатида фаолият кўрсатиши ҳақидаги маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Анион транспорти системасини ўрганишдаги биофизика ва молекуляр биологиянинг замонавий методлари»** деб номланган иккинчи бобида токларни микролокал ўлчаш методи – пэтч-кламп батафсил ёритилган ва мазкур тадқиқотда фойдаланилган асбоб-ускуналар келтирилган. Ҳужайра культураларини ўстириш протоколлари келтирилган. Молекуляр биологиянинг генлар экспрессиясини пасайтириш, пасайтиришнинг самарасини баҳолаш имконини берувчи методлари, шунингдек керакли генларнинг оверэкспрессияси методлари берилган.

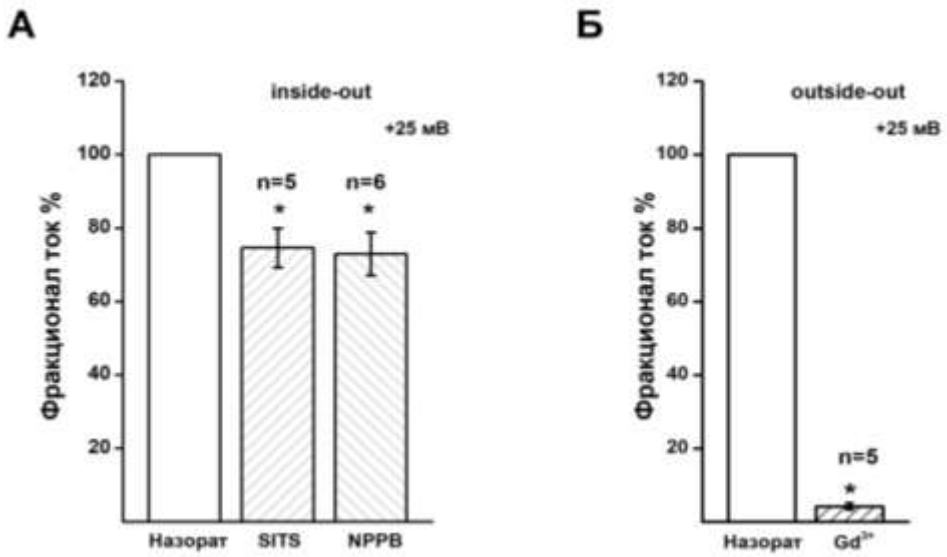
Диссертациянинг **«КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларидаги макси-анион каналининг хоссалари»** деб номланган учинчи бобида КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларидаги макси-анион каналининг биофизикавий ва фармакологик хоссалари тадқиқ қилиш натижалари келтирилган. Макси-анион каналининг фаоллашувини ҳужайра мембранаси фрагментида *inside-out* конфигурациясида пэтч-кламп методи ёрдамида қайд қилдик. Мембрана ажратилгани заҳоти (t=0 мин) каналнинг фаоллиги кузатилмади. Ёзув бошланганидан 1-2 минут ўтгач якка каналлар аста-секин пайдо бўла бошлади, 5-минутга келиб +25 мВ да 10,7±1,9 пА (n=7) амплитудали, ва –25 мВ да 9,92±1,75 пА (n=5) амплитудали 10-15 та каналлар аниқланди (1-расм). Қайд қилинаётган ток потенциалга боғлиқ бўлди ва ±30 мВ дан юқори тест импульслари берилганида тезда фаоллигини йўқотди; якка каналнинг вольт-ампер характеристикалари тўғрилашга эга бўлмади, ўтказувчанлиги 300-400 пСм га мос келадиган қияликка эга чизиқли бўлди. Фаоллашганидан сўнг макси-анион канали ±10 мВ атрофидаги потенциалларда максимал очиқ ҳолат эҳтимолига эга бўлди. КМЛ ҳужайраларидаги макси-анион каналининг катион-анион селективлигини ўрганилганда, ўтказувчанликлар нисбати P_{Cl}/P_{Na} = 8,9±0,4 га тенг бўлиши ва демак канал анион селектив эканлигини кўрсатади. Каналнинг органик анион – глутаматга нисбатан ўтказувчанлигини ўрганиш бўйича тажрибаларда глутамат$^-$ ўтказувчанлигининг хлорга нисбати (P_{Glu}/P_{Cl}) = 0,12 ± 0,01 ни ташкил этди, бу эса каналнинг глутамат ионлари учун ўтказувчан эканлигини билдиради.

Макси-анион каналининг асосий характеристикаларидан бири унинг АТФ молекулалари учун ўтказувчанлиги ҳисобланади. КМЛ меланомаси ҳужайраларида макси-анион каналининг АТФ молекулалари учун ўтказувчанлиги бўйича ўтказилган тажрибалар ўтказувчанликлар нисбати $P_{АТФ}/P_{Cl}$ = 0,07 эканлигини кўрсатди, ва бу КМЛ ҳужайраларининг АТФ молекуласини ўтказа олиши ва ҳужайраларо пуринэргик сигнализацияси учун самарали тарнспорт йўли бўлиб хизмат қилишидан далолат беради.



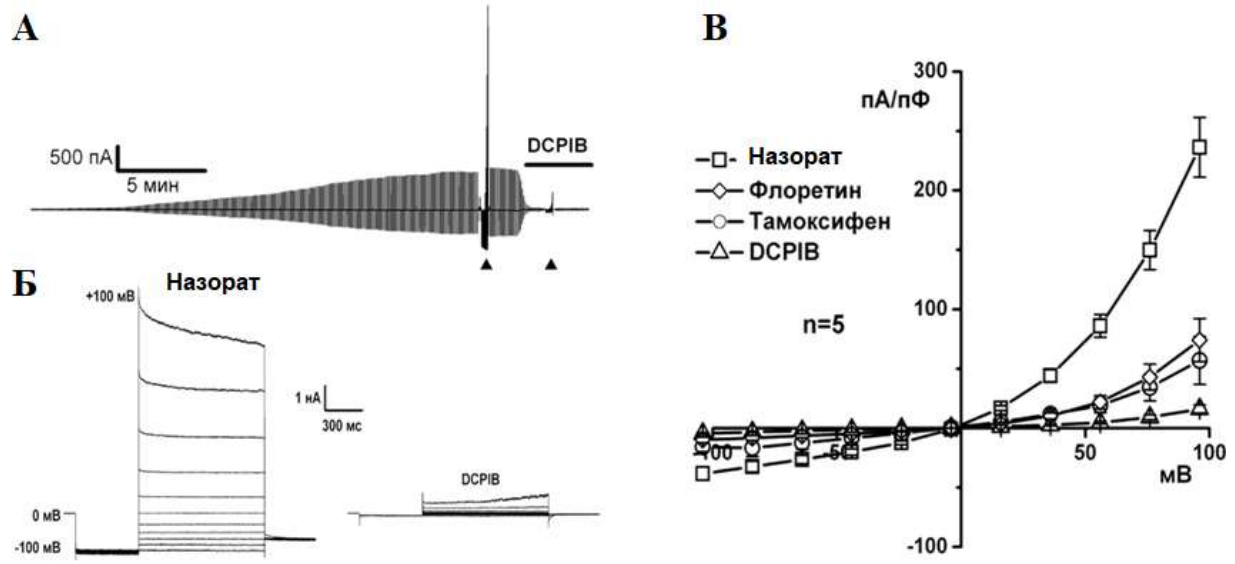
1-расм. Мембрана фрагментини ажратиш методи ёрдамида макси-анион каналини фаоллаштириш. (А) Вақт давомида, 0,5 сек давомийликда ва 10 сек. интервал билан ±25 мВ амплитудали тест-потенциаллар серияси берилганда мембрана фрагменти орқали токнинг ортиши кўрсатилган. P_on – очиқ каналларнинг ўртача сони. (Б) Макси-анион каналининг потенциалга боғлиқ ҳолда «ўчиши»нинг тасвири. Импульслар фиксацияланган 0 мВ потенциалидан 10 мВ қадам билан ±70мВ диапазонда берилган.

КМЛ ҳужайралари плазмалеммасида қайд қилинадиган макси-анион каналининг фармакологик профилини тасдиқлаш учун тажрибаларнинг навбатдаги сериясида inside-out конфигурациясида анион токининг классик блокаторлари SITS ва NPPB ҳамда outside-out конфигурациясида гадолиниум ионларидан (Gd^{3+}) фойдаланилди. Бизнинг тажрибаларимизда аниқланишича, ювувчи эритма таркибига анион транспорти блокатори SITS 100 мкМ концентрацияда қўшилиши макси-анион каналининг ўтказувчанлигини +25 мВ да назоратга нисбатан ўртача ~30% га камайишига олиб келади (2А-расм). Анион транспорти блокатори NPPB дан фойдаланилганда, у 100 мкМ концентрацияда макси-анион канали орқали токни ҳам пасайишини чақирганлиги аниқланди, бироқ бу ҳолда ингибирланиш анча кучли даражада бўлиб, назоратга нисбатан +25 мВ да ~40% ни ташкил этди. Гадолиниум лантаноиди ионларини КМЛ ҳужайраларидаги макси-анион канали фаоллигига таъсирини ўрганиш бўйича тажрибаларимизни outside-out конфигурациясида олиб бордик. Бунда биз ювувчи эритма таркибига 30 мкМ модда қўшилганида токни бутунлай блокланганлигини кузатдик (2Б-расм). Келтирилган тажрибалардан канал анион токи блокаторлари SITS ва NPPB га сезгирдир ва анион каналлари ичида фақатгина макси-анион каналини блоклайдиган гадолиниум лантаноиди ионлари билан тўлиқ блокланади, деган хулосага келиш мумкин. SITS, NPPB ва Gd^{3+} ларнинг КМЛ ҳужайраларида макси-анион каналининг ўтказувчанлигига биз қайд этган таъсирлари неонатал кардиомиоцитлар [Dutta et al., 2004], етук кардиомиоцитлар [Dutta et al., 2008], сичқон астроцитлари [Liu et al., 2008], C127 сут бези саратони [Sabirov et al., 2014] ва L929 фибросаркома [Islam et al., 2012] учун берилган маълумотларга ўхшашдир.



2-расм. КМЛ ҳужайраларидаги макси-анион каналига Gd^{3+} ва анион токининг классик блокаторларининг outside-out ва inside-out конфигурациялардаги таъсири. SITS ва NPPB (inside-out) – (А), Gd^{3+} (outside-out) – (Б) блокаторлар иштирокида қолдиқ токнинг ўртача катталиклари келтирилган. Каналлар ±25 мВ берилганда қайд қилинган. *назоратга нисбатан P<0.05.

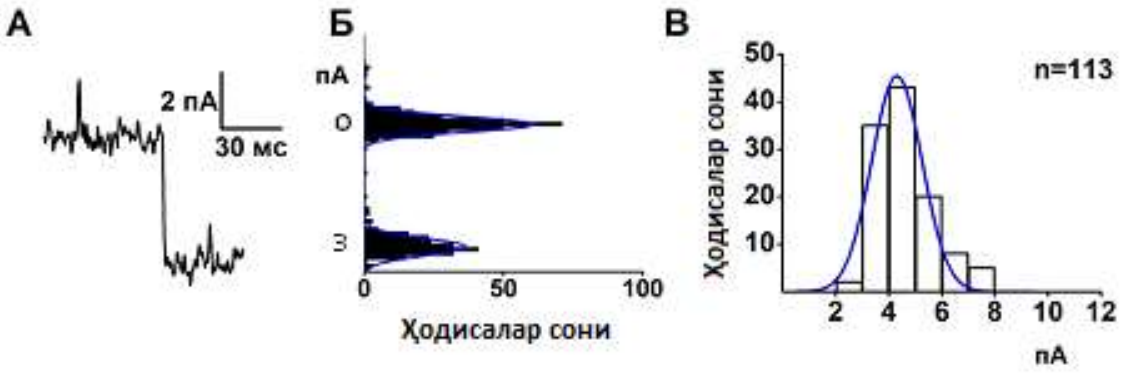
Тўртинчи боб **«КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион каналининг хоссалари»** деб номланган ва унда ҳажмга боғлиқ анион канали ҲБАКнинг биофизикавий ва фармакологик хоссалари, якка каналининг характеристикаси ҳамда культурани ўстириш муҳитининг КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларидаги ўрганилаётган каналнинг биофизикасига таъсирини тадқиқ қилиш натижалари келтирилган. Ўстирилаётган ҳужайралар культураси whole-cell конфигурацияда ўрганилди, бунда пипеткадаги эритманинг юқори гипертоник бўлиши ҳужайрани шишишига ва бу билан параллел равишда ҲБАКнинг фаоллашишига олиб келди (3А-расм). Ҳажмга боғлиқ ўтказувчанликнинг фаоллашишининг ярим-максимал вақти 9,5 ± 0,6 мин ни ташкил этди (n=6). Ҳажм билан фаоллашган макроскопик ток яққол ташқи тўғриланишга эга бўлди ва +80 мВдан юқори мусбат потенциалларда инактивацияланди. Бунда деполяризация даражаси ортиши билан инактивацияланиш тезлиги ҳам ортиб борди (3Б-расм). Ҳажм фаоллаштирадиган токнинг зичлиги +100 мВ да 236±25 пА/пФ (n=7) ни ташкил этди. Ўлчанган ток аниқ ифодаланган ташқи тўғриланишга эга бўлди, кирувчи токнинг чиқувчи токка нисбати ±100 мВ да 6,5 ± 0,5 (n=7) га тенг бўлди (3В-расм). Ҳажмга боғлиқ анион каналининг танловчанлик хоссаларини ўрганиш бўйича олиб борилган тажрибаларни кўрсатишича, ювувчи Рингер (146 мМ Cl^-) эритмаси хлор ионларининг концентрацияси анча паст бўлган эритмага (135 мМ глутамат + 11 мМ Cl^-) алмаштирилганда реверция потенциали $\Delta E_{рев}$ = 36,9 ± 2,6 мВ (n=6) силжиши рўй берди, бу қайд қилинаётган токнинг кўпроқ анион танловчанлигидан далолат беради. P_{Glu}/P_{Cl}, ўтказувчанликларнинг нисбати 0,17 ± 0,03 (n=6) ни ташкил этди. Шундай қилиб, КМЛ ҳужайра линиясидаги



3-расм. КМЛ ҳужайраларида ҲБАК специфик блокаторининг таъсири. (А) Осмотик шишиш шароитида КМЛ ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ хлор токининг ± 25 мВ тест импульслари берилган вақтдаги фаоллашиши (стрелкалар билан -100 мВ дан +100 мВ гача диапазондаги тест импульси берилган моментлар белгиланган). (Б) Ҳажмга боғлиқ хлор токининг мембрана потенциалига боғлиқ ҳолда инактивацияланиш кинетикаси (тест импульси берилган моментлар стрелкалар билан (А) расмда белгиланган). *Чапда* назоратда ва *ўнгда* DCPIB билан ингибирланганидан сўнг тест импульсларига токнинг жавоби кўрсатилган. (В) КМЛ ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ хлор токининг ҲБАК ингибиторлари таъсиридаги вольт-ампер характеристикалари. Назоратда (□) ва ювувчи эритма таркибига блокаторлар: флоретин 50 мкМ (◊), тамоксифен 100 мкМ (○), DCPIB 30 мкМ (Δ) қўшилганида.

