

**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

ФАЙЗИЕВ ДИЁР ДАВРОНОВИЧ

**ГЛИЦИРРИЗИН ВА УНИНГ ҲОСИЛАЛАРИНИНГ ҲУЖАЙРА ҲАЖМ
БОШҚАРИЛИШИ ВА АНИОН ТРАНСПОРТИГА ТАЪСИРИНИ
ЎРГАНИШ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

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

Тошкент - 2021

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

Глицирризин ва унинг ҳосилаларининг хужайра ҳажм бошқарилиши ва анион
транспортига таъсирини ўрганиш.....

3

Файзиев Диёр Давронович

Исследование влияния глицирризина и его производных на регуляцию клеточного объёма
и анионный транспорт.....

21

Fayziev Diyor Davronovich

Study of the effects of glycyrrhizin and its derivatives on the cell volume regulation and anionic
transport.....

39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....

42

**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

ФАЙЗИЕВ ДИЁР ДАВРОНОВИЧ

**ГЛИЦИРРИЗИН ВА УНИНГ ҲОСИЛАЛАРИНИНГ ҲУЖАЙРА ҲАЖМ
БОШҚАРИЛИШИ ВА АНИОН ТРАНСПОРТИГА ТАЪСИРИНИ
ЎРГАНИШ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

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

Тошкент – 2021

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2019.2.PhD/B297 рақам билан рўйхатга олинган.

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

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

Илмий раҳбар:

Курбанназарова Раъноҳон Шараповна
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Хушматов Шунқор Садуллаевич
биология фанлари доктори

Камбурова Венера Сейтумеровна
биология фанлари номзоди

Етақчи ташкилот:

Қарши давлат университети

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги илмий даражалар берувчи DSc.03/30.12.2019.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2021 йил «03» 02 соат 14⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96).

Диссертация билан Биофизика ва биокимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№23 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru; asrarov54@mail.ru.

Диссертация автореферати 2021 йил «15» 01 куни тарқатилди.
(2021 йил «15» 01 даги № 1 рақамли реестр баённомаси).



Сабилов Равшан Заирович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, б.ф.д., академик

Позилов Маъмуржон Комилжонович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д.

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 кунда дунё миқёсида олиб борилаётган кўплаб тадқиқотлар шуни кўрсатадики, ҳажмга боғлиқ анион каналлари бир қанча физиологик жараёнлар (хужайра ҳажм бошқарилиши, пролиферация, миграция, инвазия, апоптоз) билан бирга патофизиологик жараёнлар (канцерогенез ва саратон хужайраларининг цисплатинга қаршилиги, кардиомиоцитлар ва гипокамп нейронларнинг ишемик-реперфузияси натижасидаги ўлими, лактоцидоз шароитида глиал некроз, эксайтотоксик нейронлар ўлими) да қатнашади. Бундан ташқари, ҳажмга боғлиқ анион каналлари ишемик шароитда ва яллиғланишнинг бошланғич воситачиси бўлган брадикинин томонидан қўзғатилганида астроцитлардан глутамат чиқиши учун асосий йўл ҳисобланади. Ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигининг кўпайиб ёки камайиб кетиши юқоридаги ҳаётий муҳим жараёнларнинг бузилишига сабаб бўлади. Бунга асосланиб, ҳажмга боғлиқ анион каналлари ва мембрана транспортерларининг селектив блокаторларини кашф қилиниши ушбу жараённинг молекуляр асосларини аниқлашда ҳамда янги перспектив фармакологик воситалар ишлаб чиқишда муҳим илмий ва амалий аҳамият касб этади.

Дунёнинг етакчи илмий тадқиқот марказларида глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини кенг кўламда биологик ва фармакологик хусусиятлари устида жадал илмий изланишлар олиб борилмоқда. Глицирризин кислотасининг яллиғланишга қарши, вирусларга қарши, ракка қарши, антиоксидант, иммуномодуляцияловчи, жигар ҳимояловчи, юрак-қон томирларини ҳимояловчи ва бошқа дори воситаларининг таъсирини кучайтириш каби хусусиятлари аниқланган. Ҳозирги кундаги тадқиқотларда глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини мембранатроп фаоллиги, хужайралар ҳажм бошқарилиш тизимида иштирок этувчи ион каналларига, айниқса анион каналларига таъсир механизмлари кўрсатиб бериш талаб этилади.

Мамлакатимизда бугунги кунда ион каналларининг янги самарали ва кам токсик модуляторларини кашф қилиш ва уларнинг таъсир механизмларини тадқиқ этиш бўйича фундаментал ва инновацион изланишлар олиб борилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «...илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш»¹ таъкидланган. Ушбу вазифалардан келиб чиққан ҳолда маҳаллий ўсимликлардан ажратилган биологик фаол бирикмаларнинг хужайра ҳажми бошқарилиши тизимига таъсир механизмларини аниқлаш ва улар асосида фармакологик препаратларни яратиш муҳим аҳамият касб этади.

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги ПФ-4947-сонли фармони

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони, 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сон «Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида» ги Қарори ва 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

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

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида олимлар томонидан ҳажмга боғлиқ анион каналларининг нормал ва патофизиологик ҳолатлардаги ролини тавсифлаш устида кўплаб тадқиқотлар олиб борилмоқда (Akita et al., 2014; Okada et al. 2019). Глицирринин кислотаси ва уни ҳосилаларининг турли биологик жараёнларга ва мембраналардаги ион каналларига таъсири бўйича ҳам бир қатор тадқиқотлар олиб борилган. Жумладан, глициррет кислотасининг гемисукцинил ҳосиласи – карбеноксолон астроцит хужайраларида ҳажмга боғлиқ анион каналларини блоклаши ҳақида маълумотлар келтирилган (Benfenati et al. 2009). Буйракдаги сув каналларини глицирринин кислотаси томонидан ингибирланиши қисман буйрак функцияларининг нормаллашувига олиб келган (Kang et al. 2003). Каламушларда юрак қоринчасидаги миоцитларга глицирринин кислотасининг моноаммонийли тузини дозага боғлиқ ҳолда таъсири текширилганда L-типидаги Ca^{2+} -каналлари орқали кальций оқимининг камайишига олиб келган (Zhao et al. 2020). Jurkat T хужайраларидаги K_v 1.3 каналларига α - ва β -глициррет кислоталарининг таъсири текширилганда α -глициррет кислотанинг таъсири йўқлиги аниқланган, β -глициррет кислота эса ушбу каналларни потенциалга ва концентрацияга боғлиқ равишда блоклаган ва мембрана потенциалини деполяризация қилиши аниқланган (Fu et al. 2013).

МДХ давлатларида О.Ю. Селютин (2017) ва бошқа олимлар томонидан эритроцит мембраналари барқарорлигига глицирринин кислотасининг ижобий таъсири аниқлаган. О.Ю. Глущенко, Н.Э. Поляков, Т.В. Лешина (2011) томонидан глицирринин кислотасининг холестерин билан комплекси атеросклерозга қарши фаол таъсир кўрсатиши аниқланган. Бироқ, эришилган ютуқларга қарамадан, глицирринин ва унинг ҳосилаларини хужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ анион каналларининг функционал фаоллигига таъсир механизмлари билан боғлиқ бир қатор саволлар ечимсиз қолмоқда.

Республикамизда ион каналларининг биофизик ва фармакологик тадқиқотлари академиклар Б.А. Тошмухамедов ва Р.З. Сабилов, профессорлар У.З. Мирходжаев, П.Б. Усманов, М.И. Асраровлар раҳбарлиги остида амалга оширилган. Мазкур илмий мактаб олимлари томонидан ўсимликлардан ажратиб олинган турли биологик фаол моддаларнинг юрак ва силлиқ мускуллар ҳужайраларида кальций ташилиш механизмига, митохондриядаги мегапоралар ва калий каналлари функциясига, ҳужайра ҳажм бошқарилиш системасига таъсир механизми борасида илмий изланишлар олиб борилмоқда.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биофизика ва биокимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасига мувофиқ №ФА-А11-Т060 «Истикболли иммуномодулятор ва саратонга қарши препаратлар сифатида ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ анион каналларининг янги модуляторларини аниқлаш» (2015-2017), №ФА-Ф5-014 «Ҳажмга боғлиқ анион каналларининг биофизикавий фенотипи ва ҳужайра ҳажм бошқарилиш механизмидаги функцияларини ўрганиш» (2017-2020) №ПЗ-2017-0920-49 «Маҳаллий хомашё асосида ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ мембрана транспорти модуляторлари бўлган янги перспектив субстанцияларни тадқиқи» (2018-2020) мавзуларидаги илмий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади глицирризин ва унинг ҳосилаларининг ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ анион каналларининг фаоллигига таъсирини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишига глицирризин ва унинг ҳосилалари: агликон глициррет кислотаси (ГлК), унинг α - ва β -изомерлари, валериокси-ГлК, бутирокси-ГлК ҳамда гемисукцинил-ГлК (карбеноксолон)ларни дозага боғлиқ таъсирини ўрганиш, моддаларнинг ингибирловчи таъсирини анион транспортига боғлиқлигини аниқлаш;

одам йўғон ичак раки (НСТ116) ҳужайра плазмалеммасидаги ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигига глицирризин ва унинг ҳосилаларини таъсирини аниқлаш;

табiiй полифенол госсиполнинг НСТ116 ҳужайралари ва тимоцитлардаги ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигига таъсирини аниқлаш;

изоосмотик шароитда одам эритроцит ҳужайраларидан гемоглобин чиқишига глицирризин ва унинг ҳосилаларини таъсирини аниқлаш;

глицирризин кислотаси ва унинг агликонининг сунъий қўшқават липид мембраналарга таъсирини аниқлаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида зотсиз, 6-8 ҳафталик, ёш оқ каламушлардан ажратилган тимоцитлар, одам қизил қон ҳужайралари ва

одам йўғон ичак рак хужайрасининг культураси (НСТ116 линияси), тритерпеноид ва полифенол моддалар олинди.

Тадқиқотнинг предмети глицирризин ва унинг ҳосилаларини, гипоосмотик стресс шароитида каламуш тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига, НСТ116 хужайра линияси ҳажмга боғлиқ анион каналларига, одам қизил қон хужайраларига ва сунъий мембраналарга таъсири ҳамда табиий полифенол госсиполнинг НСТ116 хужайра линияси ва тимоцит хужайраларининг ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигига таъсирини тадқиқ қилишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тажрибаларда замонавий биофизикавий, биокимёвий ва электрофизиологик усуллардан фойдаланилди. Каламуш тимоцитлари ва қизил қон хужайралари стандарт методлар ёрдамида ажратилди, тимоцитлар хужайра ҳажми суспензиянинг ёруғлик ўтказувчанлигини регистрацияси усули бўйича аниқланди. Ҳажмга боғлиқ анион каналларининг биофизикавий параметрлари ион тоқларининг микролокал ўлчаш (пэтч-кламп) методи ёрдамида регистрация қилинди. Гемолиз миқдори қизил қон хужайраларидан гемоглобиннинг чиқиши бўйича ўлчанди. Сунъий кўшқават липид мембраналардан ўтувчи токни потенциаллар фиксацияси методи ёрдамида қайд қилинди, натижаларни математик ва статистик таҳлил қилиш учун Origin 5 ва 8.6 (OriginLab, Northampton, MA, США) компьютер дастурларидан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қўйидагилардан иборат:

глицирризин ва унинг ҳосилаларини гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишига таъсири ва улар ичидан кучли ингибирловчи таъсирга эга моддалар аниқланган;

ноэлектрик ва тўғридан-тўғри электрофизиологик пэтч-кламп методи ёрдамида глицирризин ва унинг ҳосилаларини ҳамда госсипол моддасининг хужайра ҳажм бошқарилишига таъсир механизми айнан ҳажмга боғлиқ анион канали блокадаси туфайли амалга оширилиши исботланган;

изоосмотик шароитда одам эритроцит хужайраларидан гемоглобин чиқишига глицирризин ва унинг ҳосилаларини таъсири ва β -глициррет кислотасининг мўътадил гемолитикка эга эканлиги аниқланган, β -глициррет кислотаси таъсирида кечувчи гемолиз, мембранада поралар ҳосил қилиши туфайли коллоид-осмотик механизм орқали амалга ошириши исботланган;

глициррет кислотасининг ион каналлари ҳосил қилиши ҳамда сунъий мембраналарнинг электр ўтказувчанлигини ошириши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қўйидагилардан иборат:

глицирризин ва унинг ҳосилалари орасидан тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасини ингибирловчи янги истиқболли моддалар аниқланган;

β -глициррет кислотаси ва унинг ҳосилалари саратон касаллигида кескин фаоллашувчи ҳажмга боғлиқ анион каналларини кучли ингибитори эканлиги исботланган;

глицирризин ва унинг ҳосилаларини изоосмотик шароитда кам цитотоксиклиги исботланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тадқиқотларда замонавий биофизик-биокимёвий, электрофизиологик тадқиқот усулларини қўллаш орқали олинганлиги, натижалар таҳлили замонавий компьютер дастури ёрдамида таҳлил қилинганлиги билан тасдиқланади, олинган натижаларнинг исботи уларнинг республика ва халқаро анжуманлардаги муҳокамаси, натижалар рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти глицирризин ва унинг ҳосилаларини тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасига ингибирловчи таъсир қилиши ва уларнинг таъсир механизмлари аниқланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти, ион каналларига боғлиқ ҳамда иммун тизими хужайралари патологияси натижасида келиб чиқувчи касалликларни олдини олиш ва даволашда, глицирризин ва унинг ҳосилаларини фаол иммуномодулятор туркумига мансуб янги авлод истиқболли дори воситалари сифатида қўллаш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Глицирризин ва унинг ҳосилаларининг хужайра ҳажм бошқарилиши ва анион транспортига таъсири бўйича олинган илмий натижалар асосида:

глицирризин ва унинг ҳосилаларининг хужайра ҳажм бошқарилиши ва анион транспортига таъсири бўйича олинган илмий натижалардан А-11-10 рақамли «Митохондриал касалликларга қарши дори препарати яратиш ва ишлаб чиқариш» мавзусидаги амалий лойиҳада глицирризин кислотаси супрамолекуляр бирикмаларининг каламуш жигари митохондрияларида антиоксидант таъсирини тавсифлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлигининг 2020 йил 30 октябрдаги 89-03-4300-сон маълумотномаси). Натижада митохондриал касалликларни даволаш учун асос бўладиган янги биологик фаол моддаларни аниқлаш имконини берган.

