

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

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

БАЕВ АРТЁМ ЮРЬЕВИЧ

**СУТ ЭМИЗУВЧИЛАРНИНГ ҲУЖАЙРАЛАРИДА НООРГАНИК
ПОЛИФОСФАТЛАРНИНГ РЕГУЛЯТОРЛИК
ВА МЕТАБОЛИК РОЛИ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

**ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2018

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

Сут эмизувчиларнинг хужайраларида ноорганик
 полифосфатларнинг регуляторлик ва метаболик 3
 роли.....

Баев Артём Юрьевич

Регуляторная и метаболическая роль неорганических полифосфатов
 в клетках млекопитающих..... 21

Baev Artyom Yurevich

Regulatory and metabolic role of inorganic polyphosphates in
 mammalian 39
 cells.....

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
 List of published works..... 43

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

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

БАЕВ АРТЁМ ЮРЬЕВИЧ

**СУТ ЭМИЗУВЧИЛАРНИНГ ҲУЖАЙРАЛАРИДА НООРГАНИК
ПОЛИФОСФАТЛАРНИНГ РЕГУЛЯТОРЛИК
ВА МЕТАБОЛИК РОЛИ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

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

Тошкент – 2018

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.2.PhD/B85 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Ўзбекистон Миллий университети бажарилган.

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

Илмий раҳбар: **Ташмухамедов Бекжан Айбекович**
биология фанлари доктори, академик

Расмий оппонентлар: **Мерзляк Пётр Григорьевич**
биология фанлари доктори

Камбурова Венера Сейтумеровна
биология фанлари номзоди, катта илмий ходим

Етакчи ташкилот: **Тошкент педиатрия тиббиёт институти**

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон Миллий университети, Ўсимлик моддалари кимёси институти ҳузуридаги DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2018 йил «__» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262–35–40; факс: (99871) 262–70–63.

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот–ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: (99871) 262–35–40; факс: (99871) 262–70–63, e-mail: asrarov54@mail.ru)

Диссертация автореферати 2018 йил «__» _____ куни тарқатилди.
(2018 йил «__» _____ даги № _____ рақамли реестр баённомаси).

Ш.И.Салихов

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

М.И.Асраров

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

Ш.У.Турдикулова

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
кошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д.

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертациясининг аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳонда охириги йилларда сут эмизувчиларини хужайрасида ноорганик полифосфатларнинг (поли-Ф) ролини аниқлашга қизиқиш ортди ва буларга бағишланган илмий ишлар кўпайиб бормоқда. Поли-Ф дастлаб XIX асрда аниқланган бўлишига қарамасдан, унинг сут эмизувчилар хужайраларидаги роли ҳақида аниқ тшунчалар бор-йўғи бундан 12–14 йил пайдо бўлди. Ушбу давр давомида поли-Ф кўпгина физиологик ва патофизиологик жараёнларда иштирок этиши ва хужайраларнинг ҳаёт фаолиятининг ажралмас қисми ҳисобланиши кўрсатиб берилган. Ҳар хил касалликлар кечишидаги иштироки алоҳида қизиқиш уйғотади. Ҳар хил юрак-томир ва нейродегенератив касалликлардаги поли-Ф метаболизми ўзгириши кўрсатилган, аммо бу патологияни сабаби ёки натижаси эканлиги аниқланмаган.

Ҳозирги кунда бутун дунё бўйлаб янги самарали дори воситаларини яратиш стратегияси меъёр ва патологиядаги хужайра фаолиятидаги молекуляр механизмларнинг фундаментал билимларга асосланади. Бир қатор сўнгги манбаларда митохондрия мегаканали (РТР) фаоллашувида, шунингдек кальций ионларини транспортида поли-Ф ларнинг иштироки кўрсатилган. РТР нинг назорат қилинмаган фаоллашуви ва кальций ионларининг ноқулай транспорти турли касалликларда хужайра ўлимига олиб келиш кўрсатилган. Шунга мувофиқ, турли хил физиологик жараёнларда ишлайдиган поли-Ф молекуляр функцияси механизмларини аниқлаш, РТРнинг назоратсиз фаоллашуви ёки кальций гомеостазининг бузилишига боғлиқ касалликларни, шунингдек турли юрак-томир ва нейродегенератив касалликларни даволаш, реабилитация қилиш ёки ташхислаш билан боғлиқ муҳим масалалардан бири ҳисобланади.

Ҳозирги кунда мамлакатимизда юрак қон-томир ва нейродегенератив касалликларни даволаш учун ижобий таъсирга эга, импорт аналогларнинг ўрнини босадиган ички дори маҳсулотларини яратишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора тадбирлар асосида, муайян натижаларга, маҳаллий хом-ашёлардан самарали доривор воситаларни излаб топиш ва яратиш борасида маълум натижаларга эришилди. Бу борада янги фармакологик агентларни яратишда, патогенез асосларини, жумладан Ca^{2+} гомеостази бузилишларини ҳамда хужайра ўлимининг молекуляр механизмларини аниқлаш муҳим рол ўйнайди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «илмий тадқиқотлар ва инновацион фаолиятни қўллаб-қувватлаш, илмий тадқиқотлар ва инновацион ютуқларни амалиётга жорий қилишнинг самарали механизмларини яратиш»¹ вазифалари белгилаб берилган, бу борада сут эмизувчилар хужайраларида поли-Ф лар ролини аниқлаш муҳим илмий ва амалий аҳамиятга эга, чунки ушбу фундаментал

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

натижалар келажакда турли касалликларни даволаш учун янги ёндашувлар ва усулларни ишлаб чиқишда муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 01-ноябрдаги ПҚ-3365 «Илмий-тадқиқот муассасаларининг инфратузилмасини янада мустаҳкамлаш ва инновацион фаолиятини ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида» қарори ва 2017 йил 7-февралдаги ПФ-4947-сонли Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармонида белгиланган устувор вазифаларни ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V «Биология, биотехнология, тупроқшунослик, сув масалалари, генетика, ўсимликлар селекцияси масалалари» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Поли-Ф дастлаб XX асрда аниқланган бўлишига қарамадан, бироқ ушбу молекулаларнинг функциялари ҳақидаги хисоботлар фақат сўнгги йиллардагина қайд қилинмоқда.

Ушбу давр давомида поли-Ф қоннинг коагуляцияси ва яллиғланиш (Morrissey J. 2017), ҳужайралар пролиферацияси (Jimenez-Nunez M. D. 2012), ангиогенез (Han K. Y. 2007), ҳужайралар биоэнергетикаси (Pavlov E. 2010), ион каналларининг фаоллиги регуляцияси (Kim D. 2007, Zakharian E. 2009), оксилларнинг фосфорланиши (Azevedo C. 2015), оксил молекулаларининг йиғилиши (Cremers C. M. 2016, Gray M. J. 2014) ва бошқалар, бироқ поли-Ф функциясининг кўпгина механизмлари ҳалигача аниқланмаган. Охирги йилларда поли-Ф ҳужайра даражасида функциясини ўрганишда, уларнинг таҳлил қилишда замонавий флуоресцент усуллари ишлаб чиқилганлиги сабабли, кўринарли ютуқларга эришилган (Aschar-Sobbi 2008, Angelova 2014). Ҳозирги вақтгача сут эмизувчилар ҳужайраларида поли-Ф синтезига жавобгар ферментлар аниқланмаганлигига қарамадан, поли-Ф синтезланиши тахмин қилинувчи жой митохондриялар ҳисобланиши ва поли-Ф миқдори митохондрияларнинг нафас занжирининг функционал ҳолатига боғлиқлиги тасдиқланган (Pavlov E. 2010).

МДХ давлатлари миқёсида ноорганик полифосфатларнинг функцияларини тадқиқ қилишда МДУ ва РФА Биокимё ва Микроорганизмлар физиологияси институтида (Пушино ш.) юқори молекуляр полифосфатлар биокимёси соҳасида 50 йилдан ортиқ тадқиқотлар тажрибасига эга бўлган проф. Игор Степанович Кулаев (РФА муҳбир аъзоси) гуруҳи асосий хизмат кўрсатган, бироқ бу гуруҳ асосан поли-Ф ни прокариотлар ва тубан эукариотлар даражасида тадқиқ қилишга ихтисослашган.

Ўзбекистон республикасида ҳайвонлар ҳужайраларида ноорганик полифосфатларни тадқиқ қилиш амалга оширилмаган. Юқорида таъкидлаб

ўтилганларга боғлиқ ҳолатда, сут эмизувчилар ҳужайраларида ноорганик полифосфатларнинг функцияларини тадқиқ қилиш сўзсиз равишда қизиқиш ўйғотади ва долзарб масала ҳисобланади.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий–тадқиқот муассасасининг илмий–тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университетининг илмий–тадқиқот ишлари режасининг Ф–5–06 «Айрим биорегуляторларнинг таъсир механизмарини ўрганиш» фундаментал лойиҳаси (2012–2016); Юқори технологиялар ўқув–тажриба Марказининг Ф–5–001 «Ноорганик полифосфатларнинг сут эмизувчилар ҳужайраларида метаболизм регуляциясидаги роли» Ёш олимлар фундаментал лойиҳаси (2016–2017); Биоорганик кимё институтининг ФА–Ф5–Т080 «Ҳажм ўзгариши орқали фаоллашувчи анион транспортининг молекуляр физиологияси ва биофизикаси» лойиҳаси (2012–2016); Лондон Университети Коллежи Неврология институтида (Лондон, Англия) проф. Абрамов А.Ю. лабораториясида RPG–2012–447 The Leverhulme Trust гранти кўмагидаги «Novel properties of phylogenetically ancient molecule in the mammalian cells» лойиҳаси (2010 – 2012); Далхауз Университетининг Физиология ва Биофизика бўлимида (Галифакс, Канада) доктор Павлов Е.В. лабораториясида «Molecular regulation of the permeability transition pore» мавзусидаги илмий лойиҳалар (2014) доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади ноорганик полифосфатларнинг сут эмизувчилар ҳужайраларидаги ролини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда F_1F_0 АТФ–аза фаоллигига таъсирини тадқиқ қилиш;

ноорганик полифосфатларнинг митохондриялар мембранасининг турли хил ионлар учун ўтказувчанлигига таъсирини тадқиқ қилиш;

ноорганик полифосфатларнинг митохондриялар мегаканали (РТР) шаклланиши/активациясига таъсирини тадқиқ қилиш;

ноорганик полифосфатлар ва кальций таъсирида РТР нинг фаоллашишига паст осмотик босимнинг таъсирини тадқиқ қилиш;

ноорганик полифосфатларнинг марказий нерв тизими (МНТ) ҳужайраларида кальций гомеостазига таъсирини тадқиқ қилиш;

ноорганик полифосфатларнинг МНТ да сигналлар узатилишида иштирокини тадқиқ қилиш.

Тадқиқотнинг объекти каламуш бош мия катта ярим шарлари, гиппокамп ва ўрта мия нейронлари ва астроцитларининг бирламчи со–культуралари, шунингдек каламуш жигаридан ажратиб олинган митохондриялар ва субмитохондриял қисмлар ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда АТФ синтетаза, РТР функцияси билан боғлиқ бўлган жараёнларга ва шунингдек, МНТ ахборотларнинг узатилиши жараёнларида иштирокини тадқиқ қилишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Барча тажрибалар маълумотларни компьютерда йиғиш ва қайта ишлаш тизимларидан фойдаланган ҳолатда, флуоресцент, конфокал ва электрон микроскопия, флуориметрия, спектроскопия, липид қўшқаватини (ЛҚҚ) шакллантириш, полярография, ферментатив фаолликни қайд қилиш, митохондрия ва хужайраларни ажратиш, хужайралар бирламчи со– культураларини олиш, шунингдек турли хил статистик услублардан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда F_1F_0 АТФ синтетаза фаоллигига таъсири ва бунда поли–Ф ушбу фермент учун олдин идентификацияланмаган субстрат бўлиши мумкинлиги аниқланган;

ноорганик полифосфатлар деэнергияланган шароитда митохондрия ички мембранасининг кальций ва барий ионлари учун нофаол ўтказувчанлигини модуляциялаши ҳамда бу таъсир митохондрия мегаканали (РТР) классик ингибиторларига боғлиқлиги, бунда деэнергияланган интакт митохондрияларда кальций ионлари қўшимча қўшилмаган шароитда ноорганик полифосфатлар физиологик концентрацияларда (25–50 μ М) митохондрия мегаканалини (РТР) фаоллаштириши аниқланган;

гипоосмотик шароитда митохондрияларнинг ички мембранаси структураси «енгил бўқиш» ҳисобига қайтар тавсифда ўзгариши ва бу митохондрияларнинг кальций буфери сиғими ортишига ҳамда митохондрия мегаканалининг (РТР) ингибирланиши олиб келиши, бироқ аксинча ноорганик полифосфатлар таъсирида унинг нисбатан самарали фаоллашиши аниқланган;

ноорганик поли-Ф олдин аниқланмаган гилотрансмиттерлар - астроцитларда $P2Y_1$ типдаги пуринорецепторлар орқали ахборот ташувчилари эканлиги ишончли тарзда исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси қуйидаги ҳолатларда ўз ифодасини топади:

поли–Ф мавжуд шароитда митохондрияларда F_1F_0 АТФ синтетазанинг АТФ–аза фаоллиги ортиши, шунингдек поли–Ф нинг бу таъсири ушбу ферментнинг асосий субстрати – АТФ мавжудлигига боғлиқ эмаслиги аниқланган;

поли–Ф нинг митохондрия мембранаси орқали айрим бир ва икки валентли катионларнинг нофаол транспортига таъсири, шунингдек поли–Ф нинг митохондрияларда турли хил транспорт тизимлари функциясига боғлиқ таъсири тадқиқ қилинган;

ингибиторли таҳлил ёрдамида поли–Ф нинг митохондрия мембранаси ўтказувчанлигига таъсири митохондрия мегаканали фаоллашиши билан боғлиқлиги ва шунингдек, бу фаоллик митохондрияга цитоплазмадан кальцийнинг кириши билан боғлиқ эмаслиги аниқланган;

паст осмотик босим ва митохондрия мегаканалининг кальций ионлари ҳамда ноорганик полифосфатлар таъсирида фаоллашиши ўртасидаги боғлиқлик тизимли тарзда тадқиқ қилинган. Паст осмотик босим митохондрия ички мембранасининг букилганлик даражасини ўзгартириши,

шунингдек ушбу ўзгариш митохондрияларнинг биоэнергетик кўрсаткичларига таъсир кўрсатмаслиги аниқланган;

хужайра ташқарисидаги поли-Ф нинг каламуш миясининг учта соҳасидан – яъни, катта яримшарлар пўстлоғи, гиппокамп ва ўрта мия нейронлари ва астроцитлари со-культурасида кальций гомеостазида иштироки тадқиқ қилинган. Ингибиторли таҳлил ёрдамида астроцитларда ноорганик полифосфатлар ёрдамида хужайра ичидаги кальций концентрацияси ортиши жараёнлари асосида ишга тушувчи сигнал тизимлари аниқланган;