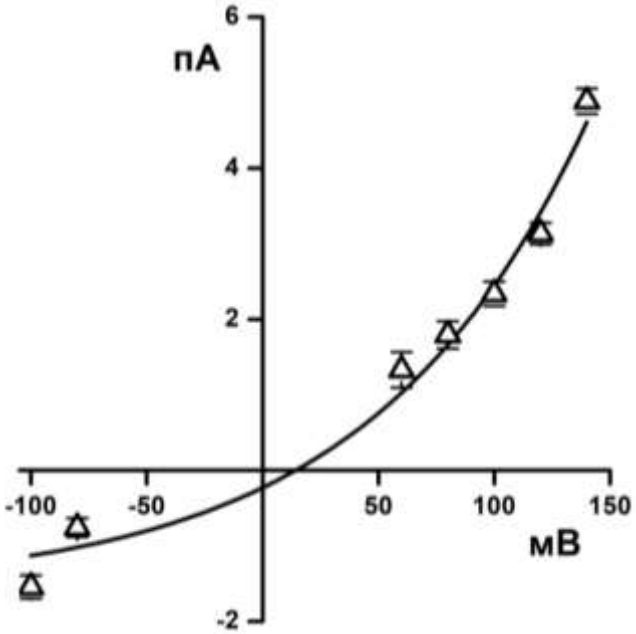
тажрибаларимиздан олинган ўтказувчанликларнинг нисбати каналнинг хлор ионларига юқори даражада селектив эканлигини билдиради.

КМЛ ҳужайраларидаги биз тавсифлаб берган каналнинг фармакологик профилини аниқлаш учун ҳажмга боғлиқ анион каналининг блокаторлари – флоретин, тамоксифен, DCPIB ларни таъсирини ўргандик. Ювувчи эритмага 50 мкМ флоретин қўшилганда КМЛ ҳужайраларида чиқувчи токнинг ингибирланиши +25 мВ да 84 ± 3% (n=5) ни ташкил этди, кирувчи ток эса – 25 мВ да 83 ± 2% (n=5) га ингибирланди (3-расм). Тамоксифен (100 мкМ) билан ўтказилган тажрибаларда +25 мВда ингибирланиш 87 ± 2% (n=5) га, – 25 мВ да 84 ± 3% (n=5) га тенг бўлди (3-расм). ҲБАКнинг ҳозирги кунда энг кучли блокатори DCPIB бирикмаси ҳисобланади. Маълумки, мазкур ингибитор бошқа анион каналлари ҳамда потенциалга боғлиқ натрий, калий ва кальций каналларига таъсир қилмайди [Okada et al., 2006; Decher et al., 2001]. DCPIB 30 мкМ концентрацияда потенциални қандай бўлишидан қатъий назар, ҳажмга боғлиқ анион каналини деярли тўлиқ блоклади ва КМЛ ҳужайраларидаги кирувчи ва чиқувчи токларнинг блокланиши тегишли равишда 95 ± 1% (n=5) ва 93 ± 1% (n=5) ни ташкил этди (3-расм). Шундай қилиб, барча учта модданинг КМЛ ҳужайраларидаги ингибирловчи таъсири назоратга нисбатан сезиларли бўлди ва 80% дан юқори бўлди (3В-расм).



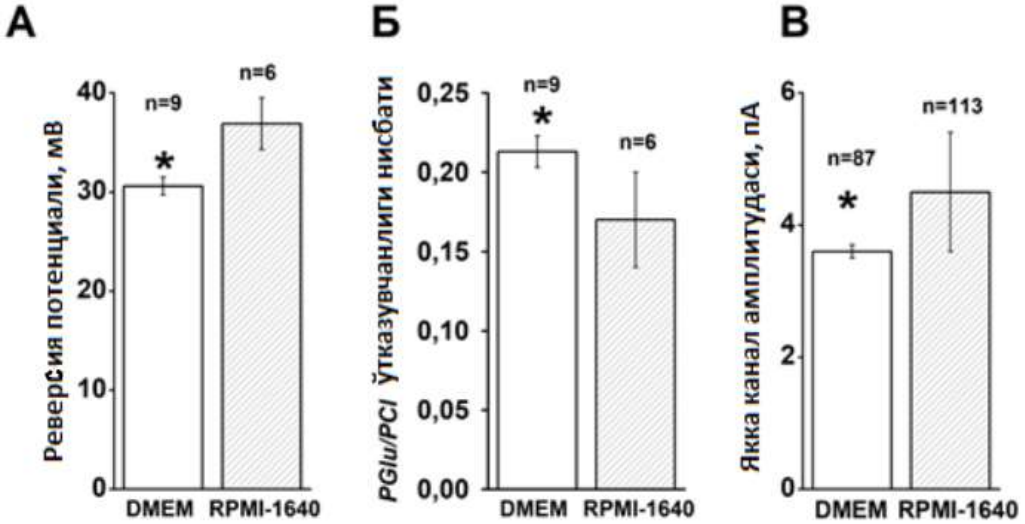
4-расм. КМЛ ҳужайраларидаги якка ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллиги ва амплитудалар тақсимланиш гистограммасинининг кўриниши. (А) гипоосмотик стрессда +140 мВ тўғри бурчакли импульслар берилганда якка ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллигини кўриниши. (Б) (А) расмда келтирилган барча нуқталарнинг тақсимланиш гистограммаси; «О» ва «З» тегишли равишда очиқ ва ёпиқ ҳолатларни билдиради. (В) Якка каналлар амплитудасининг +140 мВ да тақсимланиш гистограммаси. Амплитудалар 9та пэтчда олинган (А)дагига ўхшаш ёзувларда курсорни очиқ ва ёпиқ холатига олиб бориш йўли билан қўлда ўлчанди, n=113.

Якка ҳажмга боғлиқ анион каналини қайд қилиш учун пэтч-кламп усулининг on-cell конфигурациясидан фойдаландик. 4Б-расмда амплитудаларнинг +140 мВ да тақсимланиш гистограммаси келтирилган; КМЛ ҳужайраларидаги канал амплитудасининг ўртача қиймати 4,5 ± 0,9 пА (9 пэтчдан, n=113)ни ташкил этди (4В-расм). 5-расмда КМЛ ҳужайраларидаги якка ҳажмга боғлиқ анион каналининг вольт-ампер характеристикаси кўрсатилган. Расмда кўринганидек, қайд қилинган якка каналлар ҳамда whole-cell конфигурациясида биз қайд этган макроток, аниқ ифодаланган ташқи тўғриланишга эгадир. Ушбу биофизикавий характеристика, потенциалга боғлиқ инактивацияланиш билан бирга, айнан ана шу типдаги якка каналлар КМЛ ҳужайраларининг осмотик шишишида фаоллашадиган макроскопик анион токига масъуллигини исботлайди.



5-расм. КМЛ ҳужайраларидаги якка ҳажмга боғлиқ анион каналининг вольт-ампер характеристикаси. Каналларнинг амплитудаси фиксация потенциали 0 мВ га тенг бўлган вақтда тест импульси берилганда ўлчанган, ион токи 500 мс давомида 100 мВ пре-импульс ёрдамида максимал фаоллаштирилди; сўнгра мембранага 20 мВ қадам билан ва 1000 мс давомийликда −100 мВ дан +140 мВ гача тест импульслари юборилди. Натижалар 12 пэтчдан олинган ўртача қиймат сифатида келтирилган (n=4-35).

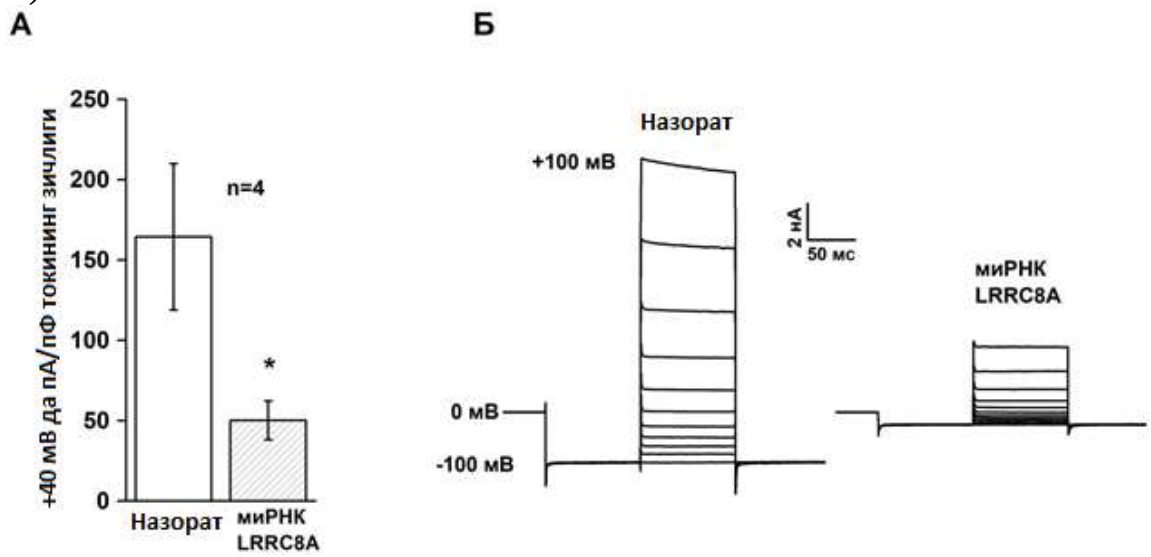
КМЛ ҳужайраси линияси C57bl сичқонларнинг думи венасига B16 ҳужайралари суспензиясини юборилгандан сўнг ҳайвонлар ўпкасида ҳосил бўлган метастазадан ажратилган. Бунда ҳужайраларга асос бўлган B16 линияси DMEM муҳитида ўстирилади, КМЛ эса RPMI-1640 муҳитида ажратиб олинган ва унда ўстириш учун мослаштирилган. Маълумки, ўстириш муҳити B16 сичқон меланомаси линиясининг ҳужайра физиологияси ва биокимёсига [Aubert et al., 1992], хусусан меланогенез ва метастаза бера олиш хусусиятига сезиларли даражада таъсир қилиши мумкин. Шу муносабат билан биз тажрибаларимизнинг навбатдаги сериясида КМЛ сичқон меланомаси ўстириш муҳитининг ҲБАКнинг фаоллигига таъсирини ўргандик. Макроскопик токнинг фаоллашиш кинетикаси ва асимметрияси деярли бир хил бўлганлиги намойиш қилинди. Бироқ, токнинг селектив хоссалари ва якка каналнинг амплитудаси RPMI-1640 ва DMEM муҳитларида ўстирилаётган КМЛ ҳужайраларида сезиларли даражада фарқ қилди (6-расм). Бундан меланома ҳужайраларини ўстириш шароитларини ўзгариши ҲБАКнинг суббирлик таркибини ўзгаришига олиб келиши мумкин, деб тахмин қилиш мумкин. ҲБАКнинг пора ҳосил қилувчи асосий компоненти бўлиб, таркибида 5 та LRRC8A/B/C/D/E паралоглари бўлган LRRC8 оиласи оқсиллари ҳисобланади. Бунда каналнинг фаолият кўрсатиши учун LRRC8Анинг оила вакилларидан бири билан жуфтликда экспрессияланиши зарурдир [Syeda et al., 2016; Voss et al., 2014]. Бизнинг натижаларимиз LRRC8 оиласи оқсилларининг экспрессия даражасига ўстириш шароитининг таъсир қилиши, шундай экан, ҳажмга боғлиқ анион каналининг структурасидаги молекуляр комбинацияларнинг ўзгаришига ҳам таъсир қилиши тўғрисидаги тахминни тасдиқлайди.



6-расм. КМЛ ҳужайраларидаги ҲБАКнинг культура ўстириш шароитига боғлиқ ҳолдаги биофизикавий хоссалари. (А ва Б) Графикда ювувчи эритма таркибига Na-глутамат қўшилганда турли муҳитлар (DMEM ва RPMI-1640)да ўстирилган КМЛ ҳужайра линиясида олинган реверсия потенциали (А) ва хлорга нисбатан глутумат ўткавчанлиги (Б) кийматлари солиштирилган. (В) Графикда турли муҳитлар (DMEM ва RPMI-1640) да ўстирилган КМЛ ҳужайра линиясида олинган якка каналлар амплитудасининг ўртача қийматлари солиштирилган. КМЛ (RPMI-1640) га нисбатан КМЛ (DMEM) учун * $P < 0.05$.

