

ISSN 0042-1685

**O‘ZBEKISTON
BIOLOGIYA
JURNALI**

**Узбекский
Биологический
Журнал**



**Uzbek
Biological
Journal**

1-2025

ЎЗБЕКИСТОН RESPUBLIKASI FANLAR АКАДЕМИЯСИ
АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

**ЎЗБЕКИСТОН
БИОЛОГИЯ
ЖУРНАЛИ**

1

2025

**УЗБЕКСКИЙ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ**

Издается с января 1957 г. по 6 номеров в год

ТАШКЕНТ – 2025

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ УЗБЕКСКОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ЖУРНАЛА

Главный редактор	акад. Сабиров Р.З.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
Зам. гл. редактора	проф. Асраров М.И.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
Отв. редактор	д. ф-м.н. Атабеков И.У.	Нац. Ком. МАБ ЮНЕСКО при АН РУз
Отв. секретарь	к.б.н. Самарходжаева Н.Р.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз

Редакционный совет

акад. Абдукаримов А.А.	Центр геномики и биоинформатики АН РУз
акад. Азимов Ж.А.	Ин-т зоологии АН РУз
акад. Арипов Т.Ф.	Ин-т биоорганической химии АН РУз
акад. Арипова Т.У.	Ин-т иммунологии и геномики человека АН РУз
акад. Мавлоний М.Э.	Ин-т микробиологии АН РУз
акад. Саатов Т.С.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
акад. Саттаров Дж.С.	Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека

Секционные редакторы

<i>Ботаника</i>	акад. Тожибоев К.Ш.	Ин-т ботаники АН РУз
<i>Зоология</i>	д.б.н. Холматов Б.Р.	Ин-т зоологии АН РУз
<i>Физиология человека и животных</i>	проф. Кучкарова Л.С.	Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека
<i>Биофизика и биохимия</i>	д.б.н. Мерзляк П.Г.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
<i>Микробиология</i>	д.б.н. Миралимова Ш.М.	Ин-т микробиологии АН РУз
<i>Биотехнология</i>	д.б.н. Ташпулатов Ж.Ж.	Академия наук РУз
<i>Генетика, молекулярная и клеточная биология</i>	проф. Усманов Р.М.	Ин-т генетики и эксп. биологии растений АН РУз
<i>Почвоведение и агрохимия</i>	проф. Гафурова Л.А.	Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека

Члены редколлегии

проф. Абрамов А.Ю.	Университетский колледж Лондона, Великобритания
др. Азимов Р.Р.	Калифорнийский университет в ЛосАнджелесе, США
проф. Азимова Ш.С.	Ин-т химии раст. веществ АН РУз
проф. Бердиев Б.К.	Ун-тет медицины и здоровья им. Мохамеда бин Рашида, ОАЭ
проф. Буриев З.Т.	Центр геномики и биоинформ. АН РУз
проф. Давранов К.Д.	Ин-т микробиологии АН РУз
проф. Далимова С.Н.	Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека
проф. Замараева М.В.	Белостокский университет, Польша
проф. Курбанназарова Р.Ш.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
др. Курганов Э.Ш.	Киотский технологический институт, Япония
проф. Мирходжаев У.З.	Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека
проф. Насиров К.Э.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
проф. Печеницын В.П.	Ин-т ботаники АН РУз
д.б.н. Тилябаев З.Т.	Ин-т биоорганической химии АН РУз
проф. Турдикулова Ш.У.	Центр передовых технологии Мин. иннов. развития
проф. Усманов П.Б.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз



**К 90-ЛЕТИЮ ОСНОВАТЕЛЯ ШКОЛЫ БИОФИЗИКИ УЗБЕКИСТАНА
АКАДЕМИКА БЕКДЖАНА АЙБЕКОВИЧА ТАШМУХАМЕДОВА
(27.01.1935–26.06.2020)**

В этом году исполняется 90 лет со дня рождения основателя Узбекской школы биофизики, лауреата Государственной премии СССР, лауреата Государственной премии РУз имени Беруни, академика Академии наук Узбекистана, доктора биологических наук, профессора Ташмухамедова Бекджана Айбековича.

Б.А. Ташмухамедов родился 27 января 1935 года в городе Ташкенте в семье известного узбекского писателя Айбека. В 1953 г. он окончил среднюю школу в г. Ташкенте. В 1958 году, окончив биологический факультет Московского государственного университета, Б.А. Ташмухамедов поступил в аспирантуру при кафедре физиологии человека и животных МГУ, где под руководством классика физиологии проф. Х.С. Коштоянца в 1962 г. защитил кандидатскую диссертацию по теме «К сравнительной физиологии и нейрофармакологии рецепторов растяжения членистоногих (ракообразных и насекомых)». После защиты кандидатской диссертации Б.А. Ташмухамедов продолжил исследования возбудимых мембран с широким использованием физиологических и биофизических подходов и методов. В Институте биохимии АН СССР Б.А. Ташмухамедов одним из первых в стране начал исследования транспортных ферментов – АТФаз. Эта работа была продолжена в Ташкенте в Ташкентском государственном университете (ныне – Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека).

Первые шаги биофизики в Узбекистане связаны с открытием Кафедры биохимии и биофизики на факультете Биологии Ташкентского государственного университета в 1962 году, где профессор (впоследствии академик АН РУз) Я.Х. Туракулов начал читать общий курс биофизики. На этой же кафедре в 1962 году начинал свою деятельность и Бекджан Айбекович Ташмухамедов (доцент кафедры с 1965 года и профессор кафедры с 1972 года). В 1979 году Кафедра биохимии и биофизики была разделена на две самостоятельные кафедры: Кафедру биохимии и Кафедру биофизики и охраны окружающей среды. В 1988 году на основе биотехнологической группы кафедры биофизики (проф. М.М. Рахимов) была организована самостоятельная Кафедра биотехнологии и клеточной биологии, а Кафедра биофизики и охраны окружающей среды была переименована в Кафедру биофизики. В том же году при кафедре была открыта проблемная лаборатория «Биофизика мембран», деятельность которой была полностью сосредоточена на научных исследованиях в области биоэнергетики и транспорта кальция (А.И. Гагельганс, М.И. Замараева), мембрано-активных комплексов и ионофоров, биофизики монослоев (У.З. Мирходжаев, Х.Ф. Абдуллаев), лиганд-рецепторных взаимодействий (А.К. Тонких). С момента организации в 1979 году и до 1985 года эту кафедру возглавлял профессор, а в последующем академик АН РУз Б.А. Ташмухамедов. В 1985-2001 гг. кафедрой заведовал ученик Ташмухамедова, профессор Альберт Иванович Гагельганс – известный специалист в области биоэнергетики и ионного транспорта. С 2001 кафедрой заведовала профессор М.В. Замараева, а в 2005–2008 гг. – профессор (ныне – академик) Р.З. Сабилов, оба выходцы из Биофизической школы Б.А. Ташмухамедова. В последующем Кафедру возглавляли кандидаты

биологических наук Левицкая Ю.В. (2008–2013 гг.), Раджабова Г.Г. (2013–2018 гг.). Профессор У.З. Мирходжаев, который перешел на Кафедру из Института биохимии (Отдел биофизики) в 1985 году, на протяжении многих лет являлся ключевой фигурой Кафедры; он руководил ею в 2018–2020 гг. и затем передал руководство к.б.н. Рузибаеву Х.С., который заведует Кафедрой по сегодняшний день.

Практически, начиная с момента зарождения, Биофизическая школа дала начало мощному потоку фундаментальных исследований не только в Университете, но и в Академии наук Узбекистана. Так, уже в 1963 году Б.А. Ташмухамедов возглавил созданную Я.Х. Туракуловым Лабораторию радиационной биофизики в Институте ядерной физики АН УзССР. На базе этой лаборатории в 1965 году была создана Лаборатория биофизики в Институте биохимии АН РУз, которой Б.А. Ташмухамедов заведовал до 1977 года. В 1977 году на базе этой лаборатории при Институте биохимии АН УзССР был создан Отдел биофизики, которым Б.А. Ташмухамедов руководил до 1985 года. В состав этого отдела вошли лаборатории биофизики клетки (проф. Усманов П.Б.), молекулярной биофизики (проф. Бекмухамедова З.У.) и биофизики мембран (проф. Гагельганс А.И.), проводившие исследования по биологической физике, электрофизиологии, молекулярной биофизике и физиологическим аспектам биохимии. В дальнейшем эти лаборатории вошли в состав Института физиологии и биофизики АН РУз, который Б.А. Ташмухамедов возглавлял в 1985–1992 гг. Директором этого института с 1992 года являлся ученик Б.А. Ташмухамедова, профессор П.Б. Усманов. В 2012 году Институт физиологии и биофизики АН РУз был закрыт, а его сотрудники были переведены в Институт биоорганической химии АН РУз. Открытие Института биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана в 2018 году (директор – акад. Р.З. Сабилов) положило начало новому этапу в развитии Школы биофизиков Узбекистана.

Научный путь Бекджана Айбековича отмечен увлекательными исследованиями и выдающимися открытиями. Так, исследуя молекулярные и физиологические механизмы активного транспорта ионов Na^+ и K^+ через плазматические мембраны, Б.А. Ташмухамедов с сотрудниками обнаружили функциональную гетерогенность Na^+ , K^+ -АТФазы в нефроне и предложили схему гормональной регуляции транспорта ионов в почках (1968 г.). В эти же годы Б.А. Ташмухамедов начинает исследования биоэнергетики клетки в связи с транспортом Ca^{2+} в митохондриях и саркоплазматическом ретикулуме. Итогом исследований 1969–1970 гг. явилась докторская диссертация Б.А. Ташмухамедова «Активный транспорт ионов через биологические мембраны», которая была защищена в Институте биофизики АН СССР (г. Москва) в апреле 1971 г. Звание профессора было присуждено в 1973 году.

После защиты докторской диссертации Б.А. Ташмухамедов возглавляет исследования в области физиологической регуляции функций мембран и в связи с этим изучает механизмы действия физиологически активных веществ (гормонов, сердечных гликозидов, зоо- и фитотоксинов, пестицидов, феромонов насекомых, мембрано-активных комплексонов и т.д.) на мембраны и специфические мембранные образования. Им были продолжены исследования механизмов активного транспорта ионов через мембраны. К наиболее существенным достижениям этого времени следует отнести реконструкцию митохондриального транспорта кальция в искусственных фосфолипидных мембранах, исследования механизма действия цитотоксинов из яда среднеазиатской кобры, получение чистых мембрано-активных компонентов из яда ряда членистоногих и изучение механизма их действия методами электрофизиологии. На примере эритроцитов показана возможность транспорта ионов Ca^{2+} при помощи кальций-натриевого обмена, который функционирует параллельно с выходом Ca^{2+} посредством Са-АТФазы плазматических мембран.

Под руководством Б.А. Ташмухамедова, основываясь на работах профессора Айнисы Каримовны Ташмухамедовой (выдающегося химика-органика и супруги Бекджана Айбековича) по синтезу уникальных соединений – макроциклических краун-эфиров, было разработано новое направление в области прикладной мембранологии – искусственные мембрано-активные ионофоры, которые открывают широкие перспективы как в аналитической технике (ион-селективные электроды, избирательная экстракция ионов из растворов), так и в сельском хозяйстве и онкологии.

В процессе выполнения всесоюзных программ «Нервный импульс» и «Ионный канал» Б.А. Ташмухамедовым проведена классификация токсинов-модификаторов и токсинов-каналфоомеров, выделен ряд новых токсинов, действующих на липидный остов мембран, блокирующих натриевые каналы возбудимых мембран, взаимодействующих с пресинаптическими мембранами синапсов позвоночных и членистоногих. Под руководством Б.А. Ташмухамедова обнаружен новый класс ней-

ротоксинов пауков, которые специфически и необратимо блокируют постсинаптические мембраны глутаматэргических синапсов позвоночных, ракообразных и насекомых. При помощи этих токсинов удалось выделить и реконструировать на бислойных мембранах глутаматные рецепторы мозга крыс, нервно-мышечных синапсов крабов и саранчи.

В 1985 г. за серию работ по изучению механизма действия нейротоксинов Б.А. Ташмухамедов был удостоен звания лауреата Государственной премии СССР. В 1989 году Б.А. Ташмухамедов стал лауреатом Государственной премии по науке и технике Узбекистана им. Беруни. Высокой оценкой научной и педагогической деятельности Б.А. Ташмухамедова явилось его избрание членом-корреспондентом АН РУз в 1979 году и действительным членом Академии в 1987 году. В 1988 году Б.А. Ташмухамедов был награжден медалью «Ветеран труда».

Сразу после обретения независимости, в 1992 году руководством Узбекистана перед академиком Б.А. Ташмухамедовым был поставлен вопрос о создании в стране Высшей аттестационной комиссии (ВАК), которую он блестяще решил и сам возглавлял ее до 1995 года. В 1995–1999 гг. Б.А. Ташмухамедов был председателем Биологического отделения Академии наук Узбекистана.

Б.А. Ташмухамедовым подготовлено 17 докторов наук и 46 кандидатов наук по биофизике, физиологии и биохимии. Им опубликовано более 400 научных трудов.

Исследования Б.А. Ташмухамедова получили широкое признание научной общественности не только у нас в стране, но и за рубежом. Б.А. Ташмухамедов неоднократно приглашался для чтения лекций и докладов на различные международные конгрессы и симпозиумы (Германия, Великобритания, США, Швеция, Франция, Швейцария, Перу, Дания, Сингапур), а также проводил экспериментальные физиолого-биофизические исследования в различных лабораториях мира (Университет им. Гумбольдта, Берлин, 1975 г.; Мерилендский университет, США, 1978 г.; Советско-Перуанская биологическая станция, Перу, 1988 г.; Кембриджский университет, Великобритания, 1989 г.; Национальный Институт физиологии, Япония, 2001, 2003 гг.).

Бекджан Айбекович много лет был Председателем Физиологического общества Узбекистана, членом ряда научных советов АН РУз. Б.А. Ташмухамедов являлся руководителем научных тем по физиологии и биофизике мембран, руководителем проблемного совета по физиологии и биофизике АН РУз, членом координационного совета Отделения общей физиологии СНГ, членом редколлегии журналов «Биофизика» (Москва), «Журнал эволюционной физиологии и биохимии» (Санкт-Петербург), «Биологические мембраны» (Москва), «General Physiology and Biophysics» (Братислава). Многие годы своей жизни Бекджан Айбекович посвятил работе «Узбекского биологического журнала» в качестве Главного редактора.

В качестве консультанта Б.А. Ташмухамедов принимал активное участие в работе других научно-исследовательских учреждений страны. Он выполнял работы по программам двусторонних договоров с Институтами биоорганической химии им. М.М. Шемякина РАН, Биоорганической химии АН РУз, ФармИ и т. д. Б.А. Ташмухамедов и его сотрудники проводили совместные исследования с сотрудниками Института биофизики РАН, Института белка РАН, Института проблем передачи информации РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова.

На протяжении многих лет Б.А. Ташмухамедов являлся членом Ученых советов по защите кандидатских и докторских диссертаций по биологическим дисциплинам при Академии наук и ТашГУ.

Б.А. Ташмухамедов уделял огромное внимание подготовке научных кадров и воспитанию молодежи. Так, начиная с 1965 г. он, сначала в должности доцента, а с 1973 г. – профессора, читал общие курсы по биофизике, а также спецкурсы «Функциональная биохимия», «Изотопные методы в биологии», «Биохимические и биофизические методы исследования», «Электробиология» и др.

Помимо основной научно-педагогической деятельности Б.А. Ташмухамедов активно популяризовал новейшие достижения науки. Он был постоянным участником научных передач по телевидению, являлся автором многочисленных научно-популярных статей в республиканских газетах и журналах. Б.А. Ташмухамедов активно занимался общественной деятельностью. Он являлся активным участником экологического движения, председателем Экологического совета при Госкомприроды Республики Узбекистан, председателем Национального комитета РУз ЮНЕСКО по программе «Человек и биосфера» («Man and Biosphere», UNESCO).

Школа биофизиков Узбекистана, созданная Б.А. Ташмухамедовым, сыграла исключительную роль в подготовке высококвалифицированных научных кадров в области биофизики. Так, в

ее рамках выросли такие известные ученые, как академики Касымов А.К., Арипов Т.Ф., Сабиров Р.З., доктора наук и профессора Бекмухамедова З.У., Гагельганс А.И., Усманов П.Б., Рахимов М.М., Красильников О.В., Мирходжаев У.З., Замараева М.В., Мирсалихова Н.М., Гайнутдинов М.Х., Туйчибаев М.У., Ахмеров Р.Н., Каликулов Д., Казаков И., Махмудова Э.М., Ахмеджанов И.Г., Атакузиев Б.У., Сафаров К.С., Акалаев Р.Н., Норов Ш.К., Юкельсон Л.Я., Мадьяров Ш.Р., Муратова У.З., Асраров М.И., Салахутдинов Б.А., Атабеков И.У., Абрамов А.Ю., Гиззатулина З.З., Насиров К.Э., Мерзляк П.Г., Ионов М.В., Курбанназарова Р.Ш., Позиллов М.К., Абдуллаева Г., Эргашев Н.А., Камбурова В.С., Абдуллаев И.Ф., кандидаты наук и доктора философии Шкинев А.В., Терновский В.И., Касымов М.М., Садыкова К.А., Тонких А.К., Лукин Ю., Болдырев В.К., Вагина О.Н., Гордиенко Н., Маренинова О.А., Шадиева Н., Беспалько Н., Лим Т., Азимов Р.Р., Азимова Р.К., Муратходжаев Дж.Н., Эл-Суфи С., Захидова Л.Т., Бессонова С.В., Мамаджанов Л., Насимова З., Тохтаева Э.Т., Сукочева О., Орынбаева З., Абдрашитова Е.В., Маматова З.А., Асямова С.А., Абдирова А.Ч., Сайфуллина Г.Л., Агишев В.С., Конов В.В., Исаев П.И., Юрасова Т.Ф., Ниязметова Н.А., Усманов К.Х., Темиров С., Маматкулов Х.М., Ташпулатов Э., Адылбеков Т.Т., Зиямухамедов Р.А., Мухсимов Ф., Мубаракова Ф.Х., Ахмедова Н.У., Зиятдинова Р.М., Джолдасова К.Б., Ахмедов К.Дж., Исмаилов И.И., Гайнутдинов Т.Х., Наджимова Х.К., Ишмухамедов Р.Н., Сагдуллаев Б., Бескина О.А., Ярышкин О.В., Таринова М.В., Левицкая Ю.В., Бердыев Б.К., Шленский В.Г., Лукьянова С.В., Мирзаева Ю.Т., Тойчиев А.Х., Курганов Э., Чарышникова О.С., Баев А.Ю., Жумаев И.З., Комилов Э.Ж., Рустамова С.И., Хамидова О.Ж., Циферова Н.А., Файзиев Д.Д., Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Тоштемирова Г.А., Рустамов Ш.Ю., Исамухамедова Д.Р., Эрназаров З.М., ст. преподаватель Умарова Ф.Т., Абдуллаев Х.Ф., и многие другие активные исследователи в области биофизики.

О высоком научном уровне созданной Б.А. Ташмухамедовым Биофизической школы Узбекистана свидетельствует тот факт, что после обретения Узбекистаном независимости ее представители вели и ведут свои научные изыскания в ведущих мировых центрах науки, таких как Калифорнийский университет в Лос-Анжелесе (Вагина О.Н., Маренинова О.А., Азимов Р.Р., Азимова Р.К., Якубов И.), Алабамский университет в Бирмингеме (Исмаилов И.И., Бердыев Б., Каликулов Д.), Японский Национальный институт физиологии (Сабиров Р.З., Абдуллаев И.Ф., Тойчиев А.Х.), Университет Ресифе в Бразилии (Красильников О.В., Юлдашева Л.Н., Мерзляк П.Г.), Свободный университет Брюсселя (Шленский В.Г.), Лондонский Королевский колледж (Абрамов А.Ю.), Белостокский университет в Польше (Замараева М.В.), Институт биофизики РАН в Пущино (Терновский В.И.) и другие.

Бекджан Айбекович Ташмухамедов был ученым высокой эрудиции, глубоко принципиальным и талантливым исследователем, крупным организатором и популяризатором науки. Нам, его ученикам, он запомнился как очень открытый, душевный и отзывчивый человек. Обладая энциклопедическими знаниями, он был всегда готов прийти на помощь в решении сложных проблем биофизики и физиологии. С его именем связана особая атмосфера творческого подъема и демократичности, которые были всегда отличительной чертой Биофизической школы. Широкие научные и человеческие связи Бекджана Айбековича с учеными России и всего Советского Союза способствовали широте научного кругозора представителей Школы биофизиков Узбекистана.

Светлая память о Бекджане Айбековиче Ташмухамедове будет вечно жить в наших сердцах.

Директор Института биофизики и биохимии при
Национальном университете Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
академик Сабиров Р.З.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ КАРАКОЛИНА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ АОРТЫ

Ю.Т. МИРЗАЕВА^{1,2}, П.Б. УСМАНОВ¹

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз;

²Университет Alfraganus

Автор для переписки: Ymirzayeva@mail.ru

Приведены результаты исследования механизма действия 1-О-бензоилкараколина, 1-О-ацетилкараколина и 14-О-бензоилкараколина на сократительную функцию гладкомышечных клеток аорты крыс. Исследование проводилось на изолированных аортальных кольцах крыс. Алкалоиды достоверно и дозозависимо ингибировали сокращение колец аорты, вызванное содержанием КСl. В то же время в этих условиях алкалоиды существенно уменьшали Ca²⁺-индуцированное сокращение колец аорты. Релаксантное действия алкалоидов может включать подавление притока Ca²⁺ через потенциал-зависимые Ca²⁺-канал, но при этом значительно подавляется с верапамилом в растворах Кребса, не содержащих Ca²⁺.

Ключевые слова: аорта, ионные каналы, КСl, гладкая мускулатура, алкалоиды.

Введение. Болезни сердечно-сосудистой системы (ССС) являются одной из наиболее распространенных патологий и занимают одно из ведущих мест среди причин смертности и инвалидности населения в развитых странах мира [1]. Согласно современным данным, в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы наблюдаются нарушения функционирования гладкомышечных клеток (ГМК), регуляции транспорта ионов Ca²⁺, а также тонуса кровеносных сосудов [2]. Ионные каналы, влияющие на мембранный потенциал и внутриклеточную концентрацию кальция контролируют возбудимость гладких мышц сосудов. Управляемые напряжением кальциевые каналы, связанные с напряжением (VGCC), каналы переходного рецепторного потенциала (TRP), напряжения (KV) и Ca²⁺-активируемые K⁺ каналы (BK) являются ключевыми регуляторами возбудимости и сократимости гладких мышц сосудов. Эти каналы регулируются различными сигналами, включая протеинкиназы и фосфатазы. Эффекты этих постоянных сигнальных молекул часто обусловлены образованием макромолекулярных комплексов, которые служат платформой для точного направления сигналов и пространственной организации взаимодействий с конкретными субстратами [3]. Ионные каналы в сосудистых гладких мышцах регулируют миогенный тонус и сократимость сосудов. В частности, активация кальций- и потенциал-зависимых калиевых каналов большой проводимости приводит к внешнему току, который смещает мембранный потенциал в сторону более отрицательных значений, запуская отрицательную обратную связь на вызванный деполяризацией приток кальция и сокращение гладких мышц [4].

В связи с этим, изучение механизмов коррекции этих нарушений, а также поиск способов фармакологической регуляции сократительной активности гладких мышц кровеносных сосудов, является актуальной проблемой современной физиологии и медицины. При этом особое внимание уделяется природным биологически активным соединениям растительного происхождения, обладающим широким спектром фармакологических эффектов и специфически взаимодействующим с различными типами ионных каналов.

Дитерпеноидные алкалоиды различных структурных типов, выделенные из растений родов *Aconitum*, являются перспективными кандидатами для создания соединений со спазмолитической активностью благодаря своим биологическим свойствам. Эти соединения взаимодействуют с различными типами ионных каналов, рианодиновыми рецепторами саркоплазматического ретикулула, N-холиновыми рецепторами и нейромедиаторными системами [5]. Побочные эффекты существующих препаратов, не позволяющие использовать многие из них для лечения язвы желудка, почечной, печеночной и сердечной недостаточности, артериальной гипотензии, что и послужило толчком к поиску и открытию новых спазмолитиков.

Ранее было установлено, что дитерпеноидный алкалоид караколин, выделенный из растений *Aconitum karakolikum* R, обладает слабым гипотензивным и антиаритмическим действием [6,7]. При

этом было обнаружено, что замена гидроксильной группы у углеродного атома С-1 караколина на бензоильную и ацетильную группу усиливает у его производных 1-О-бензоилкараколина (1-О-БК), 1-О-ацетилкараколина (1-О-АК) и 14-О-бензоилкараколина (14-О-БК) релаксантную активность. С целью установления зависимости релаксантной активности 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК от их структуры, нами были выполнены сравнительные исследования действия алкалоидов на сократительную активность ГМК аорты крысы.

В ходе исследования механизма, лежащего в основе релаксантного действия караколина и его производных, их эффекты были изучены в различных экспериментальных условиях.

Методы исследования и материалы. В экспериментах использовались изолированные препараты гладкомышечных сегментов аорты белых беспородных крыс (200-250 г). Крысы забивались с помощью цервикальной дислокации, вскрывали грудную клетку, извлекали аорту и помещали ее в физиологический раствор Кребса, следующего состава (мМ): NaCl-120,4; KCl-5; NaHCO₃-15,5; NaH₂PO₄-1,2; MgCl₂-1,2; CaCl₂-2,5; C₆H₁₂O₆-11,5; pH 7,4. Аорту очищали от жировой и соединительной ткани и нарезали на сегменты в виде колец шириной 3-4 мм.

Протоколы экспериментов соответствовали стандартам и требованиям гуманного обращения с животными и положениям Этической комиссии ИББ при НУУ им. М. Улугбека (Протокол № 7 от 07.04.2022 г.) об использовании лабораторных животных. Препараты изолированных сегментов аорты получали по [8].

Отпрепарированный сегмент аорты помещали в специальную экспериментальную камеру объемом 5 мл, где с помощью серебряной проволоки фиксировали между штоком электромеханического преобразователя (FT.03, Grass, США) и основанием камеры. Экспериментальная камера перфузировалась оксигенированным карбогеном (95%O₂, 5% CO₂) раствором Кребса при постоянной температуре 37°C. Перед экспериментом сегменты аорты предварительно растягивали нагрузкой 1 г и промывали физиологическим раствором в течение 60 минут для достижения равновесия. Сокращения препаратов аорты вызывали внесением в экспериментальную камеру фенилэфрин (1мкМ) или гиперкалиевым раствором (KCl, 50 мМ), путем эквимольного замещения им NaCl в растворе Кребса. В экспериментах также использовались бескальциевые растворы, для чего из раствора Кребса исключали ионы Ca²⁺, а для связывания их следов добавляли ЭГТА (1 мМ). Сократительную активность препаратов аорты регистрировали с помощью усилителя РИТ (Grass, США) и самописца Endim 621,02 (Германия) [9].

В работе использовали верапамил и ЭГТА фирмы Sigma (St. Louis, Mo., США). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы OriginPro 7.5 (Origin Lab Corporation; США). При этом амплитуда сокращений выражалась в % от максимального сокращения (принятого за 100%), индуцированного гиперкалиевым раствором и рассчитывалась как среднее арифметическое значение для 4-5 различных экспериментов. Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка для n экспериментов. Статистическую значимость различий между контрольными и опытными значениями определяли для ряда данных, используя парный t-тест. Значения p < 0,05 указывают на статистически значимые различия.

Результаты и их обсуждение. В предварительных экспериментах алкалоиды 1-О-бензоилкараколин, 1-О-ацетилкараколин и 14-О-бензоилкараколин в широком диапазоне концентраций не влияли на базальный тонус препаратов аорты крысы. Эти данные свидетельствуют о том, что в состоянии покоя исследуемые алкалоиды не действуют на функциональную активность сократительного аппарата гладкомышечных клеток аорты крысы. Однако, исследуемые алкалоиды эффективно расслабляли препараты аорты, предварительно сокращенные гиперкалиевыми растворами, т.е. обладают выраженным вазорелаксантным действием (рис.1). Релаксантное действие 1-О-БК имело дозо-зависимый характер, и при увеличении концентрации алкалоида в диапазоне 1 - 10 мкМ сила сокращения препарата аорты крысы, индуцированная 50 мМ KCl снижалась от 38,1±2,2 до 92,8±3,7% (рис.1). В отличие от 1-О-БК зависимость релаксантного действия 14-О-БК от его концентрации была менее выражена и максимальное расслабление препарата аорты до 91,0±4,1% наблюдалось при концентрации 60 мкМ, также 1-О-АК максимальное расслабление препарата аорты до 64,1 ± 4,0% наблюдалось при концентрации 150 мкМ (рис. 1). При этом величины IC₅₀, концентрации при которых 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК вызывали расслабление препаратов аорты на 50%, составляли 2,2 мкМ, 16,8 и 83,1 мкМ, соответственно.

Эти данные указывают на то, что 1-О-БК более эффективно расслабляет препараты аорты в условиях гиперкалиевой контрактуры.

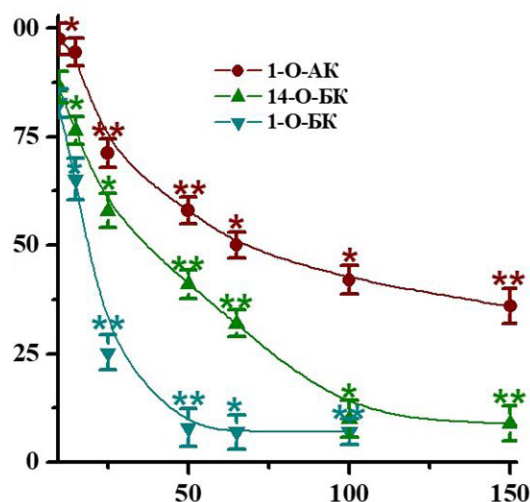


Рис. 1. Вазорелаксантное действия 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК индуцированных предварительно сокращенных КС1 (50 мМ;). По оси ординат - сила сокращения кольца аорты, индуцированного 50 мМ КС1, принятая за 100%. По оси абсцисс - концентрация алкалоидов. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ в сравнении с контролем; $n = 6$).

Учитывая то, что сокращения препаратов аорты крысы, индуцируемые гиперкалиевыми растворами, обеспечиваются в основном благодаря активации потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазмалеммы ГМК и поступлению по ним ионов Ca^{2+} , наблюдаемые эффекты исследуемых алкалоидов, можно объяснить их взаимодействием с этими каналами. При этом, алкалоиды, возможно, блокируют Ca^{2+} -каналы и подавляют поступление ионов Ca^{2+} в ГМК, что будет сопровождаться уменьшением внутриклеточной концентрации ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в них и последующим ингибированием их сократительного аппарата. Для проверки этого предположения нами была исследована зависимость эффектов 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК от концентрации ионов Ca^{2+} в среде инкубации. Следует отметить, что при инкубации препаратов аорты в растворах Кребса не содержащих ионы Ca^{2+} , гиперкалиевая стимуляция не вызывает их сокращения, а кумулятивное добавление Ca^{2+} сопровождается развитием сокращения, которое обеспечивается ионами Ca^{2+} , поступающими в ГМК. Как показали результаты этой серии экспериментов, при инкубации препаратов аорты в бескальциевых растворах Кребса с исследуемыми алкалоидами, добавки ионов Ca^{2+} также вызывали сокращения, однако по амплитуде эти сокращения были значительно меньше по сравнению с контролем. Так в контроле, в присутствии в среде инкубации 50 мМ КС1, кумулятивное добавление ионов Ca^{2+} сопровождалось усилением сокращения препарата аорты, которое достигало максимальной контрольной амплитуды (принятой за 100%) при его концентрации 2,5 мМ. В аналогичных экспериментальных условиях, но при наличии в среде инкубации 1-О-БК (10 мкМ), 1-О-АК (150 мкМ) или 14-О-БК (60 мкМ), добавление 2,5 мМ Ca^{2+} вызывало сокращения, амплитуда которых составляла $9,5 \pm 3,9\%$; $17,5 \pm 4,0\%$ и $30,1 \pm 4,2\%$, соответственно, от контроля (рис. 2). Эти данные указывают на то, что релаксантное действие 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК непосредственно связано с их влиянием на транспорт ионов Ca^{2+} через плазматическую мембрану ГМК, что может свидетельствовать о взаимодействии этих алкалоидов с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами ГМК.

Одним из основных инструментов изучения функций Ca^{2+} L-каналов являются различные синтетические блокаторы, при этом для селективного подавления функций L-каналов рекомендуется использовать блокаторы из группы дигидропиридинов (верапамил). Поэтому для проверки роли Ca^{2+} L-каналов в реализации релаксантного действия алкалоидов изучали их эффекты в присутствии блокатора этих каналов верапамила. Ингибирование входа Ca^{2+} в ГМК верапамилем приводит к вазодилатации и снижению артериального давления. В этой серии экспериментов было показано, что на фоне 0,1 мкМ верапамила (концентрация, соответствующая его IC_{50} сопровождалось расслаблением препарата аорты до $50 \pm 2,2\%$), алкалоид 1-О-БК 2,2 мкМ (концентрация соответствующая его

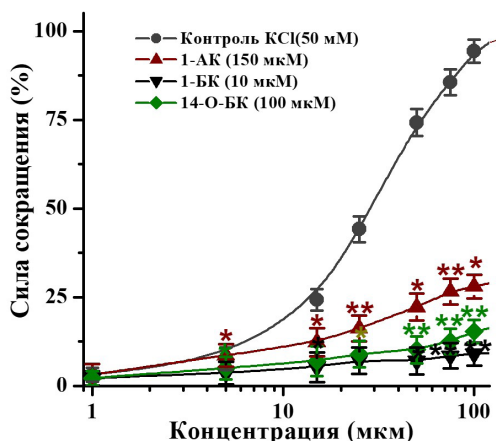


Рис. 2. Зависимость вазорелаксантного действия алкалоидов 1-О-бензоилкараколина, 1-О-ацетилкараколина и 14-О-бензоилкараколина от $[Ca^{2+}]_0$ и состояния Ca^{2+}_L -каналов. Влияние 1-О-БК (10μкМ), 14-О-БК(100 μкМ) и 1-О-АК (150μкМ) на сокращения аорты крысы, индуцированные кумулятивным добавлением $CaCl_2$ в растворы Кребса не содержащих ионы Ca^{2+} . По оси абсцисс-концентрация $CaCl_2$. По оси ординат - сила сокращения препаратов аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 50 мМ КСl и принятой за 100%. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 5-6$).

значению IC_{50}) на фоне этого эффекта верапамила, приводило к дополнительному расслаблению препаратов аорты крысы до $19,3 \pm 3,2\%$. В отличие от 1-О-БК, добавление 1-О-АК (83,1μкМ) и 14-О-БК (16,8 μкМ) в аналогичных условиях, также приводило к дополнительному расслаблению препарата аорты крысы в меньшей степени, но сохраняли способность ингибировать КСl-индуцируемые сокращения аорты. Так, внесение в раствор Кребса с верапамилом алкалоидов приводило к дополнительному снижению силы КСl-индуцированных сокращений препаратов аорты на $11,5 \pm 4,4\%$ и $16,5 \pm 4,7\%$ (рис. 3).

Результаты этих экспериментов показали, что в присутствии в среде инкубации верапамила релаксантный эффект 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК заметно снижается, но не подавляется полностью и алкалоиды сохраняли способность расслаблять препараты аорты в условиях блокады потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов.

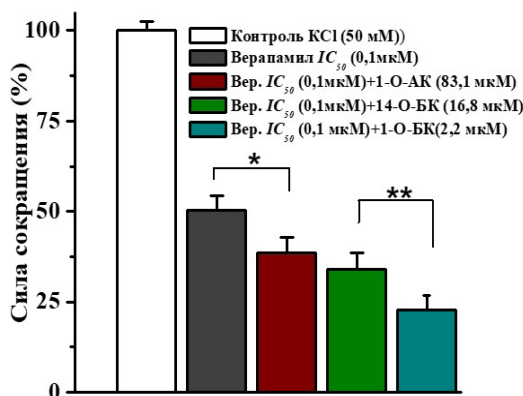


Рис. 3. Влияние верапамила (0,1 мкМ) на вазорелаксантный эффект 1-О-бензоилкараколина, 14-О-бензоилкараколина и 1-О-ацетилкараколина. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 5$).

Данные, полученные в этой серии экспериментов, убедительно свидетельствуют о том, что релаксантный эффект исследуемых алкалоидов в условиях гиперкалиевой контрактуры, действительно связан с блокадой потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, которая приводит к подавлению поступления ионов Ca^{2+} в ГМК, последующему уменьшению $[Ca^{2+}]_i$ в них и ингибированию их сократительного аппарата.

Однако, как было отмечено выше, верапамил не полностью подавляет релаксанта́нный эффект исследуемых алкалоидов и они сохраняли способность расслаблять препараты аорты в условиях гиперкалиевой контрактуры и в его присутствии. Эти данные указывают на то, что релаксанта́нное действие исследуемых алкалоидов связано не только с блокированием потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, но и их влиянием на другие системы транспорта ионов Ca^{2+} ГМК.

Таким образом, в наших исследованиях было установлено, что дитерпеноидные алкалоиды 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК обладают релаксанта́нным действием, в основе которого лежит комплексный механизм, включающий их взаимодействие с потенциал-зависимыми и рецептор-управляемыми Ca^{2+} -каналами плазмалеммы ГМК. Следствием такого взаимодействия, по-видимому, является подавление транспорта ионов Ca^{2+} , в результате которого уменьшается $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ГМК, что и является причиной ингибирования их сократительного аппарата и релаксации. Существенные отличия в релаксанта́нной активности 1-О-БК, 1-О-АК и 14-О-БК, очевидно, связаны с наличием в структуре последнего бензоильной группы, благодаря которой он, возможно, более эффективно взаимодействует и блокирует Ca^{2+} -транспортирующие системы ГМК.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке грантов Ф-ОТ-2021-154. Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан.

Конкретный вклад авторов. Мирзаева Ю.Т. - участвовала в проведении всех экспериментов, Усманов П.Б. предоставил методики для экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roth G.A., Johnson C., Abajobir A., Abd-Allah F., Abera S.F., et al. (2017) Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 70(1): 1-25. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.04.052
2. Wright P., Thomas M. (2018) Pathophysiology and management of heart failure. *Clinical Pharmacist*. 10 (12):261-269. DOI:10.1211/PJ.2018.20205742
3. Pereira da Silva E.A., Martin-Aragon Baudel M., Navedo M.F., Nieves-Cintrón M. (2022) Ion channel molecular complexes in vascular smooth muscle. *Front Physiol* 13: 999369. DOI: 10.3389/fphys.2022.999369
4. Dopico A.M., Bukiya A.N., Jaggar J.H. (2018) Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch* 470(9): 1271-1289. DOI: 10.1007/s00424-018-2151-y
5. Dzhahangirov F.N., Tursunkhodzhaeva F.M., Sultankhodzhaev M.N., Salimov B.T. (2013) Spasmolytic activity of diterpenoid alkaloids and their derivatives. Structure-activity relationship. *Chemistry of Natural Compounds* 49(4): 702-706. DOI: 10.1007/s10600-013-0712-z
6. Джахангиров Ф., Садритдинов С., Хамдамов.И. (1976). К фармакологии алкалоидов караколина и аконифина. Докл. АНУз ССр (1). 32- 34. // Dzhahangirov F., Sadritdinov S., Hamdamov.I. (1976). K farmakologii alkaloidov karakolina i akonifina. Dokl. ANUz SSr (1): 32- 34.
7. Джахангиров Ф.Н., Султаходжаев М.Н., Салимов Б.Т. (1997). Дитерпеноидные алкалоиды как новый класс антиаритмических средств. Взаимосвязь структура-активность. Химия природ. соединений (2).254-270. // Dzhahangirov F.N., Sultahodzhaev M.N., Salimov B.T. (1997). Diterpenoidnye alkaloidy kak novyj klass antiaritmicheskikh sredstv. Vzaimosvyaz' struktura-aktivnost'. Himiya prirod. soedinenij (2):254-270.
8. Vandier C., Guennec J.Y. Le, Bedfer Advan G.. *Physiol. Educ.* (2002). (26): 195-203.
9. Mirzaeva Yu.T. Sultanhodzhaev M.N., Usmanov P.B. (2013). Dejstvie diterpenoidnyh alkaloidov karakolina i 1-O-benzoilkarakolina na sokratitel'nyuyu aktivnost' gladkomyshechnykh kletok aorty krysy. O'zbekiston Biologiya Jurnal. (1): 8-11.

KARAKOLIN HOSILALARINING AORTA SILLIQ MUSKUL HUYAYRALARIGA TA'SIR
MEHANIZMINI TADQIQ QILISH

Yu.T. Mirzayeva, P.B. Usmanov

Ushbu maqolada 1-O-benzoylkarakolin, 1-O-asetilkarakolin va 14-O-benzoylkarakolinning kalamush aortasining silliq mushak hujayralari qisqarish faolligiga ta'sir mexanizmi bo'yicha o'tkazilgan tadqiqot natijalari keltirilgan. Tadqiqot kalamushlarning izolyatsiya qilingan aortal halqalarida o'tkazildi. Alkaloyidlar ishonchli va doza-bog'liq tarzda KCl bilan qo'zg'atilgan aorta halqalarining qisqarishini susaytirdi. Shu bilan birga, ushbu sharoitlarda alkaloyidlar Ca^{2+} ta'sirida induktsiyalangan aorta halqalarining qisqarishini ham sezilarli darajada kamaytirdi. Alkaloyidlarning relaksant ta'siri potentsialga bog'liq Ca^{2+} kanallari orqali Ca^{2+} oqimini susaytirishni o'z ichiga olishi mumkin, ammo Ca^{2+} siz Krebs eritmalarida verapamil ishtirokida bu ta'sir sezilarli darajada kamaygan.

Kalit so'zlar: aorta, ion kanallari, KCl, silliq mushaklar, alkaloidlar.

STUDY OF THE MECHANISM OF ACTION OF KARAKOLINE DERIVATIVES ON AORTIC SMOOTH
MUSCLE CELLS

Yu.T. Mirzayeva, P.B. Usmanov

This article presents the results of a study on the mechanism of action of 1-O-benzoylkarakoline, 1-O-acetylkarakoline, and 14-O-benzoylkarakoline on the contractile function of rat aortic smooth muscle cells. The research was conducted on isolated aortic rings from rats. The alkaloids reliably and dose-dependently inhibited the KCl-induced contraction of aortic rings. Simultaneously, under these conditions, the alkaloids significantly reduced Ca^{2+} -induced contraction of the aortic rings. The relaxant effects of the alkaloids may involve suppression of Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels; however, this effect is significantly diminished in Ca^{2+} -free Krebs solutions with verapamil.

Keywords: aorta, ion channels, KCl, smooth muscle, alkaloids.

АНАЛИЗ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФИЗМА rs689 ГЕНА ИНСУЛИНА С РАЗВИТИЕМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Т.С. СААТОВ, С.А. АБДУРАХИМОВ, Э.А. ИБРАГИМОВА, З.З. ИБРАГИМОВ

Институт Биофизики и биохимии при НУУз

Автор для переписки: zafaribragimov2017@gmail.com

Изучена ассоциация между полиморфизмом rs689 гена инсулина и развитием диабетической нейропатии (ДН). Соотношение частот аллелей и генотипов по полиморфному варианту для больных с ДН показало статистически значимое увеличение риска развития данного заболевания у носителей Т аллеля (RR = 1,64; 95% CI: 1,05–2,56), генотипов АТ (RR = 1,56; 95% CI: 1,0–2,44), ТТ (RR = 2,95; 95% CI: 0,57–15,3). Показано, что носители аллеля Т и генотипов АТ, ТТ имеют повышенный риск развития ДН, в то время как носители аллеля А и генотипа АА – пониженный риск. Полученные данные могут иметь важное клиническое значение для прогнозирования риска ДН.

