

ЎЗБЕКИСТОН RESPUBLIKASI FANLAR АКАДЕМИЯСИ  
АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

**ЎЗБЕКИСТОН  
БИОЛОГИЯ  
ЖУРНАЛИ**

**3**

---

**2025**

**УЗБЕКСКИЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЖУРНАЛ**

*Издается с января 1957 г. по 6 номеров в год*

ТАШКЕНТ – 2025

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ УЗБЕКСКОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ЖУРНАЛА

<b>Главный редактор</b>	акад. Сабиров Р.З.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
<b>Зам. гл. редактора</b>	проф. Асрапов М.И.	Ин-т биофизики и биохимии НУУз
<b>Отв. редактор</b>	д. ф-м.н. Атабеков И.У.	Нац. Ком. МАБ ЮНЕСКО при АН РУз
<b>Отв. секретарь</b>	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

## БИОХИМИЯ И БИОФИЗИКА

### ПЕРЕВИВАЕМАЯ ЛИНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ГЕПАТОЦИТОВ ИЗ ЭМБРИОНОВ КРЫС

З.С. ХАШИМОВА, М.К. САЛАХУТДИНОВА, К.А. КАХОРОВА,  
Ю.И. ОЩЕПКОВА, Ш.И. САЛИХОВ

Институт биоорганической химии АН РУз

Автор для переписки: malika.salahutdinova@mail.ru

Выведена новая перевиваемая культура клеток гепатоцитов из здоровых эмбрионов крыс и изучена чувствительность данной клеточной линии к цитотоксическим коммерческим препаратам известного механизма действия, в том числе веществ, с гепатопротекторной активностью.

**Ключевые слова:** гепатоциты, цитотоксичность, культура клеток, МТТ-тест.

Изучение вновь полученных биологически активных веществ, независимо от дальнейшей цели использования, предполагает оценить их токсичность. Модели с использованием культуры раковых и клеток нормальной ткани, в частности гепатоцитов, находят все более широкое применение в биохимико-токсикологических исследованиях, включая поиск гепатопротекторных соединений [1-4]. Печень является жизненно важным органом, участвующим в регуляции метаболического гомеостаза. Следовательно, любое патологическое изменение функциональной и архитектурной структуры печени может привести к различным заболеваниям [5].

В этой связи нами была поставлена задача получение новой стабильной перевиваемой линии клеток гепатоцитов для биоиндикации новых биологически активных веществ, проявляющих цитотоксическую или гепатопротекторную активности.

#### **Материалы и методы.**

Для эксперимента использовали беременную белую беспородную крысу, которую содержали в виварии на обычной диете. 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 биоорганической химии (Приказ о создании Этического Комитета №5/1а/х от 10 мая 2022).

Выделенная из матки крысы амниотический мешок был помещен в раствор Хэнкса с содержанием канамицина (50 мкг/мл). В стерильных условиях были извлечены эмбрионы из амниотического мешка, а затем и печень из эмбрионов, которую также отмывали трижды в растворе Хэнкса с канамицином. Далее печень помещали в раствор для ферментации (0,25 % раствор трипсина и раствор Версена, взятые в соотношение 1:1), гомогенизировали. После этого оставляли гепатоциты в ферментном растворе на 25-30 мин при 37°C при постоянном помешивании на магнитной мешалке. По истечении времени гепатоциты дважды промывали раствором Хэнкса для удаления трипсина. Гепатоциты центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин, осадок с клетками промывали средой RPMI-1640, содержащий антибиотик - антимикотик (Hi Media) для удаления остатков фермента, центрифугировали и осадок с клетками растворяли в среде RPMI-1640, содержащий антибиотик – антимикотик, добавляли L-глутамин (конечная концентрация 400 мМ) и сыворотку эмбриона теленка (конечная концентрация 20%). Клетки засеивали в культуральный флакон в количестве 10<sup>6</sup> клеток/мл. Суспензия клеток культивировалась при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. В течение недели отмирающие клетки удалялись сменой свежей средой, затем оставались до получения колонии клеток. После заполнения объема флакона до 1/3, был сделан первый пассаж. Для этого клетки снимались с поверхности флаконов 1 мМ ЭДТА, добавляли питательную среду RPMI-1640, содержащий анти-

биотик - антимикотик, L-глутамин и 20% телячьей эмбриональной сыворотки и суспензию клеток переносили в матрац для культивирования.

Цитотоксичность оценивали биохимически с помощью МТТ- метода и подсчету живых клеток трипановым синим.

Для оценки цитотоксического эффекта перевиваемую линию клеток Геп23 рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 25 тыс./мл в 100 мкл среды RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбриона теленка при температуре 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубатора. , после чего добавляли исследуемые препараты в дозах 100, 10 и 1 мкг/мл. Цитотоксичность определялась с помощью МТТ-теста [6,7],

Определяли оптическую плотность при длине волны 620 нм с помощью планшетного анализатора EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, США).

Контрольные клетки инкубировали в той же ростовой среде без воздействия веществ. В качестве положительного контроля использовали цитостатик «Цисплатин – Кемоплат» (Индия), содержащий цисплатин в качестве активного компонента.

Данные, полученные в трех экспериментах, выражали в виде среднего значения трех измерений для каждой концентрации

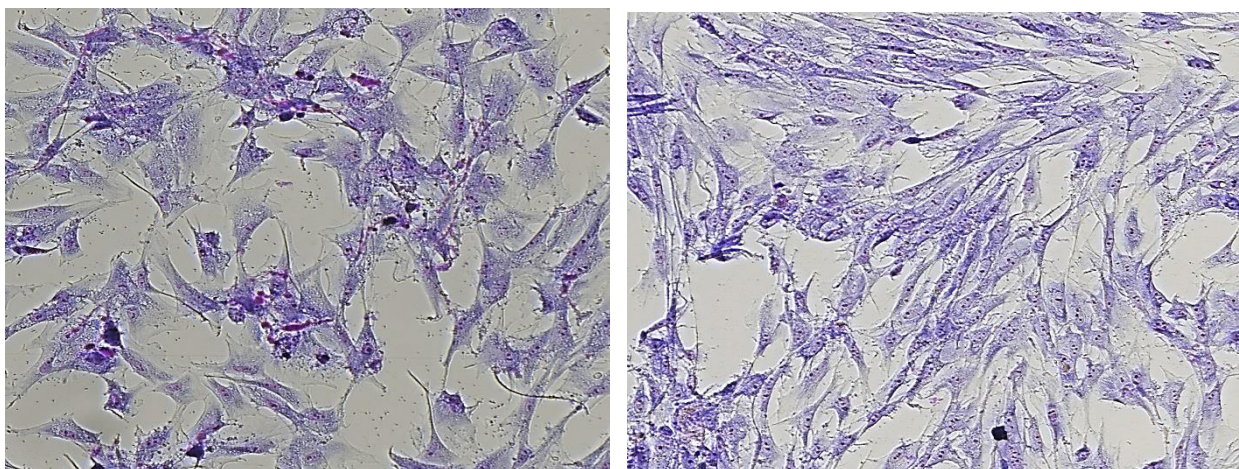
Выживаемость клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле (СОП опытных лунок – СОП среды / СОП контрольных лунок – СОП среды) x 100%, где СОП – усредненный показатель оптической плотности с помощью пакета программ “Microsoft Excel”. Все данные приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SE) для n экспериментов. Статическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-теста Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты и обсуждения.** При выведении перевиваемой культуры гепатоцитов были извлечены эмбрионы из амниотического мешка, далее из эмбрионов извлечена печень, которую гомогенизировали в среде RPMI-1640, содержащий антибиотик – антимикотик, добавляли L-глутамин (конечная концентрация 400 мМ) и сыворотку эмбриона теленка (конечная концентрация 20%). Клетки засеивали в культуральный флакон и культивировались при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе.

Через 3-4 месяца культивирования клеточная линия, названная нами Геп23, приобрела стабильность, клетки пересеивались 2-3 раза в неделю с плотностью  $5 \times 10^4$  кл/мл с коэффициентом посева 1:5 и были полностью переведены на ростовую среду RPMI-1640, содержащий антибиотик - антимикотик, 200мМ L-глутамин и 10% сыворотки эмбриона теленка.

При посеве единичные клетки в процессе размножения легко образуют колонии, которые затем сливаются и образуют конфлюэнтный монослой на 3-4 день. Клетки легко снимаются с поверхности раствором 1 мМ ЭДТА.

Жизнеспособность клеток гепатоцитов контролировали визуально с помощью микроскопа (Nikon Eclipse Ti2) в различные периоды времени (рис. 1).



**Рис. 1.** Перевиваемая линия клеток гепатоцитов (Геп23).  
Образования монослоя клеток, ок.  $\times 10$ , об.  $\times 40$ .

Перевиваемая культура клеток Геп23 представлена эпителиоподобными полигональными клетками с многочисленными двуждерными клетками.

Культура клеток Геп23 заморожена на 40-ом пассаже по  $2 \times 10^6$  клеток на криофлакон объемом 1,8 мл и хранится в банке клеточных культур Института биоорганической химии АН РУз.

Для использования культуры клеток в качестве модели для изучения биологически активных веществ необходимо определить, насколько чувствительна данная система к действию клинических препаратов [8-9]. В связи с этим нами было исследовано действие некоторых клинических противоопухолевых препаратов, а также препараты, обладающие противовоспалительными действиями: цисплатин – синтетический противоопухолевый препарат, обладает свойствами бифункциональных алкилирующих агентов; метотрексат, цитостатический препарат из группы антиметаболитов, доксорубин, противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда. Хофитол, желчегонное средство обладает гепатопротекторным и мочегонными свойствами.

Нами изучено действие этих препаратов на перевиваемой линии гепатоцитов (Геп23). Полученные результаты даны в таблице.

#### Цитотоксическая активность коммерческих препаратов на клеточной линии гепатоцитов (M±m, n=3, P <0,05)

Образцы	Включение МТТ в клетки, %		
	100	10	1
Цисплатин	49,76±2,6	67,78±3,5	90,98±6,1
Метотрексат	79,12±5,4	75,02±4,9	69,13±6,5
Доксорубин	79,92±4,3	78,98±0,9	68,88±3,8
Хофитол	108,19±3,8	94,54±4,6	85,80±2,3

Определение чувствительности гепатоцитов к известным противоопухолевым препаратам – это важный этап в исследовании эффективности и токсичности противораковых агентов.

Как следует из таблицы все 3 противоопухолевых препарата проявляют антипролиферативную активность в пределах 20-30%, наиболее выраженный цитотоксический эффект проявил цисплатин при концентрации 100 мкг/мл (50%). Хофитол практически не проявил активность по отношению здоровым клеткам печени.

Таким образом гепатоциты могут служить моделью для изучения как прямого противоопухолевого эффекта препаратов, так и их потенциальной гепатотоксичности. Полученные данные позволяют оценить потенциальную токсичность этих препаратов для печени, а также могут быть полезны для дальнейшего изучения механизмов действия препаратов и разработки новых терапевтических стратегий с минимальными побочными эффектами.

**Конкретный вклад авторов:** З.С. Хашимова вывела перевиваемую культуру, анализировала данные и написала статью, М.К. Салахутдинова провела эксперимент и анализировала данные, К.А. Кахорова принимала участие в анализе данных и подготовке статьи, Ю.И. Ощепкова и Ш.И. Салихов руководили экспериментами, редактировали статью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Романова М.А., Додонова А.Ш. (2016) Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток. *Молодой учёный*. 18: 239 // Romanova M.A., Dodonova A.Sh. Izuchenie sitotoksichnosti biologicheskii aktivnix soedineniy na culture kletok. *Molodoy Uchyonyi*. 18: 239.
2. Espindola M. R., Varotti F.P, Aguiar A.C., Andrade S. N., Rocha E.M. (2022) In vitro assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. *Braz. J. Pharm. Sci.* 58: 1-11. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e18308>.
3. Gomez-Lechon M. J., Tolosa L, Donato M. T. (2014) Cell-based models to predict human hepatotoxicity of drugs. *Rev. Toxicol.* 31: 149-156.
4. Terenteva E.O., Khashimova Z.S., Khamidova U. B- Kizi, Umarova M. R., Tosheva N. A.,

- Alimukhamedova O. B., Azimova Sh. S. (2024) Cytotoxicity Is the Key Test for In Vitro Toxicity // We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1008310>
5. Alamri Z. Z. (2018) The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 7(11):1-6.
  6. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods*. 65: 55-63.
  7. Niks M. (1990) Towards an optimized MTT assay. *J. Immunological Methods*. 130: 149-151.
  8. Кузнецова Н.Н., Нуридджанянц С.С., Пан З., Мухамедханова Ф.С. (1981) Клеточная тест-система для предварительного отбора противоопухолевых препаратов. *Вопросы онкологии*. 27: 36-39 // Kuznesova N.N., Nuridjayans S.S., Pan Z., Muxamedxanova F.S. (1981) Kletochnaya test-sistema dlya predvaritelnogo otbora protivopuxolevix preparatov. *Voprosi onkologi*. 27: 36-39.
  9. Хашимова З.С., Кахарова К.А., Сагдиев Н.Ж., Ибрагимов Ф.А., Береснева Ю.В., Тураев А.С., Салихов Ш.И. (2017) Штамм культивируемых клеток рака тонкой кишки мышей АКАТ, клон E7. № IAP 05428 06.06.2017 // Xashimova Z.S., Kaxorova K.A., Sagdiyev N.J., Ibragimov F.A., Beresneva Yu. V., Turayev A.S., Salixov Sh.I. (2017) Stamm kultiviruyumix kletok raka tonkoy kishki mishey AKAT, klon E7. № IAP 05428 06.06.2017.

#### KALAMUSH EMBRIONI GEPATOTSITLARI HUYAYRA KULTURASINING KO'CHIRIB O'TKAZILADIGAN LINIYASI

Z.S. Khashimova, M.K. Salakhutdinova, K.A. Kaxhorova, Yu. I. Oshchepkova, Sh.I. Salikhov

Sog'lom kalamush embrionlaridan gepatotsit hujayralarining yangi ko'chirib o'tkaziladigan hujayra liniyasi olindi va bu hujayra liniyasining ta'sir qilish mexanizmi ma'lum bo'lgan sitotoksik preparatlarga, shu jumladan gepatoprotektiv faol moddalarga seziluvchanligi o'rganildi.

**Kalit so'zlar:** gepatotsitlar, sitotoksiklik, hujayra kulturasini, MTT test.

#### CONTINUOUS CELL CULTURE LINE OF HEPATOCYTES FROM RAT EMBRYOS

Z.S. Khashimova, M.K. Salakhutdinova, K.A. Kaxhorova, Yu. I. Oshchepkova, Sh.I. Salikhov

A new continuous culture of hepatocyte cells was developed from healthy rat embryos and the sensitivity of this cell line to cytotoxic commercial drugs with a known mechanism of action, including substances with hepatoprotective activity, was studied.

**Key words:** hepatocytes, cytotoxicity, cell culture, MTT test.

## РОЛЬ РАЗВЕТВЛЁННЫХ АМИНОКИСЛОТ В РАЗВИТИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

<sup>1</sup>Е.А. ЦАЙ, <sup>1</sup>В.Э. ЦОЙ, <sup>1</sup>Д.Н. КУРМАЕВА, <sup>1</sup>Ш.Ж. НУРИДДИНОВ,  
<sup>2</sup>З.Ю. ХАЛИМОВА, <sup>1</sup>Д.А. ДАЛИМОВА

<sup>1</sup>Центр передовых технологий;

<sup>2</sup>Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр эндокринологии имени академика Ё. Х. Туракулова

Автор для переписки: alenkatsay@gmail.com

Сахарный диабет 2 типа (СД2) – одно из наиболее распространённых хронических заболеваний, связанных с нарушением метаболизма глюкозы и инсулинорезистентностью. Разветвлённые (лейцин, изолейцин, валин) аминокислоты активно изучаются как потенциальные биомаркеры риска развития СД2. Их уровни в плазме крови ассоциированы с нарушениями метаболизма. В данной статье рассматриваются ключевые результаты исследований разветвленных аминокислот (BCAAs) и его связи с СД2.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа (СД2), разветвлённые аминокислоты (BCAAs), метаболические маркеры, инсулинорезистентность.

**Введение.** Сахарный диабет 2 типа (СД2) характеризуется нарушением регуляции углеводного, липидного и белкового обмена и является результатом нарушения секреции инсулина, резистентности к инсулину или комбинации того и другого. Из трех основных типов диабета СД2 встречается гораздо чаще (составляя более 90% всех случаев), чем сахарный диабет 1 типа (СД1) или гестационный диабет [1].

С 1990 по 2022 г. количество людей, живущих с диабетом, выросло с 200 миллионов до 830 миллионов человек [2].

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является мультифакторным заболеванием, развивающимся под влиянием генетической предрасположенности и факторов образа жизни. Ключевыми предикторами его возникновения являются инсулинорезистентность, нарушение углеводного обмена и хроническое воспаление, усугубляемое сопутствующими заболеваниями и воздействием некоторых лекарственных препаратов [3].

**Влияние образа жизни на риск развития СД2.** Одним из основных факторов риска СД2 является образ жизни. Среди наиболее значимых факторов можно выделить:

- Физическую неактивность и малоподвижный образ жизни, которые снижают чувствительность тканей к инсулину, способствуют накоплению висцерального жира и нарушению метаболизма глюкозы.
- Курение, связанное с повышенной инсулинорезистентностью и хроническим воспалением, что усугубляет метаболические нарушения.
- Чрезмерное употребление алкоголя, способствующее дисфункции печени, гипергликемии и нарушению секреции инсулина.
- Ожирение, являющееся причиной около 55% случаев СД2. Висцеральный жир играет ключевую роль в развитии инсулинорезистентности, провоцируя воспалительные процессы и нарушая работу бета-клеток поджелудочной железы [4].

**Заболевания, повышающие риск СД2.** Помимо образа жизни, существует ряд заболеваний, способствующих развитию или прогрессированию СД2:

- Артериальная гипертензия – связана с эндотелиальной дисфункцией и инсулинорезистентностью.
- Гиперлипидемия и метаболический синдром (синдром Ривена, синдром X) – комплекс метаболических нарушений, включающий ожирение, дислипидемию, гипертонию и инсулинорезистентность, является предшественником диабета.
- Эндокринные нарушения (акромегалия, синдром Кушинга, тиреотоксикоз, феохромоцитома) – влияют на углеводный обмен и могут повышать уровень глюкозы в крови.

- Хронический панкреатит и некоторые онкологические заболевания, которые приводят к дисфункции поджелудочной железы и снижению продукции инсулина [5].

**Влияние лекарственных препаратов на развитие СД2.** Некоторые лекарственные препараты способны повышать риск развития СД2 за счёт воздействия на углеводный обмен, инсулинорезистентность и функцию поджелудочной железы. Основные механизмы их действия включают:

- Увеличение массы тела, что приводит к усилению инсулинорезистентности.
  - Нарушение секреции инсулина, провоцирующее гипергликемию.
  - Снижение чувствительности тканей к инсулину, ухудшающее усвоение глюкозы.
- К лекарственным средствам, способствующим развитию СД2, относятся:
- Глюкокортикоиды (преднизолон, дексаметазон) – увеличивают уровень глюкозы в крови и снижают чувствительность тканей к инсулину.
  - Тиазидные диуретики (гидрохлоротиазид) – могут вызывать нарушения углеводного обмена.
  - Бета-блокаторы (атенолол, пропранолол) – снижают чувствительность тканей к инсулину и маскируют симптомы гипогликемии.
  - Атипичные антипсихотики (оланзапин, кветиапин) – увеличивают риск ожирения и нарушения углеводного обмена.
  - Ингибиторы протеазы, применяемые при ВИЧ, – способствуют инсулинорезистентности.
  - Оральные контрацептивы с высокой дозой эстрогенов – могут снижать толерантность к глюкозе.

При необходимости длительного применения таких препаратов рекомендуется регулярно контролировать уровень глюкозы в крови и обсуждать с врачом возможные меры по снижению риска СД2, включая коррекцию образа жизни и мониторинг метаболических показателей.

Таким образом, развитие СД2 обусловлено сочетанием генетических факторов, особенностей образа жизни, наличием сопутствующих заболеваний и воздействием медикаментов. Одним из наиболее эффективных методов профилактики является повышение физической активности, контроль массы тела и ранняя диагностика метаболических нарушений [6].

**Метаболические пути ВСАА.** ВСААs (лейцин, изолейцин и валин) – это три основные незаменимые аминокислоты. После поступления с пищей они всасываются в кишечнике через  $\text{Na}^+$ -зависимые транспортёры, затем попадают в кровь и транспортируются в клетки, главным образом через LAT1 и 4F2hc. Их деградация начинается с участия ферментов BCAT (BCAT1 в цитозоле, BCAT2 в митохондриях), которые превращают ВСААs в кетокислоты (BCKAs). Далее BCKAs перерабатываются комплексом BCKDH, состоящим из трёх субъединиц и использующим кофакторы, такие как тиаминпирофосфат и FAD. Комплекс *разветвлённо-цепочечной кетокислотной дегидрогеназы (BCKDH)* – это мультиферментный комплекс, который катализирует необратимый этап катаболизма разветвлённых аминокислот (лейцина, изолейцина и валина), превращая их в соответствующие разветвлённо-цепочечные ацил-КоА.

В дальнейшем продукты распада (изобутирил-КоА, 2-метилбутирил-КоА и изовалерил-КоА) включаются в цикл трикарбоновых кислот (ТСА), превращаясь в пропионил-КоА, ацетил-КоА или сукцинил-КоА. Этот процесс обеспечивает клетку энергией (NADH, FADH<sub>2</sub>) и может участвовать в синтезе жирных кислот, холестерина, кетоновых тел и глюкозы в зависимости от метаболических потребностей организма [7].

В отличие от большинства аминокислот, начальный этап катаболизма ВСАА не происходит в печени из-за низкой печеночной активности аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью (BCAT), первого фермента в пути катаболизма ВСАА. Поэтому ВСАА быстро увеличиваются в системном кровотоке после приема белка и легко доступны для внепеченочных тканей. Это явление дает уникальное преимущество формулам питания на основе ВСАА по сравнению с другими, особенно теми, которые нацелены на мышцы и мозг.

ВСАА служат субстратами для синтеза белка или производства энергии и выполняют несколько метаболических и сигнальных функций, в частности, посредством активации сигнального пути мишени рапамицина млекопитающих (mTOR).