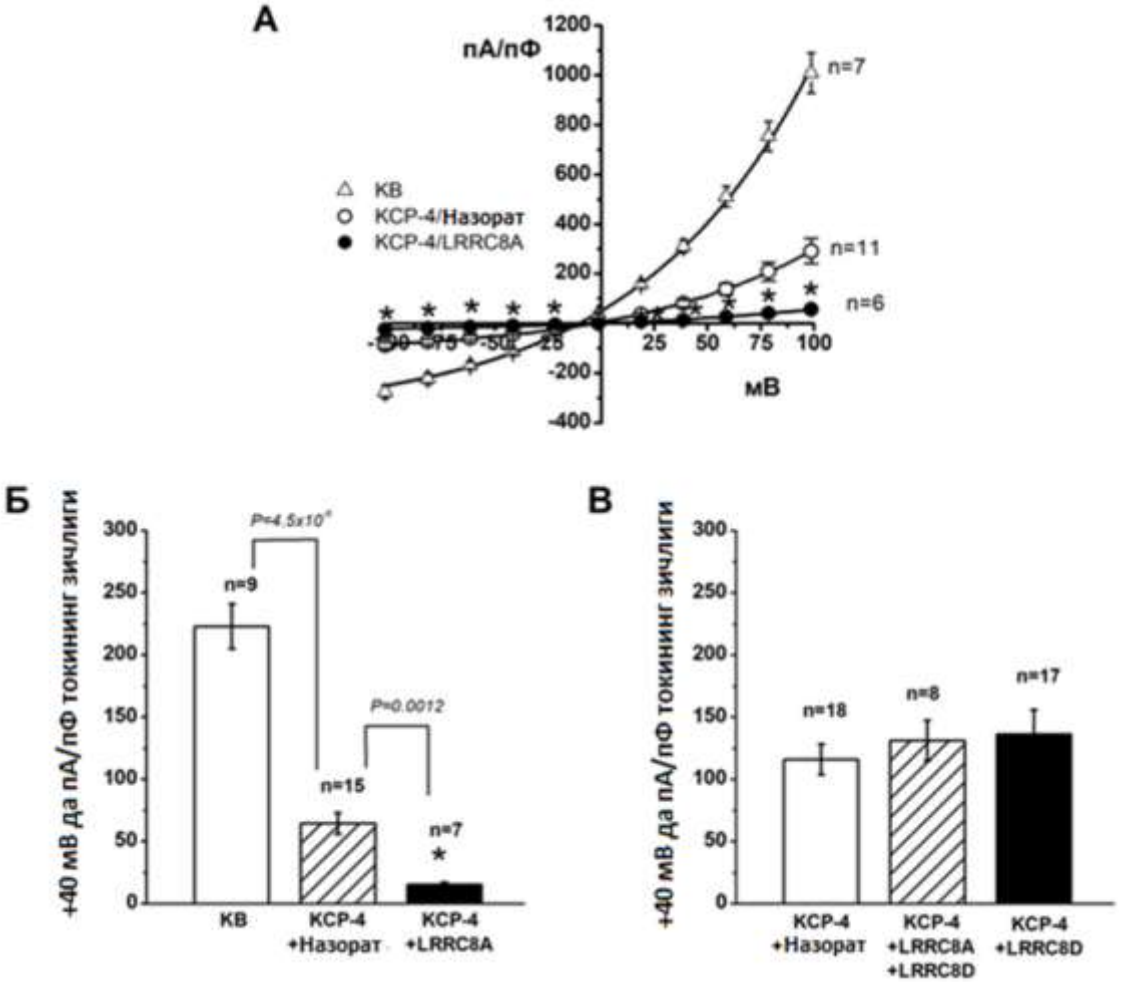
Диссертациянинг **«LRRC8 оиласи оқсилларининг ҲБАК фаолиятидаги роли»** деб номланган бешинчи бобида КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларида LRRC8A оқсили экспрессияси сусайтирилганда ҳажмга боғлиқ анион каналининг фаоллигини ҳамда LRRC8 оиласи оқсилларининг оверэкспрессияларини цисплатинга чидамли ҳужайралардаги ҲБАК фаоллигига таъсирини тадқиқ қилишдан олинган натижалар келтирилган. Маълумки, LRRC8A оқсили ҲБАК фаоллигининг абсолют зарурий компоненти ҳисобланади. Шунинг учун тажрибаларнинг навбатдаги сериясида биз КМЛ ҳужайраларидаги каналнинг фаолиятига LRRC8Ани қўшган ҳиссасини ўргандик. LRRC8Анинг экспрессиясини сусайтириш учун кичик интерференцияловчи РНК (киРНК) методидан фойдаланилди.

КМЛ ҳужайраларида ҳажмга боғлиқ анион канали фаоллигини назоратда ва киРНК *Lrrc8a* трансфекциясидан сўнг бевосита қайд қилиш учун биз пэтч-кламп тажрибаларини ўтказдик. Назоратдаги киРНК ни кодламайдиган трансфекцияланган ҳужайраларда биз ҲБАКнинг ток зичлиги +40 мВ да 164±45 пА (n=4) га тенг бўлган нормал фенотипини кузатдик. Бироқ, *Lrrc8a* гени учун хос бўлган киРНК трансфекцияланган ҳужайраларда, токнинг зичлиги +40 мВ да анча паст бўлиб, атиги 50±12 пА (n=4) ни ташкил этди, бу статистик жиҳатдан назорат катталигидан анча пастдир. Бунда 20 мВ қадам билан ±100 мВ тест импульслари берилганида ҲБАК фаоллигини пасайишидан ташқари токнинг потенциалга боғлиқ инактивацияланишини деярли тўлиқ йўқолганини кузатдик, бу эса назоратдаги ҳужайралардаги токнинг ҳолатидан кескин фарқ қилади (7-расм).



7-расм. киРНК *Lrrc8a* мавжуд бўлган КМЛ ҳужайраларидаги ҲБАКнинг фаоллиги. (А) +40 мВ берилганда назоратда ва LRRC8A (n=4) нокдаунда токнинг зичлиги. (Б) Ҳажмга боғлиқ хлор токининг мембрана потенциалига боғлиқ ҳолда инактивацияланишининг кинетикаси, фиксация потенциали 0 мВ, ион токи −100 мВ пре-импульсда 100 мс давомида максимал фаоллаштирилди; сўнгра мембранага 20 мВ қадам ва 100 мс давомийлик билан −100 мВ дан +100 мВ гача тест импульслари юборилди.

Шундай қилиб, бизнинг тажрибаларимиз барча далиллар билан LRRC8A оқсили КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион каналининг зарур компоненти ҳисобланишини исботлайди. Бу эса HCT116 йўғон ичак саратони [Voss et al., 2014] ҳамда одамнинг HeLa бачадон бўйни саратони ҳужайралари ва Т-лимфоцитлари учун олинган натижаларга мос келади [Qiu et al., 2014].

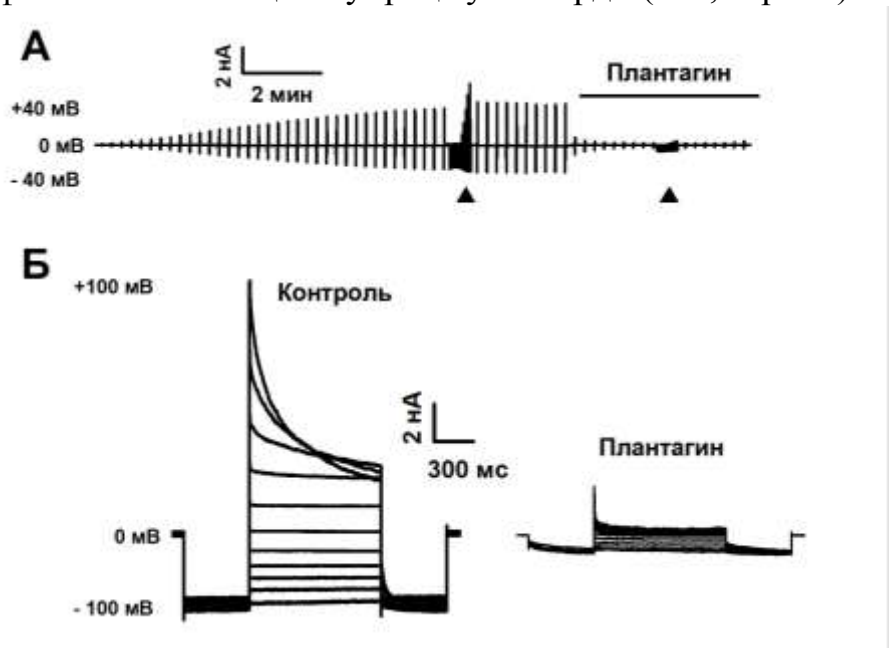


8-расм. КСР-4 ҳужайраларида LRRC8A оверэкспрессияси, ҳамда LRRC8A+LRRC8D коэкспрессиясидаги натижалар келтирилган. (А) ҲБАКнинг КВ (Δ) ва КСР-4 ҳужайраларида назоратда (○) ва LRRC8A-IRES-EGFP вектори билан (●) вольт-ампер характеристикаси. (Б) КВ, КСР-4 ва LRRC8A-IRES-EGFP вектори билан трансфекцияланган КСР-4 ҳужайраларида ток зичлигининг +40 мВ даги қиймати. (В) КВ, КСР-4 ва LRRC8A-IRES-EGFP ва LRRC8D-IRES-EGFP ёки фақатгина LRRC8D-IRES-EGFP вектори билан трансфекцияланган КСР-4 ҳужайраларида ток зичлигининг +40 мВ даги қиймати.

LRRC8 оиласи оқсилларининг ҲБАК фаолиятидаги ролини янада ўрганиш учун биз одам карциномаси ҳужайраси линиялари КВ ва КСР-4 да тажриба ўтказдик. КВ линияси КСР-4 учун асос ҳисобланади, иккинчиси ўстириш муҳити таркибида юқори концентрацияда цисплатин бўлишига чидамли ва бундан ташқари, КВ да ҲБАК фаоллиги КСР-4 даги каналнинг фаоллигидан анча юқоридир, бундан мембрана орқали цисплатин транспортида ҳажмга боғлиқ анион каналининг иштирок этишини тахмин қилиш мумкин [Hazama

et al., 2000; Lee et al., 2007]. Дарҳақиқат, яқинда ўтказилган тажрибалар LRRC8D оқсилининг платина (цисплатин ва карбоплатин) асосида олинган саратонга қарши препаратларнинг ташилишида жавобгар ҳисобланишини исботлаб берди [Planells-Cases et al., 2015].

КСР-4 ҳужайраларида LRRC8 оиласи оқсилларининг оверэкспрессияланиши ҲБАК фаоллигини КВ ҳужайраларида қайд қилинган даражагача тикланишига олиб келади, деб тахмин қилиш мантиқан тўғридир. 8-расмдан кўринганидек, КСР-4 ҳужайраларини pCMV-LRRC8A-IRES-EGFP вектори билан трансфекциясидан сўнг ток зичлиги кўпаймади, аксинча, анча камайди ва 57±7 пА/пФ (n=6) ни ташкил этди. Шундай қилиб, LRRC8A оқсилининг оверэкспрессияси нафақат КСР-4 ҳужайраларидаги ўтказувчанликни КВ кўрсаткичларигача тикламади, балки биз ўрганаётган каналнинг фаоллигини яна ҳам кўпроқ сусайтирди (8 А, Б-расм).



9-расм. HCT116 ҳужайраларида осмотик шишишга жавобан фаоллашган ҳажмга боғлиқ хлор токига 41 мкг/мл концентрациядаги плантагин таъсири. (А) Макроскопик токнинг 0 мВ дан ±25 мВ гача бўлган тест импульсига (ҳар 5 с да) жавобан ўзгаришини whole-cell конфигурациясида қайд қилиш. (Б) Ҳажмга боғлиқ хлор токининг мембрана потенциалига боғлиқ ҳолда инактивацияланиш кинетикаси. Тест импульсларини бериш моментлари (А) расмда стрелкалар билан белгиланган.

Маълумки, LRRC8 оиласи бешта аъзо (A, B, C, D ва E) дан иборат ва ҲБАКнинг меъёрида ишлаши учун LRRC8A қўшимча С, Д ёки Е паралогларидан бири билан коэкспрессияланиши зарурдир. Юқорида таъкидланганидек, LRRC8D оқсили платина асосида олинган препаратларнинг ташилиши учун масъул ҳисобланади, шунинг учун биз ушбу паралогни мембранага кўп миқдорда киритилиши КСР-4 ҳужайраларида ҲБАК фаоллигининг тикланишига олиб келиши мумкин, деб тахмин қилдик. Бироқ, кутганимиздан фарқли равишда, бизнинг тажрибаларимизда фақатгина LRRC8D оверэкспрессияси ҳамда LRRC8A ни LRRC8D билан биргаликдаги экспрессияси КСР-4 ҳужайраларида ток

зичлигига айтарли таъсир қилмади. Бунда канал фаоллигини назоратга нисбатан пасайиши ҳам кузатилмади (8В-расм).

Шундай қилиб, олинган натижаларни қуйидаги тахмин билан тушунтиришимиз мумкин. LRRC8 оиласи оқсиллари ҲБАКнинг тўлақонли ишлаши учун зарурий, лекин етарли компонент эмас. Каналнинг фаоллашиши учун керак бўлган яна битта ёки ундан кўпроқ оқсил зарур, ва айнан шу компонент цисплатинга чидамли КСР-4 ҳужайраларида етишмайди.

Диссертациянинг **«HeLa ва HCT116 ҳужайраларидаги ҲБАК нинг хоссалари ва уни ўсимликлардан ажратилган биологик фаол моддалар ёрдамида модуляциялаш»** деб номланган олтинчи бобида HeLa ва HCT116 ҳужайраларидаги ҲБАКнинг фаоллигини аниқлаш бўйича олиб борилган тадқиқотлар ҳамда ўсимликлардан ажратилган турли субстанцияларни ҲБАКнинг фаоллигига таъсири келтирилган. Тажрибаларнинг навбатдаги серияси HeLa ва HCT116 ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион каналининг қайд қилинган биофизикавий характеристикалари адабиётларда илгари бошқа типдаги ҳужайралар учун келтирилган характеристикаларга ўхшашлигини кўрсатди [Okada et al., 2019; Okada et al., 2018]. Тажрибаларда ҳужайраларнинг ўрганилган линиялари ўзларини ҲБАКнинг фаоллигига турли субстанциялар таъсирини ўрганиш бўйича тажрибалар ўтказиш учун талабларга яхши жавоб берадиган линия сифатида намоён қилдилар. Биз буни ўсимликлардан ажратилган моддаларни ушбу икки типдаги ҳужайраларда ҲБАК фаоллигига таъсирини ўрганиш бўйича ўтказган кейинги тажрибаларимизда кўрсатдик. Бунда биз ҲБАКнинг ўтказувчанлигини модуляцияловчи бир қатор моддаларни аниқладик. Масалан, плантагин полифенол препарати анча кичик концентрацияларда ҳажмга боғлиқ анион каналини тўлиқ ингибирлади (9-расм). 9-расмда плантагин учун келтирилганидек, ўхшаш натижалар ўсимликлардан ажратилган қуйидаги моддалар учун олинди. Масалан, ферутинин, каратавик ва гальбан кислоталари ҳам ҲБАКни блоклади. Леманин флавоноидини ўрганганимизда, мазкур модда ҳам ўта кичик концентрацияларда ҲБАКни тўлиқ блоклаши кўрсатиб берилди. ҲБАК фаоллигига полифенол препаратларининг таъсири ўрганилганда ҳам бир қатор истиқболли ва самарали моддалар аниқланди. Масалан, плантагин каби рутан препарати кичик концентрацияларда потенциалга боғлиқ бўлмаган ҳолда ҲБАКнинг фаоллигини 80% дан кўпроқ пасайтирди, эуфорбин препаратлари эса фақатгина юқори дозаларда фаоллик кўрсатди, бироқ уларнинг таъсири потенциалга боғлиқ характерга эга бўлди.