Ключевые слова: Диабетическая нейропатия, сахарный диабет 2 типа, ген, инсулин, полиморфизм, гены-кандидаты.

Введение. Диабетическая нейропатия (ДН) – сложное состояние, вызванное нелеченым или поздней диагностикой сахарного диабета, и представляет собой дегенеративное поражение сенсорных, двигательных и вегетативных элементов нервной системы [1,2]. Наиболее распространенные и клинически значимые нейропатии при диабете 2 типа включают уремическую нейропатию, периферическую нейропатию и вегетативную кардиальную нейропатию. Эти нейропатии серьезно влияют на качество жизни человека и значительно увеличивают риск смерти [1-3]. ДН может вызывать от дистальной до проксимальной потери функции периферических нервов и даже физическую инвалидность или возможную боль [1,2,4]. В настоящее время исследовательские центры изучают участие экологических и генетических факторов риска в патогенезе ДН. Например, генетические и экологические факторы могут способствовать развитию этого заболевания, неправильно направляя различные метаболические и микрососудистые пути, которые влияют на патогенез диабетической нейропатии [2]. В частности, роль метаболического контроля и гликемической изменчивости имеет большое значение в этих процессах. Различия в структуре нервных клеток при гипергликемии приведены на рис. 1.

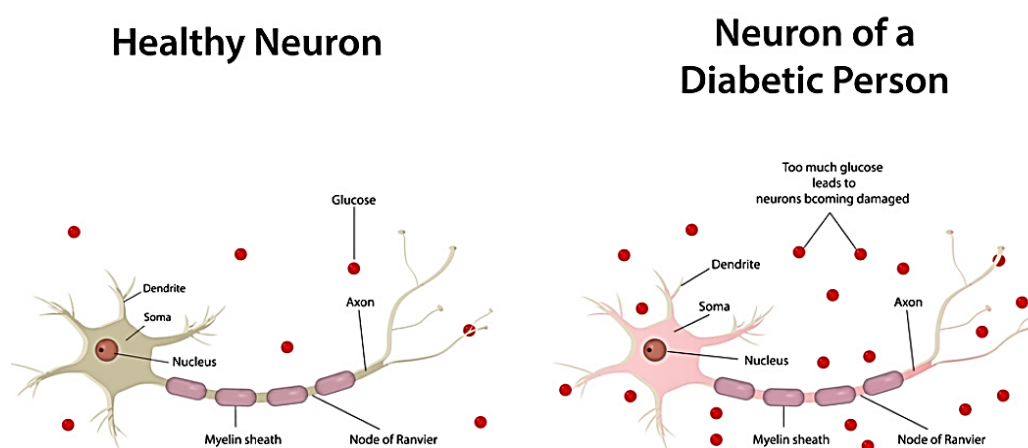


Рис. 1. Различия структуры нейронов при гипергликемии. Вид здорового нейрона и нейрона у больного диабетом (https://www.researchgate.net/figure/Sorts-s-of-Diabetic-neuropathy_fig2_361511930).

Недавно было обнаружено, что ряд генов-кандидатов, включая AKR1B1, VEGF, MTHFR, APOE и ACE, играют важную роль в развитии ДН [3,6]. Кроме того, в недавних исследованиях гомеостаза глюкозы в нервной системе, также изучалась связь гена инсулина (INS) с развитием ДН. Изменение количества инсулина в крови больных и мутации в гене инсулина могут оказывать влияние на развитие ДН [3,6].

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были сформированы две группы: основная и контрольная. Основная группа состояла из 66 пациентов узбекской национальности, находящихся на стационарном лечении в Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре эндокринологии МЗ РУз им. академика Я.Х. Туракулова. В контрольную группу включены 78 лиц без признаков ДН. На основании анамнестических и клиничко-биохимических данных была составлена генеалогическая анкета. Затем из образцов крови была выделена ДНК для молекулярных исследований. Выделение ДНК проводилось с помощью набора Ампли Тест РИБО-преп-производства ООО «НекстБио», Россия, согласно инструкции производителя. Количество и качество выделенной ДНК проверялось с помощью спектрофотометра NanoDrop. Для проверки полиморфизма rs689 гена INS были синтезированы специальные праймеры и протестированы с помощью амплификатора Step One «Applied Biosystems» (США) по протоколу аллель-специфической ПЦР (таб. 1).

Таблица 1

Характеристика последовательности синтезированных олигопраймеров

Ген	Полиморфизм	Структура праймеров	
INS	rs689	Прямая цепь 1	5'– GCTCAGCTGAACCTGGCTA –3
		Прямая цепь 2	5– GCTCAGCTGAACCTGGCTG –3
		Обратая цепь	5– CTTTAACTTCTGGCTTTGCTAT–3

После амплификации проводили электрофорез на 2,5% агарозном геле для визуализации результатов. Результаты исследования статистически обрабатывали с помощью программы DoctorStat 2013, версия 1.9. При проведении экспериментов были соблюдены все международные этические нормы проведения экспериментов с людьми.

Результаты и обсуждение. Распределение генотипов в контрольной и основной группах по полиморфизму rs689 гена INS соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Частота встречаемости дикого А аллеля гена INS в основной и контрольной группах составляет 72,7% и 83,3%, соответственно. Неблагоприятный аллель Т в популяционной выборке встречался реже по сравнению с основной группой (16,7% и 27,3%, соответственно) (рис. 2). При анализе распределения генотипов выявлено, что наиболее распространенным генотипом среди обследованных обеих групп оказался гомозиготный генотип АА (51,5 % в группе больных и 69,2% в контрольной группе). Частота гетерозиготного генотипа АТ, в выборке больных и в группе контрольных составила 42,4% и 28.2%, соответственно.

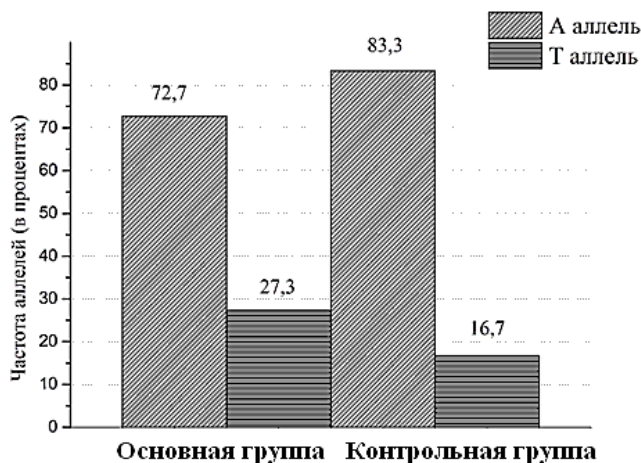


Рис. 2. Частоты аллелей полиморфизма rs689 гена INS в основной и контрольной группах.

Частоты распределения генотипа ТТ у больных с ДН составляют 6,1%, а в контрольной группе 2,6% соответственно (рис. 3).

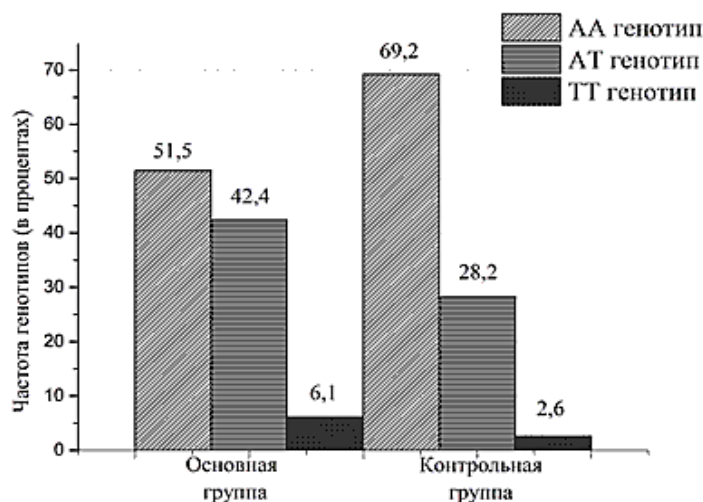


Рис. 3. Частоты генотипов полиморфизма rs689 гена INS в основной и контрольной группах.

По результатам изучения связи полиморфизма rs689 гена INS с риском развития ДН были выявлены различия при сравнении аллелей и генотипов в группах ДН и контроля (таб. 2).

Таблица 2

Ассоциативная связь между полиморфизмом rs689 гена INS с риском развития ДН

Аллели и генотипы	Статистическое различие					
	Risk ratio		Odds ratio		χ^2	p-value
	RR	95% CI:	OR	95% CI:		
A	0,87	0,77 – 0,99	0,53	0,30 – 0,94	4,76	0,029
T	1,64	1,05 – 2,56	1,88	1,06 – 3,31		
AA	0,74	0,56 – 0,98	0,47	0,24 – 0,93	4,72	0,030
AT	1,56	1,0 – 2,44	2,0	1,0 – 4,09	3,89	0,049
TT	2,95	0,57 – 15,3	3,18	0,55 – 18,3	1,85	0,18

Соотношение частот аллелей и генотипов по полиморфному варианту для больных с ДН показало статистически значимое увеличение риска развития данного заболевания у носителей Т аллеля (RR=1,64; 95% CI: 1,05–2,56, $\chi^2=4,76$; p=0,29), генотипов AT (RR= 1,56; 95% CI: 1,0–2,44, $\chi^2=3,89$; p=0,049), TT (RR= 2,95; 95% CI: 0,57–15,3, $\chi^2=1,85$; p=0,18). Из полученных результатов следует, что носители аллеля Т и генотипов AT имеют повышенный риск развития ДН, в то время как носители аллеля А и генотипа А/А – пониженный риск развития заболевания.

Заключение. В целом, результаты показывают, что аллель Т и генотип AT полиморфизма rs689 гена INS могут служить потенциальными генетическими маркерами для прогнозирования развития диабетической нейропатии. Для подтверждения этих ассоциаций и изучения их клинических последствий необходимо дальнейшее продолжение научных исследований.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке гранта F-OT-2021-153 Министерства инновационного развития Республики Узбекистан.

Вклад авторов. Саатов Т.С. - сформулировал исследовательскую проблему, разработал методологию; Абдурахимов С.А. - проведение экспериментов, собрал данные; Ибрагимов З.З - интерпретация результатов, статистический анализ; Ибрагимова Э.А. - провела обзор литературы, редактирование статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eid S.A., Rumora A.E., Beirowski B., Bennett D.L., Hur J., Savelieff, M.G., Feldman E.L. (2023) New perspectives in diabetic neuropathy. *Neuron*. 111(17): 2623-2641. DOI: 10.1016/j.neuron.2023.05.003
2. Bondar A., Popa A.R., Papanas N., Popoviciu M., Vesa C.M., Sabau M., Stoian A.P. (2021) Diabetic neuropathy: A narrative review of risk factors, classification, screening and current pathogenic treatment options. *Experimental and therapeutic medicine*. 22(1): 1-9. DOI: 10.3892/etm.2021.10122
3. Jankovic M., Novakovic I., Nikolic D., Mitrovic Maksic J., Brankovic S., Petronic, I., Bogicevic, D. (2021) Genetic and epigenomic modifiers of diabetic neuropathy. *International journal of molecular sciences*. 22(9): 4887. DOI: 10.3390/ijms22094887
4. Quiroz-Aldave J., Durand-Vasquez M., Gamarra-Osorio E., Suarez-Rojas J., Roseboom P.J., Alcalá-Mendoza R., Concepcion-Zavaleta M. (2023) Diabetic neuropathy: Past, present, and future. *Caspian journal of internal medicine*. 14(2): 153. DOI: 10.22088/cjim.14.2.153
5. Hajdú N., Rácz R., Tordai D.Z., Békeffy M., Vági O.E., Istenes I., Putz Z. Hajdú N. et.al. (2024) Genetic Variants Influence the Development of Diabetic Neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(12): 6429. DOI: 10.3390/ijms25126429
6. Saatov T., Ibragimova E., Ibragimov Z., Alimova N., Ishanhodjaev T., Zainutdinov B., Shamansurova Z. (2021) Study on INS gene rs689 polymorphism in patients with diabetes mellitus genetic burden. *Endocrine Abstracts*. Bioscientifica, 73. DOI: 10.1530/endoabs.73.AEP263

INSULIN GENINING RS689 POLIMORFIZMNI DIABETIK NEYROPATIYA RIVOJLANISHIDAGI ASSOTSIATSIYALARI TAHLILI

T.S. Saatov, S.A. Abdurakhimov, E.A. Ibragimova, Z.Z. Ibragimov

Insulin genining rs689 polimorfizmi va diabetik neyropatiya (DN) rivojlanishi o'rtasidagi bog'liqlikni ko'rib chiqildi. DN bilan og'rigan bemorlardagi rs689 polimorfizmining uchrash chastotasi tahlil qilinganda allel va genotip chastotalarining nisbati AT, TT genotiplari va T alleli tashuvchilarida DN rivojlanish xavfi ortishini ko'rsatdi (T alleli uchun: RR = 1,64; 95% CI: 1,05-2,56), (AT va TT genotiplari uchun mos ravishda: RR = 1,56; 95% CI: 1,0-2,44; RR = 2,95; 95% CI: 0,57-15,3). A alleli va AA genotipining tashuvchilarida esa mazkur kasallikka chalinish ehtimoli kamroq ekanligi kuzatildi. Olingan ma'lumotlar DN rivojlanishi xavfini oldindan aniqlashda muhim klinik ahamiyatga ega bo'lishi mumkin.

Kalit so'zlar: diabetik neyropatiya, 2-tur qandli diabet kasalligi, gen, insulin, polimorfizm, nomzod genlar.

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF INSULIN GENE rs689 POLYMORPHISM WITH THE DEVELOPMENT OF DIABETIC NEUROPATHY

T.S. Saatov, S.A. Abdurakhimov, E.A. Ibragimova, Z.Z. Ibragimov

In this study, we examined the association between the insulin gene rs689 polymorphism and the development of diabetic neuropathy (DN). The ratio of allele and genotype frequencies for the polymorphic variant for patients with DN showed a statistically significant increase in the risk of developing this disease in carriers of the T allele (RR = 1.64; 95% CI: 1.05–2.56), AT and TT genotypes (RR = 1.56; 95% CI: 1.0–2.44; RR = 2.95; 95% CI: 0.57–15.3). It was shown that carriers of the T allele and AT, TT genotypes have an increased risk of developing DN, while carriers of the A allele and AA genotype have a reduced risk. The data obtained may be of important clinical significance for predicting the risk of developing DN.

Keywords: Diabetic neuropathy, type 2 diabetes mellitus, gene, insulin, polymorphism, candidate genes.

THE EFFECT OF *RHODIOLA HETERODONTA* ON PHYSIOLOGICAL ALTERATIONS AND OXIDATIVE STRESS IN DIABETIC RATS

A. ABDULLAEV, U. GAYIBOV, S. GAYIBOVA, N. VYPOVA, T. ARIPOV

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

e-mail: dr.abdullaev.scientist@gmail.com

This study addresses the pivotal role of oxidative stress in non-infectious pathologies and underscores the importance of precise regulation of cellular oxidative processes through endogenous and exogenous antioxidant systems. Dysfunction in these systems often leads to pathological conditions, highlighting the therapeutic potential of antioxidants in restoring cellular function. *Rhodiola heterodonta*, renowned for its diverse biological effects including anti-oxidation, anti-inflammatory properties, hypoglycemic effects, and organ protection, presents a promising avenue for investigating its mechanisms, particularly in diabetes mellitus. In this research, we explore the impact of the ethanolic extract of *Rhodiola heterodonta* on oxidative stress levels in alloxan-induced diabetes. This study contributes to the growing body of literature on the potential therapeutic applications of *Rhodiola heterodonta* in managing oxidative stress-related complications associated with diabetes mellitus.

Key words: Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants, glucose, alloxan.

Introduction

The elevated glucose levels in the blood are independently associated with various pathologies, leading to hyperglycemia. Additionally, they contribute to conditions such as hyperlipidemia, hyperinsulinemia, hypertension, atherosclerosis, and even myocardial infarction [1-2].

Presently, epidemiological, biological, and clinical investigations have demonstrated the significant role of cell membrane oxidation in the progression of atherosclerosis, cataracts, and complications of diabetes mellitus caused by free radicals.

It is believed that oxidative stress is elevated during diabetes and has been reported to play a crucial role in the development of diabetic complications that result in damage to organisms. [3]. Reactive oxygen species and the inflammatory response are generated as a result of hyperglycemia, contributing to many of the secondary complications of diabetes. [4].

Natural antioxidants such as vitamin C, E, and β -carotene play significant roles in the prevention of these complications. The biological activity of many plant extracts can be attributed to their antioxidant activity (AOA) [5]. Antioxidant activity involves the transfer of electrons from one atom to another and constitutes an essential aspect of aerobic life and metabolism, as oxygen serves as the ultimate electron acceptor in the electron transport chain. However, problems may arise when the electron transport becomes uncoupled, resulting in the transfer of unpaired single electrons and the generation of free radicals.

The use of herbal preparations for treating diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and other ailments is justified due to their high safety profile coupled with reasonable efficacy, the potential for long-term use in chronic conditions, their widespread availability, and relatively low cost. While herbal remedies may not always replace synthetic drugs entirely, they can often complement conventional therapy. In Uzbekistan's traditional medicine arsenal, numerous plants demonstrate positive effects on the cardiovascular system. Additionally, they can serve as adjunctive therapy for conditions that are already present and progressing within the body. For instance, *Rhodiola heterodonta* is utilized in modern scientific medicine as an alcoholic tincture, functioning as a tonic and adaptogenic remedy for hypertension.

Materials and methods

Rhodiola heterodonta extract was kindly provided by "Bioton" LTD, Tashkent, Uzbekistan.

Experimental design

Alloxan (Sigma, 140 mg/kg body weight) was used to induce diabetes [6]. Alloxan, freshly prepared and dissolved in cold normal saline, was administered intraperitoneally to the rats. Three days after alloxan injection, fasting blood glucose levels were measured using the glucose oxidase method. Rats with blood glucose levels higher than 300 mg/dL were considered diabetic. Thirty rats were divided into two groups (n = 15):

- Group (N): Normal rats received daily 75 mg/kg of normal saline for 6 weeks via gavage.
- Group (NR): Normal *Rhodiola heterodonta* rats received every other day 75 mg/kg *Rhodiola heterodonta* extract for 2 weeks via gavage.

The animals were euthanized on the 24th day of the experiment [7] after being deeply anesthetized with CO₂.

All manipulations with the animals complied with the European Directive 2010/63/EU on protecting animals used for scientific purposes (FAO. Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Off J Eur Union. (2010):33–79.). The protocol was approved by the Animal Ethical Committee based on the Institute of Bioorganic Chemistry, AS RUz (Protocol Number: 133/1a/h, dated August 4, 2014) [8].

1. Determination of antiradical activity.

The effect of *Rhodiola heterodonta* on the free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was estimated according to the method described in reference [9]. An ethanol solution of the tested preparations was added to a control cuvette containing 100 μM DPPH. The mixture was quickly shaken, and the kinetics of its absorbance change were immediately recorded at 517 nm for half an hour.

2. Acute alloxan hyperglycemia

Acute alloxan hyperglycemia was induced by a single intraperitoneal injection of alloxan at a dose of 140 mg/kg. A decrease in blood glucose levels was determined 1 hour and 5 days after the induction of hyperglycemia [9, 10]. Additionally, acute alloxan hyperglycemia was induced by a single intraperitoneal injection of alloxan at a dose ranging from 1 to 3 grams. The decrease in blood glucose levels was assessed 1 hour and 2 days after the induction of hyperglycemia. [10].

The hypoglycemic effect (X) of the drug was calculated by the formula:

$$X = \frac{a - b}{a} \cdot 100 ,$$

where a is the concentration of sugar in the control group, mmol/l; b- the average concentration of sugar in the blood in mmol/l in the experimental group [10].

3. Data analysis

Statistical analyses were performed using the statistical package Origin 8.5 (OriginLab Corporation, USA). The data were evaluated using parametric Student's t-test, we expressed as M ± m. Deemed authentic results are expressed at * - P<0.05; ** - P<0.01; ***- P<0.001.

Results and discussion

Determination of antiradical activity of *Rhodiola heterodonta* by DPPH radical scavenging.

In this context, we investigated the anti-radical properties of *Rhodiola heterodonta* extract against the DPPH free radical. To accomplish this, we employed a method reliant on the antioxidants' capacity to diminish the molecules of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [8]. The kinetics of the compound's interaction with the stable radical DPPH were examined. Upon adding the studied compounds to an alcohol solution of DPPH, there was a noticeable change in the solution's color, indicative of DPPH transitioning to a non-radical state. Figure 1 (experimental points) illustrates the kinetics of alterations in DPPH's optical density following the addition of the tested compounds.

To assess the antioxidant radical scavenging activity (ARA) of the *Rhodiola heterodonta* under investigation, we opted for a concentration from 10 to 50 μl of extract from an alcohol solution prepared at a concentration of 1 mg/ml. Upon analysis of the results, it is evident that the optical density of the ethanol solution containing DPPH decreases, signifying their antiradical efficacy. Based on experimental findings, it can be inferred that the extract of RH under scrutiny exhibit a notable capacity to neutralize free radicals. To quantitatively evaluate the antiradical potential, half inhibition concentration (IC₅₀). In the course of the experiment to determine the antioxidant activity of *Rhodiola heterodonta* extract using the DPPH method, the concentration required to achieve 50% inhibition (IC₅₀) was calculated. The obtained IC₅₀ value was 0.0145 mg/ml. This indicates a high antioxidant potential of the extract, which may be attributed to its bioactive compounds.

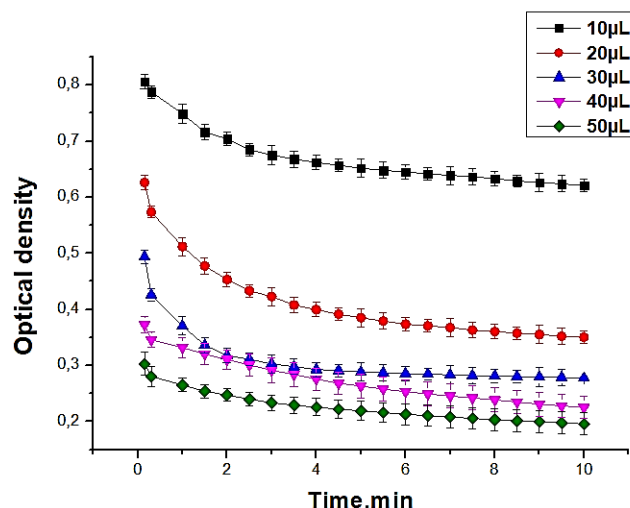


Fig. 1. Change in the relative optical density of a solution of DPPH in the ethanolic with the addition of an extract of *Rhodiola heterodonta* at various concentrations. DPPH concentration 0.1 mM.

The effect of *Rhodiola heterodonta* extract on blood glucose level and rat body weight

The alloxan diabetes model allows for the reproduction of absolute insulin deficiency, classifying it under the insulin form of diabetes mellitus. Consequently, it is unsuitable for studying the specific activity of sugar-lowering drugs that only exhibit efficacy in the presence of residual secretory function of beta cells.

The literature indicates that the toxic effect of alloxan manifests within the first few minutes after administration, with severe insulin deficiency developing over the subsequent days.

Table demonstrates that in the control group of animals, alloxan administration resulted in a 135% increase in blood glucose levels after 1 hour, rising from 4.0±0.4 mmol/l to 9.4±0.7 mmol/l. After 5 days, glucose levels remained elevated, showing a 76% increase and reaching 7.1±0.6 mmol/l.

Rhodiola heterodonta also exhibited a hypoglycemic effect in the alloxan model, albeit less pronounced. As depicted in Table, at doses of 100 and 200 mg/kg, it reduced blood sugar levels to 5.2 ± 0.41 and 5.2 ± 0.41 mmol/l, respectively, within an hour, resulting in hypoglycemic effects of 42.6% and 43.6%, respectively.

After 5 days, these figures were 5.4±0.4 and 5.3±0.6 mmol/l, respectively, with hypoglycemic effects of 24.0% and 25.3%, respectively.

Influence of extract of *Rhodiola heterodonta* on the change in glucose content in rats with alloxan hyperglycemia in comparison with the herbal preparation “Glukeyr” and dietary supplement “Natural inulin concentrate” (M±m; n=5)

Preparation	Dose of preparation mg/kg	Initial glucose concentration, mmol/l	Research time			
			after 1 hour		after 5 days	
			Content of glucose, mmol/l	Hypoglycemic effect, %	Content of glucose, mmol/l	Hypoglycemic effect, %
Control		4,0±0,4	9,4±0,7*		7,1±0,6	
Rhodiola heterodonta	100	4,0±0,4	5,4±0,4**	42,6	5,4±0,4**	24
Rhodiola heterodonta	200	4,0±0,4	5,3±0,4**	43,6	5,3±0,4**	25,3
Glukeyr	100	4,4±0,4	6,3±0,4**	33	5,0±0,6**	26
Natural inulin concentrate	200	4,2±0,4	5,8±0,4**	40	4,2±0,2**	43

*P≤ 0.05 in relation to the original group of animals,

**P≤ 0.05 in relation to the control group of animals.

The comparative drug “Glukeyr” reduced glucose levels 1 hour after alloxan administration from 9.4 ± 0.7 mmol/l to 6.3 ± 0.4 mmol/l, resulting in a hypoglycemic effect of 33%. After 5 days, this indicator decreased from 7.1 ± 0.6 to 4.2 ± 0.2 mmol/l, with hypoglycemic effects of 33% and 26%, respectively.

The reference drug “Natural inulin concentrate” decreased glucose levels 1 hour after alloxan administration from 9.4 ± 0.7 mmol/l to 5.8 ± 0.4 mmol/l, with a hypoglycemic effect of 40%. After 5 days, this indicator decreased from 7.1 ± 0.6 to 4.2 ± 0.2 mmol/l, with hypoglycemic effects of 40% and 43%, respectively.

Table shows the influence of extract *Rhodiola heterodonta* on the change in glucose content in rats with alloxan hyperglycemia, compared with the herbal preparation “Glukeyr” and dietary supplement “Natural inulin concentrate” ($M \pm m$; $n=5$).

The alloxan diabetes model enables the reproduction of absolute insulin deficiency, categorizing it under the insulin form of diabetes mellitus. Therefore, it is not suitable for studying the specific activity of sugar-lowering medications that only exhibit efficacy in the presence of residual secretory function of beta cells.

The toxic effect of alloxan is known to manifest within the first few minutes after administration, with severe insulin deficiency occurring after several days.

As indicated in Table, the introduction of alloxan in the control group of animals resulted in a 135% increase in blood glucose levels in the experimental animals after 1 hour, rising from 4.0 ± 0.4 mmol/l to 9.4 ± 0.7 mmol/l. After 5 days, the glucose content increased by 76% to 7.1 ± 0.6 mmol/l.

Rhodiola heterodonta also demonstrated a hypoglycemic effect in the alloxan model, albeit less pronounced. As shown in Table, at doses of 100 and 200 mg/kg, it reduced blood sugar levels within an hour to 5.2 ± 0.41 and 5.2 ± 0.41 mmol/l, respectively, with corresponding hypoglycemic effects of 42.6% and 43.6%. After 5 days, these figures were 5.4 ± 0.4 and 5.3 ± 0.6 mmol/l, with hypoglycemic effects of 24.0% and 25.3%, respectively.

The comparative medication “Glukeyr” reduced glucose levels 1 hour after alloxan administration from 9.4 ± 0.7 mmol/l to 6.3 ± 0.4 mmol/l, resulting in a hypoglycemic effect of 33%. After 5 days, this indicator decreased to 4.2 ± 0.2 mmol/l, with hypoglycemic effects of 33% and 26%, respectively.

The reference medication “Natural inulin concentrate” decreased glucose levels 1 hour after alloxan administration from 9.4 ± 0.7 mmol/l to 5.8 ± 0.4 mmol/l, with a hypoglycemic effect of 40%. After 5 days, this indicator decreased to 4.2 ± 0.2 mmol/l, with hypoglycemic effects of 40% and 43%, respectively.

As a result, the investigation into the hypoglycemic effect of *Rhodiola heterodonta* at doses of 100 and 200 mg/kg in the alloxan hyperglycemia model revealed its superiority over the herbal preparation Glukeyr. Its efficacy was comparable to that of “Natural inulin concentrate.”

Conclusion

Our findings represent the first investigation into the effects of *Rhodiola heterodonta* root extract on physiological alterations in a diabetic rat model. The results indicate that the extract significantly reduces blood glucose levels in comparison to the control group. Furthermore, *Rhodiola heterodonta* root extract demonstrates notable antioxidant and antiradical activity. The observed improvements in physiological parameters among diabetic rats are likely attributable to the extract’s potent antioxidant properties.

Acknowledgement

The work was supported by the Applied Research Program of the Ministry of Higher Education, Science and Innovation Republic of Uzbekistan (project A-FA-2021-372 “Creation of medicine with effective control of the cardiovascular system based on *Herba leonuri*, *Gnaphalii uliginosi herba*, *Chamomillae recutiae flores*, *Crataegi flores* medicinal plants”)

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Authors’ contribution: Abdullaev A.A. – analyzing the results, writing an article, Gayibov U.G. – give advice, direction and indications for experiments, Gayibova S.N. – induce diabetes mellitus disease model and conducting experiments. Vypova N.L. – measured the amount of sugar in the blood of rats. Aripov T.F. – head coordinator, give advice and directions for experiments.

REFERENCES

1. Jacoby RM, Nesto RW. Acute myocardial infarction in the diabetic patient: Pathophysiology, clinical course and prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 1992;20:736-44.

2. Abdullaev AA, Inamjanov DR, Abduazimova DS, Omonturdiyev SZ, Gayibov UG, Gayibova SN, Aripov TF. Silybum marianum's impact on physiological alterations and oxidative stress in diabetic rats. Biomed Pharmacol J. 2024;17(2).
3. Sheykh Hosseini S, Gol A, Khaleghi M. The effects of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 on the oxidative stress of the reproductive system in diabetic male rats. Int J Reprod BioMed. 2019;17:493-502.
4. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabetic Med. 2000;17:171-180.
5. Ribachenko VI, Ilkevich NS, Shreder G, Dmitruk AF, Chotiy KYu, Borovik VA. Izucheniye reaksii gossipola s 2,2-difenil pikrilgidrazilom. Naukovi pratsi DonNTU. 2007;119(9):77.
6. Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS. Diabetes mellitus-induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. Acta Histochem 2018; 120: 103–109.
7. Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS. Diabetes mellitus-induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. Acta Histochem. 2018;120:103-109.
8. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. (1986) Страсбург, 18 марта, Серии европейских договоров - № 123 // Yevropeyskaya konvensiya o zashite pozvonochnix jivotnix, ispol'zuemix dlya eksperimentov ili v inix nauchnix selyax. (1986) Strasburg, 18 marta, Serii yevropeyskix dogovorov - № 123.
9. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Biochem Pharmacol. 1998;56:213-222.
10. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 1968;125:189-198.
11. OECD. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure No 420. OECD Guideline Document Test No. 420. 2001.
12. Plamen IZ, Kokova VYu, Apostolova EG, Psychev LP. Possible role of 18-kDa translocator protein (TSPO) in etifoxine-induced reduction of direct twitch responses in isolated rat nerve-skeletal muscle preparations. Trop J Pharm Res. 2018;17(7):1309-1315.

RHODIOLA HETERODONTA EKSTRAKTINING DIABET KALAMUSHLARDA FIZIOLOGIK O'ZGARISHLAR VA OKSIDLOVCHI STRESSGA TA'SIRI

A. Abdullaev, U. Gayibov, S. Gayibova, N. Vipova, T. Aripov

Ushbu tadqiqot yuqumli bo'lmagan kasalliklarda oksidlovchi stressning muhim rolini o'rganadi va endogen va ekzogen antioksidantlar orqali hujayra oksidlanish jarayonlarini tartibga solish muhimligini ta'kidlaydi. Ushbu tizimlarning disregulyatsiyasi antioksidantlarning terapevtik salohiyatini ta'kidlab, patologik holatlarga olib kelishi mumkin. Antioksidant, yallig'lanishga qarshi, gipoglikemik va organlarni himoya qilish ta'siri bilan tanilgan *Rhodiola heterodonta*, alloksan bilan indutsirlangan diabet kalamushlarda oksidlovchi stressga ta'siri uchun tekshiriladi. Bizning topilmalarimiz qandli diabet bilan bog'liq oksidlovchi stress bilan bog'liq asoratlarni davolashda *Rhodiola heterodontaning* potentsial terapevtik qo'llanilishi bo'yicha o'sib borayotgan adabiyotlar to'plamiga yordam beradi va keyingi tadqiqotlar uchun yo'llarni taklif qiladi.

Kalit so'zlar: Oksidlanishli stress, reaktiv kislorod turlari, antioksidantlar, glyukoza, diabet, alloksan.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *RHODIOLA HETERODONTA* НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

А. Абдуллаев, У. Гайибов, С. Гайибова, Н. Выпова, Т. Арипов

В этом исследовании изучается критическая роль окислительного стресса при неинфекционных заболеваниях и подчеркивается важность регулирования клеточных окислительных процессов посредством эндогенных и экзогенных антиоксидантов. Нарушение регуляции этих систем может привести к патологическим состояниям, что подчеркивает терапевтический потенциал антиоксидантов. *Rhodiola heterodonta*, известная своими антиоксидантными, противовоспалительными, гипогликемическими и органопротекторными эффектами, исследуется на предмет ее влияния на окислительный стресс у крыс с диабетом, вызванным аллоксаном. Наши результаты вносят вклад в растущий объем литературы о потенциальном терапевтическом применении *Rhodiola heterodonta* в лечении осложнений, связанных с окислительным стрессом, связанных с сахарным диабетом, что предлагает направления для дальнейших исследований.

Ключевые слова: Окислительный стресс, активные формы кислорода, антиоксиданты, глюкоза, аллоксан.

**ВЛИЯНИЕ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ВЕРБЛЮЖЬЕЙ КОЛЮЧКИ
(*ALHAGI PERSARUM*) НА РЕГУЛЯЦИЮ ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ****О.Ж. ХАМИДОВА^{1,2}, Л.Х. ФАЙЗУЛЛАЕВА¹, З.К. ХАСАНОВА³, С.И. РУСТАМОВА¹,
Р.Ш. КУРБАННАЗАРОВА^{1,2,4}, П.Г. МЕРЗЛЯК¹, Р.З. САБИРОВ^{1,2}**¹Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент;²Кафедра биофизики, биологический факультет НУУз;³Институт предпринимательства и педагогики Денау;⁴Кафедра природных соединений и прикладной химии, химический факультет НУУз

Автор для переписки: ozoda_8114@mail.ru

В работе показано, что среди экстрактов изученных частей растения верблюжья колючка (*Alhagi persarum*), экстракт из семенной кожуры, наиболее богатый на биологически активные компоненты (флавоноиды, полифенолы), проявлял наиболее активные гемолитические свойства и сильнее остальных подавлял регуляцию объема тимоцитов с полумаксимальным действием 12–14 мкг/мл. Действие экстракта стебля на регуляцию объема клеток проявлялось при концентрациях, превышающих гемолитические в 2,5 раза. Все остальные экстракты проявляли ингибирующее свойство на регуляцию объема тимоцитов при сублитических концентрациях. Эта разница составила 1,6 раз для семян, 5,4 раз для листьев и 2,6 раза для корня. Можно полагать, что семенная кожура обладает очень активными нелиитическими компонентами, ингибирующими регуляцию клеточного объема.

Ключевые слова: *Alhagi persarum*, верблюжья колючка, экстракты, флавоноиды, полифенолы, тимоциты, регуляторное уменьшение объема.

Введение. Различные виды верблюжьей колючки *Alhagi* традиционно используются в восточной народной медицине в составе лекарственных средств для лечения ревматизма, бронхита, астмы, гастроэнтерита и язвы, заболеваний печени, мочевыводящих путей и желчного пузыря [1-4]. Недавние *in vivo* и *in vitro* исследования биологической активности растений рода *Alhagi* выявили антибактериальный, противогрибковый, антиоксидантный, антипролиферативный и спазмолитический эффекты [5, 6]. Nishanbaev и др. изучали биологическую активность флавоноидов и эфирных масел экстракта *Alhagi Persarum*, произрастающего в Узбекистане [3, 6]. В нашем исследовании мы приготовили экстракты из различных частей растения верблюжья колючка и изучили их влияние на регуляцию объема тимоцитов.

Материалы и методы. Объектом исследования послужил дикорастущий *Alhagi persarum*, собранный в сентябре в Денауском районе Сурхандарьинской области. Вид растения *Alhagi persarum* определяли по форме стебля, морфологии листьев, цветков и плодов согласно определителям: 1) Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений (<https://www.plantarium.ru/page/view/item/1826.html>); 2) GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset (<https://doi.org/10.15468/39omei>). Видовая принадлежность была подтверждена Ph.D. О.Т. Тургиновым (Институт ботаники АН РУз) путем сопоставления собранных образцов с гербарным материалом, хранящимся в Центральном гербарии Института ботаники АН РУз.

Собранный растительный материал разделили на 5 частей: 1) корень, 2) стебель, 3) листья, 4) семенная кожура, 5) семена. Экстракцию проводили как описано ранее [7-9]. Вкратце, 0,5 г сухого измельченного растительного сырья (корень, стебель, листья, семенная кожура или семена) заливали 10 мл 80% этанола, встряхивали 1 мин в круглодонной колбе объемом 50 мл, и затем помещали в ультразвуковую баню на 30 мин. Взвесь отфильтровывали через бумажный фильтр. Определение общего содержания сухого остатка в экстрактах проводили согласно ОФС.1.4.1.0021.15 Фармакопеи РФ с некоторыми модификациями: 2 мл жидкого экстракта помещали в стеклянный сосуд с плоским дном и высушивали в течение 3 ч при $102,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. Затем сосуд плотно закрывали крышкой, охлаждали до комнатной температуры и взвешивали до постоянной массы. Содержание сухого вещества выражали в миллиграмм на миллилитр (мг/мл) экстракта.

Определение общего содержания флавоноидов в экстрактах было проведено по комплексообразованию с треххлористым алюминием, и определение общего содержания полифенолов в экстрактах проводили с помощью метода Фолина-Чокалтеу (Folin-Ciocalteu) по [8, 9] с некоторыми модификациями.

В наших экспериментах нормальный раствор Рингера содержал (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 HEPES, 5 глюкозы (рН 7,4, 290 мОсм/кг-Н₂O). Гипотонический раствор (147±2 мОсм/кг-Н₂O) готовился путем разведения нормотонического раствора в соотношении 3:4 Н-буфером следующего состава (мМ): 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 глюкозы, рН 7,4 (40±2 мОсм/кг-Н₂O). Все реактивы имели квалификацию «х.ч.» или «ч.д.а.».

Опыты проводили на белых беспородных крысах 6–8 недельного возраста, которые содержались в виварии на обычной диете. Все процедуры проводились с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.), в строгом соответствии с рекомендациями ARRIVE (<https://arriveguidelines.org>) и были заранее одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики и биохимии. Тимоциты выделяли по стандартной методике [10].

В работе использовали метод регистрации клеточного объема по величине светопропускания [9, 10]. Изменение объема клеток тимоцитов регистрировали в проходящем свете с помощью микроколориметра МКМФ-1 (Россия). Использовали светофильтр с максимумом пропускания при 610 нм. Выходной сигнал усиливали с помощью усилителя У5-11 (Россия), оцифровывали с помощью аналого-цифрового преобразователя GO! LINK USB Data Acquisition Interface (Vernier, Beaverton, OR, США) и записывали на жесткий диск компьютера с помощью программы Logger Lite (Vernier, Beaverton, OR, США). В ходе эксперимента, 900 мкл среды, содержащей нормальный раствора Рингера (контроль), гипотонический раствор без (контроль) или с добавкой тестируемых экстрактов в указанных концентрациях, вносили в стеклянную кювету, термостатированную с помощью проточной бронзовой рубашки, соединенной с водяным циркуляционным термостатом LT Esocool 100 (Grant Instruments, Cambridge, Великобритания). После уравнивания в течение 10 мин, в ячейку вносили аликвоту (100 мкл) клеточной суспензии тимоцитов до конечной концентрации 10 млн/мл.

Регуляторное уменьшение объема (параметр *RVD*) рассчитывался по следующей формуле:

$$RVD = (T_{max} - T_{15}) / (T_{max} - T_0) * 100\% \quad (1)$$

где T_0 и T_{max} – начальное и максимальное значения светопропускания, T_{15} – значение светопропускания, измеренное через 15 мин после начала гипотонического стресса.

Концентрационные зависимости влияния испытуемых веществ на регуляцию объема клеток аппроксимировали с помощью уравнения Хилла следующего вида:

$$RVD = RVD_{min} + (RVD_{max} - RVD_{min}) / [1 + (C/C_{50})^h] \quad (2)$$

Здесь: RVD_{min} и RVD_{max} – минимальная и максимальная величины регуляторного уменьшения объема клеток (%), C – концентрация вещества (мкг/мл), C_{50} – концентрация вещества, оказывающая полумаксимальный эффект (мкг/мл), h – коэффициент Хилла.

Данные анализировались с использованием программы Origin, версии 8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка для n экспериментов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t -теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты определения сухого остатка, общего содержания флавоноидов и полифенолов в исследованных экстрактах верблюжьей колючки были приведены нами ранее (см. Таблицу 1 в [9]). Наибольшее количество сухого вещества было обнаружено в семенной кожуре (16,6±3,0 мг/мл). В материале, полученном из вегетативных частей растения, содержание сухого вещества в корне составляло 7,6±3,0 мг/мл, в стебле 8,9±1,6 мг/мл, в листьях 9,2±1,1 мг/мл. Из семян было получено примерно в 4 раза меньше (т.е. 4,5±1,0 мг/мл) сухого вещества, чем из семенной кожуры. В наших дальнейших экспериментах были использованы жидкие экстракты, а их концентрации выражались в пересчете на сухую массу согласно ранее приведенным данным [9].

В изотонической среде (нормальный раствор Рингера) объем тимоцитов оставался на постоянном уровне в течение 20 мин. При попадании в гипоосмотическую среду тимоциты сначала быстро

набухали, а затем восстанавливали свой объем до уровня, близкого к исходному, в течение ~15–20 мин. При 15-минутной инкубации клеток в гипоосмотической среде регуляторное уменьшение объема для контроля в среднем составило $RVD = 77,1 \pm 7,2\%$ ($n=16$). Экстракт корня растения при концентрации 7,6 мкг/мл стимулировал процесс RVD , т.е. уменьшение объема клеток достоверно активировалось и составляло $83,5 \pm 4,4\%$ ($n=5$) по сравнению с контролем. При увеличении концентрации экстракта происходило дозозависимое понижение способности клеток восстанавливать свой объем, и при дозе 760 мкг/мл процесс практически полностью ингибировался с $RVD \sim 13,4\%$ ($n=5$) (рис. 1А). Кривая доза-ответ хорошо описывается уравнением Хилла (2) с полумаксимальным ингибированием $C_{50} = 43,5 \pm 8,6$ мкМ и коэффициентом Хилла $5,2 \pm 4,7$ (рис. 1Б).

