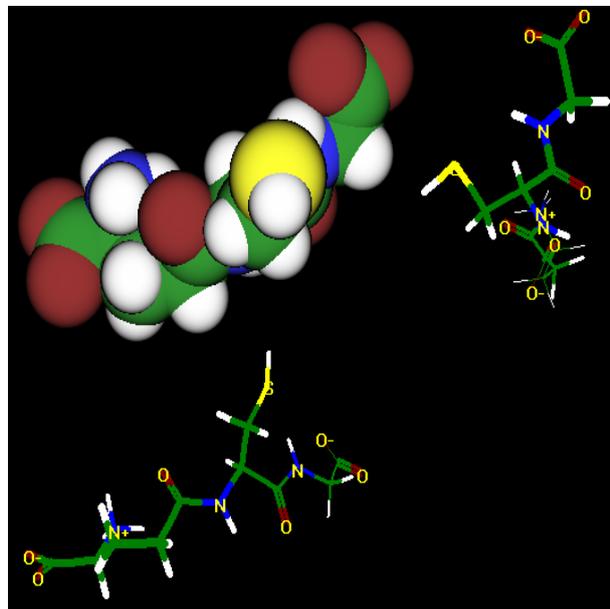


**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**НАМАНГАН МУХАНДИСЛИК –ТЕХНОЛОГИЯ
ИНСТИТУТИ**

МЕЛАНОВА НАЗИРА РАШИДОВНА

**ҲУЖАЙРАЛАРДАН ГЛУТАТИОН МОДДАСИНИНГ
ЧИҚИШ ТИЗИМИ**



Наманган – 2018

Меланова Н.Р. Хужайралардан глутатион моддасининг чиқиш тизими (Монография).-Наманган, 2018. 100 бет

УДК 577.353.4

Монографияда антиоксидант глутатион моддасининг хужайрадагт биосентиизи, функциялари, ва турли хил хужайралардан чиқиш тизими нормал ҳамда гиппоосмотик стресс шароитларида ўрганилган.

Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида тирик хужайра цитоплазмасидаги метаболитлар ва уларнинг бирламчи мессенжер сигнал молекулалар сифатидаги роли тадқиқ қилинмоқда. Булардан бири – глутатион (GSH) – трипептид (гамма-глутамилцистеилглицин) тузилишига эга бўлиб, барча тирик хужайраларда учрайдиган эркин тиол ва қуйи молекуляр антиоксидант ҳисобланади. У бир қанча биологик жараёнларда иштирок этиб, ксенобиотикларни қайтарилишини таъминлайди, гидропероксидаза фаоллигини бартараф этади ва цитозол оқсилларидаги сульфидрил группаларнинг қайтарилган ҳолатини сақлаб туришида иштирок этади

Монография физиология ва биофизика соҳасида, жумладан биология таълим йўналиши бакалаврият талабалари ва биофизика, одам ва ҳайфонлар физиологияси йўналиши магистрантларини биофизика, хужайра ички сигналлаш механизмлари фанларини ўрганиш учун мулжалланган.

Масъул муҳаррир:

Тақризчилар:

Биология фанлари доктори,

Батошов Авазбек Рисқулович (НамДУ)

Кимё фанлари доктори

Боймирзаев Азамат Йўлчиевич (НамМТИ)

Монография “Манзарали боғдорчилик ва кўкаламзорлаштириш” кафедрасининг 2018 йил _____ даги _____ сонли ва “Кимёвий технология” факультетининг 2018 йил _____ даги _____ сонли баённомаларида кўриб чиқилган ва ўқув-услубий кенгашга тавсия этилган.

Монография муҳандислик-технология институти ўқув-услубий Кенгашининг 2018 йил _____ даги _____ сонли йиғилишида муҳокама этилиб, чоп этишга рухсат этилган.

ҚИСҚАРТМА СЎЗЛАР РЎЙХАТИ

1. ABC –(ATP-binding cassette (ABC) membrane proteins)- мембрана оксиллари АТФаза
2. ABCС/MRP – мембрана оксили АТФаза, АТФ гидролизи ҳисобига хужайрадан органик анионларни ташийди
3. ВАРТА – 1,2-бис (О-аминофенокс)этан-N,N,N,N,-тетраацетат кислота
4. Bpt1p, (bile pigment transporter-1) – сафро пигменти транспортери
5. CFT1 – хужайра культураси (цистик фиброз билан оғриган беморлардан олинган)
6. CFTR – цистик фиброз транспорт регулятори
7. DCPIВ – 4-(2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил 1-индан-1-он-5-ил) оксимой кислотаси
8. DMSO – диметилсульфоксид
9. DTNB – 5,5-дитиобис 2-нитробензой кислота
10. FasL (Fas ligand) – Трансмембрана оксили
11. Fas-СДС ва АРО-1 – апоптоз рецепторлар
12. GSH – глутатион (гамма-глутамилцистеилглицин)
13. GSSH – глутатион дисульфид
14. HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N,-2-этан-сульфон кислота
15. Hgt1p (high affinity glutathione transporter in yeast) – ачитки замбуруғида глутатион ташувчи транспортерлар
16. Jurkat – одам лейкоминия касалигида Т - лимфоцит хужайралари линияси
17. MES – 2-(морфолино)этан сульфон кислотаси
18. MRP – (multidrug resistance associated proteins)- турли хил дори моддаларга қаршилик қилувчи оксиллар гуруҳи
19. NADPH – никотинадениндинуклеотид фосфат
20. NMDA – N-метил-D-аспартат

21. PPB – 5 нитро-2-3 -фенилпропиламинобензой кислота
22. Raji хужайралари – ташқи фосфатиделсерин кам бўлган лимфоцит хужайраси
23. RVD – регулятор ҳажм камайиши
24. RyR1 – рианодин рецептори
25. SITS – 4-ацетамидо-4-изотиоцианатостилбен-2,2-дисульфокислота
26. SLC22A/OAT – мембрана оксили анионлар, учун натрийга боғлиқ транспортёрлар гуруҳи
27. SLCO/OATP – органик анион ташувчи полипептид
28. TNB – 5-тиобис 2-нитробензой кислота
29. *TNF- α* , (*tumor necrosis factor*) – ўсма некрози омили
30. Ycf1p (yeast cadmium factor-1.) – ачитқида кадмий омили
31. АТФ – аденозинтрифосфат
32. дб-цАМФ – дибутирил-ц-АМФ
33. ДНК – дезоксирибонуклеин кислота
34. МК571 – сулфинперозон ва пробенецид
35. НМДГ – N-метил-D-глутамин
36. ц-АМФ – циклик аденозинмонофосфат
37. ЭГТА – этиленгликоль-бис-аминоэтилтетраацетат кислота
38. ЭДТА – этилендиаминтитраацетат кислота

КИРИШ

Жаҳонда бугунги кунда аутокрин ва паракрин сигнал узатилиши жараёнида бирламчи мессенжер сифатида хужайра ички метаболитларининг иштирокини аниқлашга бағишланган тадқиқотлар сони ортиши кузатилмоқда. Жумладан, бу йўналишда бажарилган тадқиқотлар орасида АТР ва глутамат кислоталарининг ролини тадқиқ этишга катта эътибор қаратилмоқда. Маълумки, барча тирик хужайралар АТР молекуласини энергия манбаи сифатида турли биологик жараёнларда ишлатади. Лекин, оз миқдордаги АТР хужайрадан ташқарисига турли физиологик ҳолатларда чиқарилади. Деярли барча турдаги хужайралар сатҳида АТРни специфик тарзда боғловчи пуринэргик P_2 рецепторлар мавжуд бўлиб, хужайрадан чиққан АТР шу рецепторлар билан боғланади ва натижада сигнал хужайра ичкарасига узатилади. Глутамат кислотаси ҳам хужайра ички метаболити бўлибгина қолмай, балки хужайра ташқарисига чиқарилади ва глутаматэргик ионотроп ва метаботроп рецепторлар орқали хужайралараро сигнал узатилишида иштирок этади. Пуринэргик ва глутаматэргик сигнал узатилиши турли хил физиологик ва патофизиологик ҳолатларда буйрак, юрак ва мия тўқималарда катта аҳамиятга эга.

Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида тирик хужайра цитоплазмасидаги метаболитлар ва уларнинг бирламчи мессенжер сигнал молекулалар сифатидаги роли тадқиқ қилинмоқда. Булардан бири – глутатион (GSH) – трипептид (гамма-глутамилцистеилглицин) тузилишига эга бўлиб, барча тирик хужайраларда учрайдиган эркин тиол ва қуйи молекуляр антиоксидант ҳисобланади. У бир қанча биологик жараёнларда иштирок этиб, ксенобиотикларни қайтарилишини таъминлайди, гидропероксидаза фаоллигини бартараф этади ва цитозол оқсилларидаги сульфигидрил группаларнинг қайтарилган ҳолатини сақлаб туришда иштирок этади.

Мамлакатимизда ҳозирги кунда илмий ва инновация ютуқларини

амалиётга жорий этишнинг самарали усуллари яратилмоқда. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, оксиллар ҳосил қиладиган нано-поралар, ион каналларини аниқлаш борасида натижаларга эришилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «илмий-тадқиқот ва инновация фаолиятини рағбатлантириш, илмий ва инновация ютуқларини амалиётга жорий этишнинг самарали механизмларини яратиш» такидланган, бунда хужайра ташқи муҳитидаги глутатионининг роли ва лимфоид хужайраларидан чиқиш йўллари аниқлаш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 28 ноябрдаги ПҚ-1652-сон «Соғлиқни сақлаш тизимини ислоҳ қилишни янада чуқурлаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ва 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу монография муайян даражада хизмат қилади.

Ҳозирги кунда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларида хужайра ички ва ташқи глутатионининг роли бўйича изланишлар олиб борилмоқда (Zhang, Forman, 2017; Franco, Cidlowski, 2014). Охирги йилларда глутатионнинг хужайрадаги функцияларини ва унинг хужайрадан чиқиш механизмларини ўрганишда сезиларли ютуқларга эришилди. Бу ривожланиш пэтч-кламп, флуоресцент ва ингибитор таҳлил каби янги тадқиқот усуллари ишлаб чиқилиши билан боғлиқ.

МДҲ давлатларида К.П. Василенко, Е.Б. Бурова, В.Г. Антонов, Н.Н. Никольский, А.П. Баврина, В.А. Мочин, С.Л. Малиновская томонидан глутатионнинг имуномодуляторлик хусусияти билан боғлиқ илмий изланишлар олиб боришмоқда. Бироқ, эришилган ютуқларга қарамасдан, хужайралардан глутатион чиқиш механизмлари билан боғлиқ бир қатор саволлар ечимсиз қолмоқда

Республикамизда глутатион моддасининг хужайрадан чиқиш механизмлари тадқиқ қилинмаган. Хусусан, осмотик стресс шароитида фаолланувчи анион каналларининг манфий зарядланган глутатион моддасининг транспортидаги роли жаҳон адабиётида ёритилмаган ва шу сабабдан ушбу илмий изланишнинг асосий мавзусини ташкил этадиган тадқиқотларни амалга ошириш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти тимоцит цитозолидан хужайра ташқи муҳитига нормал изотоник шароитида, ҳамда гипоосмотик стресс таъсирида глутатионнинг чиқишини тушунишда аҳамиятга эга. Ушбу жараённинг кинетик параметрлари ҳамда унинг хароратга боғлиқлиги глутатион чиқишининг бир нечта турдаги механизмлари мавжудлигидан далолат беради. Глутатион чиқишида ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг асосий роли, ҳамда ABCС/МРР, SLCO/OATP ва SLC22A/OAT транспортерларнинг сезиларли иштироки аниқлаш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундаки тадқиқот натижалар асосида глутатион чиқишининг янги ва самарали таъсирга эга ингибиторларининг кашф этилиши мумкин. Тадқиқотимизда асосан қўлланилган тимоцитлар тимусдаги иммун статусининг марказий иштирокчисидир. Ҳозирги пайтда хужайра ташқарисидаги глутатионнинг нормал физиологик шароитда ва патология жараёнидаги иммун жавобни шакиллантиришидаги роли ҳали яхши тушунилмаган. Глутатион чиқишининг фармакологик моддалар ёрдамида модуляцияси янги иммуностимулятор ва иммуносупрессорлар яратилиши ва патологик жараёнларда иммунотерапиянинг муҳим асоси бўлади. Демак, олинган натижалар амалий фармакология ва терапияда катта аҳамиятга эга. Бундан ташқари, натижалардан олий ўқув юртлари талабалари учун биофизика ва физиология фанларидан дарсликлар, ўқув қўлланмалари яратишда ва мазкур предметлардан дарс бериш жараёнида унумли фойдаланиш мумкин.

I БОБ. ҲУЖАЙРАЛАР ИЧКИ ВА ТАШҚИ МУҲИТИДА ГЛУТАТИОНИНГ АҲАМИЯТИ ВА УНИНГ БИОСИНТЕЗИ

1.1. Тимуснинг анатомияси ва физиологияси.

Тимус (айрисимон без) суяк кумиги сингари иммуногенезнинг марказий органи ҳисобланади. Тимус барча умурткали хайвонларда учрайди, лекин унинг шакли ва жойланиши турлича булиши мумкин. Инсон организмида тимус икки булакдан иборат булиб, у кукрак кафаси туш суягининг юкори кисмида жойлашган. Судралиб юрувчилар ва кушларда эса у одатда куш занжирсимон куринишга эга булиб, буйиннинг икки тарафида жойлашган. Тимус икки ассиметрик булакчалардан ташкил топган булиб, бу икки булакчалар уртасидан бир-бири билан туташган булади. Хар бир булакчанинг остки кисми устки кисмига нисбатан кенгрок булади. Хар бир булакча пустлок ва мия кисмдан иборат. Тимус танаси узига хос усимтасимон шаклли эпителиал хужайралардан ташкил топган. Эпителиал усимталар етилмаган тимоцитларни ураб, худди кучиб турганга ухшайди. Шунинг учун улар рамзий маънода «энага хужайралари» номини олган. Пустлок катлам кичик лимфоцитлар, яъни тимоцитлар билан лик тула. Улар морфологик жихатдан бошка тукумалар лимфоцитларидан фарк килмайди. Мия катламда тимоцитларнинг зичлиги, бир мунча тубан. Тимусда гуж жойлашган муртак марказлари учрамайди. Мия катламнинг эпителиал хужайралари компакт холатдаги оролчаларни – тимус таначаларини ҳосил килади. Бу органда аффирент лимфа томирлари йук. Тимус аъзога кон томирларига туташиб кирган, постгатлионар симпатик асаб толалари билан туташган. Бундай туташиб асаб ва иммун системаларининг бевосита узаро таъсир этиш омпонентларидан биридир.