ширинмия (*Glycyrrhiza glabra*) ўсимлигидан ажратиб олинган глицирризин ва унинг ҳосилаларини хужайра ҳажм бошқарилиши ва анион транспортига ингибирловчи таъсири бўйича олинган илмий натижалардан ФПФИ Т.2-18 рақамли «2-алкил(арил)-5-амино 1,3,4-тиадиазол қолдиғини тутган айрим табиий тритерпен кислоталари ҳосилаларининг биологик фаоллиги» мавзусидаги лойиҳада айрим табиий тритерпен кислоталари ҳосилаларининг биологик таъсирини ойдинлаштиришда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2020 йил 8 июлдаги 4/1255-1422-сон маълумотномаси). Натижада айрим табиий тритерпен кислоталари ҳосилаларининг мембранафаол хусусиятларини тавсифлаш имконини берган.

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

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 17 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий журналларда 5 та мақола, шундан 4 та республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, якуний қисм, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми (мундарижа, қисқартма сўзлар ва фойдаланилган адабиётлар рўйхати билан) 117 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

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

Диссертациянинг «**Глицирризин кислотаси ва уни ҳосилаларининг умумий тавсифи**» деб номланган биринчи бобида ширинмия ўсимлигининг умумий хусусиятлари ва унинг биологик фаол компонентлари: тузилиши, таснифи ва физик-кимёвий хусусиятлари таҳлил қилинган, глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини биологик фаолликлари, табиий полифенол госсипол моддасининг биологик фаол хусусиятлари, ҳужайра ҳажм бошқарилиши механизми, физиологик ва патофизиологик жараёнларда ҳужайра ҳажм бошқарилиши, ҳужайра ҳажм бошқарилиш системаси фармакологияси ва ҳажмга боғлиқ анион каналлари тўғрисида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Ҳужайра ҳажм бошқарилиши ва ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигини аниқлаш материаллари ва усуллари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотда фойдаланилган моддалар ва эритмалар тавсифи, хусусияти, тимоцит ҳужайраларини ёш оқ каламушлардан ажратиш ва тадқиқот олиб борилган эритроцит ҳужайраларини кўнгилли соғлом одам қонидан олиб суспензия тайёрлашнинг стандарт методлари, тадқиқотда фойдаланилган ҳужайра ҳажмини суспензиянинг ёруғлик ўтказувчанлигини регистрация қилиш усули, ион тоқларининг микролокал ўлчаш (пэтч-кламп), гемолиз, сунъий кўшқават липид мембраналар (БЛМ) каби оптик ва электрофизиологик усуллар батафсил ёритилган, шунингдек олинган натижаларни математик қайта ишлаш усуллари ва статистик таҳлили келтирилган.

Диссертациянинг «**Тимоцит ҳужайралари ҳажм бошқарилиши ҳамда НСТ116 ҳужайра линиясининг ҳажмга боғлиқ анион каналларига**

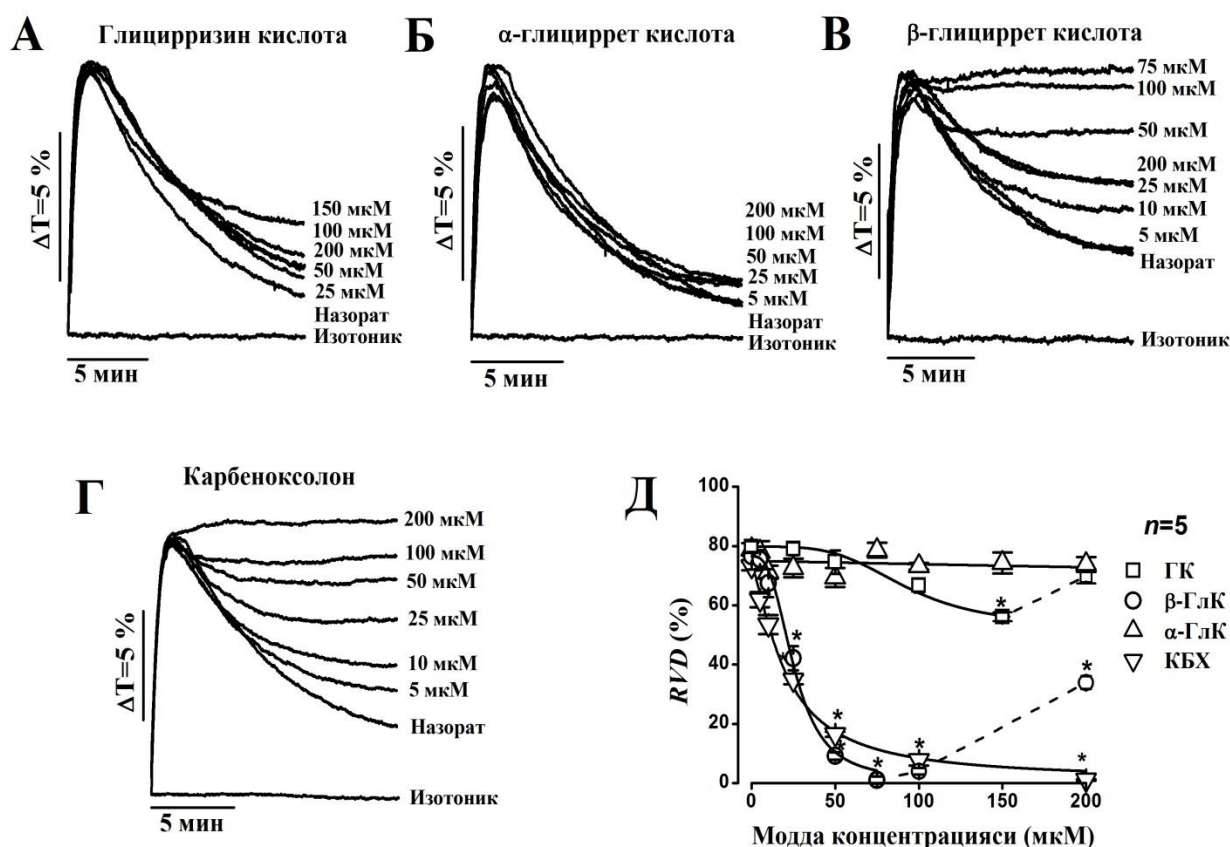
глицирризин ва унинг ҳосилаларини таъсири» деб номланган учинчи бобида гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилиши системасига глициррин кислотаси (ГК) ва унинг ҳосилаларини дозага боғлиқ таъсири, тимоцитлар ҳажм бошқарилишига ингибирловчи таъсирининг анион транспортига боғлиқлиги, НСТ116 хужайра линиясининг ҳажмга боғлиқ анион канали (ХБАК) фаоллигига таъсири бўйича натижалар келтирилган.

Шу билан бирга табиий полифенол госсиполнинг НСТ116 хужайра линияси ва тимоцит хужайраларидаги ХБАК фаоллигига таъсири бўйича тадқиқот натижалари келтирилган.

Дастлабки олиб борилган тадқиқотларда изотоник муҳитда (нормал Рингер эритмаси) тимоцитлар ҳажми 15 минут давомида ўзгармасдан сақланади (1-расм). Тимоцитлар гипотоник муҳитга тушганда дастлаб тезда шишиб (пассив жавоб), кейин изотоник ҳажмга яқин даражагача ҳажмини тиклайди (актив жавоб) (1-расм). Ушбу жараён бошқарилувчи ҳажм камайиши (*RVD – Regulatory Volume Decrease*) дейилади. Назоратда гипоосмотик стресс шароитида 15 минут давомида инкубация қилинган тимоцитларда хужайра ҳажм камайиши 68% дан 84% гача бўлиб, ўртача $78,9 \pm 3,3\%$ га ($n=15$) тенг бўлди (1-расм).

Глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини тимоцитлар хужайра ҳажм бошқарилишига дозага боғлиқ таъсири текширилганда куйидаги натижалар олинди. Глицирризин кислотаси ушбу тизимга кучсиз игибиторлик хусусиятни номоён қилди (1-А ва Д расмлар). α -глициррет кислотасининг таъсири йўқлиги аниқланди (1-Б ва Д расмлар). β -глициррет кислотаси эса *RVD* жараёнини тўлиқ блоклади (1-В ва Д расмлар). Глициррет кислотасининг гемисукцинил ҳосиласи карбеноксолон ҳам *RVD* ни дозага боғлиқ ҳолда кучли ингибирлади (1-Г ва Д расмлар).

Айтиш жоизки, юқоридаги тажрибаларда биз Sigma компаниясидан харид қилинган моддалардан фойдаландик. Кейинги тажрибаларда ЎзР ФА Биоорганик кимё институти “Қуйи молекуляр биологик фаол бирикмалар” лабораторияси ходимлари томонидан ширинмия ўсимлигидан ажратиб олинган табиий глициррет кислотаси (ГлК) ҳамда унинг валериокси- ва бутирокси-ҳосилаларидан фойдаландик. Бунда барча моддалар тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасига дозага боғлиқ ҳолда кучли ингибирлаши аниқланди.



1-расм. Гипоосмотик стресс шароитда тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасига ГК ва унинг ҳосилаларини дозага боғлиқ таъсири. (А) глицирризин кислота; (Б) α -глициррет кислота; (В) β -глициррет кислота; (Г) карбеноксолол; (Д) моддаларнинг дозага-боғлиқ таъсири натижасининг Хилл тенгламасида аппроксимацияси; ярим-максимал эффе́кт келтирувчи концентрациялар ва Хилл коэффициентлари 1-жадвалда келтирилган.

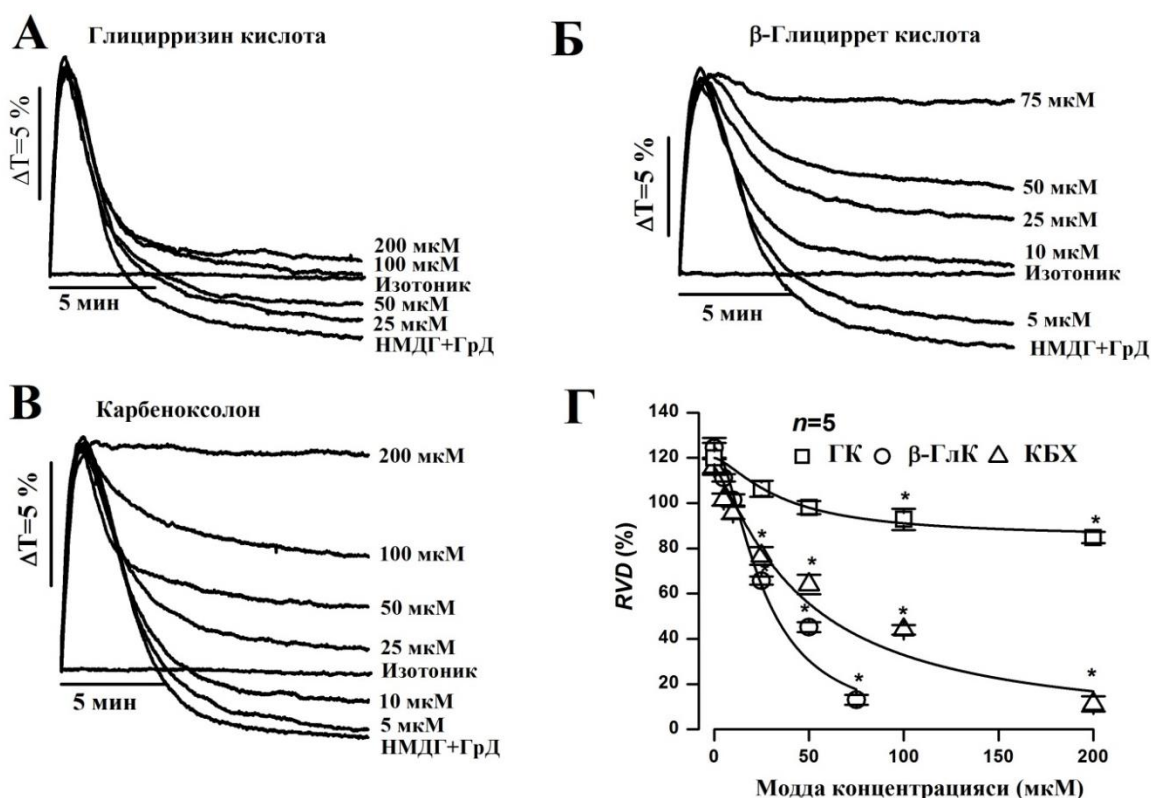
Олинган натижаларни Хилл тенгламасида аппроксимация қилиниб, ярим-максимал эффе́ктлар аниқланди (1-жадвал).

1-жадвал

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳужайра ҳажм бошқарилиш системасига глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини дозага боғлиқ таъсирининг ярим-максимал эффе́кт келтирувчи концентрациялар (C_{50}) ва Хилл коэффициентлари (h)

№	Тритерпеноидлар	C_{50} (мкМ)	h
1	Глицирризин кислота	104,8±4,8	10,5±8,1
2	α -глициррет кислота	-	-
3	β -глициррет кислота	26,6±1,2	3,1±0,4
4	Табиий глициррет кислота	9,1±0,3	1,9±0,1
5	Карбеноксолол	23,5±1,5	1,1±0,1
6	Валериоксиглициррет кислота	8,9±1,8	0,7±0,1
7	Бутироксиглициррет кислота	29,7±4,5	1,1±0,1

Адабиётларда тимоцит хужайраларининг ҳажм бошқарилиши механизмида K^+/Cl^- котранспортининг ҳамда Ca^{2+} , K^+ ва Cl^- каналларининг роли кўрсатилган. Глицирризин ва унинг ҳосилаларини ингибирлаш эффекти ушбу таркибий қисмлардан бирининг функциясига таъсири орқали амалга ошиши мумкин. Тажрибаларимизда гипотоник эритма таркибидаги барча бир валентли катионлар йирик органик катион – Н-метил-Д-глюкамин ($HM\Delta G^+$) га алмаштирилди ва тимоцитлар мембранасининг катион ўтказувчанлиги грамицидин Д (ГрД) ёрдамида оширилди. Тимоцитлар ГрД ва $HM\Delta G$ ли гипотоник Рингер эритмасига (кейинги ўринларда $HM\Delta G$ -ГрД деб аталади) жойлаштирилганда, дастлаб шишиб, натрийли гипотоник Рингерга нисбатан ўз ҳажмларини янада самаралироқ тиклади ва *RVD* параметри $108,7 \pm 6,6\%$ ($n=5$) ни ташкил этди (2-расм). $HM\Delta G$ -ГрДли шароитда хужайра плазматик мембранасидаги ҳажм бошқарилиши асосан анион транспорти фаоллигига боғлиқ бўлади (Rustamova et al. 2019). Ушбу экспериментал шароитда тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасини глицирризин кислотаси кучсиз ингибирлади (2-А ва Г расмлар). β -глициррет кислотаси ва карбеноксолон ушбу тизимни кучли блоклади (2-Б, В ва Г расмлар).