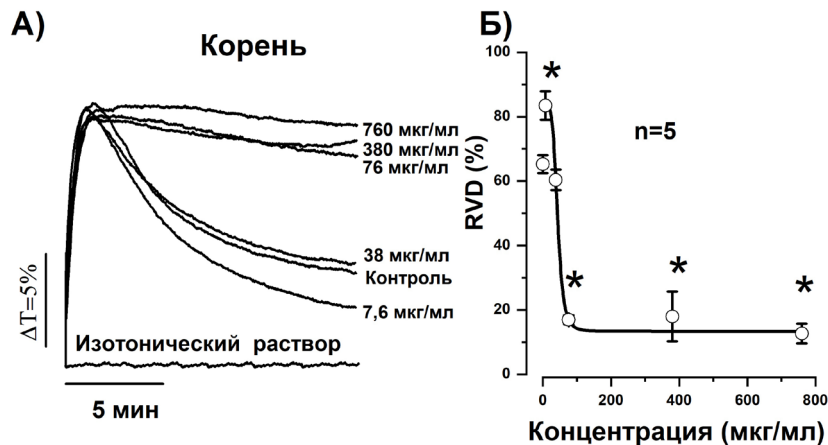


Рис. 1. Влияние экстрактов, полученных из корня верблюжьей колючки, на регуляцию объема тимоцитов в гипоосмотической среде. (А) – показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени; (Б) – показана зависимость средних величин параметра RVD , определенного по формуле (1), от концентрации экстрактов. *статистически значимое отличие при $P < 0,05$.

В экспериментах с экстрактом стебля верблюжьей колючки мы также наблюдали эффективное и дозозависимое подавление способности тимоцитов регулировать объем. Эффект был значительным уже при дозе 8,9 мкг/мл, а при 890 мкг/мл способность тимоцитов регулировать свой объем подавлялась до $RVD \sim 25\%$ (рис. 2А, Б). Однако следует отметить, что при высоких концентрациях экстракта стебля кинетика изменения объема имела двухфазный характер: начальное сжимание сменялось поздним набуханием при регистрации более 7–8 мин. Поэтому, по-видимому, значения параметра RVD , приведенные для больших доз экстракта стебля, несколько занижены. Полумаксимальный эффект наблюдался при $C_{50} = 133,1 \pm 32$ мкг/мл при коэффициенте Хилла $1,2 \pm 0,4$.

Значительное влияние экстракта листьев растения верблюжья колючка на RVD наблюдалось, начиная с концентрации 9,2 мкг/мл. При увеличении концентрации экстракта до 920 мкг/мл система контроля объема клеток блокировалась до $RVD \sim 38,6\%$ (рис. 2В). При аппроксимации результатов уравнением Хилла полумаксимальный эффект оказался равным $33,4 \pm 10,4$ мкг/мл, а коэффициент Хилла $1,5 \pm 0,7$ (рис. 2Г).

Действие экстракта кожуры семян на клетки тимоцитов было заметным уже при концентрации 2 мкг/мл и достигало плато при дозе 83 мкг/мл, при которой максимальное ингибирование составляло $RVD \sim 31,6\%$. Таким образом, даже при высокой концентрации экстракта кожуры семян полного ингибирования не наблюдалось (рис. 3А, Б). Следует отметить, что при концентрациях выше 83 мкг/мл, так же, как и в случае экстракта стебля, мы наблюдали двухфазную кинетику изменения светопропускания суспензии клеток, когда начальное сжимание сменялось вторичным набуханием, которое, по-видимому, отражает нарушение целостности клеточной мембраны, и поэтому эти данные нельзя интерпретировать однозначно, и они не приведены в данной статье. Кривая «доза-эффект» для концентраций до 83 мкг/мл хорошо описывается уравнением (2) с полумаксимальным эффектом при $C_{50} = 11,3 \pm 2,3$ мкг/мл и коэффициентом Хилла $2,4 \pm 0,9$.

В этих же условиях под воздействием экстракта из семян растения верблюжья колючка установлено снижение RVD тимоцитов до 35%. Концентрация полумаксимального эффекта была равна

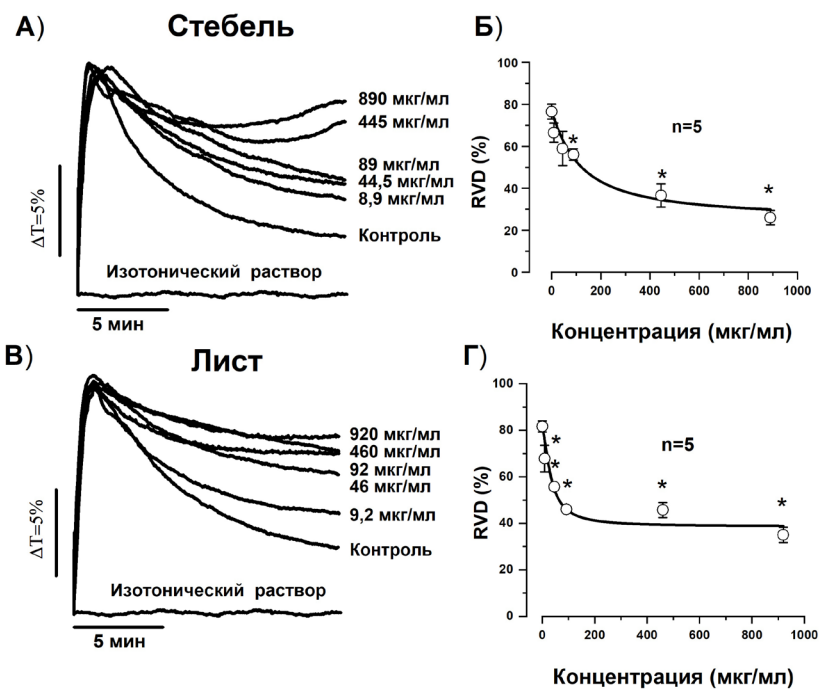


Рис. 2. Влияние экстрактов, полученных из стебля и листьев верблюжьей колючки, на регуляцию объема тимоцитов в гипоосмотической среде. (А, Б) – показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени; (В, Г) – показана зависимость средних величин параметра *RVD*, определенного по формуле (1), от концентрации экстрактов. * - статистически значимое отличие при $P < 0.05$.

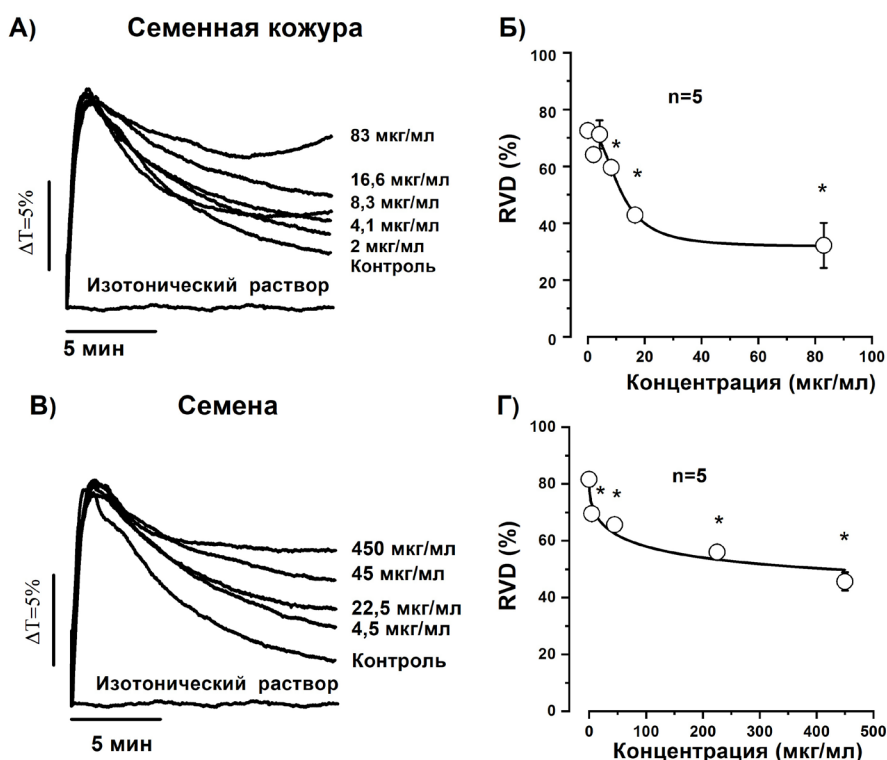


Рис. 3. Влияние экстрактов, полученных из семенной кожуры и семян верблюжьей колючки, на регуляцию объема тимоцитов в гипоосмотической среде. (А, В) – показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени; (Б, Г) – показана зависимость средних величин параметра *RVD*, определенного по формуле (1), от концентрации экстрактов. * - статистически значимое отличие при $P < 0.05$.

105,2±71,3 мкг/мл, а коэффициент Хилла 0,5±0,2 (рис. 3В, Г). Полученные в работе полумаксимальные ингибирующие концентрации, коэффициенты Хилла и максимальный процент ингибирования суммированы в таблице.

Анализ данных таблицы показывает, что, если использовать в качестве меры эффективности препарата величину C_{50} , то наиболее активным следует признать экстракт семенной кожуры, для которого этот параметр был минимальным и составил 11,3±2,3 мкг/мл, что примерно в три раза меньше, чем аналогичный параметр для экстракта листьев, т.е. экстракт семенной кожуры примерно в 3 раза более активен, чем экстракт листьев. При этом можно сказать, что экстракт семенной кожуры примерно в четыре раза эффективнее экстракта из корня, в девять раз эффективнее экстракта из семян и в десять раз эффективнее экстракта из стебля. В то же время, максимальный процент ингибирования был наибольшим для экстракта корня (больше 80%), что примерно в 1,5 раза больше, чем аналогичный параметр для экстракта семенной кожуры. Таким образом, ряд активности, составленный по величинам полумаксимальных эффективных концентраций, будет выглядеть следующим образом: семенная кожура > листья > корень > семена > стебель. Ряд эффективности, составленный по максимальному проценту ингибирования, имеет следующий вид: корень > стебель > семенная кожура = семена > листья.

Параметры уравнения Хилла для кривых зависимости параметра RVD от концентрации экстрактов, полученных из различных частей верблюжьей колючки

№	Части растения	C_{50} (мкг/мл)	Коэффициент Хилла (h)	Максимальный процент ингибирования (%)
1	Семенная кожура	11,3 ± 2,3	2,4 ± 0,9	56.5
2	Листья	33,4 ± 10,4	1,5 ± 0,7	52.2
3	Корень	43,5 ± 8,6	5,2 ± 4,7	84.0
4	Семена	105,2 ± 71,3	0,5 ± 0,2	56.5
5	Стебель	133,1 ± 32	1,2 ± 0,4	67.3

Заключение. Таким образом, среди изученных частей растения верблюжья колючка, семенная кожура была наиболее богата на биологически активные компоненты, такие как флавоноиды и полифенолы и проявляла наиболее активные гемолитические свойства [9]. Она также оказалась наиболее эффективной по своему влиянию на регуляцию объема тимоцитов, а полумаксимальное действие на эритроциты и тимоциты наблюдалось практически при одинаковой концентрации, то есть около 12–14 мкг/мл. Действие экстракта стебля на регуляцию объема клеток проявлялось при концентрациях, превышающих гемолитические в 2,5 раза. Все остальные экстракты проявляли ингибирующее свойство на регуляцию объема тимоцитов при сублитических концентрациях, т.е. при дозах, которые были намного меньше концентраций, необходимых для разрушения человеческих эритроцитов. Эта разница составила 1,6 раз для семян, 5,4 раз для листьев и 2,6 раза для корня. Можно полагать, что семенная кожура обладает очень активными нелинейными компонентами, ингибирующими регуляцию клеточного объема.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке грантов Ф-ОТ-2021-157 Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан и REP24112021/41 Мирового банка.

Конкретный вклад авторов: О.Ж. Хамидова, З.К. Хасанова и Л.Х. Файзуллаева провели эксперименты, С.И. Рустамова и О.Ж. Хамидова анализировали данные, О.Ж. Хамидова написала статью, Р.Ш. Курбанназарова и П.Г. Мерзляк принимали участие в дизайне экспериментов, анализе данных и подготовке статьи, Р.З. Сабиров руководил экспериментами, анализировал данные, редактировал статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Snafi A.E., Al-Kamel M.L., Esmael M.E. (2019) Antifungal effect of Alhagi maurorum phenolic extract. *IOSR Journal of Pharmacy* 9(9): 4-14.
2. Chakou F.Z., Boual Z., Hadj M., Belkhalifa H., Bachari K., El Alaoui-Talibi Z., El Modafar C., et al. (2021) Pharmacological Investigations in Traditional Utilization of Alhagi maurorum Medik. in Saharan Algeria: In Vitro Study of Anti-Inflammatory and Antihyperglycemic Activities of Water-Soluble Polysaccharides Extracted from the Seeds. *Plants (Basel)* 10(12). DOI: 10.3390/plants10122658
3. Nishanbaev S., Bobakulov K., Okhundedaev B., Sasmakov S., Yusupova E., Azimova S., Abdullaev N. (2019) Component composition of the extracts and essential oils from the Alhagi canescens, growing in Uzbekistan and their antimicrobial activity. *Nat Prod Res* 33(23): 3417-3420. DOI: 10.1080/14786419.2018.1475384
4. Jaradat N., Ghanim M., Abualhasan M.N., Rajab A., Kojok B., Abed R., Mousa A., et al. (2022) Chemical compositions, antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of Alhagi mannifera five extracts. *J Complement Integr Med* 19(4): 869-877. DOI: 10.1515/jcim-2021-0206
5. Marashdah M.S., Al-Hazimi H.M. (2010) Pharmacological activity of ethanolic extract of Alhagi maurorum roots. *Arabian Journal of Chemistry* 3(1): 39-42. DOI: 10.1016/j.arabjc.2009.12.007
6. Nishanbaev S.Z., Bobakulov K.M., Narbutaeva D.A., Aripova S.F., Khushbaktova Z.A., Abdullaev N.D. (2020) Flavonoids from the Aerial Part of Alhagi persarum of the Flora of Uzbekistan and Their Biological Activity. *Chemistry of Natural Compounds* 56(4): 729-731. DOI: 10.1007/s10600-020-03132-w
7. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J Univ Chem Tech Metall* 40(3): 255-260.
8. Samatha T., Shyamsundarachary R., Srinivas P., Swamy N.R. (2012) Quantification of total phenolic and total flavonoid contents in extracts of Oroxyllum Indicum l. kurz. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(4): 177-179.
9. Хамидова О.Ж., Рустамова С.И., Файзуллаева Л.Х., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. (2024) Влияние водно-этанольных экстрактов верблюжьей колючки alhagi persarum на целостность эритроцитов. *Узб. Биол. Ж.* (2): 3-7. // Xamidova O.J., Rustamova S.I., Faizullaeva L.X., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., Sabirov R.Z. (2024) Vliyanie vodno-etanolnex ekstraktov verbluyey kolyuchki Alhagi persarum na tselostnost eritrotsitov. *Uzb .Biol.J.* (2): 3-7.
10. Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. (2003) Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 22(2): 221-232.

ALHAGI PERSARUM SUV-ETANOLLI EKSTRAKTLARNING TIMOTSITLAR HAJM
BOSHQARILISHIGA TA'SIRI

O.J. Xamidova, L.X. Fayzullaeva, Z.K. Xasanova, S.I. Rustamova, R.Sh. Kurbannazarova,
P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

Ushbu maqolada yantoq (*Alhagi persarum*) o'simligining o'rganilgan qismlari ekstraktlari orasida biologik faol komponentlarga (flavonoidlar, polifenollar) eng boy bo'lgan urug' po'stlog'i, eng faol gemolitik xususiyatlarni namoyon qilishi va timotsitlar hajm boshqarilishiga yarim maksimal ta'siri 12-14 mkg/ml bilan, eng faol ta'sir ko'rsatishi aniqlangan. Poya ekstraktining hujayra hajmini boshqarishga ta'siri gemolitik faoligidan 2,5 marta yuqori konsentratsiyalarda namoyon bo'ldi. Qolgan barcha ekstraktlar sublitik konsentratsiyalarda timotsitlar hajmini boshqarishni ingibirlash xususiyatini namoyon qildi. Bu farq urug'lar uchun 1,6 marta, barglar uchun 5,4 marta va ildiz uchun 2,6 martani tashkil etdi. Urug' po'stlog'ini hujayra hajmini boshqarishni ingibirlovchi juda faol nolitik komponentlarga ega deb taxmin qilish mumkin.

Калит сўзлар: *Alhagi persarum*, yantoq, ekstraktlar, flavonoidlar, polifenollar, timotsitlar, RVD hujayra hajm kamayishi.

EFFECT OF WATER-ETHANOLIC EXTRACTS OF *ALHAGI PERSARUM* ON THE REGULATION OF THYMOCYTE VOLUME

O.J. Khamidova, L.X. Fayzullayeva, Z.K. Khasanova, S.I. Rustamova, R.Sh. Kurbannazarova,
P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

In the present study, it was shown that, among the extracts of different parts of the plant *Alhagi persarum*, the seed coat, which was the richest in biologically active components (flavonoids, polyphenols), exhibited the most active hemolytic properties and had the most active effect on thymocyte volume regulation with a half-maximal effect of 12–14 µg/ml. The effect of the stem extract on cell volume regulation was observed at concentrations 2.5 times higher than its hemolytic activity. All other extracts showed the property of inhibiting thymocyte volume regulation at sublytic concentrations. This difference was 1.6 times for seeds, 5.4 times for leaves, and 2.6 times for roots. It can be assumed that the seed coat has very active nonlytic components that inhibit cell volume regulation.

Key words: *Alhagi persarum*, extracts, flavonoids, polyphenols, thymocytes, *RVD* regulatory volume decrease.

МЕХАНИЗМ ЛИТИЧЕСКОГО И СУБЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА СМОЛЫ ФЕРУЛЫ ТАДЖИКСКОЙ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

^{1,2}Д.Д. ФАЙЗИЕВ, ²С.Х. НЕЪМАТОВА, ^{1,2}О.Ж. ХАМИДОВА, ^{1,2}Р.Ш. КУРБАННАЗАРОВА,
¹П.Г. МЕРЗЛЯК, ^{1,2}Р.З.САБИРОВ

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз;

²Кафедра биофизики, биологический факультет НУУз

Автор для переписки: diyor09@mail.ru

Представлены результаты по изучению механизма действия водно-спиртового экстракта смолы *Ferula tadshikorum* на эритроциты человека. Установлено, что экстракт индуцирует формирование пор радиусом ~3,3 нм в мембране эритроцитов. Показано, что в небольших сублитических концентрациях, не вызывающих гемолиза, экстракт снижает устойчивость клеток как к осмотическому, так и к коллоидно-осмотическому стрессу, вызванному каналоформером нистатином. Тот факт, что литическое действие происходит при концентрации <10 мкг/мл, а сублитические эффекты проявляются уже при 1 мкг/мл, свидетельствуют о крайне высокой активности биомолекул в составе экстракта смолы вида *Ferula tadshikorum*.

Ключевые слова: *Ferula tadshikorum*, осмотический стресс, эритроциты, коллоидно-осмотическая резистентность, полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Введение. *Ferula* – род многолетних цветковых травянистых растений семейства зонтичных (*Apeaceae*), которые обычно характеризуются своеобразным резким чесночным запахом. В мире встречается более 180 видов ферулы [1], в основном они распространены в Центральной Азии, на Ближнем Востоке, в Сибири и Южной Азии [2]. Ферула таджикская (*Ferula tadshikorum*) является представителем этого рода и считается эндемичным видом Средней Азии [3]. Ферула содержит множество химических соединений, в первую очередь кумарины, особенно сесквитерпеновые кумарины, летучие масла, серосодержащие и ароматические соединения, которые проявляют разнообразную биологическую активность [4, 11]. В наших предыдущих исследованиях, когда мы изучали влияние экстракта смолы *Ferula tadshikorum* на эритроциты человека, экстракт показал высокую гемолитическую активность [5]. Целью данного исследования было определение механизма гемолитического действия экстракта смолы Ферулы таджикской, а также его действия на осмотическую и коллоидно-осмотическую резистентность клеток в сублитических дозах.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования была использована смола, собранная в осенний период из надземной части растения *Ferula tadshikorum*, произрастающего в Дехканабадском районе Кашкадарьинской области. Вид растения определяли с помощью программы *Picture This – Plant Identifier* (WanChai, Гонконг, Китай). Смола была предоставлена фирмой *Pinnacle Worldwide Exim Agro LLC* (Узбекистан). Экстракт получали с использованием ранее описанного метода [6, 7] с некоторыми модификациями. 0,5 г растительной смолы заливали 10 мл 80% этанола, встряхивали 1 мин в круглодонной колбе объемом 50 мл и затем помещали в ультразвуковую баню на 30 мин. Полученную суспензию фильтровали через бумажный фильтр. Определение массы сухого остатка в экстракте проводили по правилам Фармакопеи РФ (ОФС.1.4.1.0021.15). Для этого 3 мл жидкого экстракта помещали в стеклянный сосуд с плоским дном и сушили в термостате при температуре 102,5±2,5°C в течение 3 часов. Высушенный экстракт охлаждали до комнатной температуры при плотно закрытой крышке и взвешивали до постоянного веса. Массу сухого остатка выражали в мг на 1 мл экстракта.

В наших экспериментах нормальный раствор Рингера содержал (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 HEPES, 5 глюкозы (рН 7,4, 290 мОсм/кг-Н₂О). Н-буфер содержал (мМ): 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 глюкозы, рН 7,4 (40±2 мОсм/кг-Н₂О). Гипотонические растворы с указанной осмолярностью готовили путем смешивания раствора Рингера с Н-буфером в различных соотношениях. Все реактивы имели квалификацию «х.ч.» или «ч.д.а.».

Кровь брали из локтевой вены здорового донора-добровольца в необходимом объеме с помощью стерильного шприца по ранее описанной методике [8]. Все процедуры по выделению эритро-

цитов человека проводились в строгом соответствии с Хельсинкской декларацией, в соответствии с рекомендациями ARRIVE (<https://arriveguidelines.org>) и были одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики и биохимии (разрешение № ВЕС/ИБВ-NUU/2019/01-2). Цельную гепаринизированную (10 ЕД) кровь разводили в соотношении 1:10 раствором Рингера. Приготовленную смесь центрифугировали при 3000 об/мин (1000 g) в течение 10 минут. Процедуру повторяли 3 раза и готовили 8%-ную суспензию крови. В лунки платы микротитратора вносили 200 мкл нормального раствора Рингера (контроль) или раствора Рингера, содержащего экстракт в указанной концентрации. Затем в каждую лунку добавляли по 200 мкл 8%-ной суспензии эритроцитов (общий объем суспензии 400 мкл). Смесь инкубировали в течение 60 минут при 37°C. Микротитратор, содержащий суспензию крови, осторожно встряхивали каждые 15–20 минут. После инкубации суспензию клеток центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Количество гемоглобина в супернатанте измеряли на микроколориметре (МКМФ-1, Россия) при длине волны 540 нм. Процент гемолиза рассчитывали по формуле:

$$\text{Гемолиз} = (ОП/ОП_{100}) * 100\% \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность супернатанта в опыте; ОП₁₀₀ – средняя оптическая плотность супернатанта в 3-х лунках с детергентом тритон X-100. Гемолиз, рассчитанный для 3-х контрольных лунок, показывает уровень спонтанного гемолиза при данных экспериментальных условиях. Спонтанный лизис эритроцитов составил около 1% при 60-минутной инкубации при 37°C.

Для определения устойчивости эритроцитов человека к осмотическому стрессу в лунки платы микротитратора добавляли 360 мкл раствора Рингера с различным осмотическим давлением, без или с добавкой экстракта в указанных концентрациях. Затем в каждую лунку вносили по 40 мкл 40% суспензии эритроцитов, предварительно инкубированной при комнатной температуре в течение 30 минут, без или с добавкой экстракта в указанных концентрациях. Плату переносили в термостат, инкубировали при 37°C в течение 60 мин и определяли уровень гемолиза по светопоглощению при 540 нм.

Для определения устойчивости эритроцитов к коллоидно-осмотическому лизису, в лунки платы микротитратора вносили по 200 мкл раствора Рингера без или с добавкой экстракта и нистатина в концентрациях, вдвое превышающих указанные на графиках. Во все лунки вносили по 200 мкл 8% суспензии эритроцитов (при этом концентрации экстракта и нистатина достигали конечных значений, указанных на соответствующих графиках) и через 60 мин инкубации при 37°C определяли уровень гемолиза по светопоглощению при 540 нм.

Полиэтиленгликоли (ПЭГ) использовались в следующих концентрациях, создающих дополнительное осмотическое давление 40 мОсм/кг H₂O: ПЭГ1500 (25 мМ), ПЭГ2000 (25 мМ), ПЭГ3000 (20 мМ), ПЭГ4000 (15 мМ), ПЭГ6000 (12 мМ) и ПЭГ12000 (10 мМ). Осмоляльность растворов измеряли с помощью депрессионного осмометра OM 802 (Vogel, Германия). Гидродинамические радиусы (R_h) были взяты из [9, 10].

Данные осмотической резистентности были аппроксимированы с использованием уравнение следующего вида:

$$L = L_{\min} + (L_{\max} - L_{\min}) / (1 + (П / П_{50})^s) \quad (2)$$

где: L – уровень лизиса эритроцитов человека (%), L_{\min} и L_{\max} – минимальное и максимальное значение L , $П_{50}$ – осмоляльность раствора, вызывающего полумаксимальный лизис клеток (мОсм/кг-H₂O) и s – параметр крутизны.

Кривые зависимости «доза-ответ» аппроксимировали уравнением Хилла следующего вида:

$$L = L_{\min} + (L_{\max} - L_{\min}) / (1 + (C / C_{50})^h) \quad (3)$$

Здесь: L – уровень лизиса эритроцитов человека (%), L_{\min} и L_{\max} – минимальное и максимальное значение L , C – концентрация вещества (мкг/мл), C_{50} – концентрация вещества, оказывающая полумаксимальный эффект (мкг/мл), h – коэффициент Хилла.

Данные анализировались с использованием программы Origin, версии 8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SE) для n экспериментов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t-теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В предыдущих исследованиях нами было установлено, что количество экстракта, приводящее к полумаксимальному гемолизу, равно $C_{50} = 7,8 \pm 2,4$ мкг/мл [5]. В настоящем исследовании мы определили, что масса сухого вещества в экстракте равна $7,2 \pm 0,9$ мг/мл, исходя из чего рассчитывали концентрацию, приводящую к 100% гемолизу в экспериментах с полиэтиленгликолями.

Для выяснения механизма литической активности экстракта в эритроцитах мы использовали тест осмотической защиты, основанный на предположении, что непроницаемые неэлектролиты, при внесении во внеклеточную среду в концентрациях, достаточных для уравнивания онкотического давления гемоглобина (~ 40 мОсм/кг- H_2O), оказывают защитное действие, восстанавливая двойное Равновесие Доннана, которое нарушалось при высокой проницаемости плазматической мембраны эритроцитов для небольших органических и неорганических осмотитов. В наших экспериментах осмотическая защита начиналась с ПЭГ6000 ($R_h = 2,5$ нм) (рис. 1). Тот факт, что ПЭГ12000 был способен блокировать лизис эритроцитов в присутствии экстракта в дозе, вдвое превышающей значение C_{50} , позволяет предположить коллоидно-осмотический механизм лизиса эритроцитов. Полумаксимальное блокирование лизиса наблюдалось при $R_h = 3,3$ нм (пунктирные линии на рисунке 1). Эту величину можно рассматривать как оценку эффективного размера пор, образуемых литическими компонентами экстракта смолы *ферулы*.

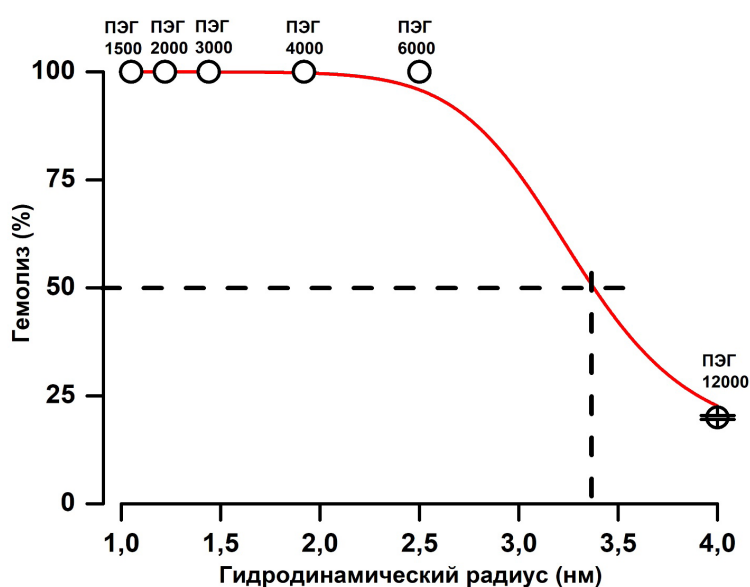


Рис. 1. Уровень гемолиза человеческих эритроцитов под воздействием экстракта *ферулы* в присутствии в среде полиэтиленгликолей с различным гидродинамическим радиусом. Все полимеры использованы в концентрациях, создающих избыточное осмотическое давление среды в 40 мОсм/кг- H_2O (см. текст).

Далее мы исследовали влияние экстракта *ферулы* на чувствительность эритроцитов человека к осмотическому и коллоидно-осмотическому стрессу. В этих экспериментах мы использовали негемолитические концентрации экстракта. В контрольных экспериментах при понижении осмотичности внеклеточной среды эритроциты человека начинали лизировать начиная с 110 мОсм/кг- H_2O , и уровень гемолиза достигал 100% при 40 мОсм/кг- H_2O , а полумаксимальный лизис наблюдался при $P_{50} = 99,9 \pm 0,3$ мОсм/кг- H_2O ($n=4$, рис. 2). В присутствии экстракта сублитических дозах мы наблюдали существенный сдвиг кривой осмоточувствительности в сторону больших величин осмотического давления (рис. 2). Этот результат означает, что в присутствии экстракта для достижения аналогичной степени лизиса эритроцитов достаточна меньшая величина осмотического градиента. Таким образом, экстракт *ферулы* оказывает осмотическое сенсibiliзирующее действие на эритроциты человека.

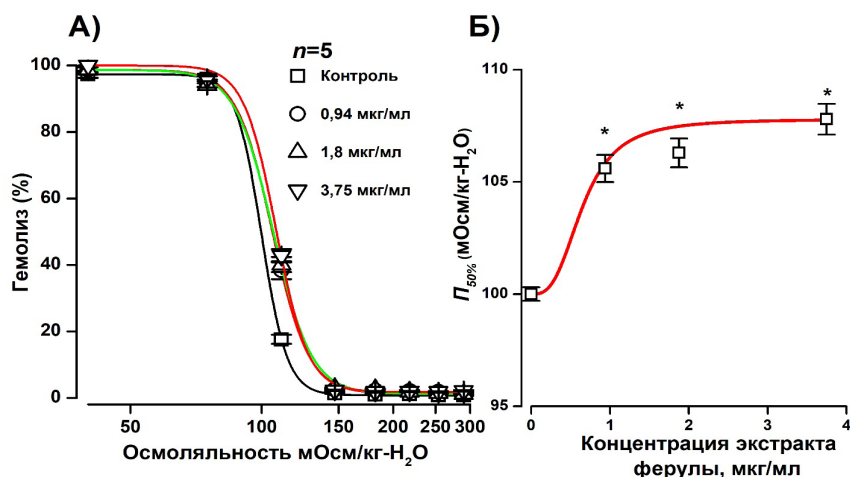


Рис. 2. Влияние экстракта ферулы на осмотическую резистентность эритроцитов человека. (А) Стационарный лизис эритроцитов измеряли после 60-минутной инкубации клеток в гипотонических растворах Рингера в присутствии экстракта в указанных концентрациях. Сплошные линии соответствуют аппроксимации уравнением (2). (Б) Изменение P_{50} в зависимости от концентрации экстракта. (* $P < 0,05$; n – число повторов).

В отличие от лизиса эритроцитов, индуцированного гипотоничностью, коллоидно-осмотический лизис происходит в изотонических условиях и обусловлен онкотическим градиентом, который несбалансирован вследствие нарушения ионной проницаемости плазмалеммы и перехода двойной доннановской системы в простую. Классическим примером коллоидно-осмотического лизиса является гемолиз, индуцированный порообразующим полиеновым антибиотиком нистатином. В качестве индикатора устойчивости клеток к коллоидно-осмотическому лизису мы использовали эффективную концентрацию нистатина, вызывающую 50% гемолиз (C_{50}). В наших экспериментальных условиях эффективная полумаксимальная концентрация нистатина, вызывающая 50% гемолиз, составила $C_{50} = 137,8 \pm 4,7$ мкМ ($n=4$, рис. 3). Добавление экстракта во внеклеточную среду приводило к отчетливому дозозависимому сдвигу кривой концентрационной зависимости в сторону более низких концентраций нистатина (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки в присутствии экстракта становились менее способными противостоять коллоидно-осмотическому стрессу.

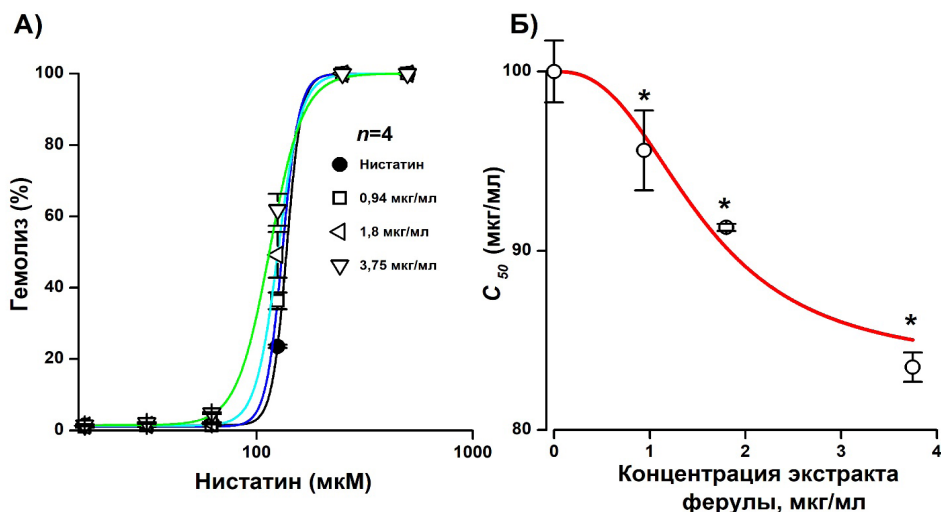


Рис. 3. Влияние экстракта ферулы на чувствительность эритроцитов человека к коллоидно-осмотическому лизису, индуцированному нистатином. (А) Влияние экстракта на эритроциты, инкубированные в течение 60 минут в нормальном растворе Рингера в среде с различными концентрациями нистатина. (Б) – Зависимость C_{50} нистатина от концентрации в среде экстракта ферулы. (* $P < 0,05$, n – число повторов).

Заключение. Таким образом, наши эксперименты, проведенные с экстрактом смолы ферулы, показали, что литические компоненты в его составе создают в мембране эритроцитов поры с эффективным радиусом $R_h = 3,3$ нм. В небольших сублитических концентрациях, не вызывающих гемолиза, экстракт снижает устойчивость клеток как к осмотическому, так и к коллоидно-осмотическому стрессу. Тот факт, что литическое действие происходит при концентрации <10 мкг/мл, а сублитические эффекты проявляются уже при 1 мкг/мл, свидетельствуют о крайне высокой активности биомолекул в составе экстракта смолы вида *Ferula tadshikorum*, которые требуют идентификации в дальнейших научных исследованиях.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке грантов Ф-ОТ-2021-157 Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан и REP24112021/41 Мирового банка.

Конкретный вклад авторов: Д.Д. Файзиев и С.Х. Неъматова провели эксперименты, Д.Д. Файзиев и О.Ж. Хамидова анализировали данные, Д.Д. Файзиев написал статью, Курбанназарова и П.Г. Мерзляк принимали участие в дизайне экспериментов, анализе данных и подготовке статьи, Р.З. Сабиров руководил экспериментами, анализировал данные, редактировал статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salehi M., Naghavi M.R., Bahmankar M. (2019) A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Ind. Crops Prod.* (139): 111511.
2. Znati M., Nicheм B.J., Cazaux, S., Bouajila J. (2014) Chemical composition, biological and cytotoxic activities of plant extracts and compounds isolated from *Ferula lutea*. *Molecules* (19): 2733–2747.
3. Khamraeva D.T., Khojimatov O.K., Uralov A.I. (2019) Growth and development of *Ferula tadshikorum* Pimenov in culture. *Acta Biologica Sibirica* 5(3): 172–177.
4. Bahetjan Y., Muhaxi M., Pang K., Kizaipek M., Tang H., Sefidkon F., Yang X. (2023) Chemistry, Bioactivity, and Prediction of the Quality Marker (Q-Marker) of *Ferula* Plants in China: A Review. *Molecules*. (28): 5191.
5. Файзиев Д.Д., Неъматова С.Х., Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. (2023) Изучение действия экстракта смолы ферулы таджикской на клеточные мембраны. *Узб. Биол. Ж.* (6): 6–10. // Fayziev D.D., Nematova S.Kh., Khamidova O.Zh., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., Sabirov R.Z. (2023) Study of the effect of *Ferula Tadshikorum* resin extract on cell membranes. *Uzb. Biol. J.* (6): 6–10.
6. Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. (2005) Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. J. Univ. Chem. Tech. Metall.* 40(3): 255–260.
7. Иногамов У.К., Циферова Н.А., Рустамова С.И., Хамидова О.Ж., Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. (2020) Влияние экстрактов общих флавоноидов из плодов и семян каперсов *sapparis spinosa* на активность объем-зависимого анионного канала. *Узб. Биол. Ж.* (6): 3–7. // Inogamov U.K., Tsiferova N.A., Rustamova S.I., Hamidova O.Zh., Fayziev D.D., Kurbannazarova R.Sh., Merzlyak P.G., Sabirov R.Z. (2020) Vliyanie ekstraktov obshchih flavonoidov iz plodov i semyan kapersov sapparis spinosa na aktivnost' ob'em-zavisimogo anionnogo kanala. *Uzb. Biol. J.* (6): 3–7.
8. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва: Медицина; (1975) 306 с. // Kost E.A. (1975) Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya. Moskva: Medicina. 306 s.
9. Sabirov R.Z., Krasilnikov O.V., Ternovsky V.I., Merzliak P.G. (1993) Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes. A novel method of pore size determination. *Gen Physiol Biophys.* 12(2): 95–111.
10. Sabirov R.Z., Okada Y. (2004) ATP-conducting maxi-anion channel: a new player in stress-sensory transduction. *Jpn. J. Physiol.* 54(1):7–14. doi: 10.2170/jjphysiol.54.7.
11. Sharopov F.S., Khalifaev P.D., Satyal P., Sun Y., Safomuddin A., Musozoda S., Wink M., Setzer W.N. (2019) The Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from the Underground Parts of *Ferula tadshikorum* (*Apiaceae*). *Rec. Nat. Prod.* 13:1 18–23.

FERULA TADSHIKORUM SMOLASI EKSTRAKTINING ODAM ERITROTSITLARI LITIK
VA SUBLITIK TA'SIR MEXANIZMI

D.D. Fayziev, S.H. Nematova, O.J. Khamidova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

Ferula tadshikorum smolasining suv-spirтли ekstraktini odam qizil qon hujayralariga ta'sir mexanizmini aniqlashga doir natijalar keltirilgan. Ekstraktning eritrotsitlar membranasida ~3,3 nm lik pora hosil qilishi aniqlandi. Gemoliz chaqirmaydigan past sublitik konsentratsiyalarda ekstrakt hujayralarning ham osmotik, ham kanal hosil qiluvchi nistatin tomonidan chaqirilgan kolloid-osmotik stressga nisbatan chidamliligini pasaytirishi ko'rsatilgan. Litik ta'sir <10 mkg/ml konsentratsiyada sodir bo'lishi va sublitik ta'sirlar 1 mkg/ml da namoyon bo'lishi *Ferula tadshikorum* turi smolasi ekstrakti tarkibidagi biomolekulalarning juda yuqori faolligidan dalolat beradi.

Kalit so'zlar: *Ferula tadshikorum*, osmotik stress, eritrotsitlar, kolloid-osmotik rezistentlik, polietilenglikol (PEG).

THE MECHANISM OF LYTIC AND SUBLYTIC EFFECTS OF *FERULA TADSHIKORUM* RESIN
EXTRACT ON HUMAN ERYTHROCYTES

D.D. Fayziev, S.H. Nematova, O.J. Khamidova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

It has presented the results of studying the mechanism of action of the water-alcoholic extract of *Ferula tadshikorum* resin on human red blood cells. It was shown that the extract induces the formation on the plasma membrane of pores with radius of ~3.3 nm. It was shown that at small sublytic concentrations, which do not cause hemolysis, the extract reduces the resistance of cells to the osmotic and colloid-osmotic stress produced by the channel-forming antibiotic, nystatin. The fact that the lytic effect takes place at a concentration of <10 µg/ml, and the sublytic effects are already manifested at 1 µg/ml, suggests the extremely high activity of the biomolecules in the *Ferula tadshikorum* resin extract.

Key words: *Ferula tadshikorum*, osmotic stress, erythrocytes, colloid-osmotic resistance, polyethyleneglycol (PEG).

ВЛИЯНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ С СУЛЬФАНИЛАМИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ НА РЕГУЛЯЦИЮ ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ

М.Б. РАХИМОВА^{1,5}, Р.С. ЭСАНОВ^{2,4}, П.Г. МЕРЗЛЯК¹, М.Б. ГАФУРОВ^{2,6},
Р.Ш. КУРБАННАЗАРОВА^{1,3}, Р.З. САБИРОВ^{1,3}

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз;

²Институт биоорганической химии АН РУз;

³Кафедра биофизики, биологический факультет НУУз;

⁴Химический факультет НУУз;

⁵Ташкентский международный университет “КИМЁ”;

⁶Гулистанский государственный университет

Автор для переписки: manzura.raximova.93@mail.ru

Показано, что формирование супрамолекулярных комплексов с сульфаниламидными препаратами приводит к значительным изменениям в способности глицирретовой кислоты (ГлК) ингибировать регуляцию объема тимоцитов при гипосмотическом стрессе. Сравнение с влиянием этих же лигандов на гемолитическую активность ГлК выявило существенные отличия: сульфацилпиримидин ослаблял оба типа активности, а сульфаметоксазол и сульфадимезин усиливали их, однако сульфален ослаблял ингибирование регуляции объема, но усиливал гемолитическую активность, а фталазол оказывал диаметрально противоположный эффект. Выраженная разнонаправленность влияния комплексообразования на эти два вида биологической активности, а также большая разница в величинах коэффициента Хилла (16–22 для гемолиза и 1,5–2,7 для регуляции объема) свидетельствуют о принципиальном различии их механизма.

Ключевые слова: 18β-глицирретовая кислота, регуляция клеточного объема, сульфаниламиды, супрамолекулярные комплексы

Введение. Многие типы клеток способны сохранять свой объем, что необходимо для их выживания и для выполнения ими своих основных биологических функций. Постоянство объема клетки зависит как от изменений внеклеточной осмолярности, так и от концентраций внутриклеточных метаболитов, а также транспорта веществ через клеточную мембрану. Чтобы противостоять критическим изменениям объема, клетки используют различные механизмы его регуляции. Так, после набухания клетки эти механизмы уменьшают внутриклеточную осмолярность и содержание воды в клетке в процессе, называемом регуляторным уменьшением объема (RVO) клетки (или RVD – Regulatory volume decrease). При сжатии клетки эти механизмы увеличивают внутриклеточную осмолярность и клеточный объем в процессе, называемом регуляторным увеличением объема (RVI – Regulatory volume increase) [1]. Изменения объема клеток могут представлять собой сигналы, которые запускают миграцию, пролиферацию и высвобождение гормонов и трансмисмиттеров из клеток [2].