поли-Ф нинг кальций гомеостазига таъсири унинг астроцитлар ўртасида ахборот узатиш хусусиятига эгаллиги билан боғлиқлиги аниқланди. Тажрибалар вақтида поли-Ф астроцитларда тўпланиши аниқланди, бунда хужайра ичида кальций концентрацияси ортиши поли-Ф нинг астроцитлардан хужайра ташқарисидаги муҳитга чиқишига олиб келади; хужайра ташқарисида поли-Ф кўшни астроцитларнинг специфик рецепторлари билан боғланиш хосил қилади ва уларда кальцийга боғлиқ сигнализация жарёнларини ишга туширади, ушбу кўринишда ахборотнинг битта хужайрадан бошқасига тарқалишини таъминлайди. Хужайра ташқарисидаги поли-Ф яқин жойлашган нейронлар томонидан тутиб олинishi мумкин.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тажриба натижалари замонавий лаборатория услублари ёрдамида олинганлиги, натижаларнинг статистик қайта ишланиши Стьюдент мезони ёрдамида бажарилганлиги билан тасдиқланади. Олинган натижаларнинг тасдиқланиши мутахассислар томонидан эксперт баҳоланиши, ушбу натижаларнинг республика ва халқаро миқёсда анжуманларда муҳокама қилинганлиги, тадқиқот натижаларининг рецензиядан ўтказилувчи етакчи журналларда нашр қилиниши билан белгиланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти бу натижалар митохондриялар даражасида ноорганик полифосфатлар ҳақида мавжуд билимлар таркибини тўлдирди; тажриба йўли билан митохондрияларда F_1F_0 АТФ синтетазанинг ноорганик полифосфатлар метаболизмида иштирок этиш эҳтимоллиги кўрсатиб берилди; поли-Ф нинг митохондрия мегаканалли билан бевосита боғлиқлиги аниқланди ва митохондриялар ҳажми ўзгартирилишининг митохондрия мегаканаллининг кальций ва поли-Ф таъсирида фаоллаштирилишига таъсирида фундаментал механизмлар очиб берилди. Хужайра ташқарисидаги муҳит даражасида поли-Ф МНТ да сигнал молекуласи функциясини бажариши мумкинлиги ва астроцитлар ўртасида сигнал узатиши тасдиқланди.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти бу натижаларнинг ишемия-реперфузия, турли хил нейродегенератив касалликлар ва бошқа турли хил касалликлар шароитида митохондрия мегаканаллининг назорат қилиб бўлмайдиган тарзда фаоллашиши билан боғлиқ хужайранинг нобуд бўлишини бошқаришнинг янги йўналишларини ишлаб чиқиш учун асос

сифатида хизмат қилишида ўз ифодасини топади. Биз поли-Ф физиологик концентрацияларда ушбу поранинг активатори ҳисобланишини асосладик, олдин поли-Ф мавжуд бўлмаган шароитда митохондрияларда поранинг кальций ионлари таъсирида фаоллашмаслиги қайд қилинган, яъни поли-Ф РТР нинг зарурий таркибий қисми ҳисобланиши тасдиқланди. Ҳозирги кунда РТР нинг кўп сондаги ингибиторлари мавжуд бўлишига қарамасдан, улардан кўпчилиги клиник синовлардан ўтмаган, яъни РТР нинг назорат қилиб бўлмайдиган тарздаги очилиши ҳисобига ҳужайраларнинг нобуд бўлишини сусайтириш масаласи долзарблигича қолмоқда. Шундай қилиб, олинган натижалар тиббиёт амалиётида, масалан поли-Ф миқдорининг регуляцияси РТР нинг ишемик инфаркт, ишемик инсульт, Паркинсона касалликлардаги назорат қилиб бўлмайдиган тарздаги очилиши таъсирида ҳужайраларнинг нобуд бўлиши масаласини ҳал қилишда фойдаланилиши мумкин.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Сут эмизувчиларнинг ҳужайраларида ноорганик полифосфатларнинг регуляторлик ва метаболик роли бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ноорганик полифосфатларнинг $P2Y_1$ пуринорецепторлар орқали ҳужайра ичида кальций концентрацияси ошириши юқори импакт-факторга эга хорижий журналларда поли-Ф нинг яллиғланиш жараёнларида иштирок этиш механизмларини таҳлил қилишда фойдаланилган (Blood 2014, V.123, Scopus CiteScore – 7.21; Journal of Thrombosis and Haemostasis 2015, V.13, Scopus CiteScore - 3.85; Molecular Cell 2016, V.63, ResearchGate IF - 10.54). Натижада олинган илмий натижалар айрим жараёнларда поли-Ф ларнинг функция бажариш механизмларини очиш имконини берган;

ноорганик полифосфатлар олдин идентификацияланмаган глиотрансмиттерлар ҳисобланишини кўрсатувчи илмий натижалар юқори импакт-факторга эга хорижий журналларда астроцитларда ахборотларнинг тарқалиши сигнал йўллари тавсифлашда фойдаланилган (Nature Neuroscience 2016, V. 19, Scopus CiteScore – 13.31; Molecular Cell 2014, V.53, ResearchGate IF - 5.65; Glia 2018, V. 66, Scopus CiteScore - 6.33). Натижада илмий натижалар МНТ да астроцитлар ўртасида ахборотларнинг узатилиши тизими ҳақида билимларни кенгайтириш имконини берган;

ноорганик полифосфатлар митохондрия мембранаси ўтказувчанлигига таъсир қилишини ва бу ўтказувчанлик митохонрия мегаканалининг фаоллашиши билан боғлиқлигини кўрсатувчи илмий натижалар юқори импакт-факторга эга хорижий журналларда митохондрия мегаканалининг активаторларини тавсифлашда фойдаланилган (Aging Cell 2017, V.16, Scopus CiteScore - 7.21; International Journal of Molecular Sciences 2017, V.18, Scopus CiteScore – 3.86; Tumor biology 2017, V.39, Scopus CiteScore – 3.27). Илмий натижалардан фойдаланиш РТР структурасини тавсифлаш, шунингдек ҳужайранинг нобуд бўлишининг янги йўллари тавсифлаш имконини берган;

ноорганик полифосфатлар бош миёда сигналлар узатилишида иштирок этишини кўрсатувчи илмий натижалар Нью-Йорк университетиде ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда кальцийга боғлиқ сигнализациядаги

ролини ўрганиш билан боғлиқ тадқиқотларда фойдаланилган (Нью–Йорк университетининг 2018 йил 4 апрелдаги маълумотномаси). Илмий натижаларни қўллаш митохондрияларда поли-Ф ролини аниқлашда янги йўналиш шакллантириш имконини берди;

гипоосмотик шароит митохондрия мегаканалининг (РТР) фаоллигини бошқариш хусусиятига эғалигини кўрсатувчи илмий натижалар Лондон университети коллежи Неврология институтида молекуляр неврология бўлимида нейродегенерация ривожланишида РТР нинг иштирокини аниқлашда фойдаланилган (Неврология институтининг 2018 йил 28 мартдаги маълумотномаси). Илмий натижаларни қўллаш олигомер α -синуклеин билан РТР фаоллаштиришини интерпретация қилишга имкон берди.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 4 та халқаро ва 5 та республика миқёсидаги илмий–амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 15 та илмий иши чоп этилган, шулардан Springer нашриётида китобнинг 1 боби, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 5 та мақола, жумладан 1 таси республика ва 4 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, олтита боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 133 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

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

Диссертациянинг «Сут эмизувчилар ҳужайраларидаги ноорганик полифосфатлар» деб номланган биринчи бобида ноорганик полифосфатларга бағишланган адабиётлар шарҳи келтирилган – жумладан, уларнинг тарқалиши, детекция қилишнинг замонавий услублари, поли-Ф метаболизмида иштирок этувчи ферментлар, шунингдек ҳужайраларда турли хил жараёнларда поли-Ф иштироки тавсифланган. Митохондрияларда жараёнларда поли-Ф нинг иштирокига, ион каналларининг модуляциясига ва ҳужайрали шаперонларнинг ролини бажариш қобилятига алоҳида эътибор қаратилган.

Диссертациянинг «Митохондриялар ва уларнинг функциялари» деб номланган иккинчи бобида митохондрияларда F_1F_0 АТФ синтетаза ва митохондрия мегаканалининг (РТР) тузилиши ва функциясига ва шунингдек,

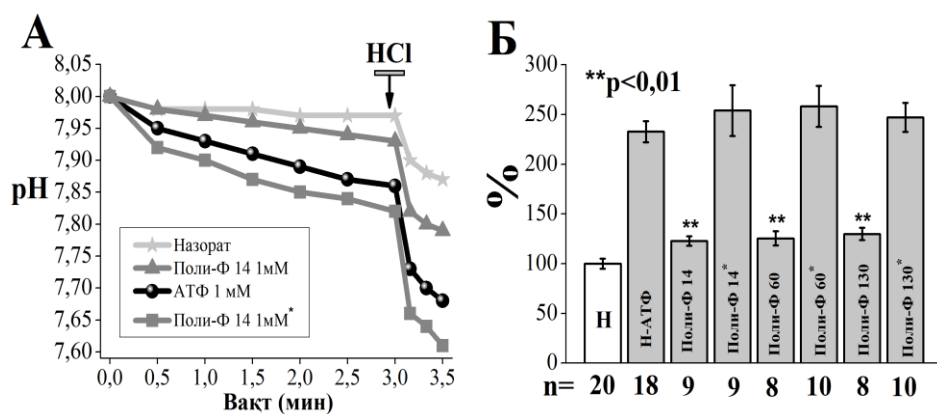
улар ўртасидаги боғлиқликка урғу берилган ҳолатда, митохондриялар ҳақидаги замонавий тасаввурлар баён қилинган. 2013-йилда РТР нинг асосий компоненти F_1F_0 АТФ синтетазадир, деган янги гипотеза пайдо бўлди. Ўша вақтдан буён адабиётда ушбу фаразни тасдиқловчи 50 дан ортиқ илмий нашриётлар пайдо бўлди, аммо бу ферментнинг РТР шаклланишида рол ўйнаётганини кўрсатадиган ишлар мавжуд.

Диссертациянинг «Марказий нерв тизимида ахборотларнинг узатилиши» деб номланган учинчи бобида МНТ да ахборотларнинг узатилиши механизмлари ҳақидаги умумий ва шунингдек, пуринергик сигнал тизими мисолида бу сигналларни узатиш тизимининг турли хужайралардаги иштироки ва баъзи патологиялар мисоллари батафсил адабиётлар шарҳи келтирилган.

Диссертациянинг «Митохондриал ва хужайра жараёнларига ноорганик полифосфатларнинг таъсирини баҳолаш усуллари» деб номланган тўртинчи бобида тадқиқот услублари, ишда фойдаланилган қурилмалар, асбоб–ускуналар, биологик, физик–кимёвий ва статистик таҳлил услублари тавсифланган. Ишларинг кўпчилиги флуоресцент спектроскопиясига, шунингдек, флуоресцент микроскопия (тасвир) га асосланган усуллар ёрдамида амалга оширилган.

Диссертациянинг бешинчи «Ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда жараёнларда иштироки» деб номланган бешинчи бобида ноорганик поли-Ф митохондрияларда F_1F_0 АТФ синтетаза ва мегаканал билан боғлиқлигини кўрсатиб берувчи олинган натижалар келтирилган.

Ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда F_1F_0 АТФ–аза фаоллигига таъсири. Олдин амалга оширилган тадқиқотларда митохондрияларда АТФ–синтетаза поли-Ф синтезида иштирок этиши мумкинлиги тахмин қилинган. F_1F_0 АТФ–синтетазанинг поли-Ф синтези/гидролизи жараёнларида иштироки ҳақидаги ушбу гипотезани текшириш учун, биз ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда F_1F_0 АТФ–аза фаоллигига таъсирини ўрганиш бўйича тажрибалар сериясини амалга оширдик.



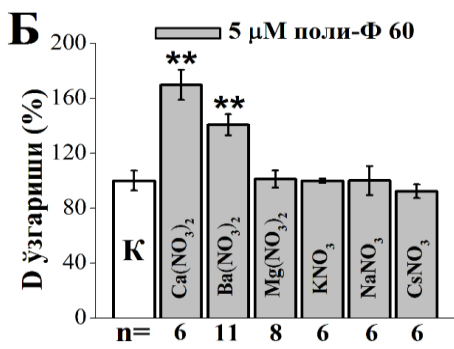
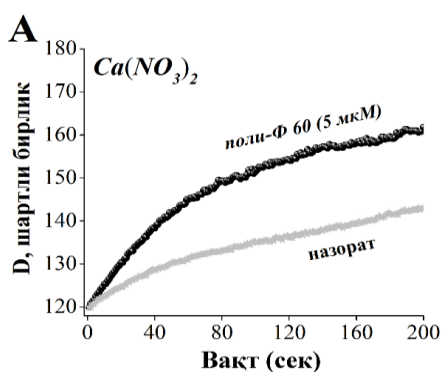
1–расм. Турли хил даражада полимерланишга эга бўлган ноорганик полифосфатларнинг каламуш жигари митохондрияларида АТФ синтетазанинг АТФ–аза фаоллигига таъсири.

А, Б. 1 мМ поли-Ф ва 1 мМ АТФ мавжуд шароитда ферментнинг АТФ-аза фаоллигини ифодалайди. Бунда Н – назорат; Н-АТФ – 1 мМ АТФ мавжуд шароитдаги назорат; поли-Ф – тизимда фақат 1 мМ поли-Ф мавжуд; поли-Ф* – тизимда 1 мМ поли-Ф ва 1 мМ АТФ мавжуд. А малг

а
оширилган тажрибалар давомида таркибида 14, 60 ва 130 та ортофосфат кислота қолдиғи мавжуд бўлган барча 3 та турдаги поли-Ф (поли-Ф, поли-Ф 60 ва поли-Ф 130) 1 мМ концентрацияда кўшилганда инкубация муҳитининг кислоталилиги ортиши аниқланди, яъни ушбу шароитда F₁F₀ АТФ-азанинг асосий субстрати – АТФ мавжуд бўлмаган ҳолатда поли-Ф митохондрияларда F₁F₀ АТФ-аза фаоллигини оширади (1А,Б-расм). Тизимда бир вақтда АТФ ва поли-Ф мавжуд шароитда кислоталаниш тезлиги яна ҳам ортади, бунда АТФ – Н-АТФ назоратга нисбатан ўртача 20,4% га ортиши аниқланди (1А, Б-расм), яъни АТФ нинг таъсири поли-Ф таъсири билан йиғинди кўринишда ифодаланади.

Олинган натижаларни митохондрияларда F₁F₀ АТФ-аза поли-Ф дан субстрат сифатида фойдаланиш хусусиятига эгаллиги билан изоҳлаш мумкин. Бироқ, биз таркибида тўлиқ митохондрия ферментлари «тўплами» мавжуд бўлган, субмитохондриял қисмлар билан ишладик ва бунда энергия ва ноорганик фосфат донори сифатида АТФ дан фойдаланиб, АТФ синтезловчи қандайдир номаълум фермент учун поли-Ф субстрат сифатида хизмат қилиши эҳтимоллиги ҳам мавжуд, бу ҳолатда АТФ якуний ҳолатда F₁F₀ АТФ-аза таъсирида парчаланади. Бироқ бу усул субстрат миқдорини ортиқча бўлишини назарда тутаяди, яъни бу ҳолатда ферментатив реакциясини тезлиги АТФ концентрациясига боғлиқмас. Бироқ, тизимда бир вақтнинг ўзида АТФ ва поли-Ф мавжуд шароитда агар F₁F₀ АТФ-аза поли-Ф ни бевосита парчаласа, ушбу 2 субстрат ферментнинг боғланиш хосил қилувчи жойига конкурент типда таъсир кўрсатиши қайд қилинади.

Ноорганик полифосфатларнинг митохондрияларда ионлар транспортига таъсири ва уларнинг митохондрия мегаканали феноменидаги иштироки. Поли-Ф нинг функциясидаги қизиқарли жиҳатлардан бири – бу, унинг РТР ҳодисасида иштироки ҳисобланади, бироқ поли-Ф нинг митохондриялар мембраналарининг ўтказувчанлигини ўзгартириши ёки бевосита тўғридан-тўғри РТР га таъсир кўрсатиши орқали РТР ҳодисасида иштирок этиши ноаниқлигича қолмоқда. Юқорида таъкидланганлардан келиб чиқиб, биз поли-Ф нинг митохондрияларда ионлар транспорти ва РТР фаоллашишидаги ролини ўрганиш бўйича тажрибаларни амалга оширдик.