ХУЛОСАЛАР

1. КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларида макси-анион канали қайд қилинди ва батафсил таърифланди; канал ўтказувчанлиги 300-400 пСм бўлган чизиқли вольт-ампер характеристикасига эга, анион-селектив

(ўтказувчанликлар нисбати P_{Cl}/P_{Na} = 8,9), АТФ молекуласи учун ўтказувчан ($P_{АТФ}/P_{Cl}$ = 0,07) ва Gd^{3+} ионлари билан блокланади.

2. КМЛ сичқон меланомаси ҳужайраларида ҳажмга боғлиқ анион канали қайд қилинди ва батафсил таърифланди; канал оралиқ амплитудага (+140 мВ да 4,5 пА), аниқ ифодаланган ташқи тўғриланишга, юқори деполяризацияловчи потенциаллардаги инактивацияга, ўтказувчанлик нисбати P_{Glu}/P_{Cl} = 0,17 билан анион танлаб ўтказувчанликка эга ва DCPIB, флоретин ва тамоксифенга сезгирдир.

3. КМЛ ҳужайралари культурасини ўстириш муҳити токнинг фаоллашиш кинетикаси ва асимметриясига таъсир қилмаган ҳолда якка ҳажмга боғлиқ анион каналининг амплитудаси (3,6 пА гача) ва унинг танловчанлигини (P_{Glu}/P_{Cl} = 0,21 гача) ахамиятли даражада ўзгартириши кўрсатилди.

4. *Lrrc8a* генининг РНК-интерференцияси КМЛ ҳужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион канали фаоллигини самарали сусайтириши, бироқ унинг экспрессияси цисплатинга чидамли КСР-4 ҳужайраларидаги канал фаоллашиши учун етарли эмаслиги ва мураккаб ҳажмга боғлиқ анион канали оқсил комплексига яна бир номаълум компонент зарурлиги аниқланди.

5. HeLa ва HCT116 ҳужайра линиялари ҳажмга боғлиқ анион канали модуляторларини *in vitro* шароитида скрининг қилиш учун қулай модел сифатида ишлатилиши мумкинлиги кўрсатилди; ўсимликлардан ажратилган биологик фаол моддалар орасида анион каналининг янги самарали блокаторлари: ферутинин, гальбан ва каратавик кислоталари, леманин, пиноцембрин, рутан, плантагин, эуфорбинлар топилди.

НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.03/30.12.2019.B.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА

ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ

ЦИФЕРОВА НАРГИЗА АЛЕКСАНДРОВНА

СИСТЕМЫ ТРАНСПОРТА АНИОНОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

03.00.02 – Биофизика и радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ

Ташкент – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1.PhD/B8.

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

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

Научный руководитель:	**Сабиров Равшан Заирович** доктор биологических наук, академик
Официальные оппоненты:	**Мирходжаев Улугбек Закирович** доктор биологических наук, профессор
	Тонких Анатолий Константинович кандидат биологических наук
Ведущая организация:	**Центр геномики и биоинформатики АН РУз**

Защита диссертации состоится «____» _____2020 г. в _____ часов на заседании Научного совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 при Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская, дом-174.тел. (99871) 246–68–96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно–ресурсном центре Института биофизикии биохимии при Национальном университете Узбекистана (зарегистрировано под №_____). Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская дом-174. Тел: (99871) 246–68–96. e–mail: ibb-nuu@mail.ru

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2020 г.
(реестр протокола рассылки № «_____» от _____ 2020).

Саатов Талъат Саатович
Заместитель председателя Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., академик

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

Ахмеджанов Искандар Гулямович
Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время в мире ежегодно регистрируется от 2 до 3 миллионов случаев немеланомного рака кожи и более ста тысяч случаев меланомы. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, каждый третий диагноз рака – это рак кожи. Несмотря на успехи в лечении онкологических заболеваний, обладающих значительной устойчивостью к химиотерапии, таких как меланома, прогноз их остается таким же угрожающим. Поэтому поиск, как новых химических терапевтических агентов, так и новых мишеней – ионных каналов является крайне актуальной задачей современной биофизики и онкологии. Одной из таких мишеней могут предстать объем-активируемые анионные каналы – макси-анионный канал и объем-зависимый анионный канал, относящиеся к системе анионного транспорта клетки.

В мировой научно-исследовательской деятельности особое место занимают работы по изучению объем-активируемых анионных каналов. Эти каналы вносят существенный вклад в систему регуляции клеточного объема, пролиферацию, миграцию и апоптоз – процессы, которые являются ключевыми в онкогенезе и метастазировании. Невзирая на исключительную физиологическую и патофизиологическую важность объем-активируемых анионных каналов, они практически не изучены в клетках меланомы, и до настоящего времени не существует мощного ингибитора или активатора, способного воздействовать на объем-активируемые анионные каналы при достаточно низкой концентрации и с хорошей специфичностью, поэтому поиск новых селективных, и в то же время малотоксичных ингибиторов или активаторов объем-активируемых анионных каналов является крайне актуальной задачей.

В Узбекистане в настоящее время уделяется большое внимание внедрению в практику научных и инновационных достижений при разработке новых лекарственых средств. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены следующие задачи: «Поощрение научно-исследовательской и инновационной деятельности, создание эффективных механизмов внедрения в практику научных и инновационных достижений». Помимо этого, в четвертом приоритетном направлении по развитию социальной сферы Стратегии действий определены важные задачи «по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности, усовершенствование обеспечения населения и медицинских учереждений дешёвыми, качественными лекарственными средствами и медицинскими предметами»[2]. В данном контексте, изучение систем анионного транспорта в клеточных культурах, и в частности в клетках меланомы, а также поиск модуляторов объем-активируемых каналов среди веществ, выделенных из растений Узбекистана,

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

позволит определить новые пути лечения онкологических заболеваний кожи, и разработать высокоэффективные лекарственные препараты для борьбы со злокачественными заболеваниями.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года, № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлении Президента Республики Узбекистан от 30 декабря 2019 года, № ПП-4554 «О дополнительных мерах по углублению реформ в фармацевтической отрасли Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

Степень изученности проблемы. В мировом масштабе научно-исследовательские работы по изучению влияния ионных каналов на пролиферативные свойства клеток меланомы в основном описывают катионные каналы. Было показано, что ингибирование экспрессии разных типов калиевых каналов приводят к остановке клеточного цикла [Lepple-Wienhues et al, 1996, Allen et al, 2010], активация кальций-активируемого калиевого канала стимулирует формирование метастаз [Schmidt et al, 2010], депо-зависимый кальциевый ток принимает непосредственное участие в метастазировании меланомы [Sun et al, 2014]. Однако об анионных каналах в клетках меланомы имеются лишь фрагментарные сведения.

В странах СНГ изучение процессов регуляции объема клетки отражено в работах ученых Орлова С.Н. и Максимова Г.В. и их сотрудников. Так были описаны: регуляция объёма клеток при апоптозе, некрозе и активации пуринергических рецепторов; роль ионного транспорта, сопряженного с изменениями клеточного объема, в механизмах регуляции сократительной функции сосудистых гладкомышечных клеток; анализ участия хлорных каналов плазматических мембран в процессах активации и программированной гибели лимфоидных клеток. Группой Михайловой И.Н. ведутся работы по созданию моделей меланомы кожи человека для научных и доклинических исследований антимеланомных средств. Однако вклад систем анионного транспорта и процессов регуляции объема клетки при образовании опухолей и их метастазировании остается неизученным.

В нашей республике масштабные исследования по биофизике мембран и клеточной физиологии ионных каналов и транспортеров ведутся под руководством академиков Ташмухамедова Б.А., Арипова Т.Ф., Сабирова Р.З., а также в лабораториях профессоров Усманова П.Б., Асрарова М.И., Мирходжаева У.З. Проводятся научные изыскания по роли систем транспорта кальция в сократимости сердечной мышцы и гладкой

мускулатуры, роли мегапоры в функции митохондрий и коррекция нарушений энергетики клетки природными биологически-активными веществами, мембранной активности краун-эфиров.

Связь исследования с планом научно-исследовательских работ научно-исследовательской организации, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана по темам НИР: ФА-Ф5-Т080 «Молекулярная физиология и биофизика объём-активируемого анионного транспорта» (2012-2016), ФА-А11-Т060 «Поиск новых модуляторов регуляции клеточного объема и объем-зависимых анионных каналов как перспективных иммуномодуляторов и противоопухолевых препаратов» (2015-2017), ФА-Ф5-014 «Исследование биофизического фенотипа объем-зависимых анионных каналов и их функций в механизме регуляции клеточного объема» (2017-2020) и ПЗ-2017-0920-49 «Разработка новых перспективных субстанций на основе растительных экстрактов и их компонентов из местного сырья – модуляторов регуляции клеточного объема и объём-зависимого мембранного транспорта» (2018-2020).

Целью исследования является определение биофизических характеристик систем объем-активируемого анионного транспорта в плазмалемме культивируемых клеток.

Задачи исследования:

определить биофизический профиль (активация, амплитуда, вольт-амперные характеристики, потенциал-зависимость, селективность, проницаемость для АТФ) и фармакологические свойства макси-анионного канала в культуре клеток меланомы КМЛ;

определить биофизический профиль (активация, амплитуда, вольт-амперные характеристики, потенциал-зависимость, селективность) и фармакологические свойства объем-зависимого анионного канала в культуре клеток меланомы КМЛ;

исследовать влияние среды культивирования на биофизические характеристики объем-зависимого анионного канала в культуре клеток меланомы КМЛ;

исследовать роль белка LRRC8A в функционировании объем-зависимого анионного канала;

определить подходящие клеточные модели для *in vitro* скрининга биологически-активных веществ в качестве модуляторов активности объем-зависимого анионного канала, а также выявить перспективные блокаторы канала растительного происхождения, выделенных из флоры Республики Узбекистан.

Объектом исследования являются линии клеточных культур: меланома мыши КМЛ, аденокарцинома человека HeLa, рак толстого кишечника человека HCT116, аденокарцинома человека KB, и ее вариант, устойчивый к цисплатину, KCP-4.

Предметом исследования являются биофизические и фармакологические свойства макси-анионного и объем-зависимого анионного каналов в мембране культивируемых клеток.

Методы исследования. В диссертационном исследовании использованы современные методы биофизики, электрофизиологии и молекулярной биологии: метод микролокального отведения токов – пэтч-кламп для электрофизиологических экспериментов; метод РНК-интерференции для ген-специфического подавления уровня экспрессии белков (нокдауна); микроматричный анализ для определения уровня экспрессии полного набора генов; метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для оценки опосредованного миРНК нокдауна экспрессии *Lrrc8a*

Научная новизна исследования заключается в следующем:

установлено, что клетки КМЛ экспрессируют анионный канал большой проводимости, детально определен биофизический профиль макси-анионного канала меланомы и его фармакологические свойства;

установлено, что осмотический стресс активирует на мембране клеток КМЛ объем-зависимый анионный канал промежуточной проводимости, детально описан биофизический профиль объем-зависимого анионного канала и его фармакологические свойства, выявлено, что среда культивирования оказывает существенное влияние на биофизические свойства канала;

выявлено, что белок LRRC8A является незаменимым компонентом объем-зависимого анионного канала, но его недостаточно для активности канала в цисплатин-резистентных раковых клетках;

показано, что линии клеток HeLa и HCT116 являются адекватной моделью при поиске новых модуляторов объем-зависимого анионного канала, выявлены перспективные ингибиторы канала среди веществ растительного происхождения.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

обосновано, что объем-зависимый анионный канал может явиться новой мишенью при поиске противораковых препаратов для лечения меланомы;

выявлены новые блокаторы объем-зависимого анионного канала растительного происхождения, способные эффективно подавлять активность канала, которые послужат основой для разработки новых малотоксичных кардио- и нейропротекторов и противораковых препаратов.

Достоверность результатов исследования обоснована использованием современных биофизических методов и методов молекулярной биологии. Выводы сформулированы на основе результатов, обработанных с помощью современных методов математической статистики с использованием критерия Стьюдента или вариационного анализа (ANOVA) с применением компьютерной программы OriginPro, версии 5-8 (OriginLab Corporation, США) при уровне доверительной вероятности $P<0,05$.

Подтверждением достоверности полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждения полученных результатов на республиканских и международных конференциях, и опубликование результатов исследования в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования выражается в обнаружении экспрессии в клетках меланомы анионных каналов, макси-анионного канала и объем-зависимого анионного канала, ответственных за одну из важнейших физиологических функций клетки – регуляцию клеточного объема. Впервые подробно описаны биофизические характеристики и фармакологический профиль анионных каналов в клетках меланомы.