Также ВСАА оказывают стимулирующее действие на синтез белка и ингибирующее действие на протеолиз. Эффекты реализуются самими ВСАА, особенно лейцином и их метаболитами. Лейцин стимулирует синтез белка через сигнальный путь mTOR и фосфорилирование факторов инициации трансляции и рибосомальных белков [8]. Роль в анаболическом действии белка лейцина играет так-

же его стимулирующее действие на секрецию инсулина [9]. Существуют тесные связи между ВСАА и уровнями глюкозы в плазме. Тот факт, что ВСАА повышают регуляцию транспортеров глюкозы и активируют секрецию инсулина, был широко продемонстрирован [10]. Однако несколько исследователей предположили, что чрезмерное потребление аминокислот может привести к ингибированию передачи сигналов инсулина [11].

**Роль ВСАА в метаболизме.** Аминокислоты с разветвленной цепью (ВСАА: изолейцин, лейцин, валин) являются незаменимыми аминокислотами, которые обычно присутствуют в богатых белком продуктах (например, красном мясе, птице, яйцах, рыбе и бобовых). Увеличение циркулирующих ВСАА натошак ранее связывали с риском диабета 2 типа [12].

ВСАА являются важными регуляторами метаболических процессов. Они не только участвуют в синтезе белка, регуляции сигнальных путей, таких как mTOR но и влияют на энергетический обмен. Однако их избыточное накопление в крови может быть связано с нарушением метаболического гомеостаза. Исследование Newgard et al. (2009) показало, что повышенные уровни ВСАА и их метаболитов коррелируют с инсулинорезистентностью у людей с ожирением. Авторы предположили, что ВСАА могут нарушать функцию митохондрий и способствовать накоплению токсичных метаболитов, таких как ацилкарнитины, что в конечном итоге приводит к снижению чувствительности к инсулину [13].

Высокопроизводительные методы метаболического профилирования выявили ВСАА как потенциальные биомаркеры риска диабета 2-го типа. Повышенные уровни ВСАА в плазме были связаны с ожирением, резистентностью к инсулину, нарушением толерантности к глюкозе и диабетом 2-го типа [14].

Исследования, направленные на изучение метаболизма, такие как работа Wang et al. (2011), продемонстрировали, что повышенные уровни ВСАА в плазме крови могут служить биомаркерами риска развития СД2. В данном исследовании было обнаружено, что у лиц с высоким уровнем ВСАА риск развития диабета был значительно выше, чем у тех, у кого уровни этих аминокислот были в норме. Из 2 422 обследованных людей без диабета у 201 человека развился диабет за 12 лет наблюдения. Их данные сравнивались с контрольной группой. В исследовании были выявлены ключевые метаболиты: **изолейцин, лейцин, валин, тирозин и фенилаланин** – данные аминокислоты оказались значимо связанными с риском развития диабета.

Метаболит	OR (на 1 стандартное отклонение)	P-значение
Изолейцин	1.70 (1.27–2.28)	0.0004
Лейцин	1.62 (1.20–2.17)	0.001
Валин	1.57 (1.17–2.09)	0.002
Фенилаланин	2.02 (1.40–2.92)	0.0002
Тирозин	1.85 (1.35–2.55)	0.0001

Как видно из таблицы, все пять аминокислот (изолейцин, лейцин, валин, фенилаланин и тирозин) статистически значимо связаны с риском развития диабета. Их P-значения <0.05, что подтверждает, что эта связь не случайна. Авторы предположили, что ВСАА могут быть не только маркерами, но и активными участниками патогенеза СД2 [15].

Исследования показывают, что уровни ВСААs и АААs (ароматические аминокислоты) могут предсказывать риск T2D задолго до клинической диагностики. Так, например, Rivas-Tumanyan et al. (2024) выявили, что у пуэрториканцев повышенные уровни лейцина, валина и тирозина ассоциированы с ухудшением инсулинорезистентности и повышенным риском диабета на 46%. В этом анализе они обнаружили сильные ассоциации между базовыми метаболитами ВСАА и ААА и диабетом 2 типа на исходном уровне и при последующем наблюдении, подтверждая их потенциальную прогностическую роль в развитии диабета среди пуэрториканцев [16]. Также Chen et al. (2016) продемонстрировали, что у китайцев уровни ВСААs/АААs лучше предсказывают риск диабета, чем традиционные метаболические маркеры, такие как глюкоза натошак [17].

**Заключение.** Современные методы выявления метаболических маркеров позволяют на основе метаболического профиля применять превентивные методы, снизить риск развития сахарного диабета 2 типа и улучшить раннюю диагностику. Исследования ВСААs показывают, что их уровни мо-

гут служить надежными индикаторами метаболических нарушений, позволяя врачам адаптировать стратегии профилактики и лечения. В разных популяциях влияние ВСААs на риск диабета может отличаться, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований и персонализированного подхода к медицинскому мониторингу. Будущие работы должны сосредоточиться на интеграции этих данных в клиническую практику, что поможет разработать эффективные стратегии предотвращения и управления диабетом 2 типа.

**Вклад авторов.** Ц.В.Э., К.Д.Н., Н.Ш.Ж. – проводили поиск и анализ актуальных статей, Е.А.Ц – концептуализация, написание и редактирование статьи, Х.З.Ю., Д.Д.А. - координировали работу и редактировали окончательный текст.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ralph A. DeFronzo, Ele Ferrannini, Leif Groop, Robert R. Henry, William H. Herman, Jens Juul Holst, Frank B. Hu, C. Ronald Kahn, Itamar Raz, Gerald I. Shulman, Donald C. Simonson, Marcia A. (2015) *Type 2 diabetes mellitus. Testa & Ram Weiss. Nature Reviews Disease Primers volume 1*, Article number: 15019
2. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
3. Alberti, K. G. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *The Lancet*, 366(9491), 1059-1062.
4. Бутрова С. А., Плохая А. А. Ожирение и сахарный диабет: общность этиологии и профилактики // Сахарный диабет. – 2005. – №. 3. – С. 45-50. // Butrova S. A., Plokhaya A. A. Ozhireniye i sakharnyy diabet: obshchnost' etiologii i profilaktiki. *Sakharnyy diabet*. №. 3. – С. 45-50.
5. Евсеев, А. Б. (2019). Факторы риска развития сахарного диабета 2-го типа. *International Journal of Medicine and Psychology*, 2(4), 15-21. // Yevseyev, A. B. (2019). Faktory riska razvitiya sakharnogo diabeta 2-go tipa. *International Journal of Medicine and Psychology*, 2(4), 15-21
6. Остроумова, О. Д., Акимова, Е. С., & Кочетков, А. И. (2019). Лекарственно-индуцированная гипергликемия. *Клиническая фармакология и терапия*. 28(2), 65-69 // Ostroumova, O. D., Akimova, Ye. S., & Kochetkov, A. I. (2019). Lekarstvenno-indutsirovannaya giperglikemiya. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 28(2), 65-69
7. Choi, B. H., Hyun, S., & Koo, S. H. (2024). The role of BCAA metabolism in metabolic health and disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(7), 1552-1559.
8. Nair, K. S., & Short, K. R. (2005). Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *The Journal of nutrition*, 135(6), 1547S-1552S.
9. Floyd, J. C., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F., & Rull, J. (1966). Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of clinical investigation*, 45(9), 1487-1502.
10. Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., & Qiao, S. (2017). Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 8, 1-12.
11. Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., & Marette, A. (2007). Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu. Rev. Nutr.*, 27(1), 293-310.
12. Zhao, X., Han, Q., Liu, Y., Sun, C., Gang, X., & Wang, G. (2016). The relationship between branched-chain amino acid related metabolomic signature and insulin resistance: a systematic review. *Journal of diabetes research*, 2016(1), 2794591.
13. Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Svetkey, L. P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism*, 9(4), 311-326.
14. Roberts, L. D., Koulman, A., & Griffin, J. L. (2014). Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2(1), 65-75.
15. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS et al (2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17:448–453
16. Rivas-Tumanyan, S., Pacheco, L. S., Haslam, D. E., Morou-Bermudez, E., Liang, L., Tucker, K. L., Bhupathiraju, S. N. (2024). Branched-Chain and Aromatic Amino Acids, Type 2 Diabetes, and Cardiometabolic Risk Factors among Puerto Rican Adults. *Nutrients*, 16(15), 2562.
17. Chen T. et al (2016). Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations. *Scientific reports*, 6(1), 20594

## 2-TOIFA QANDLI DIABET RIVOJLANISHIDA TARMOQLANGAN ZANJIRLI AMINOKISLOTALARNING ROLI

Y.A. Say, V.E. Soy, D.N. Kurmaeva, Sh.J. Nuriddinov, Z.Yu. Xalimova, D.A. Dalimova

2-toifa diabetes mellitus (T2DM) glyukoza almashinuvi va insulin qarshiligining buzilishi bilan bogʻliq boʻlgan eng keng tarqalgan surunkali kasalliklardan biridir. Tarmoqlangan zanjirli aminokislotalar (leysin, izolösin, valin) T2DM rivojlanish xavfining potentsial biomarkerlari sifatida faol oʻrganilmoqda. Ularning plazma darajasi metabolik kasalliklar bilan bogʻliq. Ushbu maqola tarmoqlangan zanjirli aminokislotalar (BCAA) va uning T2DM bilan aloqasi boʻyicha asosiy tadqiqot natijalarini koʻrib chiqadi.

**Kalit soʻzlar:** T2DM, tarmoqlangan zanjirli aminokislotalar (BCAA), metabolik belgilar, 2-toifa diabet, insulin qarshiligi.

## THE ROLE OF BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS IN THE DEVELOPMENT OF TYPE 2 DIABETES

E.A. Tsay, V.E. Tsoy, D.N. Kurmaeva, Sh.J. Nuriddinov, Z.Yu. Xalimova, D.A. Dalimova

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is one of the most common chronic diseases associated with impaired glucose metabolism and insulin resistance. Branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, valine) are actively studied as potential biomarkers of T2DM risk. Their plasma levels are associated with metabolic disorders. This article reviews key findings from studies of branched-chain amino acids (BCAAs) and their association with T2DM.

**Keywords:** T2DM, branched-chain amino acids (BCAAs), metabolic markers, type 2 diabetes, insulin resistance.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ИНФЕКЦИИ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 С ВЫКИДЫШЕМ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ АНКЕТИРОВАНИЯ

А.А. АБДУРАХИМОВ<sup>1,2</sup>, Ю.А. КАПРАЛОВА<sup>1,2</sup>, З.М. МИРАКБАРОВА<sup>1,4</sup>, А.И. РАХМАТУЛЛАЕВ<sup>1,2</sup>,  
М.Б. НАЗИРОВА<sup>1</sup>, Г.Г. АТАМУРОВА<sup>1</sup>, Ш.О. РАХМАТОВА<sup>5</sup>, Ф.П. НИШАНОВА<sup>3</sup>,  
А.А. АБДУЛЛАЕВ<sup>3</sup>, Ш.У. ТУРДИКУЛОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт Биофизики и биохимии при Национальном Университете Узбекистана, Ташкент;

<sup>2</sup>Центр передовых технологий, Ташкент;

<sup>3</sup>Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр  
Акушерства и Гинекологии МЗ РУз;

<sup>4</sup>Центральноазиатский университет, Ташкент;

<sup>5</sup>Национальный Университет Узбекистана

Автор для переписки: malikova.yu@mail.ru

Изучена связь между инфекцией SARS-CoV-2 и ранними выкидышами у женщин с привычными потерями беременности в Узбекистане. Анализ данных 1826 женщин показал, что 37,15% (81 из 218) пациенток с привычными выкидышами перенесли COVID-19. В анамнезе зарегистрировано 165 случаев потери беременности. Различия с контрольной группой статистически значимы ( $\chi^2 = 32,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ). Пик заражений пришелся на 2021–2022 годы (73% случаев). Установлено, что COVID-19 во время беременности повышает риск выкидыша ( $\chi^2 = 17,8$ ;  $p = 0,0005$ ); а женщины с привычными выкидышами на ранних сроках беременности в анамнезе заражались SARS-CoV-2 значительно чаще, чем другие беременные ( $\chi^2 = 23,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ).

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, COVID-19, выкидыш.

**Введение.** SARS-CoV-2 появился как новый коронавирус в конце 2019 года, быстро распространяясь и вызывая глобальную пандемию связанного с ним заболевания COVID-19 [1]. Коронавирусы – это большое семейство вирусов, принадлежащих к семейству Coronaviridae, известное с 1960 года как вызывающее респираторные инфекции у человека и животных [2]. Эти патогены видны при электронной микроскопии в виде кругов с шипами, которые заканчиваются мелкими каплями, появляющимися на его поверхности, по форме, напоминающей корону [3]. SARS-CoV-2 состоит из одной нити положительной РНК (рибонуклеиновой кислоты), окруженной липопротеиновой вирусной оболочкой, в которой расположен S-белок, активированный клеточной протеазой. Белок S способствует проникновению вируса в клетки-мишени, связываясь с клеточным рецептором, ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2). Этот фермент является ключевым элементом пути ренин-ангиотензин, который регулирует гемостаз и артериальное давление. Однако рецептор ACE-2 высоко экспрессируется в тонком кишечнике, мужской и женской репродуктивной системе, почках, сердце и щитовидной железе, умеренно экспрессируется в легких, печени, мочевом пузыре, толстой кишке и надпочечниках и немного в мозге, селезенке, костном мозге и клетках крови [4].

Коронавирусная инфекция прошла волной во всем слоям населения, в том числе и беременным, приводя ко многим осложнениям, таким как выкидыши, гестозы, преэклампсии, преждевременные роды, мертворождения [5], [6]. Во время любой эпидемии беременные женщины представляют собой чрезвычайно чувствительную группу из-за физиологических и иммунологических изменений, которые делают их более восприимчивыми к инфекции, а также более тяжелой инфекции [7]. Многочисленные вирусы вызывают воспаление ворсин хориона и самопроизвольные аборт [8]. Первичный рецептор SARS-CoV-2, АПФ2, экспрессируется в различных типах плацентарных клеток, включая трофобласты и синцитиотрофобласты. Эти клетки являются важнейшими компонентами плацентарного барьера и играют важную роль в обмене питательных веществ и производстве гормонов [9]. При инфицировании вирусом этих клеток происходит воспаление плаценты, повреждение сосудов и тромботические события, которые могут повлиять на здоровье плода [10]. При изучении плаценты матерей, инфицированных SARS-CoV-2 часто обнаруживается мальперфузия сосудов, фибриноидный некроз и гипертрофия артериол амниотической мембраны, а также отмечаются интрамуральные, неокклюзионные тромбы [11], приводящие к недостатку кровоснабжения и

гибели плода [12].

Таким образом, COVID-19 во время беременности, стал предметом многих исследований, в которых изучались любые потенциальные неблагоприятные эффекты [13]. Поскольку и сам вирус, и сведения о его эффектах постоянно развиваются, влияние вируса на исходы беременности весьма неоднозначны. Некоторые связывают его с повышенным риском потери беременности [14], [15], [16], в то время как другие пришли к выводу об отсутствии связи заболевания COVID-19 с осложнениями беременности [17], [18]. А значение коронавирусной инфекции у женщин с привычными потерями беременности малоизучено, в связи с этим целью данного исследования было выяснить, существует ли связь между инфекцией SARS-CoV-2 и ранним выкидышем среди женщин с привычными потерями беременности в Узбекистане.

#### **Материалы и методы.**

В Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре акушерства и гинекологии были собраны анкетные данные и образцы периферической крови 1826 женщин, давших информированное согласие. Анкета состояла из 144 вопросов, включавших информацию о заражении SARS-CoV-2 в период беременности с 2020 по 2023 годы.

Женщины были разделены на три группы. В первую группу вошли 218 женщин с привычными выкидышами (два и более выкидышей). Вторую, контрольную, составили 750 женщин, прошедших через естественные роды. А 858 женщин, у которых были случаи выкидыша, но также имеются здоровые дети, выделили в третью группу.

Возраст женщин 1-й группы с выкидышами составлял от 17 до 47 лет (средний возраст  $26,58 \pm 0,8$ ; медиана 25,75), в то время как в контрольной группе он варьировался от 19 до 52 лет (средний возраст  $22,43 \pm 0,3$ ; медиана 21,43). В исследование включали женщин без тяжелых соматических заболеваний, хронических урогенитальных инфекций и аномалий развития внутренних половых органов.

Статистический анализ проводился с использованием Excel-2019 и критерия Фишера. Статистически значимыми считались результаты при  $p \leq 0,05$ .

#### **Результаты и их обсуждение.**

Согласно анкетным данным, у 81 из 218 женщин с привычными выкидышами (37,15%) был диагностирован COVID-19. Эти женщины перенесли 165 случаев потерь беременности. В период с 2020 по 2023 годы частота выкидышей среди женщин с COVID-19 составила 16% в 2020 г., 23% - в 2021 г., 38% - в 2022 г. и 24% в 2023 г., что было выше по сравнению с контрольной группой (11%, 10%, 6% и 18% соответственно). Различия оказались статистически значимыми ( $\chi^2 = 32,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ).

Метанализы показали, что у беременных женщин COVID-19 часто протекает бессимптомно [19], [20]. Однако влияние бессимптомных или легких инфекций на ранние выкидыши изучено недостаточно.

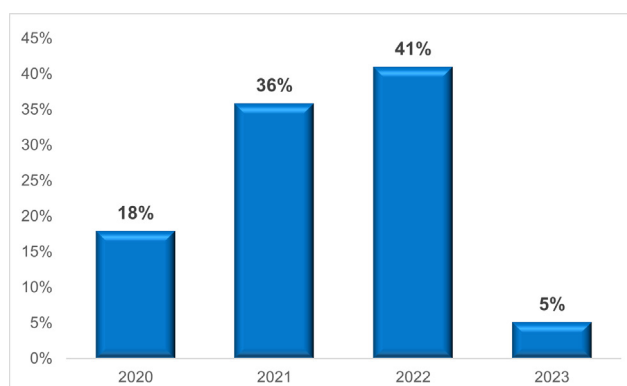
Согласно отчетам британской системы наблюдения за акушерскими случаями (UK Obstetric Surveillance System), 99% госпитализированных беременных с симптомами COVID-19 не были вакцинированы [21].

Есть косвенные доказательства вовлеченности плаценты при инфекции SARS-CoV-2, что может объяснить связь между ранним выкидышем и COVID-19 [22].

При анализе анкетных данных установлено, что в группе женщин, перенесших выкидыш во время пандемии COVID, 13 женщин были инфицированы данной инфекцией, и у них зафиксировано в общей сложности 42 случая выкидыша. Из этих случаев 18% приходятся на 2020 год (период начала пандемии), 36% – на 2021 год, а 41% – на 2022 год (рис.).

Из этих случаев 95 % (38 случаев) приходятся на 2020–2022 годы, когда пандемия COVID-19 была наиболее интенсивной. Установлено, что заражение COVID-19 во время беременности повышает риск выкидыша ( $\chi^2 = 17,8$ ;  $p = 0,0005$ ). Установлено, что женщины с привычными выкидышами в анамнезе на ранних сроках беременности заражались SARS-CoV-2 значительно чаще, чем другие беременные ( $\chi^2 = 23,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ).

Множество исследований о SARS-CoV-2 у беременных сосредотачиваются на госпитализированных женщинах с тяжелыми формами инфекции во второй половине второго и в третьем триместрах [23], [24], [25].



Случаи заражения SARS-CoV-2 во время беременности у женщин с выкидышами (2020–2023 годы).

Исследование Sacinti et al. сравнило частоту выкидышей за 13-недельный период в 2019 и 2020 годах. Выяснилось, что частота выкидышей увеличилась на 25 % во время пандемии SARS-CoV-2, с общим уровнем в 11,8 % [26]. Этот вывод согласуется с нашим наблюдением, что инфекция SARS-CoV-2 увеличивает риск потери беременности.