Тимус хажми хайвонларнинг ёшига ва турига боглик. Бу аъзо хайвоннинг жинсий етилиш давригача катталашиб, сунгра кичиклашади. Умумий масса эса тугилишдан бошлаб доимо камайиб боради, аммо

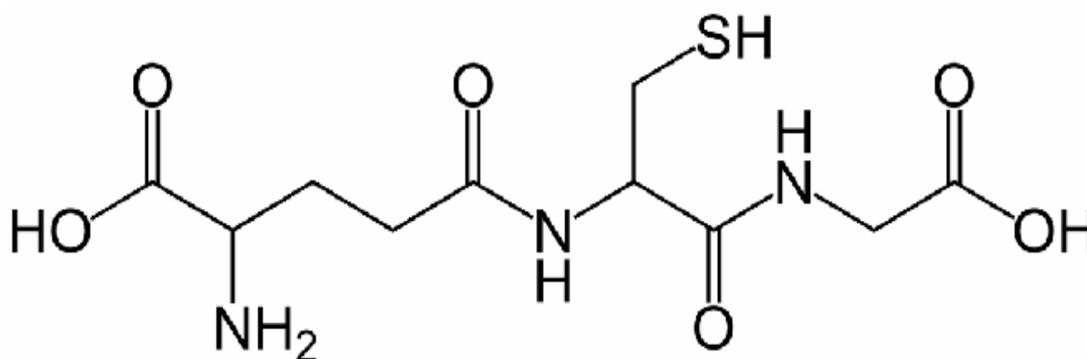
бутунлай йук булиб кетмайди. Масалан, каламуш тимусларида тугилишнинг олтинчи хафтасига келиб куп лимфоид хужайралар пайдо булади, яъни 200 млн. Ун олтинчи хафтасига келганда хужайралар сони 4 марта камаяди. Асосан лимфоид хужайралардан ташкил топган хйвонлар тимусида булардан ташкари дендритли, эпителиал хужайралар ва макрофаглар учрайди.

Тимоцитларнинг жадал купайиши пустлок катламда амалга ошади. Шунинг учун, бу катламнинг митоз темпи энг юкори хисобланади. Уларнинг хужайра цикли бор йуги 3-6 соат ичида булиб утади. Кортикал лимфоцитлар етилмаган хисобланиб, етилганлари Т-лимфоцитларга айланиб, дастлаб мия кисмига кейин эса конга утади. Тимус конга Т-лимфоцитлардан ташкари яна гормонал моддалар хам чикаради. Бу гармонлар Т-лимфоцитларни етилган лимфоцитларга айланишига ёрдам беради [63]. Кон тимусга суяк кумидаги асос хужайраларини олиб келади. Улар без булакчаларининг пуст катлам эпителиал хужайралар билан кушилади ва тимус гармонлари ёрдамида трансформацияланади. Т-лимфоцитларнинг хосил булиши жараёни эмбрионал ривожланиш давридан бошланади. Тимич эпителийси хисобига айрисимон безлар таркибида алохида микроурам хосил килади. Улар уз навбатида Т-лимфоцитларнинг айланишига таъсир курсатади. Т-хужайраларнинг тимусга киришидан бошлаб етилган хужайраларнинг аъзолардан чикишгача узаро харакатларнинг куп сони Т-хужайраларнинг айланишини комплекс жараёнларига таъсир килади. Тимусдаги лимфоцитларнинг пролиферация жараёни тез кечади, аммо бунда Т-лимфоцит куринишидаги хамма хужайралар кучмайди, уларнинг куплари шу ернинг узида халок булади. Булиниш жараёни хар хил мембрана оксилларининг мажмуини уз ичига олади ва уларнинг энг асосийси Т-хужайраларнинг рецептори (ТХР) хисобланади. ТХР-бу димер холатидаги мембрана оксили хисобланиб, тузилиши жихатидан антителани эслатади. Бу рецепторнинг асосий функцияси гистомансубликнинг бош комплекси билан боғланган пептид фрагментларини танишдан иборат.

Бошқарувчи генлар бош комплекси (БГБ) барча ядроли хужайраларнинг тшки юзасида жойлашган мембранали оксилдир. Структура жихатидан у гетеродимер булиб, тузулиши буйича антителани эслатади. БГБнинг икки синфи маълум. Уларнинг биринчи синфи ҳамма хужайраларнинг таркибида учрайди. Уларга лимфоцитлар, дендрит хужайралар ва макрофаглар киради. Аъзоларни кучириб утказишда тукиманинг кушилмаслик холати Т-хужайраларнинг БГБга нисбатан реакциялари ёрдамида булиб утади. Шунинг учунбу рецептор тукималар кушилмаслигининг антиген холати деб хам аталади.

1.2. Глутатион моддасининг умумий характеристикаси ва унинг биосинтез йўли

Глутатион (GSH) – трипептид (гамма-глутамилцистеинглицин) тузилишига эга бўлиб, барча тирик хужайраларда учрайдиган эркин тиол ва қуйи молекуляр антиоксидант ҳисобланади. Глутатион (2-амино-5-{[2-[(карбоксиметил)амино]-1-(меркаптометил)-2-оксоэтил]амино}-5-оксопентан кислотаси. Глутатион цистеиннинг аминао группаси ва глутаматнинг карбоксил группаси орасида пептид боғ ҳосил қилади (1.1- расм).

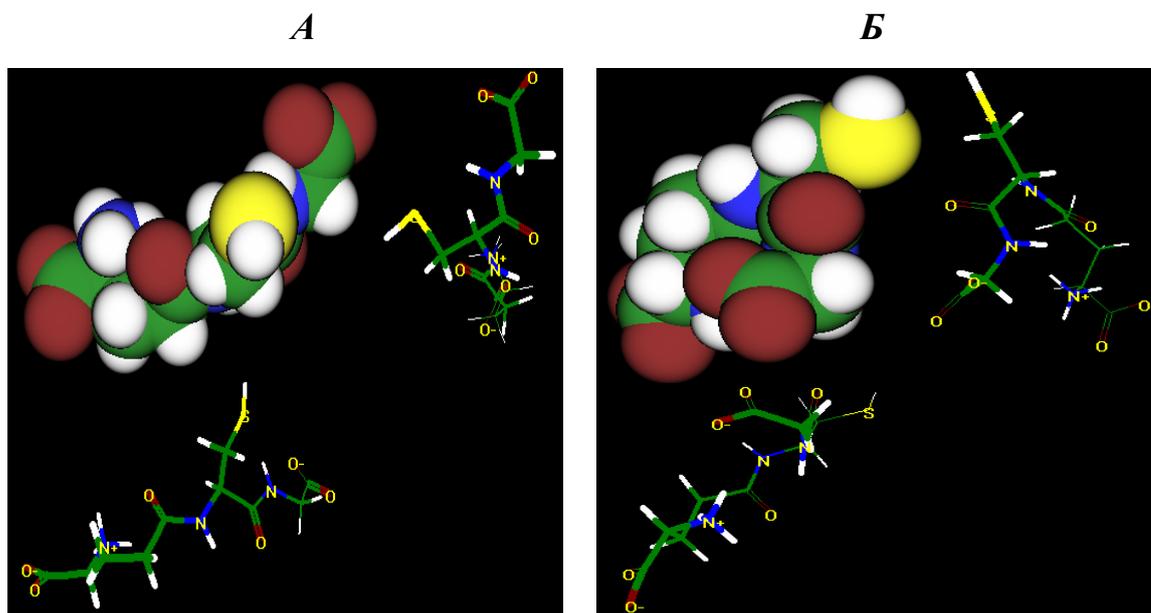


1.1-расм.

Глутатионнинг структура формуласи.

Цистеин қолдиғидаги тиол группа қайтарувчанлик хусусиятига эга

[1; 271-б; 7; 56-б]. Глутатион молекуласи ўзида учта элементар зарядга – трипептиднинг N-терминал қисмида мусбат, C-учидаги манфий ва глутамин кислота қолдиғи соҳасида манфий зарядга эга ҳисобланади. Молекуланинг умумий заряди -1 га тенг. ЎзР ФА Физиология ва биофизика институти Молекуляр биофизика лабораторияси ходимлари томонидан Molecular Modeling Pro дастури ёрдамида глутатионнинг молекуляр моделини яратиб, молекула ўлчамини аниқланган. Бунда молекула чўзилган ҳолда $1,47$ нм х $1,01$ нм х $0,956$ нм чизиқли ўлчамли параллелепипедга жойланиши мумкин (1.2.А-расм). Энергияни минималлаштириш нисбатан кичикроқ шакл ҳам мавжудлигини кўрсатиб, у $0,978$ нм х $1,12$ нм х $1,03$ нм параллелепипедга жойлашади (1.2.Б-расм). Бу икки шаклга ўртача геометрик (яъни учала ўлчамнинг кўпайтмасидан куб илдиз чиқариб, унинг ярми олинганда) ҳисобланган $0,56$ ва $0,52$ нм га тенг ўртача радиуслар мос эканлиги аниқланган



1.2-расм.

Глутатионнинг чўзилган конформациясининг фазовий кўриниши (А) ва компакт конформациясининг фазовий кўриниши (Б).

Узун формаси ўлчамлари: $1,47$ х $1,01$ х $0,956$ нм ўртача радиуси $(1/2)$ ($1,47$ х $1,01$ х $0,956$ нм) $(1/3) = 0,56$ нм. Зич формаси ўлчамлари: $0,978$ х $1,12$ х $1,03$ нм, ўртача радиуси $(1/2)$ ($0,978$ х $1,12$ х $1,03$) $(1/3) = 0,52$ нм га тенг.

Глутамин алифатик кислота бўлиб, азот алмашинувида муҳим ҳисобланади. У нейромедиаторли аминокислота бўлиб, «қўзғатувчи аминокислоталар» вакилидир. Глутамат аниони нейронларнинг специфик рецепторлари билан боғланиб, нерв импульсларини берилишида жуда муҳим [98; 407-б; 99; 154-б]. Глутатион флавопротеид глутатионредуктаза иштирокида оксидланади. Қайтарилган глутатион эритроцит хужайраларининг асосий антиоксиданти бўлиб, қайтарилган метгемоглобиннинг функционал фаол гемоглобинга ўтишида кофермент ҳисобланади. Қайтарилган глутатион ёрдамида водород пероксид ва гидропероксид детоксикацияга учрайди. Эритроцит хужайраларида яна бир муҳим ҳимоя ферменти – бу олтингугурт сақловчи глутатионпероксидаза учрайди. Қайтарилган глутатион ва глутатионпероксидаза липопероксидга айланади ва бу биоструктурага ҳавфли таъсир этади. Глутатион захираси асосан ўзида олтингугурт сақловчи аминокислоталар ҳисобига тўлади. Унинг антиоксидантлик хусусиятини глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза ва глутатионтрансфераза ферментлари катализлайди. Глутатионпероксидаза таркибига олтингугурт кириб, липидлардаги гидропероксид боғларининг камайишида асосий роль ўйнайди. Глутатионредуктаза глутатионнинг қайтарилган шаклини актив ҳолда ушлаб туради [12; 165-б, 19; 14-б].

Юқорида такидланганидек, глутатион тирик организмларда универсал, муҳим антиоксидант ҳисобланиб, бир қанча биологик жараёнларда иштирок этади. У барча органларда мавжуд, жумладан жигар, буйрак, ошқозон ости бези, кўзнинг шох пардаси ва гавҳарида бошқа органларга нисбатан юқори концентрацияда учрайди. Жигар хужайрасида нисбатан кўпроқ глутатион мавжуд (10 мМ атрофида) бўлади, бу эса ксенобиотикларнинг детоксикациясида молекулаларнинг кўп сарфланиши туфайли бўлиб, ксенобиотиклар глутатион конъюгатлари шаклида хужайралардан махсус АТФазалар ёрдамида чиқарилади [65; 29543-б]. Оз миқдордаги глутатион хужайралараро муҳитда ҳам учраши мумкин. Интерстициал

суюқликда глутатион концентрацияси бир неча мкМ ни ташкил этади, плазмада эса бу миқдор одатда икки марта кўп бўлади. Аини пайтда ўпка эпителийсини қопловчи юпқа суюқлик қатламида глутатион концентрацияси тахминан 400 мкМ бўлиб, бу оддий интерстициумга нисбатан икки мартаба кўп ҳисобланади. Бунга ўпка эпителийси юза қаватида интенсив газ алмашинуви рўй бериши сабаб бўлиб, натижада кучли оксидловчи стресс содир бўлади. Шу сабабли альвеолаларнинг эпителиал хужайралари глутатионни хужайра ташқи муҳитига секреция қилади ва бу орқали ўзини эркин радикалли оксидланишдан ҳимоя қилади [44; 14337-б; 144; 304-б].

Лимфопозитик бошланғич хужайралар суяк кўмигида пайдо бўлиб, қон оқими билан бирга тимусга боради. Бу ерда улар пролиферацияга учраб, позитив ва негатив селекцияда сараланади. Уларнинг кўп қисми апоптоз натижасида нобуд бўлади ва фақатгина етилган, Т-рецепторга эга бўлган ва ўз антигенлари билан таъсирлашмаганлари етилган Т-лимфоцитлар сифатида қон оқимида чиқарилади [131; 412-б]. Глутатион иммун тизимда муҳим кучли антивирус хусусиятига эга. У ўсма касаллигига қарши кучли агент ҳисобланади. У жигарда детоксификация жараёнида иштирок этади. Глутатион оксилларни ҳимоя қилувчи антиоксидловчи бўлиб, нуклеин кислота синтези ва ДНК қурилишида ҳам муҳим бўлган хужайравий оксидланиш – қайтарилиш потенциалини ушлаб туради [18; 238-б; 30; 315-б; 64; 64-б]. Глутатион моддаси қариш жараёнини секинлаштиради. У қондаги қизил қон хужайраларнинг бутунлигини ҳимоя қилади, миянинг нормал функциясини ушлаб туради, организмнинг иммун жавобида лимфоцитларнинг функционал активлигини бошқариб туради [84; 45-б; 85; 1399-б].

Асосан, қайтарилган глутатион кўплаб ўсимлик, микроорганизм ва турли тирик хужайраларда учрайди. Организмда бошқа органик моддаларга нисбатан миқдори юқори бўлади ва цитозолда концентрацияси 1-2 мМ ни ташкил этади. Глутатион дисульфид боғларни қайтаради ва изомеризация қилади, фермент ва оксиллар фаоллигига таъсир қилади, организмда

цистеиннинг захираси ҳисобланади [6; 47-б; 8; 7889-б].

Глутатионнинг муҳим антиоксидантлик хусусияти организмдаги физиологик жараёнлардаги иштирокида кўринади. Овқат-ҳазм қилиш системасида антиоксидантлик вазифаси глутатионнинг эндоген ва озуқа орқали ошқозон-ичак йўлига тушиши, у ерда ингичка ичак шиллик пардаси билан таъсирлашиши ва эркин радикалли оксидланиш маҳсулотларидан ҳимояланиши йўллари кўриб чиқиш билан тушинтирилади.

Сутэмизувчилар организмда GSH синтезланадиган энг муҳим орган – жигар ҳисобланади. Жигарда организмдаги физиологик ва биохимиявий жараёнлар учун 90% глутатион синтезланади. Очлик пайтида жигарда глутатионнинг миқдори 2 марта камаяди ва овқатлангандан сўнг ўз ҳолига қайтади. Глутатионнинг ҳосил бўлиши озиқ-овқат таркибидаги цистеиннинг миқдорига боғлиқ бўлади. Жигардан глутатионнинг қон плазмасига ва ўт суюқлигига ўтиши гликоген ва вазопрессин орқали стимулланади [2; 501-б; 6; 48-б]. Глутатион синтези ингибирланса, жигарда, қон плазмаси ва умуман организмда миқдори камаяди. Скелет мускуллари ўзида гамма-глутамилтранспептидаза ферменти фаоллигининг камайиши ҳисобига плазмада глутатионни сақлайди, жигар ва буйракларда эса плазмадаги глутатион камайиши ҳисобига гамма-глутамилтранспептидаза фаоллиги ортади [9; 183-б].