Практическая значимость результатов исследования выражается в том, что описанные нами каналы в меланоме могут явиться новой перспективной мишенью для поиска эффективных противораковых препаратов нового поколения и механизма действия.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов о системах анионного транспорта у клеток в культуре:

данные о вкладе белка LRRC8A в порообразование объем-зависимого анионного канала были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при определении субъединичной структуры канала (*eLife* 2019, V.8, Scopus CiteScore 6.99; *Biophysical Journal* 2019, V. 116, Scopus CiteScore - 3.26; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 177-203, Scopus CiteScore – 3.29; *Oncology Reports* 2018, V.40, Scopus CiteScore – 3.07). Результаты позволили охарактеризовать положение белка LRRC8A в трехмерной структуре объем-зависимого анионного канала;

данные о том, что для регистрации активности объем-зависимого анионного канала необходима экспрессия неизвестного регулирующего компонента, помимо белков семейства LRRC8, были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при поиске регуляторов поры объем-зависимого анионного канала (*Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 183-215, Scopus CiteScore –2.67; *Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 131-133, Scopus CiteScore –2.67; *EMBO Journal* 2017, V. 36, Scopus CiteScore – 8.28). Результаты позволили продолжить изыскания в поиске регуляторов поры объем-зависимого анионного канала;

данные о транспорте молекул АТФ через объем-активируемые анионные каналы были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при характеристике ион-транспортирующих свойств объем-зависимого анионного канала (*International Journal of Molecular Sciences* 2018, V.19, P. 808, Scopus CiteScore – 4.32; *Pharmacological Reviews* 2019, V.71, P. 49-88, Scopus CiteScore – 18.73; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 125-176, Scopus CiteScore – 3.29). Результаты позволили охарактеризовать транспорт молекул АТФ через объем-активируемые каналы;

результаты о влиянии ферутинина на активность объем-зависимого анионного канала в клетках аденокарциномы человека HeLa были использованы в проекте фундаментальных исследований Ф-5-06 «Изучение механизма действия некоторых биорегуляторов» (справка Министерства высшего и среднего специального образования Республики Узбекистан № 89-03-3705 от 3 октября 2019 года). Результаты позволили определить роль ферутинина в ряде внутриклеточных процессов, в том числе раскрыть ферутинин-опосредованный механизм модуляции кальциевой сигнализации в клетках, изучить мембраноактивные свойства ферутинина и охарактеризовать эффект действия на объем-зависимый анионный канал.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 7 международных и 5 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 22 печатные работы, из них в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации 8 научных статей, в том числе 5 в республиканских и 3 в зарубежных.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 105 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенных научных исследований, цель и задачи исследования, характеризуется объект и предмет исследования, 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 **«Свойства объем-активируемых анионных каналов»** приведены современные литературные сведения о биофизических, фармакологических характеристиках макси-анионного канала и объем-зависимого анионного канала (ОЗАК), активировании и экспрессии изучаемых каналов в различных типах клеток, зависимости основных свойств каналов от типа ткани. Представлены данные о молекулярной структуре каналов, биофизические характеристики объем-зависимого канала в зависимости от субъединичного состава канальной поры, функционировании поры макси-анионного канала как транспортера простагландинов, и также в качестве АТФ-проводящего канала.

Во второй главе под названием **«Современные методы биофизики и молекулярной биологии в исследованиях систем анионного транспорта»** приведено подробное описание метода микролокального отведения токов – пэтч-кламп и оборудования, использованного в данном исследовании. Представлены протоколы ведения клеточных культур. Описаны методы молекулярной биологии, позволяющие проводить подавление экспрессии генов, оценивать эффективность подавления, а также метод оверэкспрессии необходимых генов.

В третьей главе **«Свойства макси-анионного канала в клетках меланомы мыши КМЛ»** приведены результаты исследования биофизических и фармакологических свойств макси-анионного канала в клетках меланомы мыши КМЛ. Активацию макси-анионного канала регистрировали методом пэтч-кламп на фрагменте мембраны клетки в конфигурации *inside-out*. Сразу после отрыва мембраны активность канала не наблюдалась (t=0 мин). Постепенное включение одиночных каналов происходило после 1-2 минут записи, и на 5-й минуте было обнаружено в среднем до 10-15 каналов с амплитудой 10,7 ± 1,9 пА (n=7) при +25 мВ, и 9,92 ± 1,75 пА (n=5) при –25 мВ (Рис.1). Регистрируемый ток являлся потенциал-зависимым и при подаче тестовых импульсов свыше ±30мВ быстро инактивировался; вольтамперные характеристики одиночного канала не имели выпрямления, были линейными с наклоном, соответствующим проводимости 300-400 пСм. После активации, макси-анионный канал имел максимальную вероятность открытого состояния при потенциалах около ±10 мВ. Исследования катион-анионной селективности макси-анионного канала

клеток КМЛ показали, что отношение проницаемостей P_{Cl}/P_{Na} = 8,9±0,4, следовательно, канал является анион-селективным. Эксперименты по проницаемости канала в отношении органического аниона глутамата показали отношение проницаемости глутамат$^-$ к Cl^- (P_{Glu}/P_{Cl}) = 0,12 ± 0,01, что говорит о проницаемости канала для ионов глутамата.

Одной из основных характеристик макси-анионного канала является его проницаемость для молекул АТФ. Эксперименты, по проницаемости макси-анионного канала в клетках меланомы КМЛ для молекул АТФ, показали отношение проницаемостей $P_{АТФ}/P_{Cl}$ = 0,07 и свидетельствуют о том, что макси-анионный канал клеток КМЛ способен пропускать молекулы АТФ и может служить эффективным транспортным путем для межклеточной пуринэргической сигнализации.

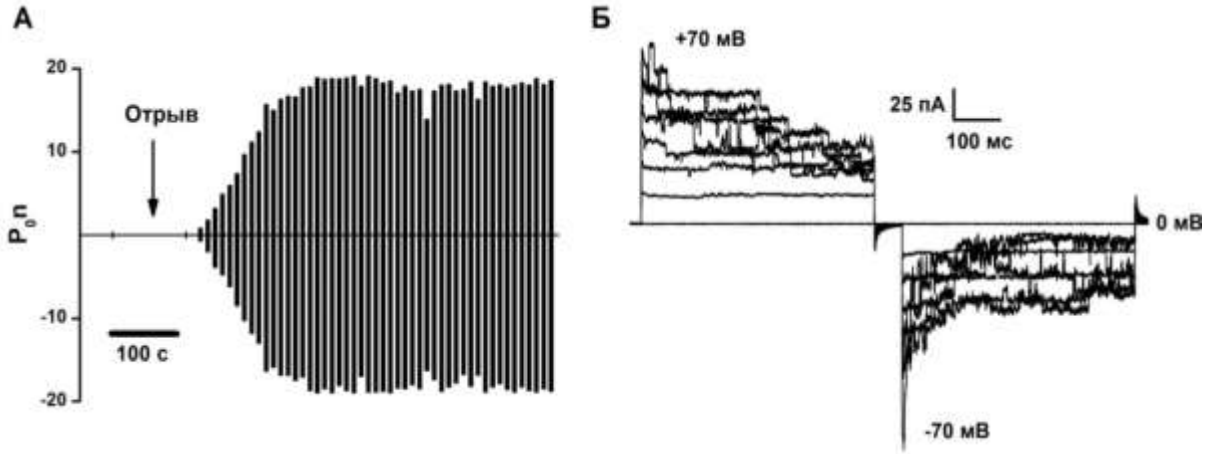


Рисунок 1. Активация макси-анионного канала методом отрыва мембранного фрагмента. (А) Показано увеличение тока через мембранный фрагмент во времени, при подаче серии тест-потенциалов с амплитудой ±25 мВ, длительностью 0,5 сек и интервалом в 10 сек. P_on – усредненное число открытых каналов. (Б) Демонстрация потенциал-зависимого выключения макси-анионного канала. Импульсы подавались в диапазоне ±70мВ с шагом в 10 мВ с фиксированного нулевого потенциала.

В следующей серии экспериментов для подтверждения фармакологического профиля макси-анионного канала, регистрируемого в плазмалемме клеток КМЛ, использовались классические блокаторы анионного тока SITS и NPPB в конфигурации inside-out, а также ионы гадолиниума Gd^{3+} в конфигурации outside-out. В наших экспериментах было обнаружено, что присутствие в омывающем растворе блокатора анионного транспорта SITS в концентрации 100 мкМ приводило к уменьшению проводимости макси-анионного канала в среднем на ~30% по сравнению с контролем при +25 мВ (Рис. 2А). В случае использования блокатора анионного транспорта NPPB нами было обнаружено, что в концентрации 100 мкМ он также вызывал снижение тока через макси-анионный канал, однако в этом случае ингибирование было более сильным и составляло ~40% при +25 мВ по сравнению с контролем. Эксперименты по исследованию влияния ионов лантаноида гадолиниума на активность макси-анионного канала в

клетках КМЛ проводили в конфигурации outside-out. При этом в присутствии в омывающем растворе 30 мкМ вещества мы наблюдали полное блокирование тока (Рис. 2Б). Из представленных экспериментов можно заключить, что канал чувствителен к блокаторам анионного тока SITS и NPPB и полностью блокируется ионами лантаноида гадолиниума, который среди анионных каналов блокирует только макси-анионный канал. Зарегистрированные нами эффекты SITS, NPPB и Gd^{3+} на проводимость макси-анионного канала в клетках КМЛ схожи с данными, описанными для неонатальных кардиомиоцитов [Dutta et al; 2004], зрелых кардиомиоцитов [Dutta et al; 2008], астроцитов мыши [Liu et al, 2008], рака молочной железы C127 [Sabirov et al, 2014] и фибросаркомы L929 [Islam et al, 2012].

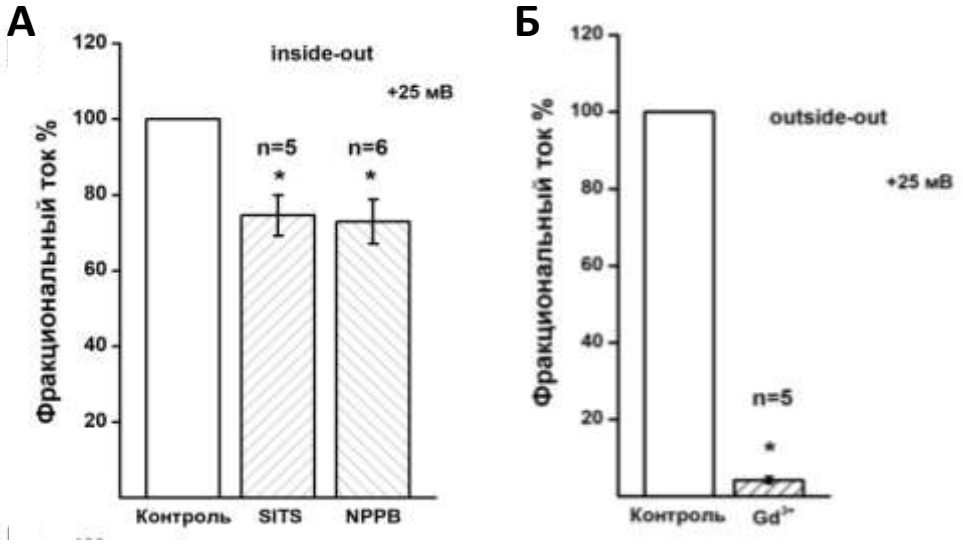


Рисунок 2. Действие Gd^{3+} и классических блокаторов анионного тока на макси-анионный канал клеток КМЛ в outside-out и inside-out конфигурациях. Представлены средние значения остаточного тока в присутствии блокаторов SITS и NPPB (inside-out) – (А), Gd^{3+} (outside-out) – (Б). Регистрация каналов получена при подаче ±25 мВ. * $P<0.05$ по сравнению с контролем.

В четвертой главе **«Свойства объем-зависимого анионного канала в клетках меланомы мыши КМЛ»** приведены результаты исследования биофизических и фармакологических свойств объем-зависимого анионного канала, характеристики одиночного канала ОЗАК, а также влияние среды культивирования на биофизику исследуемого канала в клетках меланомы мыши КМЛ. Культивируемые клетки изучались в whole-cell конфигурации, при этом повышенная гипертоничность пипеточного раствора приводила к набуханию клетки с параллельной активацией канала ОЗАК (Рис. 3А). Время полумаксимальной активации объем-зависимой проводимости составляло 9,5 ± 0,6 мин (n=6). Объем-индуцируемый макроскопический ток обладал выраженным наружным выпрямлением и инактивировался при положительных потенциалах свыше +80 мВ. При этом с ростом степени деполяризации скорость инактивации увеличивалась (Рис. 3Б).

При этом с ростом степени деполяризации скорость инактивации увеличивалась (Рис. 3Б). Плотность объем-активированного тока при +100 мВ составила 236±25 пА/пФ (n=7). Измеренный ток обладал выраженным наружным выпрямлением, отношение выходящего тока к входящему при ±100 мВ было равно 6,5 ± 0,5 (n=7) (Рис. 3В). Эксперименты по изучению селективных свойств объем-зависимого анионного канала показали, что при смене омывающего раствора Рингера (146 мМ Cl^-) на раствор с более низкой концентрацией ионов хлора (135 мМ глутамата + 11 мМ Cl^-) происходит смещение потенциала реверсии на $\Delta E_{рев}$ = 36,9 ± 2,6 мВ (n=6), что свидетельствует о преимущественно анионной избирательности регистрируемого тока. Отношение проницаемостей P_{Glu}/P_{Cl}, составило 0,17 ± 0,03 (n=6). Таким образом, отношение проницаемостей, полученное в наших экспериментах на клеточной линии КМЛ, говорит о высокой селективности канала к ионам хлора.