**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.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. van Baar, J. A. C., Kostova, E. B., Allotey, J., Thangaratinam, S., Zamora, J. R., Bonet, M. PregCOV-19 Living Systematic Review Consortium. (2024). COVID-19 in pregnant women: a systematic review and meta-analysis on the risk and prevalence of pregnancy loss. *Human Reproduction Update*, 30(2), 133–152. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmad030>
2. Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
3. Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., ... Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>
4. Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., ... Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
5. Soheili, M., Moradi, G., Baradaran, H. R., Soheili, M., Mokhtari, M. M., & Moradi, Y. (2022). Clinical manifestation and maternal complications and neonatal outcomes in pregnant women with COVID-19: a comprehensive evidence synthesis and meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 35(25), 5672–5685. <https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1888923>
6. Juan, J., Gil, M. M., Rong, Z., Zhang, Y., Yang, H., & Poon, L. C. (2020). Effect of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on maternal, perinatal and neonatal outcome: systematic review. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 56(1), 15–27. <https://doi.org/10.1002/uog.22088>
7. Chen, H., Guo, J., Wang, C., Luo, F., Yu, X., Zhang, W., ... Zhang, Y. (2020). Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet*, 395(10226), 809–815. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30360-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30360-3)
8. Kim, C. J., Romero, R., Chaemsaitong, P., & Kim, J.-S. (2015). Chronic Inflammation of the Placenta: Definition, Classification, Pathogenesis, and Clinical Significance. *American journal of obstetrics and*

- gynecology*, 213(4 Suppl), S53–S69. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.08.041>
9. Gengler, C., Dubruc, E., Favre, G., Greub, G., de Leval, L., & Baud, D. (2021). SARS-CoV-2 ACE-receptor detection in the placenta throughout pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(3), 489–490. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.049>
  10. Fakhri, S., Nouri, Z., Moradi, S. Z., Akkol, E. K., Piri, S., Sobarzo-Sánchez, E., ... Echeverría, J. (2021). Targeting Multiple Signal Transduction Pathways of SARS-CoV-2: Approaches to COVID-19 Therapeutic Candidates. *Molecules*, 26(10), 2917. <https://doi.org/10.3390/molecules26102917>
  11. Baergen, R. N., & Heller, D. S. (2020). Placental Pathology in Covid-19 Positive Mothers: Preliminary Findings. *Pediatric and Developmental Pathology*, 23(3), 177–180. <https://doi.org/10.1177/1093526620925569>
  12. Wichmann, D. (2020). Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. *Annals of Internal Medicine*, 173(12), 1030. <https://doi.org/10.7326/L20-1206>
  13. Kazemi, S. N., Hajikhani, B., Didar, H., Hosseini, S. S., Haddadi, S., Khalili, F., ... Nasiri, M. J. (2021). COVID-19 and cause of pregnancy loss during the pandemic: A systematic review. *PLOS ONE*, 16(8), e0255994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255994>
  14. Hazari, K. S., Abdeldayem, R., Paulose, L., Kurien, N., Almahloul, Z., Mohammad, H., ... Bayoumi, R. (2021). Covid-19 infection in pregnant women in Dubai: a case-control study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21(1), 658. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04130-8>
  15. Rodríguez, L. G., Cuesta, A. B. O., Pumar, M. I. P., Ferriols-Pérez, E., Carulla, R. P., Vega, R. B., ... Martínez-Pérez, O. (2022). SARS-CoV-2 infection in early first-trimester miscarriages: a prospective observational study. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(1), 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.09.010>
  16. Wei, S. Q., Bilodeau-Bertrand, M., Liu, S., & Auger, N. (2021). The impact of COVID-19 on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*, 193(16), E540–E548. <https://doi.org/10.1503/cmaj.202604>
  17. Cavalcante, M. B., de Melo Bezerra Cavalcante, C. T., Cavalcante, A. N. M., Sarno, M., Barini, R., & Kwak-Kim, J. (2021). COVID-19 and miscarriage: From immunopathological mechanisms to actual clinical evidence. *Journal of Reproductive Immunology*, 148, 103382. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103382>
  18. D'Antonio, F., Sen, C., Mascio, D. D., Galindo, A., Villalain, C., Herraiz, I., ... On the behalf of the World Association of Perinatal Medicine working group on coronavirus disease 2019. (2021). Maternal and perinatal outcomes in high compared to low risk pregnancies complicated by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection (phase 2): the World Association of Perinatal Medicine working group on coronavirus disease 2019. *American journal of obstetrics & gynecology MFM*, 3(4), 100329. <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2021.100329>
  19. Allotey, J., Stallings, E., Bonet, M., Yap, M., Chatterjee, S., Kew, T., ... for PregCOV-19 Living Systematic Review Consortium. (2020). Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 370, m3320. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3320>
  20. Crovetto, F., Crispi, F., Llorba, E., Figueras, F., Gómez-Roig, M. D., & Gratacós, E. (2020). Seroprevalence and presentation of SARS-CoV-2 in pregnancy. *Lancet (London, England)*, 396(10250), 530–531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31714-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31714-1)
  21. Vousden, N., Ramakrishnan, R., Bunch, K., Morris, E., Simpson, N. A. B., Gale, C., ... Knight, M. (2022). Severity of maternal infection and perinatal outcomes during periods of SARS-CoV-2 wildtype, alpha, and delta variant dominance in the UK: prospective cohort study. *BMJ medicine*, 1(1), e000053. <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2021-000053>
  22. Balachandren, N., Davies, M. C., Hall, J. A., Stephenson, J. M., David, A. L., Barrett, G., ... Mavrellos, D. (2022). SARS-CoV-2 infection in the first trimester and the risk of early miscarriage: a UK population-based prospective cohort study of 3041 pregnancies conceived during the pandemic. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 37(6), 1126–1133. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac062>
  23. Khalil, A., Kalafat, E., Benlioglu, C., O'Brien, P., Morris, E., Draycott, T., ... Magee, L. A. (2020). SARS-CoV-2 infection in pregnancy: A systematic review and meta-analysis of clinical features and pregnancy outcomes. *EClinicalMedicine*, 25, 100446. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100446>

24. Knight, M., Bunch, K., Vousden, N., Morris, E., Simpson, N., Gale, C., ... UK Obstetric Surveillance System SARS-CoV-2 Infection in Pregnancy Collaborative Group. (2020). Characteristics and outcomes of pregnant women admitted to hospital with confirmed SARS-CoV-2 infection in UK: national population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m2107. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2107>
25. Pierce-Williams, R. A. M., Burd, J., Felder, L., Khoury, R., Bernstein, P. S., Avila, K., ... Berghella, V. (2020). Clinical course of severe and critical coronavirus disease 2019 in hospitalized pregnancies: a United States cohort study. *American journal of obstetrics & gynecology MFM*, 2(3), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2020.100134>
26. Sacinti, K. G., Kalafat, E., Sukur, Y. E., & Koc, A. (2021). Increased incidence of first-trimester miscarriage during the COVID-19 pandemic. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 57(6), 1013–1014. <https://doi.org/10.1002/uog.23655>

#### SARS-COV-2 KORONAVIRUS INFEKSIYASINING HOMILADORLIKNING TUSHISHI BILAN BOG'LIQLIGI BO'YICHA SO'ROVNOMA MA'LUMOTLARIGA ASOSLANGAN TADQIQOT

A.A. Abdurahimov, Yu.A. Kapralova, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rahmatullaev, M.B. Nazirova, G.G. Atamurotova, Sh.O. Rahmatova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev, Sh.U. Turdikulova

O'zbekistonda homila tushish bilan SARS-CoV-2 infeksiyasi o'rtasidagi bog'liqlikni o'rganildi. 1826 nafar ayollarning ma'lumotlari tahlil qilindi. Odatiy homila tushish holati bo'lgan bemorlarning 37,15% (218 nafardan 81 tasida) COVID-19 infeksiyasini boshidan kechirgan. Ularning anamnezida 165 ta homila yo'qotish holati qayd etilgan. Nazorat guruhi bilan farqlar statistik jihatdan ishonchli ( $\chi^2 = 32,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ) deb topildi. Kasallanish avji 2021–2022 yillarga to'g'ri kelgan (73% holat). Homiladorlik davridagi COVID-19 infeksiyasi homila tushish xavfini oshirishi tasdiqlangan ( $\chi^2 = 17,8$ ;  $p = 0,0005$ ). Aniqlanishicha, homilasi tushgan ayollarda homiladorlikning dastlabki uch oyida SARS-CoV-2 bilan infeksiyalanishi boshqa homilador ayollarga qaraganda ko'proq bo'lgan va SARS-CoV-2 homila tushishiga xavf omil ekanligi tasdiqlandi ( $\chi^2 = 23,8$ ;  $p \leq 0,0001$ ).

**Kalit so'zlar:** SARS-CoV-2, COVID-19, homilaning tushishi.

#### STUDY OF THE CORRELATION BETWEEN SARS-COV-2 CORONAVIRUS INFECTION AND MISCARRIAGE BASED ON QUESTIONNAIRE DATA

A.A. Abdurakhimov, Yu.A. Kapralova, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rakhmatullaev, M.B. Nazirova, G.G. Atamurotova, Sh.O. Rakhmatova, F.P. Nishanova, A.A. Adullaev, Sh.U. Turdikulova

It has examined the association between SARS-CoV-2 infection and early miscarriages in women with recurrent pregnancy loss in Uzbekistan. An analysis of data from 1,826 women showed that 37.15% (81 out of 218) of patients with recurrent miscarriages had COVID-19. They had a history of 165 pregnancy losses. The differences with the control group were statistically significant ( $\chi^2 = 32.8$ ;  $p \leq 0.0001$ ). The peak of infections occurred in 2021–2022 (73% of cases). COVID-19 during pregnancy was found to increase the risk of miscarriage ( $\chi^2 = 17.8$ ;  $p = 0.0005$ ). Women with a history of recurrent miscarriage in early pregnancy were infected with SARS-CoV-2 significantly more often than other pregnant women ( $\chi^2 = 23.8$ ;  $p \leq 0.0001$ ).

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, miscarriage.

## ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ И АТФ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТОВ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС

Г.В. МАКСИМЧЕВА<sup>1</sup>, Х.Р. РУСТАМОВ<sup>2</sup>, Р.З. САБИРОВ<sup>1</sup>, А.Ю. БАЕВ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики и биохимии при НУУз им. М. Улугбека;

<sup>2</sup>Центр передовых технологий;

<sup>3</sup>Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека

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

Известно, что неорганические полифосфаты (поли-Ф) могут выделяться из активированных тромбоцитов и участвовать в межклеточном сигналировании через активацию пуринергических и других рецепторов. В связи с тем, что поли-Ф регулярно появляются в кровяном русле и могут контактировать с окружающими клетками, в том числе и с клетками сердца, нами было изучено влияние внеклеточных поли-Ф на сократительную активность неонатальных кардиомиоцитов. Было обнаружено, что при добавке поли-Ф клетки из одной популяции могут отвечать как повышением частоты клеточных сокращений (ЧКС) и их амплитуды, так и понижением. При этом, схожие ответы наблюдались и при добавке АТФ. Сравнительный анализ показал, что при добавке АТФ наблюдалась тенденция к увеличению ЧКС и амплитуды сокращений, тогда как добавка поли-Ф приводила к снижению ЧКС и амплитуды.

**Ключевые слова:** Неорганические полифосфаты, АТФ, сокращение кардиомиоцитов.

Неорганические полифосфаты (поли-Ф) – это гомополимеры, состоящие из остатков ортофосфорной кислоты. Поли-Ф являются естественными внутриклеточными метаболитами, которые внутри клетки участвуют в процессах клеточной биоэнергетики [1, 2], стабилизируют третичную структуру белка посредством шаперонной активности [3, 4]. В то же время было показано, что поли-Ф могут выбрасываться из астроцитов и тромбоцитов и участвовать во внеклеточных процессах в качестве сигнальной молекулы [5, 6]. Ранее показывалось, что поли-Ф могут выделяться из активированных тромбоцитов крови во время процесса тромбообразования [6]. Помимо участия в самом тромбообразовании, поли-Ф активно взаимодействует со всеми клетками, которые имеются в кровотоке или же выстилают стенки кровеносных сосудов посредством активации различных сигнальных путей, в том числе через активацию P2Y<sub>1</sub> пуринорецепторов [6, 7]. В связи с тем, что поли-Ф выделяются в кровь на постоянной основе и могут потенциально оказывать влияние на сократительную активность сердца, в своей работе мы решили оценить влияние экзогенного поли-Ф на сократительную активность первичных кардиомиоцитов, выделенных из сердец неонатальных крысят, а также сравнить эффект поли-Ф с эффектом экзогенного АТФ – естественного агониста пуринорецепторов.

### Материалы и методы.

Все эксперименты 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 ВЕС/IBV-NUU/2024/12-1.

Для работы использовался сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), следующего состава (в мМ) 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 Глюкоза, 10 HEPES, pH доводилась до значений 7,35 при помощи NaOH.

Выделение и культивирование первичных кардиомиоцитов проводили при помощи набора для выделения первичных кардиомиоцитов Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, США; кат. номер 88281) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, изолированные сердца неонатальных крыс измельчали на мелкие кусочки 1–3 мм. Полученные фрагменты ткани инкубировали в растворе ферментов в течение 30–35 мин при постоянном перемешивании при 37°C. После инкубации, надосадочную жидкость, содержащую фермент, удаляли, оставшиеся фрагменты промывали дважды ледяным сбалансированным солевым раствором Хэнкса. Далее, фрагменты аккуратно размельчали пипетированием в среде ДМЕМ с добавлением 10% FBS (эмбриональной бычьей сыворотки) и 1% раствора антибиотиков (Pen-strep). Полученную суспензию клеток высевали на покровные стекла

3×10 мм и инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Через 24 часа заменяли среду на аналогичную, содержащую добавку для роста кардиомиоцитов, предусмотренную протоколом для выделения.

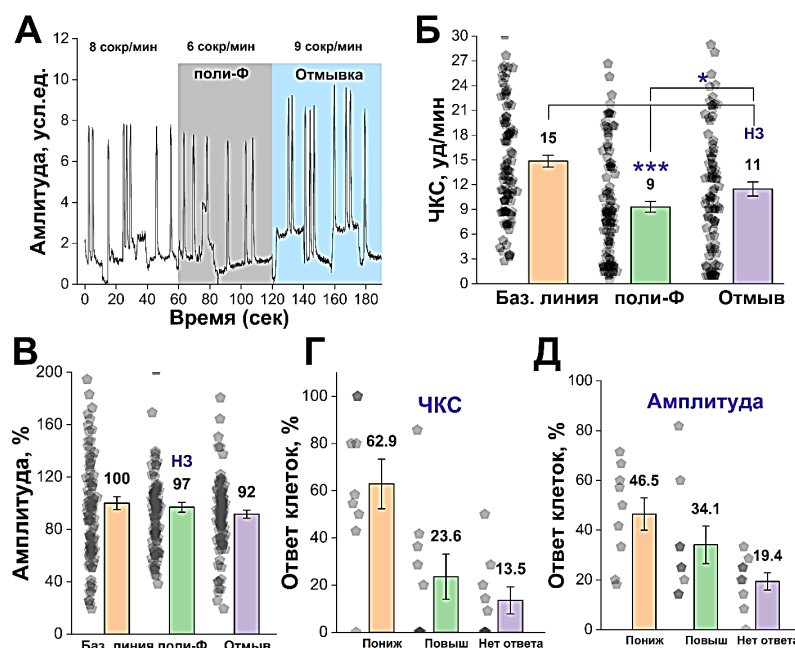
Регистрацию спонтанных сокращений вели с помощью техники видеомикроскопии в сочетании с программным обеспечением для анализа изображений. Видеозапись эксперимента проводили с помощью камеры смартфона Redmi Note 12 Pro в режиме замедленной съемки, непосредственно с экрана микроскопа EVOS XL lite (Life Technologies). Съемку эксперимента вели непрерывно до и после добавления веществ в проточную ячейку с клетками. Далее, видеозаписи в формате MP4 конвертировали в формат “.avi” и уменьшали плотность записи до 12 кадров в секунду с помощью скрипта Python ([https://github.com/KhondamirRustamov/imaging/blob/main/video\\_sampler.ipynb](https://github.com/KhondamirRustamov/imaging/blob/main/video_sampler.ipynb)).

Частоту сокращений также контролировали и определяли визуально. Цифровую обработку фрагментов записей проводили программой ImageJ 1.52 (NIH, LOCI, Университет Висконсин, США) и плагина Myocyter v.1.3 [8]. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Origin Pro 2024 (Microcal Software Inc., Northampton MA). Статистическую значимость отличий оценивали при помощи метода ANOVA и критерия Фридмана, для зависимых выборок, не отвечающих нормальному распределению. Отличия считались статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка, для n экспериментов.

### Результаты и их обсуждение.

На 3 сутки после выделения, неонатальные кардиомиоциты крыс приобретали способность к спонтанным сокращениям. При этом, на 4-е сутки число спонтанно сокращающихся клеток составляло более 50% от общего числа клеток. Поэтому наши эксперименты проводили на 4-е сутки после выделения, и анализ данных проводили только на сокращающихся клетках.

Кардиомиоциты помещали в сбалансированный солевой раствор Хэнкса, где клетки сохраняли способность к сокращению, и производили запись эксперимента. В наших экспериментах, сокращение кардиомиоцитов варьировало от 3 до 30 раз в минуту, однако для большинства клеток средние показатели сокращения составляли  $14,9 \pm 0,7$  раз в минуту (рисунок 1 А, Б).

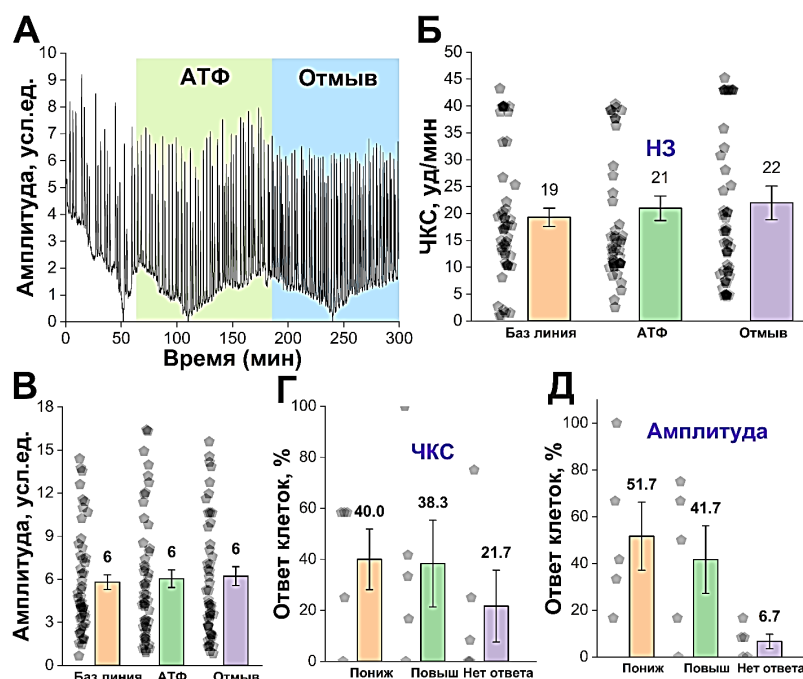


**Рис. 1.** Влияние поли-Ф на сократительную активность кардиомиоцитов. **А.** Репрезентативная запись экспериментов; **Б.** Добавка поли-Ф в концентрации 10 μM приводит к снижению частоты клеточных сокращений кардиомиоцитов; **В.** Влияние поли-Ф на амплитуду клеточных сокращений; **Г-Д.** Процентное соотношение 3-х субпопуляций клеток, разделенных в зависимости от типа изменений ЧКС и амплитуды, вызванных добавкой поли-Ф. N=21, n=99 (N – количество чашек, n – количество клеток, которые вошли в статистику. В статистику вошли эксперименты от 10-ти независимых клеточных выделений). Численные значения средних величин указаны над столбиками диаграмм. \*\*\* –  $p \leq 0,001$ , \* –  $p \leq 0,05$ , НЗ – не значительно.

Добавка поли-Ф (для работы использовался поли-Ф, содержащий 100 остатков ортофосфорной кислоты) в концентрации 10  $\mu\text{M}$  достоверно приводила к снижению частоты клеточных сокращений (ЧКС) в среднем на 40 %, но не амплитуды сокращений (рисунок 1 Б и В). Последующая отмывка клеток от поли-Ф приводила к восстановлению ЧКС до значений базовой линии (рисунок 1 Б). При анализе данных мы обнаружили, что ответы клеток на добавку поли-Ф неоднородны. Нами было обнаружено, что при добавке поли-Ф существует 3 субпопуляции клеток, отвечающих по-разному на добавку поли-Ф. Нами было обнаружено, что большая часть субпопуляции клеток отвечала понижением ЧКС и амплитуды (рисунок 1 Г и Д). Однако присутствовали клетки, которые отвечали повышением ЧКС и амплитуды и клетки, которые не реагировали на добавку поли-Ф (в данную субпопуляцию клеток входили клетки, ответы которых, после добавки поли-Ф, варьировали в пределах 5 % от базовой линии) (рисунок 1 Г и Д).

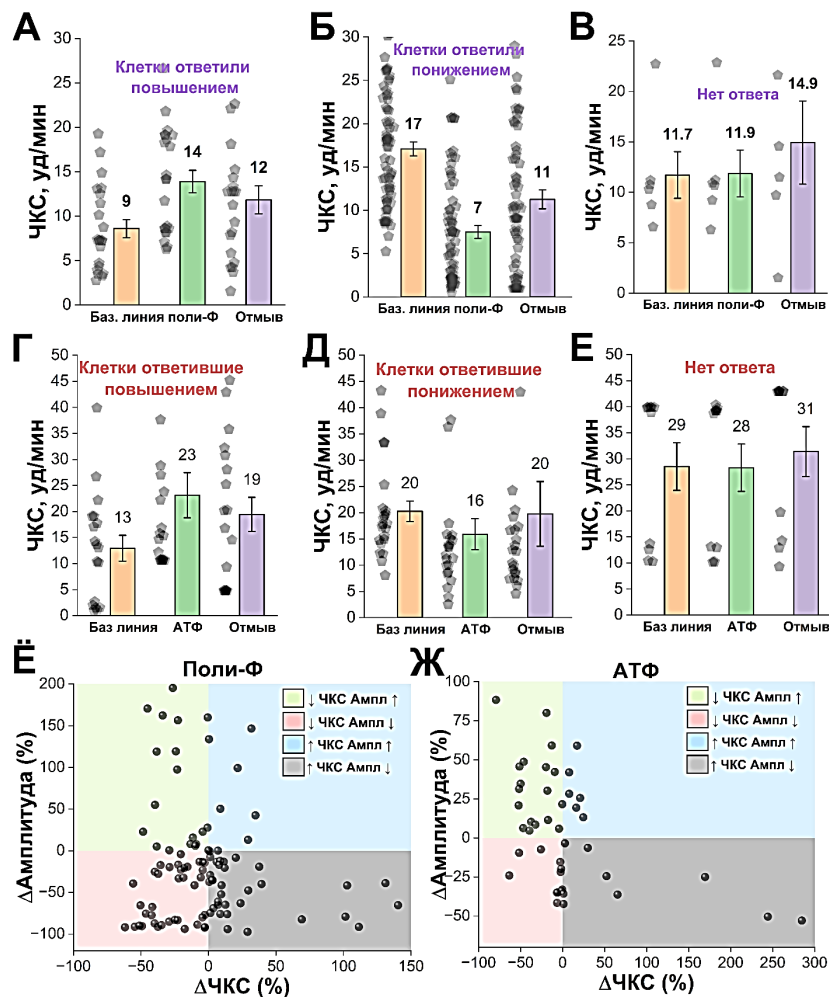
В следующей серии экспериментов мы оценили влияние внеклеточного АТФ в концентрации 10  $\mu\text{M}$  на ЧКС и амплитуду сокращений кардиомиоцитов. Добавка АТФ приводила к незначительному увеличению ЧКС и не оказывала влияния на амплитуду сокращений кардиомиоцитов (рисунок 2 А-В). Последующий анализ, как и в случае с поли-Ф, выявил 3 субпопуляции клеток, различавшихся по ответам, однако если в случае с поли-Ф преобладала субпопуляция клеток с понижением ЧКС, то в случае с АТФ 2 субпопуляции клеток (отвечавшие понижением и повышением) имели приблизительно одинаковое процентное соотношение (рисунок 2 Д). Похожее распределение было и с клетками, разделенными по амплитуде – 2 субпопуляции клеток, отвечающие понижением и повышением амплитуды имели примерно равное процентное отношение (рисунок 2 Г).