2-расм. Поли-Ф дезэнергияланган шароитда митохондриялар индукцияланган бўқишини келтириб чиқариши. **А.** 5 мкМ поли-Ф мавжуд шароитда 60 таъсирида митохондрияларнинг бўқиши. **Б.** Поли-Ф

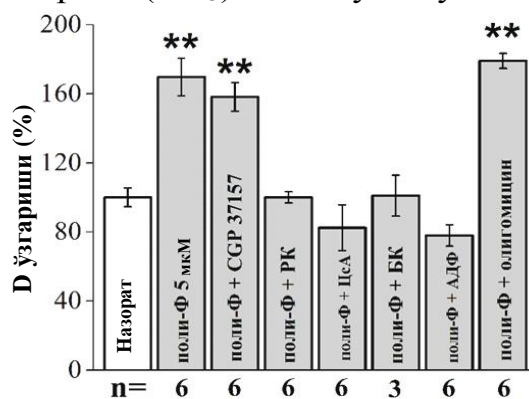
H таъсирида юзага келтирилган митохондрияларнинг бўкишининг танлаб таъсир кўрсатувчанлик оорг хусусияти. ** $p \leq 0,01$.

аник полифосфатлар дезэнергияланган митохондрияларда кальций ва барийнинг нофаол транспортини модуляцияси. Поли-Ф нинг митохондрияларда нофаол ўтказувчанликка таъсирини ўрганиш бўйича тажрибаларда барча учта турдаги поли – Ф (поли-Ф 14, поли-Ф 60 ва поли-Ф 130) таркибида $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ва $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ мавжуд бўлган муҳитда митохондрияларнинг бўкишини сезиларли даражада ошириши аниқланди, бироқ таркибида турли хил бир валентли катионлар ва магний ионлари мавжуд бўлган муҳитларда бу таъсир қайд қилинмайди (2А,Б–расм).

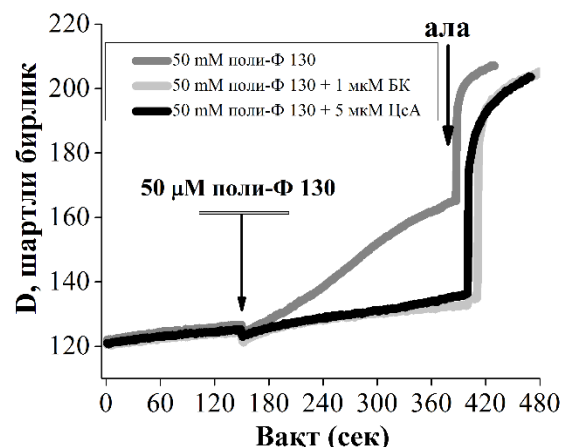
Поли-Ф таъсирининг табиатини аниқлаш учун, биз митохондрияларда айрим транспорт тизимларининг ингибиторларидан фойдаландик. Ингибиторлар қўлланилган барча тажрибалар $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ мавжуд муҳитда амалга оширилди. Шундай қилиб, поли-Ф эҳтимол, РТР ни фаоллаштириши орқали митохондрияларда бўкишни ишга тушириши қайд қилинади. Бироқ, бу таъсир иккиламчи тавсифга эга бўлиши, яъни кальций унипортёрнинг билвосита фаоллашиши ҳамда митохондрияларга кальцийнинг кириши орқали амалга ошиши ҳам мумкин (3–расм).

Поли-Ф нинг эҳтимоллиги мавжуд бўлган, бевосита мембранага таъсирини текшириш учун биз суъний липид кўшқаватли мембрана (ЛҚМ) билан тажрибаларни амалга оширдик. Тажрибалар кўрсатишича, учта турдаги поли-Ф 50–100 мкМ концентрацияда қўшилганда мембрана ўтказувчанлиги ортишини юзага келтирмайди. Поли-Ф нишонларини идентификациялаш учун биз интакт митохондриялар билан тажрибаларни амалга оширдик.

Ноорганик полифосфатлар мустақил равишда интакт дезэнергияланган митохондрияларда митохондриал мегаканалнинг очилишини фаоллаштириши. Тажрибалар натижалари кўрсатишича, турли хил даражада полимерланишга эга бўлган поли-Ф 5 мкМ концентрацияда мустақил ҳолатда митохондрияларнинг бўкишини юзага келтирмайди. Бироқ, ушбу концентрацияда поли-Ф 60 ва поли-Ф 130 кальций ионлари таъсирида РТР индукцияси шароитида бўкиш тезлиги ва амплитудасини ошириши аниқланди. Поли-Ф концентрациясининг 25–50 мкМ гача оширилиши тизимга кальций ионлари қўшилмаган ҳолатда ҳам митохондрияларнинг бўкишига олиб



3-расм. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ мавжуд шароитда поли-Ф таъсирида юзага келтирилган митохондрияларнинг бўкишининг ингибиторли таҳлили ** $p \leq 0,01$



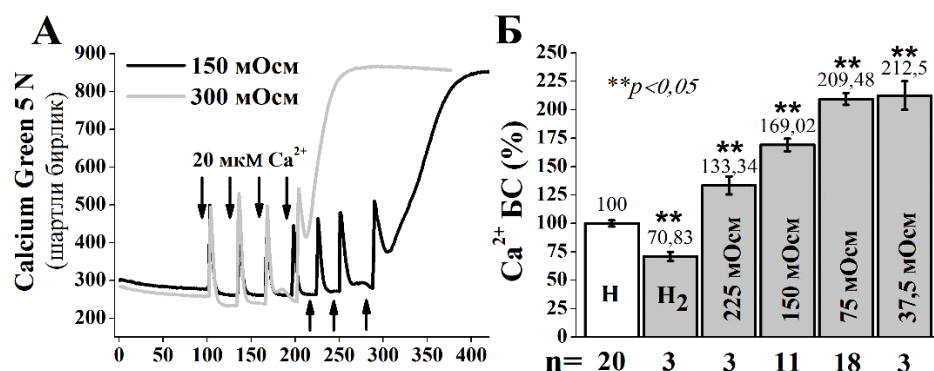
4-расм. Поли-Ф РТР фаоллаштириши

келиши аниқланди (4–расм). Деэнергияланган шароитда олинган натижаларни тасдиқлаш учун, биз энергияланган шароитда турли хил ингибиторлар мавжуд ҳолатда интакт митохондрияларни поли–Ф билан фаоллаштириш тажрибаларини амалга оширдик. Бунда ЦсА (n=6), БК (n=3) (4–расм) ва АДФ (n=7) поли–Ф таъсирини тўлиқ сусайтириши аниқланди, олигомицин А (n=6) ва CGP37157 (n=6) эса – деэнергияланган ва шунингдек, энергияланган шароитда ҳам поли–Ф таъсирида юзага келтирилган бўқишга ҳеч қандай таъсир кўрсатмаслиги кузатилди.

Шундай қилиб, ташқаридан қўшилган ноорганик полифосфатлар РТР ни фаоллаштириш хусусиятига эга ҳисобланишини аниқладик. Поли–Ф паст концентрацияда кальцийнинг фаоллаштирувчи таъсирини кучайтириши, нисбатан юқори концентрацияларда тизимга кальций ионларининг қўшича киритилишисиз, мустақил ҳолатда РТР ни фаоллаштириши аниқланди. Олдин амалга оширилган тадқиқотларда поли–Ф мавжуд бўлмаган шароитда кальций ионлари таъсирида РТР фаоллашиши деярли мумкин эмаслиги қайд қилинганлигини (Abramov et al. 2007) ҳисобга олиб, кальцийнинг ўзи фақатгина РТР нинг поли–Ф таъсирига нисбатан мойиллик пағонасини пасайтириши, РТР нинг фаоллашиши учун зарурий кофактор ҳисобланмаслигини тахмин қилиш мумкин.

Паст осмотик босимнинг митохондрия мегаканалининг кальций ва поли–Ф таъсирида фаоллашишига таъсири ҳамда бунда F_1F_0 АТФ синтетазанинг иштироки. Митохондрияларда АТФ синтетаза асосан, димер шаклида мавжуд бўлиши олдиндан маълум бўлиб, ушбу ферментнинг димеризацияси жараёнида мембранада маҳаллий букилиш соҳалари юзага келади, кенг кўламда бу жараён кристалларнинг шаклланишига олиб келади. Ҳозирги кунда F_1F_0 АТФ–синтетаза димерлари ва F_1F_0 АТФ синтетаза комплесининг F_0 суббирлиги бевосита РТР шаклланишида иштирок этиши тасдиқланган. Шундан келиб чиқиб, АТФ синтетаза димерлари РТР шаклланишида муҳим роль ўйнаши, димерларнинг шаклланиши эса – мембранада букилишлар ҳосил бўлишига олиб келиши асосида биз, митохондрия мембранасидаги маҳаллий букилишлар РТР нинг меъёрий функция бажаришида зарурий атрибут ҳисобланишини тахмин қилдик. Ушбу гипотезани текшириш учун, биз митохондрияларнинг «енгил бўқиши» орқали мембрана эгриланишини ўзгартирдик ва ушбу шароитда кальций ҳамда поли–Ф таъсирида РТР ни юзага келтирдик.

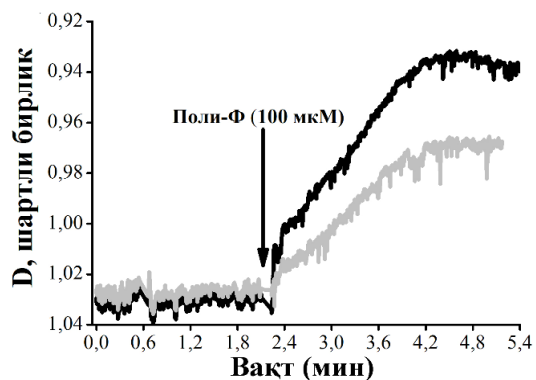
Паст осмотик босим шароитида РТР фаоллиги. Назоратда инкубация муҳитининг (ИМ) меъёрий осмотик босими (300 мОсм) шароитида $62,5 \pm 4,5$ мкМ Ca^{2+} қўшилиши РТР нинг очилиши ва митохондриядан ташқи муҳитга чиқувчи кальций ионларининг тўпланиши учун етарли ҳисобланади (5А–



5–расм. Паст осмотик босим митохондрияларда кальций буфер сифимининг ўзгариши. 15

расм). ИМ осмотик босимининг навбатдаги камайтирилиши кўрсатишича, ИМ осмотик босимининг маълум аниқ қийматгача ҳар сафар 25% га камайтирилишида, Ca^{2+} БС ортиши ва мос равишда, РТР ўртача $36 \pm 2\%$ га ингибирланиши аниқланди (5 Б–расмдаги K_2). Бироқ, митохондриялар паст осмотик босимли ИМ (150 мОсм) билан инкубацияланиши, кейин эса – ИМ осмотик босими қиймати меъёрий қийматгача (300 мОсм) келтирилиши шароитида митохондрияларда Ca^{2+} БС кўрсаткичи нафақат назорат қийматига қайтиши, балки ҳатто бироз камайиши кузатилади, бу ҳолат эҳтимол мембрана архитектурасида пертурбация таъсирида юзага келган стресс ҳисобига қайд қилиниши мумкин (5 Б–расм, H_2). ИМ осмотик босими камайтирилишининг таъсири митохондрияларда оксидланишли фосфорланиш жараёнларига таъсир кўрсатмаслиги қайд қилинди. РТР нинг классик ингибиторлари ЦсА ва АДФ билан амалга оширилган тажрибалар натижалари кўрсатишича, паст осмотик босимнинг Ca^{2+} БС га таъсири АДФ мавжуд шароитда ҳам кузатилади, бунда ушбу таъсир ингибиторнинг ўзининг таъсири билан йиғинди кўринишда бўлиши кузатилади, бироқ бу ҳолат ЦсА мавжуд шароитда кузатилмайди.

Паст осмотик босимнинг поли-Ф таъсирида юзага келтирилган РТР га таъсири. Юқорида кўрсатилганидек, ноорганик полифосфатлар кальций ионларининг қўшимча қўшилишисиз шароитда РТР ни фаоллаштириш хусусиятига эга ҳисобланади. Паст осмотик босим (150 мОсм) шароитида амалга оширилган тажрибалар натижалари кўрсатишича, 100 мкМ поли-Ф таъсири нафақат ингибирланмаслиги, балки аксинча кучайиши қайд қилинади (6–расм). Паст осмотик босимга (150 мОсм) эга муҳитда бўкиш тезлиги $53,4 \pm 10,4\%$ га ортиши кузатилади, яъни бунда 150 мОсм осмотик босимда ўлчанаётган кўрсаткич ҳам 50–65% диапазонда ўзгаради, бу ҳолат митохондрияларда Ca^{2+} БС бўйича олинган натижаларга мос келади, бироқ бунда таъсир қарама–қарши тавсифга эга ҳисобланади – яъни, РТР фаоллашиши мувафакқиятлироқ амалга ошади.



6–расм. Гипосомотик шароитда поли-Ф таъсирида РТР фаоллашиши.

Ҳозирги кунда Ca^{2+} таъсирида юзага келтирилган РТР ва унинг паст осмотик босим шароитида поли-Ф таъсирида фаоллашишининг аниқ механизмларини тахмин қилиш мураккаб масала ҳисобланади. Бу таъсирларнинг келиб чиқиши сабаблари сифатида биз бир нечта эҳтимоллиги мавжуд бўлган тахминларни келтириб ўтаемиз:

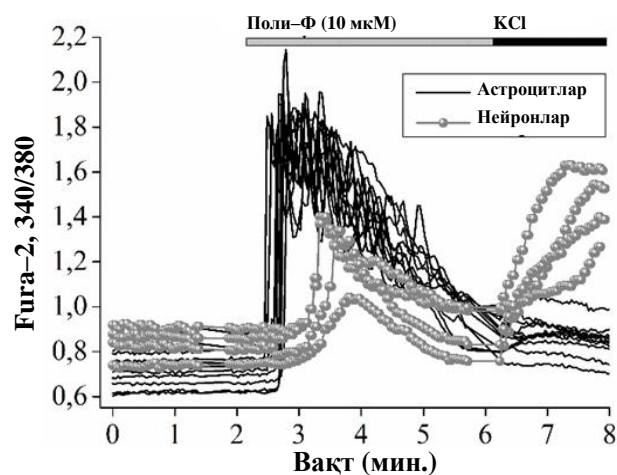
1) Митохондрияларнинг енгил тарзда бўкиши АТФ синтетаза димерлари ўртасидаги оралик масофа ортишига олиб келади ва бу ҳолат РТР нинг меъёрий функция бажаришида эҳтимол муҳим таркибий қисм ҳисобланувчи АТФ синтетаза димерлари архитектурасининг ўзгаришини белгилаб беради;

2) Мембрана архитектурасида пертурбация ва унга боғлиқ ҳолатда амалга ошувчи АТФ синтетаза димерлари конформациясининг ўзгаришлари

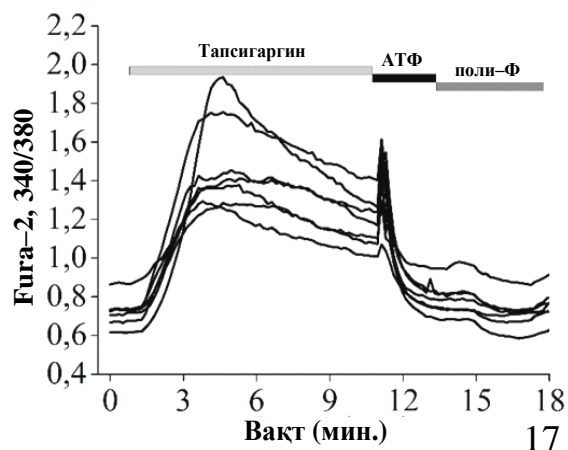
СуРD нинг РТР га аффинлик даражаси камайишига олиб келади, бу ҳолат ЦсА фонида таъсирнинг мавжуд эмаслиги ва Ca^{2+} БС ортишини изоҳлаб беради;

3) АТФ синтеза димерлари ўртасидаги масофа ортиши поли-Ф нинг РТР шаклланиш жойига осонлик билан кириб боришига олиб келади, бу ҳолат полимернинг юқори самарадорлигини таъминлайди.