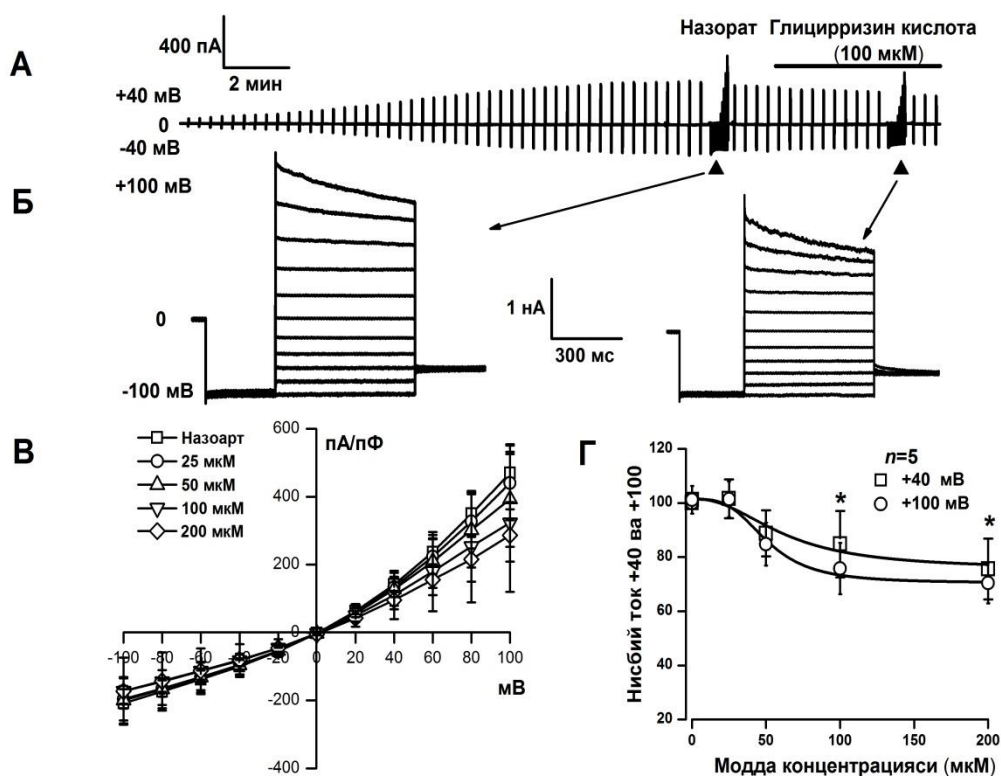


2-расм. $HM\Delta G$ -ГрДли гипоосмотик стресс шароитда тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасининг анион транспортига ГК ва унинг ҳосилаларини дозага боғлиқ таъсири. (А) глицирризин кислота; (Б) β -глициррет кислота; (В) карбеноксолон; (Г) моддаларнинг дозага-боғлиқ таъсири натижасининг Хилл тенгламасида аппроксимацияси, ярим-максимал эффект келтирувчи концентрациялар ва Хилл коэффициентлари матнда келтирилган.

Олинган натижаларни Хилл тенгласида аппроксимация қилинганда, ярим-максимал эффектлар: глицирризин кислотаси учун $C_{50}=62,7\pm 6,5$ мкМ ва $h=3,0\pm 0,7$ га, β -глициррет кислотаси учун $C_{50}=23,4\pm 3,6$ мкМ ва $h=1,6\pm 0,3$ га ҳамда карбеноксолон учун $C_{50}=40,2\pm 4,5$ мкМ ва $h=1,1\pm 0,1$ га тенг эканлиги аниқланди (2-Г расм).

Табиий глициррет кислотаси ($C_{50}=14,5\pm 2,8$ мкМ; $h=1,6\pm 0,4$) ва унинг баъзи ацил ҳосилалари валериокси- ($C_{50}=30,1\pm 2,0$ мкМ; $h=1,1\pm 0,1$) ҳамда бутироксиглициррет кислоталари ($C_{50}=31,4\pm 5,9$ мкМ; $h=0,9\pm 0,2$) НМДГ-Грдли шароитда ҳам тимоцитлар ҳажм бошқарилиш системасини блоклади.

Тадқиқотларимизнинг кейинги босқичида тажрибалар олиб бориш учун, яқинда ХБАК канали оксилларининг молекуляр идентификациялаш учун ишлатилган инсон йўғон ичак раки НСТ116 хужайра линиясидан ХБАК канали фаоллигини тўғридан-тўғри электрофизиологик баҳолашда фойдаландик. Рингер эритмаси 100 мкМ (гипоосмотик муҳитда тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилиш системасига таъсир этувчи ярим максимал миқдор 1-жадвалга қаранг) концентрацияли ГК билан алмаштирилганда плазмалемма орқали ўтаётган ток босқичма-босқич камайиб борганлигини кўриш мумкин (3-А расм).



3-расм. Гипоосмотик стресс шароитида ГКнинг НСТ116 хужайралари ҳажмга боғлиқ хлор токига таъсири. А) 0 мВ дан ± 40 мВ гача тест импульслари берилганда whole-cell конфигурациясида макроскопик токнинг ўзгариши кўрсатилган; Б) 0 мВ дан ± 100 мВ гача ҳар 20 мВ оралиқдаги тест импульслари (А планда учбурчак билан ифодаланган). В) вольт-ампер характеристикаси; Г) ГКнинг дозага боғлиқ таъсири натижасининг Хилл тенгласида аппроксимацияси, ярим-максимал концентрация ва Хилл коэффиценти матнда келтирилган.

Токнинг блокраниши потенциалга боғлиқ бўлиб, кирувчи ва чиқувчи ток бир хил даражада ингибирланмади. Ион оқими кўпроқ мусбат потенциалда камайди (3-В расм). Бундан кўринадики, ГКнинг анион каналларига таъсири тўғридан-тўғри пэтч-кламп методи ёрдамида яққол намоён бўлди. 3-Г расмда ГКнинг ХБАК каналларига дозага боғлиқ (0-200 мкМ оралиғида) таъсири келтирилган. Шунини таъкидлаш керакки, ГКнинг ХБАК фаоллигига таъсири ҳам кучли бўлмади, бу эса модданинг ушбу тизимда кучсиз ингибитор эканлигини англатади. Олинган натижалар Хилл тенгламасида аппроксимация қилинганда ярим максимал эффекти $61,9 \pm 8,8$ мкМ ва Хилл коэффициенти $2,2 \pm 0,7$ ($n=5$) га тенг бўлди (3-расм). Айтиш жоизки, пэтч-кламп усулида кузатилган ярим-максимал эффект НМДГ-Грдли шароитда кузатилган ярим-максимал концентрацияга деярли тенг бўлди, ва бу натижа иккала экспериментал шароитда ҳам айнан ХБАК фаолияти қайд этилганидан далолат беради.

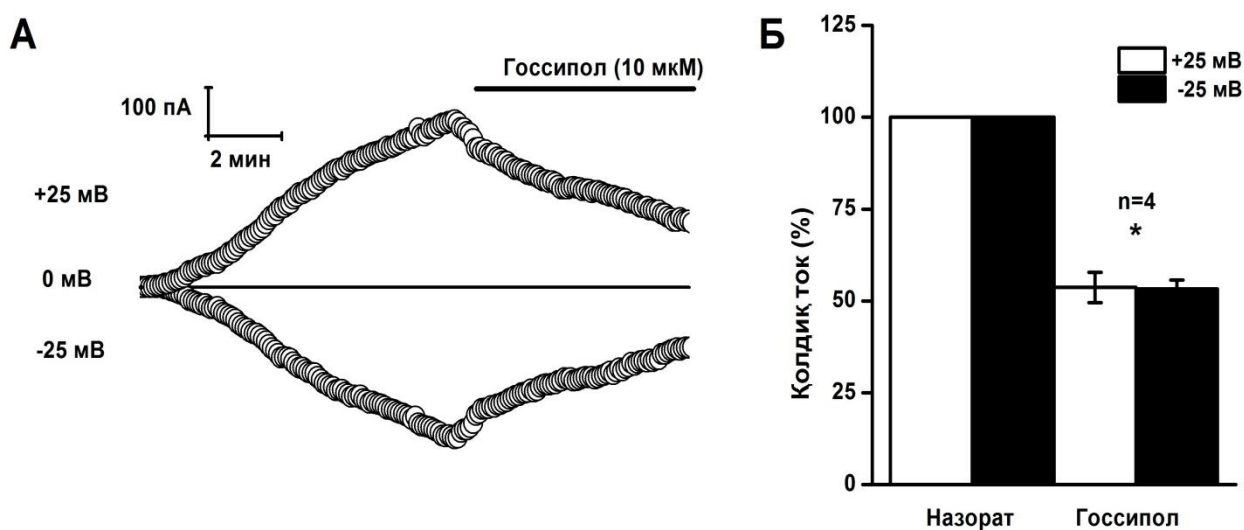
Худди шу шароитда α -глициррет кислотаси билан олиб борилган тажрибаларда модданинг ХБАК фаоллигига таъсири йўқлиги аниқланди. Лекин β -глициррет кислотаси ва карбеноксолон ХБАКни кучли блоклади. Олинган натижалар асосида глицирризин кислотаси ХБАК фаоллигига кучсиз таъсир этиши, α -глициррет кислотасининг бу тизимга таъсир этмаслиги, β -глициррет кислотаси ва карбеноксолоннинг ҳажм бошқарилиш тизимига нисбатан ингибирловчи хусусияти айнан ХБАКни блоклаш орқали амалга ошаётганлиги исботланди.

Госсипол моддаси табиий полифенол бўлиб, структура жиҳатидан икки ароматик кўш-ҳалқа кўприкча билан боғланган ва бу жиҳатдан ХБАКнинг адабиётдан маълум блокаторларидаги структура элементларини такрорлайди (Okada et al. 2019). Госсипол одам йўғон ичак раки НСТ116 хужайра линиясига таъсир эттирилганда, апоптозни келтириб чиқариши аниқланган (Zhang et al. 2007). Демак, шуларга асосланган ҳолда, биз госсипол ҳам глицирризин кислотаси ҳосилалари каби ХБАК канали фаоллигига таъсир кўрсатишини тахмин қилдик. Тадқиқотларимизнинг кейинги қисмида пэтч-кламп усулининг whole-cell конфигурациясидан фойдаланиб, табиий полифенол госсиполнинг НСТ116 хужайра линияси ХБАК фаоллигига таъсирини тадқиқ қилганимизда, плазмалемма орқали ўтаётган токни сезиларли даражада дозага боғлиқ равишда ингибирлади. Олинган натижалар Хилл тенгламасида аппроксимация қилинганда ярим максимал эффектлари мос равишда +40 мВ ҳамда -40 мВ да $4,8 \pm 0,7$ мкМ ва $5,8 \pm 0,6$ мкМ, Хилл коэффициентлари 3,2 ва 2,9 га тенг бўлди.

Худди шу шароитда каламуш тимоцитларининг ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигига госсиполнинг таъсири ўрганилди. Гипоосмотик стресс шароитида госсиполнинг тимоцит хужайралари ҳажмга боғлиқ хлор токига таъсири қуйидаги 4-расмда келтирилган.

Олинган натижаларда тимоцит хужайраларидаги таъсир НСТ116 хужайра линиясига нисбатан кучлироқ бўлди, аммо ҳажмга боғлиқ анион каналлари тўлиқ блокланмади (4-расм).

Госсипол билан олиб борилган тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, модда миқдори 10 мкМгача етганда ХБАКни маълум даражада ингибирлайди аммо, юқори концентрацияларда хужайра мембраналари барқарорлигига ҳам таъсир кўрсатди.

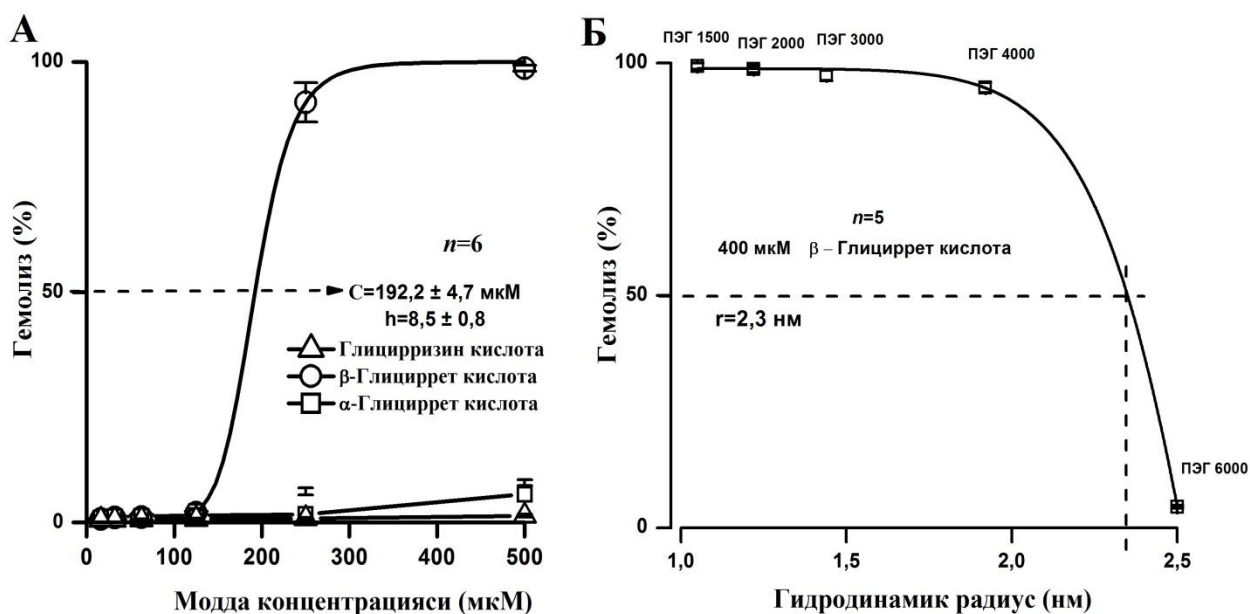


4-расм. Гипоосмотик стресс шароитида госсиполнинг тимоцит хужайралари хажмга боғлиқ хлор токига таъсири. А) 0 мВ дан ± 25 мВ гача тест импульслари берилганда whole-cell конфигурациясида макроскопик токнинг ўзгариши кўрсатилган. Б) ХБАК нинг госсипол таъсиридаги ўртача қолдиқ ток оқими кўрсатилган.

Диссертациянинг «Глицирризин ва унинг ҳосилаларини эритроцит мембраналаридаги жараёнларга ҳамда сунъий мембраналарга таъсири» деб номланган тўртинчи бобида глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини гемолиз жараёнига таъсири, кечаётган гемолиз жараёнини механизмини аниқлашга доир ҳамда сунъий қўшқават липид мембраналарга табиий ГК ва унинг агликонини таъсири бўйича тадқиқот натижалари келтирилган.

Глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини мембранатроп фаоллигини аниқлаш мақсадида моддаларнинг 1 мкМ дан 500 мкМ гача концентрацияда *in vitro* усулида изоосмотик шароитда одам қизил қон хужайраларидан гемоглобин чиқишига таъсири таҳлил қилинди. Бунда фақат β -глициррет кислотаси мўътадил гемолитик хусусиятни номоён этди (5-А расм).