Организмда ўт суюқлиги орқали глутатионнинг турли канъюгатлари ташилади ва унинг ксенобиотикларга қарши детоксикацияси амалга ошади. Глутатион-S-трансфераза глутатион ва кўплаб ксенобиотикларнинг электрофил метаболитлари орасидаги реакцияни катализлайди, бунда лигандларнинг гидрофиллиги ортади ва жигарга ташилиши осонлашади [118; 380-б]. Конъюгатларнинг ферментлар таъсиридаги деградацияси 3 босқичда боради:

1- гамма-глутамилтранспептидаза гамма-глутамил фрагментини парчалайди («узади»);

2- дипептидаза глицин қолдиғини йўқотади;

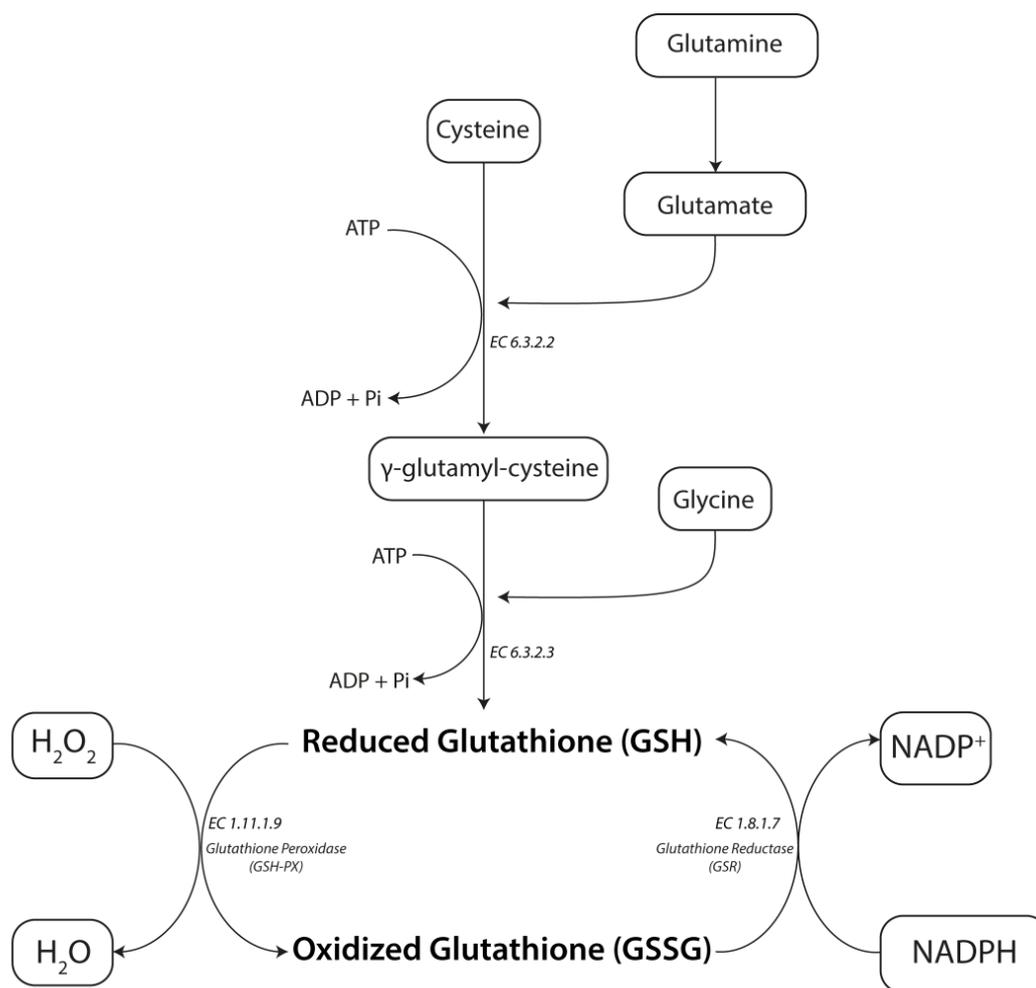
3- N-ацилтрансфераза цистеинли канъюгатларни меркаптур кислотасигача ацетиллайди [5; 12-б].

Нормада сутэмизувчилар кон плазмасида глутатионнинг қайтарилган ҳолатига қараганда, оксидланган димер GSSG ҳолати камроқ учрайди. Оксидланишли стресс жигарда GSSG ҳосил бўлишига ва конга тушишига олиб келади. GSSG ортиши плазма оқсиллари ва тўқима ҳужайраларининг базолатерал мембрана оқсилларидаги тиол груҳларининг оксидланишига ва уларнинг инактивациясига сабаб бўлади [20; 192-б; 52; 883-б].

Глутатион глутамат кислота, цистеин ва глициннинг, икки ферментатив босқичда икки молекула АТФ сарфланиши натижасида ҳосил бўлади (1.3-расм). Глутатион кўплаб биологик жараёнларда иштирок этади, жумладан оқсил ва ДНК синтези, молекуляр транспорт ва редокс сигнализациясида. Айниқса глутатионни эркин радикалларни ва кислороднинг актив формаларини қайтариш ҳусусити муҳим аҳамиятга эга [36; 896-б; 63; 2-б]. У ҳужайра ички муҳитида оксидантлар даражасини сақлаб турувчи эндоген антиоксидантдир. Глутатион кислороднинг фаол бирикмалари билан оксидланиш жараёнида глутатион пероксидаза ферменти иштирокида оксидланиб, GSSH ни ва сувни ҳосил қилади. Қайтарилиш жараёнида глутатион редуктаза глутатион дисульфиддан глутатион ҳосил қилади. Бу жараён кислороднинг актив бирикмаларини физиологик даражада сақлайди. Шу сабабли глутатион ҳужайра оксидланиш-қайтирилиш тизимида муҳим рол ўйнайди. GSH/GSSH даражаси ҳужайра оксидланиш қайтарилиш ҳолатининг кўрсаткичи ҳисобланади [62; 3-б; 123: 160-б].

Аниқланишича, жигардаги глутатионнинг 50-60%и ўт суюқлиги орқали ташилади. Ўт суюқлиги таркибидаги глутатион ингичка ичакдаги пероксидланган ёғларнинг метаболик ўзгаришларида муҳим қайтарувчи ҳисобланади [6; 48-б; 29; 304-б]. Глутатионнинг антиоксидант системаси ҳужайрани оксидланишли стрессдан ҳимоялайди. Бу ҳимояланиш асосан 3 хил ферментатив йўл билан кечади. Булар супероксиддисмутаза, каталаза ва глутатионпероксидаза. Бунда супероксидрадикаллар, водород

пероксид ва органик гидропероксидлар қайтарилади [76; 145-б].



1.3 расм.

Глутатионнинг ҳосил бўлиш босқичлари. (Rosilene C. R., Wei Zhang., Eduard P.A.van Wijk., Thomas Hankemeier., Rawi Ramautar., Jan van der Greef . Cellular glutathione levels in HL-60 cells during respiratory burst are not correlated with ultra-weak photon emission // Journal of Photochemistry & Photobiology. – 2017. – V. 17. – P. 160-167).

Глутатион, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза, глутатионредуктаза ва НАДФН глутатион антиоксидант системасини ҳосил қилади. Гидропероксидларнинг глутатионпероксидаза ва глутатионтрансфераза ёрдамида қайтарилиши пероксидланишнинг сусайиши ва унинг иккиламчи метаболитларининг юзага келишини таъминлайди. Пероксидланишнинг иккиламчи маҳсулотлари ва оксидланган моддалар глутатионтрансфераза таъсирида зарарсизлантирилади. Глутатион билан биргаликда ушбу фермент липидларнинг пероксидли оксидланишининг заҳарли маҳсулотларини канъюгатлайди [21; 807-б; 22; 699-б; 34; 951-б; 40; 768-б].

Кўплаб ҳужайраларда глутатионнинг миқдори 1-2 мМ бўлиб, GSH экспорт қиладиган гепатоцитларда 10 мМ гача етади [35; 15091-б; 46; 1650-б]. Плазмада GSH микромоляр миқдорда бўлади, аммо баъзи ҳужайраларнинг ташқи муҳитида эпителий ҳужайралари секрецияси туфайли GSH миқдори бундан анча ортиқ бўлиши мумкин [38; 156-б]. Цистик фиброз (муковисцидоз) касаллиги билан оғриган беморларда GSH нормага нисбатан кам секреция қилинади. Чекувчиларда, яъни ўпка юзаси азот оксидлари ва H_2O_2 билан тўлган инсонларда, GSH секрецияси кам бўлади ва доимий яллиғланиш кузатилади [122; 360-б; 142; 110-б]. Мана шундай ҳолатларда $HOCl$ (гипохлорид) эпителий ҳужайраларининг оқсилларини ва мембрана липидларини оксидлайди ва организм учун ҳавфли бўлган бирикмалар ҳосил бўлишига олиб келади. Цистик фиброзда GSH нинг ҳаво бўшлиғига секрецияси CFTR оқсилининг мутацияси туфайли кескин пасаяди [89; 1981-б; 106; 262-б]. CFT1 ҳужайра культурасида (Цистик фиброз билан оғриган беморлардан олинган) ҳаво бўшлиғига чикувчи GSH секрецияси жуда камлиги кузатилган. Агар шу ҳужайраларга CFTR оқсили сунъий равишда киритилса GSH секрецияси миқдори нормал ҳужайрада кузатилган

даражагача ошади [66; 30452-б; 68; 1695-б; 75; 435-б]. Бошқа ўпка касалликларида, масалан идиопатик ўпка фиброзида ҳам GSH миқдори камлиги кузатилган [43; 101-б].

Оксидатив стресс касалликларини даволашда плазматик мембранадан ўтувчи GSH транспортини тушуниш муҳим аҳамиятга эга [39; 18-б; 41; 509-б]. Хужайра ташқи қисмидаги ҳолат билан ички қисмидаги ҳолат кескин фарқ қилади. Митохондрияда GSH апоптоз ва некрозга қарши муҳим воситадир [50; 696-б]. Ядрога хужайра бўлинишида GSH муҳим ролни ўйнайди. GSH транспорти жигар метаболизми ва патологиясига боғлиқ жараёнларда кўп ўрганилган. Кўпчилик хужайрадаги GSHнинг антиоксидант ҳимояси GSH нинг пероксидаза оиласинининг 3 аъзоси ва битта перокси редоксин томонидан таъминланади [99; 153-б; 51; 929-б;]. Мазкур ферментлар GSHни H_2O_2 билан бўлган реакциясини катализлаб, H_2O ва GSSGга айлантиради. Фермент актив ҳолатда бўлиши учун GSH трансфераза анорганик фосфат (Pi)ни талаб қилади [55; 488-б; 109; 6404-б]. Фосфолипидгидропероксид GSH-пероксидаза (PH6Px ёки GPx4 турлари) ёрдамида липид алкоғолларгача қайтарилади [76; 145-б].

Кўплаб ксенобиотик бирикмаларнинг организмдан чиқарилиб юборилиши GSH билан конъюгацияси шаклида кузатилади. Бу жараён мембрананинг актив транспортерлари бўлган MRP томонидан амалга оширилади [15; 760-б; 87; 374-б; 120; 86-б].

Демак, глутатионнинг антиоксидант системаси хужайрани оксидли стрессдан ҳимоялайди, унинг камайиши ёки йўқолиши жиддий патологик ҳолатларга олиб келади.

§1.3. Хужайра ички глутатион моддасининг биологик роли

Қайтарилган GSH кўплаб хужайра ички биохимик жараёнларида муҳим рол ўйнайди. Хусусан, GSH ДНК синтезида, хужайра цикли бошқарувида, оксидловчи таъсирга қарши курашда, хужайра тиол

қайтарилиш жараёнларида, эндоген ва экзоген реактив моддалар детоксификациясида, цистеин транспортида иштирок этади [96; 2-б 97; 1126-б]. Бу трипептид учун яна қўшимча роллар генлар ифодаланишини (экспрессиясини) бошқариш, эндоген ва экзоген молекулаларнинг мембрана транспортида иштирок этади [88; 67-б;]. GSH синтези, унинг хосиллари ферментатив катаболизми ва плазматик мембранадаги транспортнинг бошқарилиши, биргаликда γ -глутамил циклини ташкил этади [92; 323-б; 95; 2413-б]. GSH ҳар бир ҳужайрада синтезланади, лекин, юқорида таъкидланганидек жигар микдорий жиҳатдан асосий ҳудуд ҳисобланади.

АТФга боғлиқ цитозол ферментлари γ -глутамилцистеин синтетаза ва глутатион синтетазалар томонидан GSH ҳужайра ичида синтезланади. У асосан ҳужайра ичида (98%) қайтарилган шаклда (GSH), баъзан эса оксидланган шаклда (GSSG) ва бошқа шаклларда ҳам учрайди [119; 640-б; 136; e0123418-б]. Синтезлангандан сўнг GSH ҳужайра ичидаги бошқа органоидларга юборилади, шу жумладан митохондрия ва эндоплазматик тўрға [72; 20-б]. Ҳужайра ташқи муҳитига чиқарилган GSH бошқа ҳужайра ва тўқималар томонидан ишлатилади. Ҳужайра ичида юз берадиган GSH синтездан фарқли равишда GSH деградацияси ҳужайра ташқарисида рўй беради, улар γ -глутамил транспептидаза ёки γ -глутамил трансфераза деб ҳам номланади. γ -глутамил транспептидаза кўплаб эпителий тўқималарида апикал сиртда кўп микдорда мавжуд бўлиб, шу жумладан жигар ва ёғ ҳужайраларида учрайди [16; 1469-б; 140; 148-б].

Тирик организмларда кечадиган муҳим физиологик ва биокимёвий жараёнлардан бири – апоптоз ҳисобланади. Апоптоз – ҳужайранинг дастурлаштирилган ўлими бўлиб, термин 1972 йил Керр томонидан [86; 27912-б; 116; 111-б] фанга киритилган бўлиб, жараённинг характерли белгилари – фосфатидилсерин липидининг цитоплазматик мембрананинг ички қаватидан ташқи қаватига чиқиши, митохондрия мембраналариаро транспорти орқали цитохром С нинг цитоплазмага чиқиши, цистеинли протеиназаларнинг (каспаза) фаолланиши, кислороднинг фаол

шакллариинг хосил бўлиши, цитоплазматик мембранада бўртмачалар пайдо бўлиши, хужайра хажмининг қисқариши, нуклеосома участкалариаро ядродаги ДНК ипларининг узилиши, хроматин конденсацияси, ядронинг қисмларга ажралиши (фрагментация), хужайранинг апоптотик таначалар хосил қилувчи пуфакчаларга фрагментацияси юзага келади [101; 39591-б; 104; 1394-б; 134; 39411-б].

Апоптоз плазматик мембранадаги рецепторлар таъсирида бошланади. Хужайра ўлимининг бу типи ўсма некрози факторининг (*TNF- α* , *tumor necrosis factor*) рецепторлар гуруҳига кирувчи, нобуд қилувчи рецепторлар таъсирида – Fas-СДС ёки АРО-1 юзага келади. Fas-оқсили плазматик мембранада мавжуд бўлиб, турли орган тўқималарида (тимус, жигар, юрак, буйракларда) ўрганилган. Унинг лиганди FasL цитотоксик Т-лимфоцитлар (Т-киллер) ва табиий киллер хужайралар (*NK*, *natural killer*) билан бирга экспрессияланади. Бу икки хужайра тури бир-биридан фарқланади. Т-хужайра инфекцияланган хужайрани нобуд қилишдан олдин тайёргарликдан ўтади, табиий киллерлар бу жараёнда қатнашмайди [23; 47-б; 27; 6950-б; 102;861-б].