Диссертациянинг «**Ноорганик полифосфатларнинг сигнал хоссалари**» деб номланган олтинчи бобида ноорганик полифосфатларнинг сут эмизувчиларнинг марказий нерв тизимида сигнал узатилишида иштироки тавсифланган. Поли-Ф ва АТФ структураси ўхшашлиги ҳар доим поли-Ф нинг сут эмизувчилар ҳужайраларида АТФ га ўхшаш функция бажариши мумкинлиги ҳақидаги масала илгари сурилган. АТФ мияда сигнал узатилишида иштирок этувчи молекула бўлиб, P2Y ва P2X рецепторлар стимуляцияси орқали кўпгина жараёнлар регуляция қилинади. АТФ ва поли-Ф структурасининг катта ўхшашликка эгалigidан келиб чиқиб, шунингдек мияда поли-Ф етарлича даражада катта концентрацияда бўлиши асосида, биз поли-Ф МНТ да сигналлар узатилишида иштирок этиши мумкинлигини тахмин қилдик.



7- расм. Поли-Ф нейронлар ва астроцитлар Ca^{2+} га боғлиқ жавобини юзага келтиради.

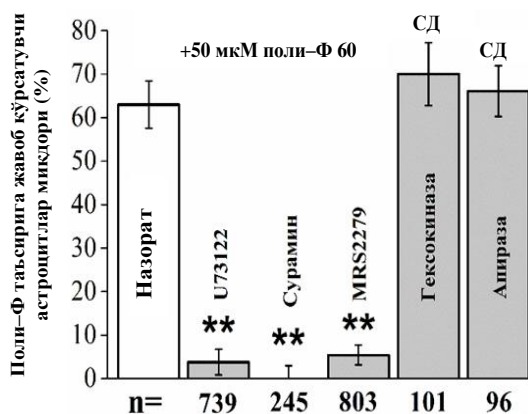


Ноорганик полифосфатлар астроцитларда кальцийга боғлиқ сигнал. Маълумки, нерв хужайраларининг маълум вақтда қўзғатилиши хужайра ичидаги Ca^{2+} концентрациясига боғлиқ. Биз поли-Ф бош мияда аниқланган концентрацияларда (25–120 мкМ) нерв хужайраларида хужайра ичидаги кальций концентрациясига таъсир кўрсатиши мумкинлигини тахмин қилдик. Тажрибалар учун каламушнинг бош миясининг учта бўлиmidан – яъни, бош мия катта яримшарлари пўстлоғи, гиппокамп ва ўрта мия нейронлари ва астроцитлари бирламчи со-культурасидан фойдаландик. Бунда хужайра ичида Fura 2 кальций зонди ёрдамида аниқлаш асосида, поли-Ф қўшилиши астроцитларнинг кўп қисмида ва фақат 3% нейронларда (n=120) хужайра ичидаги кальций концентрациясини ошириши аниқланди (7-расм). Поли-Ф концентрацияси ва тури кальцийли жавобнинг амплитудасига сезиларли таъсир кўрсатмайди, бироқ поли-Ф таъсирида кальцийли жавоб ишга тушган астроцитларда концентрацияси ва поли-Ф узунлигига боғлиқ ҳолатда, кальцийли сигнал 19 дан 74% гача вариацияланиши қайд қилинди.

8- расм. ЭР нинг бўшани астроцитларда поли-Ф таъсирини тўлиқ сусайтиради.

Кальций цитоплазмага хужайрлараро бўшлиқдан кириши ёки хужайра ичидаги деполардан чиқиши мумкин. 0,5 мМ ЭДТА мавжуд шароитда инкубация муҳитидан кальцийнинг олиб ташланиши поли-Ф таъсирида юзага келтирилган кальцийли жавобга таъсир кўрсатмайди. Ўз навбатида, SERCA нинг специфик ингибитори – тапсигаргин (1 мкМ) билан амалга оширилган тажрибалар натижалари кўрсатишича, поли-Ф қўшилиши астроцитларда цитоплазматик кальцийнинг ортишини юзага келтирмайди, бу ҳолат поли-Ф таъсирида кальций миқдорининг ортиши эндоплазматик ретикулумдан (ЭР) чиқиши ҳисобига амалга ошишини англатади (8-расм; n=101).

Ингибиторли таҳлиллар кўрсатишича, кальцийли жавоб фосфолипаза ингибитори – С U73122 (5 мкМ) ва кенг спектрдаги таъсирга эга бўлган, пуринорецепторлар ингибитори – сураминга (500 мкМ) боғлиқ ҳисобланади (9-расм). Навбатдаги тажрибалар кўрсатишича, поли-Ф бевосита P2Y_1 пуринорецепторга таъсир кўрсатади ва бу унинг специфик ингибитори – MRS2279 (50 мкМ) қўллаш ёрдамида тасдиқланди (9-расм). Поли-Ф нинг таъсири АТФ нинг қандайдир чиқишлари билан боғлиқ эмас, яъни хужайраларнинг АТФ ни парчаловчи апираза (25 U ml⁻¹) ва гексокиназа (25 U



мл⁻¹) каби ферментлар олдиндан инкубацияланиши расм) поли-Ф таъсирида юзага келтирилган кальцийли сигнал

9- расм. Астроцитларда поли-Ф таъсирида юзага келтирилган кальцийли жавобининг ингибиторли тахрили. **p≤0,005; СД – сезиларсиз даражада

билан (9–

кайд

килинувчи хужайралар сони ва сигнал амплитудасига ҳеч қандай таъсир кўрсатмайди. Шундай қилиб, хулоса қилиш мумкинки, хужайра ташқариси поли-Ф плазматик мембранада P2Y₁ рецепторлар билан боғланиши унга боғланган G оқсилнинг фаоллашиши ва ўз навбатида, фосфолипаза C активациясини келтириб чиқаради. Фосфолипаза C фаоллашиши таъсирида мембранада жойлашган IP₂ фосфолипиди IP₃ ва ДАГ га парчаланеди; бунда гидрофил тавсифга эга бўлган IP₃ мембранадан ажралади ва ЭР юзасида жойлашган IP₃ рецепторларни фаоллаштиради, натижада кальций каналлари очилади ва ЭР дан кальций концентрация градиенти бўйича цитоплазмага чиқарилади.

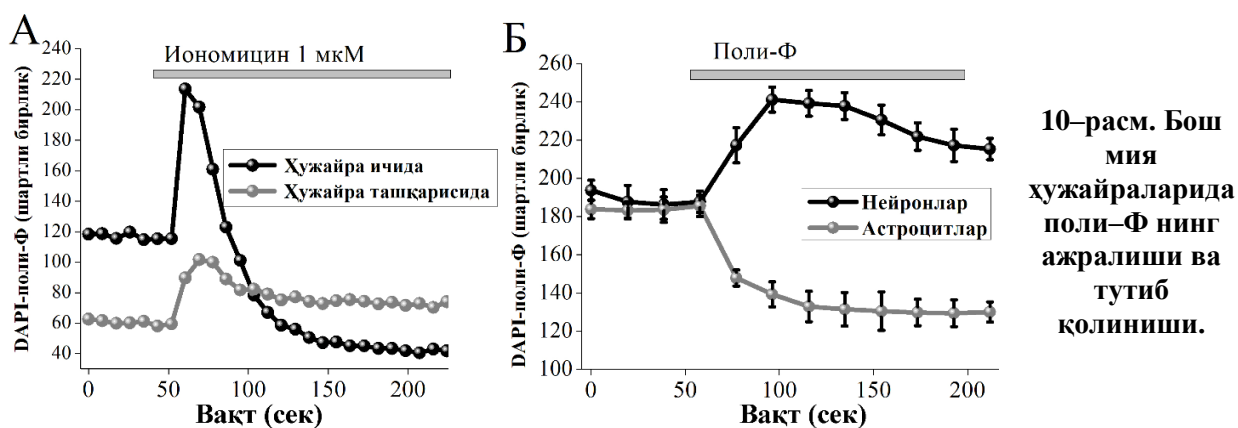
Поли-Ф – олдин тавсифланмаган глиотрансмиттер. Юқорида таъкидланганлардан келиб чиқиб, тахмин қилиш мумкинки, поли-Ф МНТ да иш бажарувчи, олдин тавсифланмаган трансмиттер ҳисобланади, бироқ нейробиологлар орасида нейро– ёки глиотрансмиттер молекулалар куйидаги 4 та асосий мезонларга жавоб бериши умумий қабул қилинган:

- 1) молекула пресинаптик хужайрада синтезланиши талаб қилинади;
- 2) молекула ҳаракат потенциали вақтида битта хужайрадан ажралиши ва бошқа хужайра ҳаракат потенциалини юзага келтириши талаб қилинади;
- 3) трансмиттер специфик механизмлар ёрдамида пресинаптик тирқишдан ажралиши талаб қилинади;

ташқаридан кўшилганда молекула нерв хужайрасидан ажралувчи трансмиттер таъсирини такрорлаши талаб қилинади.

Хужайраларда поли-Ф ни DAPI флуоресцент бўёғи ёрдамида кузатиш мумкин. Тажрибалар натижалари кўрсатишича, DAPI муҳитида астроцитларда поли-Ф асосан, ядро, митохондриялар, лизосомалар ва везикулаларни эслатувчи цитоплазматик тузилмалар соҳаларида жойлашади. DAPI муҳитидаги нейронлар ва астроцитларнинг со–культурасига 50 мкМ поли-Ф кўшилиши астроцитлар ички қисмида DAPI–поли-Ф таъсирида юзага келувчи чакнашнинг кескин сусайишига, бир вақтнинг ўзида унинг хужайра ташқарисида ортишига олиб келади, бу бизга поли-Ф таъсирида астроцитлардан поли-Ф чиқиши амалга ошишини кўрсатади (10Б расм; n=22). Кальций ионофори – иономицин (1 мкМ) кўшилиши ҳам астроцитлардан поли-Ф ажралишини юзага келтиради, бундан хулоса қилиш мумкинки, астроцитлардан поли-Ф ажралиши механизми кальцийга боғлиқ табиатга эга ҳисобланади (10А–расм; n=29). Навбатдаги тажрибаларда астроцитлардан поли-Ф нинг чиқиши яқин соҳада жойлашган нейронларда поли-Ф концентрациясининг ортиши билан амалга ошиши аниқланди (10Б–расм; нейронлар учун n=32 ва астроцитлар учун n=39). Бу тажрибалар натижалари нейронларнинг астроцитлардан чиқувчи поли-Ф ни тутиб қолиш хусусиятига эгаллигини кўрсатади. Шундай қилиб, мембрананинг ўзи поли-Ф учун ўтказувчан хусусиятига эга эмас, тахмин қилиш мумкинки, хужайра

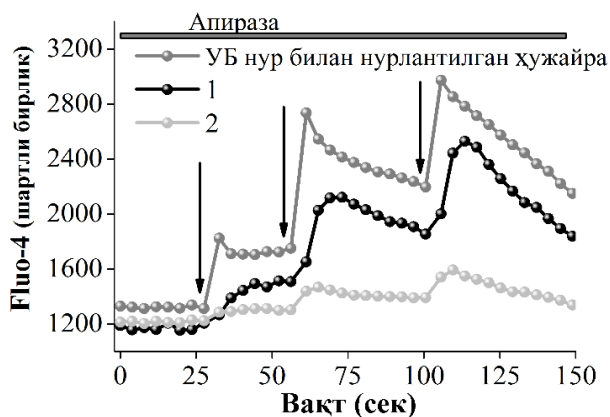
ташқарисидан нейронларнинг поли-Ф ни тутиб қолишининг махсус механизми мавжуд ҳисобланади.



10-расм. Бош мия хужайраларида поли-Ф нинг ажралиши ва тутиб қолиниши.

Битта хужайрадан ажралувчи ноорганик полифосфатлар ахборотни қўшни хужайраларга узатиш хусусиятига эга ҳисобланади. Астроцитлардан поли-Ф ажралиши механизми мавжудлиги аниқланганидан кейин, шунингдек унинг кальцийга боғлиқ табиатга эгаллиги қайд қилинганидан сўнгра, бизга битта хужайрадан ажралувчи поли-Ф қўшни хужайрада кальцийли сигнални ишга тушириши мумкин ёки мумкинмаслиги қизиқиш ўйғотди. Навбатдаги тажрибалар серияси учун ультрабинафша (УБ) нурланиш билан нурлантирилган фақат битта хужайра кальцийли сигналнинг ишга тушириш учун фото-сезгир Ca^{2+} -хелатор NP-EGTA фотолизидан фойдаланилди. Тажрибаларда хужайра NP-EGTA AM ва Fluo 4 AM кальций зондига туширилди. Тажрибалар натижалари кўрсатишича, битта хужайранинг нурлантирилиши шароитида Fluo 4 чақнаши интенсивлиги ва мос равишда, кальций концентрацияси қўшни хужайраларда ортиши аниқланди. УБ нур билан нурлантирилган хужайрада кальцийнинг ажралиши қўшни хужайраларда кальцийли жавобни ишга туширади ва бу жавоб АТФ нинг ажралишига боғлиқ эмаслиги аниқланди (11-расм). Ўз навбатида, сурамин ва MRS2279 таъсирида қўшни хужайралардаги кальцийли сигнал блокланди, бу ҳолат бизга УБ нур билан нурлантирилган хужайрада кальцийли сигналдан кейин айнан, поли-Ф ажралиши ва қўшни хужайраларда кальцийли сигнални

ишга туширишини кўрсатади. Юқорида таъкидланганлардан келиб чиқиб, хужайранинг қўзғатилиши шароитида поли-Ф ажралиши амалга ошади, ўз навбатида қўшни хужайраларнинг $P2Y_1$ рецепторлари билан боғланиш хосил қилади ва ЭР дан кальцийнинг чиқишини ишга туширади; синаптик тирқишдан поли-Ф элиминацияси поли-Ф нинг яқин жойлашган нейронлар томонидан тутиб қолиниши ҳисобига амалга ошади. Шундай қилиб, поли-



11- расм. УБ нур билан нурлантирилган хужайралардан ажралган поли-Ф қўшни хужайраларда кальцийли сигнални ишга туширади

Ф трансмиттерларнинг барча 4 та мезонига мос келади ва ўз навбатида, уларни глиотрансмиттер деб номлаш мумкин (бунда асосан, астроцитлар поли-Ф га жавоб бериши қайд қилинади).

ХУЛОСАЛАР

1. Митохондрияларда F_1F_0 АТФ-аза ноорганик поли-Ф таъсирида фаоллашиши ва бу таъсир тизимда АТФ мавжудлигига боғлиқ эмас.