Для того, что бы лучше разобраться в наблюдаемых эффектах, мы разделили 3 субпопуляции клеток и посчитали усредненные показатели базовой линии, ответа на агонист и эффекта отывки.



**Рис. 2.** Влияние АТФ на сократительную активность кардиомиоцитов. А. Репрезентативная запись экспериментов; Б. Добавка АТФ в концентрации 10  $\mu\text{M}$  приводит к незначительному увеличению ЧКС кардиомиоцитов; В. Влияние АТФ на амплитуду клеточных сокращений; Г-Д. Процентное соотношение 3-х субпопуляций клеток, разделенные в зависимости от типа изменений ЧКС и амплитуды, вызванных добавкой АТФ.  $N=7$ ,  $n=50$  ( $N$  – количество чашек,  $n$  – количество клеток, которые вошли в статистику. В статистику вошли эксперименты от 4-х независимых клеточных выделений). НЗ – не значительно. Численные значения средних величин указаны над столбиками диаграмм.

Анализ данных выявил некоторые закономерности, а именно, нами было показано что клетки, которые изначально имели низкую ЧКС, чаще всего отвечали повышением ЧКС в ответ на поли-Ф и АТФ (рисунок 3 А и Г). Клетки, которые изначально имели высокую ЧКС, отвечали понижением (рисунок 3 Б и Д). Для клеток, которые не ответили изменением ЧКС в ответ на добавку агониста, строгих закономерностей выявить не удалось (рисунок 3 В и Е), возможно, из-за большого разброса данных, а также же потому, что таких клеток было намного меньше по сравнению с двумя другими субпопуляциями.



**Рис. 3.** Сравнительный анализ различных субпопуляций клеток в ответ на добавки поли-Ф (А-В, Ё) и АТФ (Г-Д, Ж) (пояснения в тексте).

Подобные закономерности прослеживались и с амплитудой ответа клеток – те клетки, у которых базовая амплитуда сокращений была понижена, имели тенденцию к повышению амплитуды после добавки агониста и наоборот (не показано на рисунках). Исходя из данного анализа, можно предположить, что ответы клеток на добавку поли-Ф и АТФ имеют одинаковый паттерн, однако, исходя из общих усредненных данных – добавка поли-Ф приводила к значительному снижению ЧКС (рисунок 1 А и Б), а добавка АТФ приводила к незначительному увеличению ЧКС (рисунок 2 А и Б). Для того, что бы лучше понимать различия между эффектами поли-Ф и АТФ, мы построили диаграмму рассеяния, учитывая ответы клеток по 2-м параметрам одновременно – ЧКС и амплитуду. Таким образом у нас образовалось 4 кластера клеток: 1) отвечавшие повышением ЧКС и повышением амплитуды (голубое поле на рис. 3Ё и Ж); 2) повышением ЧКС и понижением амплитуды (серое поле на рис. 3Ё и Ж); 3) понижением ЧКС и повышением амплитуды (зеленое поле на рис. 3Ё и Ж); 4) понижением ЧКС и понижением амплитуды (розовое поле на рис. 3Ё и Ж). Анализ показал, что при добавке поли-Ф, 72 % клеток отвечали понижением амплитуды сокращений (точки расположенные ниже линии нуля по оси ординат), тогда как в случае с АТФ таких клеток было 45 % (рисунок 3 Ё и Ж).

Что автоматически подразумевает, что в ответ на АТФ ~ в 2 раза больше клеток ответило повышением амплитуды по сравнению с добавкой поли-Ф – причем данное распределение сохранилось для обоих кластеров клеток, ответивших повышением амплитуды (синий и зеленый поля). Оценивая ЧКС, можно увидеть, что и на добавку поли-Ф, и на АТФ примерно равный процент клеток ответил понижением ЧКС (линия ниже нуля по оси абсцисс) – 59 % в случае добавки поли-Ф и 66 % после добавки АТФ (рисунок 3 Ё и Ж). Однако в случае поли-Ф большая часть этих клеток располагается в кластере со снижением ЧКС и амплитуды, а в случае АТФ большая часть клеток находится в кластере со снижением ЧКС и повышением амплитуды (рисунок 3 Ё и Ж красные и зеленые боксы).

**Закключение.** В настоящей работе нами было изучено влияние экзогенного поли-Ф и АТФ на спонтанные сокращения неонатальных кардиомиоцитов. Было установлено, что при добавке и поли-Ф, и АТФ клетки из одной популяции могут отвечать как повышением ЧКС и амплитуды, так и понижением. Сравнительный анализ показал, что эффекты поли-Ф и АТФ имеют некоторые схожие моменты функционирования, однако имеется и ряд различий. Так, например, при добавке АТФ наблюдалась тенденция к увеличению ЧКС и амплитуды сокращений, тогда как добавка поли-Ф приводила к снижению ЧКС и амплитуды. Однако стоит отметить, что в ответ на АТФ многие клетки ответили лишь небольшим снижением или повышением ЧКС и визуально находились очень близко к нулевой линии оси ординат (рисунок 3 Ж). Если рассматривать поли-Ф и АТФ в качестве агонистов пуринорецепторов, то наблюдаемые эффекты укладываются в современное понимание участия пуринергического сигналирования в процессах сокращения клеток сердца. А именно, ранее показывалось что активация одних пуринорецепторов приводит к увеличению ЧКС или ЧСС, активация же других может приводить к обратным эффектам [9]. В связи с этим для оценки участия пуринергической системы в наблюдаемых эффектах, в дальнейшем планируется провести ингибиторный анализ.

**Финансирование.** Данная работа была выполнена при поддержке гранта № ФЗ-20200929214 (Б.А.Ю.) Фонда финансирования науки и поддержки инновации Республики Узбекистан.

**Вклад авторов в работу.** М.Г.В. – выполнение экспериментов, подготовка рисунков, написание рукописи. Р.Х.Р. – анализ данных, подготовка рисунков, С.Р.З. – концептуализация, редактирование рукописи; Б.А.Ю. – концептуализация и дизайн экспериментов, анализ данных, подготовка рисунков, написание и редактирование рукописи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Abramov A.Y., Fraley C., Diao C.T., Winkfein R., Colicos M.A., Duchon M.R., French R.J., Pavlov E. (2007) Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(46): 18091-18096. DOI: 10.1073/pnas.0708959104
2. Pavlov E., Aschar-Sobbi R., Campanella M., Turner R.J., Gomez-Garcia M.R., Abramov A.Y. (2010) Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J Biol Chem* 285(13): 9420-9428. DOI: 10.1074/jbc.M109.013011
3. Gray M.J., Wholey W.Y., Wagner N.O., Cremers C.M., Mueller-Schickert A., Hock N.T., Krieger A.G., Smith E.M., Bender R.A., Bardwell J.C., Jakob U. (2014) Polyphosphate is a primordial chaperone. *Mol Cell* 53(5): 689-699. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.012
4. Cremers C.M., Knoefler D., Gates S., Martin N., Dahl J.U., Lempart J., Xie L., Chapman M.R., Galvan V., Southworth D.R., Jakob U. (2016) Polyphosphate: A Conserved Modifier of Amyloidogenic Processes. *Mol Cell* 63(5): 768-780. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.07.016
5. 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
6. Suess P.M. (2022) Effects of Polyphosphate on Leukocyte Function. *Prog Mol Subcell Biol* 61: 131-143. DOI: 10.1007/978-3-031-01237-2\_6
7. Dinarvand P., Hassanian S.M., Qureshi S.H., Manithody C., Eissenberg J.C., Yang L., Rezaie A.R. (2014) Polyphosphate amplifies proinflammatory responses of nuclear proteins through interaction with receptor for advanced glycation end products and P2Y1 purinergic receptor. *Blood* 123(6): 935-945. DOI: 10.1182/blood-2013-09-529602
8. Grune T., Ott C., Haseli S., Hohn A., Jung T. (2019) The “MYOCYTER” - Convert cellular and cardiac contractions into numbers with ImageJ. *Sci Rep* 9(1): 15112. DOI: 10.1038/s41598-019-51676-x

9. Woo S.H., Trinh T.N. (2020) P2 Receptors in Cardiac Myocyte Pathophysiology and Mechanotransduction. *Int J Mol Sci* 22(1). DOI: 10.3390/ijms22010251

NEONATAL KALAMUSHLARNING KARDIOMIOSITLARI QISQARISH FAOLLIGIGA NOORGANIK POLIFOSFATLAR VA ATFNING TA'SIRI

G.V. Maksimcheva, X.R. Rustamov, R.Z. Sabirov, A.Y. Baev

Avvalgi tadqiqotlarda noorganik polifosfatlar (poli-F) faollashgan trombositlardan ajralib chiqishi va purinergik hamda boshqa retseptorlarni faollashtirish orqali hujayralararo signal uzatishda ishtirok etishi ko'rsatilgan. Poli-F qon aylanish tizimida muntazam paydo bo'lishi va atrofdagi hujayralar, jumladan yurak hujayralari bilan bog'lanish mumkinligini inobatga olib, biz ekzogen poli-F ning neonatal kalamushlarning kardiomyositlarini qisqarish faolligiga ta'sirini o'rgandik. Tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, poli-F qo'shilganda bitta populyatsiyadagi hujayralar qisqarish chastotasi (QCh) va amplitudasining ham oshishi, ham pasayishi bilan javob qaytarishi mumkin. O'xshash javoblar ATF qo'shilganda ham kuzatildi. Taqqoslovchi tahlil shuni ko'rsatdiki, ATF qo'shilishi QCh va qisqarish amplitudasining ortishiga ko'proq moyil bo'lgan bo'lsa, poli-F qo'shilishi QCh va amplitudaning pasayishiga olib kelgan.

**Kalit so'zlar:** Noorganik polifosfatlar, ATF, kardiomyositlarning qisqarishi.

THE EFFECT OF INORGANIC POLYPHOSPHATES AND ATP ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES

G.V. Maksimcheva, X.R. Rustamov, R.Z. Sabirov, A.Y. Baev

It was previously shown that inorganic polyphosphates (polyP) can be released from activated platelets and participate in intercellular signaling through the activation of purinergic and other receptors. Since polyP regularly appear in the bloodstream and can come into contact with surrounding cells, including heart cells, we studied the effect of extracellular polyP on the contractile activity of neonatal cardiomyocytes. It was found that upon the addition of polyP, cells from the same population could respond with either an increase or a decrease in contraction rate (CR) and amplitude. Similar responses were observed upon the addition of ATP. Comparative analysis showed that ATP tended to increase CR and contraction amplitude, while polyP tended to decrease CR and amplitude.

**Keywords:** Inorganic polyphosphates, ATP, contractility of cardiomyocytes.

## OBTAINING A RECOMBINANT BACULOVIRUS CONTAINING THE GFP GENE USING THE BAC-TO-BAC PLATFORM

Sh.Sh. KHASANOV, A.H. MARDONOV, M.Sh. SHUKURJONOV, N.A. TOSHOVA,  
D.B. TURDALIYEV, J.M. ABDURAKHMANOV, O.N. ASHIROV, S.A. SASMAKOV, Sh.S. AZIMOVA

Institute of the Chemistry of Plant Substances of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan  
shuhrat.hasanov.0305@gmail.com

This study investigated methods for obtaining a recombinant baculovirus (rBmNPV-EGFP) harboring the GFP gene using the Bac-to-Bac platform. The pFastBac1-polh-GFP plasmid was employed to successfully achieve GFP gene expression in *Bombyx mori* (BMN1) cells. Optimized co-transfection conditions were established using the Cellfectin® II liposomal reagent, enabling the efficient production of recombinant baculovirus. The findings provide a significant foundation for utilizing the GFP gene as a marker and for the future development of baculovirus expression systems.

**Keywords:** GFP, DH10Bac™, Bac-to-Bac, BacMid, baculovirus/insect cells, pFastBac1, *Bombyx mori*, recombinant protein expression.

**Introduction.** Modern biotechnology and molecular biology recognize the production of recombinant proteins as a key research direction. Recombinant proteins are widely applied in vaccine production, gene therapy, cancer treatment, tissue engineering, and other fields [1]. One of the most efficient platforms in this area is the baculovirus/insect expression system (BEVS), which enables the expression of high-quality proteins by infecting insect cells with baculoviruses [2]. The BEVS system is distinguished by its ability to synthesize recombinant proteins with functional and biological properties nearly identical to their natural analogs, while also facilitating accurate post-translational modifications such as glycosylation and phosphorylation [3-5].

In the medical field, products developed using the BEVS platform include human and veterinary vaccines, therapeutic proteins, and gene therapy vectors. For instance, in 2009, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved Cervarix, a vaccine for preventing cervical cancer, which was the first human vaccine produced using the BEVS system [6-7]. To date, eleven BEVS-based products have been approved, including four human vaccines (Cervarix, Flublok, Flublok Quadrivalent, and Nuvaxovid/Covovax), two therapeutic agents (Provenge and Glybera), and five veterinary vaccines (Porcilis Pesti, BAYOVAC CSF E2, PCV, Ingelvac CircoFLEX, and Porcilis PCV) currently in use [4].

The success of the BEVS system largely depends on the types of baculoviruses used. Traditionally, AcMNPV has been the most commonly utilized baculovirus, widely applied alongside Sf9 and Sf21 cell lines. However, in recent years, *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) and its compatible *Bombyx mori* cell lines (e.g., BMN1) have gained considerable attention [8]. The BmNPV system is particularly favored due to the high protein synthesis capacity and genetic adaptability of silkworm (*Bombyx mori*) cells. Compared to the AcMNPV system, *Bombyx mori* cells offer higher expression levels in certain cases and enable cost reduction, making them highly desirable for industrial-scale protein production [3].

The process of obtaining recombinant baculoviruses using the Bac-to-Bac platform consists of two main stages: first, the construction of recombinant bacmid DNA, and second, the production of recombinant baculovirus in insect cells using this bacmid. In our previous study on the first stage, the pFastBac1-polh-GFP plasmid was successfully constructed by inserting the GFP (Green Fluorescent Protein) gene into the pFastBac1 transfer vector, and the recombinant DH10Bac™-GFP bacmid was obtained [9]. These constructs laid the groundwork for GFP gene expression in insect cells and served as a crucial foundation for subsequent studies.

The GFP gene holds significant importance as a widely used marker in baculovirus systems. Its green fluorescence property allows for the visual assessment of recombinant virus infection efficiency and protein expression levels. The use of GFP as a marker simplifies the rapid identification and purification of viral colonies, saving time and resources compared to traditional methods. In recent years, GFP has been employed in baculovirus systems to study protein subcellular localization, protein-protein interactions, and

expression kinetics [10]. Moreover, GFP expression in *Bombyx mori* cells serves as a critical model for evaluating the efficiency of the BmNPV system and expanding its potential for industrial-scale applications.

This study aimed to produce a recombinant baculovirus (rBmNPV-EGFP) expressing the GFP gene in *Bombyx mori* BMN1 cells using the constructed pFastBac1-polh-GFP plasmid. The primary objective was to optimize the recombinant baculovirus production process via the Bac-to-Bac platform, specifically by determining co-transfection conditions and comparing the efficiency of liposomal reagents such as Cellfectin® II and Metafectene PRO.

### Materials and Methods

In this study, the recombinant baculovirus was produced using the pFastBac1-polh-GFP plasmid, previously constructed in our earlier studies, and the recombinant DH10Bac™-GFP bacmid, which was chemically transformed in *E. coli* cells. The plasmid contains the Green Fluorescent Protein (GFP) gene and is adapted for expression in *Bombyx mori* cells [9].

*Bombyx mori* BMN1 cell line was obtained from the insect cell collection of the Molecular Genetics Laboratory at the Institute of Plant Substances Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. The cells were subcultured in Grace's Insect Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Catalog No. 11667037) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Catalog No. 10437028) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Catalog No. 15140122). For transfection, Cellfectin® II (Thermo Fisher Scientific, Catalog No. 10362100) and Metafectene PRO (Biontex, Catalog No. T040-1.0) liposomal reagents were used. The recombinant bacmid DNA was isolated using the PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Catalog No. K210017).

*Isolation of Recombinant Bacmid DNA.* Recombinant DH10Bac™/pFastBac1-GFP bacmid DNA was isolated using the PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit following the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific, 2018).

*Subculturing of Bombyx mori Cell Lines.* *Bombyx mori* BMN1 cells were incubated in Grace's medium (supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin) at 26°C. Cells were seeded at a density of  $1-2 \times 10^6$  cells/ml in 25 cm<sup>2</sup> T-flasks (Corning, Catalog No. 430639). Subculturing was performed every 4–6 days, transferring cells to fresh medium at a 1:6 ratio.

*Co-transfection of Bombyx mori Cell Lines.* Co-transfection was performed in *Bombyx mori* BMN1 cells using 6-well plates (Corning, Catalog No. 3516). Cells were seeded at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well and transfected upon reaching 85–88% confluency. DH10Bac™/pFastBac1-GFP bacmid DNA (1–3 µg) was mixed with Cellfectin® II (8 µl) or Metafectene PRO (10 µl) in serum-free Grace's medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Catalog No. 11595030). The mixture was incubated at room temperature for 30 minutes, added to the cells, and incubated at 26°C for 4–6 hours. The medium was then replaced with Grace's medium containing 10% FBS. After 72 hours, GFP fluorescence was evaluated under a microscope (488 nm wavelength, 10x objective). Transfection efficiency was compared and optimized for Cellfectin® II and Metafectene PRO reagents.

*Purification and Identification of Recombinant Baculoviruses.* Recombinant baculoviruses were purified using the Plaque assay method. *Bombyx mori* BMN1 cells were seeded at a density of  $2 \times 10^6$  cells in 6 cm Petri dishes (Corning, Catalog No. 430166). After 5–7 days post-transfection, the supernatant was collected and diluted from  $10^2$  to  $10^6$ . The diluted virus was added to cells under a 1% agarose layer (in Grace's medium) and incubated at 26°C for 5–7 days. Viral plaques were identified via GFP fluorescence under a microscope. Virus titer was determined using the TCID<sub>50</sub> (Tissue Culture Infectious Dose 50) method. Cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well plates (Corning, Catalog No. 3596), and the virus was added in dilutions from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ , followed by incubation at 26°C for 5 days. GFP fluorescence was assessed in each well under a microscope. TCID<sub>50</sub> values were calculated using the Reed-Muench method.

### Results and Discussion

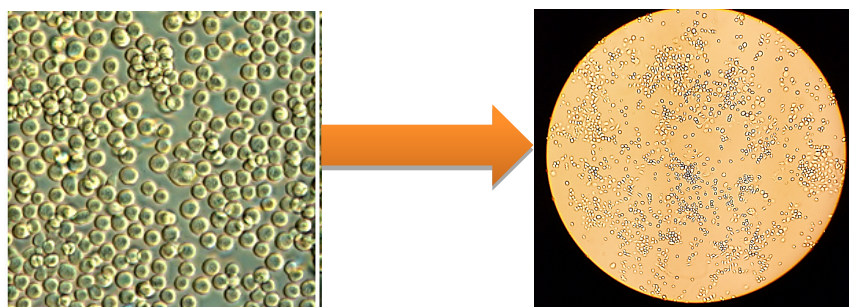
The DH10Bac™/pFastBac1-GFP bacmid DNA was successfully isolated using the PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit. The presence of the GFP gene was confirmed through polymerase chain reaction (PCR) using specific primers.

pUC/M13Forward 5'-'CCCAGTCACGACGTTGTTAAAACG-3'

pUC/M13 Reverse 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3

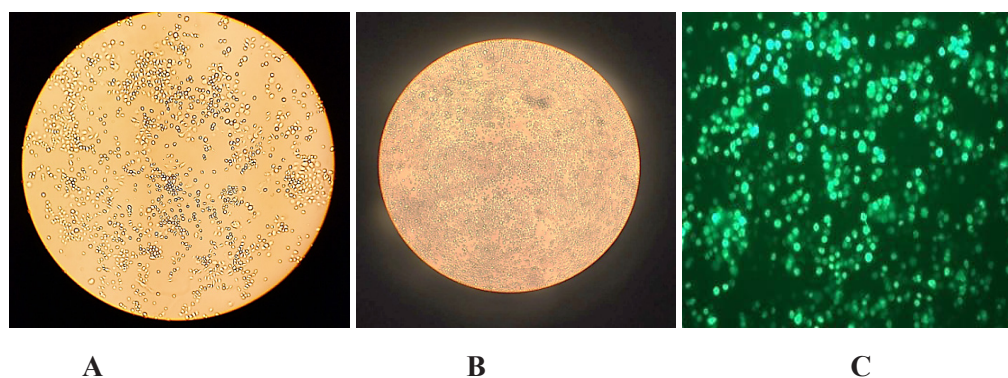
Analysis of the DH10Bac™/pFastBac1-GFP bacmid DNA revealed a 3014 bp amplicon, confirming the correct integration of the GFP gene within the bacmid.

*Bombyx mori* BMN1 cells were subcultured in Grace's medium for 5 days, reaching a density of  $2.5 \times 10^6$  cells/ml. Cell viability, determined using the Trypan blue staining method, was  $92 \pm 3\%$  ( $n=3$ ). The cells were prepared for co-transfection at 85–88% confluency. Microscopic observations confirmed the normal morphology of the cells (Figure 1).



**Fig. 1.** Microscopic view of *Bombyx mori* BMN1 cells.

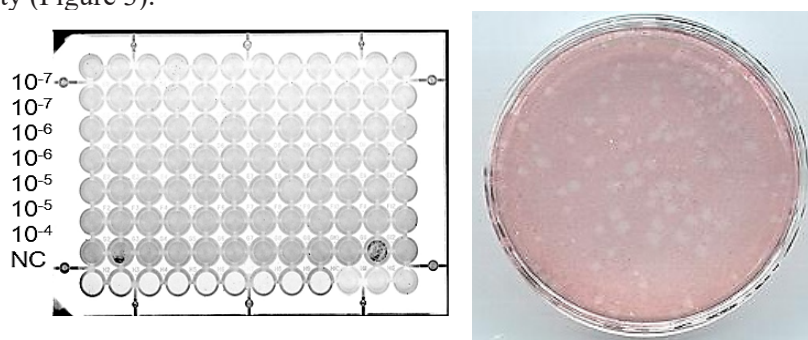
The DH10Bac™/pFastBac1-GFP bacmid DNA was co-transfected into *Bombyx mori* BMN1 cells using Cellfectin® II (8  $\mu$ l, 1  $\mu$ g DNA) and Metafectene PRO (10  $\mu$ l, 3  $\mu$ g DNA) reagents. After 72 hours, GFP fluorescence was evaluated under a microscope (488 nm wavelength, 10x objective). In cells transfected with Cellfectin® II, GFP expression was observed in  $85 \pm 5\%$  of the cells, while with Metafectene PRO, it was  $65 \pm 7\%$  ( $n=3$ ,  $p < 0.01$ , Student's t-test). Virus-infected cells clearly exhibited GFP green fluorescence (Figure 3 B, C), whereas no fluorescence was observed in control cells (Figure 2).