Тадқиқотларимиз кейинги босқичи β -ГЛК таъсирида кечаётган гемолиз жараёнининг механизмини аниқлашга бағишланди. Бунда 100% гемолиз берувчи концентрацияда олинган β -ГЛК (400 мкМ) таъсиридаги гемолиз жараёнининг коллоид-осмотик механизмини кўрсатиш учун молекуляр оғирлиги 1500 Да дан 6000 Да гача бўлган полиэтилэнгликол (ПЭГ) ларнинг куйидаги концентрацияси ишлатилди ПЭГ 1500 (25 мМ); ПЭГ 2000 (25 мМ); ПЭГ 3000 (20 мМ); ПЭГ 4000 (15 мМ); ПЭГ 6000 (12 мМ). β -глициррет кислотаси таъсирида кечувчи гемолиз жараёни эритроцит мембарансида радиуси 2,3 нм бўлган поралар ҳосил этилиб, коллоид-осмотик механизм асосида содир бўлиши аниқланди (5-Б расм).

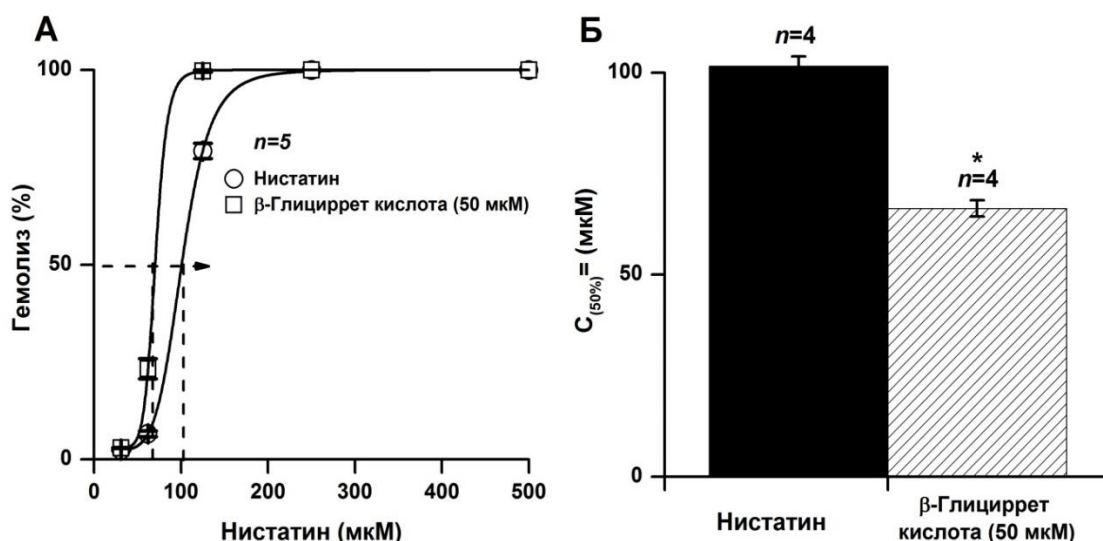


5-расм. Глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларини эритроцит хужайраларининг стационар лизисига таъсири (А). Гемолиз жараёнининг ПЭГларнинг гидродинамик радиусига боғлиқлиги (Б). Ордината ўқида – гемолиз даражаси % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – ГЛК, α-, ва β-ГЛК ларнинг миқдори мкМларда (А) ва гидродинамик радиуси нмда (Б) ифодаланган. n – тажрибалар сони.

Табиий глициррет кислотаси (ГЛК) ва унинг баъзи сукцинил ва ацил ҳосилаларини гемолиз жараёнига таъсирини текширганимизда фақат табиий ГЛК гемолитик эканлиги аниқланди. Сукцинил ва ацил қолдиқларининг кўшилиши ГЛКнинг гемолитик фаоллиги йўқолишига сабаб бўлди.

Эритроцитларнинг осмотик стрессга чидамлилигига β-глициррет кислотасининг таъсирини аниқлашга доир олиб борилган тажрибаларда хужайра ташқарисидаги осмотик босим пасайиши билан хужайраларда гемолиз даражаси аста секин ортиб бориши кузатилди. Инкубацион муҳитга сублитик миқдорда (50 мкМ) β-глициррет кислотаси қўшилганда, эритроцитларнинг осмотик резистентликга нисбатан чидамлилиги сезиларли даражада камайганлиги кузатилди. Бунда β-глициррет кислотаси эритроцитларнинг осмотик чидамлилигини пасайтириши, модданинг эритроцит мембраналарида ҳажмга боғлиқ анион каналлари фаоллигини ингибирловчи таъсири билан тушунтириш мумкин.

Кейинги тажрибаларимизда β-глициррет кислотасининг қон хужайраларининг полиен антибиотици нистатин моддаси таъсиридаги коллоид-осмотик лизисга чидамлилигига таъсири ўрганилди. Нистатиннинг турли концентрацияларда гемолиз даражасини аниқлаб, доза-жавоб эгри чизиғини чиздик ва Хилл тенгламасида аппроксимация қилиб, 50% ли гемолизга олиб келувчи полиеннинг самарали концентрациясини аниқладик. Инкубацион муҳитга сублитик миқдорда (50 мкМ) β-глициррет кислотаси қўшилгандан кейин ҳам олинган натижалар Хилл тенгламаси асосида аппроксимация қилинди, лекин уларнинг самарали концентрацияси (C_{50}) назоратдан фарқ қилди (6-А ва Б расм).



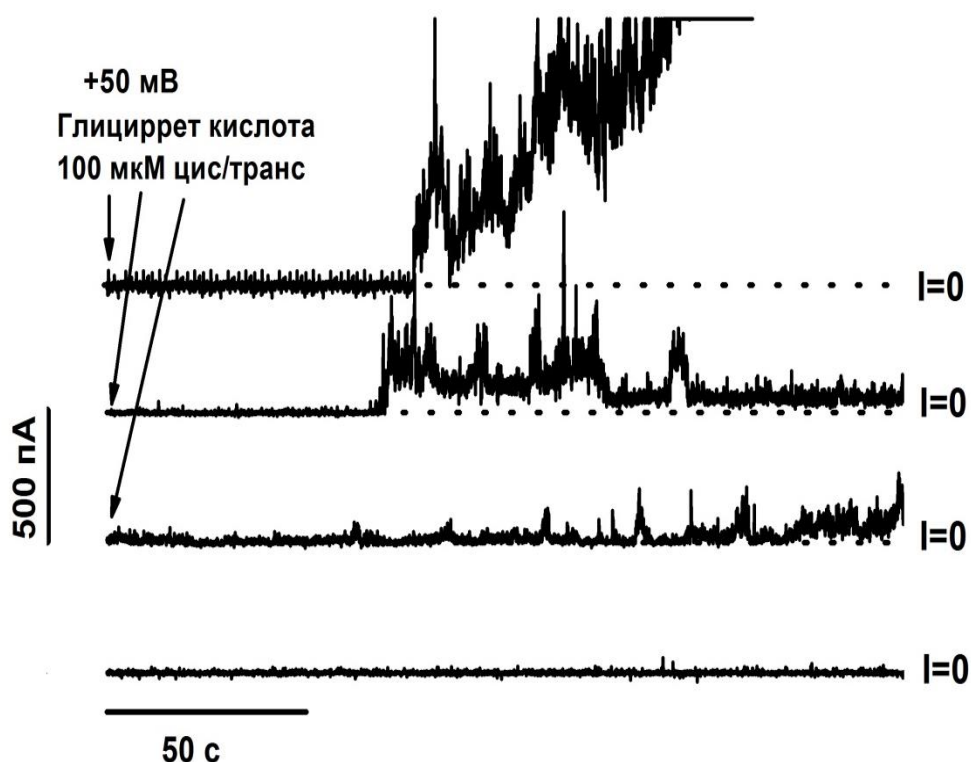
6-расм. Одам эритроцитларида 50% гемолизга олиб келувчи нистатин концентрациясига (C_{50}) муҳитдаги β-глициррет кислотасининг таъсири. Статистик аҳамиятли фарқ (*) белгиси билан кўрсатилган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$. n – тажрибалар сони.

Олинган натижалардан кўришиб турибдики, эритроцитларнинг нистатинли коллоид-осмотик лизисга нисбатан чидамлилиги β-глициррет кислотаси таъсирида пасайган, чунки 50% ли гемолизга олиб келиш учун нистатиннинг нисбатан камроқ миқдори сарфланган. Бундай таъсир эритроцитларда модданинг ҳужайра ҳажм бошқариш системаси ва ҲБАКни блоклаши билан боғлиқ бўлиши мумкин.

Эритроцит ва тимоцит ҳужайраларига табиий ГК ва унинг агликони ГЛК таъсири текширилганда юқори концентрацияларда мембраналарда пора ҳосил қилиши мумкинлиги тахмин қилинди. Моддаларнинг пора ҳосил қилиш хусусиятини батафсил ўрганиш мақсадида табиий ГК ва унинг агликони ГЛКларни сунъий қўшқават липид мембраналар (БЛМ)га таъсирини ўргандик.

Азолектинни ва баъзи тажрибаларда азоектин-холестерин аралашмасини октанда эритиб липид тайёрланди. Назорат сифатида ҳосил қилинган мембрана сиғими 150 пФ га тенг бўлди. Муҳитга табиий глицирризин кислотасининг 100 мкМ гача бўлган миқдори цис ва цис/транс ҳолатларда таъсир эттирилганда олинган натижалар назоратдан фарқ қилмади.

Глициррет кислотаси 1, 10 мкМ цис, цис/транс ва 100 мкМ цис ҳолатда глицирризин кислотаси сингари БЛМ электр ўтказувчанлигига таъсир этмади. 100 мкМ цис/транс ҳолатда БЛМ электр ўтказувчанлигини оширди. БЛМ дан ўтувчи ток силлиқ эмас балки флукуацион кўринишда бўлганлиги мембранада ион каналлари ҳосил бўлганлигидан далолат беради (7-расм).



7-расм. Глициррет кислотасининг БЛМга таъсири. Абсцисса ўқида ўтувчи ток пА ифодаланган. Ордината ўқида вақт (сек) келтирилган.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлар ҳажм бошқарилишига глицирризин кислотаси (ГК) кучсиз, лекин унинг β -агликони кучли ингибирловчи таъсирга эгаллиги аниқланди. Мазкур хусусият глициррет кислотаси (ГлК) ҳосилаларида кучайди ва самаралилиги жиҳатидан моддалар қуйидаги қаторни ташкил этди: валериокси-ГлК > табиий агликон > карбеноксолон > β -ГлК > бутирокси-ГлК >> α -ГлК.

2. Тимоцитлар ҳажм бошқарилиши фақат анион транспорти фаоллигига боғлиқ «НМДГ-ГрД» экспериментал шароитида моддаларнинг таъсири β -ГлК, табиий агликон ва карбеноксолон бу жараёни тўлиқ, ГК, бутирокси- ва валериокси-ГлКлар эса қисман блоклаши билан изохланади.

3. Биринчи бор пэтч-кламп усулида одам йўғон ичак раки (НСТ116) хужайраларидаги ҳажмга боғлиқ анион канали (ХБАК) фаоллигини ГК қисман ва кучсиз, β -ГлК ($C_{50}=18,4\pm 0,5$ мкМ) ва карбеноксолон ($C_{50}=28,6\pm 2,5$ мкМ) эса кучли ва тўлиқ блоклаши аниқланди; α -ГлК ХБАКга таъсир кўрсатмади.

4. Илк бор пэтч-кламп усулида табиий полифенол госсиполнинг НСТ116 хужайраларидаги ХБАК фаоллигини потенциалга боғлиқ бўлмаган равишда самарали (+40 мВда $C_{50}=4,8\pm 0,7$ мкМ ва -40 мВда $5,8\pm 0,6$ мкМ) блоклаши аниқланди. Мазкур эффект тимоцит хужайраларида ҳам кузатилди.

5. ГК ва унинг ўрганилган ҳосилаларидан фақат β -ГлК изоосмотик шароитда одам эритроцитларига нисбатан мўътадил ($C_{50}=192,2\pm 4,7$ мкМ) гемолитик фаолликка эга бўлиб, мембранада 2,3 нм радиусли поралар ҳосил қилиши ва ҳужайраларни коллоид-осмотик механизм билан парчалаши аниқланди. Сублитик дозада β -ГлК эритроцитларнинг осмотик ва коллоид-осмотик стрессга нисбатан чидамлилигини пасайтиради.

6. ГК сунъий қўшқават липид мембраналарга таъсир этмайди, унинг агликони (ГлК) эса каналлар ҳосил қилади.

**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

ФАЙЗИЕВ ДИЁР ДАВРОНОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЛИЦИРРИЗИНА И ЕГО
ПРОИЗВОДНЫХ НА РЕГУЛЯЦИЮ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЁМА И
АНИОННЫЙ ТРАНСПОРТ**

03.00.02 – Биофизика и радиобиология

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

Ташкент – 2021

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2019.2.PhD/B297.

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

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

Научный руководитель: Курбанназарова Раънохон Шараповна
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: Хушматов Шунқор Садуллаевич
доктор биологических наук

Камбурова Венера Сейтумеровна
кандидат биологических наук


Ведущая организация: Каршинский государственный университет


Защита диссертации состоится « 03 » 02 2021 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Научного Совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 по присуждению ученых степеней при Институте биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана. (Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел. 246-68-96.

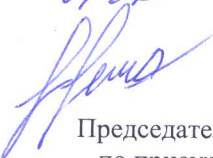
С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института Биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана (зарегистрированной за № 23). Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел: (99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru; asrarov54@mail.ru

Автореферат диссертации разослан: « 15 » 01 2021 года.
(реестр протокола рассылки № « 1 » от 15.01 2021 года).




Сабиоров Равшан Заирович
Заместитель председателя Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., академик


Позилев Маъмуржон Комилжонович
Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н.


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

ВВЕДЕНИЕ (Аннотации диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. Проводимые в настоящее время по всему миру многочисленные исследования показывают, что объем-зависимые анионные каналы принимают участие в ряде физиологических процессов (регуляции объема клеток, пролиферация, миграция, инвазия, апоптоз), а также в патофизиологических процессах (канцерогенезе и устойчивости раковых клеток к цисплатину, смерти кардиомиоцитов и нейронов гиппокампа в результате ишемии/реперфузии, глиальном некрозе при лактоцидозе, эксайтотоксической гибели нейронов). Кроме того, объем-зависимые анионные каналы являются основным путем выхода глутамата из астроцитов в условиях ишемии и при стимуляции брадикинином – основным медиатором воспаления. Повышение или снижение активности объем-зависимых анионных каналов приводит к нарушению перечисленных выше жизненно важных процессов. Исходя из этого можно заключить, что поиск селективных блокаторов объемно-зависимых анионных каналов и мембранных транспортеров имеет большое научное и практическое значение для изучения молекулярной основы этих процессов и разработки новых перспективных фармакологических средств.