2. Ноорганик полифосфатлар деэнергияланган митохондрияларда Ca^{2+} ва Ba^{2+} учун (бирок Na^+ , K^+ , Cs^+ ва Mg^{2+} учун эмас) ўтказувчанликни оширади. Поли-Ф нинг нофаол транспортига кальций ионларини таъсири митохондрия мегаканалининг очик ҳолатига боғлиқ, лекин поли-Ф митохондрия мембранага тўғридан-тўғри таъсирига эмас, балки митохондрия мегаканалининг функционал ҳолатига боғлиқ, чунки поли-Ф кальций ионлари БЛМ ўтказувчанлигини ўзгартирмайди.

3. Ноорганик полифосфатлар 25–50 мкМ концентрацияда кальций ионларисиз шароитда энергияланган митохондрияларда мегаканални фаоллаштиради.

4. Паст осмотик босим кальций индуцирлаган РТРни (митохондрияларнинг кальцийли буфер сиғими ортиши ҳисобига) ингибирлайди, лекин, аксинча ноорганик полифосфатлар РТРни янада фаоллашишига олиб келади.

5. Ноорганик полифосфатлар физиологик концентрацияларда 74% дан кўпроқ астроцитларда ва 3% нейронларда хужайра ичидаги кальций миқдорини оширишини ишга тушириши аниқланди. Астроцитларда поли-Ф $P2Y_1$ типдаги пуринорецепторларга боғланиш хосил қилади ва эндоплазматик ретикулумдан кальцийнинг чиқишини таъминловчи IP_3 йўлини ишга туширади.

6. Ноорганик полифосфатлар $P2Y_1$ типдаги пуринорецепторларнинг агонисти бўлиб, мия астроцитларида бевосита сигналлаш функцияларини амалга ошириши мумкинлиги ва бунда МНС сигнал молекулаларнинг асосий мезонларига мос келади.

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА

БАЕВ АРТЁМ ЮРЬЕВИЧ

**РЕГУЛЯТОРНАЯ И МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РОЛЬ НЕОРГАНИЧЕСКИХ
ПОЛИФОСФАТОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.00.02-Биофизика и радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)**

Ташкент-2018

Тема диссертации доктора философии (PhD) по биологическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2017.2.PhD/В85

Диссертация выполнена в Национальном Университете Узбекистана.

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

Научный руководитель: **Ташмухамедов Бекжан Айбекович**
доктор биологических наук, академик

Официальные оппоненты: **Мерзляк Пётр Григорьевич**
доктор биологических наук

Камбурова Венера Сейтумеровна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Ведущая организация: **Ташкентский педиатрический медицинский институт**

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

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

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2018 года
(реестр протокола рассылки № «__» от _____ 2018).

Ш.И.Салихов

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

М.И.Асраров

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

Ш.У.Турдикулова

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

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В последнее время в мире возрос интерес и соответственно увеличивается количество работ, направленных на выявление роли неорганических полифосфатов (поли-Ф) в клетках млекопитающих. Несмотря на то, что поли-Ф впервые были обнаружены еще в 19 веке, четко сформированные представления о их роли в клетках млекопитающих начали появляться лишь 12-14 лет назад. За этот период было показано, что поли-Ф участвуют во многих физиологических и патофизиологических процессах и являются неотъемлемой частью жизнедеятельности клетки. Отдельный интерес представляет их участие в развитии различных заболеваний. Было показано, что метаболизм поли-Ф меняется при различных сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях, однако является ли это причиной или следствием патологии остается неизвестным.

В настоящее время во всем мире стратегия создания новых эффективных лекарственных средств опирается на фундаментальные знания молекулярных механизмов функционирования клетки в нормальном состоянии и при патологии. В ряде последних работ было показано участие поли-Ф в активации митохондриального мегаканала (РТР), а также в транспорте ионов кальция. Неконтролируемая активация РТР и нарушения транспорта ионов кальция являются причиной клеточной смерти при различных заболеваниях. Соответственно выяснение молекулярных механизмов функционирования поли-Ф в различных физиологических процессах может дать ответ на актуальные вопросы касательно лечения, реабилитации или диагностики заболеваний при которых происходит неконтролируемая активация РТР или нарушение кальциевого гомеостаза, к которым в свою очередь относятся различные сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания.

В настоящее время в нашей стране уделяется особое внимание созданию отечественных препаратов оказывающих влияние на сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, способные заменить их импортируемые аналоги. На основе программных мер, принятых в этом направлении, получены определенные результаты по поиску и разработке эффективных препаратов из местного сырья, где определение молекулярных механизмов запуска клеточной смерти ионами кальция занимают основополагающую роль. В Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан¹ отмечается необходимость поощрения научно-исследовательской и инновационной деятельности, а также создания эффективных механизмов внедрения научных достижений в практику, в связи с чем определение роли поли-Ф в клетках млекопитающих приобретает важное научно-практическое значение, так как позволит обнаружить ранее

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

неизвестные аспекты патогенеза ряда заболеваний, что в дальнейшем приведет к разработке новых методов их лечения.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Постановлении Президента Республики Узбекистан ПП-3365 от 1 ноября 2017 г. «О мерах по дальнейшему укреплению инфраструктуры научно-исследовательских учреждений и развитию инновационной деятельности», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики V: «Биология, биотехнология, почвоведение, водные проблемы, вопросы генетики, селекции растений».

Степень изученности проблемы. Информация о том, что поли-Ф присутствует в клетках млекопитающих была получена еще в 20-м веке, однако отчеты об исследованиях функций этой молекулы начали появляться лишь в последние годы. За этот период было показано, что поли-Ф участвует в коагуляции крови и воспалении (Morrissey J. 2017), пролиферации клеток (Jimenez-Nunez M. D. 2012), ангиогенезе (Han K. Y. 2007), биоэнергетике клеток (Pavlov E. 2010), регуляции активности ионных каналов (Kim D. 2007, Zakharian E. 2009), фосфорилировании белков (Azevedo C. 2015), упаковке белковых молекул (Cremers C. M. 2016, Gray M. J. 2014) и т.д., однако многие механизмы функционирования поли-Ф во многих из указанных процессов до сих пор не выяснены. В последние годы достигнуты заметные успехи в изучении функций поли-Ф на клеточном уровне за счет разработки современных флуоресцентных методов их анализа (Aschar-Sobbi 2008, Angelova 2014). Несмотря на то, что до сих пор не найдено ферментов, отвечающих за синтез поли-Ф в клетках млекопитающих, было убедительно показано, что вероятным местом синтеза поли-Ф являются митохондрии, а уровень поли-Ф зависит от функционального состояния дыхательной цепи митохондрий (Pavlov E. 2010).

В странах СНГ основные заслуги в изучении функций поли-Ф принадлежат группе проф. Игоря Степановича Кулаева (член корреспондент РАН) в МГУ и Институте Биохимии и Физиологии Микроорганизмов РАН (г. Пущино), которая имеет более 50 лет опыта работы в области биохимии высокомолекулярных полифосфатов, однако данная группа в основном специализируется на изучении поли-Ф на уровне прокариот и низших эукариот.

В Республике Узбекистан исследования роли поли-Ф в животных клетках не проводились. В связи с вышесказанным, является актуальным и представляет несомненный интерес изучение функций неорганических полифосфатов в клетках млекопитающих.

Связь исследования с планом научно-исследовательских работ высшего учебного заведения, где выполнена диссертационная работа. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментального проекта Национального Университета Узбекистана Ф-5-06 «Изучение механизма действия некоторых биорегуляторов» (2012-2016); в рамках плана научно-исследовательских работ молодежного фундаментального проекта Учебно-Экспериментального Центра Высоких Технологий Ф-5-001 «Роль неорганических полифосфатов в регуляции метаболизма клеток млекопитающих» (2016-2017); в рамках плана научно-исследовательских работ проекта Института биоорганической химии ФА-Ф5-Т080 «Молекулярная физиология и биофизика объём-активируемого анионного транспорта» (2012-2016); в рамках плана научно-исследовательских работ проекта “Novel properties of phylogenetically ancient molecule in the mammalian cells” при поддержке гранта RPG-2012-447 The Leverhulme Trust (2010 – 2012), лаборатории проф. Абрамова А.Ю., отделение Молекулярной Нейробиологии института Неврологии, Университетского Колледжа Лондона (Лондон, Великобритания); в рамках плана научно-исследовательских работ проекта «Molecular regulation of the permeability transition pore» (2014), лаборатории Др. Павлова Е.В., отделение Физиологии и Биофизики, Университета Далхаузи (Галифакс, Канада).

Целью исследования является определение роли неорганических полифосфатов в клетках млекопитающих.

Задачи исследования:

изучить влияние неорганических полифосфатов на активность митохондриальной F_1F_0 АТФ-азы;

изучить влияние неорганических полифосфатов на проницаемость мембран митохондрий для различных ионов;

изучить влияние неорганических полифосфатов в формировании/активации митохондриального мегаканала (РТР);

изучить влияние низкого осмотического давления на активацию РТР кальцием и неорганическими полифосфатами;

изучить влияние неорганических полифосфатов на кальциевый гомеостаз клеток ЦНС;

изучить участие неорганических полифосфатов в передаче сигнала в ЦНС.

Объектом исследования данной работы являются первичные культуры нейронов и астроцитов коры больших полушарий мозга, гиппокампа и среднего мозга крыс, а также митохондрии и субмитохондриальные частицы, выделенные из печени крыс.

Предметом исследования является участие неорганических полифосфатов в процессах, связанных с функционированием митохондриальной АТФ синтетазы, РТР, а также в процессах передачи информации в ЦНС.

Методы исследования. В работе использованы методы флуоресцентной, конфокальной и электронной микроскопии, флуориметрии,

спектрометрии, формирования бислойных липидных мембран (БЛМ), полярографии, регистрации ферментативной активности методом рН метрии, ведение первичных культур клеток, а также различные методы статистического анализа.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

доказано влияние поли-Ф на АТФ-азную активность F_1F_0 АТФ синтетазы митохондрий, что говорит о том, что поли-Ф может являться ранее не идентифицированным субстратом для данного фермента;

охарактеризована модуляция неорганическими полифосфатами пассивной проницаемости внутренней мембраны деэнергизованных митохондрий, для ионов кальция и бария, связь этих процессов с активацией митохондриального мегаканала, а также доказано, что неорганические полифосфаты в физиологических концентрациях (25-50 μ M) активируют митохондриальный мегаканал (РТР) энергизованных митохондрий;

показано обратимое изменение структуры внутренней мембраны митохондрий гипоосмотическими условиями за счет «мягкого набухания» митохондрий, что приводит к увеличению кальциевой буферной ёмкости митохондрий и ингибированию митохондриального мегаканала (РТР), но напротив способствуют более эффективной его активации поли-Ф;

убедительно доказано - поли-Ф, ранее не идентифицированные глиотрансмиттеры передающие информацию через пуринорецепторы типа $P2Y_1$.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

продемонстрировано увеличение АТФ-азной активности F_1F_0 АТФ синтетазы митохондрий в присутствии поли-Ф, а также то, что эффект поли-Ф не зависит от присутствия основного субстрата данного фермента - АТФ;

исследовано воздействие поли-Ф на пассивный транспорт некоторых моно и ди-валентных катионов через митохондриальную мембрану, а также зависимость эффекта поли-Ф от функционирования различных транспортных систем митохондрий;

посредством ингибиторного анализа продемонстрировано, что эффект поли-Ф на проницаемость митохондриальной мембраны, связан с активацией митохондриального мегаканала, а также, что данная активность не связана со входом в митохондрии цитоплазматического кальция;

исследована связь между низким осмотическим давлением и активацией митохондриального мегаканала ионами кальция и неорганическими полифосфатами. Продемонстрировано, что низкое осмотическое давление изменяет кривизну внутренней мембраны митохондрий, а также, что данные изменения не влияют на биоэнергетические параметры митохондрий;

исследовано участие внеклеточного поли-Ф в кальциевом гомеостазе со-культур нейронов и астроцитов трех участков мозга – коры больших полушарий, гиппокампа и среднего мозга крыс. Посредством ингибиторного анализа были обнаружены сигнальные системы, при помощи которых поли-

Ф запускают процессы увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в астроцитах;

обнаружено, что эффект поли-Ф на кальциевый гомеостаз связан с его способностью передавать информацию между астроцитами. Во время экспериментов было обнаружено, что поли-Ф накапливается в астроцитах, увеличение концентрации внутриклеточного кальция способствует выбросу поли-Ф из астроцитов во внеклеточное пространство; внеклеточный поли-Ф соединяясь со специфическими рецепторами соседних астроцитов запускают в них процессы кальциевой сигнализации тем самым распространяя информацию от одной клетки другой. Внеклеточный поли-Ф может быть захвачен близлежащими нейронами.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что экспериментальные данные получены при помощи современных лабораторных методов, статистическую обработку результатов производили при помощи критерия Стьюдента. Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, обсуждение их на республиканских и международных конференциях, и публикация результатов исследования в ведущих рецензируемых научных журналах.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в том, что они дополняют знания о поли-Ф на уровне митохондрий: экспериментально продемонстрирована возможность F_1F_0 АТФ синтетазы митохондрий участвовать в метаболизме поли-Ф; показана прямая связь поли-Ф с митохондриальным мегаканалом и раскрыты фундаментальные механизмы влияния изменения объема митохондрий на активацию митохондриального мегаканала кальцием и поли-Ф. На внеклеточном уровне доказано, что поли-Ф может выполнять функции сигнальной молекулы в ЦНС, и передавать сигнал между астроцитами.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что они могут служить основой для разработки нового направления регуляции клеточной смерти, связанной с неконтролируемой активацией митохондриального мегаканала, при различных заболеваниях - таких как, ишемия-реперфузия, различные нейродегенеративные заболеваниях и т.д. Нами было обосновано, что поли-Ф в физиологических концентрациях является активатором данной поры, ранее же показывалось, что при отсутствии поли-Ф в митохондриях пора не может быть активирована ионами кальция, т.е. убедительно доказано, что поли-Ф является необходимым компонентом РТР. На сегодняшний день, несмотря на большое количество ингибиторов РТР, большинство из них не проходит клинические испытания, т.е. проблема подавления клеточной смерти за счет неконтролируемого открытия РТР остается актуальной. Таким образом полученные результаты могут найти практическое применение в медицине, например, регуляция уровня поли-Ф может стать решением проблемы клеточной смерти от неконтролируемого открытия РТР при таких

заболевания как ишемический инфаркт, ишемический инсульт, болезнь Паркинсона и т.д.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов о регуляторной и метаболической роли неорганических полифосфатов в клетках млекопитающих:

данные о способности поли-Ф запускать увеличение концентрации внутриклеточного кальция через пуринорецепторы типа P2Y₁ были использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при анализе механизмов участия поли-Ф в процессах воспаления (Blood 2014, V.123, Scopus CiteScore – 7.21; Journal of Thrombosis and Haemostasis 2015, V.13, Scopus CiteScore - 3.85; Molecular Cell 2016, V.63, ResearchGate IF - 10.54). Применение научных результатов позволило раскрыть механизмы функционирования поли-Ф в некоторых процессах;

научные результаты показывающие, что поли-Ф являются ранее не идентифицированными глиотрансммиттерами, использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при описании сигнальных путей распространения информации в астроцитах (Nature Neuroscience 2016, V. 19, Scopus CiteScore – 13.31; Molecular Cell 2014, V.53, ResearchGate IF - 5.65; Glia 2018, V. 66, Scopus CiteScore - 6). Применение научных результатов дало возможность расширить знания о системе передачи информации между астроцитами в ЦНС;

научные результаты показывающие, что поли-Ф воздействуют на проницаемость митохондриальной мембраны и эта проницаемость связана с активацией митохондриального мегаканала использованы в зарубежных журналах с высоким импакт-фактором при описании активаторов митохондриального мегаканала (Aging Cell 2017, V.16, Scopus CiteScore - 7.21; International Journal of Molecular Sciences 2017, V.18, Scopus CiteScore – 3.86; Tumor biology 2017, V.39, Scopus CiteScore – 3.27). Применение научных результатов дало возможность характеристики структуры РТР, а также описанию новых путей запуска клеточной смерти;

научные результаты показывающие, что поли-Ф участвуют в передаче сигналов в головном мозге в использованы в научном проекте Университета Нью Йорка, связанным с определением роли неорганических полифосфатов в кальциевой сигнализации митохондрий (справка Университета Нью Йорка от 4 апреля 2018 года). Применение научных результатов позволило сформировать новое направление в изучении роли поли-Ф в митохондриях;

научные результаты, показывающие, что гипоосмотические условия способны регулировать активность митохондриального мегаканала (РТР) использованы в институте Неврологии, Университетского Колледжа Лондона, в проекте, связанном с исследованием участия РТР в развитии нейродегенерации (справка института Неврологии от 28 марта 2018 года). Применение результатов позволило правильно интерпретировать результаты связанные с активацией РТР олигомерным α-синуклеином.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 4 зарубежных и 5 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 15 печатных работ, из них 1 глава в книге издательства Springer, 5 научных статей, в том числе 4 статьи в ведущих зарубежных рецензируемых журналах и 1 статья в республиканском журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 133 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенных исследований, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования как приоритетным мировым направлениям, так и направлениям развития науки и технологий Узбекистана. Излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение результатов исследования в практику, сведения об опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Неорганические полифосфаты в клетках млекопитающих**» приведен подробный обзор литературы, посвященной поли-Ф – их распространению, современным методам детекции, ферментам, участвующим в метаболизме поли-Ф, а также описанию участия поли-Ф в различных клеточных процессах. Особое внимание уделено участию поли-Ф в митохондриальных процессах, модуляции активности ионных каналов, а также их способности выполнять роль клеточных шаперонов.