**Fig. 2.** Cells infected with the rBm-polh-GFP baculovirus.

*Bombyx mori* BMN1 cells were observed under a microscope. (A) Uninfected control cells. (B and C) Cells infected with the rBm-polh-GFP baculovirus, showing distinct GFP fluorescence.

In subsequent experiments, recombinant baculoviruses (rBmNPV-EGFP) were purified using the Plaque assay method. Viral plaques were identified based on GFP fluorescence after 5–7 days of incubation. The virus titer was determined using the TCID50 method, averaging  $1.2 \times 10^8$  PFU/ml (plaque-forming units/ml) ( $n=3$ ). Purified viral colonies were further refined using the TCID50 limiting dilution method to achieve genetic homogeneity (Figure 3).



**Fig. 3.** Identification of rBmNPV-EGFP viral plaques and virus colonies using *Plaque assay* and *TCID50* limiting dilution methods.

*Bombyx mori* cells infected with rBmNPV-EGFP exhibited GFP expression after 72 hours of incubation at 26°C. Fluorescence intensity was maximal at a 488 nm wavelength and was uniformly distributed in the cell cytoplasm.

#### Discussion.

This study successfully produced a recombinant baculovirus (rBmNPV-EGFP) expressing the GFP gene in *Bombyx mori* BMN1 cells using the Bac-to-Bac platform. The results demonstrated the higher efficiency of Cellfectin® II compared to Metafectene PRO (85% versus 65%,  $p < 0.01$ ), confirming the optimized conditions for the co-transfection process. These findings align with results reported by Xing-wei Xiang, Rui Yang, Lin Chen, Xiao-long Hu, Shao-fang Yu, Cui-ping Cao, and Xiao-feng Wu for the BmNPV system in *Bombyx mori* cells, which also highlighted the superior efficiency of Cellfectin® II [11].

The significance of the GFP gene as a marker lies in its green fluorescence property, which enables rapid and accurate identification of viral infection. Traditional methods for identifying viral colonies are labor-intensive, but GFP significantly simplifies this process. The high intensity and uniform distribution of GFP expression in our study indicate the strong expression potential of *Bombyx mori* cells in the BmNPV system, consistent with the advantages of the BEVS system noted by Mishra, V. [10].

These results provide a critical foundation for our future studies to utilize the BmNPV system for expressing other therapeutic proteins (vaccine antigens or monoclonal antibodies) beyond GFP. Additionally, testing *Bombyx mori* cells with other liposomal reagents or alternative transfection methods such as electroporation would be beneficial. These findings contribute to expanding the applications of the BEVS system in vaccine production and gene therapy.

**Conclusion.** In this study, a recombinant baculovirus (rBmNPV-EGFP) expressing the GFP gene in *Bombyx mori* BMN1 cells was successfully expressed using the Bac-to-Bac platform. The pFastBac1-polh-GFP plasmid was utilized. Cellfectin® II demonstrated higher efficiency compared to Metafectene PRO (85% versus 65%). The viral titer reached  $1.2 \times 10^8$  PFU/ml. GFP fluorescence simplified virus identification and confirmed high expression in cells. The study highlighted the economic efficiency of *Bombyx mori* cells and the biotechnological significance of the baculovirus expression system. The results provide a crucial basis for obtaining other types of recombinant proteins and serve as a marker for GFP gene utilization.

**Funding.** This study was carried out within the basic scientific research plan of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Specific contribution of the authors:** Khasanov Sh.Sh., Mardonov A.H., Toshova N.A., Shukurjonov M.Sh., Turdaliyev D.B., Abdurakhmanov J.M. and Ashirov O.N carried out the experiments, prepared the figures, Sasmakov S.A. analyzed the data, supervised the experiments, Azimova Sh.S. advised on experimental design and edited the article.

#### REFERENCES

1. Chen, X., Li, C., & Liu, H. (2021). Enhanced Recombinant Protein Production Under Special Environmental Stress. *Frontiers in Microbiology*, 15 (12), doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
2. María Martínez-Solís, Salvador Herrero, Alexandra M Targovnik. (2019) Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production *Appl Microbiol Biotechnol*. 103 (1):113-123. doi: 10.1007/s00253-018-9474-7.
3. Mingqing Hong, Tingting Li, Wenhui Xue, Sibozhang, Lingyan Cui, Hong Wang, Yuyun Zhang, Lizhi Zhou, Ying Gu, Ningshao Xia, Shaowei Li. (2022) Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production *Front Bioeng Biotechnol*. DOI: 10.3389/fbioe.2022.994743
4. Rachael S Felberbaum. (2015) The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J*. 10 (5):702-14. doi: 10.1002/biot.201400438
5. Timothy Weixin Kwang, Xinhui Zeng, Shu Wang. (2016) Manufacturing of AcMNPV baculovirus vectors to enable gene therapy trials. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 27:3:15050. doi: 10.1038/mtm.2015.50.
6. Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowy D.R., Schiller J.T. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic // *Proc Natl AcadSci U S A*. – V. 89. – P. 121-136.
7. Small E.J., Fratesi P., Reese D.M., Strang G., Laus R., Peshwa M.V., et al. (2000.) Immunotherapy of

- hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells // J Clin Oncol, – V. 18:3894. – P. 903.
8. Xingwei Xiang, Rui Yang, Shaofang Yu, Cuiping Cao, Aiqin Guo, Lin Chen, Xiaofeng Wu, Weizheng Cui & J. L. Cenis. (2010) Construction of a BmNPV polyhedrin-plus Bac-to-Bac baculovirus expression system for application in silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Genetics and Mol. Biotechn. 87, pages 289–295.
  9. Sh.Sh. Khasanov, S.A. Gaynazarova, M.Sh. Shukurjonov, D.B. Turdaliyev, J.M. Abdurakhmanov, O.N. Ashirov, F.B. Eshboev, S.A. Sasmakov, Sh.S. Azimova. (2024) Construction of a recombinant plasmid containing the gfp gene using the bac-to-bac platform. Uzbek Biological Journal № 4 pages 15-19
  10. Vibhor Mishra A (2020) Comprehensive Guide to the Commercial Baculovirus Expression Vector Systems for Recombinant Protein Production Protein Pept Lett. 27(6):529-537. doi: 10.2174/0929866526666191112152646.
  11. Xing-wei Xiang, Rui Yang, Lin Chen, Xiao-long Hu, Shao-fang Yu, Cui-ping Cao, Xiao-feng Wu. (2012) Immobilization of foreign protein into polyhedra of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). J Zhejiang Univ Sci B. 13 (2):111–117. doi: 10.1631/jzus.B1100131

#### BAC-TO-BAC PLATFORMASIDAN FOYDALANGAN HOLDA O‘ZIDA GFP GENINI SAQLAGAN REKOMBINANT BAKULOVIRUS OLIISH

Sh.Sh. Hasanov, A.H. Mardonov, M.Sh. Shukurjonov, N.A. Toshova, D.B. Turdaliyev, J.M. Abduraxmanov, O.N. Ashirov, S.A. Sasmakov, Sh.S. Azimova

Bac-to-Bac platformasidan foydalanib, o‘zida GFP genini saqlagan rekombinant bakulovirus (rBmNPV-EGFP) olish usullari o‘rganildi. pFastBac1-polh-GFP plazmidasidan foydalanib, *Bombyx mori* (BMN1) hujayralarida GFP geni ekspressiyasi muvaffaqiyatli amalga oshirildi. Cellfectin® II liposomal reagenti yordamida optimallashtirilgan ko-transfeksiya sharoitlari aniqlandi, bu esa yuqori samarali rekombinant bakulovirus olish imkonini berdi. Olingan natijalar GFP genidan marker sifatida foydalanish va kelgusida bakulovirus ekspressiya tizimlarini rivojlantirish uchun muhim asos yaratadi.

**Kalit so‘zlar:** GFP, DH10Bac™, Bac-to-Bac, BacMid, baculovirus/insect cells, pFastBac1, *Bombyx mori*, rekombinant protein expression.

#### ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БАКУЛОВИРУСА, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕН GFP, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ ВАС-ТО-ВАС

Ш.Ш. Ҳасанов, А.Х. Мардонов, М.Ш. Шукуржонов, Н.А. Тошова, Д.Б. Турдалиев, Ж.М. Абдурахманов, О.Н. Аширов, С.А. Сасмаков, Ш.С. Азимова

Изучены методы получения рекомбинантного бакуловируса (rBmNPV-EGFP), содержащего ген GFP, с использованием платформы Вас-to-Вас. С применением плазмиды pFastBac1-polh-GFP была успешно осуществлена экспрессия гена GFP в клетках *Bombyx mori* (BMN1). Оптимизированные условия ко-трансфекции были определены с использованием липосомального реагента Cellfectin® II, что позволило эффективно получить рекомбинантный бакуловирис. Полученные результаты создают важную основу для использования гена GFP в качестве маркера и дальнейшего развития систем экспрессии бакуловирусов.

**Ключевые слова:** GFP, DH10Bac™, Bac-to-Bac, BacMid, бакуловирис/клетки насекомых, pFastBac1, *Bombyx mori*, экспрессия рекомбинантных белков.

## COMPARATIVE EXPRESSION OF STABILIZED SARS-COV-2 SPIKE AND DIMERIC RBD PROTEINS IN CHO CELLS FOR VACCINE APPLICATIONS

M. MUMINOV<sup>1</sup>, N. TSIFEROVA<sup>1,2</sup>, E. PSHENICHNOV<sup>1</sup>, O. CHARISHNIKOVA<sup>1</sup>, V. TSOY<sup>1</sup>,  
A. ABDURAKHIMOV<sup>1,2</sup>, S. BOZOROV<sup>1</sup>, Y. LEVITSKAYA<sup>1</sup>, D. DALIMOVA<sup>1</sup>,  
A. ABDULLAEV<sup>1</sup>, Sh.TURDIKULOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Advanced Technologies, Olmazor district 100174 Tashkent, Uzbekistan;

<sup>2</sup>Institute of Biophysics and Biochemistry, National University of Uzbekistan, Tashkent, 100174

m.muminov@cat-science.uz; muminov.imbio@gmail.com

The COVID-19 pandemic underscored the urgent need for scalable vaccine platforms. In response, we aimed to express SARS-CoV-2 spike and dimeric receptor-binding domain (RBD) proteins in mammalian cells for potential vaccine use. Synthetic genes encoding a stabilized spike ectodomain and tandem dimeric RBD were cloned into the pcDNA3.4 vector and expressed in CHO-S cells. Analysis showed high-level expression of the dimeric RBD (~50-55 kDa), consistent with glycosylation predictions. In contrast, spike protein expression was markedly lower, though within the expected 135-200 kDa range. These results highlight the need for further optimization to enhance spike protein yields for vaccine development.

**Key words:** SARS-CoV-2, Spike, RBD, Protein Vaccine, CHO cells, Expression.

### Introduction.

The ongoing SARS-CoV-2 pandemic has emphasized the urgent need for effective and scalable vaccine platforms to combat emerging infectious diseases. Among the various vaccine approaches, protein-based vaccines hold particular promise due to their long history of safety, stability, and ability to elicit robust immune responses. Unlike other platforms, such as DNA and RNA-based vaccines, protein-based vaccines rely on the direct delivery of recombinant antigens, bypassing the requirement for in vivo antigen expression and thereby enhancing safety and immunogenic control [1].

The spike protein of SARS-CoV-2 and its receptor-binding domain (RBD) are the primary targets for vaccine development. The spike protein facilitates viral entry by binding to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, making it the key antigen for eliciting neutralizing antibodies [2]. Furthermore, the RBD, a critical subunit of the spike protein, is particularly important due to its central role in receptor binding and immune recognition. Consequently, RBD-focused vaccines have been investigated as promising candidates for inducing protective immunity [3].

Protein-based vaccine development relies heavily on the production of high-quality antigens in scalable expression systems. Mammalian cell lines, such as CHO-S (Chinese Hamster Ovary cells), are commonly employed for the production of recombinant proteins due to their ability to perform complex post-translational modifications, including glycosylation, that are critical for proper folding and functional activity of viral antigens [4]. Despite these advantages, the expression efficiency of full-length spike proteins in mammalian systems often poses challenges due to their large size, complex structure, and glycosylation requirements [5].

### Materials and methods.

#### 2.1. Designing and construction of expression vectors

The SARS-CoV-2 spike protein sequence was retrieved from GenBank (accession number: MN9089473) and used as the foundation for designing vaccine constructs. To enhance stability and immunogenicity, 2P stabilization mutations [6] were introduced at positions 986 and 987, and the furin cleavage recognition site was truncated by removing the codons encoding arginine residues at the cleavage site. Also, the D614G substitution were included as it was shown that all circulating strains worldwide including Uzbekistan contained this mutation [7,8].

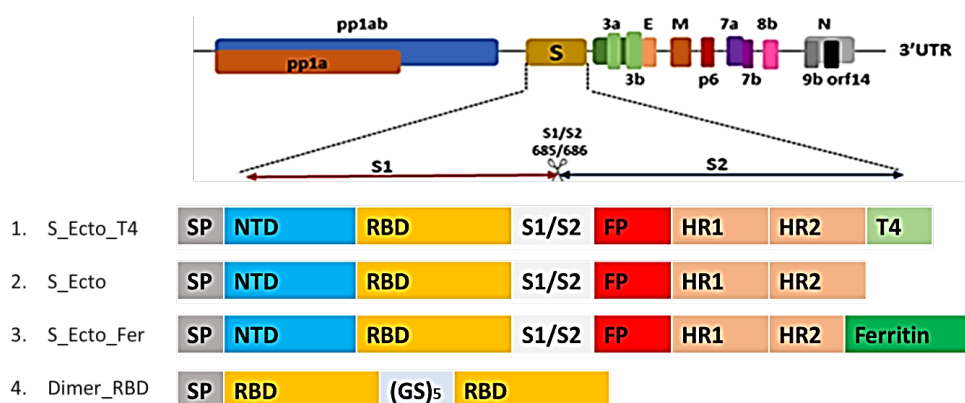
To improve secretion efficiency, the native signal peptide was replaced. Various signal peptides were evaluated for their cleavage efficiency and secretion potential using SignalP 5.0 and Cell-PLoc 2.0 tools [9,10].

As the primary goal was to compare the expression levels of various vaccine candidates, four synthetic constructs encoding full or partial fragments of the spike protein were designed (Figure 1). The key differences between the constructs focused on their C-terminal elements, structural modifications, and multimerization capabilities:

**S\_Ecto\_T4:** Encoded the spike ectodomain (amino acids 13-1213) and included a T4 foldon trimerization domain at the C-terminus to promote stable trimer formation, essential for mimicking the native structure of the spike protein [11].

**S\_Ecto:** Similar to the prior construct but lacked the T4 foldon sequence, allowing a comparison of the trimerization domain's impact on expression and antigen presentation by forming multimers, as previously described by Powell et al., 2021 [12].

**Dimer RBD:** This construct encoded tandemly repeated RBD sequences linked by a 5xGS linker to increase antigen density and enhance immune recognition. A modified version of this construct additionally encoded 6 His tag at the C terminal side of the target protein to facilitate purification.



**Fig. 1.** The schematic structure of the constructs created and used in this work.

To maximize expression efficiency, the sequences were codon-optimized for mammalian systems. Additional regulatory elements, including a Kozak motif to enhance translation initiation and double stop codons to ensure termination of translation, were incorporated. Restriction sites for XbaI and AflII were introduced at the 5' and 3' ends, respectively, to facilitate cloning into the pcDNA3.4 vector. The synthetic genes were synthesized and sequence-verified by GenScript Inc. (USA) to confirm their fidelity and readiness for downstream applications.

## 2.2. Plasmid propagation, purification and identification

The generated plasmids transformed into Top10 *E. coli* strain and positive clones were selected and colonies were transferred to 5 ml LB broth and were grown overnight. 0.1 mL of this culture further transferred to LB broth and grown for around 16-18 hours. After, culture was centrifuged and plasmids were purified with Qiagen Maxi plasmid purification kit. To map plasmids 600 ng plasmids were treated with 10 U of MfeI (Sibenzyme, Russia) according to the protocol from the manufacturer. Purified plasmids and products from restriction were analyzed using 1% agarose gel in electrophoresis.

## 2.3. Protein expression in CHO cells.

All variants of the recombinant proteins were expressed in ExpiCHO-S cells according to the manufacturer's instructions [13]. Briefly, the cells were grown in sterile Erlenmeyer-shaped flasks with plain bottoms with vented screw caps in incubator at 110 rpm (an orbital diameter of 50 mm) at 37°C and 8% CO<sub>2</sub>. ExpiCHO-S cells were passaged and split every 2–3 days when cell densities reached 0.3×10<sup>6</sup> to 6×10<sup>6</sup> viable cells per mL. Cells were allowed to reach a density of 7–10×10<sup>6</sup> cells per mL on the day of transfection, with a viability of at least 95%. Further, the cells are diluted to a final density of 6×10<sup>6</sup> cells per mL in a plain bottom Erlenmeyer flask. Finally, for protein expression we followed a protocol described by Herrera *et al.* 2020 [14].

## 2.4. Gel electrophoresis and western blot

To evaluate the expression culture supernatant subjected to SDS-PAGE electrophoresis with 7.5% Tris-glycine gels [15]. SARS-CoV-2 Spike Protein (RBD) Polyclonal Antibody was used as the primary antigen

was used as first antibody. Anti-Rabbit IgG AP antibody produced in goat (Merck, Germany) were used as a secondary antibody and the proteins were stained with NBT/BCIP Stock Solution Roche (Switzerland). The dilution of antibodies was conducted based on vendors' recommendations whereas the rest of the procedure was conducted according to common techniques [16].

### 3. Results and Discussions.

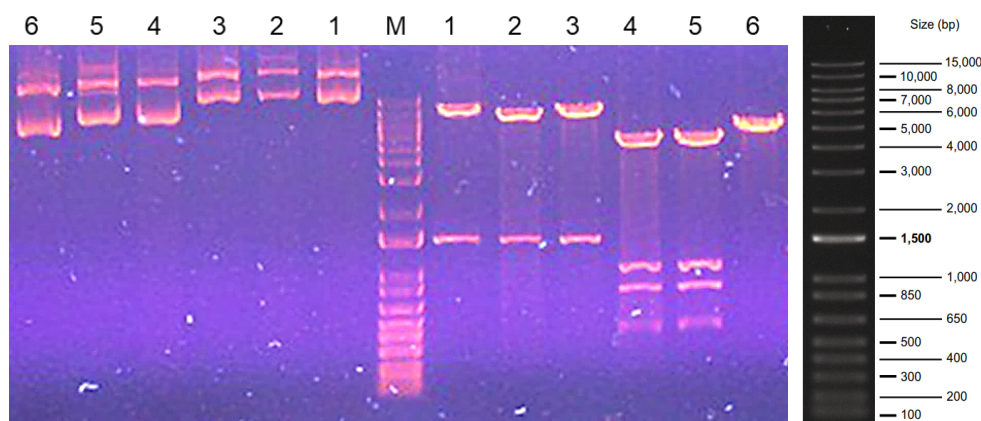
#### 3.1. Bioinformatics analysis, generation of constructs and plasmid mapping

Among the constructs, all proteins—except S\_Ecto\_Fer—were predicted to be efficiently secreted into the culture supernatant when directed by the BM-40 signal peptide (MRSLWLLLGLGLLLALSHVQA), known for its strong performance in mammalian systems. Therefore, the native SARS-CoV-2 spike signal peptide was replaced with BM-40 in these constructs. For the S\_Ecto\_Fer construct, which features an *H.pylori* ferritin scaffold, the synthetic SEC-R signal peptide was selected for its strong secretion potential and structural compatibility. Signal peptide prediction tools confirmed proper cleavage at designated sites, while solubility assessments indicated all constructs were highly soluble and unlikely to aggregate (Table).

**Details of designed ORFs and bioinformatics and restriction analysis**

Construct name	Signal Peptide	Cleavage site and probability	Predicted localization	Predicted solubility	ORF size (AA)	Vector size (bp)	Restriction fragments (bp)	Target protein Mr weight
S_Ecto_T4	BM-40	VQA-SQ. Probability: 0.9719	Secretive	Soluble	1245	9748	8474; 1274;	137,9 kDa
S_Ecto	BM-40	VQA-SQ. Probability: 0.9719	Secretive	Soluble	1218	9667	8393; 1274;	134,9 kDa
S_Ecto_Fer	SEC-R	VWA-VN. Probability: 0.9692	Secretive	Soluble	1315	9940	8678; 1274;	146,4 kDa
Dimer RBD	BM-40	VQA-RV. Probability: 0.9486	Secretive	Soluble	476	7441	5420; 941; 699; 381;	53,1 kDa
Dimer RBD 6xHis	BM-40	VQA-RV. Probability: 0.9486	Secretive	Soluble	482	7459	5438; 941; 699; 381;	53,9 kDa
pcDNA3.1-CAT	-	-	-	-	-	6217	6217	-

The last plasmid - pcDNA3.1-CAT (Invitrogen, USA) used as control for the MfeI treatment that has only one recognition site. N/D – Not detected, N/S- not studied.



**Fig. 2.** Plasmids on gel before and after MfeI treatment. 1 - S\_Ecto\_T4, 2 - S\_Ecto, 3 - S\_Ecto\_Fer, 4 - Dimer RBD, 5 - Dimer RBD 6xHis, 6 - pcDNA3.1-CAT, M – DNA marker. Left side from the marker – uncut plasmids, right side from the marker – plasmid cut with MfeI enzyme.

Digestion with MfeI was expected to produce two distinct DNA fragments, corresponding to the specific cut sites within the plasmid and the inserted spike gene sequence. Similarly, digestion of the dimeric RBD constructs was anticipated to generate four distinct fragments, reflecting the tandem arrangement of the RBD encoding sequences along with the plasmid backbone (Figure 2).