Сульфаниламидные препараты являются синтетическими противомикробными препаратами широкого спектра действия, которые давно и успешно используются в медицине в качестве средств для лечения бактериальных инфекций человека и животных [3, 4]. Сульфаниламиды используются для лечения тонзиллита, сепсиса, менингококкового менингита, бактериальной дизентерии и многих инфекций мочевыводящих путей [5, 6]. В структурном отношении сульфаниламиды являются производными пара-аминобензосульфокислоты и содержат группу $-SO_2NH_2$ или $-SO_2NH-$ (т.е. они являются сероорганическими соединениями), а также 5- или 6-членные гетероциклические кольца [7].

Образование супрамолекулярных комплексов сульфаниламидных препаратов с глицирретовой кислотой (ГлК, агликон глицирридина) и их биологическая активность практически не изучены и являются предметом данного исследования.

Материалы и методы. В наших экспериментах использовались растворы следующего состава: 1) нормальный раствор Рингера (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5 глюкозы, pH 7,4 (290 мОсм/кг H₂O); 2) Н-буфер (мМ): 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, , 5 глюкозы, pH=7,4

(40 ± 2 мОсм/кг H_2O). Гипотонический раствор (147 ± 2 мОсм/кг H_2O) готовили путем смешивания раствора Рингера с H -буфером в соотношении 3:4. ГлК получали гидролизом моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты в 2,5% серной кислоте как описано ранее [8]. Комплексы ГлК с сульфаниламидными препаратами получали путем кипячения в абсолютном этаноле 1 мМ растворов ГлК и сульфаниламидных препаратов как описано ранее [9].

Эксперименты были проведены на белых беспородных крысах 6-8-недельного возраста (100-150 г), находящихся на обычном рационе в условиях вивария. Все исследования проводились в строгом соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или других целях (Страсбург, 1986 г.) и ARRIVE (<https://arriveguidelines.org>) и были одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики и биохимии (разрешение № ВЕС/ЛВВ-НУУ/2019/01-1 от 03.10.2019 г.).

Клетки тимоцитов выделяли из тимуса белых крыс стандартным методом [10]. В эксперименте использовался метод регистрации размера клеток по светопропусканию [11-13]. В ячейку к гипотоническому раствору, содержащему 900 мкл глицирретовой кислоты и ее комплексов с сульфаниламидными препаратами, добавляли 100 мкл (100 млн/мл) суспензии тимоцитов, и регистрировали светопропускание полученной суспензии тимоцитов в течение 15 минут при длине волны 610 нм. Параметр RVD рассчитывали по следующей формуле:

$$RVD = \frac{T_{max} - T_{15}}{T_{max} - T_0} \times 100\% \quad (1)$$

Здесь T_0 и T_{max} – начальный и максимальный показатель светопропускания, T_{15} – светопропускание, измеренное через 15 минут после начала гипотонического стресса.

Данные анализировались с использованием программы Origin, версии 8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SE) для n экспериментов. Величину концентрации полумаксимального эффекта (C_{50} , мкМ) определяли путем аппроксимирования концентрационной зависимости параметра RVD для каждого эксперимента уравнением Хилла с последующим усреднением полученных величин C_{50} и h . Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием t -теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение.

Анализ структур сульфаниламидов показывает, что они могут формировать супрамолекулярные комплексы с ГлК за счет неионных взаимодействий между терпеноидными кольцами и ароматическими фрагментами молекул лигандов. В нашей предыдущей работе (Рахимова и др. 2024 [14]) мы использовали отклонение от аддитивности спектров поглощения супрамолекулярных комплексов «ГлК-сульфаниламиды» по сравнению с суммой спектров ГлК и индивидуальных лигандов более, чем на 10%. Такое отклонение было обнаружено для 5-ти из десяти исследованных соединений. При этом, для 8-ми исследованных комплексов мы зафиксировали статистически значимое отличие гемолитической активности от таковой для чистой ГлК (Рахимова и др. 2024 [14]).

В данной работе, мы в первую очередь исследовали влияние самих сульфаниламидных препаратов на РУО тимоцитов. В контроле уменьшение объема тимоцитов, инкубированных в течение 15 минут в условиях гипоосмотического стресса, составило $76,3 \pm 1,3\%$ ($n=20$). Сульфаниламидные препараты добавляли в концентрациях от 25 до 200 мкМ.

При концентрациях до 25 мкМ действие сульфаниламидных препаратов достоверно не отличалось от контроля. Уменьшение параметра RVD под действием сульфаниламидных препаратов в концентрации 100 мкМ было уже заметно и достоверно отличалось от контроля (рис. 1Б). При этом действие самих препаратов не отличалось достоверно друг от друга, а процент блокирования RVD колебался в пределах от 22% до 38%.

При изучении дозозависимого влияния комплексов ГлК с сульфаниламидными препаратами на регуляцию объема клеток было установлено, что все они, также как чистая ГлК, полностью ингибировали процесс РУО в условиях гипоосмотического стресса. В этой серии экспериментов, в контрольных опытах для тимоцитов, инкубированных в течение 15 минут в гипоосмотической среде, наблюдалось уменьшение объема от 63% до 79%, в среднем $72,6 \pm 4,9\%$ ($n=45$). Внесение в среду инкубации чистой ГлК вызывало полное подавление способности тимоцитов регулировать свой объем с $C_{50} = 10,5 \pm 0,8$ мкМ и коэффициентом Хилла $2,7 \pm 0,4$ (рис. 2А и Г, черные квадраты). Общая карти-

на ингибирующего действия супрамолекулярных комплексов ГлК с сульфамидами была схожей, как это видно из рис. 2 (Б и В), однако количественно эффекты отличались. Из рисунка 2Г видно, что комплекс ГлК+Сульфадимезин уменьшает параметр *RVD* с большей эффективностью, чем сама ГлК, тогда как действие комплекса ГлК+Сульфапиридазин было слабее по сравнению с ГлК.

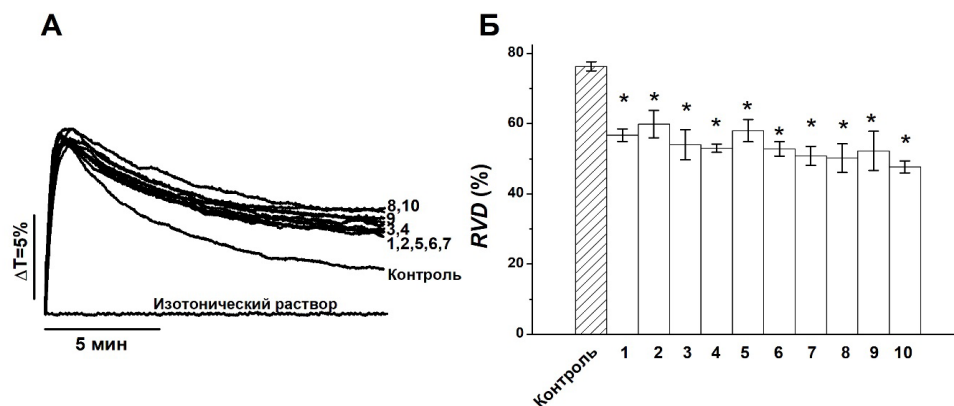


Рис. 1. Влияние сульфаниламидных препаратов в концентрации 100 мкМ на параметр *RVD* в условиях гипосмотического стресса. (А) Показаны оригиналы записей изменения светопропускания клеточной суспензии. (Б) По оси ординат – параметр *RVD* (%). Цифрами на графиках обозначены: 1 – Сульфапиридазин; 2 – Сульфален; 3 – Норсульфазол; 4 – Этазол; 5 – Сульгин; 6 – Сульфацил; 7 – Стрептоцид; 8 – Сульфаметоксазол; 9 – Фталазол; 10 – Сульфадимезин. $n = 20$ для контроля и $n = 3$ для препаратов.

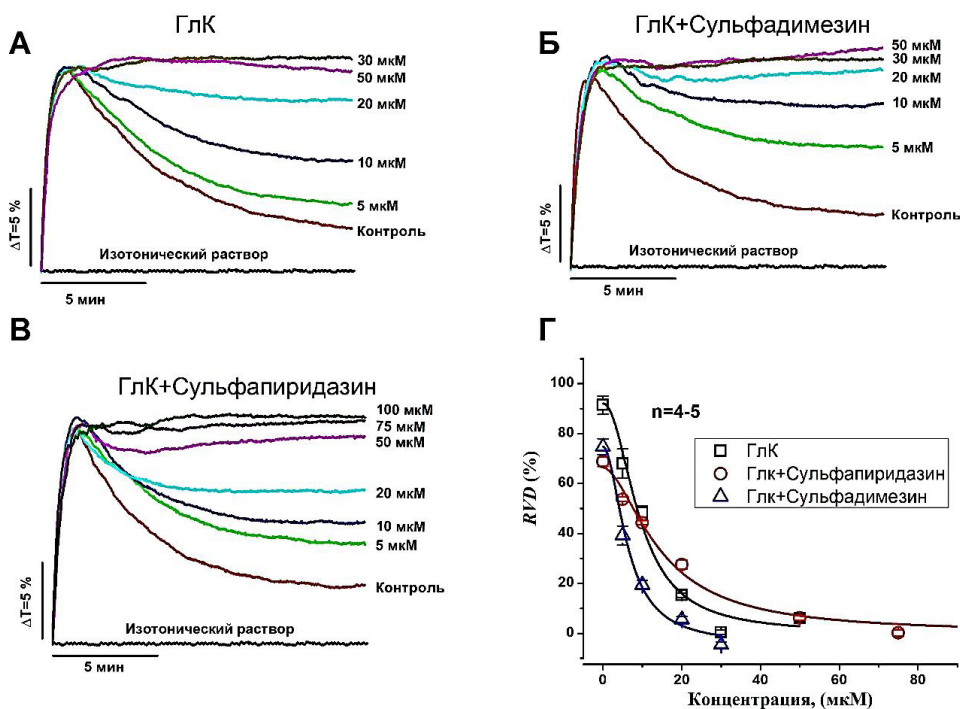


Рис. 2. Дозозависимое влияние глицирретовой кислоты и ее комплексов с сульфаниламидными препаратами на систему регуляции объема тимоцитов в условиях гипосмотического стресса. Показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени в присутствии в среде (А) ГлК, (Б) ГлК+Сульфадимезин, (В) ГлК+Сульфапиридазин. (Г) зависимость средних величин параметра *RVD* от концентрации ГлК и ее комплексов, полученных в экспериментах, аналогичных показанным на А, Б и В.

Результаты экспериментов с десятью исследованными комплексами суммированы в таблице. Графический анализ величин C_{50} , приведенный на рисунке 3 показывает, что некоторые из этих комплексов оказывали слабое влияние на активность ГлК, а некоторые – сильное влияние, причем есть как усиливающие блокирование РУО (т. е. понижающие величину C_{50} , это комплексы с сульфаметоксазолом, фталазолом, сульфадимезином), так и ослабляющие ингибирование (супрамoleкулярные комплексы, в которых в качестве лиганда использованы сульфацилпиримидин и сульфален).

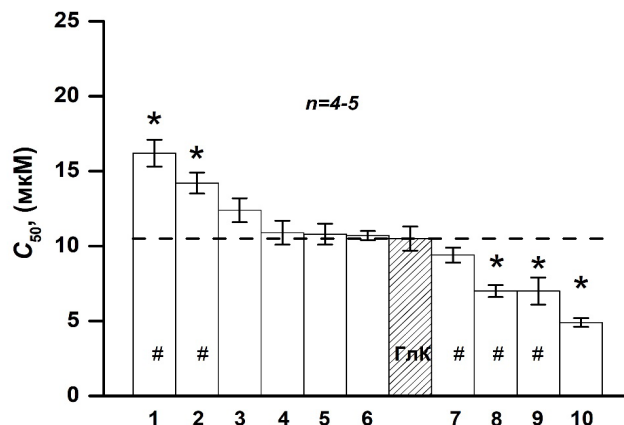


Рис. 3. Полумаксимальные эффективные концентрации комплексов глицирретовой кислоты с сульфаниламидными препаратами. Заштрихованный столбик показывает результат для чистой ГлК; 1) ГлК+Сульфацилпиримидин; 2) ГлК+Сульфален; 3) ГлК+Норсульфазол; 4) ГлК+Этазол; 5) ГлК+Сульгин; 6) ГлК+Сульфацил; 7) ГлК+Стрептоцид; 8) ГлК+Сульфаметоксазол; 9) ГлК+Фталазол; 10) ГлК+Сульфадимезин. Символом # отмечены вещества, формирующие супрамoleкулярный комплекс по данным спектрофотометрии. Указаны средние величины из 4-5 экспериментов ± SE. Звездочками (*) отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от величины C_{50} для ГлК при $P < 0,05$.

Следует отметить, что влияние на ингибирующую РУО активность ГлК не всегда совпадает с наличием спектрофотометрического доказательства формирования супрамoleкулярных комплексов. Так, сульфацилпиримидин по данным спектрофотометрии образует устойчивый комплекс ($K(\lambda)=0,64\pm 0,01$ [14]), однако сульфадимезин нет ($K(\lambda)=0,93\pm 0,06$), хотя он и усиливает действие ГлК почти в 2 раза (рис. 3, табл.). Вполне возможно, что сульфадимезин образует комплекс, но это не отражается на спектрах поглощения ГлК. Образующий комплекс сульфален ослабляет ингибирование РУО, а сульфаметоксазол и фталазол, которые также формируют комплекс, усиливают.

Концентрации полумаксимального эффекта (C_{50}) и коэффициенты Хилла (h) дозозависимого ингибирующего действия комплексов глицирретовой кислоты с сульфаниламидными препаратами на систему регуляции объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса

№	Название комплекса	C_{50} (μM)	h
	ГлК	10,5±0,8	2,7± 0,2
1	ГлК+Сульфацилпиримидин	16,2±0,9	1,6±0,1
2	ГлК+Сульфален	14,2±0,7	1,5±0,1
3	ГлК+Норсульфазол	12,4±0,8	2,2±0,1
4	ГлК+Этазол	10,9±0,8	2,3±0,2
5	ГлК+Сульгин	10,8±0,7	2,0±0,2
6	ГлК+Сульфацил	10,7±0,3	1,9±0,1
7	ГлК+Стрептоцид	9,4±0,5	2,0±0,2
8	ГлК+Сульфаметоксазол	7,0±0,4	1,6±0,2
9	ГлК+Фталазол	7,0±0,9	1,8±0,3
10	ГлК+Сульфадимезин	4,9±0,3	1,8±0,1

Заключение. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что формирование супрамолекулярных комплексов с сульфаниламидными препаратами может приводить как к ослаблению, так и к усилению способности ГлК ингибировать регуляцию объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса. Если первый тип влияния может отражать уменьшение биодоступности молекул ГлК, то второй тип влияния, по-видимому, отражает изменение связывания молекул ГлК с ключевыми компонентами системы РУО тимоцитов, такими как пути входа ионов кальция, кальций-активируемые калиевые и объем-зависимые анионные каналы [15-17]. Сравнение с влиянием этих же лигандов на гемолитическую активность ГлК показывает, что влияние на ингибирование регуляции объема сильно отличается. Так, хотя сульфацилрин ослаблял оба типа активности, а сульфаметоксазол и сульфадимезин усиливали их, сульфален ослаблял ингибирование ГлК регуляции объема, и наоборот, усиливал ее гемолитическую активность. Для фталазола наблюдался диаметрально противоположный эффект. Выраженная разнонаправленность влияния комплексообразования ГлК с сульфаниламидами на эти два вида биологической активности свидетельствует, а также большая разница в величинах коэффициента Хилла (16–22 для гемолиза и 1,5–2,7 для регуляции объема) свидетельствуют о принципиальном различии их механизма. Как мы показали ранее, гемолиз под действием ГлК происходит по коллоидно-осмотическому механизму как результат формирования водонаполненных пор радиусом около 2,3 нм (Fayziev_et_all_2022_J_Herbmed). В то же время, подавление регуляции объема является следствием ингибирования активности объем-зависимого анионного канала (ОЗАК) [18, 19]. Значение коэффициента Хилла 1,5–2,3 близко к таковому для ГлК ($h=2,7$) и говорит о том, что механизм подавления РУО не меняется при комплексообразовании и требует связывания не менее двух молекул ГлК или его сульфаниламидного комплекса с ОЗАК.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке грантов Ф-ОТ-2021-157 Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан и REP24112021/41 Всемирного банка.

Конкретный вклад авторов: М.Б. Рахимова, Р.С. Эсанов, провели эксперименты и анализировали данные, М.Б. Рахимова и П.Г. Мерзляк написали статью, М.Б. Гафуров и Р.Ш. Курбанназарова принимали участие в дизайне экспериментов, анализе данных и подготовке статьи, Р.З. Сабилов руководил экспериментами, анализировал данные, редактировал статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Model M.A. Chapter Five - Studying cell volume beyond cell volume. In: Model MA, Levitan I, editors. *Current Topics in Membranes*. 88: Academic Press; 2021. p. 165-188.
2. Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78(1): 247-306.
3. Hussain H., Ali I., Wang D., Hakkim F.L., Westermann B., Ahmed I., Ashour A.M., Khan A., Hussain A., Green I.R., Shah S.T.A. (2021) Glycyrrhetic acid: a promising scaffold for the discovery of anti-cancer agents. *Expert Opin Drug Discov* 16(12): 1497-1516. DOI: 10.1080/17460441.2021.1956901
4. Seydel J.K. (1968) Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists. *J Pharm Sci* 57(9): 1455-1478. DOI: 10.1002/jps.2600570902
5. Seneca H. (1966) Long-acting sulfonamides in urinary tract infections. *JAMA* 198(9): 975-980.
6. Wiedemann B., Heisig A., Heisig P. (2014) Uncomplicated Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance-Epidemiological and Mechanistic Aspects. *Antibiotics (Basel)* 3(3): 341-352. DOI: 10.3390/antibiotics3030341
7. Ovung A., Bhattacharyya J. (2021) Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews* 13(2): 259-272. DOI: 10.1007/s12551-021-00795-9
8. Baltina L.A., Flekhter O.B., Putieva Z.M., Kondratenko R.M., Krasnova L.V., Tolstikov G.A. (1996) Hydrolysis of β -glycyrrhizic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 30(4): 263-266. DOI: 10.1007/BF02218774

9. Дикусар Е.А., Поткин В.И., Козлов Н.Г., Гаджилыб Р.А., Плегенов Р.Т., Ювченко А.П., Желдакова Р.А. (2011) Синтез и изучение фунгицидной активности аминовых солей глицирризиновой кислоты. *Химия растительного сырья* (4): 53-56. // Dikusar E.A., Potkin V.I., Kozlov N.G., Gadzhilyb R.A., Plegenov R.T., YUvchenko A.P., ZHeldakova R.A. (2011) Sintez i izuchenie fungicidnoj aktivnosti aminovyh solej glicirrizinovoj kisloty. *Himiya rastitel'nogo syr'ya* (4): 53-56.
10. Клаус Д. Лимфоциты. Методы. Москва: Мир; (1990) 393 с. // Klaus D. Limfocity. Metody. Moskva: Mir; (1990) 393 с.
11. Hempling H.G., Thompson S., Dupre A. (1977) Osmotic properties of human lymphocyte. *J Cell Physiol* 93(2): 293-302. DOI: 10.1002/jcp.1040930215
12. Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. (2003) Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 22(2): 221-232.
13. Sabirov R.Z., Manjosova M.A., Tadjibaeva E.T., Krasilnikov O.V. (1993) The interaction of amphotericin B with cell membrane of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 12(3): 249-257.
14. Рахимова М.Б., Эсанов Р.С., Мерзляк П.Г., Гафуров М.Б., Курбанназарова Р.Ш., Сабилов Р.З. (2024) Влияние супрамолекулярных комплексов глицирретовой кислоты с сульфаниламидными препаратами на мембраны эритроцитов. *Узб. Биол. Ж.* (5): 3-9. // Rahimova M.B., Esanov R.S., Merzlyak P.G., Gafurov M.B., Kurbannazarova R.SH., Sabirov R.Z. (2024) Vliyanie supramolekul'yarnyh kompleksov glicirretovoj kisloty s sul'fanilamidnymi preparatami na membrany eritrocitov. *Uzb. Biol. Zh.* (5): 3-9.
15. Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. (2008) Role of potassium and chlorine channels in the regulation of thymocyte volume in rats. *Bull Exp Biol Med* 145(5): 544-547.
16. Kurbannazarova R.S., Bessonova S.V., Okada Y., Sabirov R.Z. (2011) Swelling-activated anion channels are essential for volume regulation of mouse thymocytes. *Int J Mol Sci* 12(12): 9125-9137. DOI: 10.3390/ijms12129125
17. Sabirov R.Z., Kurbannazarova R.S., Melanova N.R., Okada Y. (2013) Volume-sensitive anion channels mediate osmosensitive glutathione release from rat thymocytes. *PLoS One* 8(1): e55646. DOI: 10.1371/journal.pone.0055646
18. Файзиев Д.Д., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Далимов Д.Н., Эсанов Р.С., Юлдашев Х.А., Гафуров М.Б., Сабилов Р.З. (2021) Блокирование объем-зависимого анионного транспорта глицирретовой кислотой и ее производными. *Узб. Биол. Ж.* (6): 8-13. // Fajzиеv D.D., Kurbannazarova R.SH., Merzlyak P.G., Dalimov D.N., Esanov R.S., YUldashev H.A., Gafurov M.B., Sabirov R.Z. (2021) Blokirovanie ob'em-zavisimogo anionnogo transporta glicirretovoj kislotoj i ee proizvodnymi. *Uzb. Biol. Zh.* (6): 8-13.
19. Файзиев Д.Д., Циферова Н.А., Курбанназарова Р.Ш., Мерзляк П.Г., Сабилов Р.З. (2022) Исследование влияния глицирризиновой кислоты и ее производных на активность объем-зависимого анионного канала. *Узб. Биол. Ж.* (6): 3-8. // Fajzиеv D.D., Ciferova N.A., Kurbannazarova R.SH., Merzlyak P.G., Sabirov R.Z. (2022) Issledovanie vliyaniya glicirrizinovoj kisloty i ee proizvodnyh na aktivnost' ob'em-zavisimogo anionnogo kanala. *Uzb. Biol. Zh.* (6): 3-8.

GLITSIRRET KISLOTASINING SULFANILAMID PREPARATLARI BILAN SUPRAMOLEKULYAR KOMPLEKSLARINING TIMOTSITLAR HAJM BOSHQARILISHIGA TA'SIRI

M.B. Raximova, R.S. Esanov, P.G. Merzlyak, M.B. Gafurov, R.Sh. Kurbannazarova, R.Z. Sabirov

Sulfanilamid preparatlari bilan supramolekulyar komplekslarning hosil bo'lishi glitsirret kislotasining (GIK) gipoosmotik stress sharoitida timotsitlar hajm boshqarilishini ingibirlash hususiyatini sezilarli o'zgarishisha olib kelishi ko'rsatilgan. Aynan shu ligandlarning faolligini GIKni gemolitik ta'siri bilan solishtirilganda sezilarli farqlar aniqlandi: sulfapiridazin ikkala faoliyat turini zaiflashtirdi va sulfametoksazol hamda sulfadimezin ularni kuchaytirdi, ammo sulfalen hajm boshqarilishini ingibirlashni zaiflashtirdi, ammo gemolitik faollikni oshirdi, ftalazolning ta'siri esa bunga teskari bo'ldi. Kompleks shakllanishining biologik faollikning ushbu ikki turiga turli yo'nalishda ta'siri va shuningdek Hill koeffitsienti qiymatlaridagi katta farq (gemoliz uchun 16–22 va hajm boshqarilishi uchun 1,5–2,7) ularning mexanizmidagi printsiplial farqdan dalolat beradi.

Kalit so'zlar: 18β-glitsirret kislotasi, hujayra hajm boshqarilishi, sulfanilamidlar, supramolekulyar komplekslar.

EFFECT OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES OF GLYCYRRHETIC ACID WITH SULFANILAMIDE DRUGS ON THYMOCYTE VOLUME REGULATION

M.B. Rakhimova, R.S. Esanov, P.G. Merzlyak, M.B. Gafurov, R.Sh. Kurbannazarova, R.Z. Sabirov

It has shown that the formation of supramolecular complexes with sulfanilamide drugs leads to significant changes in the ability of glycyrrhetic acid (GIA) to inhibit the regulation of thymocyte volume under hypoosmotic stress. Comparison with the effect of the same ligands on the hemolytic activity of GIA revealed significant differences: sulfapyridazine weakened both types of activity, and sulfamethoxazole and sulfadimezine enhanced them, however sulfalene weakened the inhibition of volume regulation, but enhanced hemolytic activity, while ftalazol's effect was opposite. The profound difference in the direction of the effect of complex formation on these two types of biological activity, together with a large difference in the Hill coefficient values (16–22 for hemolysis and 1.5–2.7 for volume regulation) indicate a fundamental difference in their mechanism.

Keywords: 18 β -glycyrrhetic acid, cell volume regulation, sulfanilamide, supramolecular complexes

B CELL EPITOPES OF RENOVAC – DIMER RBD PROTEIN SUBUNIT VACCINE AGAINST COVID-19

M. MUMINOV¹, N. TSIFEROVA^{1,2}, V. TSOY¹, A. ABDURAKHIMOV^{1,2} SH. TURDIKULOVA¹

¹Center for Advanced Technologies;

²Institute of Biophysics and Biochemistry at National University of Uzbekistan

Corresponding author: m.muminov@cat-science.uz

Understanding vaccine mechanisms is vital for optimizing design and ensuring strong immune responses. This study assessed RENOVAC, a COVID-19 vaccine, by mapping its linear and conformational B-cell epitopes to uncover its mechanism of action and efficacy. Linear epitopes were predicted with BepiPred-2.0, while conformational epitopes were identified using Swiss Model and Discotope 2.0. Eighteen linear epitopes were identified, with 10 overlapping validated regions. Key conformational residues, such as 416–469, 441–463, and 495–506, were associated with ACE2 binding and antibody neutralization. RENOVAC's epitope profile explains its strong inhibition rate and immune activation, supporting its potential for further vaccine development.

Key words: SARS-CoV-2, RBD, Protein Vaccine, Immunogenicity, B cell Epitopes.

Introduction.

The global impact of the COVID-19 pandemic has necessitated the rapid development of effective vaccines to control the spread of SARS-CoV-2. Among the various vaccine platforms, protein subunit vaccines have garnered significant attention due to their safety profile and adaptability. These vaccines use specific components of the virus, such as the spike (S) protein or its receptor-binding domain (RBD), to elicit a targeted immune response without introducing the live virus. This approach provides a precise and controlled immunological stimulus, minimizing adverse effects while maintaining efficacy [1].

The spike protein of SARS-CoV-2, a trimeric glycoprotein responsible for viral entry into host cells via the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, has emerged as the primary target for neutralizing antibodies [2]. Its critical role in infection makes it an ideal candidate for vaccine development. Additionally, the receptor-binding domain (RBD), a smaller region within the spike protein, represents a highly immunogenic and antigenically focused target. Recent advancements have also explored the potential of dimeric RBD structures, which enhance antigenicity by mimicking the natural multivalent presentation of the spike protein [3].

Spike, monomeric RBD, and dimeric RBD protein subunit vaccines have demonstrated varying degrees of immunogenicity and efficacy in preclinical and clinical studies [4]. RBD-based vaccines, on the other hand, offer advantages such as smaller size, ease of production, and reduced risk of eliciting non-neutralizing antibodies. Dimeric RBD vaccines further enhance immune responses by improving B-cell receptor cross-linking and antigen presentation, resulting in higher neutralizing antibody titers and broader protection against emerging variants. In this context, our research is centered on the development of a novel dimeric receptor-binding domain (RBD)-based vaccine, RENOVAC, specifically designed to enhance immunogenicity and confer broad-spectrum protection against SARS-CoV-2. RENOVAC employs a highly optimized dimeric RBD antigen, formulated with an alum adjuvant system, to elicit robust humoral and cellular immune responses. The dimeric RBD structure enhances antigen stability and improves receptor mimicry, facilitating efficient immune system recognition and activation. Preclinical studies have demonstrated significant IgG production and surrogate virus neutralization along with robust activation humoral immune pathway, and an acceptable safety profile [5].

This study focuses on evaluation of the immunogenicity of RENOVAC, leveraging computational *in silico* tools to identify and analyze linear and conformational B cell epitopes as vaccine demonstrated strong activation of B-cells to provide humoral immunity. By integrating bioinformatic approaches, we aim to characterize the immune targets of the vaccine, providing insights into its mechanism of action and guiding its further optimization for clinical application.

2. Materials and methods.

2.1. Identification of linear B cell epitopes

To analyze potential linear cell B cell epitopes within the RENOVAC protein, which consists of tandemly repeated SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) sequences linked by a 5xGS linker and lacking the signal peptide, the protein sequence was processed using the BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor tool [6]. Limited advancement has been achieved over the last decade in the accuracy of epitope prediction methods, especially for those that rely on the sequence of the antigen only. Here, we present BepiPred-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). BepiPred-2.0 utilizes a Random Forest algorithm to predict B-cell epitopes based on a comprehensive analysis of protein sequences. This prediction model has been specifically trained using amino acid data derived from both confirmed epitopes and non-epitope residues, as determined through crystallographic structures. The algorithm assesses the sequence for regions likely to be recognized by the immune system, aiding in the identification of potential linear epitopes within the RENOVAC vaccine antigen.

2.2. Identification of conformational B cell epitopes

To identify potential conformational B-cell epitopes, four structural models of the RENOVAC-Dimer RBD protein were first generated using the Swiss Model tool [7]. Swiss Model is an automated server for protein homology modeling that generates three-dimensional structures based on known protein templates. Following the prediction, the model with the highest GMQE (Global Model Quality Estimate) score, which indicates the best overall quality and reliability of the predicted structure, was selected for further analysis. This high-quality model was then uploaded to the Discotope version 2.0 platform [8], which specializes in predicting discontinuous B-cell epitopes. Discotope uses structural data to identify regions of the protein that are likely to be recognized by B-cells in a three-dimensional context, thus aiding in the identification of conformational epitopes that are crucial for effective immune responses.

3. Results and Discussions.

3.1. Linear B cell epitope prediction

Identifying B-cell linear epitopes of the SARS-CoV-2 spike protein, particularly within the receptor-binding domain (RBD), is critical for vaccine development, therapeutic antibody design, and diagnostic assay creation. These epitopes are key targets for the immune response and have been mapped in previous studies using experimental techniques such as ELISA, peptide arrays, or computational predictions validated with experimental data.

In this study, we employed the BepiPred 2.0 tool to analyze potential linear B-cell epitopes within the spike protein, focusing on its RBD region. BepiPred 2.0 predicts linear epitopes based on a combination of amino acid propensity scales and machine learning algorithms, providing a threshold score of 0.5 for epitope identification.

Our analysis revealed that RENOVAC, our RBD-based vaccine, contained 18 predicted epitopes with scores above the threshold (0.5). The predicted epitopes were distributed across various regions of the RBD protein (Figure 1).

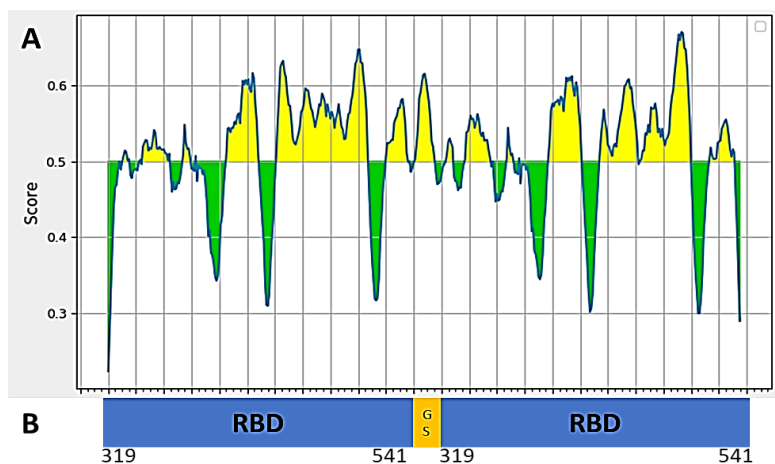


Fig. 1. Predicted linear B cell epitopes in RENOVAC vaccine. **(A)** Predicted linear B cell epitopes using BepiPred 2.0. **(B)** Schematic representation of the RENOVAC dimer RBD vaccine sequence, with positions aligned to the SARS-CoV-2 spike protein.

Comparison with previously confirmed linear epitopes in the literature showed a high degree of overlap with 10 predicted epitopes of RENOVAС. (Table). For example, key epitopes within residues 450–460 and 470–490–regions known for their immunogenicity and neutralizing antibody targeting–were also identified in RENOVAС.

Predicted RENOVAС epitopes overlapping with confirmed epitopes

№	Start	Stop	Predicted RENOVAС epitope amino acid sequence	Spike protein position	Overlapping epitope study reference
1.	26	45	ATRFASVYAWNRKRISNCVA	344-363	[9]
2.	55	60	SFSTFK	373-378	[9]
3.	86	109	GDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPD	404-427	[9,10]
4.	122	188	NLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKP FERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNC YFPLQSYGFQPTNGVGYQ	440-506	[9–11]
5.	201	216	HAPATVCGPKKSTNLV	519-534	[9]
6.	258	276	NATRFASVYAWNRKRISNC	343-361	[9]
7.	318	342	RGDEVQRQIAPGQTGKIADY- NYKLPD	403-427	[9,10]
8.	355	382	NLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK- PFERD	440-467	[9–11]
9.	384	420	STEIQAGSTPCNGVEGFNCYF- PLQSYGFQPTNGVGY	469-504	[9–11]
10.	434	452	HAPATVCGPKKSTNLVKNK	519-537	[9]

Furthermore, the distribution and accessibility of these epitopes were evaluated in the structural context of the spike protein. This analysis ensured that the predicted epitopes are surface-exposed and likely to interact with B-cell receptors or antibodies *in vivo*. The identification of these epitopes emphasizes their potential relevance for inducing a robust immune response, making RENOVAС a promising candidate for further development in vaccine and antibody-based therapeutic strategies.

3.2. Conformational B cell epitope prediction

Conformational epitopes are essential for understanding targets of neutralizing antibodies, as a majority of B-cell epitopes in native proteins are conformational rather than linear. Studies suggest that approximately 90% of B-cell epitopes fall into this category [12]. This predominance highlights the critical need to focus on conformational epitopes when developing vaccines and therapeutic antibodies.

To identify potential conformational B-cell epitopes within the SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD), the RENOVAС-Dimer RBD protein structure was analyzed. A 3D structural model was generated using the Swiss Model tool, achieving a GMQE (Global Model Quality Estimate) score of 0.72. The selected model exhibited high structural similarity to the crystallographic structure SMTL ID: 7fh0.1, which represents two neutralizing nanobodies in complex with the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (Figure 2A).

The model with the highest GMQE score was subsequently analyzed using the Discotope 2.0 platform for discontinuous epitope prediction. Discotope 2.0 integrates structural data and epitope propensity scoring to identify regions likely to be recognized as conformational B-cell epitopes. The analysis revealed several potential epitopes distributed across key regions of the RBD, particularly those critical for ACE2 receptor binding and structural stability (Figures 2B and 2C).

The RENOVAС protein harbors several conformational epitopes that overlap with previously confirmed immunologically significant regions, as detailed below:

1. Residues 416–469: A region vital for ACE2 receptor binding, including key residues such as lysine (K417), which stabilize interactions with the receptor. This epitope is targeted by neutralizing antibodies like LY-CoV555 [13].

2. Residues 441–463: Contains a key loop essential for ACE2 interaction. Critical residues within this segment are prominent targets for neutralizing antibodies such as REGN10933 [14].

3. Residues 495–506: A receptor-binding hotspot, particularly around residue N501, which is critical for receptor affinity and frequently targeted by antibodies like CB6 [15].

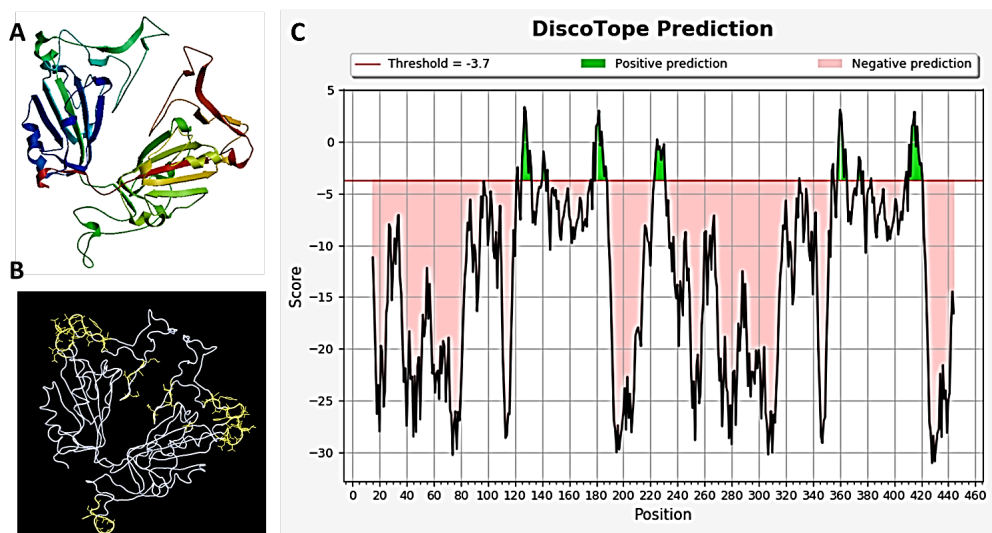


Fig. 2. Predicted 3D structure and conformational B cell epitopes in RENOVAC vaccine. **(A)** Predicted 3D model of RENOVAC protein antigen with highest GMQE score. **(B)** Visualization of predicted conformational B-cell epitopes in the RENOVAC vaccine in 3D model view. **(C)** Predicted conformational B-cell epitopes in the RENOVAC vaccine represented as a chart view.

The identified epitopes correspond to regions directly involved in ACE2 receptor interaction, highlighting their critical relevance in vaccine and therapeutic antibody design. These epitopes likely contribute significantly to the high inhibition rate observed with the RENOVAC vaccine.

Conclusion. This study highlights the immunological potential of RENOVAC, a dimeric RBD-based subunit vaccine designed to combat SARS-CoV-2. Through bioinformatic analysis, multiple linear and conformational B-cell epitopes critical for ACE2 receptor binding and antibody neutralization were identified. These epitopes contribute to the high inhibition efficacy observed in preclinical studies. The overlapping epitopes with experimentally validated regions further validate its immunogenicity. These results underscore the importance of epitope mapping in vaccine design and position RENOVAC as a strong candidate for further studies and development.

Acknowledgements and funding. The project was funded by the Ministry of Higher Education, Science and Innovation of Uzbekistan in the framework of capacity building fund for national vaccine development. Project number M-2021-1.

Author contributions. Conceptualization: MM, and ST; bioinformatical analysis and result interpretation: MM, NT, VT, AA, Writing original draft: MM, NT and AA. Editing: ST.

REFERENCES

1. Heidary M, Kaviar VH, Shirani M, Ghanavati R, Motahar M, Sholeh M, et al. A Comprehensive Review of the Protein Subunit Vaccines Against COVID-19. *Front Microbiol.* 2022;13: 927306. doi:10.3389/fmicb.2022.927306
2. Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2021;21: 73–82. doi:10.1038/s41577-020-00480-0
3. Min L, Sun Q. Antibodies and Vaccines Target RBD of SARS-CoV-2. *Front Mol Biosci.* 2021;8. doi:10.3389/fmolb.2021.671633
4. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;385: 1172–1183. doi:10.1056/NEJMoa2107659
5. Muminov M, Tsiferova N, Pshenichnov E, Ermatova K, Charishnikova O, Abdullaev A, et al. Development, Pre-Clinical Safety, and Immune Profile of RENOVAC—A Dimer RBD-Based Anti-Coronavirus Subunit Vaccine. *Vaccines.* 2024;12: 1420. doi:10.3390/vaccines12121420
6. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45: W24–W29. doi:10.1093/nar/gkx346

7. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. Available: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W296/5000024>
8. Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. PLoS Comput Biol. 2012;8: e1002829. doi:10.1371/journal.pcbi.1002829
9. Polyiam K, Phoolcharoen W, Butkhot N, Srisaowakarn C, Thitithyanont A, Auewarakul P, et al. Immunodominant linear B cell epitopes in the spike and membrane proteins of SARS-CoV-2 identified by immunoinformatics prediction and immunoassay. Sci Rep. 2021;11: 20383. doi:10.1038/s41598-021-99642-w
10. Nitahara Y, Nakagama Y, Kaku N, Candray K, Michimuko Y, Tshibangu-Kabamba E, et al. High-Resolution Linear Epitope Mapping of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein in COVID-19 mRNA Vaccine Recipients. Microbiol Spectr. 2021;9: e00965-21. doi:10.1128/Spectrum.00965-21
11. Wang A, Tian Y, Liu H, Ding P, Chen Y, Liang C, et al. Identification of three conserved linear B cell epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein. Emerg Microbes Infect. 11: 2120–2131. doi:10.1080/22221751.2022.2109515
12. Huang J, Honda W. CED: a conformational epitope database. BMC Immunol. 2006;7: 7. doi:10.1186/1471-2172-7-7
13. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19 | New England Journal of Medicine. Available: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2029849>
14. Copin R, Baum A, Wloga E, Pascal KE, Giordano S, Fulton BO, et al. The monoclonal antibody combination REGEN-COV protects against SARS-CoV-2 mutational escape in preclinical and human studies. Cell. 2021;184: 3949–3961.e11. doi:10.1016/j.cell.2021.06.002
15. Shi R, Shan C, Duan X, Chen Z, Liu P, Song J, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. Nature. 2020;584: 120–124. doi:10.1038/s41586-020-2381-y

RENOVAC - DIMER RBD OQSIL SUBBIRLIK COVID-19 VAKSINASINING B HUYAYRA EPITOPLARI

M. Muminov, N. Tsiferova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov, Sh. Turdikulova

Vaksinalar samaradorligini tushunish ularni optimallashtirish va kuchli immun javobini ta'minlash uchun juda muhimdir. Ushbu tadqiqotda RENOVAC - COVID-19 vaksinasining ta'sir mexanizmi va samaradorligini ochib berish uchun uning chiziqli va konformatsion B-hujayra epitoplari xaritasi tahlil qilindi. Chiziqli epitoplar BepiPred-2.0 yordamida bashorat qilindi, konformatsion epitoplar esa Swiss Model va Discotope 2.0 yordamida aniqlandi. 18 ta chiziqli epitop aniqlanib, ulardan 10 tasi oldin tasdiqlangan epitoplar bilan mos kelgan. Muhim konformatsion epitoplar, jumladan 416–469, 441–463 va 495–506 aniqlanib, ular ACE2 bilan bog'lanish va antitana neytrallashuvi bilan bog'liq. RENOVAC epitop profili uning yuqori ingibirlash darajasi va immun faolligini tushuntiradi va uning vaksina sifatida keyingi rivojlanishini qo'llab-quvvatlaydi.

Kalit so'zlar: SARS-CoV-2, RBD, Oqsil vaksina, Immunogenlik, B hujayra epitoplari.