Fas га боғлиқ апоптозда цитотоксик Т-лимфоцитлар вирус ва бактерия билан инфицирланган хужайрага таъсир қилса, Н-киллерлар ўсма хужайраларига таъсир қилади. Бу апоптоз лимфоцитлар гомеостазини бошқаради. FasL кўпроқ кўзнинг шох пардаси, камалак парда, киприксимон хужайралари, уруғдон фолликуляр хужайраларида учрайди. Умуман олганда, яллиғланишга мойил органлар кўз ва эркаклар жинсий беги ҳисобланади. Агар касалликда фаолланган Т-лимфоцитлар бу органларга кирса, FasL уларга қарши хужум қилади ва хужайралар нобуд бўлади [13; 403-б; 53: 931-б].

Организмда глутатион миқдорининг ўзгариши апоптозга таъсир қилиши олимлар томонидан ўрганилиб келинмоқда. Маълумки, FasL кўзғатувчи апоптоз рецептори СД 95/Аро-1 рецептори билан боғланган бўлиб, иммун гомеостазда муҳим рол бажаради. Fas рецепторининг

бошқаруви бузилиши ўсма ва аутоиммун лимфопрлифератив синдром метастазига олиб келади [59; 673-б; 61; 2-б].

Хужайрада глутатион миқдорининг камайиши стресс ёки бирон модда сабаб хужайра ўлимини юзага келтиради. Глутатион камайиши ва апоптоз орасида боғлиқлик ўрганилганда, глутатион хужайрани апоптоздан сақлаб қолади деган ғоя пайдо бўлди [67; 36071-б], аммо бу механизм тўлалигича ўрганилмаган. Апоптоз пайтида хужайрадаги GSH камайиши, глутатион актив транспортининг фаолланиши билан кечади ва бу апоптознинг ривожланишига кўмаклашади [71; 946-б; 74; 8058-б].

Глутатионнинг камайиши эрта апоптоздан хабар беради. Кейинги тадқиқотларда глутатион ажралиши, кислороднинг фаол бирикмаларининг пайдо бўлиши ва апоптознинг ривожланиш жараёнларининг боғлиқлиги ўрганилган [38; 155-б 94; 76-б]. Хужайрада глутатионнинг камайиб кетиши кислороднинг фаол бирикмаларига кирувчи водород пероксид, супероксид анион, гидроксил радикали ва липид пероксиди ишлаб чиқарилишига олиб келади [130; 173-б]. Шу билан бирга кислороднинг фаол бирикмаларига қарши антиоксидантлик йўқолади. GSH камайиши кислороднинг фаол бирикмаларининг ишлаб чиқарилишига сабаб бўлади. Шуниси қизиқки, хужайралараро юқори миқдордаги тиол (GSH ва N-ацетил цистеин) апоптознинг олдини олади. Апоптоз юқори шаклланган жараён бўлиб, биокимёвий ва морфологик ўзгариш кетма-кетлиги билан характерланади. Апоптознинг илк босқичи кислороднинг фаол бирикмаларининг шаклланиши билан характерланади, бунда хужайрадаги ионли гомеостаз, хужайра қисқариши, мембрана липид қаватининг йўқолиши каби ўзгаришлар юзага келади. Кечки фазаси эса, каспаза ва эндонуклеазалар активланиши, апоптотик танача шаклланиши ва хужайранинг фрагментларга ажралиши билан характерланади.

GSH турли концентрацияда бўлиши нейродегенератив ва ёмон ўсма касалликларидан далолат беради. Турли апоптотик ҳолатларга жавобан хужайра нобуд бўлиш прогрессиясида хужайралараро GSH йўқолади,

плазма мембранаси билан боғланади ва оксидланиш фаолланади. GSH камайиши кислороднинг фаол бирикмаларини шаклланиши ва оксидланишли стресс учун индикатор бўлиб ҳисобланади. Кичик тиол саналган GSH химоя қилувчи антиоксидант сифатида эркин радикаллар ҳисобига оксидланиб, хужайрада оксидланиш-қайтарилиш балансини белгилашда муҳим рол ўйнайди [22; 699-б; 28; 419-б; 37; 749-б; 70; 500-б].

FasL ҳосил қилувчи апоптозда GSH оқими GSH/OA ионига алмашинади. Бу эса плазма мембранаси атрофидаги GSH билан электрокимёвий градиентга боғлиқ. Умуман олганда GSH цитозолда 90% эркин ҳолда бўлади. GSH физиологик рН ни манфийга ўзгартиради ва хужайра ичидаги манфий потенциал – 30-60 мВ гача боради [10; 2-б].

Демак, GSH камайиши тиол ўзгаришли реакциялар сабаб апоптотик энзимларнинг фаоллигини кучайтиради, тиол ўзгаришли реакциялар ион каналлари ва хужайралардаги ионли гомеостазни бошқаради, каспаза ва эндонуклеазаларни фаоллантиради.

§1.4 Хужайра ташқи муҳитидаги глутатион моддасининг биологик роли

Глутатион (GSH) ўзининг антиоксидантлик ва эркин радикалларни йиғиб олиш каби бир қанча функциялари ҳар томонлама чуқур ўрганилган. Охирги йилларда GSHнинг нерв тизимидаги янги вазифалари аниқланди, яъни GSH кўшимча нейромоддулятор ва нейротрансмиттер сифатида ҳам фаолият кўрсатиши мумкин деган таҳминлар пайдо бўлди. Кўпгина тадқиқотларда GSHнинг айнан ўша охирги иккита функциясини аниқлаш учун изланишлар олиб борилди [78; 889-б, 92; 323-б, 93; 3143-б]. Бу изланишлар учун радиолиганд боғлаш, синаптик ажралиш, электрофизиологик қайт қилиш каби усуллардан фойдаланилди. Бу тадқиқотларда GSHни NMDA рецептори билан ўзаро таъсири ва GSH ни

нерв фаолиятига таъсирининг характеристикаси кўриб чиқилди. Олинган натижалар шуни кўрсатадики, GSH ўзининг гамма-глутамин қолдиғи билан ионотроп глутамат рецепторларига боғланади [77; 617-б]. GSH микромоляр концентрацияларда кўзгатувчи агонист билан ўрин алмашинади. Бунга ўхшаш модуляциялар NMDA рецептори канал оқсилларини очишини кўрсатиб берди, бу фаолият нормал ва анормал синоптик фаолиятда сезиларли роль ўйнайди [82; 153-б].

GSHнинг эркин радикаллардан тозалаш вазифаси кўпчилик нерв тўқималарида аниқланган. Бироқ нерв тизимида антиоксидантлик роли жуда юқори бўлиши мумкин. Бир қанча янги тадқиқотларда GSH нинг бир қатор неврологик касалликларга боғлиқлиги аниқланди ва шундан кейин GSHнинг нерв тизимидаги ролини ўрганишга қизиқиш ортди. Тахминан 50 йил олдин W.F.Loamis ва H.L. Lenhoff GSH нинг гидраларда сигнал трансдукциядаги ролини тажрибаларда аниқлашган [78; 889-б]. Сутэмизувчиларда GSH нейротрансмиттер ажралишининг бир қанча жихатларини ўзида жамлайди. Бир қатор кузатишлар GSHнинг нерв системасида сигнал трансдукциясидаги ролини кўрсатиб беради. GSHнинг нерв хужайраларига таъсирини урганишда унинг бошқа моддалар билан таъсири ҳам ўрганилди. Баъзи бир тадқиқотларда GSHнинг таурин моддаси билан биргаликда таъсири кўриб чиқилган. Таурин (2-аминоэтансульфат кислота) ҳамма тирик ҳайвон хужайраларида оддий олтингурут сақловчи ингибитор аминокислота бўлиб барча хужайраларда тарқалган [79; 75-б; 99; 153-б, 100; 407-б;]. Бу модда мия хужайраларида юқори концентрацияда мавжуд; асосан онтогенетик ривожланиш даврида унинг концентрацияси асосий кўзгатувчи трансмиттер – глутаматдан ошиб кетади [103; 77-б; 105; 1285-б]. У сувда яшовчи ҳайвонларда қадимги осморегулятор ролини бажарса қуруқликда яшовчи ҳайвонлар миясида ҳам худи шу функцияларни бажаради деб тахмин қилинади. Бошқа томондан олиб қараганда таурин мембранадан хлорид ўтишига таъсир қилади, унинг таъсирида нейронал кўзгатувчиларнинг гиперполяризацияси ва ингибирланиш рўй беради [80; 617-б].

Глутатион ва глутатион оксиди стрессга қарши энг асосий химоя ҳисобланади ва периферик органларда, бош мияда кислороднинг актив формалари билан таъсирлашади [81; 163-б]. Глутатионнинг илгаридан маълум бўлган антиоксидантлик хоссасидан келиб чиқиб уни ҳозирда турли хил оксидантли стресс ҳолатлари, Паркинсон, Альцгеймер касалликлари, сурункали чарчаш синдроми, шизофрения ва бошқа касалликларда қўллаш мумкин деб тахмин қилинмоқда [83; 347-б]. Глутатионнинг аниқланган нейромодулятор ва нейромедиаторлик роли унинг нерв хужайраларини химоя қилиш хусусиятини акс этириши мумкин. Тауринга ўхшаб, хужайра ташқарисидаги глутатион ҳам нормал нейрон хужайралари ривожланиши учун замин яратади. Бу жиҳатлар GSH марказий нерв тизимида глутамат ўтишининг бошқарувига таъсир этиши мумкин деган концепцияни қўллаб-қувватлайди [128; 560-б; 129; 45-б].

Таурин ва GSH бир қанча умумий ўзига хосликларга эга бўлган бир пайтда GSH ўзининг нейропротекторлигини нафақат ўзи, балки тауринни, таурин сақловчи модулятор интернейронлардан ажралиб чиқиш частотасини пасайтириши орқали эришиш мумкин. Ривожланаётган гипоталамусда бундай ўзаро таъсирни исботлаш учун глутатион ва глутатион ҳосилаларининг K^+ ионига таъсири ўрганилган [14; 936-б]. Бундан ташқари глутатионнинг юрак хужайраларига таъсири ўрганилганда унинг хужайрадаги микдорини ўзгариши хужайра иш фаолиятига ва яшовчанлигига катта таъсир кўрсатиши аниқланган [138; 38-б]. Мазкур ишда, миокард инфрактга учраган каламуш юраги миоцитларидан глутатион чиқишини ўрганилган. Миокард касалликлари асосан стресс ва юрак ички тизимидаги жараёнларни бузилиши оқибатида келиб чиқиши аниқланди [56; 201-б, 57; 1914-б]. Сутэмизувчилар хужайраларида, глутатион микдорининг ўзгариши миокард касалликларини келиб чиқишига сабаб бўлади. Масалан, глутатион юрак фаолиятида ўз аҳамиятига эга бўлган бир қанча моддаларни нейтраллашда иштирок этади. Бундан ташқари, глутатион гидропероксидларни бартараф этишда ҳам асосий рол ўйнайди. Сўнгги

тадқиқотлар шуни кўрсатдики, хужайрадаги глутатион миқдори инфракт касаллигини келиб чиқишига бевосита таъсир кўрсатади. Мазкур тадқиқотларда, каламуш юрагини инфракт касаллигига учратилиб, ундаги глутатион миқдори ўлчанган. Каламуш юраги инфракт билан касалланганда глутатион миқдори кескин тарзда камайиб кетганлиги кузатилган. Глутатионнинг бошқарилиш механизмларини аниқлаш мақсадида инсулин таъсирини текшириб кўрилганда инсулин диабетга учраган каламушларда глутатион миқдорини нормаллаштиришга ёрдам берган. Аммо, инфрактга учраган каламуш юрак хужайраларига 100-300 мкМ инсулин юбориб, 5-6 соатдан кейин текширилганида, глутатион миқдорини ўзгармаганлиги аниқланган. Таққослаш учун шуни айтиш мумкинки, сунъий инсулин билан шу ҳолат такрорланганда, глутатион миқдори ошади. Хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки, 10 мкМ сунъий инсулин глутатион миқдорини ошишига олиб келади. Бундан ташқари, глутатион миқдорига пируватларнинг таъсири ҳам ўрганилган бўлиб, 5мМ пируват касалликка учраган каламуш миоцитларида глутатион миқдорини ошишига ёрдам беради. Бундан ташқари, дихлорацетатнинг таъсирини ҳам ўрганилганда, бу модда пируват дегидрогеназани активатори бўлиб, 1,5мМ дихлорацетат хужайрадаги глутатион миқдорини ошишига ижобий таъсир кўрсатади [55; 488-б].

§1.5. Хужайрадан хужайра ташқи муҳитига глутатион моддасининг чиқиши ва унинг механизми

Қайтарилган глутатион кўплаб хужайравий жараёнларда муҳим аҳамиятга эга, унинг хужайра ичида ва ташқарисида концентрацияси доимо бир меъёрда бўлади. Хужайра ичидаги глутатион концентрацияси икки механизм орқали бошқарилади: синтезланиш тезлиги ва хужайрадан чиқарилиши. Ҳозирги кунгача сутэмизувчилар хужайрасидан глутатион чиқишига бир қанча оқсиллар жавобгар эканлиги ўрганилди, аниқланишича глутатион транспортерлари ўзига хос хусусиятли бўлиб, бир қанча

вазифаларни бажаради. ABCС/MRP мембрана оксилларининг барча турлари GSH ташилишида ва гомеостазида воситачидир. MRP оксиллари фақат GSH чиқишида воситачи бўлибгина қолмасдан, улар GSHнинг оксидланиш маҳсулотлари (глутатион дисулфид (GSSG), глутатионнинг метал комплекслари), ҳамда бошқа глутатион конъюгатларини ҳам ташийд [21; 807-б 24; 517-б; 25; 1735-б].

Юқорида таъкидланганидек, қайтарилган глутатион хужайра метоболизмида, дифференциациясида ва апоптозга сабаб бўлувчи касалликларни келиб чиқишида, жумладан: рак, қариш касалликлари, юрак-қон томир, ялиғланиш, иммун ва нерв бошқаруви патологиясида муҳим роль ўйнайди.