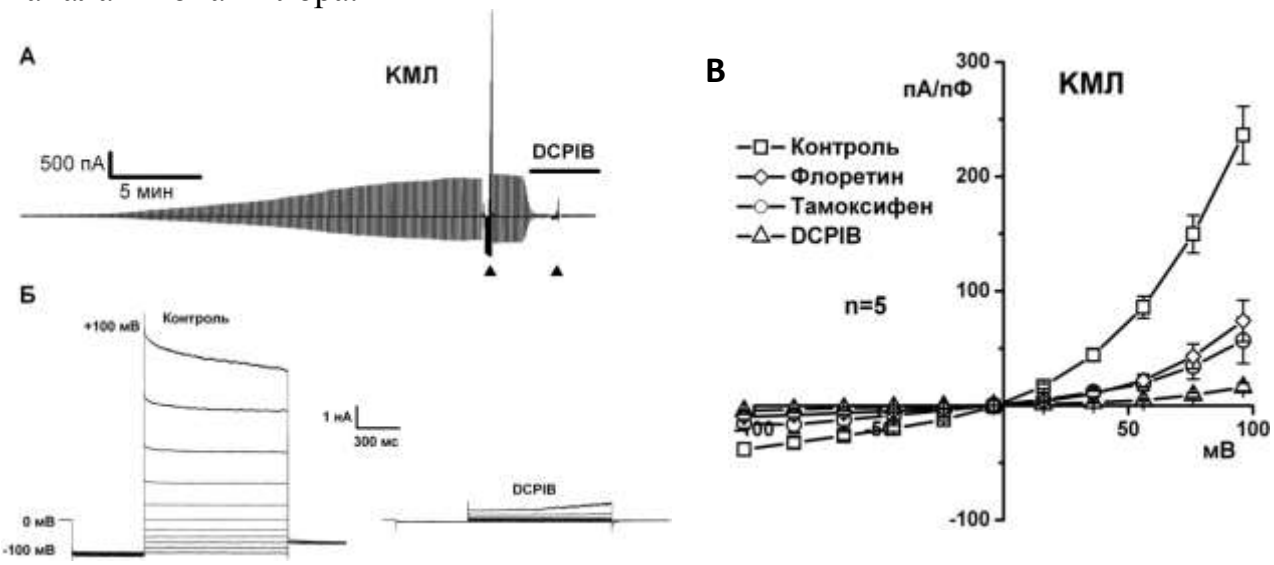


Рисунок 3. Демонстрация действия специфичного блокатора ОЗАК в клетках КМЛ. (А) Активация объем-зависимого хлорного тока в клетках КМЛ при подаче тестового импульса ± 25 мВ в условиях осмотического набухания клеток (стрелками отмечены моменты подачи тестового импульса в диапазоне от -100 мВ до +100 мВ). (Б) Кинетика инактивации объем-активируемого хлорного тока в зависимости от мембранного потенциала (моменты подачи тестового импульса отмечены стрелками на рисунке (А)). *Слева* показаны токовые ответы на тестовые импульсы в контроле и *справа* после ингибирования DCPIB. (В) Вольт-амперные характеристики объем-зависимого хлорного тока в клетках КМЛ при действии ингибиторов ОЗАК. В контрольных условиях (□) и в присутствии в омывающем растворе блокаторов: флоретин 50 мкМ (◊), тамоксифен 100 мкМ (○), DCPIB 30 мкМ (Δ).

Для установления фармакологической идентичности охарактеризованного нами канала в клетках КМЛ мы исследовали действие блокаторов объем-зависимого анионного канала – флоретина, тамоксифена, DCPIB. При добавлении в омывающий раствор 50 мкМ флоретина в клетках КМЛ ингибирование выходящего тока при +25 мВ составило 84 ± 3% (n=5), а входящий ток, при –25 мВ был ингибирован на 83 ± 2% (n=5) (Рис. 3). В экспериментах с тамоксифеном (100 мкМ), ингибирование при + 25 мВ

составило 87 ± 2% (n=5), при –25 мВ было равно 84 ± 3% (n=5) (Рис. 3). Наиболее сильным ингибитором канала ОЗАК на сегодняшний день является соединение DCPIB. Известно, что данный ингибитор не влияет на другие анионные каналы, а также на потенциал-зависимые натриевые, калиевые и кальциевые каналы [Okada et al, 2006; Decher et al, 2001]. В концентрации 30 мкМ DCPIB практически полностью блокировал объем-зависимый анионный ток независимо от потенциала, и блокирование выходящего и входящего токов в клетках КМЛ составило 95 ± 1% (n=5) и 93 ± 1% (n=5) (Рис. 3), соответственно. Таким образом, ингибирующее действие всех трех веществ в клетках КМЛ было значительно по сравнению с контролем и превышало 80% (рис. 3В).

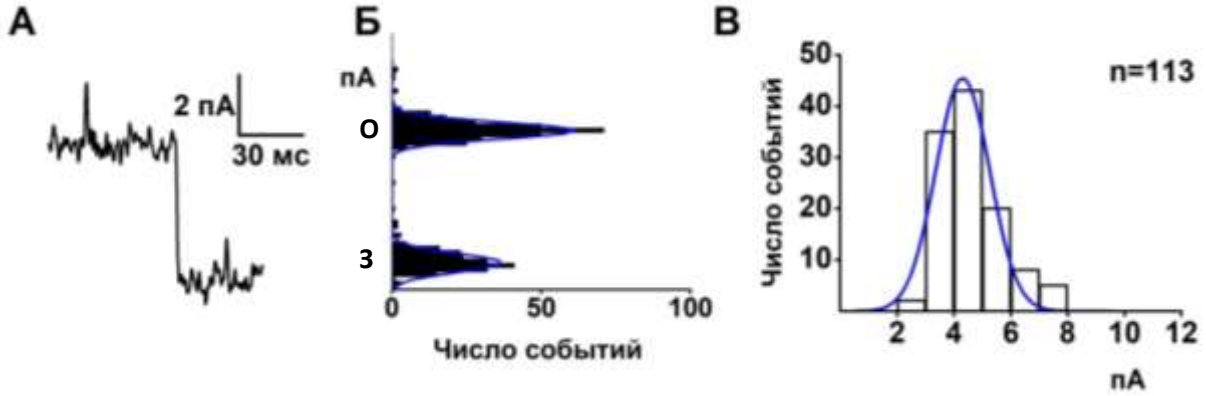


Рисунок 4. Демонстрация активности и гистограмма распределения амплитуд одиночного объем-зависимого анионного канала в клетках КМЛ. (А) Демонстрация активности одиночного объем-зависимого анионного канала при подаче прямоугольного импульса +140 мВ при гипоосмотическом стрессе. (Б) Гистограмма распределения всех точек, представленных на рис. (А); «О» и «З» обозначают открытое и закрытое состояние, соответственно. (В) Гистограмма распределения амплитуд одиночных каналов при +140 мВ. Амплитуды были замерены вручную путем наведения курсора на записях идентичных (А) из 9 пэтчей, n=113.

Для регистрации одиночного объем-зависимого анионного канала использовали пэтч-кламп конфигурацию on-cell. На рисунке 4Б представлена гистограмма распределения амплитуд, полученных при +140 мВ; среднее значение амплитуды канала в клетках КМЛ составило 4,5±0,9 пА (n=113 из 9 пэтчей) (Рис. 4В). На рисунке 5 представлена вольт-амперная характеристика одиночного объем-зависимого анионного канала в клетках КМЛ, из которой видно, что зарегистрированные одиночные каналы, также как зарегистрированный нами макроток в конфигурации whole-cell, имели ярко выраженное наружное выпрямление. Эта биофизическая характеристика, вместе с потенциал-зависимой инактивацией, является доказательством того, что именно этот тип одиночных каналов ответственен за макроскопический анионный ток, активирующийся при осмотическом набухании клеток КМЛ.

Клеточная линия КМЛ была выделена из метастаз в легких, образовавшихся у животных после введения суспензии клеток линии B16 в хвостовую вену мышей C57bl. При этом родительская линия клеток B16

культивировалась в среде DMEM, а КМЛ была выделена и адаптирована для культивирования в среде RPMI-1640. Известно, что среда культивирования может значительно влиять на физиологию и биохимию клеток меланомы мыши линии B16 [Aubert et al, 1992], в частности на меланогенез и способность к метастазированию. В связи с этим в следующей серии экспериментов мы проверили влияние среды культивирования клеток меланомы мыши КМЛ на активность канала ОЗАК. Было продемонстрировано, что кинетика активации и асимметрия макроскопического тока были практически идентичны. Однако селективные свойства и амплитуда одиночного канала имели значительные различия в клетках КМЛ, культивируемых в средах RPMI-1640 и DMEM (Рис. 6). Можно полагать, что изменение условий культивирования клеток меланомы может вызывать изменение субъединичного состава канала ОЗАК. Основными порообразующими компонентами канала ОЗАК являются белки семейства LRRC8, в составе которого имеется пять паралогов LRRC8A/ B/C/D/E. При этом для функционирования канала необходима экспрессия LRRC8A в паре с одним из других представителей семейства [Syeda et al, 2016; Voss et al, 2014]. Наши эксперименты подтверждают гипотезу о влиянии условий культивирования на уровень экспрессии белков семейства LRRC8, а, следовательно, и изменении молекулярных комбинаций в структуре объем-зависимого анионного канала.

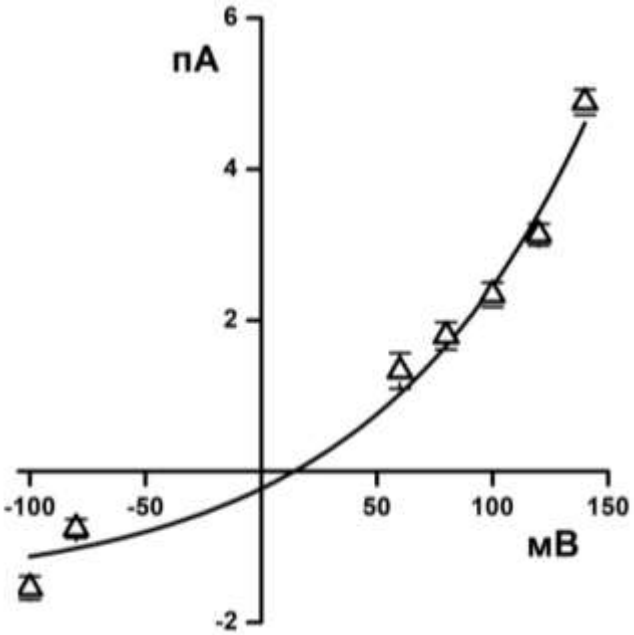


Рисунок 5. Вольтамперная характеристика одиночного объем-зависимого анионного канала в клетках КМЛ. Амплитуды каналов были измерены при подаче тестового импульса при котором потенциал фиксации был равен 0 мВ, ионный ток максимально активировался с помощью пре-импульса −100 мВ в течении 500 мс; затем на мембрану подавались тестовые импульсы от −100 мВ до +140 мВ с шагом 20 мВ и протяженностью 1000 мс. Значения представлены как средние с n=4-35 из 12 пэтчей.

В пятой главе **«Роль белков семейства LRRC8 в функционировании ОЗАК»** приведены результаты исследования активности объем-зависимого анионного канала при подавлении экспрессии белка LRRC8A в клетках меланомы мыши КМЛ, а также влияние оверэкпрессии белков семейства LRRC8 на активность ОЗАК в цисплатин-резистентных клетках. Известно, что белок LRRC8A является абсолютно необходимым компонентом для активности ОЗАК. Поэтому, в следующей серии экспериментов мы изучили вклад LRRC8A в функционирование канала в клетках КМЛ. Для подавления

экспрессии LRRC8A был использован метод малых интерферирующих РНК (миРНК).

Для непосредственной регистрации активности объем-зависимого анионного канала на клетках КМЛ в контроле и после трансфекции миРНК *Lrrc8a*, мы провели эксперименты пэтч-кламп. В контрольных клетках, трансфецированных некодирующей миРНК, мы наблюдали нормальный фенотип ОЗАК с плотностью тока при +40 мВ, равной 164±45 пА (n=4). Однако в клетках, трансфецированных миРНК, специфичных по отношению к гену *Lrrc8a*, плотность тока при +40 мВ была намного ниже и составила всего лишь 50±12 пА (n=4), что статистически значимо ниже контрольной величины. При этом, при подаче тестовых импульсов ±100 мВ с шагом 20 мВ, помимо снижения активности ОЗАК мы наблюдали практически полное отсутствие потенциал-зависимой инактивации тока, что резко отличается от поведения тока в контрольных клетках (Рис. 7). Таким образом, наши эксперименты со всей очевидностью доказывают, что белок LRRC8A является необходимой компонентой объем-зависимого анионного канала в клетках меланомы мыши КМЛ, что согласуется с данными, полученными для клеток рака толстого кишечника HCT116 [Voss et al, 2014] а также в Т-лимфоцитах и клетках рака шейки матки человека HeLa [Qiu et al, 2014].

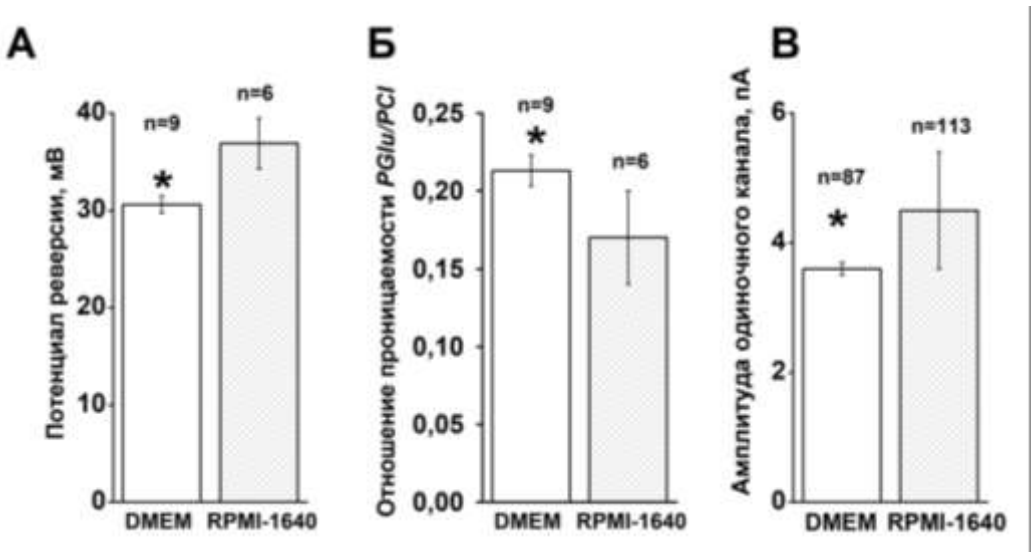


Рисунок 6. **Биофизические свойства канала ОЗАК в клетках КМЛ в зависимости от условий культивирования.** (А) На графике представлено сравнение значений потенциала реверсии ($E_{рев}$) в присутствии Na-глутамата в омывающем растворе, полученных на клеточной линии КМЛ при культивировании в разных средах (DMEM и RPMI-1640). (Б) На графике представлено сравнение значений отношения проницаемостей глутамата к хлору, полученных на клеточной линии КМЛ при культивировании в разных средах (DMEM и RPMI-1640). (В) На графике представлено сравнение средних значений амплитуд одиночных каналов, полученных на клеточной линии КМЛ при культивировании в разных средах (DMEM и RPMI-1640). * $P < 0.05$ для КМЛ (DMEM) относительно КМЛ (RPMI-1640).