В-КЛЕТОЧНЫЕ ЭПИТОПЫ РЕНОВАК – ДИМЕРА БЕЛКА СУБЪЕДИНИЦЫ RBD ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19

М. Муминов, Н. Циферова, В. Цой, А. Абдурахимов, Ш. Турдикулова

Понимание механизмов действия вакцин имеет решающее значение для их оптимального проектирования и обеспечения сильного иммунного ответа. В данном исследовании была проведена оценка вакцины против COVID-19 RENOVAC путем картирования её линейных и конформационных эпитопов В-клеток, чтобы раскрыть механизм её действия и эффективность. Линейные эпитопы прогнозировались с помощью BepiPred-2.0, а конформационные эпитопы определялись с использованием Swiss Model и Discotope 2.0. Были выявлены 18 линейных эпитопов, 10 из которых совпали с ранее подтвержденными регионами. Ключевые конформационные остатки, такие как 416–469, 441–463 и 495–506, связаны с взаимодействием ACE2 и нейтрализацией антител. Эпитопный профиль RENOVAC объясняет его высокую ингибирующую активность и активацию иммунного ответа, что подтверждает его потенциал для дальнейшей разработки.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, RBD, белковая вакцина, иммуногенность, эпитопы В-клеток.

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КСАНТИНОКСИДАЗЫ ПРИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ УГАРНЫМ ГАЗОМ

Р.Х. МАДЖИДОВА¹, О.С. ЧАРЫШНИКОВА¹, А.Ю. БАЕВ^{1,2}

¹Центр передовых технологий;

²Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека

Автор для переписки: baev.a.yu@gmail.com

Отравления угарным газом имеют серьезные последствия в целом для всего организма, и в первую очередь, для центральной нервной системы. Недавние исследования показали, что реоксигенация пациентов нормобарическим кислородом также может приводить к токсическому повреждению нейронов головного мозга, развивающегося по механизмам аналогичным реперфузионному синдрому, возникающему при инсульте. В настоящей работе, нами впервые, в Узбекистане, отработана и внедрена *in vitro* модель токсичности угарным газом на первичных культурах нейроглиальных клеток, выделенных из головного мозга крыс. Методом флуоресцентной визуализации быстрых физиологических процессов, проведен анализ адекватности предложенной нами модели. В рамках настоящего исследования проведена оценка скорости продукции активных форм кислорода (АФК) происходящих на клеточном уровне и вовлеченность ксантиноксидазы в продукцию АФК при отравлениях угарным газом в условиях гипоксии и реоксигенации.

Ключевые слова: угарный газ, АФК, ишемия, реперфузия, ксантиноксидаза, окислительный стресс.

Введение. Отравление в результате токсического действия окиси углерода (угарный газ, СО) является одной из наиболее распространенных и тяжелых форм химической патологии. СО, образующийся при неполном сгорании органических веществ, накапливается в воздухе и, при вдыхании образует стабильный комплекс с гемоглобином - карбоксигемоглобин, тем самым, снижая способность эритроцитов транспортировать кислород, что приводит к гипоксии тканей, и в первую очередь, наиболее чувствительных к дефициту кислорода, таких как головной мозг и сердце.

Токсическое воздействие угарного газа на центральную нервную систему приводит к гибели нейронов или утрате их функций, что может вызвать развитие отсроченных неврологических нарушений, которые проявляются через 2–40 дней после отравления. Даже при своевременном лечении полное восстановление не всегда достижимо.

В ишемизированных нейронах (клетках головного мозга) нарушается митохондриальное дыхание, что приводит к энергетическому дефициту. В условиях гипоксии для восстановления кислородного обмена и нормализации клеточных функций, проводится реоксигенация с использованием нормобарического кислорода (100% кислорода). Побочным продуктом реоксигенации является образование активных форм кислорода (АФК), которые могут спровоцировать нейротоксичность и гибель клеток. Недавние исследования показали, что активация АФК является одним из ключевых механизмов повреждения клеток в этом процессе.

Недавние исследования на моделях *in vitro* токсичности угарным газом показали, что СО индуцирует генерацию АФК из трех различных внутриклеточных источников. Первая волна АФК продуцируется митохондриями в первые 15–20 минут после начала токсического воздействия угарного газа. Спустя 20 минут происходит активация ксантиноксидазы, что вызывает вторичную волну АФК, сопряженную с её активностью. В процессе реперфузии возникает третья волна роста АФК, в основном связанная с активностью НАДФН-оксидазы. Ингибирование ключевых звеньев, отвечающих за накопление АФК при ишемии, вызванной кислородным голоданием или токсичностью угарного газа, рассматривается как потенциальная терапевтическая стратегия при инсультах, инфарктах и отравлениях угарным газом [1, 2]. В данной работе мы использовали клеточную модель токсичности угарным газом для оценки активности ксантиноксидазы, в качестве молекулярного инструмента для скрининга биологически активности соединений.

Ксантиноксидаза (ХО) представляет собой фермент, участвующий в катаболизме пуринов, превращая гипоксантин в мочевую кислоту через ксантин. Несмотря на то, что ХО является значительным источником супероксида, особенно при легкой гипоксии [3], данные о её роли в развитии

патологий мозга ограничены. Основная информация о её роли в развитии нейродегенеративных каскадов была получена с помощью ингибиторного анализа, который показал, что ингибиторы ХО, такие как аллопуринол и оксипуринол, могут снижать генерацию АФК при болезни Хантингтона и оказывать нейропротективный эффект в клеточных моделях болезни Паркинсона и Альцгеймера [3].

Материалы и методы. Объектом исследования являлись первичные нейроглиальные клетки в культуре, выделенных из коры больших полушарий неонатальных крыс [4] Острую токсичность угарным газом вызывали внесением к культуре клеток 60 μM CORM-401 (CO releasing molecule - одна молекула CORM-401 при растворении в воде выделяет 3 молекулы CO). Продукцию АФК регистрировали в нагруженных флуорофором дегидроэтидиумом (HEt) – возбуждение 500 нм, эмиссия 582 нм. Сигнал флуоресценции регистрировали на флуоресцентном инвертированном микроскопе EVOS FL COLOUR. Кинетику продукции АФК регистрировали отдельно для нейронов и астроцитов, учитывая их морфологические и функциональные различия. Фотодокументирование результатов осуществляли каждые 20 секунд в процессе записи эксперимента.

Статистический анализ и обработку записей экспериментов делали в программе Origin Pro 2021. Данные представлены как среднее значение выборки \pm среднеквадратичная ошибка среднего. Для оценки статистической значимости зависимых данных (разница между скоростями базовой линии и разных фаз воздействия CO) использовалась ANOVA с повторными измерениями (One-Way Repeated Measures ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки. Для сравнения эффектов аллопуринола (рис. 3) использовался тест Стьюдента для независимых выборок (Two-Sample t-Test).

Результаты и их обсуждение. Для определения базового уровня роста АФК, первые 5 минут эксперимента прописывали скорость окисления HEt при физиологических условиях. Окисление HEt происходит в основном за счет супероксид аниона, в связи с этим увеличение интенсивности флуоресценции HEt принимали за эквивалент скорости образования АФК. Скорость продукции АФК при физиологических условиях (базовая линия) принимали за 100 %, все последующие расчеты производили относительно данного показателя. Для оценки влияния угарного газа на продукцию АФК в нервных клетках, в систему вносили 60 μM CORM-401. В течении первых 20 минут эксперимента (1-я фаза ишемии), скорость

роста АФК увеличивалась на 36 %/мин в нейронах и на 120 %/мин в астроцитах (рис. 1).

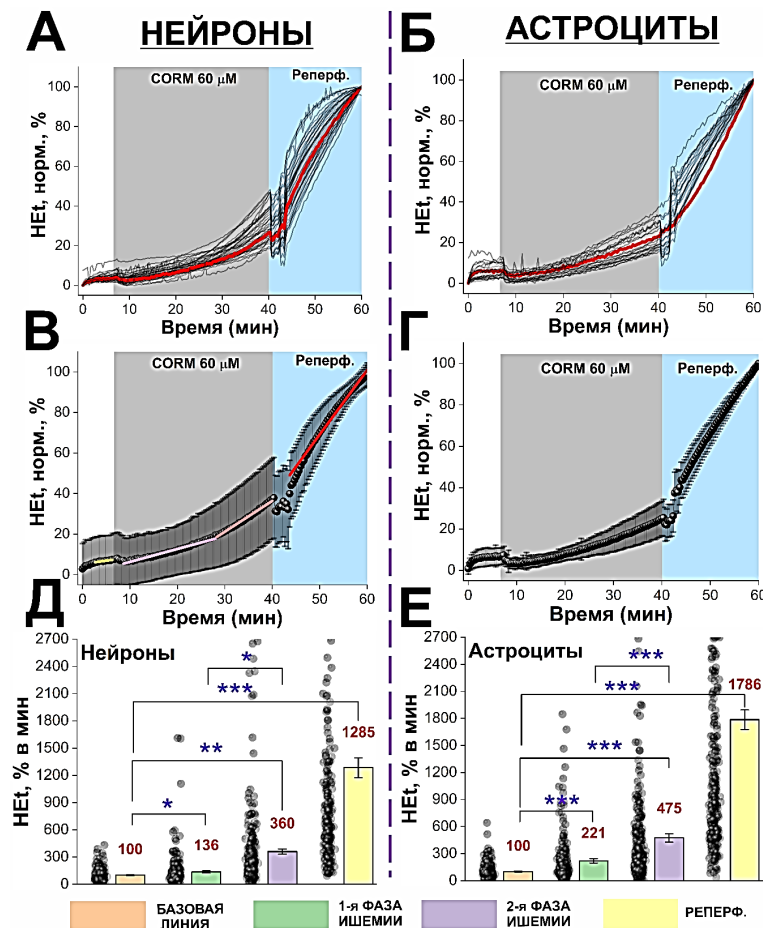


Рис. 1. Продукция АФК в нейронах и астроцитах при острой токсичности CO. Репрезентативная запись одного эксперимента, каждая линия отображает сигнал от одной клетки в нейронах (А) и астроцитах (Б); Усредненный сигнал от всех клеток репрезентативного эксперимента, вертикальные линии отображают стандартное отклонение выборки для нейронов (В) и астроцитов (Г); Статистическая оценка всех дней экспериментов. N=9; n=229 для нейронов и n=309 для астроцитов; (N - кол-во чашек, n-количество клеток). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

В следующие 10-20 минут эксперимента (зона роста АФК после первых 20 минут ишемии до репер-

фузии) скорость прироста АФК увеличилась на 260 %/мин в нейронах и на 475 % в астроцитах, относительно базовой линии (рис. 1 А и Б). Реперфузия (отмывка клеток от CORM-401), приводила к увеличению скорости продукции АФК на 1285 %/мин в нейронах 1786 %/мин в астроцитах, относительно базовой линии (рис 1). Скорость роста АФК оценивали при помощи функции линейной регрессии в каждой клетке, что визуально отображено в качестве касательных на рисунке 1 В. Таким образом, в серии экспериментов нам удалось воспроизвести модель токсичности угарным газом в культуре нейроглиальных клеток, выделенных из коры больших полушарий мозга неонатальных крыс. Паттерн изменения скорости роста АФК полностью совпадал с таковым, описанным в литературе [1], однако стоит отметить, что скорость роста АФК в астроцитах, в наших экспериментах была значительно выше, по сравнению с нейронами.

В следующей серии экспериментов нами были проведены аналогичные предыдущей конфигурации модели токсичности угарным газом эксперименты, на фоне ингибитора ксантиноксидазы аллопуринола. Преинкубирование клеток с 20 μM аллопуринола не оказывало значительного влияния на первую фазу ишемии – в первые 20 минут после добавки CORM-401, ни в нейронах, ни в астроцитах (рис. 2). Однако, скорость продукции АФК во второй фазе ишемии (20–40 минут) на фоне аллопуринола была такой же, как и при первой фазе, как в нейронах, так и в астроцитах (рис. 2). При реперфузии также, как и в контроле, наблюдалось значительное увеличение скорости роста продукции АФК по сравнению с базовой линией.

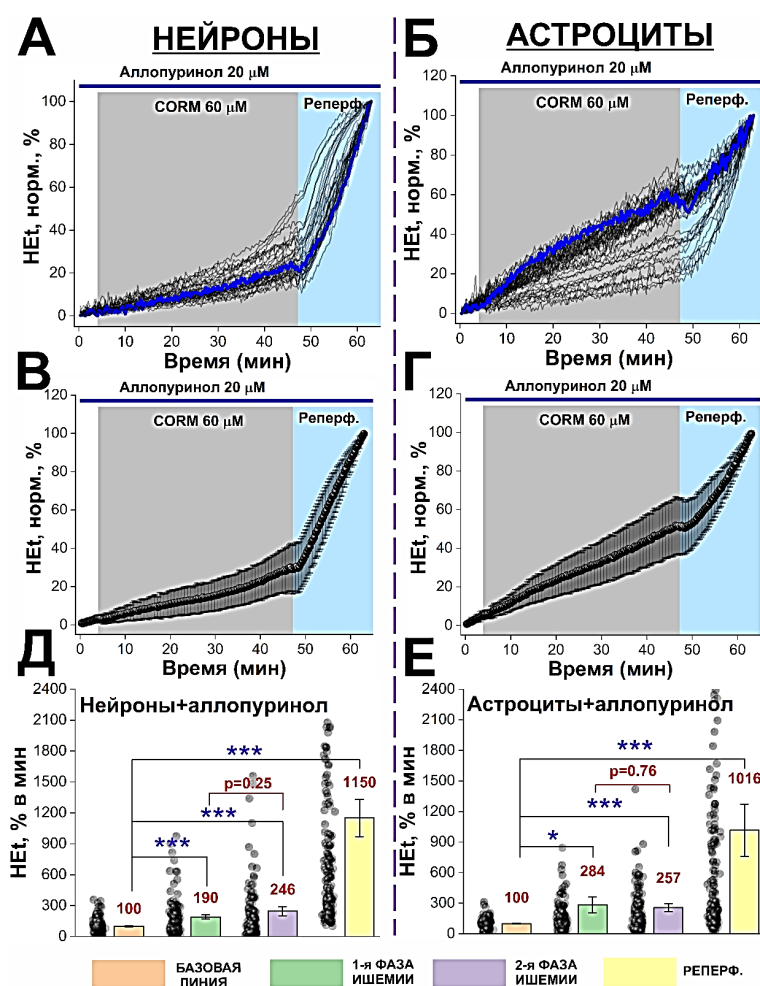


Рис. 2. Влияние аллопуринола (20 μM) на СО-индуцированную продукцию АФК в нейронах и астроцитах. Репрезентативная запись одного эксперимента, каждая линия отображает сигнал от одной клетки в нейронах (А) и астроцитах (Б); Усредненный сигнал от всех клеток репрезентативного эксперимента, вертикальные линии отображают стандартное отклонение выборки для нейронов (В) и астроцитов (Г); Статистическая оценка всех дней экспериментов. N=9; n=187 для нейронов и n=186 для астроцитов; (N - кол-во чашек, n-количество клеток). * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Как в контрольных экспериментах, так и на фоне аллопуринола, реперфузия приводила к наибольшему по скорости росту продукции АФК (рис. 1 и 2), значительно отличающейся от базовой линии и всех фаз ишемии. Интересно, воздействие аллопуринола приводило к значительному увеличению продукции АФК при физиологических условиях (базовая линия – рис. 3 А).

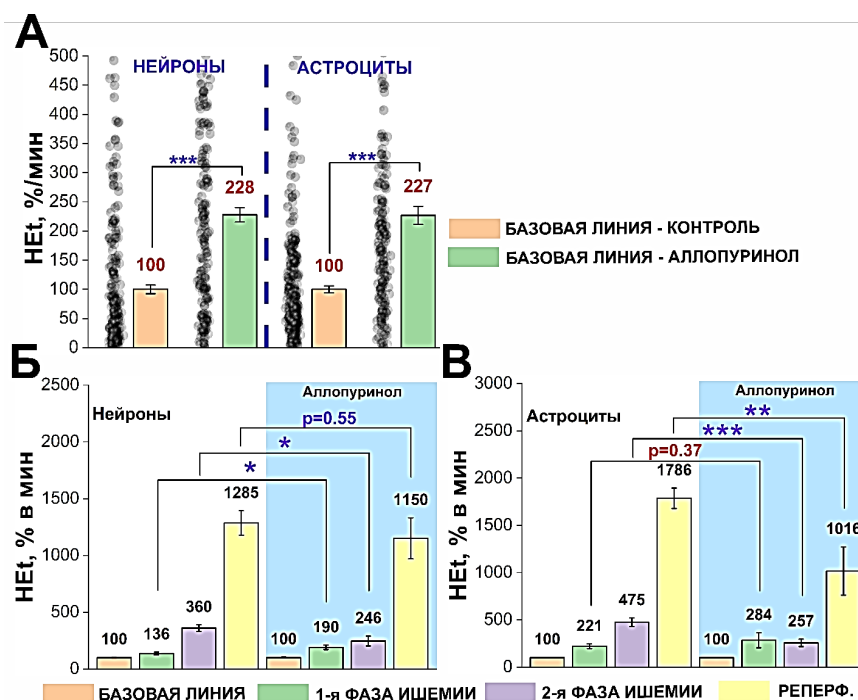


Рис. 3. Сравнительный анализ контрольных экспериментов и экспериментов на фоне аллопуринола. А. Изменение скорости роста АФК при базовой линии, сигнал нормализован под контроль; Б. Оценка эффекта аллопуринола скорость роста АФК в нейронах; В. Оценка эффекта аллопуринола скорость роста АФК в астроцитах. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Однако, на сегодняшний день не установлено, вызывает ли это окислительный стресс в дальнейшем. Сравнительный анализ показал, что аллопуринол достоверно снижает скорость продукции АФК во второй фазе ишемии как в нейронах, так и в астроцитах (рис. 3 Б и В). Однако в первой фазе ишемии наблюдался небольшой рост скорости продукции АФК на фоне применения аллопуринола, при этом этот эффект был достоверным только в нейронах, в то время как в астроцитах изменений не было (рис. 3 Б и В). Мы связываем эти результаты с тем, что сам аллопуринол способствует увеличению скорости продукции АФК (рис. 3 А). Влияние аллопуринола на фазу реперфузии оказалось двояким. В нейронах ингибирование ксантиноксидазы не оказывало значительного эффекта на скорость роста АФК при реперфузии, в то время как у астроцитов было зафиксировано достоверное снижение продукции АФК (рис. 3 Б и В).

Основываясь на данных результатах можно сделать предположение, что в нейронах и астроцитах токсичность угарным газом может иметь несколько отличные механизмы.

Заключение. В результате проведенной работы впервые в Узбекистане удалось разработать точную модель токсичности угарным газом на первичных культурах кортикальных нейроглиальных клеток, а также оценить роль ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса при данной форме токсичности. Наши эксперименты подтверждают ранее полученные данные о механизмах роста АФК при токсичности угарным газом [1].

Более того, мы обнаружили, что аллопуринол способен вызывать увеличение скорости продукции АФК, что может указывать на потенциальный риск развития окислительного стресса при длительном применении этого препарата. Также было показано, что ингибирование ксантиноксидазы снижает скорость продукции АФК в астроцитах в период реперфузии, что ранее не было продемонстрировано в других работах.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке гранта № А-ИРВ-2021-465 (Б.А.Ю.) Агентства Инновационного развития Республики Узбекистан. Выражаем благодарность Небесной К.С., которая оказала помощь в выделении и ведении первичной культуры нервных клеток.

Конкретный вклад авторов. Н.К.С. – проведение функциональных экспериментов, анализ данных, подготовка рисунков; Ч.О.С. - ресурсы, концептуализация; Б.А.Ю. - концептуализация и дизайн экспериментов, проведение функциональных экспериментов, анализ данных, подготовка рисунков, написание и редактирование рукописи, ресурсы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Angelova P.R., Myers I., Abramov A.Y. (2023) Carbon monoxide neurotoxicity is triggered by oxidative stress induced by ROS production from three distinct cellular sources. *Redox Biol* 60: 102598. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102598
2. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27(5): 1129-1138. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007
3. Angelova P.R. (2021) Sources and triggers of oxidative damage in neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine* 173: 52-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.003>
4. Holmstrom K.M., Marina N., Baev A.Y., Wood N.W., Gourine A.V., Abramov A.Y. (2013) Signalling properties of inorganic polyphosphate in the mammalian brain. *Nat Commun* 4: 1362. DOI: 10.1038/ncomms2364

IS GAZI BILAN O‘TKIR ZAHARLANISHDA KSANTINOKSIDAZA FAOLLIGINI BAHOLASH

R.X. Majidova, O.S. Charishnikova, A.Yu. Baev

Is gazi bilan zaharlanish organizm uchun xavfli bo‘lgan oqibatlariga olib keladi. So‘nggi paytlarda olingan yangi ma‘lumotlarga qaraganda bemorlarni normobarik kislorod bilan reoksigenatsiyasi qilish inson organizmi nerv hujayralariga insult vaqtida kuzatiladigan sindromlarga o‘xshash toksik ta‘sir qilishi mumkinligi aniqlandi. Ushbu tadqiqotda biz birinchi marotaba O‘zbekiston Respublikasi sharoitida kalamushlar miyasidan ajratilgan birlamchi neyrogliyal kulturalarda is gazi bilan zaharlanish modelini qo‘lladik va amaliyotga tadbiiq qildik. Olingan modelning muvaffaqiyatini tezkor fiziologik jarayonlarning fluoressent tasviri yordamida kislorodning faol shakillari (KFSH) ishlab chiqarish tezligi nuqtai nazaridan baholadik, shuningdek, Is gazi bilan zaharlanishda KFSH ishlab chiqarishda ksantioksidazaning ishtirokini baholadik.

Kalit so‘zlar. Uglarod monoksidi, KFSH, ishemiya, reperfuzya, ksantinoksidaza, oksidlovchi stress.

ASSESSMENT OF XANTHINE OXIDASE ACTIVITY IN ACUTE CARBON MONOXIDE TOXICITY

R.X. Majidova, O.S. Charishnikova, A.Yu. Baev

Carbon monoxide poisoning has dire consequences for our bodies. Recently, it was shown that the reoxygenation of patients with normobaric oxygen can also have toxic effects on nerve cells, due to reperfusion syndrome, similar to the processes observed in strokes. In the present work, we developed and introduced a carbon monoxide toxicity model in primary neuroglial cultures isolated from the brains of rats in the Republic of Uzbekistan. We assessed the model by measuring the rate of production of reactive oxygen species (ROS) using fluorescence imaging technic and also evaluated the role of xanthine oxidase in the production of ROS during carbon monoxide poisoning

Key words: Carbon monoxide, ROS, ischemia, reperfusion, xanthineoxidase, oxidative stress.

CHARACTERIZING THE MUTATIONAL LANDSCAPE OF SARS-COV-2 NON-STRUCTURAL PROTEINS

G. ESONOVA^{1,2}, A. ABDURAKHIMOV^{1,2}, SH. IBRAGIMOVA¹, M. MUMINOV¹, V. TSOY¹, J. GULOMOV¹, A. ABDULLAEV¹, D. DALIMOVA¹, SH. TURDIKULOVA¹

¹Center of Advanced Technologies, Tashkent, Uzbekistan;

²Institute of Biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan named after M. Ulugbek

e-mail: esonovagulnoza96@gmail.com

Since the emergence of the COVID-19 pandemic in 2019, caused by the novel SARS-CoV-2 virus, it has had a significant impact on a global scale. Our previous studies focused on analyzing mutations in the Spike protein of SARS-CoV-2 genomes, providing insights into the spread, evolution, and genetic diversity of the virus in Uzbekistan. In this study, we aim to investigate the most prevalent mutations in the Open Reading Frame 1ab (ORF1ab) locus of the SARS-CoV-2 genome. The ORF1ab locus encodes non-structural proteins (NSPs), which play a crucial role in the virus's life cycle, including RNA processing, viral replication, and evasion of the host immune system. Analyzing mutations in this genomic region will help us better understand the evolutionary trajectories of SARS-CoV-2 and explore opportunities for managing and preventing the disease in the context of Uzbekistan. Furthermore, the findings may contribute to the design of vaccines targeting SARS-CoV-2 and its variants.

Key words: SARS-CoV-2, ORF1ab, Non - structural proteins (NSPs), NSP 13, P323L.

Introduction

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was discovered for the first time in Wuhan, China's Hubei Province, in December 2019. Since then, the World Health Organization (WHO) has identified this virus as the cause of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, which was formally announced on March 11, 2020 [1–3]. The rapid global spread of SARS-CoV-2, affecting more than 200 countries worldwide, has prompted an unprecedented scientific and public health response to mitigate and resolve the crisis. The pandemic's impact has been profound, with over 770 million reported cases and approximately 6.9 million deaths globally as of October 31, 2023 [4].

Coronaviruses exhibit a spherical virion shape with a diameter ranging from 80 to 120 nm, characterized by the presence of “spikes”—trimers of the Spike (S) protein [5,6]. As a beta-coronavirus, SARS-CoV-2 shares similar morphology and structure with its beta-coronavirus relatives, with a genetic similarity of 79% to SARS-CoV and 51.8% to MERS-CoV. The SARS-CoV-2 virus possesses a positive-sense RNA genome, which is enveloped and ranges in size from 26 to 36 kilobases. The viral genome has a 5' cap and a poly(A) 3' tail, allowing it to serve as messenger RNA for translation by the host cell machinery. At the 5' end of the genome, there are the open reading frame (ORF) 1a and 1b replicase genes, which encode proteins that are subsequently cleaved to yield 16 non-structural proteins (NSPs). These NSPs, encoded by the ORF1ab region, play crucial roles in the viral life cycle. In addition to the structural proteins (S, E, M, N) located at the 3' end of the genome, the NSPs also mediate other essential functions, including viral replication, translation, post-translational modification, assembly, and host immune evasion [5]. These NSPs are not components of the viral particle but are nonetheless indispensable for the virus to successfully infect and replicate within the host cell.

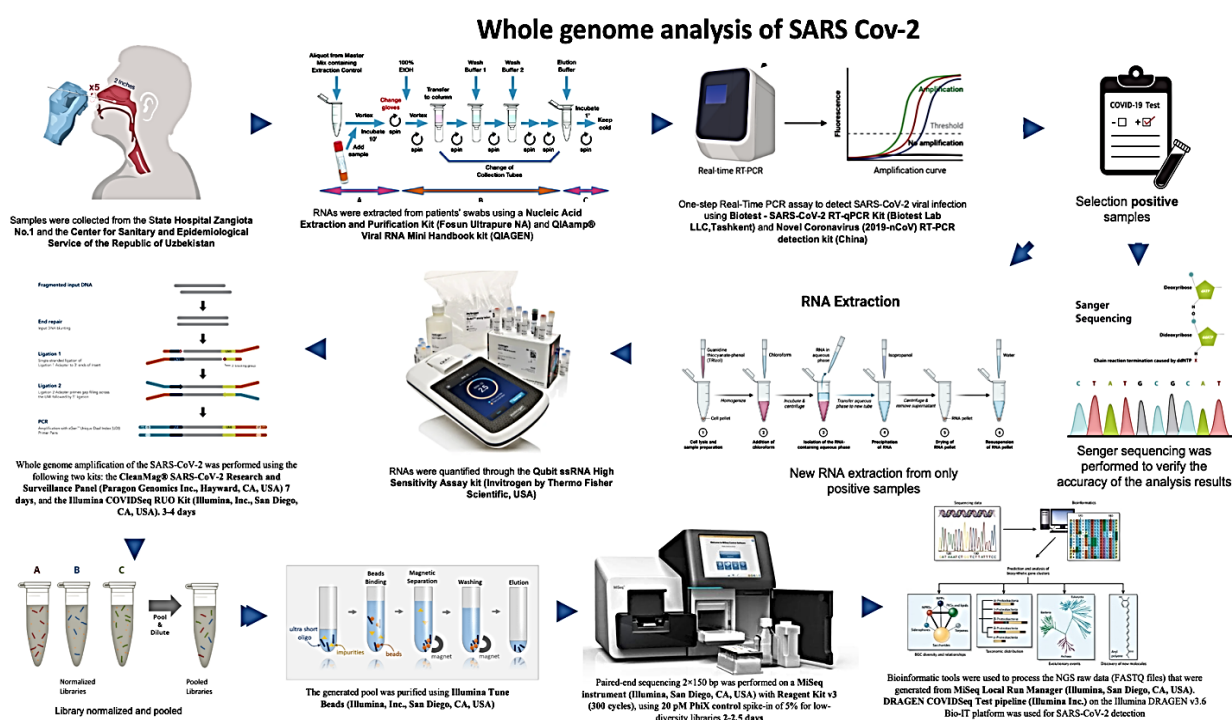
In our previous studies [7,8], we focused on the specific mutations in the Spike protein, in this study, we tried to focus on the most common mutations occurring in the ORF1ab region since the NSPs play a crucial role in the virus life cycle. By investigating the mutations in this region, we can further our understanding of the virus's evolution and potential implications for its management and prevention.

Materials and methods

Samples included in this research were obtained from COVID-19-diagnosed patients with mild, moderate, and severe symptoms who were being treated at the State Hospital Zangiota-1 and Zangiota-2. Nasopharyngeal and oropharyngeal specimens were collected in 3 mL of the viral transport medium tube using flocked swabs and sent to the Biotechnology laboratory of the Center for the Advanced Technologies

at a cold temperature (2–8°C) within 72 hours post-collection. All the swab samples were stored at -80°C until further analyses. SARS-CoV-2 RNAs were extracted from patients' swabs using QIAamp® Viral RNA Mini Handbook kit (QIAGEN) according to manufacturer's protocol. The concentration and purity of the isolated RNA samples were measured using a BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu Biotech, Japan). To detect SARS-CoV-2 viral infection, a one-step Real-Time PCR assay was performed using Novel Coronavirus (2019-nCoV) RT-PCR detection kit (Shanghai, People's Republic of China) on the QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) as per the manufacturer's instructions. Based on the Real-Time-PCR assay analysis, samples that were reported as Real-Time PCR positive for SARS-CoV-2 were chosen for the next - Sanger sequencing and Next generation sequencing (NGS) analysis.

Sanger sequencing was performed to verify the accuracy of the analysis results and determine the target mutations of SARS-CoV-2 variants, while NGS was performed to identify SARS-CoV-2 variants and mutations that are specific to each new variant. Illumina COVIDSeq RUO Kit (1000000126053 v05 Jun 2021) as well as CleanPlex SARS-CoV-2 Panel (version UG4001-04, Jan 2021 and UG4004-06 Feb 2022) were used according to the manufacturer's instructions.



Schematic diagram representing several stages starting from sample collection to analysis.

After libraries were generated, the generated pool was purified using Illumina Tune Beads as per protocols provided by the manufacturer (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Finally, the purified pool was quantified using Qubit 2.0 fluorometer dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sequencing was performed on a MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA). The entire procedure used in this study is presented in Figure.

Results

According to the whole genome sequencing analysis, the SAR-CoV-2 genomes had multiple mutations in every region. Of the 347 amino acid level variants found, the ORF1ab region had the highest frequency of mutations, consisting of 159 mutations (113 and 46 mutations in ORF1a and ORF1b, respectively).

Non-structural proteins (NSP1-NSP16) encoded by the ORF1ab region of the SARS-CoV-2 genome are proteins that are not components of the virion but are transcribed and translated during host cell infection and play an important role in viral replication, translation, post-translational modification, assembly, evasion of the host immune system and other important functions [9]. Among these NSPs, the highest number of mutations was observed in NSP3 (the largest protein of the virus, which plays an important

role in virus replication), NSP2 (a relatively small protein which involved in the replication process of the virus), and NSP13 (a multifunctional protein which acts as a helicase), with 41, 19, and 17 amino acid substitutions, respectively. Interestingly, no mutations were identified in the NSP11 gene, suggesting that this non-structural protein may be under stronger evolutionary constraints or play a more critical role in the virus's life cycle, limiting the accumulation of mutations.

Notably, the P323L substitution in the NSP12 protein was the most frequently detected substitution, identified in 98% of the samples (n = 108). NSP12 plays a crucial role in SARS-CoV-2 genome replication and transcription [10]. Another frequently observed substitution was the T492I substitution in NSP4, which was detected in 73% of the isolates (n = 80). The all-amino acid substitutions of non- structural proteins (ORF1ab) are illustrated in the Table.

The S135R mutation in the NSP1 protein of SARS-CoV-2 (found the most frequent mutation with 55%) is believed to enhance the virus's ability to evade the host immune system, potentially leading to increased immune evasion and escape. This mutation may also alter NSP1's structure or function, impacting viral replication, transcription, and overall fitness. Additionally, it could influence the virus's severity and clinical manifestations of COVID-19. Its presence, particularly in the Omicron variant and its subvariants, suggests a possible selective advantage for the virus.

Amino acid substitutions of Non- Structural Proteins

ORF 1a	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	NSP6
	S135R, K47R, G82D, M85del, D139Y, F143del, G133C, K141del, Q66R, R124C, R24C, S142del, V86del	R27C, K81N, P129L, E563D, K142R, K554E, L550F, D23Y, D43Y, G339S, I295V, M141R, P129S, Q376K, Q395R, R119K, S348P, T547I, T590I	G489S, T24I, P1469S, P1228L, A488S, P822L, H1274Y, S126L, E374G, I1412T, T183I, A1711V, A579V, A890D, E1799G, T73I, T771I, A1310V, A1892T, E113D, G1716S, I388T, K38R, L1266I, L632F, M375I, P822S, Q585H, R568H, S1265del, S1670F, S403L, S692F, T1036I, T1866A, V1139I, V1243F, V1522I, V665I, V929I, Y103N	T492I, T327I, L264F, V167L, A446V, L438F, T96I, A146V, D279N, E141G, I110V, T189I, T214I	P132H, K90R, A193V, A260V, T225I	G107del, S106del, F108del, T77A, V149A, L75F, F34S, G277S, I189V, L105del, L237M, L260F, T10I, T181I, V149I, V152F

ORF 1ab	NSP7	NSP8	NSP9	NSP10	NSP12	NSP13	NSP14	NSP15	NSP16
	L56F	N118S, N192K, V160L	T24I	I55T	P323L, G671S, A423V, L648F, P227L, P323F, T225I, V792I, V96I, Y273H, Y479N	R392C, P77L, T127N, S36P, S38L, I399V, A85P, F24S, G206C, L295I, L297F, M233I, N102S, N268S, T481M, V169F, Y217H	I42V, A394V, P46L, S461P, A471V, A1S, D144N, E204D	E56D, G286C, H234Y, S147G, T112I, V165I, V320L, V66L	K160R, K182N

In NSP3, the G489S mutation, which is specific to the Omicron variant, was observed with a high frequency of 60% across all Omicron subvariants detected in Uzbekistan. Meanwhile, the T492I mutation in the NSP4 protein was identified as the most frequent mutation, occurring at a rate of 73%. As a type I interferon antagonist, NSP5 is the primary protease that is crucial for SARS-CoV-2 [11]. In this study, the mutation P132H in NSP5 which might affect enzyme activity, was observed in all subvariants of Omicron. Representing a frequency rate of 65%, the G107del and S106del mutations identified in NSP6 may change the conformation of the spike protein, potentially impacting its ability to bind to the ACE2 receptor on host cells. This alteration can affect the virus's entry into cells.

Only a small number of mutations with a frequency rate of roughly 1% were found in the NSP7, NSP8, NSP9 and NSP10 areas.

The following novel mutations, which may be significant for understanding COVID-19, were found in the NSP12 region of the SARS-CoV-2 genome. Since NSP12 encodes RNA-dependent RNA polymerase, it is crucial for the transcription and replication of the SARS-CoV-2 genome [12]. According to earlier research, the P323L substitution in NSP12, which was found in 98 percent of our samples, may cause structural alterations, and impair proofreading when the SARS-CoV-2 genome replicates [11].

A key enzyme in coronaviruses, NSP13 is a highly conserved RNA triphosphatase that unwinds double-stranded RNA in a 5' to 3' orientation [9]. One study suggested that the RNA Nucleoside Triphosphatase of the NSP13 helicase may be impacted by the R392C mutation, which is found in the Rec1A domain. According to another study, this mutation may modify the protein's secondary structure and result in minor modifications to protein folding [5].

Conclusion

In summary, our study highlights the significant mutations occurring within the ORF1ab region of the SARS-CoV-2 genome, particularly focusing on the NSPs that play critical roles in the virus's life cycle. The high frequency of mutations, especially in NSPs such as NSP3, NSP12, and NSP13, underscores the dynamic nature of the virus and its ability to adapt to host environments and immune responses.

Understanding these mutations provides valuable insights into the evolutionary trajectories of SARS-CoV-2, informing public health strategies and interventions for disease management and prevention in Uzbekistan and beyond.

Author Contributions

Investigation: Esonova G, Abdurakhimov A, Ibragimova Sh, Muminov M, Tsoy V, Gulomov J, Abdullaev A. Funding acquisition: Dalimova D, Turdikulova Sh. Writing – original draft: Esonova G.

REFERENCES

1. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. (2021) Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications, and opportunities. *Brief Bioinform.* 22:616–30. DOI: 10.1093/bib/bbaa297
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. (2020) Genomic characterisation, and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond Engl.* 395:565–74. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
3. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 579:265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3
4. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. (2021) Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 43:845–67. DOI: 10.3390/cimb43020061
5. Mingaleeva RN, Nigmatulina NA, Sharafetdinova LM, Romozanova AM, Gabdoulkhakova AG, Filina YV, et al. (2022) Biology of the SARS-CoV-2 Coronavirus. *Biochem Biokhimiia.* 87:1662–78. DOI: 10.1134/S0006297922120215
6. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. (2021) The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses.* 13:1115. DOI: 10.3390/v13061115
7. Esonova G, Abdurakhimov A, Ibragimova S, Kurmaeva D, Gulomov J, Mirazimov D, et al. (2024) Complete genome sequencing of SARSCoV-2 strains that were circulating in Uzbekistan throughout four pandemic waves. *PLoS ONE* 19(11): e0298940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298940>
8. Esonova G., Abdurakhimov A., Ibragimova Sh., Kurmaeva D., Rakhmatullaev A., Rakhmonkulova A., Abdullaev A., Dalimova D., Turdikulova Sh. (2024) Mutations of the SARS-CoV-2 omicron variant spike protein. *O'zbekiston Biologiya Jurnali, 3-son Tashkent-2024 9-15 betlar.*
9. Nieto-Torres JL, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Castaño-Rodríguez C, Fernandez-Delgado R, et al. (2015) Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein

- transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology*. 485:330–9. DOI: 10.1016/j.virol.2015.08.010
10. Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. (2020) SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*. 9:231. DOI: 10.3390/pathogens9030231
 11. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, et al. (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*. 302:276–8. DOI: 10.1126/science.1087139.
 12. Han H-J, Yu H, Yu X-J. (2016) Evidence for zoonotic origins of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Gen Virol*. 97:274–80. doi: 10.1099/jgv.0.000342.

SARS-COV-2 NING STRUKTURAVIY BO'LMAGAN OQSILLARIDAGI MUTATSION LANDSHAFTINI TAVSIFLASH

G. Esonova, A. Abdurakhimov, Sh. Ibragimova, M. Muminov, V. Tsoy, J. Gulomov, A. Abdullaev,
D. Dalimova, Sh. Turdikulova

2019 yilda yangi SARS-CoV-2 virusi tufayli COVID-19 pandemiyasi paydo bo'lganidan beri global miqyosda katta ta'sir ko'rsatdi. Avvalgi tadqiqotlarimiz SARS-CoV-2 genomlarining Spike oqsilidagi mutatsiyalarni tahlil qilishga qaratilgan bo'lib, bu virusning O'zbekistonda tarqalishi, evolyutsiyasi va genetik xilma-xilligi haqida ma'lumot berildi. Mazkur tadqiqotda esa SARS-CoV-2 genomining Open Reading Frame 1ab (ORF1ab) lokusidagi eng keng tarqalgan mutatsiyalarni o'rganishni maqsad qilganmiz. ORF1ab lokusi nostruktur oqsillarni (NSP) kodlaydi, ular virusning hayot siklida muhim rol o'ynaydi, shu jumladan, RNKni qayta ishlash, virusning replikasiya qilinishi va xujayraning immun tizimidan qochishi jarayonlarida ishtirok etadi. Ushbu genom mintaqasidagi mutatsiyalarni tahlil qilish SARS-CoV-2 evolyutsiyasi yo'nalishlarini chuqurroq tushunishga hamda O'zbekiston sharoitida kasallikni boshqarish va uning oldini olish bo'yicha imkoniyatlarni o'rganishga yordam beradi. Bundan tashqari SARS-CoV-2 virusi va uning variantlariga vaksina dizaynida foydalanish mumkin.

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИОННОГО ЛАНДШАФТА НЕСТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ SARS-COV-2

Г. Эсонова, А. Абдурахимов, Ш. Ибрагимова, М. Муминов, В. Цой, Ж. Гуломов, А. Абдуллаев,
Д. Далимова, Ш. Турдикулова

С момента появления новой пандемии COVID-19 в 2019 году, вызванной вирусом SARS-CoV-2, она оказала значительное влияние на глобальном уровне. Наши предыдущие исследования были сосредоточены на анализе мутаций в белке Spike генома SARS-CoV-2, что позволило получить информацию о распространении, эволюции и генетическом разнообразии вируса в Узбекистане. В настоящем исследовании мы поставили целью изучение наиболее распространенных мутаций в локусе открытой рамки считывания 1ab (ORF1ab) генома SARS-CoV-2. Локус ORF1ab кодирует неструктурные белки (NSP), которые играют важную роль в жизненном цикле вируса, включая процессы обработки РНК, репликации вируса и уклонения от иммунной системы клетки. Анализ мутаций в этом геномном регионе поможет глубже понять направления эволюции SARS-CoV-2, а также изучить возможности для управления заболеванием и его профилактики в условиях Узбекистана. Кроме того, результаты могут быть использованы при разработке вакцин против SARS-CoV-2 и его вариантов.

THE ROLE OF Ca^{2+}_L -CHANNELS IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS IN THE RELAXANT EFFECT OF SOME INDOLE ALKALOIDS

E.B. IBRAGIMOV¹, A.A. ZARIPOV¹, P.B. USMANOV¹, I.Z. JUMAEV¹, SH.M. ADIZOV²

¹Institute of Biophysics and Biochemistry of the National University of Uzbekistan;

²Institute of the Chemistry of Plant Substances Academy of Sciences

E-mail: eldoribragimov1215@gmail .com

This article studies the relaxant effect of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids on the smooth muscle preparation of rat aorta. The contraction activity of the smooth muscle cell of the blood vessel was recorded using the FT-03 device (Grass Instrument Co., USA). The relaxant effect of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids was found to be associated with the blockade of voltage-dependent Ca^{2+} channels located in the plasma membrane of smooth muscle cells, resulting in a decrease in the influx of Ca^{2+} ions into the cytoplasm.

Keywords: aorta, indole alkaloids vincanidine, Ca^{2+}_L -kanal, relaxant

Introduction

One of the main causes of cardiovascular diseases is hypertension, and the treatment and prevention of this condition significantly reduce the risk of heart and vascular diseases [1]. It is known that the development of hypertension is primarily associated with the disruption of several ion transport systems that maintain the Ca^{2+} homeostasis in smooth muscle cells [2]. In the regulation of Ca^{2+} homeostasis in smooth muscle cells, the calcium transport system of the sarcoplasmic reticulum, along with the voltage-dependent Ca^{2+}_L -channels in the plasma membrane, plays an important role. [3,4]. The modulation of these Ca^{2+} transport systems with biologically active substances for the treatment of cardiovascular diseases is currently one of the most relevant issues in cardiology and pharmacology [5]. It is known that some alkaloids have a broad pharmacological effect. In particular, the F-25 alkaloid has been found to exert a strong vasorelaxant effect, and the mechanism of this effect involves the blockade of Ca^{2+}_L and Ca^{2+}_R channels located in the plasma membrane of smooth muscle cells [6]. Furthermore, it has been determined that the pyrazoline alkaloid exerts a positive inotropic effect on the contraction force of the rat heart papillary muscle preparation, and this effect is associated with the activation of the Ca^{2+}_L channel in cardiomyocytes [7]. Considering this, the aim of this study was to investigate the effects of vincanidine ethyl iodide (12-hydroxynorfluorocurarine ethyl iodide) and vincanidine methyl iodide (12-hydroxynorfluorocurarine methyl iodide), indole alkaloids, on the voltage-dependent Ca^{2+} channels of aortic smooth muscle cells.