Во второй главе «**Митохондрии и их функции**» описаны современные представления о митохондриях, с акцентом на строение и функционирование митохондриальной F_1F_0 АТФ синтетазы и митохондриального мегаканала (РТР), а также связи между ними. В 2013 году появилась новая гипотеза о том, что основным компонентом РТР является F_1F_0 АТФ синтетаза. С тех пор в литературе появилось более 50 научных публикаций подтверждающих данную гипотезу, однако имеются работы показывающие, что данный фермент не играет ключевую роль в формировании РТР.

В третьей главе «**Передача информации в центральной нервной системе**» приведен подробный обзор литературы с описанием механизмов передачи информации в ЦНС в общем, а также на примере пуринергической системы сигнализации с примерами участия данной системы передачи сигнала в различных клетках, а также при некоторых патологиях.

В четвертой главе диссертации «**Методы оценки влияния неорганических полифосфатов на митохондриальные и клеточные**

процессы» описаны методы исследований, приборы, оборудование, биологические, физико-химические и статистические методы анализа, использованные в работе. Большая часть работа выполнена с использованием методов, основанных на флуоресцентном анализе – флуоресцентная спектроскопия, а также флуоресцентная микроскопия (визуализация).

В пятой главе «Участие неорганических полифосфатов в митохондриальных процессах» приведены результаты, показывающие связь поли-Ф с F_1F_0 АТФ синтетазой и митохондриальным мегаканалом.

Влияние неорганических полифосфатов на активность F_1F_0 АТФ-азы митохондрий. Ранее в работах предполагалось, что АТФ-синтаза митохондрий может участвовать в процессах синтеза поли-Ф. Для проверки гипотезы об участии F_1F_0 АТФ-синтазы в процессах синтеза/гидролиза поли-Ф мы провели серию экспериментов по изучению влияния поли-Ф на активность F_1F_0 АТФ-азы митохондрий.

В ходе экспериментов было показано, что добавка всех 3 видов поли-Ф - содержащих 14, 60 и 130 остатков ортофосфорной кислоты (поли-Ф 14, поли-Ф 60 и поли-Ф 130 соответственно), в концентрации 1 мМ, способствовала увеличению закисления среды инкубации, т.е. поли-Ф в данных условиях увеличивает активность F_1F_0 АТФ-азы митохондрий без наличия основного субстрата F_1F_0 АТФ-азы – АТФ (рис. 1 А, Б). Когда же в системе одновременно присутствовали и АТФ и поли-Ф скорость закисления увеличивалась еще больше, в среднем на 20,4 % относительно контроля с АТФ – К-АТР (рис. 1 А, Б), т.е. эффект АТФ суммировался с эффектом поли-Ф.

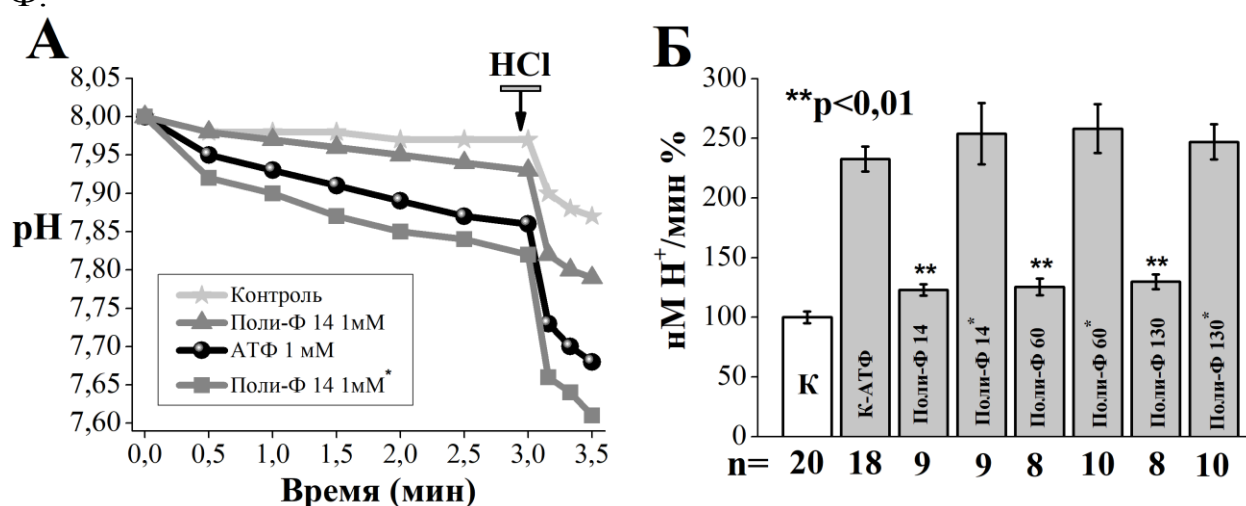


Рис. 1. Влияние неорганических полифосфатов разной степени полимеризации на АТФ-азную активность АТФ синтетазы митохондрий печени крыс. А, Б АТФ-азная активность фермента в присутствии 1 мМ поли-Ф и 1 мМ АТФ. К- контроль; К-АТФ – контроль в присутствии 1 мМ АТФ; поли-Ф – в системе присутствует только 1 мМ поли-Ф; поли-Ф* - в системе присутствует 1 мМ поли-Ф и 1 мМ АТФ.

Полученные данные можно объяснить тем что F_1F_0 АТФ-аза митохондрий способна использовать поли-Ф в качестве субстрата. Однако так как мы работали с субмитохондриальными частицами, содержащими полный «набор» митохондриальных ферментов, есть вероятность, что поли-Ф служит субстратом для какого-либо неизвестного фермента который

синтезирует АТФ используя поли-Ф в качестве донора энергии и неорганического фосфата, а АТФ в последствии уже расщепляется F_1F_0 АТФ-азой. В тоже же время, данный метод предполагает наличие избыточного количества субстрата - АТФ, т.е. скорость ферментативной реакции в данном случае не зависит от концентрации АТФ. Следовательно, если поли-Ф сначала конвертировался в АТФ это бы не влияло на общую скорость реакции при одновременном присутствии субстратов в системе.

Влияние неорганических полифосфатов на митохондриальный транспорт ионов, и их участие в феномене митохондриального мегаканала. Одним из интригующих аспектов функционирования поли-Ф является его участие в явлении РТР, однако остается неясным, участвует ли поли-Ф в явлении РТР изменяя проницаемость мембраны митохондрий или же на прямую воздействует на РТР. Исходя из вышесказанного нами были проведены эксперименты по изучению роли поли-Ф в митохондриальном транспорте ионов и в активации РТР.

Модуляция пассивного транспорта кальция и бария в деэнергизованных митохондриях неорганическими полифосфатами. Эксперименты по изучению влияния поли-Ф на пассивную проницаемость митохондрий показали, что все три вида поли-Ф (поли-Ф 14, поли-Ф 60 и поли-Ф 130), значительно увеличивали набухание митохондрий в среде, содержащей $Ca(NO_3)_2$ и $Ba(NO_3)_2$, но не в средах с различными одновалентными катионами, и ионами магния (рис. 2 А и Б).

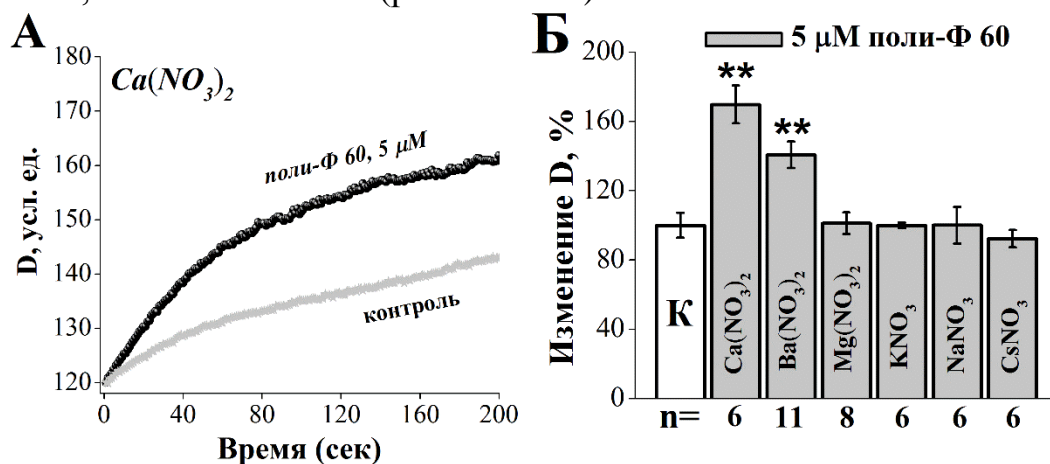


Рис. 2. Поли-Ф-индуцируемое набухание митохондрий в деэнергизованных условиях. А. Набухание митохондрий в $Ca(NO_3)_2$ в присутствии 5 μ M поли-Ф 60; **Б.** Селективность поли-Ф индуцированного набухания митохондрий, ** $p \leq 0,01$.

Для определения природы эффекта поли-Ф нами были применены ингибиторы некоторых транспортных систем митохондрий. Все эксперименты с применением ингибиторов проводились в среде с $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Было показано, что поли-Ф запускает набухание митохондрий вероятнее всего активируя РТР. Однако, данный эффект может быть вторичным и быть опосредованным активацией кальциевого унипортера и входом кальция внутрь митохондрий (рис. 3).

Для проверки возможности воздействия поли-Ф непосредственно на мембрану нами были проведены эксперименты с бислойными искусственными липидными мембранами (БЛМ). Эксперименты показали, что добавка поли-Ф в концентрации 50-100 μM всех трех видов поли-Ф, не вызывает увеличения проводимости мембраны. Для идентификации мишени поли-Ф мы провели эксперименты с интактными митохондриями.

Активация митохондриального мегаканала интактных энергизованных митохондрий неорганическими полифосфатами. Эксперименты показали, что

поли-Ф разной степени полимеризации в концентрации 5 μM не вызывают набухание митохондрий самостоятельно. Однако было обнаружено, что поли-Ф 60 и поли-Ф 130 в данной концентрации увеличивают скорость и амплитуду набухания при индукции РТР ионами кальция. Увеличение концентрации поли-Ф до 25-50 μM , привело к набуханию митохондрий, без внесения в систему дополнительно ионов кальция (рис. 4). Для удостоверения результатов, полученных в деэнергизованных условиях мы провели эксперименты активируя интактные митохондрии поли-Ф в присутствии различных ингибиторов в энергизованных условиях. Было показано, что ЦсА, БК и АДФ полностью подавляют эффект поли-Ф; олигомицин А и CGP37157 не оказывали никакого эффекта на поли-Ф индуцируемое набухание, как и в деэнергизованных условиях (рис. 4).

Таким образом нами показано, что поли-Ф, добавленные из вне, способны активировать РТР. Низкие концентрации поли-Ф способны усиливать активирующий эффект кальция,

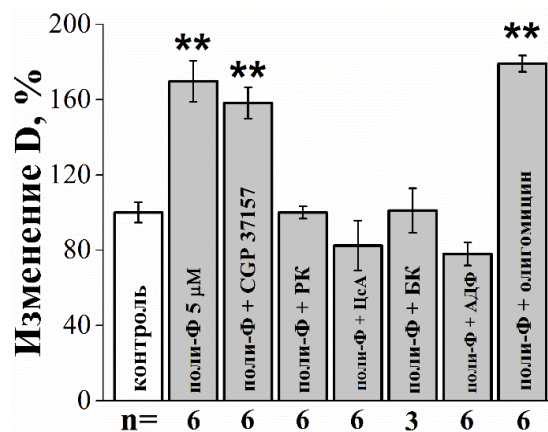


Рис. 3. Ингибиторный анализ поли-Ф индуцированного набухания митохондрий в $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, ** $p \leq 0,01$

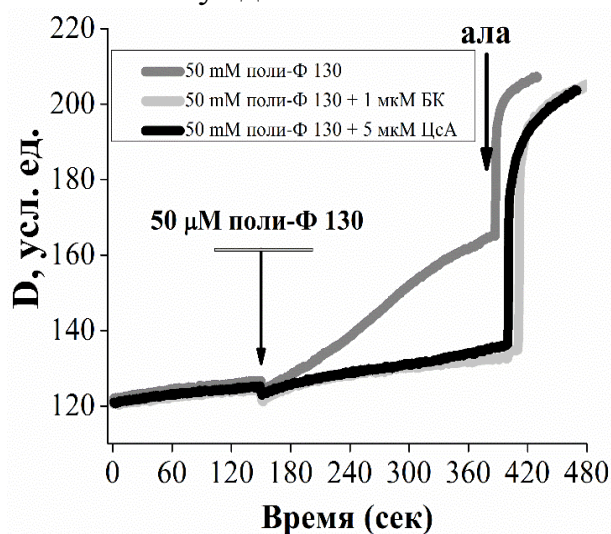


Рис. 4. Активация РТР поли-Ф.

более высокие концентрации способны самостоятельно активировать РТР без внесения в систему дополнительно ионов кальция. Учитывая предыдущие работы где было показано, что при отсутствии поли-Ф активация РТР ионами кальция практически невозможна (Abramov et. al. 2007), можно предположить, что кальций сам по себе лишь снижает порог восприимчивости РТР к поли-Ф, а не является необходимым кофактором для активации РТР.