GSH хужайра цитозолида синтезланади, лекин унинг парчаланиши фақат хужайра ташқаридаги муҳитда рўй беради. Жигар хужайраларида синтезланган GSH юқори тезлик билан қон плазмасига ва ўт пуфагига ўтади. Гарчи GSH молекуласи транспортерлари жуда кам бўлсада, ҳозирги кунгача олинган маълумотларда ABCС/MRP мембрана оксиллар бу жараёнда муҳим роль ўйнаши аниқланди [31; 661-б; 33; 537-б; 43; 101-б; 45; 579-б]. Шунга қарамай GSH конъюгатлари транспорти, GSH ташувчиларнинг молекуляр ўхшашлиги, функционал характеристикасидаги фарқ яхши ўрганилмай қолмоқда. Сутэмизувчиларнинг барча хужайраларида GSHнинг айланиши биринчи бўлиб плазматик мембрана орқали хужайралараро бўшлиққа ўтишидан бошланади, бироқ механизм тўлиқ ўрганилмаган. GSH ташилиши, унинг таркибидаги аминокислоталарни бошқа тўқималарга етказиш, дорилар детоксикацияси, бошқа эндоген ва экзоген манбаларнинг реактив бирикмалари, оксидловчи стрессдан ҳимоялаш ва ўт пуфаги суюқлиги учун зарур. Охирги маълумотларга қараганда ABCС/MRP мембрана оксилларининг баъзи бир аъзолари ва шу билан бирга органик анион ташувчи полипептид SLCO /OATP оиласининг аъзолари бу жараёнда ҳисса қўшади. Жумладан ABCС/MRP оиласининг 12 аъзосидан бештаси, яъни MRP1, MRP2, MRP4, MRP5 ва CFTR хужайрадан глутатион чиқишига

воситачилик қилади. Бундан ташқари OATP оиласининг икки аъзоси каламуш Oatp1 ва Oatp2 глутатион транспартерларига ўхшашлиги аниқланган. Ачитқиларда ABC Ycf1p и Bpt1p оксиллари GSHни цитозолдан вакуолага ўтказади, Hgt1p эса GSHни плазматик мембранасидан ўтишини бошқаради [46; 1650-б; 111; 5232-б; 112; 171-б]. Глутатионнинг катта миқдорда чиқарилиши яна Jurkat (одам лейкоиния касалигида Т- лимфоцит хужайралари линияси) Т-лимфоцитлари линиясининг Fas-лиганд таъсирида апоптик ўлиши пайтида ҳам кузатилади. Бу жараённинг фармакологик тадқиқотлари шуни кўрсатади, SLCO/OATP оиласи транспортерлари глутатион чиқишида иштирок этади [65; 29542-б; 133; 738-б]. Бунда хужайранинг апоптотик ўлими учун юқори концентрацияларда апоптозни ингибирловчи хужайра ташқи глутатиони муҳим эмас, балки, хужайра ичида қайта тикланган глутатион хужайра ички системаларининг функционал ҳолатини сақловчи зарурий фактор сифатида муҳимдир. GSH транспорти нисбатан аниқланганлигига қарамай, GSHнинг молекуляр даражадаги транспортерлари ҳақида маълумотлар кам. Маълумотнинг камлиги асосан қатор амалий ва назарий чегаралашлар билан изоҳланиб, улар GSH транспортерларининг функционал ва молекуляр характеристикасини тушунтириш бироз мушқул. Биринчи фактор хужайрадан глутатионни чиқишида иштирок этувчи транспортерларини тадқиқ қилиш бошқаларга нисбатан қийинлигида [107; 393-б; 121; 374-б; 132; 193-б]. Ҳозирги пайтгача хужайраларда экспортни бажарувчи оксиллар ҳақида маълумотлар камлиги (ABCдан ташқари) [47; 438-б 48; 523-б; 120; 86-б], GSH транспортини чегараловчи ингибиторлар асосида хужайра ички концентрацияларни аниқлаш мумкин эмаслигида ва улар хужайра ички ҳолатини ўзгартириши мумкинлигида. Шундай қилиб, GSHнинг характеристикасини бу трипептид бошқарувчи бошқа биохимик жараёнларга ва физиологик функцияларга таъсир этмасдан аниқлаш мумкин эмас. Изоляцияланган мембрана пуфакчаларидан фойдаланиш айрим чеклашларни енгишга ёрдам берди, лекин иккиламчи транспортерларнинг транспортини йўқолишига олиб

келади. Ундан ташқари мембрана пуфакчасини тайёрлаш пуфакча тўғри ёки тесқари томонидан келиб чиқиши туфайли олинган натижаларнинг таҳлилини чигаллаштиради. Иккинчидан, GSH транспортерлари паст самарадорликни намоён этади [108; 259-б; 111; 5232-б; 112; 171-б]. Шундай қилиб, табиий ҳолда GSH ҳужайраларда 1-10 мМ атрофида бўлади, лекин улар зарарланмаган ҳужайраларида ёки мембрана пуфакчаларида ўлчашда мушкуллик туғдиради [113; 723-б; 114; 417-б].

Юқорида тақидлаганимиздек, ҳужайралар апоптоз жараёнига учраганда улардан GSH чиқади ва ушбу факт шуни кўрсатадики, ABCС/MRP оқсиллар GSH чиқишига жавобгар [73; 14337-б]. Органик анион ташувчи (SLCO/OATP) полипептидлари мембранадан эндоген ва экзоген органик компонентлар ташилишида муҳим. Бу ташувчилар глутатионни қабул қилади ва органик анионга айлантиради. GSH ажралиши SLCO/OATP субстрати саналган таурохолик кислота томонидан кучаяди [54; 488-б; 58; 213-б].

Демак, SLCO/OATP GSH ни GSH/OA ионига ўзгартириб, унинг миқдори камайгач, ҳужайранинг дастурлаштирилган ўлимига олиб келади [23; 48-б]. Jurkat ҳужайралари Fas антитана ва циклоспорин-сезувчи апоптоз жараёнида ҳужайра ички GSH ни 75-80% ни ташқарига чиқариб юборади. Таққослаш учун Raji ҳужайралари (яъни ташқи фосфатиделсеринга кам бўлган лимфоцит ҳужайра) линияси апоптоз жараёнида GSH чиқармайди ва бу ҳужайраларда бошқа апоптотик омиллар ҳам секин кузатилади. Бу жараённи MRP1нинг жойлашиши ва функциядаги фарқи келтириб чиқаради. Jurkat ҳужайраларида MRP1 оқсили плазматик мембранада жойлашган ва бу ҳужайралар MRP субстрати калцеинни экспорт қилади. Апоптоз жараёнида сунъий равишда ҳужайрага киритилган калцеиннинг чиқиши кучаяди. Таққослаш учун Raji ҳужайраларида MRP оқсиллари плазматик мембранада жуда кам миқдорда бўлиб, апоптоз шароитларида калцеинни чиқариши ҳам кам кузатилади. Бу шуни кўрсатадики, ушбу ҳужайралар плазматик мембранасида функционал MRP оқсиллари кам миқдорда мавжуд. Jurkat ҳужайралари апоптоз жараёнига учрагандаги глутатион

чиқишини органик анион транспорти ингибиторлари МК571 (сулфинперозон ва пробенецид) томонидан ингибирланади. Қўшимча равишда РНК интерференцияси билан MRP оқсиллари экспрессияси камайтирилганда апоптоз шароитларида глутатион чиқиши ҳам кам бўлади. Бу шунга далил бўладики глутатион чиқишида MRP 1 оқсили иштирок этади [24; 517-б; 25; 1735-б, 117; 681-б].

Апоптоз жараёнига учраган ҳужайралар ташқи муҳитга глутатион чиқаради, лекин глутатион экспорти ва апоптоз жараёни механизми тўлиқ ўрганилмаган. Чунки глутатион кўпгина ҳужайравий жараёнларни бошқаради. Ҳужайра ички глутатионининг камайиши бу жараёнларни бузади [42; 1164-б;]. Апоптоз жараёнида глутатион чиқиши ҳужайра ўлимининг оддий давоми бўлса ҳам шундай факт борки, специфик апоптотик сигнал йўллари ва ҳужайра компонентларининг ўзига хос бузилишига керак бўлади [49; 56-б; 69; 117-б]. Масалан глутатионининг камайиши кислороднинг реактив турлари ёрдамчи мессенжерлар сифатида ишловчиларининг ошишига ёки митохондриал бузилиш ва апоптозни тезлашишига олиб келади. Юқорида айтиб ўтганимиздек, глутатион чиқишида транспорт оқсиллари иштирок этиши мумкин, чунки махсус фармакология орқали ингибирлаш апоптоз жараёнида глутатион чиқишини камайтиради ва апоптоз жараёнини секинлашишига олиб келади. Бу маълумотлар шуни кўрсатадики OATP оиласи оқсиллари апоптотик глутатион чиқишига жавобгар. Базал ҳолатларда глутатион чиқиши MRP оиласи оқсиллари томонидан амалга оширилади деб ҳисобланади. Охириги маълумотлар шуни кўрсатдики ҳужайраларнинг апоптоз жараёнида MRP оиласи оқсиллари глутатион чиқишига жавобгар экан, OATP оиласи оқсиллари бу жараёнда иштирок этмайди [17; 689-б; 18;238-б; 135; 3-б].

GSH ва GSН ҳосилаларининг синтези ва катоболизми γ -глутамил циклига тегишли бўлган плазматик мембрана энзиматик транспортерлари тўплами орқали бошқарилишида кўринади. GSН ни митохондрия ва эндоплазматик тўрга транспортининг механизми аниқланмаган, аммо

баъзи гипотезалар мавжуд. Буйрак ва жигар митохондриясида ўтказилган баъзи бир тадқиқотлар шуни кўрсатадики дикарбоксилат ва оксиглутарат ташувчилар GSH ни митохондрия ички мембранасидан ўтишига ҳисса қўшади. Аммо буйрак ва жигар хужайралари митохондриясидаги GSH транспортининг фарқи шундаки, унда қўшимча номаълум ташувчилар ҳам бор деб фараз қилинади. Эндоплазматик тўрда олиб борилган тадқиқотлар шуни кўрсатдики GSH ни ташилиши RyR1 (рианодин рецептори)га боғлиқ бўлиши билан тушунтирилади. Мавжуд шароитда RyR1 блокаторлари қўшилганда GSH чиқиши кузатилмагани бу органеллада GSH транспорти RyR1 билан бирга бўлади деб фикр юритиш мумкин [11;42927-б].

GSHнинг хужайрадан чиқарилиш механизмининг қийинлигига қарамаздан икки турдаги плазматик мембранадан GSH чиқариш механизмлари ўрганилганда, қуйидагилар аниқланган [26; 109-б]:

1. GSH транспортида MRP оқсилларининг роли *Saccharomyces cerevisiae* замбуруғида ўрганилган [32; 537-б; 36; 896-б; 137; 62-б;]. Қўшимча равишда замбуруғ транспортери Vpt1p (Ycf1p нинг гомологи) ҳам GSH транспортида иштирок этади. Чунки Vpt1p ва Ycf1p структуравий ва функционал жihatдан MRP оқсилларига гомолог ҳисобланади. Бу шуни кўрсатадики сутэмизувчилар хужайраларидан GSH чиқиши MRP1 ва MRP2 томонидан таъминланади [115; 33449-б].

2. Каламуш Oatp1 синусоидал органик транспортер бўлиб GSH органик эритувчилар воситачиси (алмаштирувчи) сифатида ишлаши кўрсатилган. Аммо охириги тадқиқотлар шуни кўрсатдики одамнинг Oatp оқсиллари GSH транспорти механизмида роли йўқ бўлиши мумкин [139; 210-б].

* * *

Юқорида тахлил қилинган адабиёт малумотларидан шуни ҳулоса қилшимиз мумкинки, глутатионнинг нормал шароитдаги ва

гипоосмотик стресс таъсирида чиқиш жараёни адабиётда деярли ёритилмаган. Шунга асосланган ҳолда, биз қуйидаги тажрибаларни олиб бордик.

II БОБ. ХУЖАЙРАЛАРНИ АЖРАТИБ ОЛИШ, ГЛУТАТИОННИ МИҚДОРИ ВА ТАЪСИР МЕХАНИЗМЛАРИНИ АНИҚЛАШ УСУЛЛАРИ

§2.1. Тадқиқот материаллари

Ишни бажаришда қуйидаги кимёвий препаратлар ва реактивлардан фойдаланилди: глутатион, глутатион редуктаза, NADPH (Oriental Yeast Япония), DTNB, MES, HEPES, SITS, NPPB, пробенцид, таураҳолат кислотаси, глибенкламид, флоретин, гадолиний, тамоксифен, дб-цАМФ, форсколин, теофиллин (Sigma, АҚШ), DCPiB (Tocris, АҚШ), амминогиппур кислотаси, нистатин (Wako, Япония). Қолган бошқа реактивлар: ЭДТА, ЭГТА, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , KCl , глюкоза Россияда ишлаб чиқарилган. Фойдаланилган барча реактивлар тажриба учун кимёвий таҳлил учун тозалик квалификациясига эга.

Тажрибаларимизда қуйидаги таркибли эритмалардан фойдаланилди.

1. Нормал Рингер эритмаси таркиби (мМ): 135 NaCl , 5 KCl , 10 HEPES, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 глюкоза, pH 7,4 (290 ± 2 мОсм/кг H_2O).
2. Н-буфер таркиби (мМ): 5 KCl , 10 HEPES, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 5 глюкоза, pH 7,4 (40 ± 2 мОсм/кг H_2O).
3. MES буфер таркиби (мМ): 400 2-(морфолино)этан сульфон кислотаси (MES), 100 KH_2PO_4 , 2 ЕДТА, pH 6,0.

Коктейл учун керакли компонентларнинг тайёрланиши:

1) Глутатионредуктаза – 2 бирлик/мл: фермент эритмасидан 100 мкл шприц ёрдамида тоза эппендорфга олинади ва – 20°C ҳарорат шароитида сақланади. Ишлатиш учун 2 мкл олинади ва 998 мкл MES буферда эритилади.

2) NADPH – 1,7 мг/мл H_2O . Музлатилган ҳолатда 2 ҳафта давомида сақланади.

3) DTNB – 3 мг/мл DTNB 50 мкл DMSO да эритилади ва MES буфер ёрдамида 1 мл гача келтирилди.

Коктейл (умумий ҳажми 4,25 мл; 10 минут давомида ишлатилди.): MES Buffer – 2,812 мл, глутатионредуктаза – 0,525 мл, NADPH – 0,226 мл, H₂O – 0,575 мл, DTNB – 0,112 мл.

KCl ли Рингер таркибидаги барча натрий хлор KCl га ўзгартирилди.

НМДГ ли Рингер эритмасида барча натрий хлор НМДГ га ўзгартирилди.

Глутаматли Рингер таркибидаги натрий хлор эквимолекуляр натрий глутаматга ўзгартирилди. Гипотоник эритмалар Рингер ва Н-буфер аралашмасида тайёрланди.

2.1-жадвал

Гипотоник эритмалар таркиби ва осмотик босими

№	Рингер (мл)	Н-буфер (мл)	Осмотиклик (мОс/кгH ₂ O)	Осмотик градиент (мОс/кг H ₂ O)
1	7	0	290	0
2	6	1	254	38
3	5	2	219	76
4	4	3	182	114
5	3	4	147	152
6	2	5	111	190
7	1	6	76	228
8	0	7	40	266

§2.2. Каламуш тимусидан тимоцитларни ажратиб олиш

Тажрибалар зотсиз (100-150 гр), виварийда оддий парҳезда боқилган, 6-8 ҳафталик оқ каламушларда олиб борилди. Каламушдан ажратиб олинган тимус беги нормал Рингер эритмасига солинди. Тимус қон томирлардан яхшилаб тозаланди ва Петри лycopчасига ўтказилиб, муз устида бир хил масса ҳосил бўлгунча ўткир пинцет билан майдаланди. Ҳосил бўлган масса ячейка ўлчами 100 мкм катталиқдаги нейлон тўрдан ўтказилди. Шу тарзда ҳосил қилинган суспензия 5 минут давомида 1000 айланиш/мин тезлигида центрифуга қилинди. Юзасидаги суюқлик (супернатант) олиб ташланиб, устига 1 мл Рингер эритмаси солинди ва бир хил масса ҳосил бўлгунча

яхшилаб аралаштирилди (ресуспензия қилинди). Тимоцитларни ажратиб олиш ишлари хона ҳароратида ўтказилди. Хужайралар сони Горяев камерасида ҳисобланди [3; 395-б].