В ведущих научных центрах мира проводятся интенсивные научные исследования широкого спектра биологических и фармакологических свойств глицирризиновой кислоты и ее производных. Установлено, что глицирризиновая кислота обладает противовоспалительными, противовирусными, противораковыми, антиоксидантными, иммуномодулирующими, защитными для печени и сердечно-сосудистой системы свойствами. В исследованиях настоящего времени требуется установить мембранотропную активность глицирризиновой кислоты и ее производных и определить механизмы их влияния на ионные каналы, участвующие в системе регуляции объема клетки, особенно анионные каналы.

В нашей стране в настоящее время также проводятся фундаментальные и инновационные исследования по поиску новых эффективных и малотоксических модуляторов ионных каналов, а также механизмов их действия. В «Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» подчеркивается «...стимулирование научно-исследовательской и инновационной деятельности, создание эффективных механизмов внедрения научных и инновационных достижений в практику»². Исходя из этих задач, большое научное и практическое значение приобретает определение механизма действия природных биологически активных соединений, выделенных из местных растений, на систему регуляции клеточного объема и создание на их основе новых фармакологических препаратов.

² Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан». № УП-4947.

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 14 февраля 2018 г № ПП-3532 «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли» и Постановлении Президента Республики Узбекистан от 6 мая 2019 г № ПП-4310 «О мерах по дальнейшему развитию системы медицинского и фармацевтического образования и науки», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

Степень изученности проблемы. В настоящее время в ведущих исследовательских центрах мира учеными проводится множество исследований по характеристике роли объем-зависимых анионных каналов в нормальных и патофизиологических условиях (Akita et al., 2014; Okada et al. 2019). Кроме того, осуществлен ряд исследований влияния глицирризиновой кислоты и ее производных на различные биологические процессы и ионные каналы. В частности сообщалось, что гемисукцинильное производное глицирретовой кислоты – карбеноксолон блокирует объем-зависимые анионные каналы в клетках астроцитов (Benfenati et al. 2009). Частичное ингибирование глицирризиновой кислотой водных каналов в почках приводило к нормализации их функции (Kang et al. 2003). Моноаммониевая соль глицирризиновой кислоты дозозависимо блокировала поток ионов кальция через Ca^{2+} -каналы L-типа в миоцитах желудочков крыс (Zhao et al. 2020). Изучение влияния α - и β -глицирретовой кислоты на каналы K_v 1.3 в T-клетках Jurkat не выявило эффекта α -глицирретовой кислоты, в то время как β -глицирретовая кислота потенциал-зависимо блокировала эти каналы (Fu et al. 2013).

В странах СНГ, О.Ю. Селютина (2017) и другие ученые установили положительное влияние глицирризиновой кислоты на стабильность мембран эритроцитов. О.Ю. Глущенко, Н. Поляков, Т. Лешина (2011) обнаружили, что комплекс глицирризиновой кислоты с холестерином проявляет активность против атеросклероза. Однако, несмотря на достигнутый значительный прогресс, ряд вопросов, связанных с действием глицирризина и его производных на регуляцию объема клеток и активность объем-зависимых анионных каналов остается нерешенным.

Биофизические и фармакологические исследования ионных каналов в нашей Республике проводятся под руководством академиков Б.А. Ташмухамедова и Р.З. Сабирова, профессоров У.З. Мирходжаева, П.Б. Усманова, М.И. Асрарова. Учеными этой научной школы изучаются механизмы влияния различных биологически активных веществ, выделенных

из природных источников, на процессы транспорта кальция в сердечной и гладкой мускулатуре, на функцию мегапор и калиевых каналов в митохондриях и на систему регуляции объема клеток.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментальных проектов Института биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана ФА-А11-Т060 «Поиск новых модуляторов регуляции клеточного объема и объем-зависимых анионных каналов как перспективных иммуномодуляторов и противоопухолевых препаратов» (2015-2017), ПЗ-2017-0920-49 «Разработка новых перспективных субстанций на основе растительных экстрактов и их компонентов из местного сырья – модуляторов регуляции клеточного объема и объем-зависимого мембранного транспорта» (2018-2020) и ФА-Ф5-014 «Исследование биофизического фенотипа объем-зависимых анионных каналов и их функций в механизме регуляции клеточного объема» (2017-2020).

Целью исследования является определение влияния глицирризина и его производных на регуляцию объема клеток и на активность объем-зависимых анионных каналов.

Задачи исследования:

изучение дозозависимого действия глицирризина и его производных: агликона – глицирретовой кислоты (ГлК), ее α - и β -изомеров, валериокси-ГлК, бутироксиглуконата-ГлК и гемисукцинил-ГлК (карбеносукцинил-ГлК) на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе, определение связи между ингибирующим действием этих веществ и системой транспорта анионов;

изучение влияния глицирризина и его производных на активность объем-зависимых анионных каналов плазмалеммы клеток рака толстой кишки человека (НСТ116);

изучение влияния природного полифенола госсипола на активность объем-зависимых анионных каналов в клетках НСТ116 и тимоцитах;

изучение влияния глицирризина и его производных на выход гемоглобина из эритроцитов человека в изоосмотических условиях;

изучение влияния глицирризиновой кислоты и ее агликона на искусственную бислойную липидную мембрану.

Объектом исследования являлись тимоциты, выделенные из беспородных белых крыс 6-8 недельного возраста, красные кровяные клетки человека, культура клеток рака толстой кишки человека (линия НСТ116), тритерпеноиды и полифенолы.

Предметом исследования является исследование влияния глицирризина и его производных на регуляцию объема тимоцитов крыс в условиях гипоосмотического стресса, объем-зависимые анионные каналы клеток линии НСТ116, эритроциты человека и искусственные мембраны, а

также влияние природного полифенола госсипола на объем-зависимые анионные каналы и клетки тимоцитов.

Методы исследования. В экспериментах использовались современные биофизические, биохимические и электрофизиологические методы. Тимоциты крыс и эритроциты человека выделялись с помощью стандартных методов, изменение объема тимоцитов определялось методом регистрации светопропускания клеточной суспензии. Уровень гемолиза измерялся по выходу гемоглобина из эритроцитов. Биофизические параметры объем-зависимых анионных каналов регистрировали с помощью метода микролокального отведения ионных токов (пэтч-кламп), математическая и статистическая обработка данных была проведена с помощью компьютерной программы Origin версий 5 и 8.6 (OriginLab, Northampton, MA, США).

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

установлено влияние глицирризина и его производных на регуляцию объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса, среди них выявлены вещества с сильным ингибирующим действием;

неэлектрическим и прямым электрофизиологическим методом пэтч-кламп доказано, что механизм действия глицирризина и его производных, а также госсипола на регуляцию объема клеток обусловлен блокадой объем-зависимых анионных каналов;

определено влияние глицирризина и его производных на выход гемоглобина из клеток эритроцитов человека в изоосмотических условиях и обнаружено, что β -глицирретовая кислота обладает умеренным гемолитическим действием, доказано, что гемолиз под действием β -глицирретовой кислоты происходит по коллоидно-осмотическому механизму вследствие образования пор в мембране;

установлено, что глицирретовая кислота образует ионные каналы, и в результате увеличивает электрическую проводимость искусственных мембран.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

среди производных глицирризина обнаружены новые перспективные вещества, ингибирующие систему регуляции объема тимоцитов;

доказано, что β -глицирретовая кислота и ее производные являются сильными ингибиторами объем-зависимых анионных каналов, активность которых резко возрастает в раковых клетках;

доказано, что глицирризин и его производные обладают низкой цитотоксичностью в изоосмотических условиях.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что результаты получены с применением современных биофизических, биохимических и электрофизиологических методов исследований, анализы результатов были выполнены с использованием современных компьютерных программ, достоверность результатов основывается на их обсуждении на

республиканских и международных конференциях и публикацией результатов исследований в рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость полученных результатов заключается в том, что было исследовано влияние глицирризина и его производных на систему регуляции клеточного объема тимоцитов, и определен механизм их действия.

Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что при профилактике и лечении заболеваний, связанных с ионными каналами и клеточной патологией иммунной системы, глицирризин и его производные могут быть использованы как перспективные активные иммуномодуляторы нового поколения.

Внедрение результатов исследования. На основании научных результатов, полученных при исследовании влияния глицирризина и его производных на регуляцию объема клеток и транспорт анионов:

результаты, полученные при изучении влияния глицирризина и его производных на регуляцию объема клеток и транспорт анионов, были использованы в прикладном проекте А-11-10 «Разработка и производство препаратов против митохондриальных заболеваний» для описания антиоксидантного действия супрамолекулярных соединений глицирризиновой кислоты в митохондриях печени крыс (справка Министерства высшего и среднего специального образования Республики Узбекистан № 89-03-4300 от 30 октября 2020 года). Результаты позволили выявить новые биологически активные вещества в качестве основы для лечения митохондриальных заболеваний;

результаты по влиянию глицирризина и его производных, выделенных из растения солодки (*Glycyrrhiza glabra*) на регуляцию объема клеток и их ингибирующему действию на транспорт анионов были использованы в фундаментальном проекте ФПФИ Т.2-18 «Биологическая активность новых производных некоторых природных тритерпеновых кислот, содержащих остатки 2-алкил(арил)-5-амино-1,3,4-тиадиазола» для выяснения биологических эффектов некоторых природных производных тритерпеновой кислоты (справка Академии наук Республики Узбекистан № 4/1255-1422 от 8 июля 2020 года). Результаты позволили охарактеризовать мембрано-активные свойства некоторых производных природных тритерпеновых кислот.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 5 международных и 7 республиканских научных конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 17 печатных работ, из них 5 научных статей, в том числе 4 в республиканских и 1 в зарубежном журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка использованной литературы. Объем диссертации (с оглавления, списка условных обозначений и списка литературы) составляет 117 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

В первой главе диссертации **«Общая характеристика глицирризиновой кислоты и ее производных»** анализируются общие свойства солодки и ее биологически активных компонентов: структура, классификация и физико-химические свойства, биологическая активность глицирризиновой кислоты и ее производных, биологически активные свойства природного полифенола госсипола, информация о механизме регуляции клеточного объема, роли системы регуляции клеточного объема в физиологических и патофизиологических процессах, фармакологии системы регуляция клеточного объема и объем-зависимых анионных каналах.

Вторая глава диссертации, озаглавленная **«Описание материалов и методов, используемых для определения регуляции объема клеток и активности объем-зависимых анионных каналов»** дано описание веществ и растворов, использованных в исследовании, подробно описаны стандартные методы выделения тимоцитов из крыс, и эритроцитов человека из крови здоровых добровольцев, оптические и электрофизиологические методы, такие как метод регистрации клеточного объема по величине светопропускания, метод микролокального отведения ионных токов – пэтч-кламп, определение уровня гемолиза и метод получения искусственных бислойных липидных мембран (БЛМ), а также методы математической обработки и статистического анализа полученных результатов.

В третьей главе диссертации, озаглавленной **«Влияние глицирризина и его производных на регуляцию объема тимоцитов и объем-зависимые анионные каналы линии клеток НСТ116»** изложены результаты исследования дозозависимых эффектов глицирризиновой кислоты (ГК) и ее производных на систему регуляции объема клеток при гипоосмотическом стрессе, связи ингибирующего эффекта на регуляцию объема тимоцитов с системой транспорта анионов, влиянию на активность объем-зависимого анионного канала (ОЗАК) клеточной линии НСТ116. Также представлены

результаты исследования влияния природного полифенола госсипола на активность ОЗАК линии клеток НСТ116 и тимоцитов.

В первоначальных исследованиях в изотонической среде (нормальный раствор Рингера) объем тимоцитов оставался на постоянном уровне в течение 15 мин (рис. 1). При попадании в гипоосмотическую среду тимоциты сначала быстро набухали (пассивный ответ) и затем восстанавливали свой объем до уровня, близкого к исходному (активный ответ) (рис. 1). Этот процесс называется регуляторным уменьшением объема (*RVD – Regulatory Volume Decrease*). После 15-минутной инкубации клеток в гипоосмотической среде в контроле регуляторное уменьшение объема варьировало от 68% до 84%, и в среднем было равно $78,9 \pm 3,3\%$ ($n=15$, рис. 1).

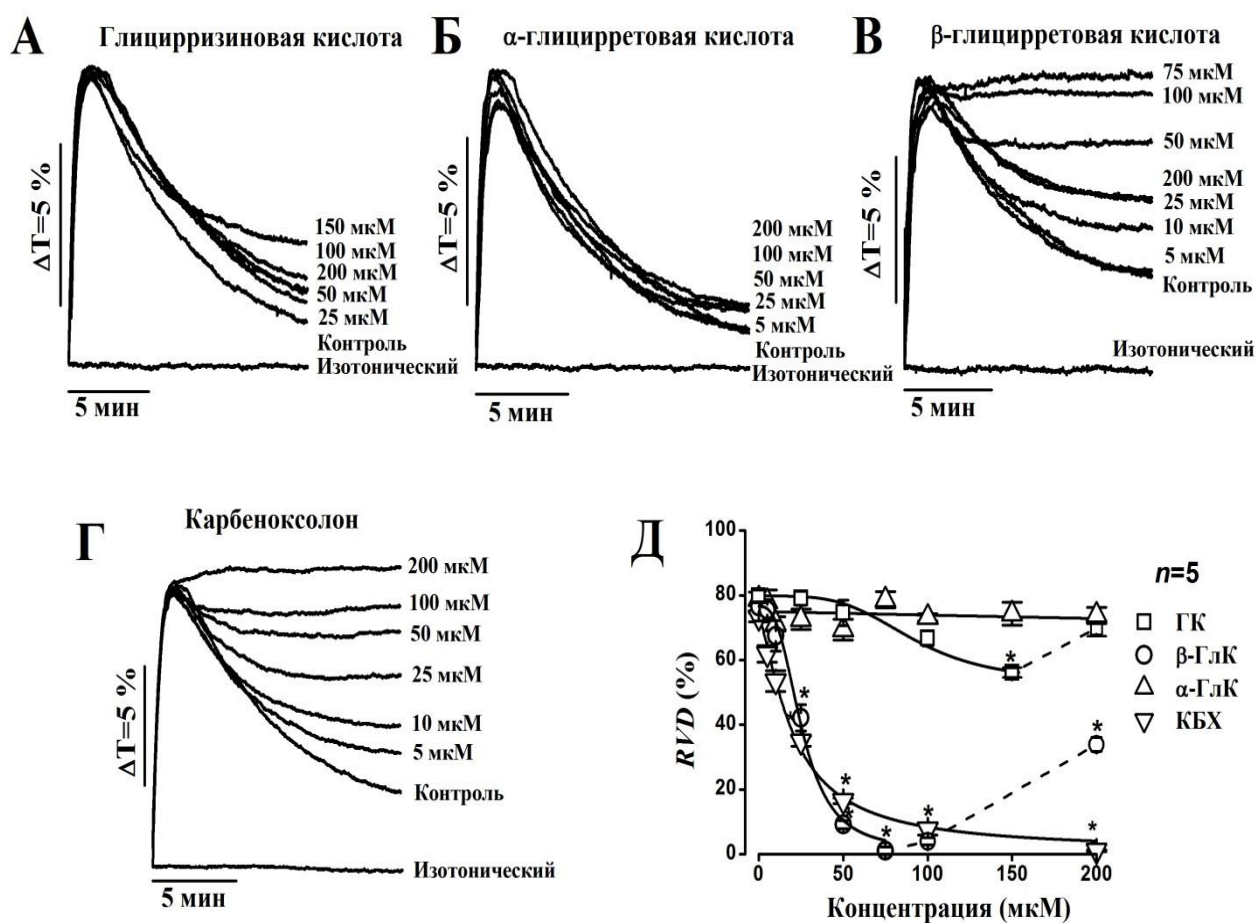


Рисунок 1. Дозозависимые эффекты ГК и его производных на регуляцию объема тимоцитов крыс в условиях гипоосмотического стресса. (А) глицирризиновая кислота; (Б) α-глицирретовая кислота; (В) β-глицирретовая кислота; (Г) карбеноксолон; (Д) аппроксимация результатов уравнением Хилла; концентрации полумаксимального эффекта и коэффициенты Хилла приведены в таблице 1.