The results of the restriction digestion confirmed the successful cloning and proper orientation of the genes.

### 3.2. In vitro expression analysis

One major challenge in protein-based vaccine development is efficiently producing active recombinant forms of complex proteins like the SARS-CoV-2 spike, a heavily glycosylated glycoprotein (~180-200 kDa). Its proper folding and glycosylation are essential for function and immunogenicity but difficult to replicate in recombinant systems.

Expression analysis revealed that, with the exception of the S\_Ecto\_Fer construct, all other constructs demonstrated adequate levels of spike and dimeric RBD protein expression. The molecular masses of the expressed proteins corresponded to their theoretical values, confirming proper translation and initial post-translational modifications. For example: The molecular masses of the spike constructs were within the expected range of 135-200 kDa, aligning with their calculated values of 137.9 kDa and 134.9 kDa, depending on the specific modifications included. The dimeric RBD protein exhibited a molecular mass of approximately 50-55 kDa, consistent with predictions for its tandem RBD arrangement and glycosylation.

Interestingly, the dimeric RBD protein exhibited significantly higher expression levels than the spike constructs, which, despite reaching the expected molecular mass, showed relatively low production yields. The superior expression efficiency and scalability of the dimeric RBD made it a strong candidate for further development. Based on this construct, our team developed the RENOVAC protein-subunit vaccine. This candidate was subsequently evaluated in preclinical studies, demonstrating a favorable safety profile and the ability to induce a robust immune response [17].

**Conclusion.** The study highlights the potential of CHO-S cells for producing recombinant SARS-CoV-2 antigens. Among the tested constructs, the dimeric RBD protein showed the highest expression and scalability, making it a strong vaccine candidate. In contrast, full-length spike protein expression was limited, indicating a need for further optimization. These findings support continued development of protein-based vaccines, with the dimeric RBD forming the basis of the RENOVAC vaccine, which has shown promising safety and immunogenicity in preclinical studies. Future efforts will focus on improving spike protein expression and advancing production strategies for broader vaccine availability.

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

**Author contributions.** Conceptualization: MM, AA (Alisher Abdullaev), ST; Experiments, methodology, data curation and analysis: MM, NT, EP, OC, VT, AA (Abrorjon Abdurakhimov), BS, YL and DD; Visualization: MM, and NT; Writing original draft: MM, and NT. Editing: ST.

## REFERENCES

1. Ghattas, M. *et al.* (2021) Vaccine Technologies and Platforms for Infectious Diseases: Current Progress, Challenges, and Opportunities. *Vaccines* 9, 1490
2. Dai, L. and Gao, G.F. (2021) Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 73–82
3. Wang, Q. *et al.* (2020) Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* 181, 894-904.e9
4. Kim, J.Y. *et al.* (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 917–930
5. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes | Science[Online]. Available: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd0826>.
6. Pallesen, J. *et al.* (2017) Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E7348–E7357
7. Esonova, G. *et al.* (2024) Complete genome sequencing of SARS-CoV-2 strains that were circulating

- in Uzbekistan over the course of four pandemic waves. *PLOS ONE* 19, e0298940
8. Korber, B. *et al.* (2020) Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* 182, 812-827.e19
  9. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks | Nature Biotechnology[Online]. <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0036-z>.
  10. Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms | Nature Protocols[Online]. <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.494>.
  11. Amanat, F. *et al.* (2020) A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 26, 1033–1036
  12. Powell, A.E. *et al.* (2021) A Single Immunization with Spike-Functionalized Ferritin Vaccines Elicits Neutralizing Antibody Responses against SARS-CoV-2 in Mice. *ACS Cent. Sci.* 7, 183–199
  13. Gibco. For transfection of ExpiCHO-S™ Cells in a defined, serum-free medium. In ExpiCHO™ Expression System User Guide;MAN0014337; Thermo Fisher Scientific: Carlsbad, CA, USA, 2018
  14. Herrera, N.G. *et al.* (2020) Characterization of the SARS-CoV-2 S Protein: Biophysical, Biochemical, Structural, and Antigenic AnalysisbioRxiv, 2020.06.14.150607
  15. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
  16. Western blot protocol | Abcam[Online]. <https://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol#antibody-staining>.
  17. Muminov, M. *et al.* (2024) Development, Pre-Clinical Safety, and Immune Profile of RENOVAC–A Dimer RBD-Based Anti-Coronavirus Subunit Vaccine. *Vaccines* 12, 1420

#### VAKSINA SIFATIDA QO‘LLASH UCHUN STABILASHTIRILGAN SARS-COV-2 TOJDOR VA DIMER RBD OQSILLARINING CHO HUYAYRALARIDAGI SOLISHTIRMA EKSPRESSIYASI

M. Muminov, N. Tsiferova, E. Pshenichnov, O. Charishnikova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov, S. Bozorov, Y. Levitskaya, D. Dalimova, A. Abdullaev, Sh. Turdikulova

COVID-19 pandemiyasi keng ko‘lamli vaktsina platformalariga bo‘lgan dolzarb ehtiyojni yana bir bor ko‘rsatdi. Shu munosabat bilan, biz SARS-CoV-2 virusining spike (tirqish) va dimerli retseptor bilan bog‘lovchi domen (RBD) oqsillarini sutemizuvchilarning hujayralarida ifodalashni maqsad qildik. Barqarorlashtirilgan spike ektodomeni va tandem dimerli RBD ni kodlovchi sun‘iy genlar pсDNA3.4 vektoriga klonlanib, CHO-S hujayralarida ifodalandi. Tahlillar dimerli RBD (~50–55 kDa) oqsilining yuqori darajada ifodalanganini ko‘rsatdi, bu glikozillangan shakllarga mos keladi. Aksincha, spike oqsili pastroq darajada ifodalandi, garchi u kutilgan 135–200 kDa massasi oraliqida bo‘lsa ham. Bu natijalar spike oqsilining hosildorligini oshirish uchun qo‘shimcha optimallashtirish zarurligini ko‘rsatadi.

**Kalit so‘zlar:** SARS-CoV-2, Spike, RBD, Oqsil vaktsina, CHO hujayralari, Ekspressiya.

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ШИПА SARS-COV-2 И ДИМЕРНОГО RBD В КЛЕТКАХ CHO ДЛЯ ВАКЦИННЫХ ПРИМЕНЕНИЙ

М. Муминов, Н. Циферова, Е. Пшеничнов, О. Чарышникова, В. Цой, А. Абдурахимов, С. Бозоров, Ю. Левицкая, Д. Далимова, А. Абдуллаев, Ш. Турдикулова

Пандемия COVID-19 подчеркнула острую необходимость в масштабируемых вакцинных платформах. В связи с этим мы стремились экспрессировать спайковый белок SARS-CoV-2 и димерный рецептор-связывающий домен (RBD) в клетках млекопитающих для потенциального применения в вакцинах. Синтетические гены, кодирующие стабилизированный эктодомен спайка и тандемный димерный RBD, были клонированы в вектор pсDNA3.4 и экспрессированы в клетках CHO-S. Анализ показал высокий уровень экспрессии димерного RBD (~50–55 кДа), что соответствует предполагаемым формам с гликозилированием. В отличие от этого, экспрессия полного спайкового белка была значительно ниже, хотя и находилась в ожидаемом диапазоне молекулярной массы (135–200 кДа). Эти результаты подчеркивают необходимость дальнейшей оптимизации для повышения уровня экспрессии спайка с целью разработки вакцин.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, Spike, RBD, белковая вакцина, клетки CHO, экспрессия.

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИФЕНОЛОВ ГЕКСАГАЛЛОИЛ-ГЛЮКОЗЫ И ГЕПТАГАЛЛОИЛ-ГЛЮКОЗЫ

Г.В. АБДУЛХАКОВА<sup>1</sup>, Э.Ж. КОМИЛОВ<sup>1</sup>, Н.А. ЭРГАШЕВ<sup>1</sup>, Р.Р. МАХМУДОВ<sup>2</sup>, М.И. АСРАРОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики и биохимии при НУУз;

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии АН РУз

Автор для переписки: nazira.2713@mail.ru

Оценивается влияние полифенолов гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы, выделенных из листьев растения *Pistacia vera L.*, на процесс перекисного окисления липидов индуцированного  $Fe^{2+}$ /аскорбатом, протекающий в митохондриях, а также антирадикальное свойство этих полифенолов по отношению к дифенилпикрилгидразилу.

**Ключевые слова:** гексагаллоилглюкоза, гептагаллоилглюкоза, митохондрии печени, ПОЛ,ДФПГ.

**Введение.** Митохондрии – клеточные органеллы, которые вырабатывают энергию в клетке и контролируют процессы апоптоза. Это зависит от структуры мембраны и липидного состава митохондрий. Липиды, обнаруженные в мембранах митохондрий, участвуют в поддержании целостности органеллы и синтезе АТФ, а также в регуляции пролиферации, метаболизма, воспаления и апоптоза клеток. Нарушение липидного гомеостаза приводит к нарушению энергетического метаболизма, биологическому старению и развитию возрастных заболеваний [1; 2]. Таким образом, возрастные заболевания связаны с дисфункцией митохондрий и избыточной выработкой активных форм кислорода (АФК). Хотя процесс перекисное окисления липидов (ПОЛ) является одним из признаков окислительного стресса, он активирует фосфолипазы и стимулирует сигнальные каскады в жизненно важных процессах клетки. При нейродегенеративных заболеваниях наблюдается образование радикалов кислорода и стимуляция процесса ПОЛ также вызывает. Было показано, что продукты ПОЛ являются пусковым механизмом некротической и апоптотической гибели клеток [3]. Процесс ПОЛ происходит в результате атаки свободных радикалов на двойные углерод-углеродные связи, особенно липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты. Согласно биохимической концепции, малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидроксиноненаль (4-ГН), образующиеся в процессе ПОЛ, действуют как сигнальные молекулы, стимулируя экспрессию генов и жизнеспособность клеток, тогда как цитотоксичность приводит к ингибированию экспрессии генов и гибели клеток [4].

Было обнаружено, что фосфолипиды, содержащие диацил-полиненасыщенные жирные кислоты, взаимодействуют с митохондриальной цепью переноса электронов и производит АФК для инициирования ПОЛ. Кроме того, связывание с ферроптозом эти фосфолипиды снижаются при старении и болезни Хантингтона. Антиоксиданты, влияющие на митохондрии, защищают их от окислительного стресса. [5] и было показано, что они связаны с  $Fe^{2+}$ -зависимой гибелью клеток, т.е. ферроптозом [5; 6]. Полиненасыщенные жирные кислоты, расположенные в митохондриальной мембране, являются основными мишенями для избыточной продукции АФК в результате окислительного стресса и атаки этих АФК. Процесс ПОЛ в митохондриях приводит к нарушению их целостности и функции и в конечном итоге к развитию различных патологий [7]. В последнее время часто используются полифенольные вещества с антиоксидантными и антирадикальными свойствами при лечении и профилактики нейродегенеративных и других заболеваниях.

В связи с этим, на основании вышеизложенного, были изучены антиоксидантные и антирадикальные свойства полифенолов гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы, выделенных из листьев *Pistacia vera L.*

**Материалы и методы.** Полифенолы гексагаллоил-глюкоза (6-О-дигаллоил-1,2,3,4-тетра-О-галлоил-бета-D-глюкоза) и гептагаллоил-глюкоза (3,6-О-дигаллоил-1,2,4-три -О-галлоил-бета-D-глюкоза) любезно предоставлены Институтом биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан. Их химические структуры представлены на рисунке 1. Чистота веществ составляет более 90%.

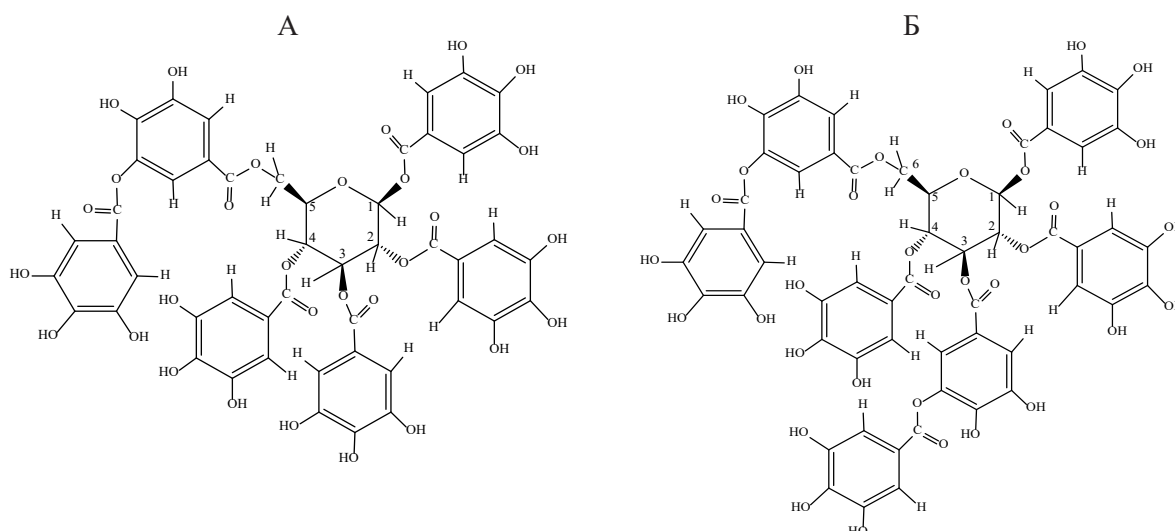


Рис. 1. Химическая структура гексагаллоил-глюкозы (А) и гептагаллоил-глюкозы (Б).

Исследование проводили на белых беспородных крыс массой 180-200 г. Все процедуры, проводимые с животными, соответствуют требованиям Декларации Совета Европейского Союза 86/609/ЕЕС и протокол по биоэтике Института биофизики и биохимии при НУУз с № BRC/IBB-N44/2024/75-1.

Митохондрии из печени крыс выделяли по методу дифференциального центрифугирования [8]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10мМ трис-НСl, рН 7,4. На первом этапе центрифугирование проводили на угловом роторе в центрифуге РС-6МЦ при скорости 1500 об/мин в течение 7-8 минут. На втором этапе центрифугирование проводили в течение 15 минут при скорости 6000 об/мин. Митохондрии суспендировали в среде выделения без ЭДТА в соотношении 10:1. Во время эксперимента суспензия митохондрий хранилась в ледяной бане. Белок определяли по методу биурета [9] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

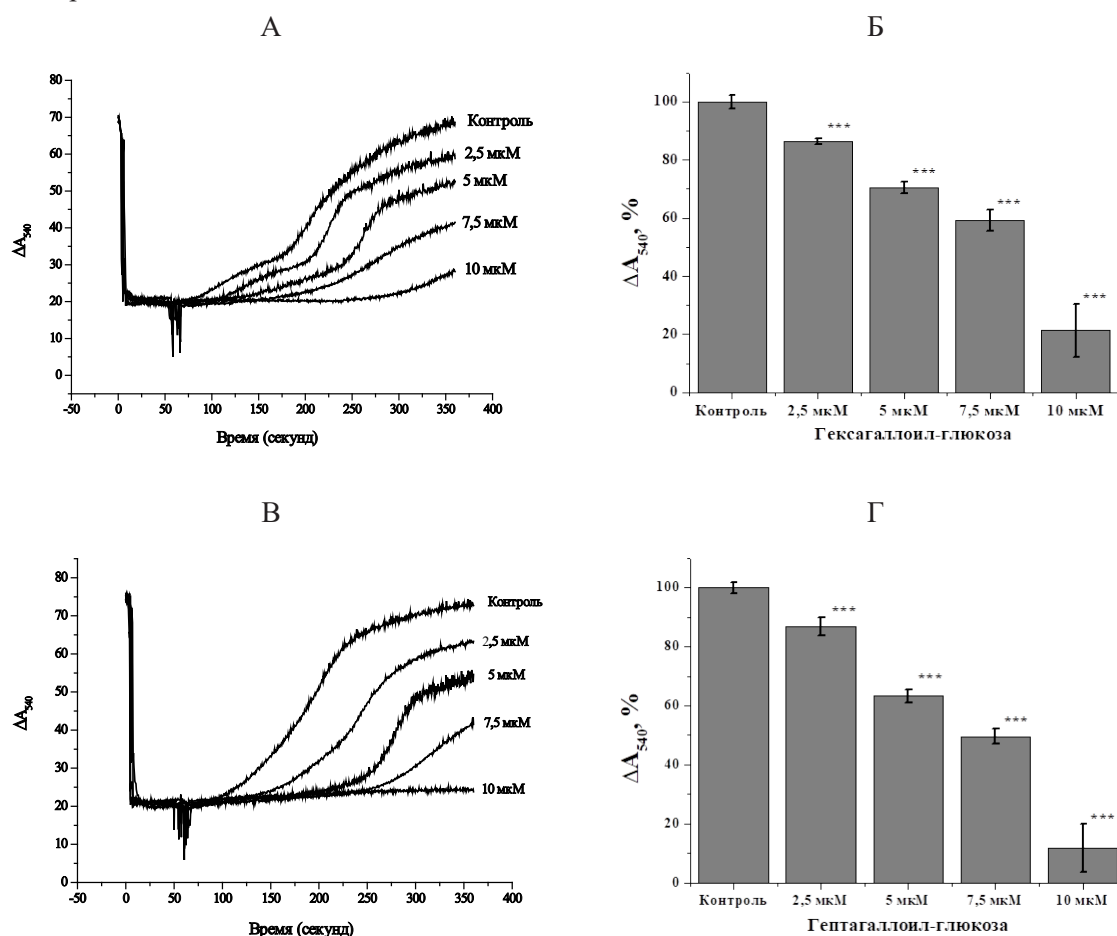
Для определения антиоксидантных свойств этих галлотанинов использовали  $Fe^{2+}$ /аскорбат-зависимого ПОЛ. В суспензиях митохондрий набухание вызывали добавлением 10 мкМ  $FeSO_4$  и 600 мкМ аскорбата и регистрировали на спектрофотометре V-5000 при 540 нм. Инкубационная среда содержала 125 мМ КСl, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4. Содержание белка митохондрий составляло 0,5 мг на 1 мл среды инкубации. Установленная ранее линейная корреляционная взаимосвязь между интенсивностью процессов ПОЛ, индуцированных системой  $Fe^{2+}$ /аскорбат, и скоростью высокоамплитудного набухания митохондрий [10], позволяет по интенсивности набухания судить о состоянии реакций ПОЛ и использовать эту модель как тест-систему для изучения полифенольных антиоксидантов.

Для оценки антирадикальной активности использовали метод спектрофотометрического измерения кинетики восстановления молекул стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) с антиоксидантами [11]. Свободный радикал ДФПГ взаимодействует с нечетным электроном, давая сильное поглощение при 517 нм [12]. Эксперименты проводили в спиртовом растворе ДФПГ и в растворе концентрация ДФПГ составляла 100 мкМ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Origin 6.1 с вычислением средней арифметической величины ( $M$ ), стандартной ошибки ( $m$ ), и показателя достоверности ( $p$ ) с использованием t-теста Стьюдента. Величину  $p < 0,05$  рассматривали как показатель достоверных различий.

**Результаты и их обсуждение.** В проведенных экспериментах было показано, что полифенол гексагаллоил-глюкоза ингибирует процесс ПОЛ в митохондриях, индуцированный  $Fe^{2+}$ /аскорбатом, в зависимости от концентрации (рис. 2, А, Б). В этом случае при добавлении  $Fe^{2+}$ /аскорбата в инкубационную среду наблюдалось протекание процесса ПОЛ в митохондриях, при этом отмечалось сильное набухание митохондрий. Тогда под влиянием концентрации гексагаллоилглюкозы 2,5 мкМ процесс ПОЛ, индуцированный  $Fe^{2+}$ /аскорбатом, усиливался на  $13,60 \pm 0,83\%$  по сравнению с контролем, а под влиянием концентрации 5 мкМ процесс ПОЛ усиливался на  $29,6 \pm 1,4\%$ . % по срав-

нению с контролем. В концентрации 7,5 мкМ процесс ПОЛ был ингибирован на  $40,90 \pm 2,15\%$ , а в концентрации 10 мкМ на  $79,90 \pm 2,59\%$ .



**Рис. 2.** Влияние гексагаллоил-глюкозы (А, Б) и гептагаллоил-глюкозы (В, Г) на процесс ПОЛ в митохондриях, индуцированный  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбатом (\*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$ ;  $n = 3-5$ ).

Контроль –  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбат индуцированные ПОЛ в митохондриях и различные концентрации полифенола, влияющий на ПОЛ.

Таким образом, гексагаллоилглюкоза ингибировала процесс ПОЛ даже в низких концентрациях и проявляла высокие антиоксидантные свойства. Полуингибирующая концентрация гексагаллоил-глюкозы для процесса ПОЛ составила  $IC_{50} = 8,12 \pm 0,38$ .

В последующих экспериментах было изучено влияние различных концентраций полифенола гептагаллоилглюкозы на процесс ПОЛ, индуцированный  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбатом (рис. 2 В, Г). Результаты показали, что гептагаллоилглюкоза в концентрации 2,5 мкМ ингибировала процесс ПОЛ на  $13,3 \pm 2,59\%$  по сравнению с контролем, а в концентрации 5 мкМ – на  $36,8 \pm 1,39\%$ . Установлено, что в концентрации 10 мкМ он ингибировал процесс ПОЛ на  $50,4 \pm 1,27\%$ , а в концентрации 10 мкМ он ингибировал процесс ПОЛ на  $89,4 \pm 1,91\%$  по сравнению с контролем.