§2.2.1. Тимоцитларнинг яшовчанлигини аниқлаш

Стандарт (1,5 мл) Эппендорф пробиркасига 10 мкл хужайра суспензияси ва 10 мкл кўк трипаннинг рингердаги 0.2%ли эритмаси солинди. Суспензия пипетка ёрдамида аралаштирилди. Кейин хужайрали масса томчиси тезлик билан Горяев камерасига олиб ўтилди ва хужайра чўкмага тушгунча 1 минут ушлаб турилди. Кейинги 3 минут ичида 100 та хужайра саналди, улар орасида кўк рангли (яъни мембранаси гидрофил трипан бўёғини ўтказувчи) ўлик хужайралар, рангсизлари эса тирик хужайралар бўлади. Тажрибаларимизда ўлик хужайралар сони 5%дан ошмади.

§2.3. Эритроцитлар суспензиясини тайёрлаш

Одам қони умумий усулда кўнгиллилардан олинди [4; 46-б]. Тоза пробиркага Рингер эритмаси антикоагулянт (гепарин, 10 бирлик/мл) билан бирга солинди. Қон (5-10 мл) билан венасидан бир мартабали стерил шприц ва нина ёрдамида олинди. Олинган қон 1:10 нисбатда Рингер эритмаси билан суюлтирилди ва 3000 айланиш/минут тезлигида 10 минут давомида центрифугаланди. Чўкма усти суюқлиги пипетка ёрдамида олиб ташландинди. Шу жараён (антикоагулянтсиз) Рингер эритмаси билан яна 2 мартаба такрорланди. Суспензиядаги эритроцитлар фоизини аниқлаш учун шиша найчага суспензия олиниб яна 3000 айланиш/мин тезлигида 10 минут давомида центрифуга қилинди. Бунинг учун оддий гематокрит капиллярлари, ёки 0,1 мл ўлчамли шиша пипетка капиллярдан 10 см узинликда кесилганини ишлатиш мумкин. Капиллярлар охири пластилин билан беркитилган бўлиши керак. Центрифугаланган суспензия аниқ икки қисмга ажраб қолади: сувли ва қизил қон хужайралари (қизил). Гематокрит (G) хужайра ҳажми (B_x) билан умумий ҳажм ($B_{умум}$) нинг фоизларда ифодалангани билан

ифодаланади.

$$Г = B_x / B_{\text{умуми}} \times 100\% \quad (2.1)$$

§2.4. Меланома тери рак хужайраларини культураси

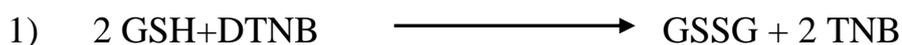
Меланома тери рак хужайралари культураси (КМЛ, патент № IAP 02729) ЎзФА Биоорганик кимё институти ходими Кузнецова Н.Н. томонидан тақдим этилди. Хужайраларни ўстириш учун RPMI-1640 (HIMEDIA) муҳитидан фойдаландик. Муҳитга 10% бузоқ эмбриони қони зардоби, NaHCO_3 , антибиотиклар ва глутамин қўшилди. Хужайралар 37°C да оддий термостатда сақланди ва моноқават 2-3 кундан сўнг ҳосил бўлди. Хужайра культураси Н.А.Циферова билан биргаликда олиб борилди.

§2.5. Тажриба протоколлари (схемалари)

§2.5.1. Глутатион моддасини аниқлаш усули

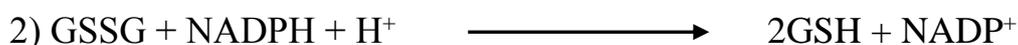
Глутатион чиқиши миқдорий колориметрик методи билан аниқланди. Бунда GSH 5,5-дитиобис 2-нитробензой кислота (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid, DTNB) реагенти таъсирида GSSG гача оксидланади ва 5-тио-2-нитробензой кислота (5-thio-2-nitrobenzoic acid, TNB) ҳосил бўлади [57; 58-б]. Реакциянинг охириги маҳсулоти сариқ рангли TNB бўлиб, у спектрофотометрнинг 425 нмли тўлқин узунлигидаги ёруғликни ютилиши орқали ўлчанди .

Асосий реакция:



Глутатионредуктаза ва NADPH таъсирида GSSG тухтовсиз GSHгача қайтарилади.

Глутатион редуктаза



Глутатион бу реакцияда катализатор вазифасини бажаради, умумий

реакцияда эса DTNB NADPH ҳисобига TNBгача қайтарилади, шу сабабли методнинг сезувчанлиги кескин ошади.

Реакциянинг умумий кўриниши:



Ушбу усулнинг умумий реакциялари маълумлигига қарамай, бизнинг экспериментал шароитимизда TNB оптик зичлиги ва глутатион концентрацияси орасида тўғри чизиқли боғланиш олингунча экспериментал шароитларни (коктейл таркиби, ҳарорат ва инкубация вақти) ўзгартириш зарур бўлди. Реакция тезлиги глутатион концентрациясига тўғри пропорционал бўлиши қуйидаги шароитда эришилди.

Тажрибанинг бориш тартиби: таркибида глутатион бўлган 125 мкл Рингер эритмасига 375 мкл коктейл қуйилди (умумий ҳажм 500 мкл). Хона ҳароратида 25 минут давомида қоронғи жойга сақланди. Эритма оптик зичлиги ўлчанади (425 нм). GSH концентрацияси калибровка эгри чизиғи орқали аниқланди.

Калибрлаш. Глутатионнинг сувдаги стандарт эритмаси тайёрланди (25 мМ) ва музлаган ҳолатда сақланди. Бу эритма охириги концентрацияси 50 мкМ (10 мкл/5000 мкл Рингер) бўлгунча Рингер эритмасида 500 марта суюлтирилди.

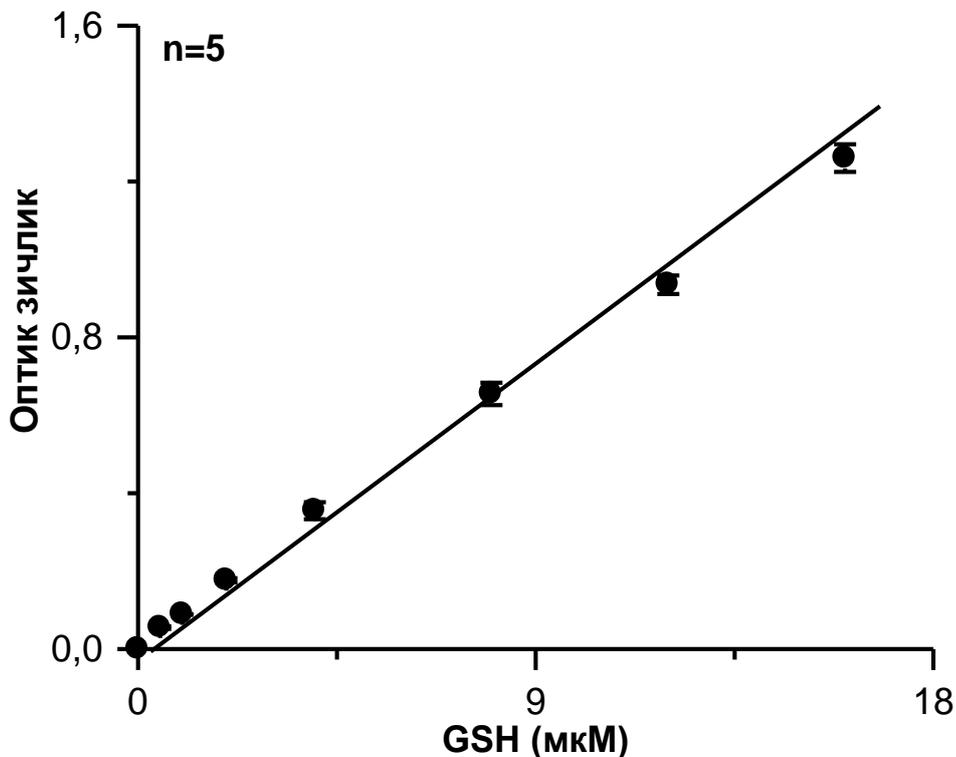
2.2-жадвал

Глутатионнинг Рингерда тайёрланган эритмалар қатори

№	GSH (50мкМ дан) (мкл)	Рингер (мкл)	GSH (охирги концентрация) (мкМ)
1	0	500	0
2	5	495	0,5
3	10	490	1
4	20	480	2
5	40	460	4
6	80	420	8
7	120	380	12

8	160	340	16
---	-----	-----	----

Олинган калибровка тўғри чизиғи 2.1-расмда кўрсатилган.



2.1-расм.

Глутатионнинг фотометрик аниқланиш тажрибаларида

олинган калибровка чизиғи. Ордината ўқида – 425 нм да ўлчалган оптик зичлик кўрсаткичлари; абсцисса ўқида – глутатион миқдори мкМда (n = 5).

§2.5.2. Тимоцитлардан глутатион ажралиб чиқишини аниқлаш

Стандарт методи орқали тимоцитлар ажратилиб олинди ва уларнинг яшовчанлиги аниқланди. Хужайра суспензиясининг концентрацияси 1 млрд/млга етказилди. Стандарт (1,5 мл) Эппендорф пробиркасига 100 мкл тимоцитлар суспензияси ва 900 мкл нормал Рингер (назорат) ёки гипотоник эритма (тажриба) қуйилди ва пипетка ёрдамида яхшилаб аралаштирилди. Аралашма хона ҳароратида 20 минут давомида инкубация қилинди. Кейин суспензия 10 минут давомида 1500 айланиш/мин тезлигида

центрифугаланди. Ҳосил бўлган супернатантдан Эппендорф идишига 125 мкл олиниб, унга 375 мкл коктейл қуйилди ва унда глутатион миқдори юқоридаги усул билан аниқланди. Яна бир назорат ҳужайрасиз бўлди: 125 мкл Рингер + 375 мкл коктейл ва бу назорат микроколориметрнинг ноль оптик зичлигини аниқлашда қўлланилди.

§2.5.3. Тимоцитлар ҳажмининг ўзгаришини ёруғлик ўтказиш услуби ёрдамида текшириш

Ёруғликни ўтказиш катталиги бўйича ҳужайра ҳажмини қайд этиш шунга асосланганки, ҳужайралар суспензияси ўзидан ўтувчи ёруғликни сочиб юборади, натижада ўтувчи ёруғлик интенсивлиги (I) кирувчи ёруғлик интенсивлигидан (I₀) анчагина камаяди [97; 223-б; 98; 608-б]. Ҳужайралар суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги қуйидаги формула орқали аниқланади:

$$T = (I / I_0) \times 100\% \quad (2.2)$$

Тажрибада ҳужайра ҳажмини ёруғлик ўтказувчанлиги бўйича қайд қилиш усули қўлланилган [90; 222-б; 91; 606-б; 124; 249-б;]. Тимоцитлар ҳажми ўзгаришини микроколориметр МКМФ-1 ёрдамида қайд қилинди. Ютилиш максимуми 610 нм бўлган ёруғлик фильтри қўлланилди. Микроколориметрда ўлчанган сигнал У5-11 операцион кучайтиргичи ёрдамида кучайтирилди ва GO!Link (Qubit Systems, Канада) аналог-рақам конвертори орқали компьютерга (Pentum IV) узатилиб, Logger Lite (Qubit Systems, Канада) махсус дастури ёрдамида 100 Гц частотасида қайд қилинди.

Тажрибаларда таркибида Рингер нормал эритмасидан (назорат) ёки бошқа синалаётган эритмалардан 900 мкл шиша кюветага солинди. Шиша кювета U-3 (Германия) сувли термостати билан боғланган. Ҳарорат барқарорлашгандан сўнг, ҳужайра суспензияси (100 млн/мл, 100 мкл) ячейкага солинди. Тажриба 15 минут давомида олиб борилди.

Регулятор ҳажм кичрайиши (*RVD, Regulatory Volume Decrease*)

қуйидаги формула орқали ҳисобланди:

$$RVD = [(T_{max} - T_{15}) / (T_{max} - T_0)] \times 100\% \quad (2.3)$$

Бу ерда T_0 ва T_{max} - ёруғлик ўтказучанликни бошланғич ва максимал кўрсаткичи, T_{15} – гипотоник шокдан 15 дақиқа ўтгандан сўнг ўлчанган ёруғлик ўтказувчанлик кўрсаткичи.

Бошланғич даражага етгунча ҳужайра ҳажмининг тўлиқ тикланиши $RVD = 100\%$ га тўғри келади. Ҳажм бошқарилишининг тўлиқ тўхтатилишида $RVD = 0$.

Назорат шароитларда RVD ҳужайра турига, осмотик градиент катталигига, ҳарорат ва бошқа экспериментал шароитга боғлиқ ҳолда 60-90% кўрсаткичга эга.

§2.5.4. Гемолиз миқдорини аниқлаш

Микротитратор платасининг 11 та ўйиқларига 200 мкл Рингер эритмаси солинди. Биринчи ўйиқ назорат учун қолдирилди. 2-чи ўйиққа аниқланаётган моддадан максимал концентрацияда солинди ва яхшилаб пипетка ёрдамида аралаштирилди (10 мартадан кам бўлмаган ҳолатда). Кейин 2-чи ўйиқдан 200 мкл эритмадан олиб, 3-ўйиққа солинди, аралаштирилди ва шу тарзда қолган ўйиқларга титрланди. Бунинг натижаси ўларок, ҳамма ўйиқлардаги аниқланаётган модда концентрацияси кўшни эритма концентрациясидан 2 мартага фарқ қилди. Яна бир ўйиққа 1%ли Тритон Х-100 эримасидан ҳужайрани тўлиқ гемолизлаш учун солинди. Тажриба уч марта ўтказилиши керак. Шунинг учун барча жараённи яна 2 қаторда такрорлаш лозим. Ҳамма ўйиқларга 200 мкл 8%ли эритроцитлар суспензияси солинди ва столнинг устки юзасида айлантириб аралаштирилди. Плата ойна билан ёпилиб термостатда 37⁰С да 30-60 минут давомида инкубация қилинди ва ҳар 10 минутда аралаштирилиб турилди. Ўйиқлардаги суюқликларни тоза 10 мл ли пробиркаларга олинди ва ҳар

бирига 1 мл дан Рингер солиниб, 3000 айланиш/мин тезлигида 10 минут давомида центрифуга қилинди. Чўкма усти суёқлигининг оптик зичлигини 540 нм да ўлчанди. Гемолиз фоизи қуйидаги формуладан келтириб чиқарилди:

$$\text{Гемолиз} = (OЗ / OЗ_{100}) \times 100\% \quad (2.4)$$

Бу ерда, $OЗ$ - бу тажрибадаги чўкма усти суёқлигининг оптик зичлиги; $OЗ_{100}$ - 3-ўйиқдаги тритон Х-100 детергенти билан чўкма усти суёқлигини ўртача оптик зичлигини ифодалайди.