Для дальнейшего изучения роли белков семейства LRRC8 в функционировании ОЗАК мы провели эксперименты на клеточных линиях карциномы человека KB и KCP-4. Линия KB является родительской для KCP-4, вторая устойчива к присутствию высоких концентраций цисплатина в среде культивирования, и более того, активность ОЗАК в KB значительно превышает активность канала в KCP-4, что предполагает участие объем-зависимого анионного канала в транспорте цисплатина через мембрану [Hazama et al, 2000; Lee et al, 2007]. Действительно, недавние исследования доказали, что белок LRRC8D является ответственным за транспорт противораковых препаратов, полученных на основе платины (цисплатина и карбоплатина) [Planells-Cases et al, 2015].

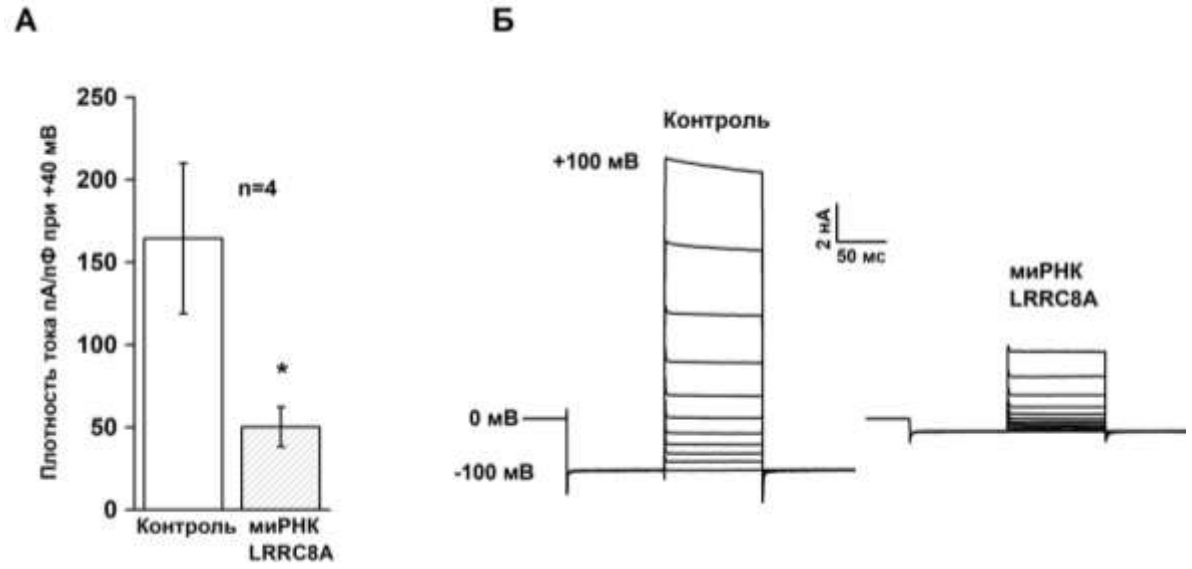


Рисунок 7. Активность канала ОЗАК в присутствии миРНК *Lrrc8a* в клетках КМЛ. (А) Плотность тока при подаче +40 мВ в контроле и при нокдауне LRRC8A (n=4). (Б) Кинетика инактивации объем-активируемого хлорного тока в зависимости от мембранного потенциала потенциал фиксации 0 мВ, ионный ток максимально активировался с помощью пре-импульса −100 мВ в течении 100 мс; затем на мембрану подавались тестовые импульсы от −100 мВ до +100 мВ с шагом 20 мВ и протяженностью 100 мс.

Логично предположить, что оверэкспрессия белков семейства LRRC8 в клетках KCP-4 приведет к восстановлению активности ОЗАК до уровня, регистрируемого в клетках KB. Как видно на рисунке 8, после трансфекции клеток KCP-4 вектором pCMV-LRRC8A-IRES-EGFP плотность тока не увеличилась, а наоборот, значительно уменьшилась и составила 57±7 пА/пФ (n=6). Таким образом, оверэкспрессия белка LRRC8A не только не восстановила значения проводимости в клетках KCP-4 до показателей KB, но еще более подавила активность изучаемого нами канала (Рис. 8 А, Б).

Известно, что семейство LRRC8 состоит из пяти членов (A, B, C, D и E), и что для нормального функционирования ОЗАК необходима коэкспрессия LRRC8A с одним из паралогов C, D или E. Как упоминалось выше, белок LRRC8D является ответственным за транспорт препаратов,

полученных на основе платины, поэтому мы предположили, что введение в мембрану большого количества этого паралога может привести к восстановлению активности ОЗАК в клетках КСР-4. Однако, в противоположность ожиданиям, в наших экспериментах оверэкспрессия только LRRC8D, а также совместная экспрессия LRRC8A вместе с LRRC8D существенно не влияли на плотность тока в клетках КСР-4. При этом подавления активности канала по сравнению с контролем также не наблюдалось (Рис. 8В).

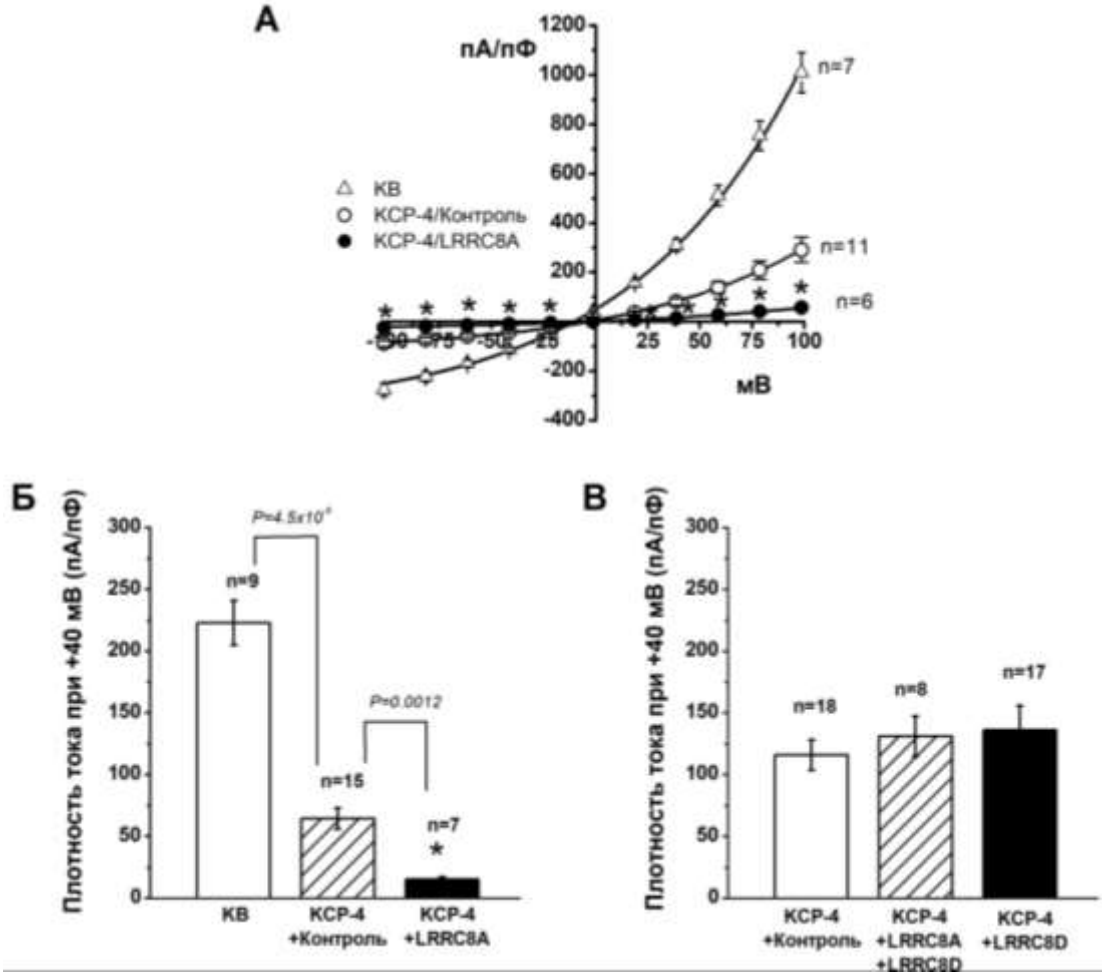


Рисунок 8. Представлены данные при оверэкспрессии LRRC8A, а также коэкспресиии LRRC8A + LRRC8D в клетках КСР-4. (А) Вольт-амперная характеристика ОЗАК в клетках КВ (Δ) и КСР-4 контроль (○) и с вектором LRRC8A-IRES-EGFP (●). (Б) Значения плотности тока при +40 мВ в клетках КВ, контрольных КСР-4 и КСР-4 трансфецированных вектором LRRC8A-IRES-EGFP. (В) Значения плотности тока при +40 мВ в контрольных КСР-4 и КСР-4 трансфецированных векторами LRRC8A-IRES-DsRed2 и LRRC8D-IRES-EGFP или только LRRC8D-IRES-EGFP.

Таким образом, объяснением полученных нам данных является предположение о том, что белки семейства LRRC8 являются необходимым, но не достаточным компонентом для полноценного функционирования канала ОЗАК. Это означает, что необходим еще один или более белков,

присутствие которых требуется для активности канала, и именно этого компонента не хватает в цисплатин-резистентных клетках КСР-4.

В шестой главе **«Свойства канала ОЗАК в клетках HeLa и HCT116 и его модуляция биологически-активными веществами природного происхождения»** приведены эксперименты исследований активности канала ОЗАК в клеточных линиях HeLa и HCT116, а также влияния различных субстанций растительного происхождения на активность канала ОЗАК. Следующая серия экспериментов обнаружила, что зарегистрированные биофизические характеристики объем-зависимого анионного канала в клетках HeLa и HCT116, являются схожими с ранее описанными в литературе для других типов клеток [Okada et al, 2019; Okada et al, 2018]. В эксперименте, исследованные линии клеток показали себя значительно более удовлетворяющими требованиям для проведения экспериментов по изучению влияния различных субстанций на активность канала ОЗАК. Мы продемонстрировали это в наших дальнейших экспериментах по влиянию веществ растительного происхождения на активность ОЗАК в этих двух типах клеток. При этом мы выявили ряд веществ, модулирующих проводимость канала ОЗАК. Так, полифенольный препарат плантагин в достаточно низкой концентрации, полностью ингибировал объем-зависимый анионный канал (Рис.9). Нами были получены аналогичные, представленным на рисунке 9, данные для следующих веществ растительного происхождения. Так ферутинин, каратавиковая и гальбановая кислоты также блокировали канал ОЗАК.

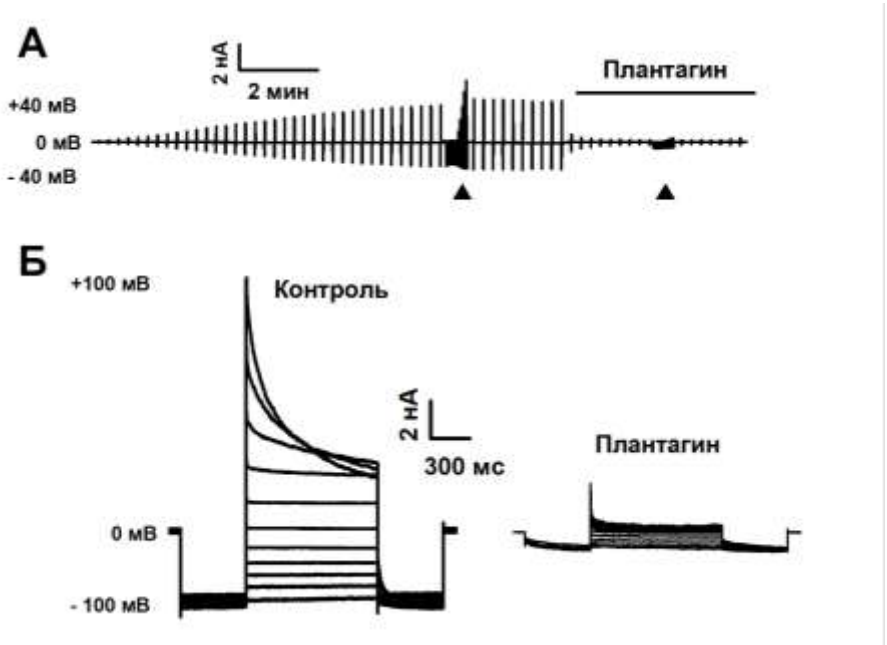


Рисунок 9. Влияние плантагина в концентрации 41 мкг/мл на объем-зависимый хлорный ток, активируемый в клетках HCT116 в ответ на их осмотическое набухание. (А) Регистрация изменения макроскопического тока в конфигурации whole-cell, в ответ на тестовый импульс ±40 мВ от 0 мВ (каждые 15 с). (Б) Кинетика инактивации объем-активируемого хлорного тока в зависимости от мембранного потенциала. Моменты подачи тестовых импульсов отмечены на рис. (А) стрелками.

Изучение флавоноида леманина показало, что в критически низких концентрациях данное вещество также полностью подавляет активность канала ОЗАК. Исследования полифенольных препаратов на активность канала ОЗАК также выявили ряд перспективных и эффективных веществ. Так, подобно плантагину, препарат рутана в низких концентрациях потенциал-независимо подавляли активность канала ОЗАК более, чем на 80%, тогда, как препараты эуфорбинов показали активность только в высоких дозах, но, при этом, эффект имел потенциал-зависимый характер.