Material and methods

White rats were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg), the chest was opened, the aorta was isolated, and 3-4 mm aorta preparations were prepared by removing excess fatty tissue and placing them in a special container. Prepared aortic drug Krebs solution: (in mM) NaCl - 118; KCl - 8 ; $MgCO_4$ - 1.2; KH_2PO_4 - 1.2; $CaCl_2$ - 2.5; $NaHCO_3$ -25; glucose - 11; (pH = 7.4) was placed in the cell. Temperature stability ($t = +37$ °C) was ensured by U-8 ultrathermostat. The contractile activity of the aortic vascular preparation was connected to the FT-03 sensor (Grass Instrument Co., USA) in isometric conditions using hooks made of platinum wire and recorded using a standard method (mechanography) using a special computer program through a signal amplifier device (Grass Instrument, USA). Initially, the rat aorta preparation was incubated with a tension of 1 g (~10 mN) for 45–60 min until normalization. The aortic preparation was then reduced with KCl (50 mM), and the relaxant effect of the indole alkaloid under study was examined. Statistical processing of the obtained results and drawing of pictures were carried out using the OriginPro 7.5 computer program. All data are presented as the mean \pm standard error for n experiments. The statistical significance of the differences between the control and experimental values was determined for a series of data using the paired t-test. p-values <0.05 indicate statistically significant differences.

The experimental protocols complied with the standards and requirements for humane treatment of animals and the regulations of the Ethics Committee of the IBB at the National University of Uzbekistan

named after M. Ulughbek (Protocol №. 7 dated April 7, 2022) regarding the use of laboratory animals. The preparations of isolated aortic segments were obtained according to [8].

Results

It is known that the contractile activity of the aorta preparation induced by KCl is determined by the activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels located in the plasma membrane of smooth muscle cells. In this case, an increase in the concentration of K^+ ions in the medium alters the membrane potential, leading to the activation of voltage-dependent Ca^{2+} channels. This results in an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration, which causes muscle contraction [9]. From this perspective, the effects of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids, on the contraction activity induced by KCl (50 mM) in aortic smooth muscle preparations were studied. In the initial experiments, the relaxant effects of the vincanidine indole alkaloids on the isometric contraction activity of rat aortic blood vessels were studied under in vitro conditions. It was found that the indole alkaloids vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide, had a significant relaxant effect on the contraction force induced by KCl (50 mM) at concentrations of 5-150 μ M and 5-125 μ M respectively. When repeating this experiment with vincanidine methyl iodide, it was found that at a concentration of 5 μ M, the aortic preparation reduced the contraction force by $7.2 \pm 3.4\%$, and at 125 μ M, the reduction was $79.8 \pm 2.3\%$. The EC_{50} concentration values of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids, which reduced the contraction force induced by KCl by 50%, were found to be 63.11 μ M and 54.34 μ M, respectively (Figure 1).

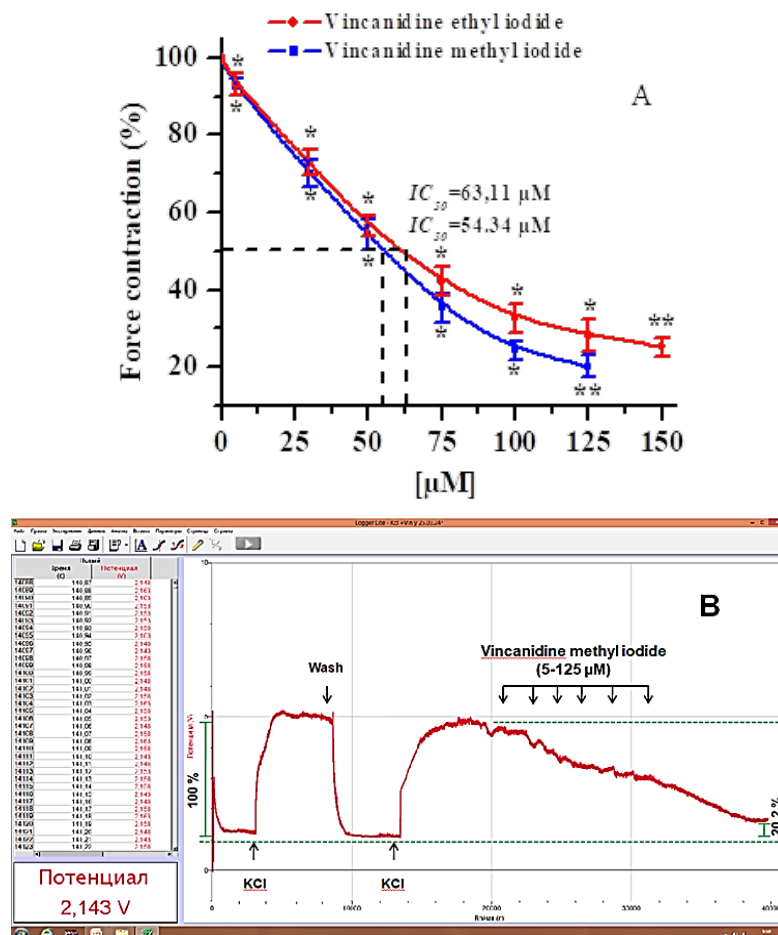
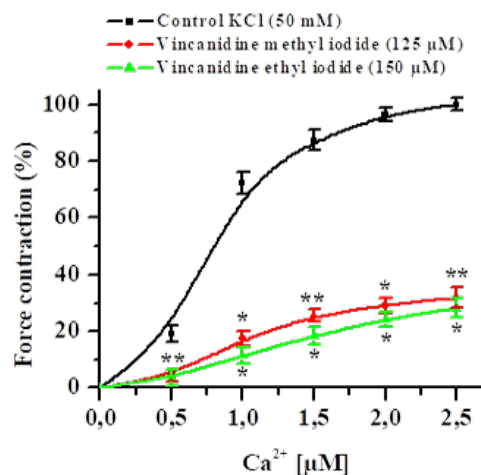


Fig. 1. A. Dose-dependent relaxant effects of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids on the contraction activity induced by KCl (50 mM) in rat aortic smooth muscle preparations. B. Original recording. The contraction force induced by KCl (50 mM) was taken as control (100%) (* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; $n = 4-5$).

Considering that the contraction of the aorta preparation induced by KCl occurs as a result of increased activity of Ca^{2+}_L channels and the subsequent increase in cytosolic Ca^{2+} ions, the relaxant effects of these indole alkaloids may be related to the partial inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} channels located in the

plasma membrane of smooth muscle cells. To test this hypothesis, in the subsequent experiments, we used Krebs-Henseleit physiological solution with a $[Ca^{2+}]_{out}$ range of 0.5-2.5 mM. It is known that in the absence of Ca^{2+} ions in the Krebs solution, an increase in KCl concentration does not induce contraction in the aortic blood vessel preparation. However, in this condition, the addition of Ca^{2+} ions to the Krebs-Henseleit solution leads to contraction of the aortic preparation [10]. In our experiments, the aortic preparation was incubated with vincanidine ethyl iodide (150 μ M) and vincanidine methyl iodide (125 μ M) indole alkaloids. KCl (50 mM) was then added to the medium, followed by the addition of Ca^{2+} (0.5-2.5 mM), which resulted in contraction of the aortic preparation. It was found that the relaxant effect of vincanidine indole alkaloids is dependent on the $[Ca^{2+}]_{out}$ concentration. That is, under the incubation conditions with indole alkaloids, the contraction force of the aortic preparation was found to decrease by $68.3 \pm 4.2\%$ and $71.8 \pm 3.9\%$ compared to the control (Figure 2).

Fig. 2. The relaxant effects of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids on the contraction activity induced by KCl (50 mM) in rat aortic smooth muscle preparations, dependent on the $[Ca^{2+}]_{out}$ concentration. The contraction force induced by KCl (50 mM) was taken as the control (100%) (* – $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 4$).



The results of the experiments indicate that the relaxant effect of indole alkaloids under contraction conditions induced by KCl may be related to the inhibition of Ca^{2+} ion entry through Ca^{2+} channels, which are associated with the potential located on the smooth muscle cell membrane. In our next experiments, studies were conducted in the presence of the specific blocker of these channels, verapamil, to clarify the involvement of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the relaxant effect of the indole alkaloids under investigation [11]. In these experiments, the half-maximal effective concentration of verapamil, $IC_{50} = 0.1 \mu$ M, was used. In the incubation medium, the effects of vincanidine ethyl iodide (63,11 μ M) and vincanidine methyl iodide (54.34 μ M) on the contraction of aorta preparations induced by KCl (50 mM) were examined in the presence of verapamil at an EC_{50} of 0.1 μ M. In this case, it was observed that the indole alkaloids under investigation further decreased the contraction force of the aorta preparations by $8.7 \pm 3.1\%$ and $11.5 \pm 3.7\%$, respectively (Figure 3).

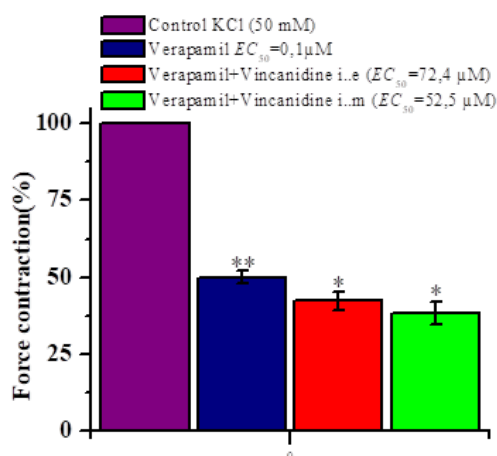


Fig. 3. The effect of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide, indole alkaloids, on the contraction activity induced by KCl (50 mM) in mouse aorta smooth muscle preparations under incubation conditions with the specific Ca^{2+}_L channel blocker – verapamil ($IC_{50} = 0.1 \mu$ M). The contraction force induced by KCl (50 mM) was taken as the control (100%) (* – $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 5$).

These results further confirm that vincristine indole alkaloids have the ability to block Ca²⁺ channels on the plasma membrane of smooth muscle cells.

Conclusion.

Based on the obtained experimental results, it can be concluded that vincanidine indole alkaloids have a strong relaxant effect on the contraction activity of aorta preparations induced by KCl (50 mM). In this process, the blockade of the Ca²⁺_L-channel located on the plasma membrane of smooth muscle cells reduces the entry of Ca²⁺ ions into the cell, leading to muscle relaxation. This hypothesis is further confirmed by the results obtained using the voltage-dependent Ca²⁺ channel specific blocker, verapamil.

Authors' contribution: Ibragimov E.B. - participated in conducting all the experiments. Zaripov A.A. - participated in conducting some experiments and checking the article for spelling errors. Usmanov P.B. - supervisor, provided the methodologies for the experiments, and explained the correct approach to working with them. Jumaev I.Z. - checked the article for spelling errors. Adizov Sh.M. - participated in the isolation of vincanidine ethyl iodide and vincanidine methyl iodide indole alkaloids.

REFERENCES

1. Arima H., Barzi F., Chalmers J. (2011) Mortality patterns in hypertension. *J. Hypertens.* 29 (1): 3-7. DOI: 10.1097/01.hjh.0000410246.59221.b1
2. Wang L., Kong L., Wu F., Bai Y., Burton R. (2005) Preventing chronic diseases in China. *J. Lancet* 366(9499): 1821-1824. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67344-8
3. Jackson W.F., Boerman E.M. (2018) Voltage-gated Ca²⁺ channel activity modulates smooth muscle cell calcium waves in hamster cremaster arteriole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 315(4): 871-878. DOI: 10.1152/ajpheart.00292.2018
4. de Lanerolle P., Paul R.J. (1991) Myosin phosphorylation dephosphorylation and regulation of airway smooth muscle contractility. *Am J Physiol.* 261(1): 1-14. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1991.261.2.11>
5. Gul W., Hamann M.T. (2005) Indole alkaloid marine natural products: an established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *J. Life Sci.* 78. 442-453. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.007
6. Зарипов А.А., Усманов П.Б., Есимбетов А.Т., Абдуллаева Н.У., Журакулов Ш.Н. (2023). F-25 алкалоидининг каламуш аорта препаратига вазорелаксант таъсири. *Наука и общество Научно-методический журнал* (4): 43-46 // Zaripov A.A., Usmanov P.B., Yesimbetov A.T., Abdullayeva N.U., Jurakulov Sh.N. (2023). F-25 alkaloidining kalamush aorta preparatiga vazorelaksant ta'siri. *Fan va jamiyat ilmiy-metodik jurnali* (4): 43-46.
7. Zhumaev I. Z., Boboev S.N., Zaripov A.A., Rustamov Sh.Yu., Ibragimov E.B., Usmanov P.B., Adizov Sh.M. (2023) Evaluation of the inotropic effects of the pirozoline alkaloid. *J. European Journal of Research.* 8(8): 9-15.
8. Vandier C., Guennec J.Y. Le, Bedfer Advan G. *Physiol. Educ.* (2002). (26): 195-203.
9. Vandier C., Jean-Yves Le Guennec., Bedfer G. (2002) What are the signaling pathways used by norepinephrine to contract the artery? A demonstration using guinea pig aortic ring segments. *J. Adv. Physiol. Educ.* 26(4): 195-203. DOI: 10.1152/advan.00062.2001
10. Nishimura K., Ota M., Ito K. (1991). Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by alpha 1-adrenoceptor activation. *J. British Journal of Pharmacology* 102. 215-221. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12156.x
11. Cleary L., Vandeputte C., Kelly J.G., Docherty J.R. (2004) Actions of R- and S- verapamil and nifedipine on rat vascular and intestinal smooth muscle. *J. Auton. Autacoid. Pharmacol.* 24(3): 63-67. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2004.00317.x

AYRIM INDOL ALKALOIDLARNING RELAKSANT TA'SIRIDA AORTA SILLIQ MUSKUL
HUJAYRALARI Ca^{2+}_L -KANALLARINING ROLI

E.B. Ibragimov, A.A. Zaripov, P.B. Usmanov, I.Z. Jumaev, Sh. M. Adizov

Vinkanidin etil yodidi va vinkanidin metil yodid indol alkaloidining kalamush aorta qon-tomiri silliq muskul preparatiga relaksant ta'siri o'rganildi. Qon tomir silliq muskul hujayrasining qisqarish faolligi FT-03 (Grass Instrument Co., AQSh) qurilmasi yordamida qayd qilindi. Vinkanidin etil yodidi va vinkanidin metil yodid indol alkaloidlarining relaksant ta'siri, silliq muskul hujayralari plazmolemmasida joylashgan potensialga bog'liq Ca^{2+} kanallarini bloklanishi natijasida sitoplazma Ca^{2+} ionlari kirishi susayishi bilan bog'liqligi aniqlandi.

Tayanch iboralar: aorta, vinkanidin indol alkaloid, Ca^{2+}_L -kanal, relaksant.

РОЛЬ Ca^{2+}_L -КАНАЛОВ В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ АОРТЫ В РЕЛАКСАНТНОМ ДЕЙСТВИИ
НЕКОТОРЫХ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ

Э.Б. Ибрагимов, А.А. Зарипов, П.Б. Усманов, И.З. Жумаев, Ш.М. Адизов

Исследовано расслабляющее действие винканидина метил-йодид и винканидина этил-йодид алкалоида на подготовку гладкой мускулатуры аорты крысы. Активность сокращения гладкомышечных клеток сосудов была зафиксирована с помощью устройства FT-03 (Grass Instrument Co., США). Расслабляющее действие винканидина этил-йодид и винканидина метил-йодид индольных алкалоидов связано с блокировкой потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов, расположенных в плазмолемме гладкомышечных клеток, что приводит к снижению поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму.

Ключевые слова: аорта, индол-алкалоидов винканидина, Ca^{2+}_L -канал, relaksant.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛА ANK-1 И ЭКСТАРКАТА ITL-2 НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Г. М. РАИМОВА¹, Э. К. НАСИРОВ¹, С. С. ХОДЖИЕВ¹, Л. Н. ВЫПОВА²,
К.Н. МАХМУДОВА¹, Р. Р. МАХМУДОВ²

¹Институт Биофизики и биохимии при НУУз;

²Институт биоорганической химии АН РУз

Автор для переписки: guliraimova111@gmail.com

Нарушения системы гемостаза у больных сахарным диабетом включают активацию естественных механизмов системы коагуляции, подавление фибринолитической активности, а также нарушения функции тромбоцитов. В связи этим актуальной проблемой является исследование данной проблемы и поиск новых лекарственных вещества, препятствующих дальнейшему прогрессированию сахарного диабета 2- типа и развитию его осложнений, на систему гемостаза. В наших исследованиях выявлено, что полифенол выделенный из растения *Pistacia vera* и экстракт из *Isatis tinctoria L.* обладают противодиабетической и антитромботической активностью. Было показано, что эти полифенолы улучшают гликемический контроль у экспериментально смоделированных крыс сахарным диабетом 2 типа, а также снижают уровень тромботических осложнений.

Ключевые слова: Сахарный диабет 2 типа, модулирование сахарного диабета, система гемостаза, плазменные и биохимические показатели крови, полифенолы.

Введение. При сахарном диабете страдают практически все звенья системы гемостаза, что приводит к нарушениям коагуляции, фибринолиза, антикоагулянтной системы, функции тромбоцитов [1]. Эти факторы приводят прогрессированию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Одними из главных причин данных изменений являются: инсулинорезистентность, гиперинсулинемия и неудовлетворительная компенсация углеводного обмена [3]. В настоящее время для улучшения углеводного обмена и системы гемостаза применяются такие лекарственные препараты как Диабетон МВ, метформин и другие. Препарат Диабетон МВ (гликлазид модифицированного высвобождения) нормализует не только углеводный обмен, но и улучшает протромботическое состояние [4]. Диабетон МВ в сравнении с другими препаратами этой группы улучшает первую фазу секреции инсулина и действует на вторую фазу секреции, имеет меньшие риски развития гипогликемии, снижает секрецию глюкозы печенью [5]. В дополнении к вышеперечисленным свойствам, Диабетон МВ снижает адгезию и агрегацию тромбоцитов, а также увеличивает фибринолиз [4]. Другой препарат метформин заметно снижает уровень тканевого активатора плазминогена PAI – 1 и влияет на активацию фактора XIII и полимеризацию фибрина [6]. Интересным препаратами в плане их влияния на углеводный обмен и систему гемостаза являются гликлазид и глибенкламид. При сравнении влияния гликлазида и глибенкламида на углеводный контроль и коагуляцию было показано, что оба эти препарата в ходе 6-месячного приема снижали уровень гликированного гемоглобина. У пациентов в группе, получавшей гликлазид, наблюдалось снижение агрегации тромбоцитов и повышение уровня антитромбина III, в то время как в группе, получавшей глибенкламид, уровень агрегации тромбоцитов не изменился, более того, уровень антитромбина III снизился [7, 8]. Лекарственные вещества синтетического или растительного происхождения, а также препараты, давно применяемые в медицинской практике, обладают способностью препятствовать дальнейшему прогрессированию сахарного диабета (СД) и развитию его осложнений. Актуальной проблемой современной фармакологии продолжает оставаться в поисках новых антидиабетических препаратов, обладающих высокой терапевтической активностью и способностью препятствовать дальнейшему развитию нарушения кровообращения. Цель настоящего исследования – изучение влияния полифенола ANK-1 и экстракт ITL-2 на показатели углеводного обмена и систему гемостаза у крыс, модулированных сахарным диабетом II типа.

Материалы и методы: Исследования проведены на 30-ти половозрелых беспородных белых крысах-самцах с массой тела 280–340 г, которые содержались в условиях вивариях. Экспериментальная

модель сахарного диабета типа 2 проводили в естественном световом режиме на полнораціонной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных.

Все проведенные эксперименты соответствуют требованиям Всемирного общества по защите животных и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, 1986 г.)

Стрептозотоциновый диабет моделировали кормлением в течение 60 суток высоко жировой диетой и однократной инъекцией стрептозотоцина. На 61-е сутки эксперимента после 12-часового голодания вводили однократно внутривентриально свежеприготовленный раствор стрептозотоцина (35 мг/кг в 0,1 М цитратном буфере с рН 4,5). После инъекции животные должны получать воду и пищу в достаточном количестве для того, чтобы предотвратить развитие гипогликемической комы. Под влиянием стрептозотоцина у крыс развивается острый некроз бета-клеток и удаление из них инсулина, выраженная гипергликемия развивается через 24-72 ч и сохраняется продолжительное время [9].

На 3 сутки у животных из конъюнктивы глаза крысы забирали капельно кровь в эпиндорфы. Без стабилизатора по 50 мкл для изучения антитромботической активности и по 0,5 мл крови на цитрате 1:9, последнюю хорошо перемешивали и центрифугировали (ОПН-8 ротор РУ180 Л8000 гр) при 3000 об. в течение 10 минут [9]. Исследовали следующие показатели коагулограммы: протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), рекальцификация плазмы (РП), сек, фибриноген (Ф) [9] на коагулометре (CYANCoag, Belgium.CY003, SN:5400439) с помощью наборов фирмы CYPRESS DIAGNOSTICS, Германия.

Для определения антитромботической активности свежие тромбы (50 мкл) заливали 0,5 мл физ. раствором и ставили в термостат при 37°C. Через 1 час измеряли антитромботическую активность по развитию окраски, адсорбции супернатанта (сгусток + физ. раствор) на спектрофотометр при максимальной длине волны поглощения при 410 нм и температуре 22-24°C (АА = окраска супернатанта опыта/окраска супернатанта контроля). После инкубации образовавшийся сгусток взвешивали. Ингибирование или индуцирование сгустка (ИС) рассчитывали следующим образом: СИС (%) = (масса сгустка у контроля – масса сгустка опыта) / (массу сгустка контроля) x 100.

Биохимические показатели определяли по содержанию глюкозы, ммоль/л; общего белка (ОБ), г/дл; аланин - и аспартат - аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) U/E, общего холестерина, ммол/л, триглицериды ммол/л в сыворотке крови, на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «CYANSmart» с помощью тест наборов, фирмы Cypress Diagnostica, Belgium.

В работе использованы полифенольные соединения (ANK-1) из растений *Pistacia vera* C48H36O30 Молекулярная масса-109 и ИТЛ-2 экстракт из листьев *Isatis tinctoria* и препарат сравнения Диаглизид ®MR таблетки по 30 мг, производитель «Фармак», Украина.

Данные, полученные в ходе экспериментов, обрабатывали статистически. Обработку данных и оформление иллюстраций осуществляли с помощью компьютерной программы Origin 7.1 (Microsoft, США). Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t-критерия находили для 95% уровня значимости ($p \leq 0,05$).

На гистограммах и в таблицах приведены средние арифметические и их стандартные ошибки из 3-5 независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение

При моделировании сахарным диабетом 2-типа (СД 2) у крыс, выявлены изменения наряду с биохимическими и гемостатическими показателями, что выражалось в достоверном увеличении у контрольных животных на 3-и сутки после однократного внутривентриального введения стрептозотоцина содержания глюкозы и других биохимических показателей по отношению к интакту и гиперкоагуляции.

Как видно из приведенных в таблице 1 данных в контрольной группе животных было увеличено содержание глюкозы в 3,5 раза ($p=0.0001$), АСТ и АЛТ в 3,2 ($p \leq 0,01$) и 2,2 ($p \leq 0,01$) раза по отношению к интакту (3,1±0,12 ммоль/л, 31,5±4,2 и 49,2±2,1 U/л), также на 17% было увеличено содержание холестерина и на 27,6% триглицеридов ($p \leq 0,01$).

Таблица 1

Изменения биохимических показателей крови у контрольных крыс с СД 2 типа ($M \pm m$, $n=5$)

Исследовательские группы	Общий белок, г/л	АЛТ, U/л	АСТ, U/л	Глюкоза, ммол/л	Общий холестерин, ммол/л	Триглицерид ммол/л
Интакт	65,4±2,8	31,5±4,2	49,2±2,1	3,1±0,12	1,8±0,08	0,87±0,02
Контроль на 3-и сутки с СД 2	64±1,3	97,3±6,8*	64,1±5,2*	10,9±0,8*	2,1±0,12*	1,11±0,1*

* $p \leq 0,01$ по отношению к интактной группе животных;

Однократное подкожное введение стрептозотоцина привело к достоверному сокращению протромбинового времени (ПВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и время рекальцификации плазмы (ВРП), а также увеличение содержания фибриногена (ФИБ) в сравнении с интактными животными.

Таблица 2

Изменения показателей коагулограммы у крыс с СД 2 типа ($M \pm m$, $n=6$)

Экспериментальные группы	Показатели коагулограммы				АА	СИС
	ПВ, сек	АЧТВ, сек	ВРП, сек	ФИБ, мг/дл		
интакт	22,0±1,4	40,6±3,0	46,4±2,5	325,8±24		
Контроль на 3-и сутки с СД 2	12,9±1,15*	21,7±1,9*	24,3±2,3*	625,0±35*	1,46	74,1

* $p \leq 0,01$ по отношению к интактной группе животных;

Из данных приведенных в таблице 2 видно, что стрептозотоцин в контрольной группе животных вызывает гиперкоагуляцию, что выражается в достоверном сокращении на 3-и сутки введения стрептозотоцина, ПВ который характеризует внешний путь свертывания крови на 70,5% ($p=0,001$) по отношению к исходным данным (22,0±1,4 сек), время АЧТВ, который характеризует внутренний путь свертывания крови достоверно изменяются и в наибольшей степени отражают дефицит факторов, участвующих во внутреннем механизме образования протромбиназы, а также количество фибриногена, тромбоцитов и их функциональной активности сократился на 87,1% ($p=0,001$) по отношению интакту 46,4±2,5 сек. Время рекальцификации плазмы в наибольшей степени отражает дефицит факторов, участвующих во внутреннем механизме образования протромбиназы, а также количество фибриногена, тромбоцитов и их функциональной активности сократился на 50,4% ($p=0,0001$) при этом содержание фибриногена увеличилось на 91,2% ($p=0,0002$) контроль СД 2 325,8±24 мг/дл.

Исследование профилактического действия полифенола ANK-1 и экстракта ITL-2 в сравнении с Диаглизидом на биохимические показатели крови крыс, с СД 2 типа, выявило, достоверное уменьшение содержания глюкозы в 1,66 раза ($p \leq 0,01$), АСТ и АЛТ в 1,6 ($p \leq 0,01$) и 3,1 ($p \leq 0,01$) раза по сравнению с контрольной группой животных (10,9±0,8 ммоль/л, 31,5±4,2 и 49,2±2,1 U/л) изменение остальных показателей биохимии крови было не достоверно (табл. 3).

При исследовании профилактического действия полифенола ANK-1 и экстракта ITL-2 в сравнении с действием Диаглизидом в тестах на свёртываемости крови у крыс с СД 2 типа, выявлена нормализация гемостатических показателей (рис.1 и рис.2).

Известно, что тест АЧТВ указывает на дефицит или ингибирование одного из факторов XII, XI, IX, VIII, X, V и II [8]. Также ПВ-тест определяет протромбиновое время, отсутствие или активность факторов протромбинового комплекса (VII, X, V, II) внешнего механизма свертывания крови [10-11].

Таблица 3

Биохимические показатели крови при профилактическом применении ANK-1, ITL-2 и Диаглизид крыс с СД 2 типа (M±m, n=6)

Препараты	Общий белок г/л	АЛТ, U/л	АСТ, U/л	Глюкоза, ммол/л	Общий холестерин, ммол/л	Триглицериды ммол/л
Интакт	65,4±2,8	31,5±4,2	49,2±2,1	3,1±0,12	1,8±0,08	0,87±0,02
СД 2 на 3-и сутки	64±1,3	97,3±6,8*	64,1±5,2*	10,9±0,8*	2,1±0,12*	1,11±0,1*
ANK-1	65,0±2,1	41,5±4,2**	48,2±3,8**	6,4±0,4**	1,9±0,11	0,89±0,07
ITL-2	65,4±2,8	46,7±3,2**	40,8±3,2**	7,0±0,57**	1,8±0,08	0,97±0,02
Диаглизид	64,1±1,1	45,2±3,4**	41,6±2,8**	8,0±0,67**	1,7±0,07	0,98±0,02

* $p \leq 0,01$ по отношению к интактной группе животных; ** $p \leq 0,01$ по отношению к контрольной группе животных с СД 2.

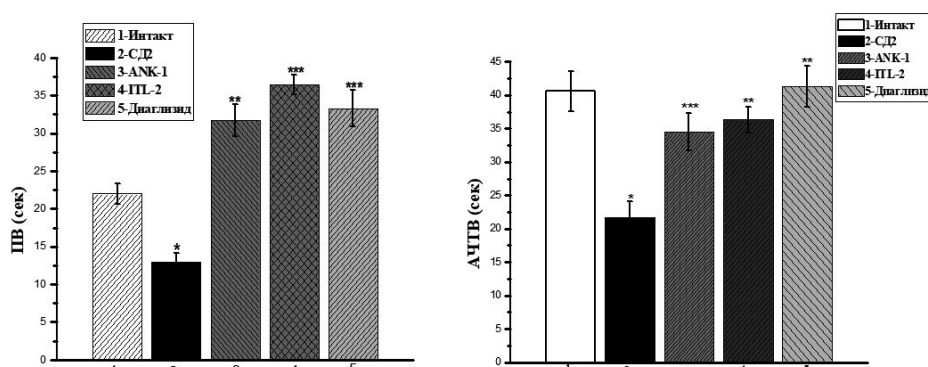


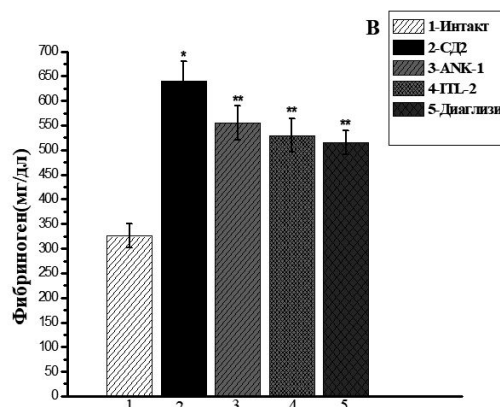
Рис. 1. (А)-Исследование влияния полифенолов и препарата сравнения на протромбиновое время (ПВ). (В)-Исследование влияния полифенолов и препарата сравнения на АЧТВ. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. (n=6).

Профилактическое применение препарата ANK-1 привело к достоверному увеличению ПВ на 52,0% ($p=0,009$) по отношению к контролю 12,9±1,15 сек, АЧТВ на 84,0% ($p=0,001$) контроль 21,7±1,9 сек, ВРП увеличилось на 207% ($p=0,01$), в контроле 33,0±2,3 сек., а содержание фибриногена сократилось на 74,7 % ($p=0,01$) (контроль 641,0±39 мг/дл).

В группе животных с профилактическим применением ITL-2 выявлено достоверное увеличение ПВ на 102,0 % ($p=0,01$) по отношению к контрольным крысам с СД2 15,2 ±1,17 сек, АЧТВ - на 76,0 % ($p=0,001$). ВРП увеличилось на 144,0 % ($p=0,01$), в контроле, а содержание фибриногена сократилось на 60,1 % ($p=0,01$).

На фоне препарата сравнения Диаглизид ПВ увеличилось на 163,4 % ($p=0,01$), АЧТВ на 63,6% ($p=0,01$) по отношению к контролю. Время РП увеличилось на 255% ($p=0,01$), а содержание фибриногена сократилось на 30,3 % ($p=0,01$)

Рис. 2. (А)-Исследование влияния полифенолов и препарата Диаглизид на РП время. (В)-Исследование влияния полифенолов и препарата на Фибриноген тест. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. (n=6).



Таким образом, ВРП и АЧТВ на 3-и сутки на фоне изученных препаратов и препарата сравнения изменялись не достоверно по отношению к контролю. Содержание фибриногена в опытных группах приближалось к исходным показателям и только в группе с препаратом сравнения превышало исходные данные.

Об антитромботическом действии исследуемых препаратов судили по определению деградации 50 мкл свернувшейся крысиной крови. Через 3 сутки после введения стрептозотоцина в контрольной группе животных окраска снизилась на 44% ($p < 0,001$) по отношению к интактной группе животных ($0,64 \pm 0,05$). В опытных группах на фоне исследуемых препаратов увеличилась на 117,5% ($p < 0,001$), по отношению к контролю ($0,36 \pm 0,03$).

В контрольной группе животных вес тромба увеличился на 74% ($p < 0,001$) по отношению к интактной группе ($16,2 \pm 1,0$ мг). Введение на фоне исследуемых препаратов привело к ингибированию веса тромба на 38-55% ($p < 0,001$) по сравнению с показателями в контрольной группе ($28,2 \pm 1,8$ мг).

Таким образом, проведенные исследования позволили сделать следующие выводы:

1. В контрольной группе животных в течение всего эксперимента достоверно были увеличены такие биохимические показатели как АСТ, АЛТ, Глюкоза, содержание триглицеридов и холестерина

2. У крыс с сахарным диабетом 2 типа наблюдается гиперкоагуляция, вызванная введением стрептозотоцина по внешнему (ПВ) и внутреннему (АЧТВ) пути свертывания крови. Что приводит к сокращению ПВ, АЧТВ и ВРП и увеличение содержания фибриногена.

3. Все исследованные препараты при пероральном введении в дозах 10 мг/кг уже при профилактическом введении приводят к нормализации процесса свертывания крови.

4. Наиболее выраженное антитромботическое действие проявилось у препаратов ANK-1 и ITL-2.

Конкретный вклад авторов. Раимова М.Г. – основной исполнитель исследования и оформление статьи. Насиров К.Э. – формулирование идею исследования. Выпова Л.Н., Ходжиев С.С., Махмудов Р.Р. – исполнители исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А.С., Соловьева О.Л. (2007) Нарушения в системе гемостаза при сахарном диабете и пути их коррекции при назначении комбинированной терапии Диабетоном МВ и метформином. Сахарный диабет. 10(3)-С.33-39 // Ametov A.S., Soloveva O.L.(2007) Narusheniya v sisteme gemostaza pri saxarnom diabete I puti ix korreksii pri naznachenii kombinirovannoy terapii Diabetonom MB I metforminom. Saxarniy diabet. 10(3): S-33-39. <https://doi.org/10.14341/2072-0351-5995>.
2. Fomicheva O.A., Popkova T.V., Krougly L.B., Gerasimova E.V., Novikova D.S., Pogorelova O.A. et al. (2021) Factors of Progression and Occurrence of Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. Kardiologiya. 61(1):12–21
3. Лавренова Е.А., Драпкина О.М. (2020) Инсулинорезистентность при ожирении: причины и последствия. Ожирение и метаболизм; -17(1)-С.48-55// Lavrenova E.A., Drapkina O.M.(2020) Insulinrezistentnost pri ojireni; prichini i posledstviya. Ojireniye i metabolizm; -17(1)-S.48-55. <https://doi.org/10.14341/omet9759>.
4. Campbell O., Lavielle R., Nathan C. (1991) The mode of action and clinical pharmacology of gliclazide. Diabetes Res Clin Pract. -№2-S.21-36.
5. Моргунов Л.Ю., Ерина Е.Э. (2021) Гликлазид МВ: очевидные преимущества. Эндокринология: новости, мнения, обучение. Т. 10, № 2. -С. 74-81// Morgunov L.Yu. Erina E.E. (2021) Gliklazid MB: ochevidniye premushestva. Endokrinologiya: novosti, mneniya, obucheniye. Т. 10, № 2. -S. 74-81. DOI: <https://doi.org/10.33029/2304-9529-2021-10-2-74-81>.
6. Colwell J. (1987) Treatment for the procoagulant state in type 2 diabetes. Endocrinol Metab Clin North Am 2001 Dec; 30(4): T-1011-1030. Vague P., Juhan - Vague I., Alessi M.C. Metformin decreases the high PAI-1 capacity, plasma insulin in nin-diabetic obese subjects. Thromb Haemost.; 57(3):326-8.
7. Rubinjoni Z., Turk Z., Coce F. (1978) Effect of platelet adhesiveness in diabetics after treatment with a new oral hypoglycaemic agent. Current Med Res Opin. 5(8):T-625-31.
8. Raimova Guli Madmurodovna, Nasirov Kabil Erkinovich, Khodjiyev Sirojiddin Salimovich, Ortikov Mukhamadkodir Musajonovich, Maxmudov Rustam Rasuljonovich, Toshtemirova Muazzam

- Akmaljonovna, Isagalieva Sadafhon Mukhammadaminovna, Usmanova Muhayyokhan Sobirjonovna (2024) ANK-1, ANK-2, ITL-2 Polyphenols in a Dexamethasone-Induced Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus Treatment. *Journal of Angiotherapy* 8(7) 1-11 <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.879778:T-1-11>.
9. Guli M. Raimova, Nozim N. Khoshimov, Kabil E. Nasirov, Abbaskhan, S. Turaev, Malokhat E. Savutova (2021) Anti-thrombotic action of sulfated polysaccharides on thrombosis caused by thromboplastin. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 14(11):6085-8. doi: 10.52711/0974360X.2021.01057.
 10. Nozim N. Khoshimov, Guli M. Raimova, Kabul E. Nasirov, Zulayho A. Mamatova, Nodira I. Mamadaliyeva, Abbaskhan S. Turaev (2021) The effect of Sulphated cellulose on System of Haemostasis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 14(6):3283-9. doi: 10.52711/0974-360X.2021.00571.
 11. Hui Cao, Juanying Ou, Lei Chen, Yanbo Zhang, Tomasz Szkudelski, Dominique Delmas, Maria Daglia & Jianbo Xiao (2018) Dietary polyphenols and type 2 diabetes. Human study and clinical trials, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI:10.1080/10408398.2018.1492900. 2018;21(5):356-363. <https://doi.org/10.14341/DM9490>.

EKSPERIMENTAL QANDLI DIABETDA KALAMUSHLARDA GEMOSTAZ TIZIMIGA ANK-1 POLIFENOLI VA ITL-2 EKSTARKATINING TA'SIRI

M.G. Raimova, E.K. Nasirov, S.S. Hodjiyev, L.N. Vipova, K.N. Mahmudova, R.R. Mahmudov

Qandli diabet bilan ogʻrigan bemorlarda gemostaz tizimining buzilishi koagulyatsion tizimining tabiiy mexanizmlarining faollashuvi, fibrinolitik faollikning pasayishi, shuningdek, trombotsitlar funksiyasining buzilishini oʻz ichiga oladi. Shu munosabat bilan Qandli diabet 2-tipining yanada rivojlanishi va gemostaz tizimidagi oʻzgarishlarga toʻsqinlik qiluvchi yangi dori vositalarini izlash dolzarb muammo hisoblanadi.

Tadqiqotlarimizda *Pistacia vera* oʻsimligidan ajratib olingan polifenol va *Isatis tinctoria* L. oʻsimligidan ajratib olingan ekstrakti diabetga qarshi va antitrombotik faollikka ega ekanligi aniqlandi. Ushbu maqolada polifenollar qandli diabet 2-tipi bilan eksperimental modellashtirilgan kalamushlarda glikemik nazoratni yaxshilashi, shuningdek, trombotik asoratlar darajasini pasaytirishi koʻrsatildi.

Kalit soʻzlar: 2-tip qandli diabet, qandli diabetning modulyatsiyasi, gemostaz tizim, plazma va biokimyoviy qon parametrlari, polifenollar.

THE INFLUENCE OF ANK-1 POLYPHENOL AND ITL-2 EXTRACT ON THE HEMOSTASIS SYSTEM IN RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES

M.G. Raimova, E.K. Nasirov, S.S. Hodjiyev, L.N. Vipova, K.N. Mahmudova, R.R. Mahmudov

Hemostasis system disorders in patients with diabetes include activation of the natural mechanisms of the coagulation system, suppression of fibrinolytic activity, as well as disruption of the function of platelets. In this regard, the study of this problem and the search for new drugs that prevent further progression of type 2 diabetes and the development of its complications in the hemostatic system is a pressing issue.

Our research revealed that the polyphenol isolated from the plant *Pistacia vera* and the extract of *Isatis tinctoria* L. exhibited antidiabetic and antithrombotic activity. It was shown that these polyphenols improve glycemic control in experimentally modeled rats with type 2 diabetes, as well as reduce the level of thrombotic complications.

Key words: Type 2 diabetes mellitus, modulation of diabetes mellitus, hemostasis system, plasma and biochemical blood parameters, polyphenols.

**БИОФИЗИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ОБЪЕМ-ЗАВИСИМОГО АНИОННОГО КАНАЛА
В КЛЕТКАХ ГИСТОЦИТАРНОЙ ЛИМФОМЫ ЧЕЛОВЕКА U937**

^{1,2}Д.Д. ФАЙЗИЕВ, ^{2,3}Г.В. МАКСИМЧЕВА, ^{2,3}Н.А. ЦИФЕРОВА, ^{1,2}Р.Ш. КУРБАННАЗАРОВА,
¹П.Г. МЕРЗЛЯК, ^{1,2}Р.З.САБИРОВ

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент;

²Кафедра биофизики, факультет биологии и экологии НУУз;

³Центр передовых технологий при министерстве высшего образования науки и инновации

Автор для переписки: diyor09@mail.ru

Показано, что в ответ на осмотическое набухание в плазматической мембране клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937 активируется большая анионная проводимость с выраженным наружным выпрямлением и потенциал-зависимой инактивацией при больших положительных потенциалах. Результаты дозозависимого действия селективного ингибитора объём-зависимого анионного канала DCPiB показали, что он эффективно и потенциал-независимым образом подавляет объём-зависимый ток в этих клетках с полумаксимальной ингибирующей концентрацией $C_{50} = 4,04$ мкМ и коэффициентом Хилла, равным 2,02.

Ключевые слова: U937, DCPiB, объём-зависимый анионный канал, ОЗАК.

Введение. Объём-зависимые анионные каналы (ОЗАК), представляют собой класс мембранных ионных каналов, играющих фундаментальную роль в клеточном гомеостазе [1]. Эти каналы активируются в ответ на набухание клеток и участвуют в важных физиологических процессах, включая регуляцию объема клеток, миграцию клеток, пролиферацию и апоптоз [2, 3]. Недавно была установлена молекулярная идентичность каналов ОЗАК, которые образованы из белков семейства LRRC8 (A, B, C, D и E), среди которых паралог LRRC8A является облигаторным, а остальные модулируют его биофизические параметры, такие как проницаемость и потенциал-зависимость [4, 5]. Эти каналы проявляют необычайную универсальность, реагируют на различные клеточные стрессы и играют важную роль в физиологии иммунных клеток, нейронной сигнализации и динамике раковых клеток [6].

Клетки U937 (линия клеток гистиоцитарной лимфомы человека) широко используются в иммунологических исследованиях из-за их способности к дифференцированию и реагированию на различные раздражители [7, 8]. Однако, детальные электрофизиологические характеристики ОЗАК в клетках U937 остаются в основном неисследованными.