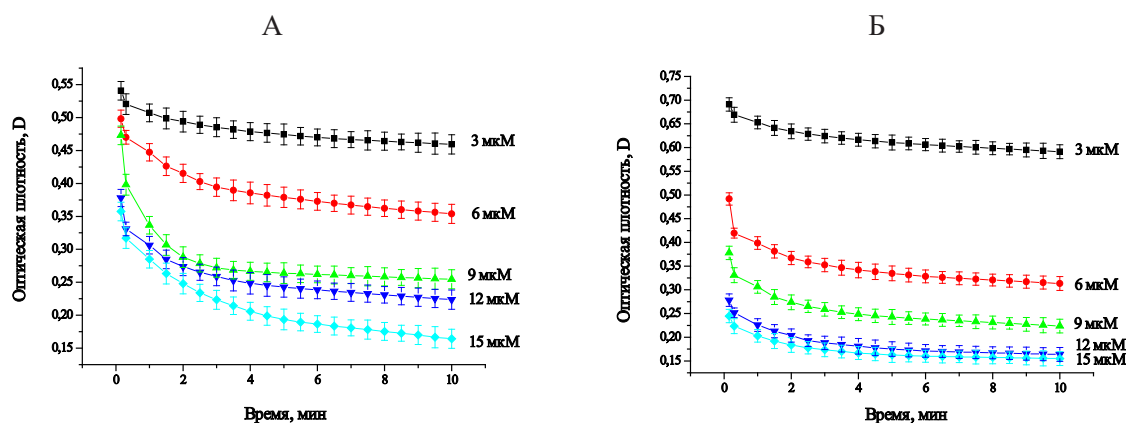
Таким образом, гептагаллоил-глюкозы также проявил высокие антиоксидантные свойства, аналогичные гексагаллоил-глюкозе. При этом, полумаксимальная ингибирующая концентрация гептагаллоил-глюкозы составляла  $IC_{50} = 7,30 \pm 0,24$  мкМ.

Результаты показывают, что оба полифенольные вещества проявляют высокую антиоксидантную активность через систему  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбат. Очевидно, что подобно тому, как  $\text{Fe}^{2+}$ /аскорбат усиливает процесс ПОЛ в митохондриях, он также, как было показано, индуцирует процесс ПОЛ в других клетках и тканях, что приводит к повышению уровня малонового диальдегида, снижению антиоксидантной защиты, повышению уровня супероксиддесмутазы и снижению уровня глутатионпероксидазы. При этом наблюдалась повышенная регуляция воспалительных процессов, акти-

вазией фактора транскрипции NF-κB (энхансер В-клеток - ядерного фактора каппа-легкой цепи), более высокой продукцией интерлейкина-6 и циклоксигеназы-2, а также снижение IκB (ингибитор каппа В-киназы) [13].

В последующих экспериментах антирадикальная активность галлотанинов гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы была исследована на ДФПГ. Изучена кинетика нейтрализации радикала ДФПГ с различными концентрациями полифенола гексагаллоил-глюкозы (рис. 3, А). Результаты показывают, что при изучении влияния гексагаллоил-глюкозы на нейтрализацию радикала ДФПГ в концентрации 3–15 мкМ она нейтрализовала 54,1±3,15% при концентрации полифенола 3 мкМ, тогда как при более высокой концентрации, т.е. 15 мкМ концентрации было обнаружено, что он нейтрализует 83,6±8,83%, демонстрируя высокую антирадикальную активность. Было показано, что полумаксимальная ингибирующая концентрация этого галлотанина составила  $IC_{50}=3,39\pm 1,5$  мкМ. Было обнаружено, что полифенол гептагаллоил-глюкозы (рис. 3, Б) нейтрализует радикал ДФПГ на 46,2±2,45% при концентрации 3 мкМ и на 85,9±9,36% при концентрации 15 мкМ. Полумаксимальная ингибирующая концентрация этого полифенола составила  $IC_{50}=4,80\pm 1,2$  мкМ.

Результаты показывают, что оба исследованных полифенола проявляют высокую антирадикальную активность. По данным литературы, полифенольные вещества, в частности флавоноиды, проявляют более слабую антирадикальную активность [14; 15], было показано, что галло- и эллагитаннины проявляют более высокую антирадикальную активность, чем флавоноиды [15; 16; 17;]. Показано, что полумаксимальная ингибирующая концентрация галло- и эллагитаннинов зависит от количества галлоильных групп и колеблется в пределах 1–15 мкМ, тогда как проявление антирадикальной активности флавоноидов зависит от расположения и количества гидроксильных групп в их структуре.



**Рис. 3.** Изменение относительной оптической плотности раствора ДФПГ (0,1 мМ) в этиловом спирте при добавлении полифенолов гексагаллоил-глюкозы (А) и гептагаллоил-глюкозы (Б). Во всех случаях  $P < 0,05$ ;  $n = 3$ .

Очевидно, что гидролизуемые танины обладают сильными антиоксидантными и антирадикальными свойствами, а также, как было показано, обладают антимикробными, противораковыми и улучшающими липидный обмен свойствами. Подчеркивается, что они снижают окислительный стресс, нейтрализуют свободные радикалы, модулируют антиоксидантные ферменты и подавляют накопление липидов [18].

**Заключение.** Изучены антиоксидантные и антирадикальные свойства гидролизуемых танинов гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы, выделенных из листьев растения *Pistacia vera L.*

Исследования *in vitro* показали, что полифенолы гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы проявляют антиоксидантные свойства, ингибируя ПОЛ, вызванные  $Fe^{2+}$ /аскорбатом в митохондриях печени крыс, и нейтрализуя свободные радикалы ДФПГ. Было обнаружено, что гептагаллоил-глюкоза проявляет более сильные антиоксидантные свойства, чем гексагаллоил-глюкоза, в то время как гексагаллоил-глюкоза проявляет более сильную антирадикальную активность, чем гептагаллоил-глюкоза.

**Вклад авторов.** Г.В. Абдулхакова и Э.Дж. Комилов – проведение лабораторных экспериментов, оформления результатов и написание статьи; Н.А.Эргашев принимал участие в анализе данных и подготовке статьи; Р.Р. Махмудов выделял полифенолов; М.И. Асраров руководил экспериментами, анализировал данные и редактировал статью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Poulaki A., Giannouli S. (2022) Mitochondrial Lipids: From Membrane Organization to Apoptotic Facilitation. *Int. J. Mol. Sci.* 23(7): 3738. DOI: 10.3390/ijms23073738.
2. Ademowo O.S., Dias H.K.I., Burton D.G.A., Griffiths H.R. (2017) Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology.* 18(6): 859–879. DOI:10.1007/s10522-017-9710-z.
3. Angelova P.R., Esteras N., Abramov A.Y. (2021) Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. *Med Res Rev.* 41(2):770-784. DOI: 10.1002/med.21712.
4. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 360438. DOI: 10.1155/2014/360438.
5. Qiu B, Zandkarimi F, Bezjian CT, Reznik E, Soni RK, Gu W, Jiang X, Stockwell BR. (2024) Phospholipids with two polyunsaturated fatty acyl tails promote ferroptosis. *Cell.* 187(5):1177-1190. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2024.01.030.
6. Li S, Zhang G, Hu J, Tian Y, Fu X. (2024) Ferroptosis at the nexus of metabolism and metabolic diseases. *Theranostics.*;14(15):5826-5852. DOI: 10.7150/thno.100080.
7. Xiao M, Zhong H, Xia L, Tao Y, Yin H. (2017) Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 111:316-327. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.363.
8. Schneider W.C., Hogeboom G.H. (1951) Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation. *Cancer. Res.*11(1). P. 1–22.
9. Watters C. (1978) A one-step biuret assay for protein in the presence of detergent *Anal Biochem.* 88(2). P. 695-698. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90475-x.
10. Асраров М.И., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Позилов М.К., Эшбакова К.А., Тошматов З.А., Ташбекова М.Х. (2015) Механизм действия флавона лютеолина на функции митохондрий печени крыс. *Вопр. биол. мед. и фарм. химии.* 12:38-43. // Asrarov M.I., Komilov E.Dj., Ergashev N.A., Pozilov M.K., Eshbakova K.A., Toshmatov Z.A., Tashbekova M.X. (2015) Mexanizm deystviya flavona lyuteolina na funktsii mitoxondriy pecheni kris. *Vopr. biol. med. i farm. ximii.* 12:38-43
11. Починок Т.В., Тараховский М.Л., Портнягина В.А., Денисова М.Ф., Вонсяцкий В.А., Александрова А.Н., Мельничук В.А. (1985) Экспресс-метод определения антирадикальной активности лекарственных веществ. *Хим. Фарм. журн.* 5:565-567. // Pochinok T.V., Tarahovskiy M.L., Portnyagina V.A., Denisova M.F., Vonsyatskiy V.A., Aleksandrova A.N., Melnichuk V.A. (1985) Ekspress-metod opredeleniya antiradikalnoy aktivnosti lekarstvennix veshestv. *Xim. Farm. jurn.* 5:565-567.
12. Baliyan S, Mukherjee R, Priyadarshini A, Vibhuti A, Gupta A, Pandey RP, Chang CM. (2022) Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules.* 27(4):1326. DOI:10.3390/molecules27041326.
13. Yara S, Lavoie JC, Beaulieu JF, Delvin E, Amre D, Marcil V, Seidman E, Levy E. (2013) Iron-ascorbate-mediated lipid peroxidation causes epigenetic changes in the antioxidant defense in intestinal epithelial cells: impact on inflammation. *PLoS One.* 8(5):e63456. DOI:10.1371/journal.pone.0063456.
14. Гайибов У.Г., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Махмудов Р.Р., Эшбакова К.А., Асраров М.И., Арипов Т.Ф. (2019) Антирадикальная активность некоторых флавоноидов. *X-международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация».* Пушино. 128-132. // Gayibov U.G., Komilov E.Dj., Ergashev N.A., Mahmudov R.R., Eshbakova K.A., Asrarov M.I., Aripov T.F. (2019) Antiradikal'naya aktivnost nekotarih flavonoidov. *X-mejdunarodnaya konferentsiya «Retseptori i vnutrikletochnaya signalizatsiya».* Pushino. 128-132.

15. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol.* 47(5):357-362. DOI: 10.3177/jnsv.47.357.
16. Гайибов У.Г., Гайибова С.Н., Комилов Э.Д., Эргашев Н.А., Рахимов Р.Н., Асраров М.И., Арипов Т.Ф. (2018) Антирадикальная активность полифенольных соединений выделенных из растений семейства Euphorbia. *Universum: химия и биология.* 11(53). // Gayibov U.G., Gayibova S.N., Komilov E.D., Ergashev N.A., Rahimov R.N., Asrarov M.I., Aripov T.F. (2018) Antiradikal'naya aktivnost polifenol'nykh soedineniy videnennykh iz rasteniy semeystva Euphorbia. *Universum: ximiya i biologiya.* 11(53). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/6543>.
17. Эргашев Н.А., Исамухамедова Д.Р., Сайфиева Х.Д., Гайибов У.Г., Рахимов Р.Н., Махмудов Р.Р., Асраров М.И. (2023) Антирадикальная активность некоторых гидролизуемых таннинов. *Universum: химия и биология.* 7(109). // Ergashev N.A., Isamuxamedova D.R., Sayfieva X.D., Gayibov U.G., Rahimov R.N., Makhmudov R.R., Asrarov M.I. (2023) Antiradikal'naya aktivnost' nekotorykh gidrolizuemykh tanninov. *Universum: ximiya i biologiya.* 7(109). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/15719>.
18. Marrone G, Di Lauro M, Izzo F, Cornali K, Masci C, Vita C, Occhiuto F, Di Daniele N, De Lorenzo A, Noce A. (2023) Possible Beneficial Effects of Hydrolyzable Tannins Deriving from *Castanea sativa* L. in Internal Medicine. *Nutrients.* 16(1):45. DOI: 10.3390/nu16010045.

#### JIGAR MITOXONDRIYALARIDA GEKSAGALLOIL-GLYUKOZA VA GEPTAGALLOIL-GLYUKOZANING ANTIOKSIDANT VA ANTIRADIKAL HUSUSIYATLARI

G.V. Abdalxqova, E.J. Komilov, N.A. Ergashev, R.R. Makhmudov, M.I. Asrarov

Maqolada *Pistacia vera* L. o'simlik barglaridan ajratilgan geksagalloil-glyukoza va geptagalloil-glyukoza polifenollarining mitoxondriyalarda sodir bo'ladigan Fe<sup>2+</sup>/askorbat bilan chaqirilgan lipidlarning perekisli oksidlanish jarayoniga ta'siri hamda ushbu polifenollarni difenilpikrilgidrazil bo'yicha antiradikalik xossalari baholandi.

**Kalit so'zlar:** geksagalloil-glyukoza, geptagalloil-glyukoza, jigar mitoxondriyalari, LPO, DFPG.

#### ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL PROPERTIES OF HEXAGALLOYL-GLUCOSE AND HEPTAGALLOYL-GLUCOSE IN LIVER MITOCHONDRIA

G.V. Abdulkhakova, E.J. Komilov, N.A. Ergashev, R.R. Makhmudov, M.I. Asrarov

The article evaluates the effect of hexagalloyl-glucose and heptagalloyl-glucose polyphenols isolated from *Pistacia vera* L. leaves on the Fe<sup>2+</sup>/ascorbate-induced lipid peroxidation process occurring in mitochondria, as well as the antiradical properties of these polyphenols against diphenylpicrylhydrazyl.

**Key words:** hexagalloyl-glucose, heptagalloyl-glucose, liver mitochondria, LPO, DPPH.

## ЗООЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ДИНАМИКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ  
АЛЬГОФЛОРЫ НЕКОТОРЫХ ВОДОЕМОВ БУХАРСКОЙ ОБЛАСТИШ.Б. ЖУМАЕВА<sup>1,2</sup>, М.И. МУСТАФАЕВА<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Бухарский государственный медицинский институт, Бухара;<sup>2</sup>Кафедра медицинской биологии, биомедицинский факультет БухГМИ

Автор для переписки: mamlakatm@mail.ru

Представлены данные по оценке основных характеристик фитопланктона в исследованных участках поверхностных водоемов Бухарской области, поскольку они во многом определяют внешний вид водоемов. Видовой состав водорослей водоемов в Узбекистане и Центральной Азии определяется гидрологическими и гидрохимическими характеристиками водоемов. Полученный материал может быть использован для практического применения в сельском хозяйстве и других отраслях.

**Ключевые слова:** Экология, поверхностные водоемы, гидробиология, фитопланктон, водный ресурс, общая численность и биомасса фитопланктона.

**Введение.** Роль гидробионтов в жизни различных водоемов огромна. Они принимают участие в круговороте вещества и энергии, в накоплении донных отложений, а также имеют большое медико-социальное значение из-за использования многочисленных поверхностных водоемов для хозяйственно-питьевых и культурно-бытовых целей [1, 3]. По этой причине определение фитопланктона является обязательным по О'zDSt 950-2011 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством» (ГОСТ) и О'zDSt 951-2011 «Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора» (ГОСТ) [11, 12].

**Целью работы** настоящего исследования явилось изучение и оценка характеристик фитопланктона в исследованных участках поверхностных водоемов Бухарской области.

**Материалы и методы.** Нами были исследованы поверхностные водоемы Бухарской области - водохранилище Тудакуль и Куюмазарское водохранилище, используемые в хозяйственно-питьевых, культурно-бытовых и ирригационных целях. Исследования проведены весной и летом 2023-2024 года. Были исследованы 23 проб, взятых с разных мест указанных водоемов.

В биологических исследованиях наиболее надежным и приемлемым методом отбора проб фитопланктона из воды поверхностных водоемов считается батометрический метод.

Для качественного сбора фитопланктона применяли планктонную сеть из шелкового газа №76. Для «мягкой» фиксации проб фитопланктона использовали раствор Люголя (до слабозелтого цвета) с последующим добавлением 40%-ного формалина (10 мл 40%-ного формалина для 0,5 л пробы).

Сбор проб фитопланктона проводился по общепринятым альгологическим методикам [4, 7], для идентификации видового состава микроводорослей использовали определители [9, 10].

Отобранная в полиэтиленовую бутылку проба фиксировалась 40%-ным формалином и раствором Люголя, снабжалась этикеткой (номер пробы, дата, водный объект, кем взята, в присутствии кого взята проба). Стандартные горизонты отбора проб воды составляли: 0 (поверхность); 0,5; 1,0; 2,5; 5 м.

В условиях для проб фитопланктона использовался осадочный метод.

Количественную обработку материала проводили по общепринятой альгологической методике в камере Горяева объемом (0,001 мм<sup>3</sup>) или в камере Фукса-Розенталя объемом (3,2 мм<sup>3</sup>). Дальнейшие исследования проводились в лаборатории с использованием светового микроскопа МЕИЛ.

Биомасса изученного фитопланктона определялась общепринятым расчетным способом [3, 8].

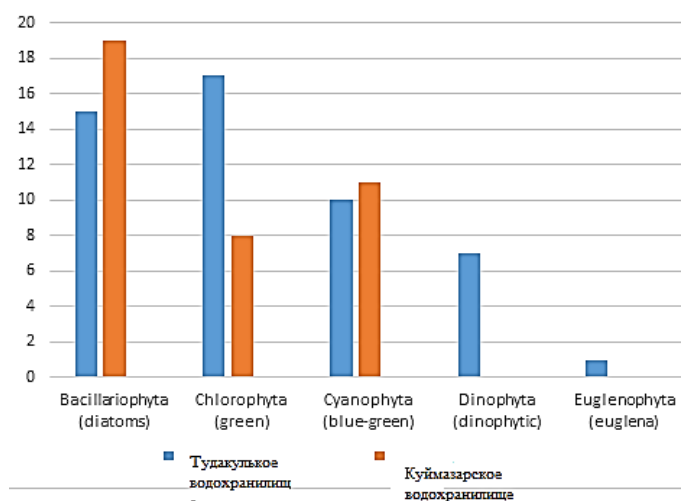
В ходе исследований определяли нижеследующие качественные и количественные характери-

стики фитопланктона: видовой состав фитопланктона; число видов в каждой основной группе; таксономический состав фитопланктона; численность и биомасса видов и основных групп фитопланктона - численность клеток  $\times 10^3$ .

**Результаты и обсуждение.** Пробы фитопланктона из озера Тудакуль и Куюмазарского водохранилища отбирали соответствующими методами. В ходе рекогносцировочного выезда были отобраны пробы фитопланктона, в которых обнаружено 89 видов, разновидностей и форм водорослей: диатомовых (*Bacillariophyta*) - 35 видов; зеленых (*Chlorophyta*) - 25 видов; сине-зеленых (*Cyanophyta*) - 22 вида; динофитовых (*Dinophyta*) - 7 видов; эвгленовых (*Euglenophyta*) - 1 вид.

Наиболее высокую общую численность фитопланктона в пробах воды обоих водоемов составили *Cyanophyta*, а наибольшая биомасса фитопланктона отмечена у *Bacillariophyta* и *Chlorophyta*. При этом *Euglenophyta* и *Dinophyta* в водах Куюмазарского водохранилища не обнаружены.

Таксономическая структура фитопланктона водоемов Бухарской области представлена на рис. 1.



**Рис. 1.** Таксономическая структура фитопланктона исследованных участков водоемов Бухарской области.

Доминантный комплекс фитопланктонных сообществ исследованных участков озера Тудакуль и Куюмазарского водохранилища был представлен в основном продуцентами. Среди них наибольшего развития и разнообразия достигли диатомовые водоросли, зеленые и сине-зеленые водоросли, а также с невысоким обилием (1-5 видов) отмечены динофитовые и эвгленовые водоросли.

Диатомовые (*Bacillariophyta*) и зеленые (*Chlorophyta*) водоросли в пробах озера Тудакуль выявлялись чаще, чем другие: соответственно 13 (31,0%) и 14 (33,3%) видов.

Сине-зеленые водоросли (*Cyanophyta*) в пробах фитопланктона исследованных участков данного водоема представлены слабо, всего 9 видами, что составило 21,43% от общего числа видов. Преобладали широко распространенные планктонные колониальные и нитчатые формы водорослей родов *Merismopedia*, *Microcystis*, *Gloeocapsa*, *Gomposphaeria* и виды семейства *Oscillatoriaceae*.

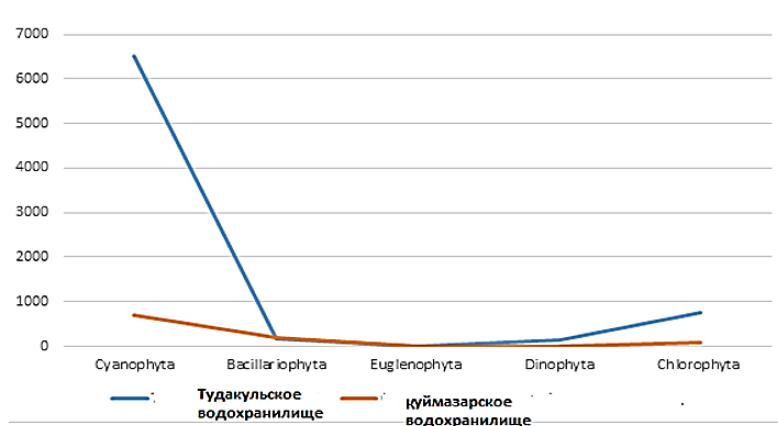
Наиболее показательное количественное развитие сине-зеленых водорослей (*Cyanophyta*) отмечено в пробе из озера Тудакуль. Численность сине-зеленых здесь в пробе составила  $6500,00 \pm 15,01 \times 10^3$  кл/л, а биомасса - 58,694 мг/л. Наименьшее развитие сине-зеленых водорослей отмечено в пробе из Куюмазарского водохранилища: численность -  $706,250 \pm 5,12 \times 10^3$  кл/л при биомассе 11,150 мг/л (табл., рис. 3, рис. 4).

По таксономическому разнообразию диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) занимали доминирующее положение в пробах фитопланктона (34 видов, 45,33%) исследованных открытых водоемов.

В июньских пробах фитопланктона озера Тудакуль преобладали планктонные пресноводно-солонатоводные формы б-мезосапробные виды родов *Melosira*, *Cyclotella*, *Fragilaria*, *Synedra*. В пробе фитопланктона Куюмазарского водохранилища преобладали солонатоводные (мезогалобы) б- и б-α-мезосапробные формы водорослей из родов *Cocconeis*, *Achnanthes*, *Gyrosigma*, *Amphiprora*, *Navicula*, *Bacillaria*, *Nitzschia* (рис. 2).