Влияние низкого осмотического давления на активацию митохондриального мегаканала кальцием и поли-Ф – участие F_1F_0 АТФ синтетазы. Давно известно, что АТФ синтетаза митохондрий в основном находится в виде димеров, а процесс димеризации данного фермента способствует возникновению локальных изгибов на мембране, которые в глобальном масштабе приводят к формированию крист. На сегодняшний день показано, что димеры F_1F_0 АТФ-синтетазы и субъединица с F_0 комплекса F_1F_0 АТФ синтетазы принимают непосредственное участие в формировании РТР. Исходя из того, что димеры АТФ синтетазы играют важную роль в формировании РТР, а формирование димеров приводит к изгибам на мембране мы предположили, что локальные изгибы митохондриальной мембраны являются обязательным атрибутом нормального функционирования РТР. Для проверки данной гипотезы мы изменяли кривизну мембраны, посредством «мягкого» набухания митохондрий и индуцировали РТР кальцием и поли-Ф в данных условиях.

Активность РТР в условиях низкого осмотического давления. Было показано, что в контроле, при нормальной осмотичности среды инкубации - СИ (300 мОсм), добавка $62,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} была достаточной для открытия РТР и выхода накопившегося кальция из митохондрий в окружающую среду (рис. 5 А). Однако снижение осмотичности СИ на 50 % (150 мОсм) привело к резкому увеличению кальциевой буферной ёмкости митохондрий (Ca^{2+} БЁМ) на $69,09 \pm 5,49$ % относительно контроля, т.е. в данных условиях $90 \pm 7,1 \mu\text{M}$ Ca^{2+} требовалось для открытия РТР (рис. 5 А). Дальнейшее снижение осмотичности СИ показало, что увеличение Ca^{2+} БЁМ и соответственно ингибирование РТР происходило каждый раз в среднем на 36 ± 2 % после каждого снижения осмотичности СИ на 25 % (75 мОсм), до определенных пределов (рис. 5 Б).

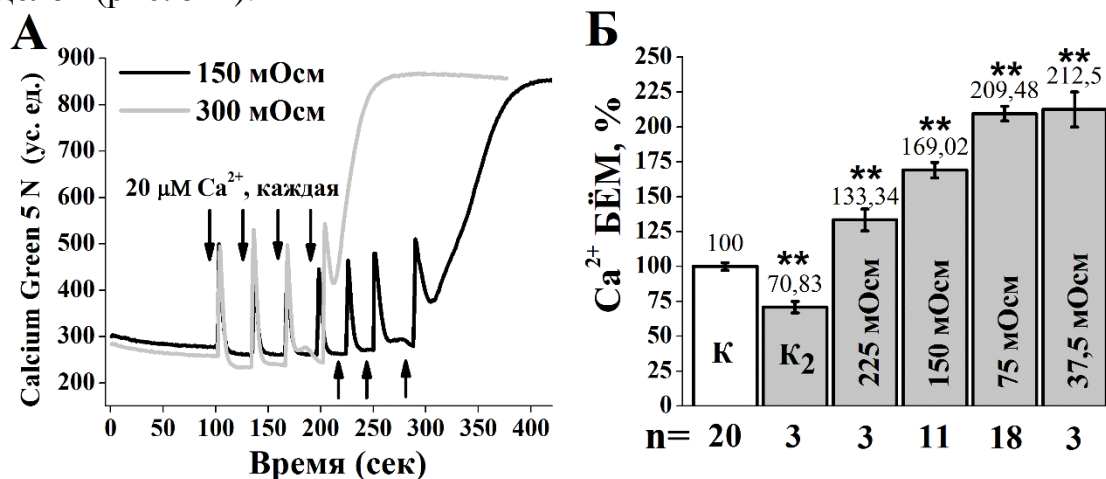


Рис. 5. Влияние низкого осмотического давления на Ca^{2+} БЁМ. $**p \leq 0,01$.

Однако, когда митохондрии были проинкубированы в СИ с низким осмотическим давлением (150 мОсм), а затем осмотичность СИ была доведена до нормального значения (300 мОсм), параметр Ca^{2+} БЁМ не только вернулся до контрольных значений, но даже немного снизился, возможно за счет стресса, вызванного пертурбациями в архитектуре мембраны (К₂ рис. 5 Б). Эффект сниженного осмотического давления СИ не влиял на процессы окислительного фосфорилирования митохондрий. Эксперименты с классическими ингибиторами РТР ЦсА и АДФ показали, что в эффект низкого осмотического давления на Ca^{2+} БЁМ также проявляются в присутствии АДФ, суммируясь с эффектом самого ингибитора, но не в присутствии ЦсА.

Влияние низкого осмотического давление на поли-Ф индуцируемую РТР.

Как было показано выше, неорганические полифосфаты способны активировать РТР без внесения дополнительно ионов кальция. Эксперименты при низком осмотическом давлении (150 мОсм) показали, что эффект поли-Ф

в концентрации 100 μM не только не ингибируется, но наоборот усиливается (рис. 6). Было показано, что в среде с низким осмотическим давлением (150 мОсм) скорость набухания увеличивается на $53,4 \pm 10,4$ %, т.е. в данном случае изучаемый параметр при осмотическом давлении 150 мОсм также изменяется в диапазоне 50-65 %, что сопоставимо с результатами по Ca^{2+} БЁМ, однако в данном случае эффект противоположный – активация РТР происходит эффективнее. На сегодняшний день сложно предположить точные механизмы ингибирования Ca^{2+} индуцируемой РТР и активации поли-Ф индуцируемой РТР низким осмотическим давлением. Мы предполагаем несколько возможных причин возникновения данных эффектов:

- Мягкое набухание митохондрий приводит к увеличению расстояния между димерами АТФ синтетазы, что способствует изменению архитектуры димеров АТФ синтетазы, что вероятно является важным составляющим нормального функционирования РТР;

- Пертурбации в архитектуре мембраны и сопутствующее этому изменение конформации димеров АТФ синтетазы приводит к снижению аффинности СуРD к РТР, что объясняет отсутствие эффекта на фоне ЦсА и увеличение Ca^{2+} БЁМ;

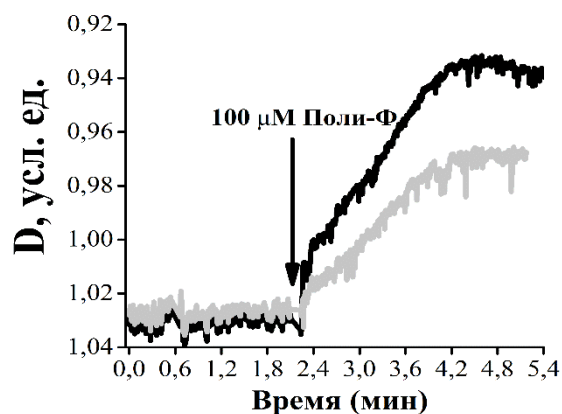


Рис. 6. Активация РТР поли-Ф в гипосмотических условиях. $**p \leq 0,01$.

• Увеличение расстояния между димерами АТФ синтетазы способствует более легкому проникновению поли-Ф к месту формирования РТР, что обеспечивает большую эффективность полимера.

В 6 главе «Сигнальные свойства неорганических полифосфатов» описывается участие неорганических полифосфатов в передаче сигнала в центральной нервной системе млекопитающих. Из-за структурной схожести поли-Ф и АТФ все время стоит вопрос о возможности поли-Ф выполнять аналогичные АТФ функции в клетках млекопитающих. АТФ является сигнальной молекулой в мозге, которая регулирует многие процессы через стимуляцию P2Y и P2X рецепторов. Исходя из большой структурной схожести АТФ и поли-Ф, а также зная, что поли-Ф находится в мозге в достаточно больших концентрациях, мы предположили, что поли-Ф может участвовать в передаче сигнала в ЦНС.

Поли-Ф опосредованный кальциевый сигнал в астроцитах. Хорошо известно, что при возбуждении нервных клеток в определенный момент происходит изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Мы предположили, что поли-Ф, в концентрациях, найденных в головном мозге (25-120 μM), может воздействовать на концентрацию внутриклеточного кальция в нервных клетках. Для экспериментов использовались первичные со-культуры нейронов и астроцитов трех отделов головного мозга крыс – коры больших полушарий, гиппокампа и среднего мозга. Было показано, что добавка поли-Ф вызывает повышение концентрации внутриклеточного кальция в большей части астроцитов и лишь в 3% нейронов (n=120) (рис. 7), что детектировалось при помощи внутриклеточного кальциевого зонда Фура 2. Концентрация и вид поли-Ф не оказывали значительного влияния на амплитуду кальциевого ответа, однако число астроцитов в которых поли-Ф запускал кальциевый сигнал варьировало от 19 до 74 %, в зависимости от концентрации и длины поли-Ф.

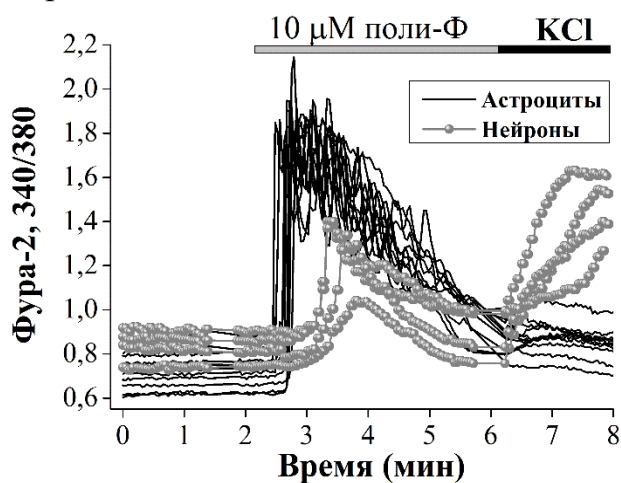


Рис. 7. Поли-Ф индуцирует Ca^{2+} ответ в нейронах и астроцитах.

Кальций может поступать в цитоплазму из межклеточного пространства или же внутриклеточных кальциевых депо. Удаление кальция из среды инкубации, в присутствии 0,5 мМ ЭДТА, не повлияло на поли-Ф индуцируемый кальциевый ответ. В свою очередь при опустошении эндоплазматического ретикулума (ЭР) от кальция, при помощи ингибитора SERCA тапсигаргина (1 мМ), добавка поли-Ф не вызывала повышение цитоплазматического кальция в астроцитах, что говорит о том, что при добавке поли-Ф кальций появляется в цитоплазме за счет его высвобождения из эндоплазматического ретикулума (ЭР) (рис. 8, n=101).

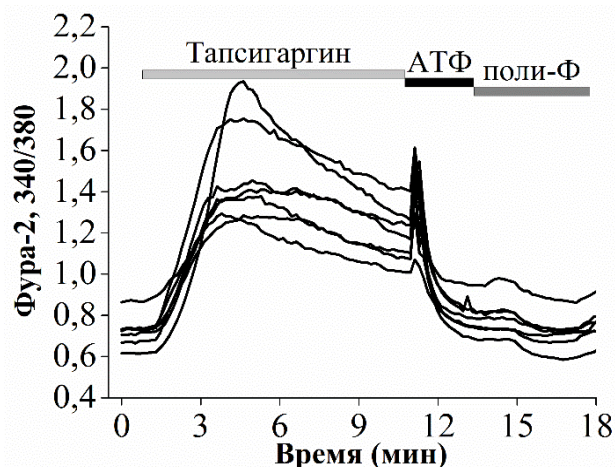


Рис. 8. Опустошение ЭР полностью подавило эффект поли-Ф в астроцитах.

Ингибиторный анализ показал, что поли-Ф индуцируемый кальциевый ответ зависит от ингибитора фосфолипазы С U73122 (5 мМ) и ингибитора пуринорецепторов широкого спектра действия сурамина (500 мМ) (рис. 9). Последующие эксперименты показали, что поли-Ф воздействует непосредственно на P2Y₁ пуринорецепторы, что было доказано путем применения специфического ингибитора MRS2279 (50 мМ) (рис. 9). Эффект поли-Ф не был опосредован каким-либо выбросом АТФ, так как пре-инкубация клеток с АТФ деградирующими ферментами такими как апираза (25 U ml⁻¹) и гексокиназа (25 U ml⁻¹) (рис. 9) не повлияла ни на амплитуду, ни на количество клеток в которых добавка поли-Ф вызывала кальциевый сигнал. Таким образом можно сделать вывод, что внеклеточный поли-Ф соединяется с P2Y₁ рецепторами на плазматической мембране, что приводит к активации ассоциированных с ними G белков, которые в свою очередь активируют фосфолипазу С. Активированная фосфолипаза С расщепляет мембранный фосфолипид IP₂ до IP₃ и ДАГ; гидрофильный IP₃ отсоединяясь от мембраны активирует IP₃ рецепторы на поверхности ЭР, происходит открытие кальциевых каналов и кальций по градиенту концентраций из ЭР поступает в цитоплазму.

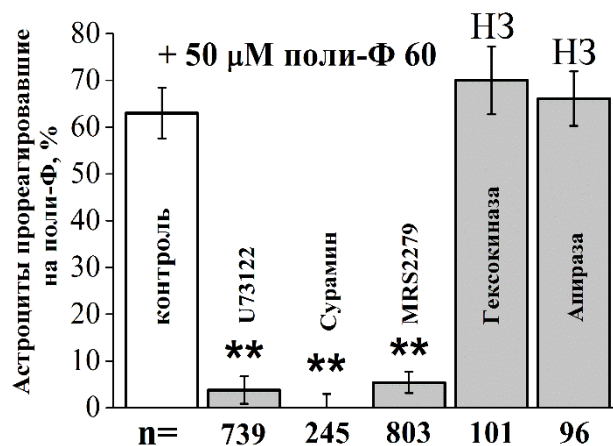


Рис. 9. Ингибиторный анализ поли-Ф индуцируемого кальциевого ответа в астроцитах. **p≤0,005; НЗ - незначительно

Поли-Ф ранее не описанный глиотрансмиттер. Исходя из вышесказанного можно предположить, что поли-Ф является ранее не описанным трансмисмиттером, работающим в ЦНС, однако среди

нейробиологов общепринято, что нейро- или глиотрансмиттерами может называться молекула, отвечающая 4-м основным критериям, а именно:

- Молекула должна быть синтезирована в пресинаптической клетке;
- Молекула должна быть высвобождена из одной клетки при потенциале действия и вызывать потенциал действия у другой клетки;
- Трансмиттер должен удаляться из пресинаптической щели при помощи специальных механизмов;
- При добавке из вне, молекула должна повторять эффект трансмиттера, высвобожденного из нервной клетки.

Поли-Ф в клетке может быть визуализирован при помощи флуоресцентного красителя DAPI. Эксперименты показали, что в астроцитах загруженных DAPI поли-Ф находится в основном в области ядра, митохондрий, лизосом и цитоплазматических структур, напоминающих везикулы. Добавка 50 μM поли-Ф к со-культуре нейронов и астроцитов, загруженных DAPI вызвала резкое снижение DAPI-поли-Ф свечения внутри астроцитов и одновременное увеличение его снаружи клеток, что говорит нам о поли-Ф индуцируемом выбросе поли-Ф из астроцитов (рис. 10 Б, $n=39$).

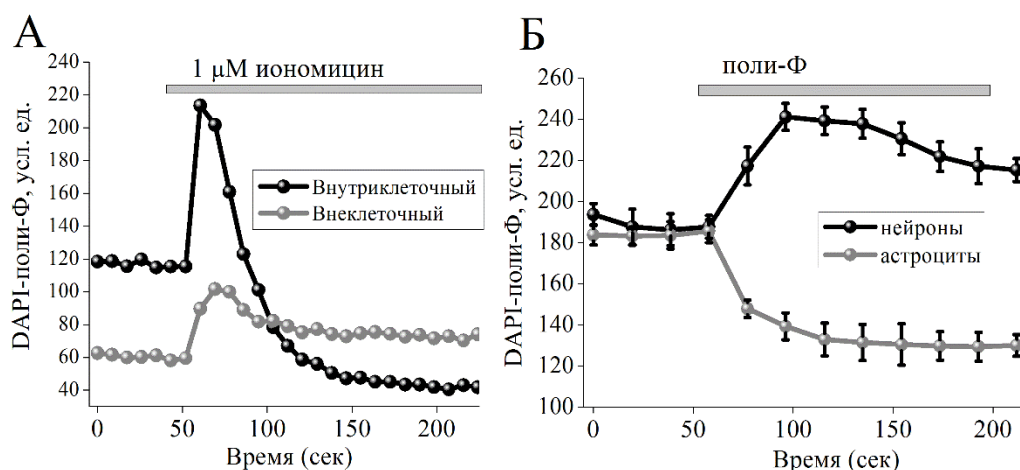


Рис. 10. Высвобождение и захват поли-Ф клетками головного мозга.