DCPiB (4-(2-butyl-6,7-dichlor-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl) oxybutyric acid) является хорошо изученным и селективным ингибитором ОЗАК [9]. Он эффективно блокирует активность ОЗАК, взаимодействуя с областью поры канала, тем самым ингибируя объём-зависимые анионные токи и предотвращая осмотическое набухание в гипотонических условиях [10]. Цель данного исследования – изучение биофизического профиля ОЗАК и дозозависимого действия DCPiB на эти каналы в клеточной линии U937.

Материалы и методы. Нормальный раствор Рингера содержал (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5 глюкозы (рН 7,4, доведенный NaOH, 290 мОсм/кг-Н₂O). Пипеточный раствор в экспериментах пэтч-кламп содержал (мМ): 125 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3 Na₂ATP, 5 HEPES, 10 EGTA, 50 маннитола (рСа 7,65, 320 мОсм/кг-Н₂O, рН 7,4 доведен CsOH).

DCPiB добавляли из концентрированных исходных растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО). Конечная концентрация ДМСО не превышала 0,1%, при этой концентрации растворитель не оказывал существенного влияния на получаемые данные.

Клетки U937 культивировались в среде DMEM (Sigma-Aldrich) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, NaHCO₃, антибиотиков и глутамина. Клетки инкубировались при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для проведения электрофизиологических экспериментов клетки поддерживались в суспензионной культуре с осторожным перемешиванием и использовались в течение 3–5 часов.

Электрофизиологические эксперименты проводили, как описано ранее [11, 12]. Пэтч-кламп электроды были изготовлены из боросиликатного стекла с использованием механической кузницы PP-830 (Narishige, Япония) и имели, после заполнения пипеточным раствором, сопротивление кончика 2–5 МΩ. Быстрые и медленные емкостные отбросы регулярно компенсировались. При записи тока целых клеток сопротивление доступа не превышало 10 МΩ и было скомпенсировано на ~80%. Мембранные токи измерялись с помощью системы Patch-Clamp EPC-9 (Heka Electronics, Lambrecht/Pfalz, Германия). Мембранный потенциал контролировался путем смещения потенциала пипетки и считался положительным для конфигурации *whole-cell*. Токи фильтровались при частоте 1 кГц и оцифровывались при частоте 5–10 кГц. Запись и анализ данных проводились с помощью программного обеспечения Pulse+PulseFit (Heka Electronics, Германия). Потенциалы жидкостного контакта рассчитывались с использованием программы pCLAMP 8.1 (Axon Instruments, Foster, CA, США). Непрерывная запись кинетики активации и блокировки тока осуществлялась с помощью аналого-цифрового преобразователя GO!Link USB Data Acquisition Interface и программы Logger Lite 1.3.2 (Vernier, Beaverton, OR, США). Экспериментальная ячейка (~0,3 мл) перфузировалась с постоянной скоростью ~2 мл/мин. Все эксперименты проводились при комнатной температуре (23–25 °C).

Данные доза-ответ были аппроксимированы с помощью уравнения Хилла следующего вида:

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) / [1 + (C / C_{50})^h] \quad (1)$$

Здесь: I – относительный ток в (%); I_{\min} и I_{\max} – минимальное и максимальное значения I , соответственно; C – концентрация вещества (мкМ); C_{50} – концентрация вещества, оказывающая полумаксимальный ингибирующий эффект (мкМ); h – коэффициент Хилла.

Данные анализировались с использованием программы Origin, версий 5–8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка для n экспериментов. Сравнения между двумя экспериментальными группами проводились с использованием t -теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В наших экспериментах пэтч-пипетки заполняли пипеточным раствором с несколько более высоким значением осмотичности (320 мОсм/кг H_2O), чтобы вызвать набухание клеток в конфигурации *whole-cell*, как описано ранее [13, 14]. После образования *whole-cell* конфигурации, клетки начинали постепенно набухать, что можно было наблюдать визуально с помощью фазово-контрастной микроскопии. Набухание клеток сопровождалось активацией макроскопических токов (рис. 1А). В начальный момент времени при подаче потенциала ± 40 мВ мы не наблюдали увеличение базовой проводимости, однако с течением времени, по мере того, как клетки увеличивались в объеме, мы регистрировали постепенный рост проводимости. После того, как проводимость достигала стационарного состояния мы стимулировали клетки путем подачи серии тестовых импульсов от –100 мВ до +100 мВ с интервалом 20 мВ, что выявило умеренную инактивацию при больших деполяризующих потенциалах и выраженное наружное выпрямление с амплитудой выходящего тока, намного превышающего поток ионов внутрь клетки (рис. 1Б). Описанные нами биофизические свойства позволяют заключить, что зарегистрированная нами объем-активируемая проводимость по своим свойствам соответствует характеристикам, описанным ранее в литературе для ОЗАК [15, 16].

Исследование влияния DCPiB в концентрации 10 мкМ на объем-зависимый макроскопический ток показало резкое подавление активности ОЗАК (рис. 1). Эффект был полностью обратимым. Несмотря на то, что ингибирование ОЗАК было практически полным, небольшой остаточный ток все еще обладал наружным выпрямлением.

Ионный ток подавлялся как при положительных, так и при отрицательных потенциалах, что указывало на то, что эффект являлся потенциал-независимым. Мы провели детальное изучение зависимости блокирования токов ОЗАК от концентрации DCPiB. На рис. 2 приведены вольт-амперные характеристики объем-активированного тока при различных концентрациях DCPiB.

Эксперименты по исследованию дозозависимого влияния DCPiB на проводимость ОЗАК в диапазоне концентраций 0–20 мкМ показали, что концентрация полумаксимального эффекта при +40 мВ составляет $C_{50} = 4,04 \pm 0,5$ мкМ с коэффициентом Хилла $h = 2,02 \pm 0,5$, а при –40 мВ – $C_{50} = 4,05 \pm 0,4$ мкМ с коэффициентом Хилла $h = 2,2 \pm 0,4$ (рис. 3). Полученные нами значения C_{50} очень близки к полученному ранее значению ($C_{50} = 4,1$ мкМ) для тока ОЗАК в линии клеток эндотелия легочной ар-

терии CРАЕ [17]. Значение коэффициента Хилла, близкое к 2 означает, что для блокирования ОЗАК необходимо связывание не менее двух молекул блокатора.

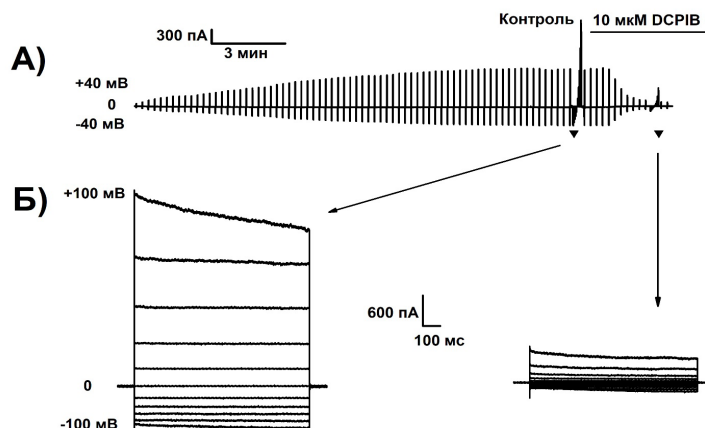


Рис. 1. Влияние DCPiB на объем-зависимый анионный ток, активируемый в клетках U937 в ответ на их осмотическое набухание. (А) Регистрация изменения макроскопического тока в конфигурации *whole-cell*, в ответ на тестовый импульс ± 40 мВ от 0 мВ (каждые 10 с). (Б) Кинетика инактивации ОЗАК в зависимости от мембранного потенциала. Моменты подачи тестовых импульсов отмечены на (А) стрелками.

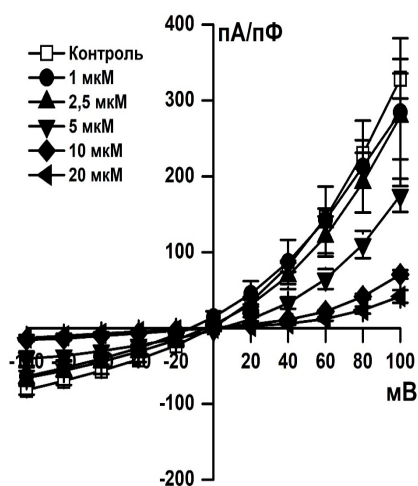


Рис. 2. Вольтамперные характеристики макроскопического тока до (Контроль) и после добавки DCPiB в указанных концентрациях.

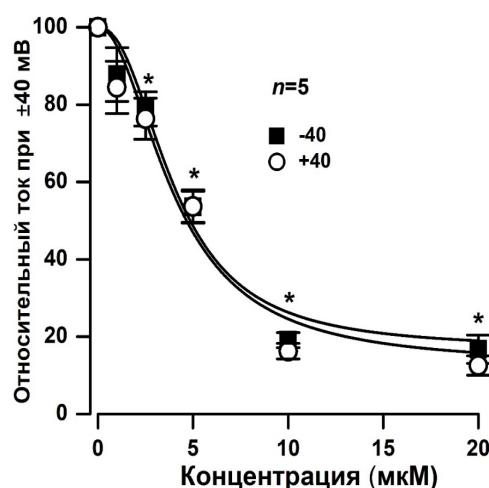


Рис. 3. Зависимость ингибирования ОЗАК от концентрации DCPiB. n – число повторов, * $P < 0,05$ относительно контроля.

Таким образом, нами показано, клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937 экспрессируют большое количество анионных каналов биофизического фенотипа ОЗАК с фармакологией, близкой к таковой, описанной ранее для других типов клеток.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан (грант № FZ-202009216/F-OT-2021-157).

Конкретный вклад авторов: Файзиев Д.Д. провел эксперименты, анализировал данные, написал статью, Максимчева Г.В., Циферова Н.А., Курбанназарова Р.Ш. и Мерзляк П.Г. принимали участие в дизайне экспериментов, анализе данных и подготовке статьи, Р.З. Сабиров руководил экспериментами, анализировал данные, редактировал статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F. (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*. 89(1):193-277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>.
2. Pedersen S.F., Okada Y., Nilius B. (2016) Biophysics and Physiology of the Volume-Regulated Anion Channel (VRAC)/Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Anion Channel (VSOR). *Pflugers Arch*. 468(3):371-383. doi: 10.1007/s00424-015-1781-6.
3. Jentsch T.J. (2016) VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 17(5):293-307. DOI: 10.1038/nrm.2016.29
4. Qiu Z., Dubin A.E., Mathur J., Buu T., Kritika R., Loren J.M., Jurgen R., Anthony P.O., Ardem P. (2014) SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell*. 157:447-458. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.024
5. Voss F.K., Ullrich F., Munch J., Lazarow K., Lutter D., Mah N., Andrade-Navarro M.A., Kries J.P.V., Stauber T., Jentsch T.J. (2014) Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science*. 344:634-638. DOI: 10.1126/science.1252826
6. Lang F., Hoffmann E.K. (2012) Role of ion transport in control of apoptotic cell death. *Compr. Physiol*. 3:2037-2061. doi: 10.1002/cphy.c110046.
7. Prasad A., Sedlářová M., Balukova A., Ovsii A., Rác M., Krupka M., Kasai Sh., Pospíšil P. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Front. Physiol*. 11:e552569. doi.org/10.3389/fphys.2020.552569
8. Tafreshi M.G.K., Mazaheri Z., Heidari M., Babaei N., Doosti A. (2021) Induction of Apoptosis in the U937 Cell Line Co-cultured with Adipose-derived Stem Cells Secreting Bone Morphogenetic Protein-4. *Int. J. Mol. Cell Med*. 10(4):265-275. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.10.4.265.
9. Bowens N.H., Dohare P., Kuo Y.H., Mongin A. (2013) DCPIB, the proposed selective blocker of volume-regulated anion channels, inhibits several glutamate transport pathways in glial cells. *Mol Pharmacol*. 83(1):22-32. doi: 10.1124/mol.112.080457.
10. Kern D.M., Oh S., Hite R.K., Brohawn S.G. (2019) Cryo-EM structures of the DCPIB-inhibited volume-regulated anion channel LRRC8A in lipid nanodiscs Regulation of cell volume by ion channels and transporters: role of volume-regulated anion channels. *Elife*. 18:8:e42636. doi: 10.7554/eLife.42636.
11. Tsiferova N.A., Khamidova O.J., Amonov A.U., Rakhimova M.B., Rustamova S.I., Kurbannazarova R.S., Merzlyak P.G., Abdulladjanova N.G., Sabirov R.Z. (2019) Tannins, novel inhibitors of the volume regulation and the volume-sensitive anion channel. *Eur. Pharm. J*. 66(2):37-44. DOI: 10.2478/afpuc-2019-0016
12. Rustamova S.I., Tsiferova N.A., Khamidova O.J., Kurbannazarova R.S., Merzlyak P.G., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N., Botirov E.K., Eshbakova K.A., Sabirov R.Z. (2019) Effect of plant flavonoids on the volume regulation of rat thymocytes under hypoosmotic stress. *Pharmacol. Rep*. 71(6):1079-1087. DOI: 10.1016/j.pharep.2019.05.023
13. Kurbannazarova R.S., Bessonova S.V., Okada Y., Sabirov R.Z. (2011) Swelling-activated anion channels are essential for volume regulation of mouse thymocytes. *Int. J. Mol. Sci*. 12:9125-9137. DOI: 10.3390/ijms12129125
14. Sabirov R.Z., Kurbannazarova R.S., Melanova N.R., Okada Y. (2013) Volume-Sensitive Anion Channels Mediate Osmosensitive Glutathione Release From Rat Thymocytes. *PLoS One*. 8:e55646. DOI: 10.1371/journal.pone.0055646
15. Okada Y. (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J. Physiol*. 273:755-789. DOI: 10.1152/ajpcell.1997.273.3.C755
16. Okada Y., Sabirov R.Z., Merzlyak P.G., Numata T., Sato-Numata K. (2021) Properties, Structures, and Physiological Roles of Three Types of Anion Channels Molecularly Identified in the 2010's. *Front Physiol*. 12:805148. DOI: 10.3389/fphys.2021.8051483.
17. Decher N., Lang H.J., Nilius B., Bruggemann A., Busch A.E., Steinmeyer K. (2001) DCPIB is a novel selective blocker of I(Cl,swell) and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134(7): 1467-1479. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704413.

INSON U937 GISTOSITAR LIMFOMASI HUYAYRALARIDA HAJMGA BOG‘LIQ ANION KANALLARINING BIOFIZIK PROFILI

D.D. Fayziyev, G.V. Maksimcheva, N.A. Tsiferova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

Odam U937 gistiotsitar limfomasi hujayralarining plazmatik membranasida osmotik shishishga javoban kata anion o‘tkazuvchanlik aktivatsiya bo‘lishi va bu o‘tkazuvchanlik tashqi to‘g‘rilanishi va yuqori musbat potentsiallarda inaktivatsiyaga uchrashi ko‘rsatilgan. Hajmga bog‘liq anion kanalining selektiv ingibitori bo‘lgan DCPIB moddasining dozaga bog‘liq ta‘siri natijalari shuni ko‘rsatdiki, u yarim maksimal ingibirlovchi konsentratsiya $C_{50} = 4,04$ mkM va Hill koeffitsiyenti 2,02 ga teng bo‘lgan holda ushbu hujayralardagi hajmga bog‘liq tokni samarali va potentsialga bog‘liq bo‘lmagan tarzda ingibirloydi.

Kalit so‘zlar: U937, LRRC8, DCPIB, hajmga bog‘liq anion kanallari, HBAK.

BIOPHYSICAL PROFILE OF VOLUME-SENSITIVE ANION CHANNELS IN U937 HUMAN HISTIOCYTIC LYMPHOMA CELLS

D.D. Fayziyev, G.V. Maksimcheva, N.A. Tsiferova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov

It has demonstrated that in response to osmotic swelling in the plasma membrane of human U937 histiocytic lymphoma cells, large anion conductance is activated with pronounced outward rectification and voltage-dependent inactivation at high positive potentials. The results of the dose-dependent effect of the selective inhibitor of the volume-dependent anion channel, DCPIB, showed that it effectively suppresses the swelling-activated current in these cells in a voltage-independent manner with a half-maximal inhibitory concentration of $C_{50} = 4.04$ μ M and a Hill coefficient of 2.02.

Key words: U937, LRRC8, DCPIB, volume-dependent anion channels, VDAC.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАКТОРОВ РИСКА В АНАМНЕЗЕ ПРИ ПРИВЫЧНОЙ ПОТЕРЕ БЕРЕМЕННОСТИ В УЗБЕКИСТАНЕ

Ю.А. КАПРАЛОВА^{1,2}, А.А. АБДУРАХИМОВ^{1,2}, З.М. МИРАКБАРОВА^{2,4}, А.И. РАХМАТУЛЛАЕВ^{1,2},
М.Б. НАЗИРОВА², С.Ш. НИШАНОВА², М.М. РЕЖАПОВА¹, С. АКРАМХОНОВА¹,
М.О. СОДИКОВА¹, Г.Г. АТАМУРОВА², Ф.П. НИШАНОВА³, А.А. АБДУЛЛАЕВ¹,
Ш.У. ТУРДИКУЛОВА¹, Д.А. ДАЛИМОВА¹

¹Центр передовых технологий, Ташкент;

²Институт биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана, Ташкент;

³Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр Акушерства и Гинекологии МЗ РУз;

⁴Центральноазиатский университет, Ташкент

Автор для переписки: malikova.yu@mail.ru

Невынашивание беременности остаётся одной из значимых проблем в акушерстве и гинекологии, влияя на здоровье женщин и их семей. Цель данного исследования – анализ клинико-anamnestических особенностей пациенток с привычной потерей беременности (ППБ) для выявления факторов риска. В основную группу включены 163 женщины с двумя и более последовательными выкидышами неизвестной этиологии, а в группу сравнения – 614 здоровых женщин с положительным акушерским анамнезом. Установлено, что возраст женщины является значимым фактором риска, увеличивающим вероятность выкидыша после 30 лет. 85 % выкидышей происходят в первом триместре беременности, а у 42 % пациенток зафиксированы три и более повторных потерь беременности. Ассоциация между поздним началом менархе и повышенным риском выкидыша подтверждена высоким коэффициентом шансов (OR = 2,091; p = 0,00002).

Ключевые слова: невынашивание беременности, привычная потеря беременности (ППБ), выкидыш, факторы риска.

Введение. Невынашивание беременности остается актуальной акушерско-гинекологической проблемой. Раннее прерывание беременности (выкидыш) – клиническая потеря до 20 недель гестации. Согласно рекомендациям ESHRE [1] и ASRM [2], привычная потеря беременности (ППБ) – это 2 и более последовательных спонтанных аборта. Причины выкидышей разнообразны и поддаются лечению, но около 50% случаев ППБ остаются невыясненными [1]. Около 15–25% беременностей заканчивается до 12 недель гестации, частота возрастает с возрастом матери [3]. Средовые и поведенческие факторы, такие как воздействие тяжелых металлов, химических веществ, курение, употребление кофеина и алкоголя, экстремальные значения ИМТ, повышают риск выкидыша [4], [5]. Выкидыш – тяжелое событие для женщин и их семей. Изучение факторов риска самопроизвольного выкидыша может помочь в разработке мер защиты эмбриона [1]. В связи с этим проведен анализ клинико-anamnestических особенностей пациенток с ППБ для выявления факторов риска.

Материал и методы исследования. Исследование основано на данных 777 женщин узбекской национальности, обследованных в РСНПМЦ Акушерства и Гинекологии МЗ РУз. Пациентки разделены на 2 группы. Основная группа: 163 женщины (19–47 лет, средний возраст 27,8±5,99 года) с привычными потерями беременности (два и более выкидыша неизвестной этиологии). Критерии исключения: тяжелые сопутствующие заболевания, хронические инфекции урогенитального тракта, аномалии половых органов. Проанализированы 414 случаев выкидышей. Группа сравнения: 614 здоровых женщин (19–65 лет, средний возраст 31,15±6,8 года) с одним или более ребенком. Составлены индивидуальные анкеты с этническими, паспортными, антропометрическими данными, сведениями об образовании, работе, вредностях, анамнезом заболеваний и беременности. Подписано информированное согласие, одобренное Локальным этическим комитетом. Данные деперсонализированы. Представлены ретроспективные данные анкет с анализом социальных и клинико-anamnestических характеристик. Анализ выполнен методами описательной статистики, качественные признаки представлены абсолютными и относительными значениями (%). Статистическая обработка проведена в

Excel-2019, различия между группами оценены точным критерием Фишера, значимыми считались $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ данных 163 женщин из 1-й группы показал, что средний возраст на момент первой беременности составил $23,41 \pm 4,43$ года, в группе сравнения – $22,84 \pm 3,51$ года (рис.1).

Возраст зачатия является независимым фактором риска потери беременности. Риск слегка повышается у молодых матерей и значительно возрастает с возрастом [3]. Согласно руководству Королевского колледжа акушерства и гинекологии, риск потери беременности составляет: ≤ 19 лет – 13%, 20–29 лет – 11–12%, 30–34 лет – 15%, 35–39 лет – 25%, 40–44 лет – 51%, ≥ 45 лет – 93% [6].

В исследовании выявлено, что возраст влияет на риск выкидыша. Женщины старше 35 лет при первой беременности чаще встречались в основной группе (5,5% против 1%, $p=0.0024$, OR – 5.425, CI – 1.813–16.97). У женщин старше 30 лет также отмечено преобладание в основной группе (9,6% против 4,5%, $p=0.0163$, OR – 2.2, CI – 1.066–4.4).

Среди 414 патологий плода у 163 женщин основной группы: замершая беременность – 51,6%, мертворождение – 7,6%, спонтанный выкидыш – 34,2%, внематочная беременность – 2,84%, прерывание по медицинским показаниям – 3,72%. (рис.1).

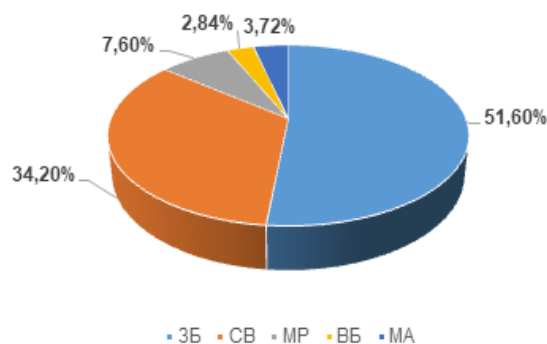


Рис. 1. Распределение числа выкидышей среди исследуемых женщин (ПБ – потери беременности).

Наиболее частым патологическим состоянием была замершая беременность (51,6%). Ее причины включают генетические факторы (иммунологическая несовместимость, мутации) и средовые влияния (заболевания матери, химические и физические воздействия) [7].

Выкидыш составил 34,2% случаев, чаще всего из-за генетических и хромосомных aberrаций, нарушений развития плаценты и кровоснабжения плодного яйца. Важную роль играют воспалительные процессы в эндометрии, недостаточная гормональная стимуляция эмбриона и первичная плацентарная недостаточность [7].

Мертворождения отмечены в 7,6% случаев, что требует улучшения перинатальной помощи.

Внематочная беременность, зарегистрированная в нашем исследовании у 2,84% женщин, является основной причиной материнской смертности в первом триместре (5–10% от общего числа всех смертей, связанных с беременностью). Ее диагностика затруднена из-за неспецифических симптомов, таких как боль в животе и кровотечения [8].

В 3,72% случаев беременность была прервана по медицинским показаниям. Эти данные подчеркивают важность раннего выявления беременности, профилактики и лечения патологий, а также повышения качества медицинских услуг и уровня знаний о репродуктивном здоровье.

Среди исследуемых у 58% женщин было два выкидыша, у 20% – три, у 11% – четыре, у 7% – шесть, у 4% – пять и более. Женщины с тремя и более беременностями составляют 42% (рис. 2). Многократные выкидыши значительно влияют на фертильность, общее здоровье и психологическое состояние. Риск последующих потерь после трех и более выкидышей достигает 50% [9].

У женщин с бесплодием повышен риск выкидыша, особенно при зачатии, требующем более 6 месяцев [9].

Анализ сроков выкидышей показал, что 85% прерываются до 12 недель (рис. 3). У 70% выкидышей в первом триместре выявлены тонкая и фрагментированная цитотрофобластическая оболочка по всей плаценте [10]. Недостаточная инвазия трофобласта вызывает неполное закупоривание

спиральных артерий, преждевременную плацентарную перфузию и окислительное повреждение ворсин, создавая неблагоприятную децидуальную среду [11]. После установления маточно-плацентарного кровообращения к 12 неделям риск выкидышей резко снижается [3].

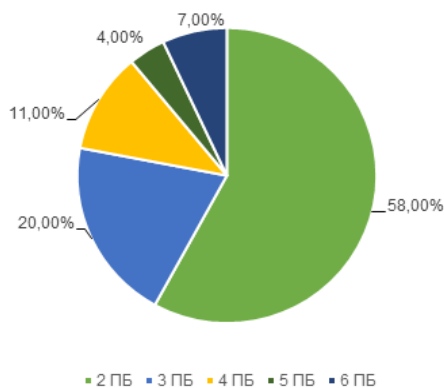


Рис. 2. Распределение числа выкидышей среди исследуемых женщин (ПБ – потери беременности).

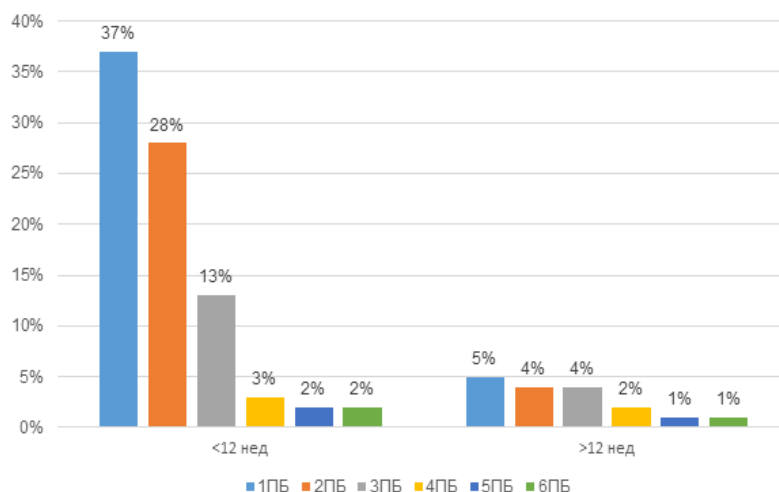


Рис. 3. Распределение потерь беременности по срокам. (ПБ – потери беременности).

Менархе – начало овуляции и фертильности. Поздний возраст менархе связан с неблагоприятными исходами беременности, такими как выкидыши [12].

Наше исследование показало, что у 55% женщин с выкидышами менархе наступило после 14 лет, что на 17,6% больше, чем в контрольной группе (37,4%) (табл.). Различия статистически значимы ($p=0.00002$, $OR=2.091$, $CI=1.47-2.96$).

Распределение возраста менархе в исследуемых группах

Возраст менархе	Случай	Контроль
До 14 лет	45%	62,55%
После 14 лет	55%	37,5%

Задержка менархе может быть вызвана гормональными изменениями, генетическими факторами, воздействием среды, питанием и заболеваниями, что может повлиять на репродуктивное здоровье и протекание беременности [13].

Заключение

Исходя из представленных данных, можно сделать несколько важных выводов. Возраст матери является значимым фактором риска выкидыша, не только после 35 лет, но и после 30. 85 % всех выкидышей происходит в первом триместре беременности. У исследованных женщин в 51,6 % слу-

чаев было зафиксировано прекращение развития плода, а в 34,22 % случаев – выкидыш. При изучении частоты повторных выкидышей было установлено, что у 42 % женщин, переживших потерю беременности, он происходил 3 и более раз. Была установлена ассоциация между поздним началом менархе и выкидышами. Это подтверждается высоким коэффициентом шансов (OR – 2,091) и статистической значимостью ($p=0.00002$). Эти данные подчеркивают необходимость тщательного наблюдения и поддержки женщин с повышенным риском выкидыша, особенно в старшем репродуктивном возрасте и при наличии задержки полового развития.

Благодарность. Данная работа была выполнена при поддержке грантов №№ Ф-ОТ-2021-158 от Министерства инновационного развития Узбекистана и REP-03032022_192 Фонда финансирования Всемирного банка.

Вклад авторов: Капралова Ю.А. и Абдурахимов А.А. написали статью, Миракбарова З.М. и Рахматуллаев А.И. проводили статистический анализ, Назирова М.Б. и Нишанова С.Ш. собирали данные, Режапова М.М., Акрамхонова С., Содикова М.О., Атамуротова Г.Г. создавали электронную базу данных, Нишанова Ф.П. осуществляла контроль за сбором данных, Абдуллаев А.А., Турдикулова Ш.У., Далимова Д.А. руководили экспериментами, анализировали данные, редактировали статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik, R., Christiansen, O. B., Elson, J., Kolte, A. M., Lewis, S., ... Goddijn, M. (2023). ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Human Reproduction Open*, 2023(1), hoad002. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoad002>
2. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2012). Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1103–1111. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048>
3. Magnus, M. C., Wilcox, A. J., Morken, N.-H., Weinberg, C. R., & Håberg, S. E. (2019). Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ*, 364, 1869. <https://doi.org/10.1136/bmj.l869>
4. Gardella, J. R., & Iii, J. A. H. (2000). Environmental Toxins Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*, 18(4), 407–424. <https://doi.org/10.1055/s-2000-13731>
5. Ng, K. Y. B., Cherian, G., Kermack, A. J., Bailey, S., Macklon, N., Sunkara, S. K., & Cheong, Y. (2021). Systematic review and meta-analysis of female lifestyle factors and risk of recurrent pregnancy loss. *Scientific Reports*, 11, 7081. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86445-2>
6. No G. G. (n.d.). The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage, (RCOG: London, UK. – 2011. – С. 75-81.), С. 75-81.
7. Alves, C., Jenkins, S. M., & Rapp, A. (2024). Early Pregnancy Loss (Spontaneous Abortion). In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560521/>
8. Larsen, E. C., Christiansen, O. B., Kolte, A. M., & Macklon, N. (2013). New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Medicine*, 11, 154. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-154>
9. Linehan, L., Hennessy, M., & O'Donoghue, K. (2021, September 7). Infertility and subsequent recurrent miscarriage: Current state of the literature and future considerations for practice and research. *HRB Open Research*. <https://doi.org/10.12688/hrbopenres.13397.1>
10. Jauniaux, E., & Hustin, J. (1992). Histological examination of first trimester spontaneous abortions: the impact of materno-embryonic interface features. *Histopathology*, 21(5), 409–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1992.tb00424.x>
11. Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2017). The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. *Placenta*, 60, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.007>
12. Martin, E. J., Brinton, L. A., & Hoover, R. (1983). Menarcheal age and miscarriage. *American Journal of Epidemiology*, 117(5), 634–636. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113587>
13. Guldbrandsen, K., Hakonsen, L. B., Ernst, A., Toft, G., Lyngso, J., Olsen, J., & Ramlau-Hansen, C. H. (2014). Age of menarche and time to pregnancy. *Human Reproduction*, 29(9), 2058–2064. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu153>

O'ZBEKISTONDA TAKRORIY HOMILADORLIKNING YO'QOLISHI TARIXIDAGI XAVF OMILLARINING STATISTIK TAHLILI

Yu.A. Kapralova, A.A. Abdurahimov, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rahmatullaev, M.B. Nazirova, S.Sh. Nishanova,
M.M. Rejapova, S. Akramkhonova, M.O. Sodiqova, G.G. Atamurotova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev,
Sh.U. Turdikulova, D.A. Dalimova

Homilani tutib turolmaslik akusher-ginekologiyada ayollar hamda ularning oilalari salomatligiga ta'sir qiluvchi muhim muammolardan biri bo'lib qolmoqda. Ushbu tadqiqotning maqsadi – takroriy ravishda homilasini yo'qotgan (TRHY) bemorlarning klinik-anamnestik xususiyatlarini tahlil qilib, xavf omillarini aniqlashdir. Asosiy guruhga etiologiyasi noma'lum bo'lgan ikki yoki undan ortiq ketma-ket homilasi tushgan 163 ayol kiritildi, taqqoslash guruhiga esa homilasi tushmagan, tabiiy tug'riqni o'tkazgan 614 ayoldan iborat bo'ldi. Ayollarning yoshi 30 yoshdan oshgach, homila tushish xavfi oshishi kuzatilgan. Tushgan homilalarning 85% homiladorlikning birinchi uch oyida sodir bo'lgan, va 42% ayollarda uch yoki undan ortiq takroriy homila tushishlar kuzatilgan. Menarxenening kech boshlanishi va homila tushish xavfining oshishi o'rtasidagi assotsiatsiya mavjudligi aniqlandi (OR = 2,091; p = 0,00002).

Kalit so'zlar: homiladorlikni tutib turolmaslik, takroriy homiladorlik yo'qotilishi (THY), homila tushishi, xavf omillari.

STATISTICAL ANALYSIS OF RISK FACTORS IN HISTORY OF RECURRENT PREGNANCY LOSS IN UZBEKISTAN

Yu.A. Kapralova, A.A. Abdurahimov, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rahmatullaev, M.B. Nazirova, S.Sh. Nishanova,
M.M. Rejapova, S. Akramkhonova, M.O. Sodiqova, G.G. Atamurotova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev,
Sh.U. Turdikulova, D.A. Dalimova

Pregnancy loss remains a significant issue in obstetrics and gynecology, impacting the health of women and their families. This study aims to analyze the clinical and anamnestic characteristics of patients with recurrent pregnancy loss (RPL) to identify risk factors. The study included 163 women with two or more consecutive miscarriages of unknown etiology in the main group and 614 healthy women with a positive obstetric history in the comparison group. Age was identified as a significant risk factor, with an increased likelihood of miscarriage after 30 years. A total of 85% of miscarriages occurred in the first trimester, and 42% of patients experienced three or more recurrent pregnancy losses. An association between late menarche onset and an increased risk of miscarriage was confirmed, with a high odds ratio (OR = 2.091; p = 0.00002).

Keywords: pregnancy loss, recurrent pregnancy loss (RPL), miscarriage, risk factors.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ALKYL DERIVATIVES OF ALKALOID CONVULVINE**M.R. UMAROVA, U.B. KHAMIDOVA, N.A. TOSHEVA, E.O. TERENCEVA, E.G. YUSUPOVA,
G.A. PIYAKINA, D.R. MANSUROV, D.B. KADIROVA, S.F. ARIPOVA, SH.S. AZIMOVA**

Institute of Plant Chemistry named after academician S.Yu. Yunusov, Academy of Sciences, Tashkent

Corresponding author: mukaddasu06@gmail.com

It has studied the alkyl derivatives of the tropane alkaloid convolvin - 3,4-dimethoxybenzoyloxy-nortropane were synthesized by interaction with a homologous series of alkyl halides and their cytotoxic activity. The structures of the synthesized compounds were proven based on IR and NMR spectroscopy data. The cytotoxicity of the synthesized compounds was studied on both cancer cell lines and healthy cell lines. Among the 6 derivatives, N-nonyl convolvin and N-decyl convolvin samples were found to be cytotoxically active.

Key words: Convolvulus subhirsutus, alkaloids, N-alkyl derivatives of convolvin, cancer cells, cytotoxicity.

Introduction. Cancer is currently the second leading cause of death worldwide [1]. The increasing risk of drug-resistant cancers and adverse drug reactions highlights the need to develop new, more effective and safer anticancer agents [2].

Convolvulus plants exhibit various biological activities, including cytotoxicity [3]. For example, almost all parts of *C. arvensis* had antiproliferative effects on human rhabdomyosarcoma (RD) cancer cells and rat embryo fibroblast (REF-3) cell line [4]. Extracts from *Convolvulus* were also tested on human hepatoma cell line (HepG2) [5], CACO (colorectal carcinoma) and HCT-116 (colon cancer) cancer cells and showed high efficacy [6].

Convolvulus subhirsutus plant, growing in various regions of Uzbekistan, Kazakhstan and Tajikistan, contains significant amounts of tropane alkaloids, the main one being the alkaloid convolvine (3,4-dimethoxybenzoyloxy-nortropane), a derivative of nortropine [7]. In order to find substances with valuable pharmacological properties, we synthesized several synthetic derivatives of convolvin and studied their cytotoxicity. [8, 9]. It was found that N-benzylconvolvin and N-chloroacetylconvolvin showed the greatest activity against laryngeal and cervical cancer cells [10]. In this regard, the synthesis of new derivatives of the alkaloid convolvin and biological activity were studied.

Materials and methods. Alkyl derivatives of the tropane alkaloid convolvin - 3,4-dimethoxybenzoyloxy-nortropane were synthesized by interaction with a homologous series of alkyl halides 2a-g [11]. It was found that all reactions occur with heating at the boiling point of the solvent with yields of 60-85%. The structures of the synthesized compounds were proven based on IR and NMR spectroscopy data. For hydrochlorides of N-hexyl, N-octyl and N-nonyl derivatives of convolvin, the spatial structure was established by X-ray diffraction (XRD) [12].

Cell lines

The cytotoxicity of the synthesized compounds against 4 lines of cancer cells (epithelial carcinoma of the cervix HeLa, adenocarcinoma of the mammary gland HBL-100 (ATCC HTB 124) and adenocarcinoma of the larynx HEp-2 (ATCC:CCL-3), T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM (ATCC:CCL-19) and 4 lines of healthy cells on hepatocytes [14], mononuclear cells [15], fibroblasts [16] and Vero B (African green monkey kidney cells (ATCC:CRL-1587) was studied *in vitro*.

HeLa, HBL-100, HEp-2 cells were obtained from the Central Bank of the Cell Culture Collection of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, CCRF-CEM cells – from the University of Heidelberg, Germany), Vero B cells - from Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences. Cell lines were cultured in RPMI-1640 or DMEM/F12 media (Capricorn scientific, Germany) with the addition of 10% bovine fetal serum (Sigma, USA), 2 mM glutamine and 1x antibiotic-antimycotic solution (Lonza, Belgium) in 5% CO₂ and 37°C [17].

MTT-based cytotoxicity assay

The cytotoxicity of N-alkyl derivatives of convolvin was studied using the colorimetric MTT method - a quantitative determination of cell survival and proliferation, based on the cleavage of MTT (tetrazoli-

um salt: 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2n-tetrazolium bromide) by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase of living cells, with the formation of a blue formazan product, which crystallizes inside the cell [18,19].

100 µl cell suspension (2×10^4 cells/ml) were seeded at 96 microplate and incubated for 24 hours (37°C , 5% CO_2 air humidified). The substances were dissolved in DMSO (0.8% of the volume) and introduced into the cells, at a concentration of 100 µM. The cells with the substances were incubated for 24 hours. After, 20 µl of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg/ml) (Acros organics, Belgium) were added to the cells and incubated for 4 hours. After the incubation period, the medium was removed from the plate and 100 µl of DMSO was added to each well to dissolve the formed formazan crystals. The optical density was determined at 630 nm using a Rayto RT-2100C Microplate Reader (China). Each concentration of the substance was analyzed in 3 wells and repeated 3 times.

The percentage of cell survival was calculated based on the following formula. The percentage of cell survival in the negative control (cells without substances) was taken as 100 [20]. The cytotoxic effects of the studied substances were compared with the well-known antitumor drug Cisplatin-Naprod (India).

$$\% \text{Cell Survival} = 100 - \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

A_t : Absorbance of tested concentration,

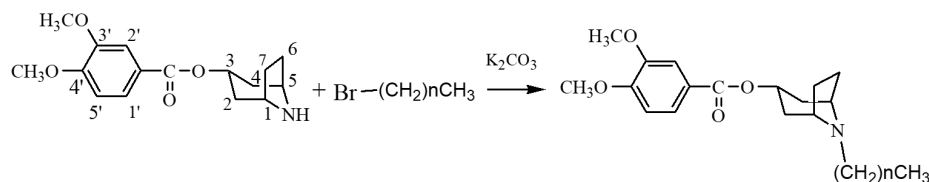
A_b : Absorbance of blank,

A_c : Absorbance of negative control

Statistical analysis

Data obtained in 3 independent experiments were statistically processed using «Origin 8.6» and expressed as the mean value for each concentration (\pm) standard error of the mean.

Results and discussion. The scheme shows synthetic alkyl derivatives of the tropane alkaloid convolvine-3,4-dimethoxybenzoyloxynortropane, synthesized by interaction with a homologous series of alkyl halides [11].



$n=4, 5, 6, 8, 9, 10$

Scheme of N-alkyl derivatives of convolvine

We wanted to study the *in vitro* cytotoxic activity of alkyl derivatives of the tropane alkaloid convolvine, differing in the length of the methylene chain. Accordingly, N-butyl convolvin consists of 4 $-(\text{CH}_2)-$ fragments, N-isoamyl - of 5, N-hexyl convolvin - of 6, N-octyl - of 8, N-nonyl - of 9, N-decyle convolvin - of 10 methylene chain fragments [11].

Table 1

Cytotoxicity activity of compounds at a concentration of 100 µM against cancer cell lines

Compound	Cell growth inhibition, %			
	HEp-2	HeLa	HBL-100	CCRF-CEM
N-Butyl Convolvin (4)*	10.9±0.1	7.4±0.2	39.3±0.3	20.8±0.7
N-Isoamyl convolvin (5)*	13.9±0.3	29.7±1.0	19.9±0.5	0.0±0.0
N-Hexyl convolvin (6)*	19.5±0.5	25.1±0.8	33.2±0.1	42.6±0.5
N-Octyl convolvin (8)*	55.2±0.4	51.9±0.7	9.8±0.4	14.2±0.3
N-Nonyl convolvin (9)*	82.8±0.5	98.9±0.3	100.0±0.2	77.4±1.1
N-Decyl convolvin (10)*	77.3±1.1	93.7±0.4	100.0±0.2	78.4±0.9
Cisplatin	77.6±1.1	98.9±0.3	75.1±0.5	67.6±0.1

* - number of fragments in the methylated chain $-(\text{CH}_2)-$.

As can be seen from Table 1, the new derivatives with 4 and 5 fragments at 100 μ M did not show cytotoxicity in all cell lines. The cytotoxicity of derivatives increases with increasing of chain length $-(CH_2)_n$. In this case, the 6-fragment derivative (N-hexylconvolvin) showed selective cytotoxicity only on HBL-100 (33.2%) and CCRF-CEM (42.6%) cells. In contrast, N-octylconvolvin (8 methylene chain fragments) showed weak cell growth inhibitory activity against HEP-2 and HeLa, respectively 55.2 and 51.9% (table 1). Moreover, the elongation of 9 and 10 methylene chain fragments to the convolvin molecule (N-Nonyl and N-Decyl convolvin) under the same conditions resulted in both an increase in cytotoxicity. Thus, N-Nonyl convolvin caused the death of an average of 77.4-100% of the cells of the investigated cell lines, N-Decyl convolvin - 77.3-100% of all the presented cell lines. Moreover, HBL-100 breast adenocarcinoma cells and cervical epithelial carcinoma HeLa cells were found to be more sensitive to the action of these convolvin derivatives.

Compounds that showed cytotoxicity on cancer cells were studied under the same conditions on healthy cells (primary cell culture) of – liver, blood, kidneys and skin. These tissues and organs are among the first targets of drug toxicity, as drugs are distributed throughout the body, metabolized in the liver, and excreted through the kidneys and skin.

The results on the cytotoxicity of convolvin derivatives are shown in Table 2.