При изучении дозозависимого эффекта глицирризиновой кислоты и ее производных на регуляцию клеточного объема тимоцитов были получены следующие результаты. Глицирризиновая кислота проявляла слабое ингибирующее действие по отношению к этой системе (рис. 1-А и Д). Эффекта α-глицирретовой кислоты не было обнаружено (рис. 1-Б и Д), тогда

как β -глицирретовая кислота полностью блокировала процесс *RVD* (рис. 1-В и Д). Гемисукцинильное производное глицирретовой кислоты – карбенексолон также сильно и дозозависимо ингибировал *RVD* (рис. 3-Г и Д).

Следует отметить, что в вышеописанных экспериментах мы использовали вещества, приобретенные в фирме Sigma. В дальнейших опытах были использованы природная глицирризиновая кислота, выделенная из солодки сотрудниками лаборатории «Низкомолекулярные биологически активные соединения» Института биоорганической химии АН РУз, и ее валериокси- и бутирокси-производные. При этом все соединения оказывали сильное дозозависимое ингибирующее действие на систему регуляции объема тимоцитов. Полученные результаты были аппроксимированы уравнением Хилла и определены концентрации, оказывающие полумаксимальные эффекты (таблица 1).

Таблица 1

Величины концентраций ГК и его производных, оказывающих полумаксимальный эффект на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе, определенные по соответствующим концентрационным зависимостям (C_{50}), и коэффициенты Хилла (h)

№	Тритерпеноидлар	C_{50} (мкМ)	h
1	Глицирризиновая кислота	104,8±4,8	10,5±8,1
2	α-глицирретовая кислота	-	-
3	β-глицирретовая кислота	26,6±1,2	3,1±0,4
4	Природная глицирретовая кислота	9,1±0,3	1,9±0,1
5	Карбенексолон	23,5±1,5	1,1±0,1
6	Валериоксиглицирретовая кислота	8,9±1,8	0,7±0,1
7	Бутироксиглицирретовая кислота	29,7±4,5	1,1±0,1

В литературе имеются данные об участии Ca^{2+} , K^+ , Cl^- каналов и котранспорта K^+/Cl^- в механизме регуляции объема тимоцитов. Ингибирующее действие ГК и его производных может быть связано с модуляцией любого из этих компонентов. Поэтому мы провели эксперименты, в которых одновалентные катионы в гипотоническом растворе были замещены на органический катион Н-метил-Д-глюкамин ($HMДГ^+$), а катионная проницаемость мембраны тимоцитов была увеличена с помощью грамицидина Д ($ГрД$).

Когда тимоциты помещали в гипотонический раствор Рингера с ГрД и НМДГ (эти условия мы далее будем обозначать как «НМДГ-ГрД»), они сначала набухали, а затем восстанавливали свой объем даже более эффективно, чем в гипотоническом растворе Рингера с натрием, с параметром $RVD=108,7\pm6,6\%$ ($n=5$, рис. 2). В условиях НМДГ-ГрД регуляция клеточного объема в основном зависит активности анионного транспорта (Rustamova et al. 2019).

В этих экспериментальных условиях ГК слабо ингибировала систему регуляция объемом тимоцитов (рис. 2-А и Г). β -глицирретовая кислота и карбеноксолон сильно блокировали эту систему (рис. 2-Б, В и Г). Полумаксимальные эффекты были равны: для глицирризиновой кислоты $C_{50}=62,7\pm6,5$ мкМ и $h=3,0\pm0,7$, для β -глицирретовой кислоты $C_{50}=23,4\pm3,6$ мкМ и $h=1,6\pm0,3$, а также для карбеноксолона $C_{50}=40,2\pm4,5$ мкМ, а $h=1,1\pm0,1$ (рис. 2-Г).

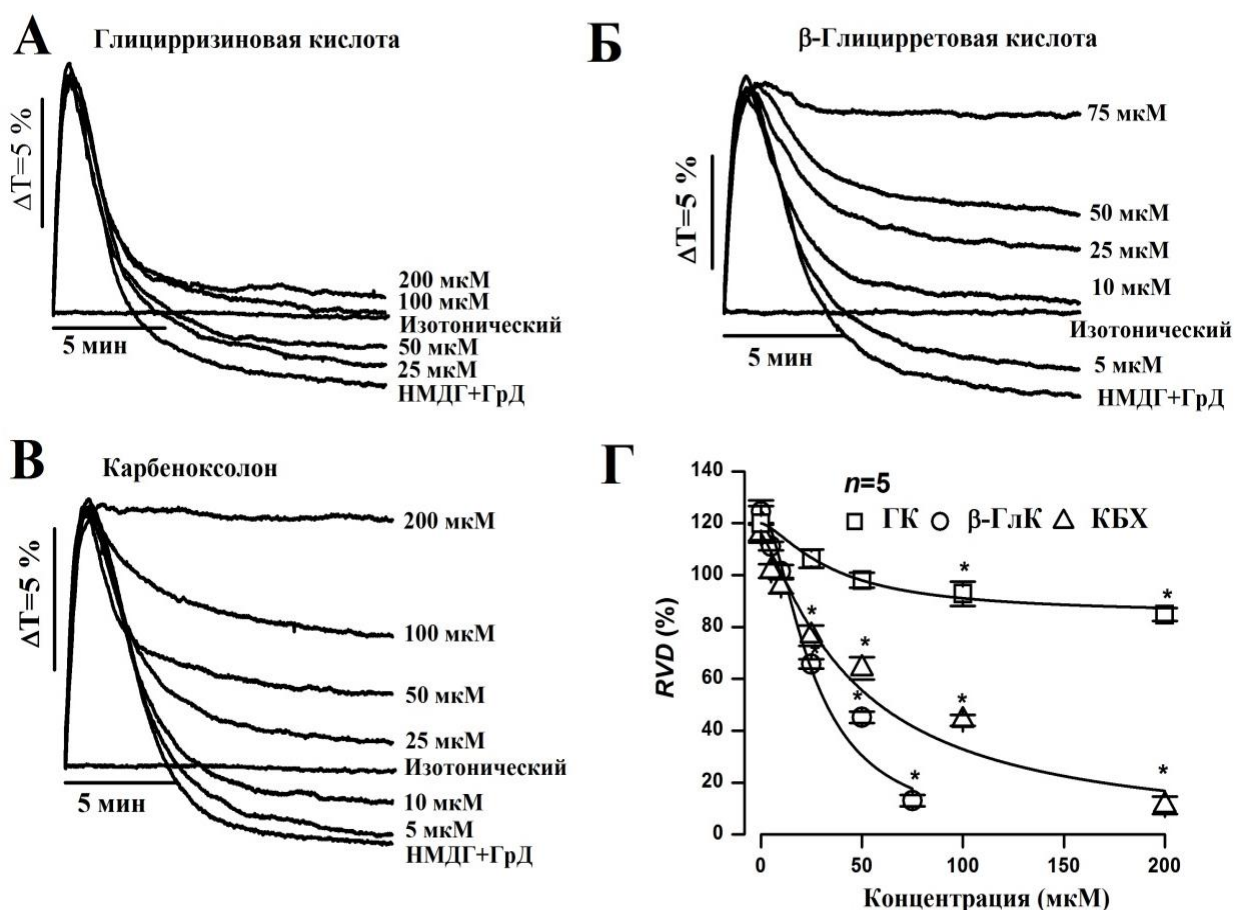


Рисунок 2. Дозозависимые эффекты ГК и его производных на систему анионного транспорта тимоцитов при гипоосмотическом стрессе в условиях НМДГ-ГрД. (А) глицирризиновая кислота; (Б) β -глицирретовая кислота; (В) карбеноксолон; (Г) аппроксимация результатов уравнением Хилла; концентрации полумаксимального эффекта и коэффициенты Хилла приведены в тексте.

Природная глицирретовая кислота ($C_{50}=14,5\pm2,8$ мкМ; $h=1,6\pm0,4$), ее ацильное производное валерокси- ($C_{50}=30,1\pm2,0$ мкМ; $h=1,1\pm0,1$) и

бутироксиглицирретовая кислота ($C_{50}=31,4\pm 5,9$ мкМ; $h=0,9\pm 0,2$) блокировали систему регуляция объема тимоцитов также и в условиях НМДГ-ГрД.

На следующем этапе нашего исследования мы использовали прямое электрофизиологическое определение активности канала ОЗАК в клетках рака толстого кишечника человека линии НСТ116, которая недавно была использована для молекулярной идентификации белков канала ОЗАК. Когда в раствор Рингера была добавлена ГК в концентрации 100 мкМ (концентрация полумаксимального эффекта, см. таблицу 1), можно видеть, что ток, протекающий через плазмалемму, постепенно уменьшается (рис 3-А). Блокировка была потенциал-зависимой, так как входящие и выходящие токи не подавлялись одинаково, и эффект был сильнее при положительном потенциале (рис. 3-В).

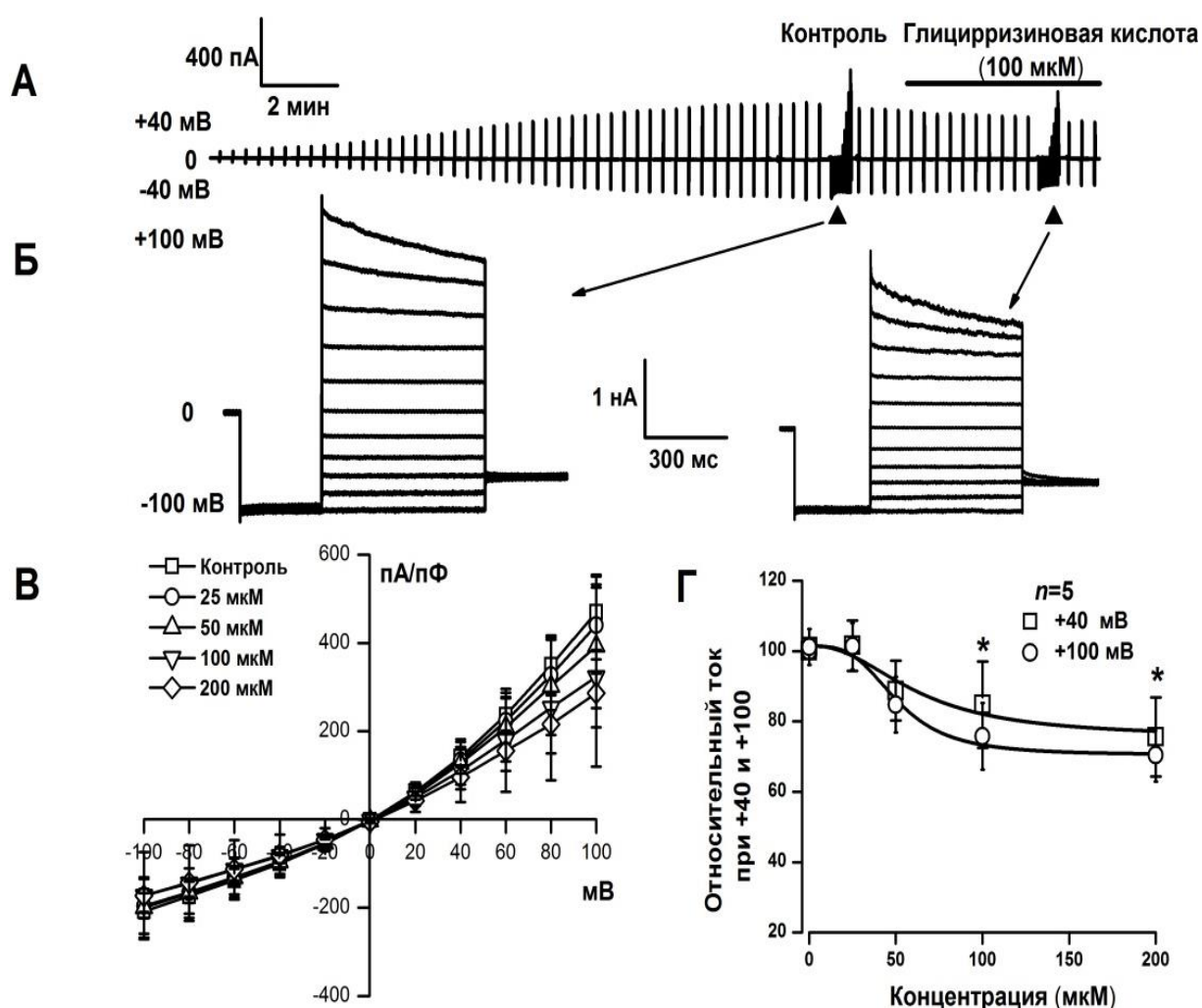


Рисунок 3. Влияние ГК на объем-зависимый хлорный ток в клетках НСТ116 при гипоосмотическом стрессе. А) изменение макроскопического тока в конфигурации whole-cell при подаче тестовых импульсов ± 40 мВ; Б) токовые ответы на подачу тестовых импульсов от 0 мВ до ± 100 мВ с инкрементом 20 мВ (моменты подачи отмечены треугольниками на панели А); В) вольт-амперная характеристика; Г) аппроксимация результатов дозозависимого действия ГК уравнением Хилла, полумаксимальная концентрация икоэффициент Хилла приведены в тексте.