Добавка кальциевого ионофора иономицина (1 μM) также вызвала выброс поли-Ф из астроцитов, из чего можно сделать вывод, что механизмы высвобождения поли-Ф из астроцитов имеют кальций зависимую природу (рис. 10 А, $n=29$). В дальнейшем было показано, что выброс поли-Ф из астроцитов сопровождается увеличением концентрации поли-Ф в близкорасположенных нейронах (рис. 10 Б, $n=32$ для нейронов и $n=39$ для астроцитов). Данный эксперимент показывает, что нейроны способны захватывать поли-Ф при его высвобождении из астроцитов. Так как мембрана сама по себе не проницаема для поли-Ф можно предположить, что существует специальный механизм захвата поли-Ф нейронами из внеклеточного пространства.

Неорганические полифосфаты, высвобожденные из одной клетки способны передавать информацию соседним клеткам. После того как было обнаружено, что существуют механизмы высвобождения поли-Ф из

астроцитов, а также, что они имеют кальций зависимую природу, нам стало интересно, сможет ли высвободившийся поли-Ф из одной клетки запустить кальциевый сигнал у соседних клеток.

Для следующей серии экспериментов использовался фотолиз фоточувствительного Ca^{2+} -хелатора NP-EGTA для запуска кальциевого сигнала лишь в одной клетке, которую облучали ультрафиолетом (УФ). В эксперименте клетки загружались NP-EGTA AM и кальциевым зондом fluo 4 AM. Эксперименты показали, что при облучении одной клетки, интенсивность свечения fluo 4 и соответственно концентрация кальция

увеличивается и в соседних клетках. Высвобождение кальция в облученной УФ клетке запускало кальциевый ответ в соседних клетках и ответ не зависел от выброса АТФ (рис. 11). В свою очередь сурамин и MRS2279 блокировали развитие кальциевого сигнала в соседних клетках, что говорит нам о том, что именно поли-Ф выделяется после кальциевого сигнала облученной УФ клетки и запускает кальциевый ответ в соседних клетках. Исходя из вышеизложенного, при возбуждении клетки происходит выброс поли-Ф, который в свою очередь соединяясь с P2Y_1 рецепторами соседних клеток запускает выход кальция из ЭР; элиминация поли-Ф из синаптической щели происходит за счет захвата поли-Ф близлежащими нейронами. Таким образом нами было показано, что поли-Ф соответствует всем 4 критериям транмиттеров и соответственно может называться глиотрансммиттером (так как в основном астроциты отвечали на поли-Ф).

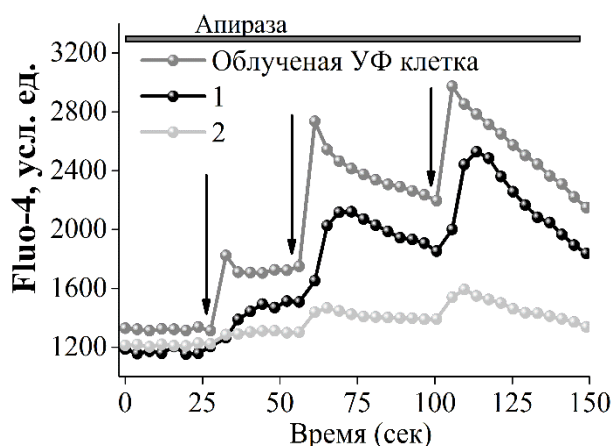


Рис. 11. Поли-Ф выделенный из одной клетки запускает кальциевый сигнал в соседних клетках

ВЫВОДЫ

1. Неорганические полифосфаты активируют F_1F_0 АТФ-азу митохондрий и этот эффект не зависит от присутствия АТФ в системе;
2. Неорганические полифосфаты увеличивают проницаемость мембран дезэнергизованных митохондрий для ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} , но не для Na^+ , K^+ , Cs^+ и Mg^{2+} . Эффект поли-Ф на пассивный транспорт ионов кальция зависит от функционального состояния митохондриального мегаканала, но не от прямого действия поли-Ф на митохондриальную мембрану, поскольку поли-Ф не изменяют проводимость БЛМ для ионов кальция;
3. Неорганические полифосфаты в концентрациях 25-50 μM активируют митохондриальный мегаканал в энергизованных митохондриях, в отсутствии ионов кальция;
4. Низкое осмотическое давление ингибирует кальций индуцируемую РТР (за счет увеличения кальциевой буферной ёмкости митохондрий), но напротив приводит к более эффективной активации РТР неорганическими полифосфатами;

5. Неорганические полифосфаты в физиологических концентрациях, запускают увеличение концентрации внутриклеточного кальция более чем в 74 % астроцитов и в 3 % нейронов. В астроцитах поли-Ф связываясь с пуринорецепторами типа $P2Y_1$ запускают IP_3 путь высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума;

6. Неорганические полифосфаты могут выполнять сигнальные функции в астроцитах головного мозга крыс, являясь агонистами пуринорецепторов типа $P2Y_1$, так как соответствуют основным критериям сигнальных молекул ЦНС.

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

NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN

BAEV ARTYOM YUREVICH

**REGULATORY AND METABOLIC ROLE OF INORGANIC
POLYPHOSPHATES IN MAMMALIAN CELLS**

03.00.02-Biophysics and radiobiology

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

Tashkent – 2018

This PhD dissertation has been registered with the number B2017.2.PhD/B85 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

The dissertation has been prepared at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (ww.biochem.uz) and on the website of informational and educational portal “ZiyoNet” (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor:

Tashmuhamedov Bekjan Aybekovich
doctor of biological sciences, academician

Official opponents:

Merzlyak Petr Grigorevich
doctor of biological sciences

Kamburova Venera Seytumerovna
Doctor of Philosophy of biological sciences,
Senior Scientific Researcher

Leading organisation:

Tashkent Pediatric Medical Institute

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

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

Abstract of the dissertation is distributed on “___” _____ 2018 year
(Registry of the distribution protocol № _____ on “___” _____ 2018 year).

Sh.I.Salikhov

Chairman of scientific degrees awarding
scientific council, D.B.Sc., academician

M.I.Asrarov

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

Sh.U.Turdikulova

Chairman of the seminar of scientific degrees
awarding scientific council, D.B.Sc.

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the research work is to identify the role of inorganic polyphosphates in mammalian cells.

The object of the research work is primary co-cultures of neurons and astrocytes of rat's cerebral cortex, hippocampus and midbrain, as well as rat liver mitochondria and submitochondrial particles.

Scientific novelty of the research work is as follows:

the influence of inorganic polyphosphates on the ATPase activity of mitochondrial F_1F_0 ATP synthase was demonstrated, that indicates that inorganic polyphosphates (poly-P) can be, previously, unidentified substrate for this enzyme;

it has been demonstrated that inorganic polyphosphates modulate passive permeability of the inner mitochondrial membrane of deenergized mitochondria, for calcium and barium ions, and that this effect depends on activation of mitochondrial megachannel (PTP), PTP-activating effect of inorganic polyphosphates was also proved in energized mitochondria (in physiological concentrations - 25-50 μ M);

it has been demonstrated that hypoosmotic conditions reversibly alter the structure of the inner mitochondrial membrane due to the "soft mitochondrial swelling", that leads to an increase of mitochondrial calcium retention capacity and concomitant inhibition of the mitochondrial PTP, but on the contrary contribute to more efficient PTP activation by inorganic polyphosphates;

conclusively proved that inorganic polyphosphates are previously unidentified gliotransmitters, which transmit information through the $P2Y_1$ purinoreceptors.

Implementation of the research results. Based on the scientific results about regulatory and metabolic role of inorganic polyphosphates in mammalian cells:

scientific results, showing the ability of inorganic polyphosphates to trigger an increase in the intracellular calcium concentration through $P2Y_1$ purinoreceptors were used in international peer reviewed journals with high impact factor in analyzing the mechanisms of poly-P involvement in inflammatory processes (Blood 2014, V.123, Scopus CiteScore – 7.21; Journal of Thrombosis and Haemostasis 2015, V.13, Scopus CiteScore - 3.85; Molecular Cell 2016, V.63, ResearchGate IF - 10.54). Application of scientific results helped to understand the mechanisms of poly-P functioning in different processes;

scientific results, showing that inorganic polyphosphates are previously unidentified gliotransmitters were used in international peer reviewed journals with high impact factor in describing the signaling pathways of astrocytes communication (Nature Neuroscience 2016, V. 19, Scopus CiteScore – 13.31; Molecular Cell 2014, V.53, ResearchGate IF - 5.65; Glia 2018, V. 66, Scopus CiteScore - 6.33). Application of the results made it possible to expand knowledge

about the communication pathways between astrocytes in the central nervous system;

scientific results showing that inorganic polyphosphates affect the permeability of the mitochondrial membrane and this permeability is associated with the activation of the mitochondrial PTP used in international peer reviewed journals with high impact factor during the description of the mitochondrial PTP activators (Aging Cell 2017, V.16, Scopus CiteScore - 7.21; International Journal of Molecular Sciences 2017, V.18, Scopus CiteScore – 3.86; Tumor biology 2017, V.39, Scopus CiteScore – 3.27). Application of the results helped to characterize the structure of PTP and to describe new pathways of cell death triggering;

scientific results showing that inorganic polyphosphates are involved in the transmission of signals in the brain are used in New York University in a project related to investigation of the inorganic polyphosphates role in the mitochondrial calcium signaling (letter from New York University, dated on 4th of April, is attached). Application of the results helped to correct the research direction oriented to the study of inorganic polyphosphates involvement in mitochondrial processes;

scientific results showing that the hypoosmotic conditions are able to regulate the activity of the mitochondrial PTP are used at the Institute of Neurology, University College London in a project related to the involvement of PTP in the development of neurodegeneration (letter from Institute of Neurology, University College London, dated on 28th of March, is attached). Application of the results helped to do the correct interpretation of the activation of mitochondrial PTP by oligomeric α -synuclein experiments.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of introduction, six chapters, conclusion and list of used literature. The volume of the thesis is 133 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Holmström K. M., Marina N., Baev A. Y., Wood N. W., Gourine A. V., Abramov A. Y. Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain // *Nature Communications*. – 2013. – V. 4, – pp. 1362 (№40, ResearchGate, IF – 12.03 (2013)).
2. Angelova P. R., Baev A. Y., Berezhnov A. V., Abramov A. Y. Role of inorganic polyphosphate in mammalian cells: from signal transduction and mitochondrial metabolism to cell death // *Biochem Soc Trans*. – 2016. – V. 44, № 1. – pp. 40-45 (№3, Scopus, CiteScore – 2.99).
3. Baev A. Y., Angelova P. R., Abramov A. Y. Role of Inorganic Polyphosphate in the Cells of the Mammalian Brain // *Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells* / In: Kulakovskaya T., Pavlov E., Dedkova E. (eds) – Cham: Springer International Publishing, 2016. – pp. 115-121.
4. Baev A. Y., Negoda A., Abramov A. Y. Modulation of mitochondrial ion transport by inorganic polyphosphate - essential role in mitochondrial permeability transition pore // *J Bioenerg Biomembr*. – 2017. – V. 49, № 1. – pp. 49-55 (№3, Scopus, CiteScore – 2.26).
5. Baev A.Y., Rakhmatullina N.S., Tashmukhamedov B.A.// Involvement of mitochondrial ATP-synthase in inorganic polyphosphates metabolism// Доклады академии наук Узбекистана - 2017. - №2. стр. 72-75 (03.00.00, № 6).
6. Baev A. Y., Elustondo P. A., Negoda A., Pavlov E. V. Osmotic regulation of the mitochondrial permeability transition pore investigated by light scattering, fluorescence and electron microscopy techniques // *Anal. Biochem*. – 2018. – V. 552. – pp. 38-44 (№3, Scopus, CiteScore – 2.16 (2017)).

II бўлим (II часть; Part II)

7. Баев А.Ю., Левицкая Ю.В., Абрамов А.Ю. Влияние неорганических полифосфатов на гомеостаз кальция в клетках мозга млекопитающих// 15-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых - Биология наука 21 века, 18-22 апреля, 2011 г., Пущино, Россия, стр. 121
8. Баев А.Ю., Левицкая Ю.В., Абрамов А.Ю. Роль неорганических полифосфатов в митохондриальных процессах// Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» 27-30 мая, 2013, Пущино, Россия, стр. 636-641
9. Artyom Y. Baev, Yulia V. Levitskaya, Kira M. Holmstrom, Andrey Y. Abramov. Role of polyphosphate in mitochondria: from modification of energy metabolism to induction of the cell death// *Biophysical society – 57th annual meeting*. 2-6 Feb., 2013, Philadelphia, Pennsylvania. стр 660 a
10. Artyom Y. Baev, Pia Elustondo, Alexander Negoda, Evgeny V. Pavlov. Влияние низкого осмотического давления на функционирование циклоспорин А чувствительной поры митохондрий: участие АТФ синтазы//

Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых, Ташкент 2014, стр. 101-102

11. Баев А.Ю., Рахматуллина Н.Ш., Муминов Б.Б., Ташмухамедов Б.А., Левицкая Ю.В. Абрамов А.Ю. АТФ-синтетаза как возможный фермент, отвечающий за синтез и деградацию неорганических полифосфатов в клетках млекопитающих// Научно-практическая конференция “Актуальные проблемы физико-химической биологии” посвященная 80-летию академика Ташмухамедова Б.А., Ташкент, 2015, стр. 70-72

12. Баев А.Ю., Муминов Б.Б., Абрамов А.Ю. Роль неорганических полифосфатов в митохондриальных процессах млекопитающих.// конференция “Миллий университет: фан, таълим, инновация”, Ташкент, 2015, стр. 287-289

13. Baev A.Y., Rahmatullina N.Sh., Nazirova M.B., Tashmuhamedov B.A., Abramov A.Y. Inorganic polyphosphate– essential trigger of mitochondrial permeability transition pore.// VIII международная научная конференция «Современные направления в науке и технологии» посвященная 25-летию создания корейских научно-технических обществ стран СНГ (Узбекистан, Казахстан, Россия), 18-19 ноября, Ташкент, 2016, стр. 268-270

14. Baev A.Y., Tashmukhamedov B.A. and Abramov A.Y. Role of inorganic polyphosphates in mitochondrial processes.// Материалы научно-практической конференции Современные аспекты физико-химической биологии и эко токсикологии, Ташкент, 2016, стр. 50.

15. Marthe Ludtmann, Plamena Angelova, Minee-Liane Choi, Mathew Horrocks, Artyom Baev, Daniel Little, Michael Devine, Paul Gissen, Evgeny Pavlov, David Klenerman, Andrey Abramov, Sonia Gandhi. Direct Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Oligomeric Alpha-Synuclein Causes Toxicity in PD. Biophysical Society 61st Annual Meeting, February 11-15, 2017, New Orleans, Louisiana, стр 440 a

Автореферат «Ўзбекистон Биология журналы» таҳририятида таҳрирдан ўтказилди