Table 2

Results of cytotoxicity of compounds on normal cell lines

Compound	Cell growth inhibition, %			
	Hepatocytes	Mononuclear cells	Vero B	Fibroblasts (skin cells)
N-Nonyl convolvin	53.5 \pm 1.2	35.8 \pm 0.6	67.6 \pm 0.4	86.9 \pm 0.5
N-Decyl convolvin	53.8 \pm 0.8	42.3 \pm 0.2	72.5 \pm 0.1	98.8 \pm 0.8
N-Octyl convolvin	45.5 \pm 0.2	36.4 \pm 0.6	60.0 \pm 1.3	96.2 \pm 0.2
Cisplatin	12.3 \pm 0.3	6.9 \pm 0.1	14.6 \pm 0.6	13.2 \pm 0.3

According to the results of Table 2, the cytotoxicity of N-decyl-, N-nonyl and N-octyl derivatives of convolvin was also preserved on healthy cells – the suppression of skin cell growth was 86.9-98.8%, kidney cells – 60-72.5%, liver cells – 45.5-53.8% and blood – 35.8-42.3% compared to control values.

Conclusions.

A study of the cytotoxicity of synthetic derivatives of convolvin on the cancer cell lines HeLa, HBL-100, HEP-2 and CCRF-CEM showed that the sequential addition of methylene chain fragments to the alkaloid molecule leads to an increase in the activity of the investigated substances and a decrease in the selectivity of their action. At the same time, the high cytotoxicity of these compounds is also maintained on healthy cells of the body, which does not allow them to be offered for further in vitro and in vivo studies as antitumor agents.

Thus, further search for new convolvin derivatives that exhibit high anticancer activity and are harmless to healthy cells is necessary.

Specific contribution of the authors: Umarova M.R, Khamidova U.B, Tosheva N.A carried out the experiments. Mansurov D.R, Kadirova D.B isolated alkaloids from plants. Aripova S.F., Azimova Sh.S general consultations and advised on experimental design and edited the article. Terenteva E.O, Yusupova E.G and Piyakina G.A planning experiments, summarizing results.

REFERENCES

1. Subhash Chandraa, Manoj Gahlot, Alka N. Choudharya, Santwana Palai, Ray Silva de Almeidac, John Eversong Lucena de Vasconcelos, Francisco Antonio Vieira dos Santos, Pablo Antonio Maia de Farias, Henrique Douglas Melo Coutinhoc. (2023) Scientific evidences of anticancer potential of medicinal plants. *Food Chemistry Advances*, Volume 2, 100239, <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100239>
2. Singh S, Dhasmana DC, Bisht M, Singh PK. (2017) Pattern of Adverse Drug Reactions to Anticancer Drugs: A Quantitative and Qualitative Analysis. *Indian J Med Paediatr Oncol*. Apr-Jun;38(2):140-145. doi: 10.4103/ijmpo.ijmpo_18_16. PMID: 28900321; PMCID: PMC5582550.
3. Salehi B, Krochmal-Marczak B, Skiba D, et al. (2020) Convolvulus plant–A comprehensive review from phytochemical composition to pharmacy. *Phytotherapy Research*.;34:315–328. <https://doi.org/10.1002/ptr.6662>

[org/10.1002/ptr.6540](https://doi.org/10.1002/ptr.6540)

4. Al-Asady, A. A. B., Suker, D. K., & Hassan, K. K. (2014). Cytotoxic and cytogenetic effects of *Convolvulus arvensis* extracts on rhabdomyosarcoma (RD) tumor cell line in vitro. *Journal of Medicinal Plant Research*, 8(15), 588–598.
5. Tamboli, A.M., Wadkar, K.A. (2022) Comparative cytotoxic activity of *Convolvulus pluricaulis* against human hepatoma cell line (HepG2) and normal cell line (L929) via apoptosis pathways by flow cytometry analysis. *Bull Natl Res Cent* 46, 145. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00835-8>
6. Al-Enazi, N. M. (2018) Phytochemical screening and biological activities of some species of *Alpinia* and *Convolvulus* plants. *International Journal of Pharmacology*, 14, 301–309. DOI: 10.3923/ijp.2018.301.309
7. Введенский А. И. (1961) Флора Узбекистана, Изд-во АН УССР, Ташкент, , 5, С. 28. // Vvedensky A. I. (1961) *Flora Uzbekistana*, Izd-vo AN USSR, Tashkent, , 5, С. 28
8. Gapparov A. M., Okhunov I. I., Aripova S. F., Nabiev A., *Chem. Nat. Compd.*, 47, 608 (2011).
9. Хашимова З. С., Арипова С. Ф., Цеомашко Н. Е., Терентьева Е. О., Охунов И. И., Кадирова Д. Б., Азимова Ш. С., Патент РУз, № 4 IAP 04965: «Средство, проявляющее избирательную цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака гортани». // Khashimova Z.S., Aripova S.F., Tseomashko N.E., Terenteva E.O., Okhunov I.I., Kadirova D.B., Azimova Sh.S., Patent RUz, № 4 IAP04965: «Sredstvo, proyavlyayushiy izbiratelnuyu sitotoksicheskuyu aktivnost po otnosheniyu k kletkam raka gortani»
10. Tseomashko, N. E., Terenteva, E. O., Kodirova, D. B., Okhunov, I. I., Aripova, S. F., Khashimova, Z. S., & Azimova, S. S. (2013). Synthesis of convolinine and cytotoxic activity of alkaloids of the genus *Convolvulus* and their derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(6), 1039–1041.
11. Кадирова Д.Б., Тургунов К.К., Ташходжаев Б., Арипова С.Ф. Химия природных соединений. №.1, 105-106 (2023). // Kadirova D.B., Turgunov K.K., Tashkhodzhaev B., Aripova S.F. *Ximiya prirodnix soedineniy. №.1, 105-106 (2023)*.
12. Gapparov A. M., Aripova S. F., Tashkhodzhaev B., Levkovich M. G., Aripov O. *Chem. Nat. Compd.*, 46, 590 (2010).
13. Cabral, F., Miller, C.M., Kudrna, K.M., Hass, B.E., Daubendiek, J.G., Kellar, B.M., Harris, E.N. Purification of Hepatocytes and Sinusoidal Endothelial Cells from Mouse Liver Perfusion. *J. Vis. Exp.* (132), e56993, doi:10.3791/56993 (2018)
14. Charlotte R. Kleiveland. *Peripheral Blood Mononuclear Cells. Immunology and Microbiology. Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, 2017
15. Khamidova U.B., Terenteva E.O., Azimova Sh.S. (2021) *Узбекский биологический журнал*. Ташкент. №5, с.7-10 //Khamidova U.B., Terenteva E.O., Azimova Sh.S. (2021) Isolation of skin fibroblasts by new modified method. //Uzbekskiy biologicheskiy jurnal. Tashkent. №5, с.7-10
16. Фрешни Р. (2012) Культура животных клеток, методы, Ташкент, стр.16-20 // Freshni R. (2012) *Kultura jivotnix kletok, metodi*, Tashkent, str.16-20
17. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986 May 22;89(2):271-7. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90368-6
18. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. (2021) Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827.
19. H. Sadeghi-aliabadi, N. Ghasemi and M. Kohi., (2008) Cytotoxic effect of *Convolvulus arvensis* extracts on human cancerous cell line. *RPS*; 3(1): 31-34

CONVOLVIN ALKALOIDI ALKIL HOSILALARINING SITOTOKSIK FAOLLIGI

M.R. Umarova, U.B. Khamidova, N.A. Tosheva, E.O. Terenteva, E.G. Yusupova, G.A. Piyakina, D.R. Mansurov, D.B. Kadirova, S.F. Aripova, Sh.S. Azimova

Tropan alkaloidining alkil hosilalari konvolvin-3,4-dimetoksibenzoiloksi-nortropan gomologik qator alkil galogenidlar bilan o'zaro ta'sir qilish natijasida sintezlangan va ularning sitotoksik faolligi o'rganildi. Sintezlangan birikmalarning tuzilishlari IQ va YMR spektroskopiyasi ma'lumotlari asosida isbotlangan. Sintezlangan birikmalarning sitotoksikligi saraton hujayralari va sog'lom hujayralar qatorlarida o'rganildi. 6 xil hosilalar orasidan sitotoksik faol namunalari N-nonil konvolvin va N-detsil konvolvin bo'ldi.

Kalit so'zlar: *Convolvulus subhirsutus*, alkaloidlar, N-alkil konvolvin hosilalari, rak hujayralari, sitotoksiklik.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЛКИЛПРОИЗВОДНЫХ АЛКАЛОИДА КОНВОЛЬВИНА

M.P. Umarova, U.B. Xamidova, N.A. Toшева, E.O. Терентьева, Э.Г. Юсупова, Г.А. Пиякина, Д.Р. Мансуров, Д.Б. Кадирова, С.Ф. Арипова, Ш.С. Азимова

Изучены алкилпроизводные тропанового алкалоида конвольвина - 3,4-диметоксибензоилокси-нортропана, синтезированные путем взаимодействия с гомологическим рядом алкилгалогенидов, и их цитотоксическая активность. Структуры синтезированных соединений доказаны на основании данных ИК- и ЯМР-спектроскопии. Цитотоксичность синтезированных соединений изучалась как на линиях раковых клеток, так и на линиях здоровых клеток. Среди 6 производных образцы N-нонилконвольвина и N-децилконвольвина оказались цитотоксически активными.

Ключевые слова: *Convolvulus subhirsutus*, алкалоиды, N-алкил производные конвольвина, раковые клетки, цитотоксичность.

ВЛИЯНИЕ ДИФЕНИЛЬНОГО ПРОИЗВОДНОГО 1,2,4-ТРИАЗОЛА НА РЕГУЛЯЦИЮ ОБЪЕМА ТИМОЦИТОВ И КЛЕТОК U937

У.Ж. РИЗАКУЛОВ¹, Н.А. ЦИФЕРОВА^{1,5}, Г.В. МАКСИМЧЕВА¹, А.А. ЗИЯЕВ¹, О.Ж. ХАМИДОВА^{1,2},
С.И. РУСТАМОВА¹, Б.Н. БАБАЕВ³, Р.Ш. КУРБАННАЗАРОВА^{1,2,3}, П.Г. МЕРЗЛЯК¹, Р.З. САБИРОВ^{1,2}

¹Институт биофизики и биохимии при НУУз, Ташкент ;

²Кафедра биофизики, биологический факультет НУУз;

³Кафедра природных соединений и прикладной химии, химический факультет НУУз;

⁴Институт химии растительных веществ АН РУз;

⁵Центр передовых технологий при Министерстве высшего образования, науки и инноваций

Автор для переписки: rizaqulovumrbek@gmail.com

Проведено исследование дозозависимого действия 3-амидо-(N,N-дибутилкарбомоилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазола (БФТ) на систему регуляции объема тимоцитов крысы и линии клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937. Установлено, что полумаксимальный эффект БФТ на регуляцию объема тимоцитов составляет $C_{50} = 10,8 \pm 2,3$ мкМ, а коэффициент Хилла равен $1,1 \pm 0,3$. Полумаксимальный эффект вещества для раковых клеток U937 составил $C_{50} = 12,9 \pm 4,4$ мкМ, а коэффициент Хилла $0,7 \pm 0,1$, т.е. для ингибирующего эффекта БФТ требуется не менее одной молекулы вещества. Установлено, что БФТ практически не обладает гемолитической активностью.

Ключевые слова: 1,2,4-триазол, тимоциты, U937, красные кровяные клетки человека, гипоосмотический стресс, регуляция объема клетки, гемолиз.

Введение. В настоящее время выявление новых синтетических и природных соединений с эффективными механизмами действия в лечении различных инфекционных заболеваний остается одной из приоритетных проблем. Соединения, содержащие триазольное кольцо, являются гетероциклическими веществами с высокой биологической активностью и широким спектром действия, которые имеют большое значение при лечении бактериальных, грибковых и вирусных заболеваний [1]. К таким веществам относятся химические соединения, содержащие в своей основе 2 различных варианта триазольного кольца: 1,2,3- и 1,2,4-триазолы, отличающиеся расположением атомов азота в молекуле гетероцикла [1–2].

Известно, что триазолы не только подавляют рост патогенных микроорганизмов, но также действуют и на клетки макроорганизма. Так, в литературе имеются сведения о противосудорожной, обезболивающей, противовоспалительной и противоопухолевой активности некоторых соединений на основе 1,2,4-триазола [3]. Тем не менее, биологическая активность веществ с 1,2,4-триазольным кольцом изучена крайне недостаточно. Ранее нами было показано, что 3-амидо-(N,N-дибутилкарбомоилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазола (БФТ) эффективно подавляет регуляцию объема тимоцитов крыс в условиях гипоосмотического стресса, являющегося одним из таких соединений, на систему регуляции объема тимоцитов крыс [4]. В данной работе мы подтвердили и уточнили ранее полученные данные, а также провели исследование БФТ на регуляцию объема раковых клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937.

Материал и методы:

Стандартный раствор Рингера имел следующий состав (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 глюкоза, pH 7,4 (290±2 мОсм/кг H₂O). Состав H-буфера (мМ): 5 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 глюкозы, pH 7,4 (40±2 мОсм/кг H₂O). Гипотонический раствор готовился путем разведения стандартного раствора Рингера и H-буфера в соотношении 3:4. Все реактивы имели квалификацию «х.ч.» или «ч.д.а.». При приготовлении растворов использовали дистиллированную воду. Соединение 3-амидо-(N,N-дибутилкарбомоилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазол, использованный в данном исследовании, было синтезировано как описано ранее [5].

Опыты проводились на 6–8 недельных беспородных крысах-самцах с массой тела 100–150 г. При работе с лабораторными животными в исследованиях соблюдались положения декларации ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In vivo Experiments*: <https://arriveguidelines.org>), в строгом соответ-

ствии с рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или других целях (Страсбург, 1986 г.) и были одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики и биохимии (разрешение № ВЕС/ЛВВ-НУУ/2019/01-1 от 03.10.2019 г.). Тимоциты выделялись, как описано ранее [6-8]. Конечную суспензию, содержащую 100 млн/мл и хранили в растворе Рингера и использовали в течение 3–5 ч.

Линию клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937 культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, NaHCO_3 , глутамина и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Концентрацию клеток в суспензии определяли с помощью электронно-оптического счетчика клеток Corning Cell Counter (Corning Inc., США). Для проведения экспериментов по регистрации клеточного объема клетки центрифугировались 5 мин при 1000 об/мин (200 g). Супернатант (среда культивирования) сливали, клетки ресуспендировали в стандартном растворе Рингера и концентрацию клеток доводили до 100 млн/мл. Клетки хранились при комнатной температуре до начала эксперимента, но не более 3–4 часов. Жизнеспособность клеток определяли по исключению трипанового синего. В наших экспериментах количество погибших клеток не превышало 5%.

В работе использовали метод регистрации клеточного объема по величине светопропускания [6–9]. В ходе эксперимента, 900 мкл среды, содержащей нормальный раствор Рингера (контроль) или раствор, содержащий соответствующую концентрацию вещества, вносили в стеклянную кювету. После уравнивания в кювету вносили аликвоту клеточной суспензии (100 мкл) тимоцитов или клеток U937 до конечной концентрации клеток 10 млн/мл.

Регуляторное уменьшение объема (параметр RVD) рассчитывался по следующей формуле:

$$RVD = (T_{max} - T_{15}) / (T_{max} - T_0) * 100\% \quad (1)$$

где T_0 и T_{max} – начальное и максимальное значение светопропускания, T_{15} – значение светопропускания, измеренное через 15 мин после начала гипотонического стресса.

Концентрационные зависимости влияния испытуемых веществ на регуляцию объема клеток аппроксимировали с помощью уравнения Хилла следующего вида:

$$RVD = RVD_{min} + (RVD_{max} - RVD_{min}) / [1 + (C/C_{50})^h] \quad (2)$$

Здесь: RVD_{min} и RVD_{max} – минимальная и максимальная величина регуляторного уменьшения объема клеток (%), C – концентрация вещества (мкг/мл), C_{50} – концентрация вещества, оказывающая полумаксимальный эффект (мкМ), h – коэффициент Хилла.

Для определения гемолитической активности, кровь брали у добровольцев (сотрудники лаборатории) по общепринятой методике с использованием гепарина в качестве антикоагулянта (10 ед/мл) [10]. Все процедуры выделения эритроцитов человека проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией, в соответствии с рекомендациями ARRIVE (<https://arriveguidelines.org/>) и одобрены Комитетом по биоэтике Института биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана. Цельную кровь разводили в соотношении 1:10 раствором Рингера и центрифугировали при 3000 об/мин (1800 g) в течении 10 мин, затем эритроциты отмывали аналогичным образом 3 раза в растворе Рингера и готовили 8% суспензию эритроцитов.

Для определения гемолитической активности вещества в изотонических условиях, в лунку платы микротитратора заливали по 200 мкл раствора Рингера. Лунки первого ряда оставляли для контроля. Во второй ряд в первую лунку помещали 400 мкл максимальной концентрации исследуемого вещества и осторожно перемешивали с помощью пипетки. Затем брали 200 мкл и помещали во 2-ю лунку, перемешивали, повторяли этот процесс до конца ряда. Таким образом в каждой последующей лунке концентрация вещества уменьшается вдвое по сравнению с предыдущей. В три лунки добавляли 1%-й раствор детергента тритона X-100 для полного разрушения клеток (100 %-й гемолиз). Затем во все лунки вносили по 200 мкл 8% суспензии эритроцитов (конечная концентрация клеток при этом составила 4%) и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Затем клетки из лунок перевозили в чистые пробирки, содержащие 1 мл раствора Рингера и центрифугировали при 3000 об/мин (1000 g) в течение 10 минут. Содержание гемоглобина в супернатанте определяли по светопоглощению при 540 нм. Процент гемолиза рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Гемолиз} = (ОП / ОП_{100}) * 100\% \quad (3)$$

где ОП – это оптическая плотность супернатанта в опыте; ОП₁₀₀ – средняя оптическая плотность супернатанта в 3-х лунках с детергентом тритон X-100. Гемолиз, рассчитанный для 3-х контрольных лунок дает уровень спонтанного гемолиза при данных экспериментальных условиях, который обычно не превышал 1–2%.

Данные анализировались с использованием программы Origin, версии 8 (OriginLab, Northampton, MA, США). Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка для *n* экспериментов. Сравнения между двумя экспериментальными группами проводились с использованием *t*-теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их анализ. В наших предварительных экспериментах мы изучили дозозависимое действие БФТ на систему регуляции объема тимоцитов в условиях гипоосмотического стресса (147 ± 2 мОсм/кг H₂O). В изотонической среде объем клеток оставался неизменным в течение 15 минут. При внесении клеток в гипотоническую среду клетки вначале быстро набухали (пассивный ответ), а затем в течение 15 минут восстанавливали свой объем до уровня, близкого к исходному значению (активный ответ). В контроле регуляторное уменьшение объема тимоцитов в ответ на гипоосмотический стресс составило в среднем $RVD = 71,6 \pm 3,0\%$ ($n=3$) (Рис. 1А).

При исследовании влияния различных концентраций БФТ мы наблюдали ингибирование системы регуляции объема тимоцитов, начиная уже с 5 мкМ вещества ($RVD = 44,5 \pm 2,3\%$; $n=5$). При повышении концентрации вещества до 25 мкМ RVD был равен $29,0 \pm 4,3\%$. При 50 мкМ и 100 мкМ БФТ полностью блокировал систему регуляции объема тимоцитов, и величина RVD составила $2,6 \pm 2,6\%$ и $-2,7 \pm 3,7\%$ соответственно ($n=5$). Небольшое отрицательное значение параметра RVD отражает небольшое набухание клеток при большой концентрации вещества.

При аппроксимации полученных результатов уравнением Хилла было установлено, что полу-максимальный эффект составляет $C_{50} = 10,8 \pm 2,3$ мкМ, а коэффициент Хилла равен $1,1 \pm 0,3$ (рис. 1).

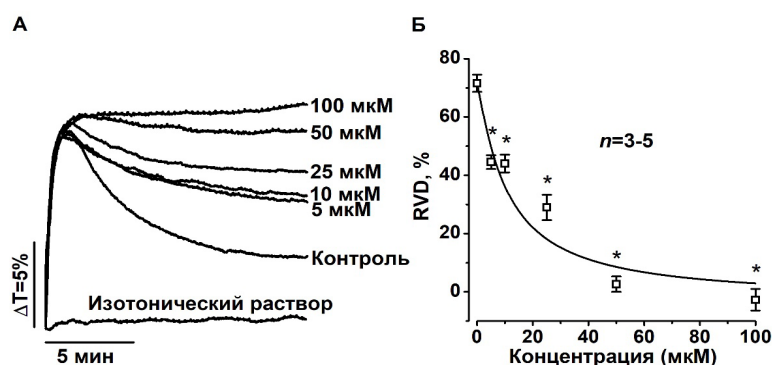


Рис. 1. Влияние БФТ на регуляторное уменьшение объема тимоцитов при гипоосмотическом стрессе. (А) – показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени; (Б) – показана зависимость средних величин параметра RVD , определенного по формуле (1), от концентрации БФТ в среде, n – число экспериментов. (*) – статистически значимо отличаются от контроля при $P < 0,05$. Сплошная линия соответствует аппроксимации уравнением Хилла (2).

В наших следующих экспериментах мы исследовали дозозависимое действие БФТ на систему регуляции объема раковых клеток гистиоцитарной лимфомы человека U937. В изотонической среде объем клеток оставался неизменным в течение 15 минут. Контрольное значение параметра RVD в гипотонической среде был равен $88,0 \pm 2,8\%$ ($n=5$). При добавлении в экспериментальную среду различных концентраций БФТ, уже начиная с 0,5 мкМ, можно было наблюдать видимое подавление системы регуляции объема клеток U937, хотя эффект не достигал уровня статистической значимости ($RVD = 74,5 \pm 2,8\%$; $n=5$). При более высоких концентрациях вещества ингибирование усиливалось, и при 100 мкМ $RVD = 12,6 \pm 1,9\%$ ($n=5$), а при 150 мкМ $RVD = 14,1 \pm 2,3\%$ ($n=5$). При достижении концентрации 200 мкМ регуляция клеточного объема полностью останавливалась, а показатель RVD становился слегка отрицательным с $RVD = -3,4 \pm 3,1\%$ ($n=5$), вследствие небольшого остаточного набухания клеток (см. оригинал записи при 200 мкМ на рис. 2А).

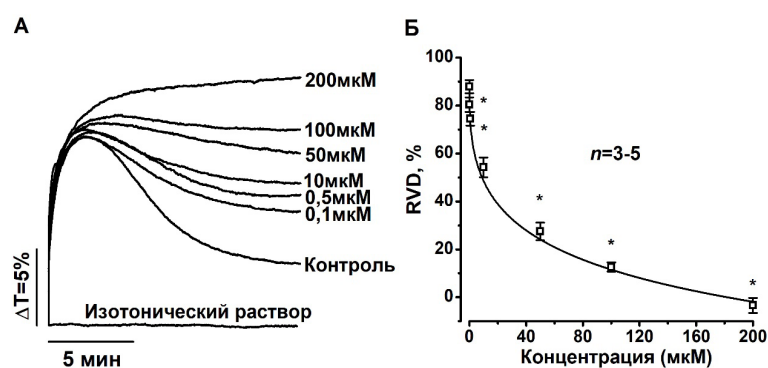


Рис. 2. Влияние БФТ на регуляторное уменьшение объема клеток U937 при гипоосмотическом стрессе. (А) показаны оригиналы записи регистрации изменения светопропускания суспензии клеток во времени; (Б) показана зависимость средних величин параметра RVD, определенного по формуле (1), от концентрации 3-амидо-4,5-дифенил-1,2,4-триазола в среде. n – число экспериментов. (*) – статистически значимо отличаются от контроля при $P < 0,05$. Сплошная линия соответствует аппроксимации уравнением Хилла (2).

При аппроксимации полученных результатов уравнением Хилла, полу-максимальная эффективная концентрация ингибирующего вещества составила $C_{50} = 12,9 \pm 4,4$ μM , а коэффициент Хилла был равен $0,7 \pm 0,1$, т.е. для ингибирующего эффекта БФТ, так же, как и в случае тимоцитов, достаточно одной молекулы вещества (рис. 2).

В следующей части наших исследований было изучено цитотоксическое действие БФТ на красные клетки крови человека в условиях изоосмотического стресса. Спонтанный гемолиз эритроцитов человека, инкубированного в изоосмотических условиях при температуре 37°C в течение 60 минут, составил $1,6 \pm 0,1\%$ ($n=3$). Только при высокой концентрации вещества (500 μM) мы наблюдали незначительное повышение уровня гемолиза до $3,4 \pm 0,5\%$ ($n=5$). Хотя уровень гемолиза статистически значимо отличался от контроля, его невысокий уровень свидетельствует о том, что БФТ не обладает цитолитическими свойствами.

Заключение. В условиях гипоосмотического стресса соединение 3-амидо-(N,N-дибутилкарбомилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазол в микромолярных дозах с примерно равной эффективностью ингибирует систему регуляции объема как тимоцитов, так и раковых клеток линии U937. Близость коэффициента Хилла к единице свидетельствует о том, что для ингибирующего эффекта БФТ требуется не менее одной молекулы вещества. Его ингибирующее действие можно объяснить блокировкой транспортной системы K^+/Cl^- котранспорта, кальциевых, калиевых и/или анионных каналов, принимающих участие в системе регуляции клеточного объема тимоцитов (нормальные клетки) и клеток U937. Близость величин C_{50} и коэффициента Хилла для обоих типов клеток может свидетельствовать о том, что, несмотря на различную природу и происхождение, они имеют одинаковую точку приложения (место связывания) для БФТ. Полученные нами результаты могут послужить основой для поиска новых синтетических иммуномодуляторов и противоопухолевых препаратов на основе производных 1,2,4-триазола.

Благодарности. Данное исследование было выполнено при поддержке гранта Ф-ОТ-2021-157 Министерства высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан.

Конкретный вклад авторов: У.Ж. Ризакулов провел эксперименты, анализировал данные, Н.А. Циферова и Г.В. Максимчева культивировали клеточную линию U937, А.А. Зияев, Б.Н. Бабаев синтезировали вещество, О.Ж. Хамидова, С.И. Рустамова, Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк принимали участие в дизайне экспериментов, анализе данных и подготовке статьи, Р.З. Сабилов редактировал статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strzelecka M., Swiatek P. (2021) 1,2,4-Triazoles as Important Antibacterial Agents. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(3). DOI: 10.3390/ph14030224
2. Shneine J.K., Alaraji Y.H. (2016) Chemistry of 1,2,4-triazole: a review article. *Journal of Pharmaceutical Research International* 5(3): 1411-1423. DOI: 10.21275/NOV161902
3. Kumar S., Khokra S.L., Yadav A. (2021) Triazole analogues as potential pharmacological agents: a brief review. *Futur J Pharm Sci* 7(1): 106. DOI: 10.1186/s43094-021-00241-3
4. Ризакулов У.Ж., Олжаев Н.Д., Бабаев Б.Н., Хамидова О.Ж., Курбанназарова Р.Ш., Зияев А.А., Мерзляк П.Г., Сабиров Р.З. (1993) 3-амидо-(п,п-дибутилкарбомоилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазолнинг ҳужайра мембраналарига таъсири. *Узб. Биол. Ж.* (1): 94-101.
5. Бабаев Б.Н., Зиявитдинов Ж.Ф., Зияев А.А., Бозоров С.С. (2019) Синтез новых производных 4,5-дифенил-2Н-1,2,4-триазол-3-тиона. *Вестник науки и образования.* 20(74): Часть 2. 5-10. // Babaev B.N., Ziyavitdinov J.F., Ziyaev A.A., Bozorov S.S. (2019) Sintez novix proizvodnix 4,5-difenil-2N-1,2,4-triazol-3-tiona. *Vestnik nauki i obrazovaniya.* 20(74): Chast 2. 5-10.
6. Sabirov R.Z., Manjsova M.A., Tadjibaeva E.T., Krasilnikov O.V. (1993) The interaction of amphotericin B with cell membrane of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 12(3): 249-257.
7. Kurbannazarova R.S., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. (2003) Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 22(2): 221-232.
8. Клаус Д. Лимфоциты. Методы. Москва: Мир; (1990) 393 с. // Klaus Dj. (1990) Limfotsityi. Metodyi. M.:Mir. 395 s.
9. Курбанназарова Р.Ш., Ташмухамедов Б.А., Сабиров Р.З. (2008) Роль ионных каналов в регуляции объема лимфоцитов из тимуса крыс. *Вестник НУУз.* 4: 4-6. // Kurbannazarova R.SH., Tashmukhamedov B.A., Sabirov R.Z. (2008) Rol' ionnix kanalov v regulyatsii ob'ema limfotsitov iz timusa kris. *Vestnik NUUZ.* 4:4-6.
10. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Москва: Медицина; (1975) 306 с. // Kost E.A. Spravochnik po klinicheskim laboratornim metodam issledovaniya. M.: Med 1975. 46-47 s.

DIFENIL 1,2,4-TRIAZOLNING TIMOTSIT VA U937
HUYAYRALAR HAJM BOSHQARISH TIZIMIGA TA'SIRI

U.J. Rizakulov, N.A. Tsiferova, G.V. Maksimcheva, A.A. Ziyaev, O.J. Khamidova, B.N. Babaev, S.I. Rustamova,
R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov.

3-амидо-(N,N-дибутилкарбомоилметилентио)-4,5-дифенил-1,2,4-триазол (BFT) ning kalamush timositlari va inson gistotsitik limfoma hujayra liniyasi U937ning hajm boshqarilish tizimiga dozaga bog'liq ta'sirini o'rganildi. BFTning timositlar hajmi boshqarilishiga yarim maksimal ta'siri $C_{50} = 10,8 \pm 2,3$ mkM, Hill koeffitsienti esa $1,1 \pm 0,3$ ekanligi aniqlandi. U937 saraton hujayralari uchun moddaning yarim maksimal ta'siri $C_{50} = 12,9 \pm 4,4$ mkM, Hill koeffitsienti esa $0,7 \pm 0,1$ ga teng. Ya'ni, BFTning blokatorlik ta'siri uchun moddaning kamida bitta molekulasini talab qilinadi. BFTning gemolitik faolligi deyarli yo'qligi aniqlandi.

Kalit so'zlar: 1,2,4-triazol, kalamush timositlari, U937, odam qizil qon hujayralari, gipoosmotik stress, hujayra hajm boshqarilishi, gemoliz.

EFFECT OF DIPHENYL DERIVATIVE OF 1,2,4-TRIAZOLE ON VOLUME REGULATION OF
THYMOCYTES AND U937 CELLS

U.J. Rizakulov, N.A. Tsiferova, G.V. Maksimcheva, A.A. Ziyaev, O.J. Khamidova, B.N. Babaev, S.I. Rustamova,
R.SH. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov.

The dose-dependent effect of 3-amido-(N,N-dibutylcarbamoilmethylenethio)-4,5-diphenyl-1,2,4-triazole (BFT) on the volume regulation system of rat thymocytes and human histiocytic lymphoma U937 cells has investigated. It has found that the half-maximal effect of BFT on thymocyte volume regulation was $C_{50} = 10.8 \pm 2.3$ μ M, and the Hill coefficient was 1.1 ± 0.3 . The half-maximal effect of BFT on U937 cancer cells was $C_{50} = 12.9 \pm 4.4$ μ M, and the Hill coefficient was 0.7 ± 0.1 , i.e. at least one molecule of the substance is required for the inhibitory effect of BFT. It was found that BFT has virtually no hemolytic activity.

Keywords: 1,2,4-triazole, rat thymocytes, U937, human red blood cells, hypoosmotic stress, cell volume regulation, haemolysis.

МУНДАРИЖА

Karakolin hosilalarining aorta silliq muskul hujayralariga ta'sir mexanizmini tadqiq qilish.....	7
Yu.T. Mirzayeva, P.B. Usmanov	
Insulin genining rs689 polimorfizmni diabetik neyropatiya rivojlanishidagi assotsiatsiyalari tahlili.....	13
T.S. Saatov, S.A. Abdurakhimov, E.A. Ibragimova, Z.Z. Ibragimov	
<i>Rhodiola heterodonta</i> ekstraktining diabet kalamushlarda fiziologik o'zgarishlar va oksidlovchi stressga ta'siri	17
A. Abdullaev, U. Gayibov, S. Gayibova, N. Vipova, T. Aripov	
<i>Alhagi persarum</i> suv-etanolli ekstraktlarning timotsitlar hajm boshqarilishiga ta'siri.....	22
O.J. Xamidova, L.X. Fayzullaeva, Z.K. Xasanova, S.I. Rustamova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
<i>Ferula tadshikorum</i> smolasi ekstraktining odam eritrotsitlari litik va sublitik ta'sir mexanizmi.....	29
D.D. Fayziev, S.H. Nematova, O.J. Khamidova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
Glitsirret kislotasining sulfanilamid preparatlari bilan supramolekulyar komplekslarining timotsitlar hajm boshqarilishiga ta'siri.....	35
M.B. Raximova, R.S. Esanov, P.G. Merzlyak, M.B. Gafurov, R.Sh. Kurbannazarova, R.Z. Sabirov	
RENOVAC - dimer RBD oqsil subbirlilik COVID-19 vakinasining B hujayra epitoplari	42
M. Muminov, N. Tsiferova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov, Sh. Turdikulova	
Is gazi bilan o'tkir zaharlanishda ksantinoksidaza faolligini baholash.....	47
R.X. Majidova, O.S. Charishnikova, A.Yu. Baev	
SARS-CoV-2 ning strukturaviy bo'lmagan oqsillaridagi mutatsion landshaftini tavsiflash	52
G. Esonova, A. Abdurakhimov, Sh. Ibragimova, M. Muminov, V. Tsoy, J. Gulomov, A. Abdullaev, D. Dalimova, Sh. Turdikulova	
Ayrim indol alkaloidlarning relaksant ta'sirida aorta silliq muskul hujayralari Ca^{2+}_L -kanallarining roli ..	57
E.B. Ibragimov, A.A. Zaripov, P.B. Usmanov, I.Z. Jumaev, Sh. M. Adizov	
Eksperimental qandli diabetda kalamushlarda gemostaz tizimiga ANK-1 polifenoli va ITL-2 ekstarkatining ta'siri.....	62
M.G. Raimova, E.K. Nasirov, S.S. Hodjiyev, L.N. Vipova, K.N. Mahmudova, R.R. Mahmudov	
Inson U937 gistositar limfomasi hujayralarida hajmga bog'liq anion kanallarining biofizik profili	68
D.D. Fayziyev, G.V. Maksimcheva, N.A. Tsiferova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
O'zbekistonda takroriy homiladorlikning yo'qolishi tarixidagi xavf omillarining statistik tahlili.....	73
Yu.A. Kapralova, A.A. Abdurahimov, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rahmatullaev, M.B. Nazirova, S.Sh. Nishanova, M.M. Rejapova, S. Akramkhonova, M.O. Sodiqova, G.G. Atamurotova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev, Sh.U. Turdikulova, D.A. Dalimova	
Convolvin alkaloidi alkil hosilalarining sitotoksik faolligi	78
M.R. Umarova, U.B. Khamidova, N.A. Tosheva, E.O. Terenteva, E.G. Yusupova, G.A. Piyakina, D.R. Mansurov, D.B. Kadirova, S.F. Aripova, Sh.S. Azimova	
Difenil 1,2,4-triazolning timotsit va U937 hujayralar hajm boshqarish tizimiga ta'siri.....	83
U.J. Rizakulov, N.A. Tsiferova, G.V. Maksimcheva, A.A. Ziyaev, O.J. Khamidova, B.N. Babaev, S.I. Rustamova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov.	

СОДЕРЖАНИЕ

Исследование механизма действия производных караколина на гладкомышечные клетки аорты..... 7	Ю.Т. Мирзаева, П.Б. Усманов
Анализ ассоциации полиморфизма rs689 гена инсулина с развитием диабетической нейропатии . 13	Т.С. Саатов, С.А. Абдурахимов, Э.А. Ибрагимова, З.З. Ибрагимов
Влияние экстракта <i>Rhodiola heterodonta</i> на физиологические изменения и окислительный стресс у диабетических крыс..... 17	А. Абдуллаев, У. Гайибов, С. Гайибова, Н. Выпова, Т. Арипов
Влияние водно-этанольных экстрактов верблюжьей колючки (<i>Alhagi persarum</i>) на регуляцию объема тимоцитов 22	О.Ж. Хамидова, Л.Х. Файзуллаева, З.К. Хасанова, С.И. Рустамова, Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З. Сабилов
Механизм литического и сублитического действия экстракта смолы Ферулы таджикской на эритроциты человека 29	Д.Д. Файзиев, С.Х. Неъматова, О.Ж. Хамидова, Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З.Сабилов
Влияние супрамолекулярных комплексов глицирретовой кислоты с сульфаниламидными препаратами на регуляцию объема тимоцитов 35	М.Б. Рахимова, Р.С. Эсанов, П.Г. Мерзляк, М.Б. Гафуров, Р.Ш. Курбанназарова, Р.З. Сабилов
В-клеточные эпитопы РЕНОВАК – димера белка субъединицы RBD вакцины против COVID-19. 42	М. Муминов, Н. Циферова, В. Цой, А. Абдурахимов, Ш. Турдикулова
Оценка активности ксантиноксидазы при острой токсичности угарным газом 47	Р.Х. Маджидова, О.С. Чарышникова, А.Ю. Баев
Характеристика мутационного ландшафта неструктурных белков SARS-CoV-2 52	Г. Эсонова, А. Абдурахимов, Ш. Ибрагимова, М. Муминов, В. Цой, Ж. Гуломов, А. Абдуллаев, Д. Далимова, Ш. Турдикулова
Роль Ca ²⁺ _L -каналов в гладкомышечных клетках аорты в релаксантном действии некоторых индольных алкалоидов 57	Э.Б. Ибрагимов, А.А. Зарипов, П.Б. Усманов, И.З. Жумаев, Ш.М. Адизов
Влияние полифенола ANK-1 и экстракта ITL-2 на систему гемостаза у крыс при экспериментальном диабете 62	Г. М. Раимова, Э. К. Насиров, С. С. Ходжиев, Л. Н. Выпова, К.Н. Махмудова, Р. Р. Махмудов
Биофизический профиль объем-зависимого анионного канала в клетках гистоцитарной лимфомы человека U937 68	Д.Д. Файзиев, Г.В. Максимчева, Н.А. Циферова, Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З.Сабилов
Статистический анализ факторов риска в анамнезе при привычной потере беременности в Узбекистане 73	Ю.А. Капралова, А.А. Абдурахимов, З.М. Миракбарова, А.И. Рахматуллаев, М.Б. Назирова, С.Ш. Нишанова, М.М. Режапова, С. Акрамхонова, М.О. Содикова, Г.Г. Атамуротова, Ф.П. Нишанова, А.А. Абдуллаев, Ш.У. Турдикулова, Д.А. Далимова
Цитотоксическая активность алкилпроизводных алкалоида конвольвина 78	М.Р. Умарова, У.Б. Хамидова, Н.А. Тошева, Е.О. Терентьева, Э.Г. Юсупова, Г.А. Пиякина, Д.Р. Мансуров, Д.Б. Кадирова, С.Ф. Арипова, Ш.С. Азимова
Влияние дифенильного производного 1,2,4-триазола на регуляцию объема тимоцитов и клеток U937 83	У.Ж. Ризакулов, Н.А. Циферова, Г.В. Максимчева, А.А. Зияев, О.Ж. Хамидова, С.И. Рустамова, Б.Н. Бабаев, Р.Ш. Курбанназарова, П.Г. Мерзляк, Р.З. Сабилов

CONTENTS

Study of the mechanism of action of karakoline derivatives on aortic smooth muscle cells	7
Yu.T. Mirzayeva, P.B. Usmanov	
Analysis of the association of insulin gene rs689 polymorphism with the development of diabetic neuropathy	13
T.S. Saatov, S.A. Abdurakhimov, E.A. Ibragimova, Z.Z. Ibragimov	
The effect of <i>Rhodiola heterodonta</i> on physiological alterations and oxidative stress in diabetic rats	17
A. Abdullaev, U. Gayibov, S. Gayibova, N. Vypova, T. Aripov	
Effect of water-ethanolic extracts of <i>Alhagi persarum</i> on the regulation of thymocyte volume.....	22
O.J. Khamidova, L.X. Fayzullayeva, Z.K. Khasanova, S.I. Rustamova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
The mechanism of lytic and sublytic effects of <i>Ferula tadshikorum</i> resin extract on human erythrocytes	29
D.D. Fayziev, S.H. Nematova, O.J. Khamidova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
Effect of supramolecular complexes of glycyrrhetic acid with sulfanilamide drugs on thymocyte volume regulation	35
M.B. Rakhimova, R.S. Esanov, P.G. Merzlyak, M.B. Gafurov, R.Sh. Kurbannazarova, R.Z. Sabirov	
B cell epitopes of RENOVAC – dimer RBD protein subunit vaccine against COVID-19	42
M. Muminov, N. Tsiferova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov Sh. Turdikulova	
Assessment of xanthine oxidase activity in acute carbon monoxide toxicity.....	47
R.X. Majidova, O.S. Charishnikova, A.Yu. Baev	
Characterizing the mutational landscape of SARS-CoV-2 non-structural proteins	52
G. Esonova, A. Abdurakhimov, Sh. Ibragimova, M. Muminov, V. Tsoy, J. Gulomov, A. Abdullaev, D. Dalimova, Sh. Turdikulova	
The role of Ca ²⁺ _L -channels in aortic smooth muscle cells in the relaxant effect of some indole alkaloids	57
E.B. Ibragimov, A.A. Zaripov, P.B. Usmanov, I.Z. Jumaev, Sh.M. Adizov	
The influence of ANK-1 polyphenol and ITL-2 extract on the hemostasis system in rats in experimental diabetes	62
M.G. Raimova, E.K. Nasirov, S.S. Hodjiyev, L.N. Vipova, K.N. Mahmudova, R.R. Mahmudov	
Biophysical profile of volume-sensitive anion channels in U937 human histiocytic lymphoma cells	68
D.D. Fayziyev, G.V. Maksimcheva, N.A. Tsiferova, R.Sh. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov	
Statistical analysis of risk factors in history of recurrent pregnancy loss in Uzbekistan.....	73
Yu.A. Kapralova, A.A. Abdurahimov, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rahmatullaev, M.B. Nazirova, S.Sh. Nishanova, M.M. Rejapova, S. Akramkhonova, M.O. Sodiqova, G.G. Atamurotova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev, Sh.U. Turdikulova, D.A. Dalimova	
Cytotoxic activity of alkyl derivatives of alkaloid convolvine.....	78
M.R. Umarova, U.B. Khamidova, N.A. Tosheva, E.O. Terenteva, E.G. Yusupova, G.A. Piyakina, D.R. Mansurov, D.B. Kadirova, S.F. Aripova, Sh.S. Azimova	
Effect of diphenyl derivative of 1,2,4-triazole on volume regulation of thymocytes and U937 cells	83
U.J. Rizakulov, N.A. Tsiferova, G.V. Maksimcheva, A.A. Ziyaev, O.J. Khamidova, B.N. Babaev, S.I. Rustamova, R.SH. Kurbannazarova, P.G. Merzlyak, R.Z. Sabirov.	

Правилами оформления статей для Узбекского биологического журнала
и статьями вышедших номеров можно ознакомиться на сайте: <http://www.ubj.academy.uz>

Журнал зарегистрирован Агентством по печати и информации
Республики Узбекистан 22.12.2006
Регистрационный номер 0052.

Телефон редакции журнала (+998)71 232 11 81, (+998) 90 915 13 73.

Адрес редакции:
100047, Ташкент, ул. Я. Гулямова, 70.

На обложке:
БУРГУТ
Беркут
Golden Eagle
Aquila chrysaetos
Linnaeus, 1758
ssp. fulva Linnaeus, 1758 (1)
ssp. daphanea Severtzov, 1888 (2)