Таким образом, ингибирующее влияние ГК на анионные каналы было наглядно продемонстрировано с помощью прямого метода пэтч-клампа. На рис. 3-Г показано дозозависимое (в диапазоне 0–200 мкМ) действие ГК на каналы ОЗАК. Следует отметить, что ГК является слабым ингибитором в этой системе. Когда результаты были аппроксимированы уравнением Хилла, полумаксимальный эффект составил $61,9 \pm 8,8$ мкМ, а коэффициент Хилла $2,2 \pm 0,7$ ($n=5$, рис. 3).

Следует отметить, что полумаксимальный эффект, наблюдаемый в методе пэтч-клампа, был практически равен полумаксимальной концентрации, наблюдаемой в условиях НМДГ-ГрД, и этот результат указывает на то, что именно изменение активности ОЗАК было зарегистрировано в обоих экспериментальных условиях.

В экспериментах с α -глицирретовой кислотой в тех же условиях было обнаружено, что это вещество не влияло на активность ОЗАК. Однако β -глицирретовая кислота и карбенноксолон сильно блокировали ОЗАК. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что глицирризиновая кислота слабо влияет на активность ОЗАК, α -глицирретовая кислота не влияет на эту систему, ингибирующие свойства β -глицирретовой кислоты и карбенноксолона в отношении системы регуляции объема реализуются за счет блокирования ОЗАК.

Природный полифенол госсипол в структурном отношении представляет собой два двухкольцевых ароматических фрагмента, связанных между собой углеродным мостиком, и в этом отношении он воспроизводит структурные детерминанты других известных блокаторов ОЗАК (Okada et al. 2019). Ранее было обнаружено, что госсипол вызывает апоптоз использованных в наших экспериментах клеток линии НСТ116 (Zhang et al. 2007). На этом основании мы предположили, что госсипол может влиять на активность канала ОЗАК таким же образом, как и производные глицирризиновой кислоты.

В следующей части нашего исследования, когда мы исследовали влияние природного полифенола госсипола на активность ОЗАК клеточной линии НСТ116 с использованием конфигурации whole-cell метода пэтч-клампа, было установлено, что ток, протекающий через плазмалемму, дозозависимо подавлялся. Когда результаты были аппроксимированы уравнением Хилла, полумаксимальные эффекты составили $4,8 \pm 0,7$ мкМ и $5,8 \pm 0,6$ мкМ при +40 мВ и -40 мВ соответственно, а коэффициенты Хилла составили 3,2 и 2,9.

При этих же условиях мы изучили влияние госсипола на активность ОЗАК тимоцитов крыс. На рисунке 4 показано влияние госсипола на объем-зависящий поток хлора в условиях гипоосмотического стресса.

Влияние госсипола на клетки тимоцитов было сильнее, чем на клеточную линию НСТ116, хотя ОЗАК также не был блокирован полностью (рис. 4).

Результаты исследования показали, что госсипол при концентрации 10 мкМ ингибировал ОЗАК, но при дальнейшем повышении концентрации стабильность клеточных мембран уменьшалась, а их проводимость росла.

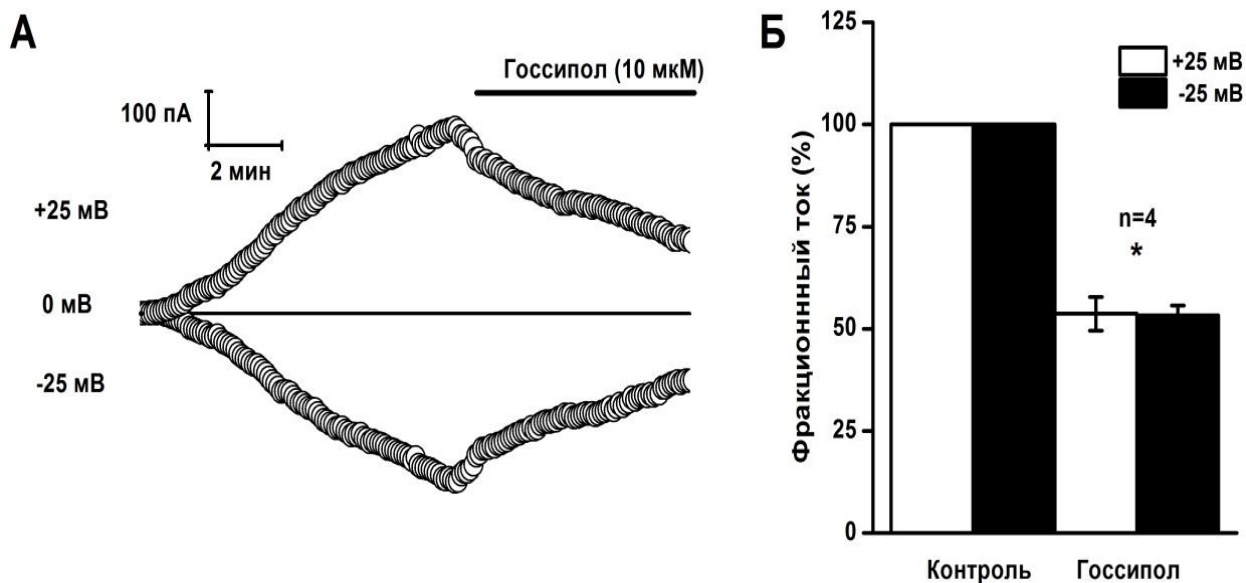


Рисунок 4. Влияние госсипола на хлорный ток, в клетках тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса. А) Изменение макроскопического тока в конфигурации whole-cell показано при фиксации тестовых импульсов от ± 25 мВ. Б) Показан средний остаточный ток ОЗАК в присутствии 10 мкМ госсипола.

В четвертой главе диссертации, озаглавленной «**Влияние глицирризина и его производных на процессы в мембранах эритроцитов и искусственных мембран**», описывается влияние глицирризиновой кислоты и ее производных на процесс гемолиза, механизм процесса гемолиза и действие природных ГК и его агликона на искусственные бислоиные липидные мембраны.

Для оценки мембранотропной активности глицирризиновой кислоты и ее производных *in vitro* мы проанализировали влияние веществ на выход гемоглобина из эритроцитов человека в изоосмотических условиях в диапазоне концентраций от 1 мкМ до 500 мкМ. В этих экспериментах только β -глицирретовая кислота проявляла умеренные гемолитические свойства (рис. 5-А).

Следующий этап нашего исследования был посвящен определению механизма процесса гемолиза под действием β -ГлК. Для демонстрации коллоидно-осмотического механизма мы использовали концентрация β -ГлК (400 мкМ), достаточную для 100% гемолиза, и вносили во внеклеточную среду следующие концентрации полиэтиленгликолей (ПЭГ): ПЭГ 1500 (25 мМ); ПЭГ 2000 (25 мМ); ПЭГ 3000 (20 мМ); ПЭГ 4000 (15 мМ); ПЭГ 6000 (12 мМ). Было установлено, что процесс гемолиза под действием β -ГлК происходит по коллоид-осмотическому механизму как результат формирования в мембране эритроцитов пор радиусом 2.3 нм (рис. 5-Б).

Когда мы исследовали влияние природной глицирретовой кислоты и некоторых сукциниловых и ацильных производных на процесс гемолиза, было обнаружено, что только природная ГлК является умеренным гемолитиком. Добавление сукцинильных и ацильных остатков приводило к потере гемолитической активности ГлК.

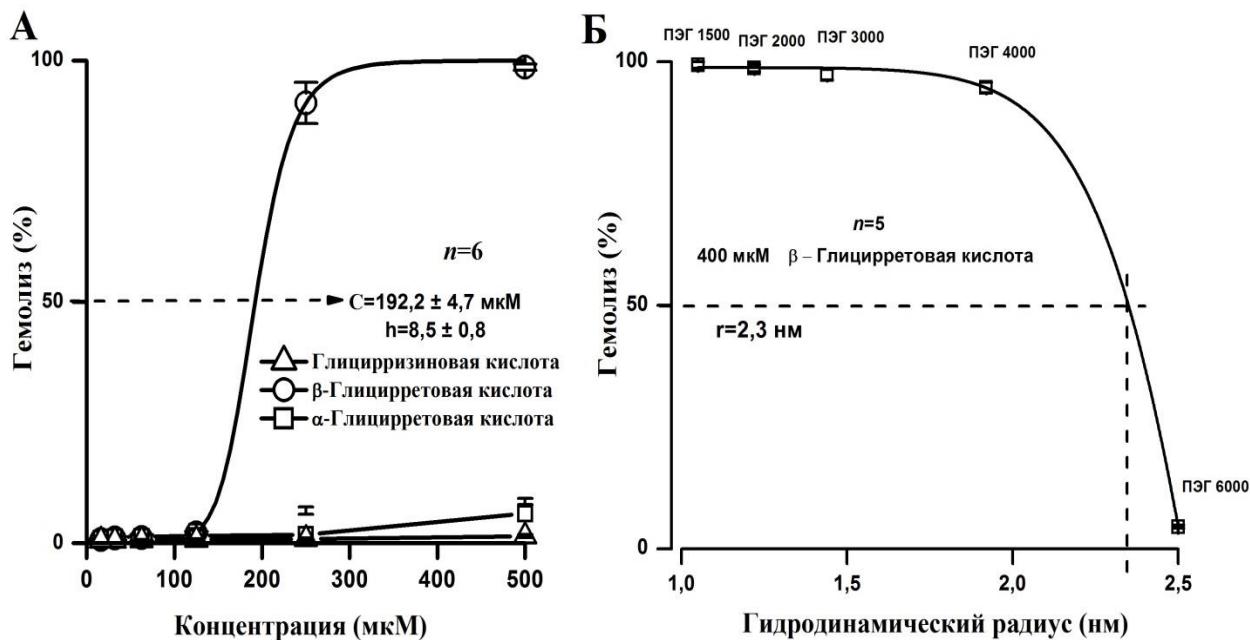


Рисунок 5. А). Влияние глицирризиновой кислоты и ее агликонов на лизис эритроцитов. **Б).** Зависимость уровня гемолиза от гидродинамического радиуса ПЭГ. По оси ординат – степень гемолиза, выражена в %, по оси абсцисс – концентрации ГК, α- и β-ГлК в мкМ (А) или гидродинамический радиус в нм (Б). *n* - количество экспериментов.

В экспериментах по определению влияния β-глицирретовой кислоты на устойчивость эритроцитов к осмотическому стрессу гемолиза постепенно увеличивался с уменьшением внеклеточного осмотического давления. При добавлении β-глицирретовой кислоты в среду инкубации в сублитической концентрации (50 мкМ) наблюдалось значительное снижение устойчивости эритроцитов к осмотическому стрессу, что можно объяснить ингибирующим действием соединения на активность объем-зависимых анионных каналов в мембране эритроцитов.

В наших последующих экспериментах мы исследовали влияние β-глицирретовой кислоты на устойчивость клеток крови к коллоид-осмотическому лизису под действием полиенового антибиотика нистатина. Мы определили степень гемолиза при различных концентрациях нистатина, построили кривую дозозависимости и, аппроксимировав ее уравнением Хилла, определили эффективную концентрацию полиена, приводящую к 50% гемолизу. В присутствии β-глицирретовой кислоты в сублитической дозе (50 мкМ), концентрация полумаксимального эффекта нистатина статистически значимо снижалась (рис. 6-А и Б).

Результаты показывают, что устойчивость эритроцитов к коллоид-осмотическому лизису, индуцированному нистатином, снижается под влиянием β -глицирретовой кислоты. Такой эффект также может быть связан с тем, что вещество в эритроцитах блокирует систему регуляция клеточного объема.

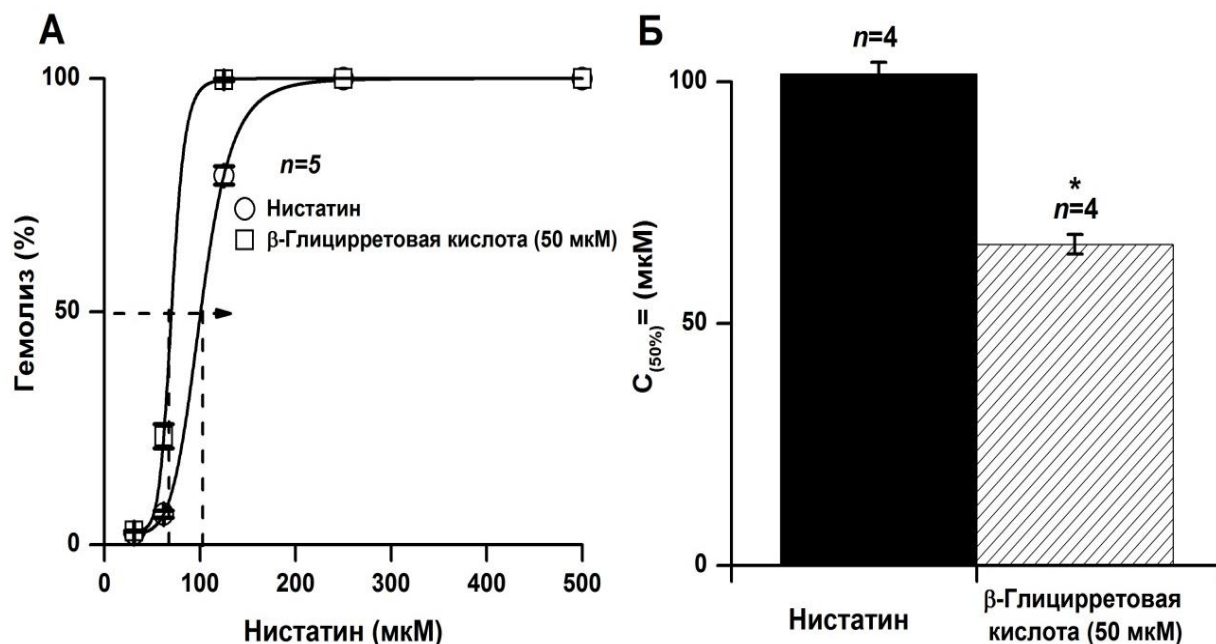


Рисунок 6. Влияние β -глицирретовой кислоты на концентрацию нистатина, индуцирующую полумаксимальный гемолиза человеческих эритроцитов. Звездочками (*) отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля. $P < 0,05$ по сравнению с контролем, n - количество экспериментов.

При исследовании действия природной ГК и ее агликона ГлК на клетки эритроцитов и тимоцитов, нами была выдвинута гипотеза, что при больших концентрациях эти вещества могут образовывать поры в мембранах. Для детального изучения мембраноактивных свойств, мы исследовали влияние этих соединений на искусственные бислойные липидные мембраны (БЛМ).

Мембраны формировались из 1%-го раствора азолектина или смеси азолектин-холестерин в октане. Ёмкость сформированной мембраны составляла приблизительно 150 пФ (рис. 7). При добавлении в среду природной ГК вплоть до 100 мкМ не наблюдалось никаких изменений в электропроводящих свойствах БЛМ. Глицирретовая кислота при добавке до 100 мкМ в один отсек или добавке в оба отсека ячейки при небольших концентрациях (1-10 мкМ) не влияла на электрическую проводимость БЛМ.