**Количественное развитие фитопланктона исследованных участков водоемов  
Бухарской области (численность клеток  $\times 10^3$ )**

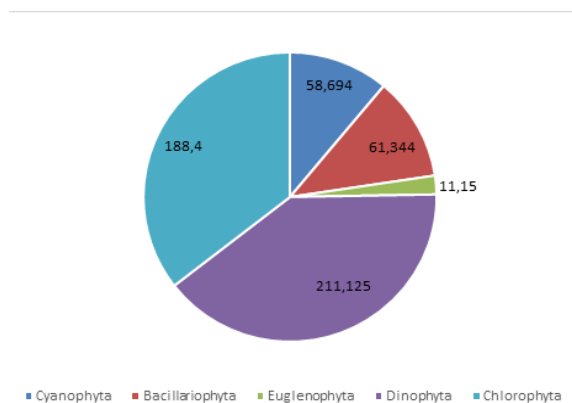
Таксон	Тудакульское водохранилище	Куюмазарское водохранилище
<i>Cyanophyta</i> (сине-зеленые)	6500,00 $\pm$ 15,01	706,250 $\pm$ 5,12
<i>Bacillariophyta</i> (диатомовые)	162,500 $\pm$ 8,12	193,750 $\pm$ 7,10
<i>Euglenophyta</i> (эвгленовые)	12,500 $\pm$ 3,05	0
<i>Dinophyta</i> (динофитовые)	150,625 $\pm$ 11,05	0
<i>Chlorophyta</i> (зеленые)	756,250 $\pm$ 6,10	87,500 $\pm$ 4,15
Общая численность клеток $\times 10^3$ кл/л	7581,875	987,500



**Рис. 2.** Количественное развитие планктона на изученных участках ( $10^3$  количество клеток).

При единичной встречаемости диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) из-за больших размеров клеток составляли большую биомассу. Численность диатомовых в пробах составила  $162,500 \pm 8,12 \times 10^3$  кл/л и  $193,750 \pm 7,10 \times 10^3$  кл/л, а биомасса соответственно - 61,344 мг/л и 187,800 мг/л.

Зеленые водоросли (*Chlorophyta*) в пробах исследованных водоемов представлены умерено - 20 видов или 26,67%, форм и разновидностей, которые в основном представлены широко - распространенными б-мезосапробными видами из родов *Ankistrodesmus*, *Oocystis*, *Chlorella*, *Chlamidomonas*, *Scenedesmus*, *Cosmarium* и др. Численность зеленых водорослей в пробах фитопланктона составила  $756,250 \pm 6,10 \times 10^3$  кл/л и  $87,500 \pm 4,15 \times 10^3$  кл/л, а биомасса соответственно - 188,400 мг/л и 31,500 мг/л.

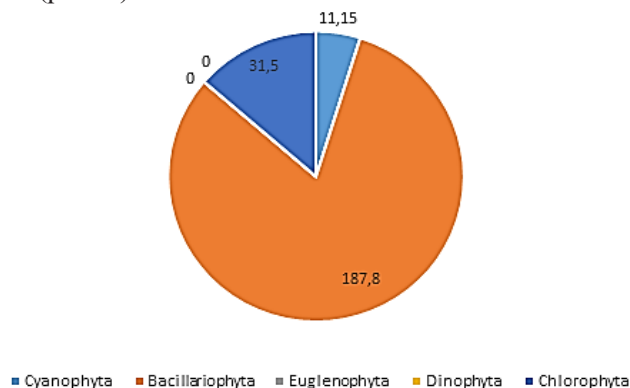


**Рис. 3.** Количественное развитие фитопланктона на изученных участках водоемов Бухарской области (биомасса, мг/л).

В пробах фитопланктона из озера Тудакуль отмечено хорошее развитие динофитовых водорослей - *Dinophyta* (5 видов), которые представлены в основном родами *Glenodinium*, *Peridinium* и с

единичной встречаемостью отмечены эвгленовые - *Thahelomonas*. Численность динофитовых водорослей составила  $150,625 \pm 11,05 \times 10^3$  кл/л, а биомасса - 211.125 мг/л. При этом динофитные и эвгленовые водоросли в пробах воды Куюмазарского водохранилища не обнаружены (рис. 3).

В то же время в пробах воды Куйимазарского водохранилища не были обнаружены динофитные и эвгленофитовые водоросли (рис. 4).



**Рис. 4.** Количественное развитие фитопланктона на изученных участках Куйимазарского водохранилища (биомасса, мг/л).

Видовой состав водорослей биологических прудов очистных сооружений г. Бухара имеет некоторую общность с флорой прудов Узбекистана и Средней Азии. Начнем наши сопоставления прудов Узбекистана и Средней Азии. При сравнении флоры водорослей в биологических прудах очистных сооружений с некоторыми другими местами Узбекистана и Средней Азии можно видеть, что она имеет много общего с флорой других регионов.

Качественный и количественный состав водорослей в прудах рыбхоза Калган Чирчик Ташкентской области, а также периодичность его развития по сезонам года был изучен П.Н. Саксен (1965) и определено 522 таксона, из которых сине-зеленых – 87, золотистых – 6, диатомовых – 209, динофитовых – 6, эвгленовых – 37, желтозеленых – 4, зеленых – 172.

В списке обнаруженных водорослей рыбхоза Калган Чирчик, 56 видов водорослей аналогичны нашим исследованиям. Так, например, *Merismopedia punctata*, *Gomphosphaeria lacustris*, *Pediastrum duplex*, *P.simplex*, *Tetraedron minimum*, *Ankistrodesmus densus*, *Scenedesmus acuminatus*, *Pandoriuna torum* и другие обнаружены также весной, летом и осенью в биологических прудах очистных сооружений г. Бухара. Изучая альгофлору в прудах колхоза имени Сабира Рахимова Денауского района Сурхандарьинской области А.Э. Эргашев (1974) обнаружил 111 видов и форм водорослей, из них синезеленые – 17, диатомовые – 77, эвгленовые – 1, зеленые – 16.

Выше, из указанных видов 24 были обнаружены в биологических прудах очистных сооружений г. Бухары: *Oscillatoria amoena*, *O.amphibia*, *O.tenuis*, *Achnanthes lanceolata*, *Cumbella affinis*, *Navicula cincta*, *Dictyospsvaerium pulchellum*, *Scenedesmus acuminatus*, *Stigeoclonium tenue* и другие.

Также А.Э. Эргашевым (1974) была изучена альгофлора прудов колхоза им. Калинина Яккабагского района Кашкадарьинской области. В результате обработки собранного альгологического материала найдено 118 таксонов, из них синезеленые – 38, диатомовые – 68, эвгленовые – 12, зеленые – 2.

Сходных нашими видами оказалось 32: *Oscillatoria lacteirens*, *O.grinceps*, *O.woronichinii*, *Phormidium tenue*, *Gloecapsa tarrgida*, *mastogloia smittii*, *M.baltica*, *Nitzshia sigina*, *N. Signoidea*, *N.trublionella*, *Euglena oxyuris*, *Chlorella vulgaris* и другие.

Полученная гидробиологическая информация по исследованным водоемам Бухарской области свидетельствует о том, что антропогенные факторы, особенно загрязнение, вызывают изменения в составе, структуре и экологическом состоянии водных биоценозов различной глубины, выражающиеся в смене доминирующих комплексов организмов, упрощении экологической структуры, появлении сапробных видов.

**Выводы.** В пробах фитопланктона, взятых соответствующими методами из водоёмов Тудакульского и Куюмазарского водохранилищ было обнаружено 89 видов разновидностей и форм

водорослей: чаще всего встречались диатомовые водоросли *Bacillariophyta* - 34 вида, зеленые водоросли *Chlorophyta* - 25 видов, сине-зеленые водоросли *Cyanophyta* - 22 вида, реже динофитовые - *Dinophyta* - 7 видов и эвгленовые *Englenophyta* – всего 1 вид. Наиболее высокую общую численность фитопланктона в пробах воды обоих водоемов составили *Cyanophyta*, а наибольшая биомасса фитопланктона отмечена у *Bacillariophyta* и *Chlorophyta*. При этом *Englenophyta* и *Dinophyta* в водах Куюмазарского водохранилища не обнаружены.

**Финансирование.** Данное исследование было проведено при поддержке программы, созданной в соответствии с законом Республики Узбекистан «О государственном контроле за использованием и охраной вод».

**Вклад авторов:** Ш.Б. Жумаева и М.И. Мустафаева: проведение и дизайн экспериментов, анализ данных, подготовка статьи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алматов Б.И., Нуралиев Н.А., Курбанова С.Ю. Посезонная динамика изменения микробного состава воды некоторых водохранилищ Узбекистана // Микробиологичний журнал. - Киев, Украина, 2016. - Том 78. - №2. - С.95-102. // Almatov B.I., Nuraliev N.A., Kurbanova S.Yu. Posezonnaya dinamika izmeneniya mikrobnogo sostava vodi nekotorig vodoxranilish Uzbekistana // Mikrobiologichniy jurnal. - Kiev, Ukraina, 2016. - Tom 78. - №2. - S.95-102.
2. Гинатуллина Е.Н. Зоопланктон трансформированных минерализованных озер Узбекистана: диссертация на соискание ученой степени к.б.н., LAP Lampert Academic Publishing, Saarbruecken, 2013. - 141 с. // Ginatullina Ye.N. Zooplankton transformirovannix mineralizovannix ozer Uzbekistana: dissertatsiya na soiskanie uchenoy stepeni k.b.n., LAP Lampert Academic Publishing, Saarbruecken, 2013. - 141 с.
3. Мустафаева М.И., Гафаров С.М. Биоэкологическая характеристика водорослей биологических прудов города Бухары // Ученый XXI века. - 2016. - № 5-4 (18). - С.15-17. // Mustafaeva M.I., Gafarov S.M. Bioekologicheskaya karakteristika vodorosley biologicheskix prudov goroda Buxari // Ucheniy XXI veka. - 2016. - № 5-4 (18). - S.15-17.
4. Мустафаева З.А., Мирзаев У.Т., Камиллов Б.Г. Методы гидробиологического мониторинга водных объектов Узбекистана // Методическое пособие. - Ташкент, Навруз. - 2017. - 112 с. // Mustafaeva Z.A., Mirzaev U.T., Kamilov B.G. Metodi gidrobiologicheskogo monitoringa vodnix ob'ektov Uzbekistana // Metodicheskoe posobie. - Tashkent, Navruz. - 2017. - 112 s.
5. Нуралиев Н.А., Гинатуллина Е.Н., Алматов Б.И. Методические указания по гидробиологическому анализу водных объектов питьевого и рекреационного назначения // Методические указания №012-3/0269. - Ташкент, 2015. - 28 с. // Nuraliev N.A., Ginatullina Ye.N., Almatov B.I. Metodicheskie ukazaniya po gidrobiologicheskomu analizu vodnix ob'ektov pitevogo i rekreatsionnogo naznacheniya // Metodicheskie ukazaniya №012-3/0269. - Tashkent, 2015. - 28 s.
6. Нуралиев Н.А., Сагдуллаева Б.О. Теоретические и практические основы санитарной микробиологии // Учебно-методическое пособие. - Ташкент, 2014. - 45 с. // Nuraliev N.A., Sagdullaeva B.O. Teoreticheskie i prakticheskie osnovi sanitarnoy mikrobiologii // Uchebno-metodicheskoe posobie. - Tashkent, 2014. - 45 s.
7. Тальских В.Н. Методы гидробиологического мониторинга водных объектов региона Центральной Азии // Методические рекомендации. – Ташкент, 1997. - 53 с. // Talskix V.N. Metodi gidrobiologicheskogo monitoringa vodnix ob'ektov regiona sentralnoy Azii // Metodicheskie rekomendatsii. – Tashkent, 1997. - 53 s.
8. Федоров В.Д., Капков В.И. Практическая гидробиология пресноводных экосистем. - Москва, МГУ, 2006. - 365 с. // Fedorov V.D., Kapkov V.I. Prakticheskaya gidrobiologiya presnovodnix ekosistem. - Moskva, MGU, 2006. - 365 s.
9. Халилов С.А., Шоякубов Р.Ш., Темиров А., Тожибаев Т.Ж., Казирахимова Н.К. Улотриксковые водоросли Узбекистана. - Наманган, 2012. - 216 с. // Xalilov S.A., Shoyakubov R.Sh., Temirov A., Tojibaev T.J., Kaziraximova N.K. Ulotriksovie vodorosli Uzbekistana. - Namangan, 2012. - 216 s.
10. Халилов С.А., Шоякубов Р.Ш., Мустафаева З.А., Эргашева Х.Э., Каримов Б.К., Тожибаев Т.Ж., Алимжанова Х.А. Определитель вольвоксовых водорослей Узбекистана. - Наманган, 2014. - 215

- с. // Xalilov S.A., Shoyakubov R.Sh., Mustafaeva Z.A., Ergasheva X.E., Karimov B.K., Tojibaev T.J., Alimjanova X.A. *Opredelitel volvoksovix vodorosley Uzbekistana*. - Namangan, 2014. - 215 s.
11. O'zDSt 950-2011 «Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством» // O'zDSt 950-2011 «Voda pitevaya. Gigienicheskie trebovaniya i kontrol za kachestvom».
12. O'zDSt 951-2011 «Источники централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения. Гигиенические, технические требования и правила выбора» // O'zDSt 951-2011 «Istochniki sentralizovannogo hozyaystvenno-pitevogo vodosnabjeniya. Gigienicheskie, texnicheskie trebovaniya i pravila vibora».

#### BUXORO VILOYATINING AYRIM SUV OMBORLARIDA ALGOFLOLANING BIOLOGIK XILMA-XILLIGINING TARKIBIY DINAMIKASINI O'RGANISH

Sh.B. Jumaeva, M.I. Mustafaeva

Maqolada Buxoro viloyati ochiq suv omborlarining tadqiq etilgan ob'ekt nuqtalarida fitoplanktonning asosiy xususiyatlarini baholash bo'yicha ma'lumotlar keltirilgan. Suv omborlarining suv o'tlari o'rganildi, chunki ular ko'p jihatdan turli ob'ektlardagi ko'rinishni aniqlandi. Suv havzalaridagi suv o'tlarining tur tarkibi O'zbekiston va Markaziy Osiyodagi boshqa suv havzalari o'rtasidagi farq ajablanarli emas, chunki suv havzalarining gidrologik va gidrokimyoviy xususiyatlari flora tarkibiga ta'sir qiladi, bu ularni qishloq xo'jaligi va boshqa sohalarda amaliy qo'llashning nazariy imkoniyatlarini asoslaydi.

**Kalit so'zlar:** ekologiya, ochiq suv omborlari, gidrobiologiya, fitoplankton, suv resurslari, fitoplanktonning umumiy soni va biomassasi.

#### THE STUDY OF THE STRUCTURAL DYNAMICS OF THE BIOLOGICAL DIVERSITY OF ALGOFLORA IN SOME RESERVOIRS OF THE BUKHARA REGION

Sh.B. Jumaeva, M.I. Mustafaeva

The article presents data on the assessment of the main characteristics of phytoplankton in the studied areas of surface reservoirs of the Bukhara region. Algae of reservoirs have been studied, since they largely determine the appearance in various objects. The difference in the species composition of algae in reservoirs from other reservoirs in Uzbekistan and Central Asia is not surprising, since the hydrological and hydrochemical characteristics of reservoirs affect the composition of the flora, which substantiates the theoretical possibility of their practical application in agriculture and other industries.

**Keywords:** Ecology, surface reservoirs, hydrobiology, phytoplankton, water resource, total abundance and biomass of phytoplankton.

## МУНДАРИЖА

Kalamush embrioni hepatotsitlari hujayra kulturasining ko‘chirib o‘tkaziladigan liniyasi.....	3
Z.S. Khashimova, M.K. Salakhutdinova, K.A. Kaxhorova, Yu. I. Oshchepkova, Sh.I. Salikhov	
2-toifa qandli diabet rivojlanishida tarmoqlangan zanjirli aminokislotalarning roli .....	7
Y.A. Say, V.E. Soy, D.N. Kurmaeva, Sh.J. Nuriddinov, Z.Yu. Xalimova, D.A. Dalimova	
SARS-COV-2 koronavirus infeksiyasining homiladorlikning tushishi bilan bog‘liqligi bo‘yicha so‘rovnoma ma’lumotlariga asoslangan tadqiqot .....	12
A.A. Abdurahimov, Yu.A. Kapralova, Z.M.Mirakbarova, A.I.Rahmatullaev, M.B. Nazirova, G.G. Atamurotova, Sh.O. Rahmatova, F.P. Nishanova, A.A. Abdullaev, Sh.U. Turdikulova	
Neonatal kalamushlarning kardiomyositlari qisqarish faolligiga noorganik polifosfatlar va ATFning ta’siri.....	17
G.V. Maksimcheva, X.R. Rustamov, R.Z. Sabirov, A.Y. Baev	
BAC-TO-BAC platformasidan foydalangan holda o‘zida GFP genini saqlagan rekombinant bakulovirus olish.....	23
Sh.Sh. Hasanov, A.H.Mardonov, M.Sh. Shukurjonov, N.A. Toshova, D.B. Turdaliyev, J.M. Abduraxmanov, O.N. Ashirov, S.A. Sasmakov, Sh.S. Azimova	
Vaksina sifatida qo‘llash uchun stabillashtirilgan SARS-COV-2 tojdor va dimer RBD oqsillarining CHO hujayralaridagi solishtirma ekspressiyasi .....	28
M. Muminov, N. Tsiferova, E. Pshenichnov, O. Charishnikova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov, S. Bozorov, Y. Levitskaya, D. Dalimova, A. Abdullaev, Sh. Turdikulova	
Jigar mitoxondriyalarida geksagalloil-glyukoza va geptagalloil-glyukoza ning antioksidant va antiradikal hususiyatlari .....	33
G.V. Abdulxaqova, E.J. Komilov, N.A. Ergashev, R.R. Maxmudov , M.I. Asrarov	
Buxoro viloyatining ayrim suv omborlarida algofloraning biologik xilma-xilligining tarkibiy dinamikasini o‘rganish .....	39
Sh.B. Jumaeva, M.I. Mustafaeva	

## СОДЕРЖАНИЕ

Перевиваемая линия культуры клеток гепатоцитов из эмбрионов крыс .....	3
З.С. Хашимова, М.К. Салахутдинова, К.А. Кахорова, Ю.И. Ощепкова, Ш.И. Салихов	
Роль разветвлённых аминокислот в развитии сахарного диабета 2 типа .....	7
Е.А. Цай, В.Э. Цой, Д.Н. Курмаева, Ш.Ж. Нуриддинов, З.Ю. Халимова, Д.А. Далимова	
Исследование корреляции инфекции коронавируса SARS-COV-2 с выкидышем на основе данных анкетирования .....	12
А.А. Абдурахимов, Ю.А. Капралова, З.М. Миракбарова, А.И. Рахматуллаев, М.Б. Назирова, Г.Г. Атамуротова, Ш.О. Рахматова, Ф.П. Нишанова, А.А. Абдуллаев, Ш.У. Турдикулова	
Влияние неорганических полифосфатов и АТФ на сократительную активность кардиомиоцитов неонатальных крыс .....	17
Г.В. Максимчева, Х.Р. Рустамов, Р.З. Сабиров, А.Ю. Баев <sup>3</sup>	
Получение рекомбинантного бакуловirusа, содержащего ген GFP, с использованием платформы VAC-TO-VAC .....	23
Ш.Ш. Ҳасанов, А.Х. Мардонов, М.Ш. Шукуржонов, Н.А. Тошова, Д.Б. Турдалиев, Ж.М. Абдурахманов, О.Н. Аширов, С.А. Сасмаков, Ш.С. Азимова	
Сравнительная экспрессия стабилизированных белков шипа SARS-COV-2 и димерного RBD в клетках СНО для вакцинных применений .....	28
М. Муминов, Н. Циферова, Е. Пшеничнов, О. Чарышникова, В. Цой, А. Абдурахимов, С. Бозоров, Ю. Левицкая, Д. Далимова, А. Абдуллаев, Ш. Турдикулова	
Антиоксидантные и антирадикальные свойства полифенолов гексагаллоил-глюкозы и гептагаллоил-глюкозы .....	33
Г.В. Абдулхакова, Э.Ж. Комилов, Н.А. Эргашев, Р.Р. Махмудов, М.И. Асраров	
Изучение структурной динамики биологического разнообразия альгофлоры некоторых водоемов Бухарской области .....	39
Ш.Б. Жумаева, М.И. Мустафаева	

## CONTENTS

Continuous cell culture line of hepatocytes from rat embryos .....	3
Z.S. Khashimova, M.K. Salakhutdinova, K.A. Kaxhorova, Yu. I. Oshchepkova, Sh.I. Salikhov	
The role of branched-chain amino acids in the development of type 2 diabetes .....	7
E.A. Tsay, V.E. Tsoy, D.N. Kurmaeva, Sh.J. Nuriddinov, Z.Yu. Xalimova, D.A. Dalimova	
Study of the correlation between SARS-COV-2 coronavirus infection and miscarriage based on questionnaire data .....	12
A.A. Abdurakhimov, Yu.A. Kapralova, Z.M. Mirakbarova, A.I. Rakhmatullaev, M.B. Nazirova, G.G. Atamurotova, Sh.O. Rakhmatova, F.P. Nishanova, A.A. Adullaev, Sh.U. Turdikulova	
The effect of inorganic polyphosphates and ATP on the contractile activity of neonatal rat cardiomyocytes .....	17
G.V. Maksimcheva, K.R. Rustamov, R.Z. Sabirov, A.Y. Baev	
Obtaining a recombinant baculovirus containing the GFP gene using the BAC-TO-BAC platform .....	23
Sh.Sh. Khasanov, A.H. Mardonov, M.Sh. Shukurjonov, N.A. Toshova, D.B. Turdaliyev, J.M. Abdurakhmanov, O.N. Ashirov, S.A. Sasmakov, Sh.S. Azimova	
Comparative expression of stabilized SARS-COV-2 spike and dimeric RBD proteins in CHO cells for vaccine applications .....	28
M. Muminov, N. Tsiferova, E. Pshenichnov, O. Charishnikova, V. Tsoy, A. Abdurakhimov, S. Bozorov, Y. Levitskaya, D. Dalimova, A. Abdullaev, Sh. Turdikulova	
Antioxidant and antiradical properties of hexagalloyl-glucose and heptagalloyl-glucose in liver mitochondria .....	33
G.V. Abdulkhakova, E.J. Komilov, N.A. Ergashev, R.R. Makhmudov, M.I. Asrarov	
The study of the structural dynamics of the biological diversity of algoflora in some reservoirs of the Bukhara region .....	39
Sh.B. Jumaeva, M.I. Mustafaeva	

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:

Непентес  
Непентес  
*Nepenthes clipeata*