ВЫВОДЫ

1. Зарегистрирован и подробно описан макси-анионный канал в клетках меланомы мыши КМЛ; канал имеет линейную вольт-амперную характеристику с проводимостью 300-400 пСм и анионную селективность (с отношением проницаемостей P_{Cl}/P_{Na} = 8,9), проницаем для молекул АТФ (с $P_{АТФ}/P_{Cl}$ = 0,07) и блокируется ионами Gd^{3+} .
2. Зарегистрирован и подробно описан объем-зависимый анионный канал (ОЗАК) в клетках меланомы мыши КМЛ; канал обладает промежуточной амплитудой (4,5 пА при +140 мВ), выраженным наружным выпрямлением, потенциал-зависимой инактивацией при высоких деполяризующих потенциалах, анионной селективностью с отношением проницаемостей P_{Glu}/P_{Cl} = 0,17 и чувствительностью к DCPIB, флоретину и тамоксифену.
3. Показано, что среда культивирования клеток КМЛ существенно изменяет амплитуду одиночного объем-зависимого анионного канала (до 3,6 пА) и его селективность (до P_{Glu}/P_{Cl} = 0,21), но не влияет на кинетику активации и асимметрию тока.
4. Установлено, что РНК-интерференция гена *Lrrc8a* эффективно подавляет активность объем-зависимого анионного канала в клетках КМЛ, однако его экспрессии недостаточно для активности канала в цисплатин-резистентных клетках КСР-4, и необходим ещё один, неидентифицированный компонент сложного белкового комплекса объем-зависимого анионного канала.
5. Показано, что клеточные линии HeLa и HCT116 могут быть использованы в качестве удобных моделей для *in vitro* скрининга модуляторов объем-зависимого анионного канала; с их помощью среди биологически активных веществ растительного происхождения обнаружены новые эффективные блокаторы канала: ферутинин, гальбановая и каратавиковая кислоты, леманин, пиноцембрин, рутан, плантагин и эуфорбины.

SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING SCIENTIFIC DEGREES DSc.03/30.12.2019.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

TSIFEROVA NARGIZA ALEKSANDROVNA

ANION TRANSPORT SYSTEMS OF PLASMA MEMBRANES OF CELLS IN CULTURE

03.00.02 – Biophysics and radiobiology

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

Tashkent - 2020

The dissertation of PhD Has been registered with number B2017.1.PhD/B8 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers 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 is posted in three languages (Uzbek, Russian and English) on the website of the Scientific Council www.ibb-nuu.uz on the website of «ZiyoNet» information–educational portal (www.ziyonet.uz)

Scientific supervisor:	**Sabirov Ravshan Zairovich** doctor of biological sciences, academician
Official opponents:	**Mirkhodjayev Ulugbek Zakirovich** doctor of biological sciences, professor
	Tonkykh Anatoliy Konstantinovich doctor of philosophy
Leading organization:	**Center of genomics and bioinformatics Uzbek Academy of Sciences**

The defense of the dissertation will take place on _____2020 year ___ at the meeting of the Scientific Council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 scientific degrees at the Institute of biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan at the following Address: 100174, Tashkent sity, Almazar district, Students town, University st., 174. Phone: (99871) 246–68–96..

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of biophysics and biochemistry National University of Uzbekistan (registration number №____). Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Students town, University st., 174. Phone: 262-68-96, E-mail: ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of the dissertation has been distributed on «____» _____2020
(Protocol at the register №___ dated «_____» _____2020)

Saatov T.S.
Vice-Chairman of the Scientific Council Awarding Scientific Degrees, D.B.Sc., academician

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

Axmedjanov I.G.
Chairman of the seminar of scientific degrees awarding scientific council, D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work is biophysical characterization of the anion transport systems of plasma membranes of cells in culture.

The objects of the research work were cultured cell lines: mouse melanoma KML, human adenocarcinoma HeLa, human colorectal carcinoma HCT116, human adenocarcinoma KB and its variant resistant to cisplatin, KCP-4.

The scientific novelty of the research work is as follows:

it was established, that KML cells expressed large conductance anion channel; the biophysical profile and pharmacological properties of the maxi-anion channel in melanoma cells were described in detail;

it was established, that the osmotic stress activated intermediate conductance volume-sensitive anion channel in KML cells; the biophysical profile of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR) in melanoma cells was described, as well as it`s pharmacological properties were presented; it was revealed, that the culture medium significantly altered biophysical properties of the channel;

it was shown, that LRRC8A protein is an essential component of the VSOR pore, yet it is not sufficient for channel activity in cisplatin-resistant cancer cells;

it was found, that HeLa and HCT116 cell lines are adequate models for the *in vitro* screening of new modulators of VSOR; perspective inhibitors of VSOR were identified among substances of plant origin.

Implementation of the research results. The results of the scientific research of the anion transport systems of plasma membranes of cells in culture were basis for:

data on the contribution of LRRC8A protein to the pore-formation of the volume-sensitive anion channel were used in journals with high impact-factors in studying subunit structure of the channel (*eLife* 2019, V.8, Scopus CiteScore 6.99; *Biophysical Journal* 2019, V. 116, Scopus CiteScore - 3.26; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 177-203, Scopus CiteScore – 3.29; *Oncology Reports* 2018, V.40, Scopus CiteScore – 3.07). The results enabled characterizing the position of the LRRC8A protein in the three-dimensional structure of the VSOR;

the data that expression of an unknown regulatory component, in addition to LRRC8 proteins family, is necessary for the VSOR activity, was used in journals with high impact factors in the search of VSOR pore regulators (*Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 183-215, Scopus CiteScore –2.67; *Experimental Neurobiology* 2019, V. 28, №2, P. 131-133, Scopus CiteScore –2.67; *EMBO Journal* 2017, V. 36, Scopus CiteScore – 8.28). The results let to continue searching for pore regulators of the volume-sensitive anion channel;

data on the transport of ATP molecules through volume-activated anion channels were used in journals with a high impact factor to characterize the ion-transporting properties of the volume-sensitive anion channel (*International Journal of Molecular Sciences* 2018, V.19, P. 808, Scopus CiteScore – 4.32; *Pharmacological Reviews* 2019, V.71, P. 49-88, Scopus CiteScore – 18.73; *Current Topics in Membranes* 2018, V.81, P. 125-176, Scopus CiteScore – 3.29).

The results enabled characterizing the transport of ATP molecules through volume-activated anion channels;

the results on the effect of ferutinin on the activity of the volume-sensitive anion channel in human adenocarcinoma HeLa cells were used in the fundamental scientific project F-5-06 “Study of the mechanism of action of some bioregulators” (certificate of the Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Republic of Uzbekistan No. 89-03-3705 of October 3, 2019). The results permit determining the role of ferutinin in a number of intracellular processes, including the ferutinin-mediated mechanism of calcium cell signaling, the membrane-active properties of ferutinin, and the effects on the volume-sensitive anion channel.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of introduction, six chapters, conclusion and list of publication. The volume is 105 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Циферова Н. А., Мерзляк П.Г., Левицкая Ю.В., Кузнецова Н.Н., Сабиров Р. З. Биофизические характеристики каналов большой амплитуды, регистрируемых на плазматической мембране клеток меланомы. Вестник НУУз –2011.– Спец. выпуск.– С 34-36. (03.00.00; №9).
2. Циферова Н. А., Курганов Э.Ш., Мерзляк П.Г., Левицкая Ю.В., Кузнецова Н.Н., Б.А. Ташмухамедов, Сабиров Р. З. Сравнительный анализ биофизических свойств объём-активируемой мембранной проводимости в клетках КМЛ И HeLa. Доклады Академии наук Республики Узбекистан.– 2012.– № 5.–С. 51-54. (03.00.00; №6).
3. Циферова Н. А., Мерзляк П.Г., Левицкая Ю.В., Сабиров Р. З. Субъединичная организация каналов большой проводимости на плазмалемме меланомы и образованных гемоцианином в БЛМ. Вестник НУУз.–2015– №3/1. –С. 91-93. (03.00.00; №9).
4. Циферова Н. А., Курганов Э.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабиров Р. З. Селективность объем-зависимого анионного канала в клеточных линиях КМЛ, B16 и HeLa. Узбекский биологический журнал. – 2015.– № 4.– С. 11-14. (03.00.00; №5).
5. Циферова Н.А., Курганов Э.Ш., Мерзляк П.Г., Ташмухамедов Б.А., Сабиров Р.З.. Фармакологические свойства объем-зависимого анионного канала в клетках HeLa, КМЛ и B16. Узбекский биологический журнал. – 2016.– № 2.– С. 8-14. (03.00.00; №5).
6. Okada T., Islam M.R., Tsiferova N.A., Okada Y. and Sabirov R.Z. Specific and essential but not sufficient roles of LRRC8A in the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR). Channels (Austin). –2017. V11. –№2.–P. 109-120.– (Scopus CiteScore-1.51).
7. Rustamova S.I., Tsiferova N.A., Khamidova O.J., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N., Botirov E.Kh., Eshbakova K.A. and Sabirov R.Z. Effect of plant flavonoids on the volume regulation of rat thymocytes under hypoosmotic stress. Pharmacological Reports. –2019.– V. 71.– № 1.– P. 49-88. DOI: (Scopus CiteScore - 2.93).
8. Tsiferova N.A., Khamidova O. J., Amonov A. U., Rakhimova M. B., Rustamova S I., Kurbannazarova R. Sh., Merzlyak P.G., Abdulladjanova N G., Sabirov R Z.. Tannins, novel inhibitors of the volume regulation and the volume-sensitive anion channel. European Pharmaceutical Journal.–2019.–V.66.– №2.– P.37-44.– DOI: 10.2478/afpuc-2019-0016 – (Scopus CiteScore -0.39).

II бўлим (II часть; II part)

9. Tsiferova N.A., Merzlyak P.G., Sabirov R.Z. VSOR channel properties in melanoma cells cultured in different mediums. European Science Review. №1-2.– 2019.– P. 57-59.– (03.00.00; №6). DOI: https://doi.org/10.29013/ESR-19-1.2.2-57-59.

10. Циферова Н. А., Кузнецова Н.Н., Мерзляк П.Г., Левицкая Ю.В., Сабиров Р.З. Исследование объем-зависимого анионного канала в мембране клеток меланомы. Сборник тезисов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука 21 века». –Пущино (Россия). –2009.– С. 151-152.

11. Циферова Н. А. Исследование объем-зависимого анионного транспорта в клеточных мембранах. Сборник тезисов «Магистратура».– 2009.–С. 26.

12. Циферова Н. А.,Мерзляк П.Г., Курганов Э. Ш., Левицкая Ю.В., Кузнецова Н.Н., Сабиров Р.З. Регуляция объема клеток меланомы мыши при гипоосмотическом стрессе и объем-активируемые анионные каналы. Тезисы докладов республиканской научно-практической конференции «Проблемы ботаники, биоэкологии, физиологии и биохимии растений». Ташкент (Узбекистан).– 2011.– С. 134.

13. Циферова Н. А., Курганов Э.Ш., Мерзляк П.Г., Левицкая Ю.В., Сабиров Р. З. Фармакологические свойства объем-зависимого хлорного канала в клетках КМЛ и HeLa. «Табиий бирикмалардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари» Республика илмий амалий анжумани материаллари тўплами. Гулистан (Узбекистан) – 4-5 май 2013. С. 48.

14. Циферова Н. А., Мерзляк П.Г., Сабиров Р. З. Биофизика и фармакология объем-зависимого анионного канала в плазмалемме культивируемых клеток меланомы. Сборник тезисов Международной научной конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии». Ташкент (Узбекистан).– 15-16 ноября 2013.– С. 94.

15. Sabirov R.Z., Tsiferova N.A., Merzlyak P., & Okada Y. Volume-sensitive anion channels in melanoma cells before and after tumor formation. “The 92th Annual Meeting of the PSJ / The 120th Annual Meeting of the JAA”.. –Kobe (Japan) – J. Physiol. Sci– March 21-23, 2015.– V. 65– (Suppl. 1).– S144.

16. Циферова Н. А., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. Анализ характеристик объем-зависимого анионного канала в клетках HeLa и меланомы мыши до и после опухолеобразования. Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» – Пущино (Россия) – 2-3 ноября 2015.–С. 117-118.

17. Tsiferova N.A., Merzlyak P., Okada Y. , & Sabirov R.Z. Properties of the maxi-anion channel in melanoma cells. “The 93th Annual Meeting of the PSJ”. Sapporo (Japan) –J. Physiol. Sci. –March 22-24, 2016.– V. 66 .–(Suppl. 1).– S120.

18. Циферова Н. А., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. Биофизические свойства объем-зависимого анионного канала в клетках B16 и КМЛ, культивируемых в DMEM. Материалы научно-практической конференции

«Современные аспекты физико-химической биологии и экотоксикологии» – Ташкент (Узбекистан).– 26 апреля 2016.–С. 243.

19. Okada T., Islam M.R., Tsiferova N.A., Kurbannazarova R.S., Okada Y. and Sabirov R.Z. Investigation of the role of the LRRC8 family proteins in cisplatin-resistant cell line, KCP-4 (シスプラチン耐性細胞株KCP-4におけるLRRC8分子群の役割の検討). In: “Abstracts of the 63nd Annual Meeting of the Physiological Society of Chubu Area” – Okazaki (Japan).– 4-5 November 2016.– P.58.

20. Циферова Н.А., Мерзляк П.Г., Рахимов Р. Н., Абдулладжанова Н. Г., акад. Сабиров Р.З. Действие растительных полифенолов на активность объем-зависимого анионного канала в клетках HCT 116. Сборник тезисов Международной научной конференции «Лекарственные препараты на основе природных соединений» – Ташкент (Узбекистан) – 18-20 сентября 2018.– С.129-130.

21. Хамидова О.Ж., Циферова Н.А., Амонов А.У., Рахимова М.Б., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Абдулладжанова Н.Г., Сабиров Р.З. Баъзи полифенол бирикмаларнинг ҳужайра мембраналарига таъсири. «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари. Республика илмий анжумани»– Ташкент (Узбекистан) –16 май 2019. С. 169-171.

22. Циферова Н.А. Окада Т. Мерзляк П.Г. Сабиров Р.З. Роль белка LRRC8A в функционировании объем-зависимого анионного канала в клетках меланомы мыши. «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари. Республика илмий анжумани»– Ташкент (Узбекистан) –16 май 2019. С.173-174.

Автореферат «Ўзбекистон биология журнали» журналида

тахрирдан ўтказилиб, ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар ўзаро мувофиқлаштирилди.