В случае одновременной добавки ГлК в концентрации 100 мкМ в оба отсека ячейки, она вызывала увеличение проводимость БЛМ. Тот факт, что рост протекающего через БЛМ тока не являлся плавным, а был скачкообразным, по-видимому указывает на то, что в мембране формируются ионные каналы (рис. 7).

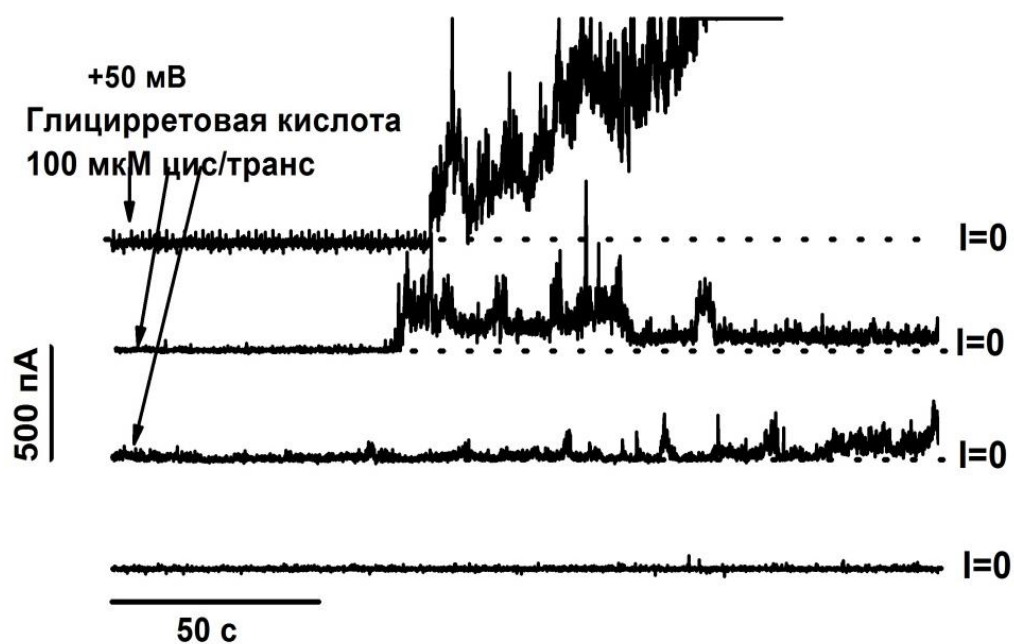


Рисунок 7. Влияние ГлК на БЛМ. Ток, проходящий по оси абсцисс, выражен в пА. Время (в секундах) отложено по оси ординат.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что глицирризиновая кислота (ГК) оказывает слабое, тогда как ее β -агликон – сильное ингибирующее действие на регуляцию объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. Это свойство усиливается у производных глицирретовой кислоты (ГлК), и по своей эффективности исследованные вещества располагаются в следующий ряд: валериокси-ГлК > природный агликон > карбеноксолон > β -ГлК > бутирокси-ГлК >> α -ГлК.

2. В экспериментальных условиях «НМДГ-Грд», когда регуляция объема тимоцитов зависит только от активности транспорта анионов, действие β -ГлК, природного агликона и карбеноксолон проявляется в полном блокировании этого процесса, тогда как ГК, бутирокси- и валериокси-ГлК подавляют лишь частично.

3. Впервые методом пэтч-кламп установлено, что активность объем-зависимого анионного канала (ОЗАК) в клетках рака толстого кишечника человека (НСТ116) подавляется ГК слабо и лишь частично, в то время как β -ГлК ($C_{50}=18,4\pm 0,5$ мкМ) и карбеноксолон ($C_{50}=28,6\pm 2,5$ мкМ) оказались сильными блокаторами и подавляли канал полностью; α -ГлК не оказывал влияния на ОЗАК.

4. Впервые методом пэтч-кламп установлено, что природный полифенол госсипол эффективно и потенциально-независимым образом блокирует ($C_{50}=4,8\pm 0,7$ мкМ при +40 мВ и $C_{50}=5,8\pm 0,6$ мкМ при -40 мВ) активность ОЗАК в клетках НСТ116; аналогичный эффект наблюдался также в клетках тимоцитов.

5. Из исследованных ГК и его производных, только β -ГлК в изоосмотических условиях обладает умеренной ($C_{50}=192,2\pm 4,7$ мкМ) гемолитической активностью в отношении эритроцитов человека; лизис происходит по коллоид-осмотическому механизму как результат формирования в мембране пор радиусом 2.3 нм. В сублитической дозе β -ГлК снижает устойчивость эритроцитов к осмотическому и коллоидно-осмотическому стрессу.

6. ГК не влияет на искусственные бислоиные липидные мембраны, тогда как его агликон (ГлК) формирует каналы.

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

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

FAYZIEV DIYOR DAVRONOVICH

**STUDY OF THE EFFECTS OF GLYCYRRHIZIN AND ITS
DERIVATIVES ON THE CELL VOLUME REGULATION AND ANIONIC
TRANSPORT**

03.00.02 – Biophysics and radiobiology

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

Tashkent – 2021

The title of the dissertation of PhD has been registered with number B2019.2.PhD/B297 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 in three (Uzbek, Russian and English (Resume)) languages has been placed on the website of the Scientific Council (www.ibb-nuu.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor: **Kurbannazarova Ranokhon Sharapovna**
doctor of biological sciences

Official opponents: **Khushmatov Shunkor Sadullaevich**
doctor of biological sciences

Kamburova Venera Seytumerovna
candidate of biological sciences


Leading organization: **Karshi State University**


The dissertation will be defended on 03.02 2021 year 14⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 at the Institute of Biophysics and Biochemistry, at the National University of Uzbekistan at the following address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student's town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96.

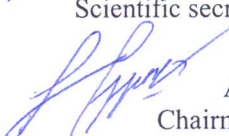
The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number № 23). Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student's town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of the dissertation has been distributed on « 15 » 01 2021
(Protocol at the register № 1 dated « 15 » 01 2021)




Sabirov Ravshan Zairovich
Chairman of the Scientific Council Awarding
Scientific Degrees, D.B.Sc., academician


Pozilov Mamurjon Komiljonovich
Scientific secretary the Scientific Council Awarding
Scientific Degrees, D.B.Sc.


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

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work is to investigate the effects of glycyrrhizin and its derivatives on the cell volume regulation and the activity of volume-sensitive outwardly rectifying anion channel

The objects of the research work: thymocytes isolated from young 6-8 weeks white rats, human red blood cells, human colon cancer cell line (HCT116 line), triterpenoids and polyphenols.

The scientific novelty of the research work is as follows:

the effects of glycyrrhizin and its derivatives on the thymocytes volume regulation under hypoosmotic stress is described, substances with strong inhibitory effects have been identified;

using nonelectric and direct electrophysiological patch-clamp method, it has been proven that the mechanism of inhibition the cell volume regulation by glycyrrhizin and its derivatives and gossypol was due to blockage of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR);

the effect of glycyrrhizin and its derivatives on the release of hemoglobin from human erythrocyte cell under isoosmotic conditions was investigated, and it was found that β -glycyrrhetic acid exhibits a moderate hemolytic properties, hemolysis induced by β -glycyrrhetic acid occurs by a colloid-osmotic mechanism due to formation in plasma membrane of the pores with a radius of ~ 2.3 nm;

it was found that glycyrrhetic acid increases the electrical conductivity of artificial lipid bilayer membranes through the formation of ion channels.

Implementation of the research results. Based on scientific results obtained in the studies of the effects of glycyrrhizin and its derivatives on the cell volume regulation and transport of anions:

the results obtained in the study of the effects of glycyrrhizin and its derivatives on the cell volume regulation and transport of anions were used in the applied project A-11-10 «Development and production of drugs against mitochondrial diseases» to describe the antioxidant effects of supramolecular compounds of glycyrrhizic acid in the mitochondria of rat liver (Statements of the Ministry of Higher and Secondary Special Education of October 30, 2020, №. 89-03-4300). The results allowed identification of new biologically active substances as a basis for the treatment of mitochondrial diseases;

the results of the study of the effects of glycyrrhizin and its derivatives isolated from the licorice plant (*Glycyrrhiza glabra*) on the cell volume regulation and their inhibitory effect on the transport of anions were used in the fundamental project FPMI T.2-18 «Biological activity of new derivatives of some natural triterpene acids containing residues of 2-alkyl (aryl) -5-amino-1,3,4-thiadiazole» to elucidate the biological effects of some natural derivatives of triterpenic acid (Certificate of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan № 4/1255-1422 of July 8, 2020). The results allowed characterization of the membrane-active properties of some derivatives of natural triterpenic acids.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusions and list of publications. Total volume is 117 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Юлдашев Х.А., Файзиев Д.Д., Зиявитдинов Ж.Ф., Далимов Д.Н., Бабаев Б.Н., Сабилов Р.З. Исследование влияния глицирризиновой кислоты на искусственные бислойные липидные мембраны.// Узб. Биол. Ж. - 2017. № 2. – С. 7-11. (03.00.02., №2).

2. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Далимов Ш.И., Эсанов Р.С., Юлдашев Х.А., Гафуров М.Б., Сабилов Р.З. Глицирризин ва уни ҳосилаларининг гемолиз жараёнига таъсирини тадқиқ қилиш.// ҚарДУ Хабарлари. -2018. -№ 4. – Б. 7-10. (03.00.02., №4).

3. Файзиев Д.Д., Рустамова С.И., Хамидова О.Ж., Юлдашев Х.А., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Изучение действия α - и β -изомеров глицирретовой кислоты на регуляцию объема тимоцитов.// ДАН РУз. -2018. -№ 5. –С. 60-65. (03.00.02., №5).

4. Файзиев Д.Д., Рустамова С.И., Хамидова О.Ж., Юлдашев Х.А., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Изучение механизма действия глицирризиновой кислоты на регуляцию объема тимоцитов.// Узб. Биол. Ж. -2019. -№1. –С. 17-20. (03.00.02., №1).

5. Chorlieva N.M., Fayziev D.D., Tsiferova N.A., Toshtemirova G.A., Khamidova O.J., Merzlyak P.G., Kurbannazarova R.Sh., Ziyaev Kh.L., Gafurov M.B., Sabirov R.Z. Lytic and sublytic effects of gossypol on red blood cells and thymocytes.// Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology -2021. V. 48; – P. 227-237. (SCOPUS Cite Score 4.2)

II бўлим (II часть; II part)

6. Файзиев Д.Д., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Гафуров М.Б., Далимов Д.Н., Ташмухамедов Б.А., Сабилов Р.З. Глицирризин кислотаси ва унинг агликони глициррет кислотасининг сунъий кўшқават липид мембраналарга таъсирини ўрганиш.// «Ёш олимлар илмий-амалий конференцияси». Республика илмий-амалий анжумани материаллари. Тошкент. (22-декабрь). 2015. – Б. 402-403.

7. Fayziev D.D., Yuldashev Kh.A. Dalimov D.N., Babaev B.N. and Sabirov R.Z. Formation of artificial bilayer membranes of glycyrrhetic acid and its mixtures with asolectin.// Proceedingd of the Scientific Conference of PhD. Students of FAFR and FBFS, SUA in Nitra, Slovakia. (Nov. 10). -2016. – P. 29.

8. Fayziev D.D., Khamidova O.J., Rustamova S.I., Choriyeva N.M., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P. G., Sabirov R.Z. Effects of glyrrhizic acid and its aglycone on erythrocytes and thymocytes.// In: Abstracts of the 12th

International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent. Uzbekistan. (September 7-8). -2017. – P. 394.

9. Fayziev D.D., Yuldashev Kh.A., Dalimov D.N., Babayev B.N., Sabirov R.Z. Effects of glycyrrhizic acid and its aglycone on the artificial bilayer membrane.// In: Abstracts of the 12th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. Tashkent. Uzbekistan. (September 7-8). -2017. – P. 180.

10. Юлдашев Х.А., Эсанов Р.С., Файзиев Д.Д., Зиявитдинов Ж.Ф., Бабаев Б.Н. Исследование содержания 18 α - и 18 β - глицирретовой кислоты методом ВЭЖХ.// «Ўзбекистонда аналитик кимёнинг ривожланиш истиқболлари». Республика илмий-амалий анжумани материаллари. Ташкент. (11 май). -2018. – С. 97-100.

11. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. β -глициррет кислотаси ҳамда карбеноксолоннинг ҳужайралар мембранасига таъсирини ўрганиш.// «Табиий бирикмалардан кишлоқ хўжалигида фойдаланиш истиқболлари». Республика илмий-амалий анжумани материаллари. Гулистон. (25-26 май). -2018. – Б. 106-107.

12. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Далимов Ш.И., Эсанов Р.С., Юлдашев Х.А., Гафуров М.Б., Сабилов Р.З. Изучение влияния глицирретовой кислоты и её некоторых ацилированных производных на регуляцию объёма тимоцитов.// Мат. международной научной конференции «Лекарственные препараты на основе природных соединений». Ташкент. (18-20 сентября). -2018 г. – С. 18-19.

13. Fayziev D.D., Khamidova O.J., Rustamova S.I., Kurbannazarova R.S., Merzlyak P.G. and Sabirov R.Z. Study of the mechanism of effects of glycyrrhizic acid on volume regulation in thymocytes.// Proceedings of the Scientific Conference of PhD. Students of FAFR and FBFS, SUA in Nitra, Slovakia. (Nov. 6). -2018. – P. 51.

14. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., акад. Сабилов Р.З. Глицирризин ва уни ҳосилаларининг гемолиз жараёнига таъсирини ўрганиш.// «Генетика, геномика ва биотехнологиянинг замонавий муаммолари» Республика илмий анжумани, Тошкент. (16 май). -2019. – Б. 168-169.

15. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., акад. Сабилов Р.З. β -глициррет кислотасининг гемолиз жараёнига таъсир механизминини ўрганиш.// «Биофизика ва биокимёнинг ютуқлари ва истиқболлари» мавзусидаги институт Ёш олимларининг I илмий-амалий конференцияси. (17 сентябрь). -2019. – Б. 87-89.

16. Файзиев Д.Д., Циферова Н.А., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. Влияние глицирретовой кислоты на активность объем-зависимого анионного канала в клетках НСТ116. Материалы международной молодежной научно-практической конференции «Наука и инновации» Центр передовых технологий при Мининноваций. Ташкент. (1 ноября). -2019. – С. 113-114.

17. Файзиев Д.Д., Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Циферова Н.А., Юлдашев Х.А., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. Глицирризин ва унинг ҳосилаларини хужайра ҳажм бошқарилиши ва анион транспортига таъсири.// «Биофизика ва биокимё муаммолари – 2020» илмий конференцияси материаллар, Тошкент.(22 май). -2020. – Б. 146.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» тахририятида тахрирдан
ўтказилди (05.01.2021).