§2.6 Натижаларнинг статистик таҳлили

Олинган натижаларни статистик қайта ишлаш ва расмларни чизиш OriginPro 7,5 (OriginLab Pro, США) компьютер дастури ёрдамида амалга оширилди. Матн аа расмларда тажрибалар такрорийлиги n ҳарфи билан ифодаланди, ва шу такрорларда олинган ўртача миқдор ($X_{ўрт}$) ва унинг стандарт хатоси (SE) кўрсатилди. Стандарт ҳато қуйидаги формула асосида ҳисобланди:

$$SE = \left\{ \left[\sum (X_i - X_{ўрт})^2 \right] / (n - 1) \right\}^{1/2} \quad (2.5)$$

Назорат ва тажрибада олинган ўртача қийматлар орасидаги фарқ Стьюдент t-тести бўйича ҳисобланди ва қийматлар фарқининг статистик ишончлилиги $P < 0,05$ даражасида ифодаланди. Уч ва ундан ортиқ ўртача миқдорларни тақослаганда вариацион анализ (ANOVA) алгоритмидан фойдаланилди.

III БОБ. ХУЖАЙРАЛАРДАН НОРМАЛ ВА ГИПООСМОТИК СТРЕСС ШАРОИТИДА ГЛУТАТИОН ЧИҚИШИГА ТАЪСИР ЭТУВЧИ ОМИЛЛАР ВА МЕХАНИЗМЛАРИ

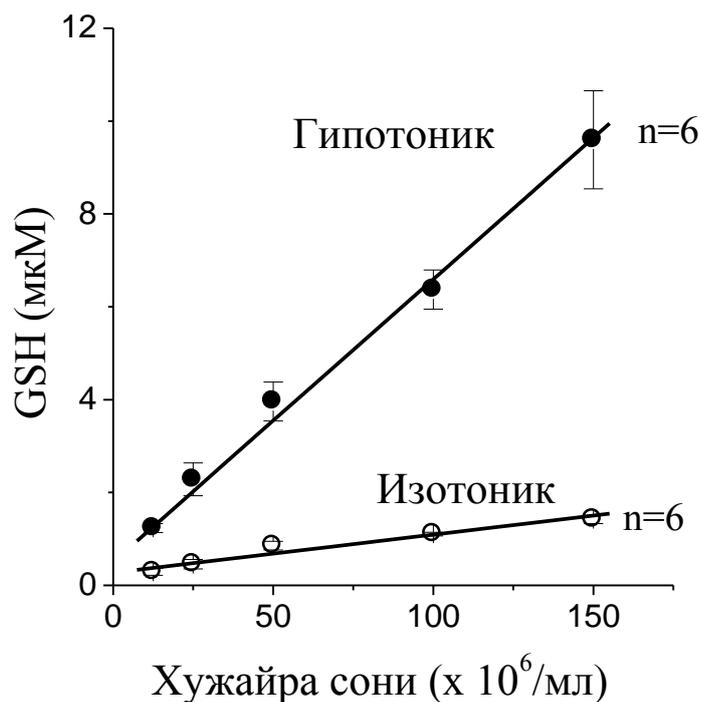
§3.1. Тимоцитлардан глутатион моддасини чиқиш системасининг умумий характеристикаси

Барча ҳужайра турлари каби, тимоцитлар ўз таркибида глутатионнинг маълум миқдорига эга, ва уни ҳам тинчлик нормотоник, ҳам гипоосмотик стресс шароитида ташқи муҳитга секреция қилиши керак. Лекин бу жараён адабиётда умуман ёритилмаган. Шу сабабли мазкур тадқиқотларимизда биз тимоцитлардан глутатион чиқарилишининг ҳужайра сонига боғлиқлигини, кинетикаси, ҳароратга, эритманинг осмотик босимиغا боғлиқлиги ва фармакологиясини систематик тадқиқ қилишни, ҳамда бу жараёндаги ион каналлари ва транспортерларнинг ролини ўрганишни режалаштирдик.

§3.1.1. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг ҳужайра сонига боғлиқлиги

Биз тадқиқотларимизнинг дастлабки босқичида нормал изоосмотик шароитда (290 мОсм/кг Н₂О) ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг Н₂О) шароитида тимоцит ҳужайраларидан ҳужайра ички суюқлигидаги глутатион чиқишини ҳужайра сони ортиб боришига боғлиқ ҳолда текширдик. Бунда нормал изоосмотик шароитда 10 минут давомида, ҳужайра сони 12,5 млн/мл бўлганда ҳужайрадан ташқи муҳитига $0,29 \pm 0,07$ мкМ (n=6) глутатион ажралди, ҳужайра концентрацияси 100 млн/мл бўлганда эса $1,11 \pm 0,04$ мкМ (n=6) глутатион ажралиб чиқди. Гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқиш тезлиги кескин ортганини кузатдик, яъни 10 минутда ҳужайра сони 12,5 млн/мл бўлганда $1,23 \pm 0,09$ мкМ (n=6), 100 млн/мл да эса $6,37 \pm 0,04$ мкМ

(n=6) глутатион ажралиб чиқди. Глутатионнинг хужайра ички сууюқлигидан чиқишининг хужайра сонига боғлиқлиги гипоосмотик стресс шароитида ҳам, нормал шароитдаги каби чизиқли кўринишга яқин бўлди (3.1-расм).



3.1-расм.

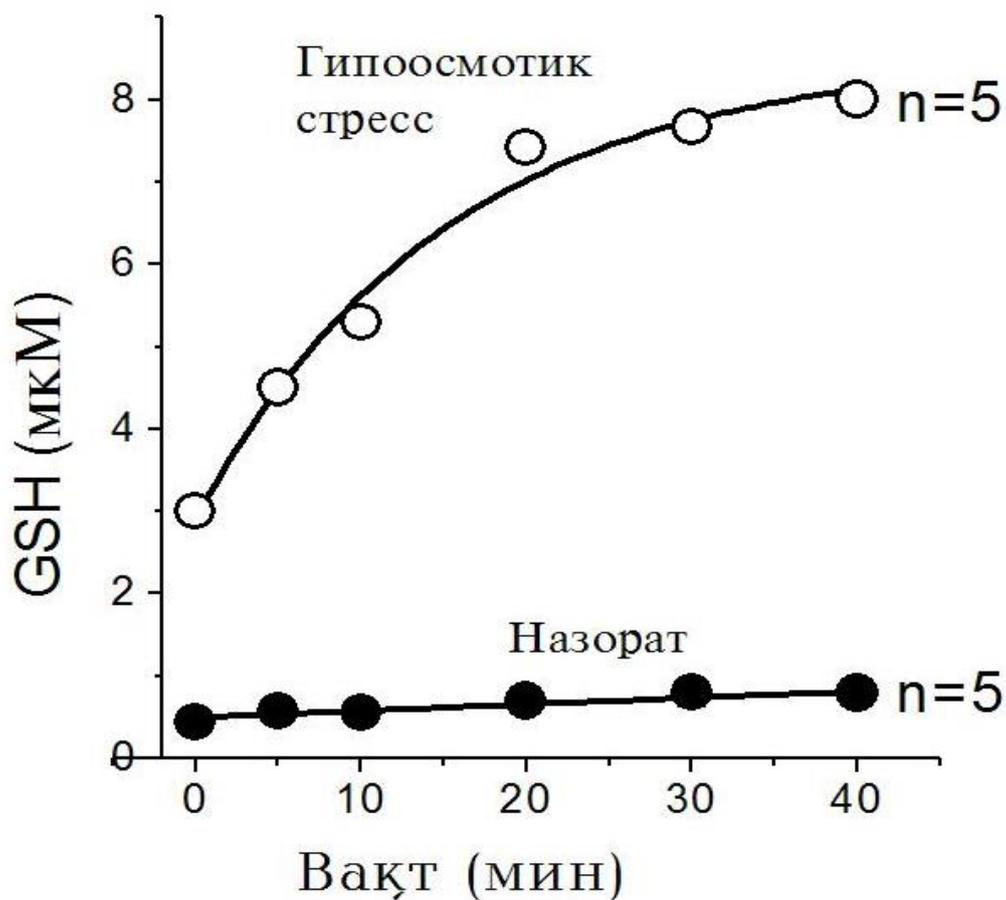
Тимоцит хужайраларидан хужайра сонига боғлиқ холда глутатион чиқиши.

Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – хужайра сони (млн/мл)да ифодаланган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n = 6$).

Бу бизнинг тадқиқотларимизда хужайра ички сууюқлигидан глутатион чиқиши манбаи айнан тимоцитлар эканлигини исботлайди.

§3.1.2. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг инкубация вақтига боғлиқлиги

Тажрибалармизнинг кейинги босқичида вақтга боғлиқ ҳолда изотоник ва гипотоник шароитларда тимоцит ҳужайраларидан глутатион чиқишини кўзатдик. Бунда 100 млн/мл ҳужайрадан нормал изотоник шароитда глутатион чиқиши вақтга боғлиқ ҳолда аста секин ошишини кўзатдик. Гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқиши кинетикаси нормал изотоник шароитдагисидан кескин фарқ қилди. Бунда тимоцитлар гипотоник муҳитга қўшилиши билан глутатион концентрацияси баланд бўлди. Вақт ўтиши билан ҳужайра ташқи муҳитидаги глутатион миқдори янада ошиб, тахминан 20 минут мобайнида стационар даражасига етди (3.2- расм). Бундай икки фазали кинетика глутатионнинг тимоцитлардан чиқарилишининг камида икки хил механизми мавжудлигидан далолат бериши мумкин.



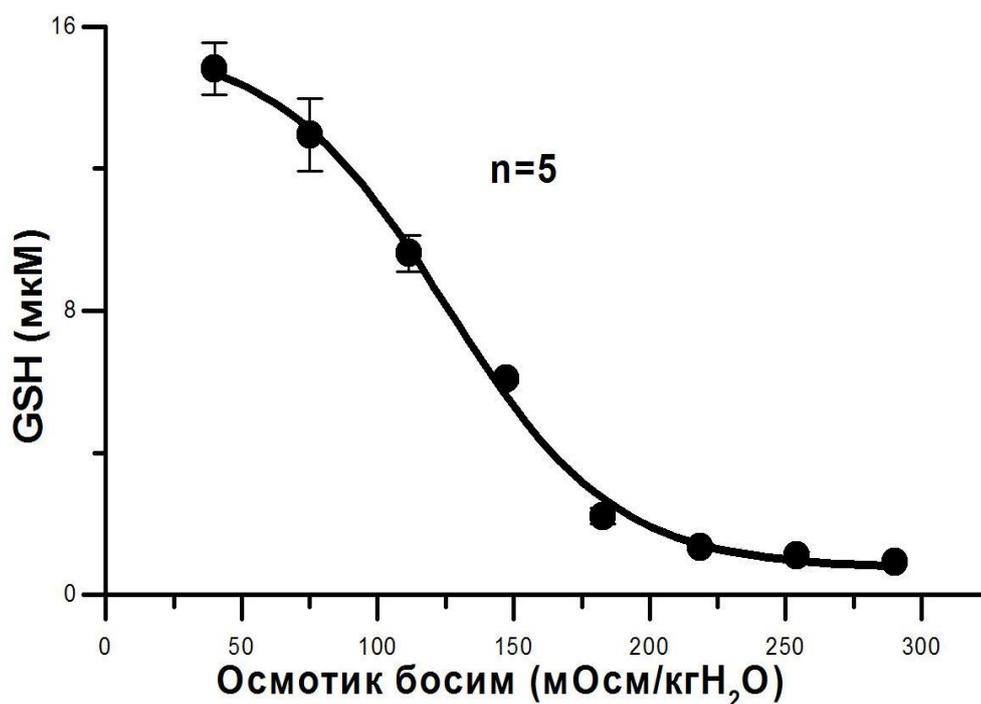
3.2-расм.

**Тимоцит хужайраларидан инкубация вақтига боғлиқ ҳолда
глутатион чиқиши.**

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – вақт (мин) да ифодаланган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n = 5$).

§3.1.3. Тимоцитлардан глутатион чиқишига эритма осмотик босимининг таъсири

Тадқиқотларимизда изоосмотик шароитларида ҳужайра ички суюқлигидан оз миқдорда глутатион чиқиши кузатилиб, гипоосмотик стресс шароитида унинг кўпайиши юз беради. Ҳужайра ички суюқлигидан глутатион чиқиши муҳитининг осмотик босимига боғлиқлиги сигмоид характерга эга бўлиб, 50% глутатион чиқиши муҳитининг осмотиклиги $125,1 \pm 4,3$ мОсм/кг H_2O га тенглиги кузатилди (3.3-расм).



3.3-расм.

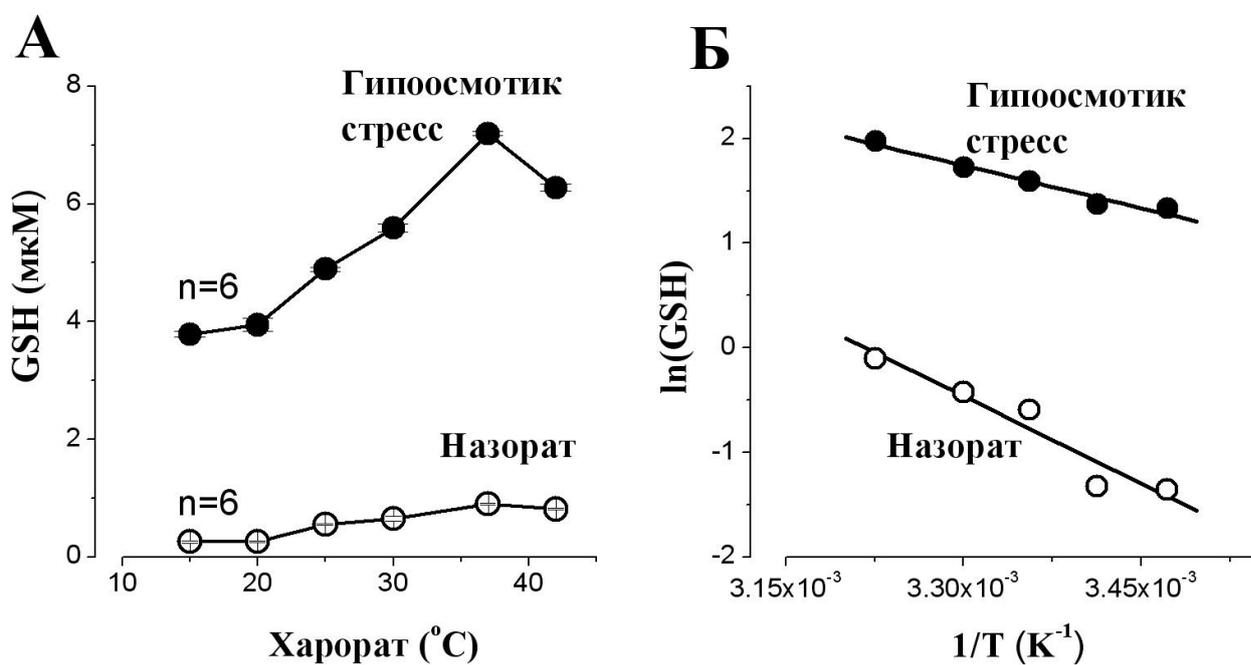
Тимоцит ҳужайраларидан осмотик босимга боғлиқ ҳолда глутатион чиқиши.

Ҳужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – ҳужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – осмотик босим (мОсм/кг H_2O) да ифодаланган. Барча ҳолатларда изотоник назоратга нисбатан $P < 0,05$ (n=5).

Кейинги тажрибаларда гипоосмотик эритма осмотиклиги 147 мОсм/кг H₂O дан иборат бўлди.

§3.1.4. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг ҳароратга боғлиқлиги

Тажриба муҳитининг ҳарорати нормал ҳолатда ҳам, гипоосмотик стресс шароитида ҳам глутатион чиқишига сезиларли таъсир кўрсатди. Тимоцитлардан глутатион чиқиш миқдори иккала шароитда ҳам ҳарорат ортиши билан 15⁰Сдан 37⁰Сгача бўлган диапазонда текис ортди. 42⁰С ҳароратда хужайрадан глутатион чиқиш тезлиги камайди. Бу ҳолат температура шоки таъсирида глутатион чиқариш системасининг бузилишини ўзида акс эттиради. 15-37⁰С диапазондаги ҳароратга боғлиқлик Аррениус координаталарида чизиқли бўлиб, жараённинг фаоллашув энергияси изотоник (назорат) глутатион чиқиш жараёни учун 11,1±1,8 ккал/моль, ва гипоосмотик стресс шароити учун 5,4±0.6 ккал/мольни ташкил этди. Фаоллашув энергиясидаги бундай катта фарқ бу икки тажриба шароитидаги глутатион чиқиш механизмларнинг турлича эканлигидан далолат беради. Гипоосмотик шароитдаги нисбатан паст фаоллашув энергияси, осмотик босим таъсирида шишган хужайралар мембранасидаги ион каналлари иштироки билан амалга ошувчи глутатион транспортининг диффузион механизми борлигидан далолат беради.



3.4-расм.

Тимоцит хужайраларидан мухит хароратига боғлиқ холда глутатионнинг чиқиши.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- харорат (°C) да (А) ёки 1/T (K⁻¹)да ифодаланган. Барча ҳолатларда изотоник назоратга нисбатан P < 0,05 (n = 6).

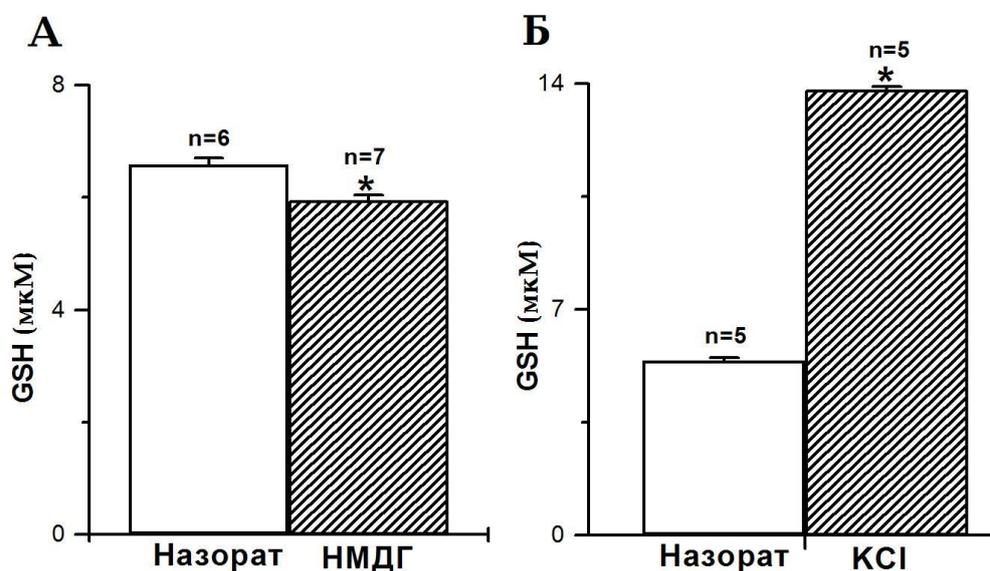
§3.2 Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқиш механизмини ўрганиш

Бизнинг дастлабки тажрибаларимизда гипоосмотик стресс шароитида ҳужайралардан ҳужайрааро муҳитга катта миқдорда глутатион чиқарилиши аниқланди. Бу жараён адабиётларда тавсифланмаган. Шу сабабли мазкур тажрибаларимизнинг кейинги қисмида биз тимоцитлардан глутатион чиқарилишига ион каналлари ва транспортерларнинг эҳтимолий ролини ўрганишни режалаштирдик.

§3.2.1. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига эритма ион таркибининг боғлиқлиги

Тажрибаларимизни олиб боришда эритма таркиби муҳим ўрин тутди. Биз тажрибаларимизда эритма таркибидаги натрий ионини НМДГ (N-methyl-D-glucamine) ва калий ионига алмаштирдик. Назоратда $6,58 \pm 0,12$ мкМ глутатион ажралган бўлса, солинган НМДГли эритмада $5,95 \pm 0,09$ мкМ глутатион чиқиши кўзатилди. Бундан кўришиб турибдики НМДГ ҳужайрадан глутатион чиқишини камайтиради (3.5А-расм), ва бу камайиш глутатион чиқишида натрийга боғлиқ бўлган транспорт механизмининг иштирокидан далолат беради. Эритма таркибидаги натрий ионини калий ионига алмаштириб тажрибаларни давом эттирдик. Бунда 100 млн/мл ҳужайрадан 20 минут давомида назоратда $7,43 \pm 0,12$ мкМ, калийли эритмада эса $15,01 \pm 0,18$ мкМ глутатион чиқиши кузатилди (3.5Б- расм). Олинган натижа мембрана потенциали юқори-калийли муҳитда юқорида кутилган натижадан фарқ қилади, чунки ҳужайра ички манфий электрик потенциали манфий зарядга эга бўлган глутатионни ҳужайрани тарк этишига кўмаклашиши керак. Тахминимизча, калийнинг юқори концентрациясида тимоцитлар

шишиши (бу адабиётда таърифланган) глутатион чиқишини ортиб боришига олиб келган бўлиши мумкин.

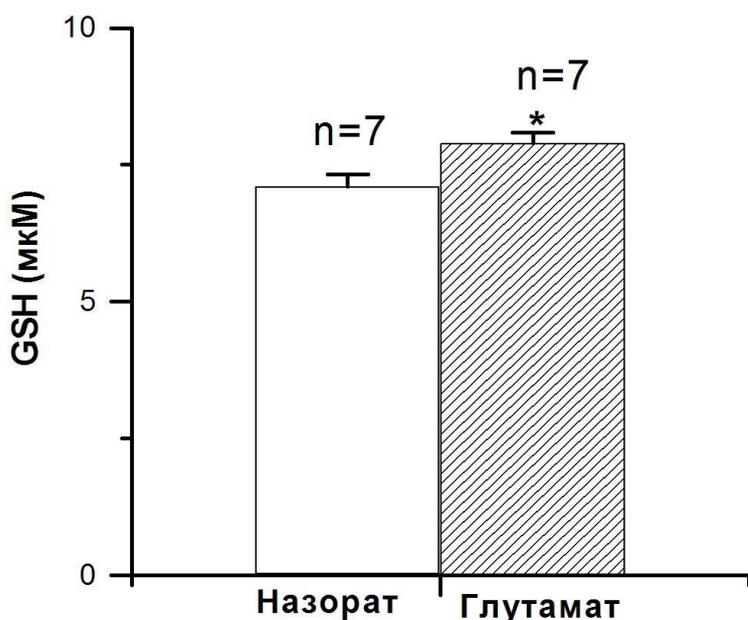


3.5-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига эритма таркибидаги натрий ионини (А) НМДГ ва (Б) калий ионига алмаштирилгандаги таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида - тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=7$).

Тажрибаларимизнинг кейинги босқичида эритма таркибида хлор ионини ролини аниқлаш мақсадида, эритма таркибида натрий хлорид ўрнига натрий глутаматдан фойдаландик. Бу тажрибамизда 100 млн/мл хужайрадан 20 минут давомида назоратда $7,1 \pm 0,22$ мкМ, глутаматли эритмада эса $7,9 \pm 0,19$ мкМ глутатион чиқиши кўзатилди (3.6-расм). Глутатион миқдори камаймаганлиги, ва аксинча, бирмунча ортганлиги глутатион чиқиш механизми хлор алмашуви жараёнига алоқаси йўқлигидан далолат беради.

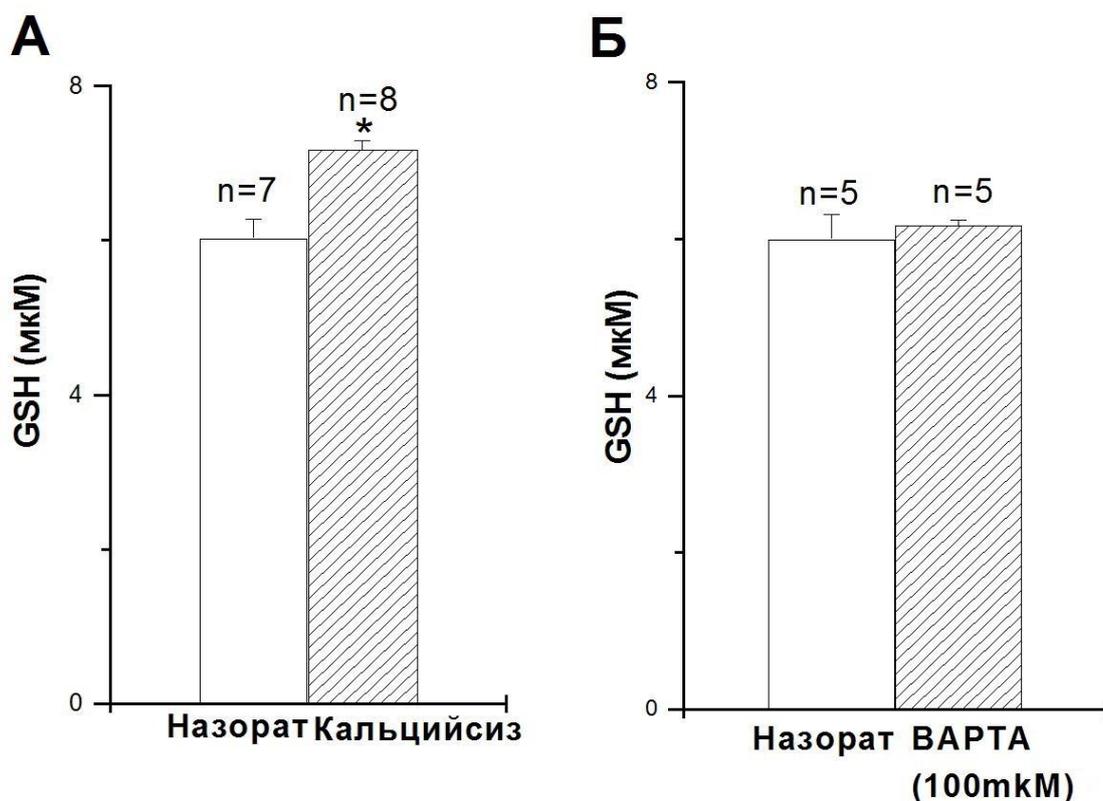


3.6-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига эритма таркибидаги хлор ионини глутаматга алмаштирилгандаги таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=7$).

Глутатион чиқиш жараёнида кальций ионининг ролини аниқлаш учун биз эритма таркибидаги кальций ионини олиб ташладик. Олинган натижаларга кўра назоратда $6,03 \pm 0,25$ мкМ глутатион ажралган бўлса, кальцийсиз муҳитда $7,17 \pm 0,13$ мкМ глутатион ажралиб чиқди. Тажрибамизнинг кейинги қисмида хужайра ички муҳитидаги кальцийнинг глутатион чиқишига таъсирини аниқлаш учун 100 мкМ ВАРТА эритмасидан фойдаландик. ВАРТА хужайра ичидаги кальцийни боғлаб олади ва жараёнда иштирок этишига йўл қўймайди (3.7-расм). Бундай шароитда глутатион ажралиб чиқиши сезиларли ўзгармади. Олинган натижа гипоосмотик стресс шароитидаги глутатион чиқиши механизмида кальций ионларининг иштироки муҳим эмаслигидан далолат беради.



3.7-расм.

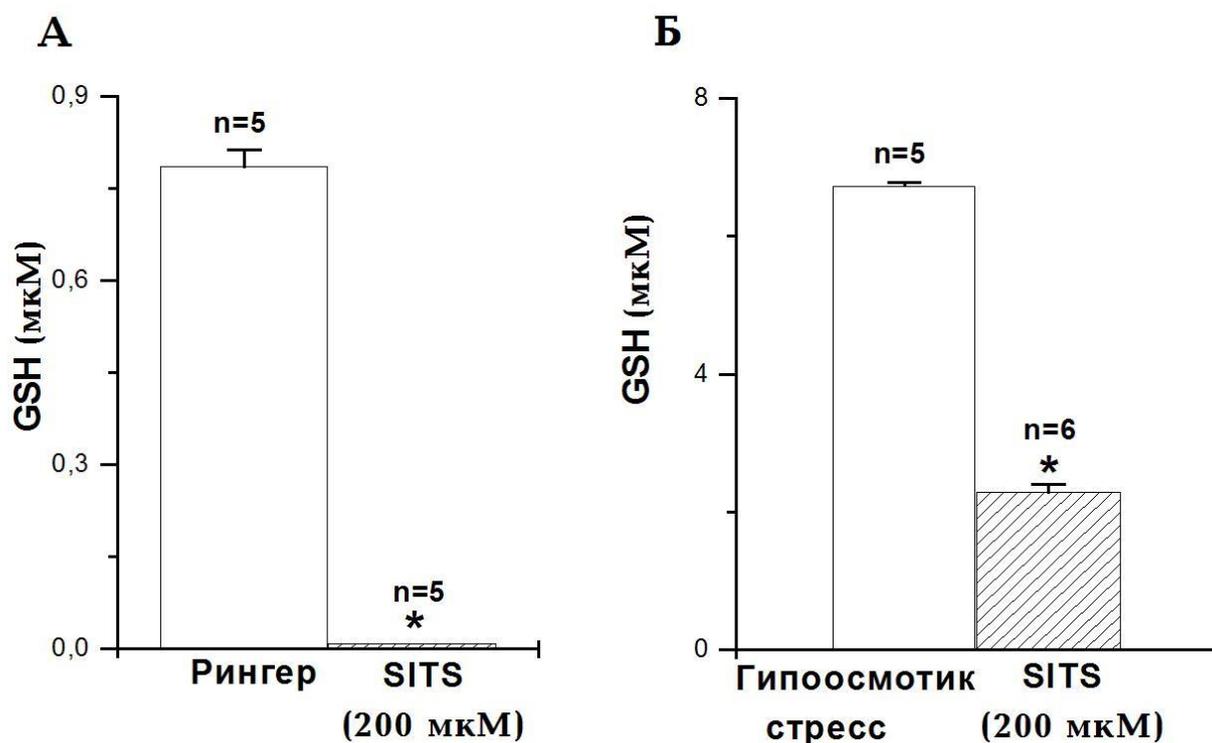
Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига эритма таркибидаги кальций ионини олиб ташланганлиги (А) ва ВАРТА комплексони ёрдамида хелатланганининг (Б) таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – таъриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=7$).

§3.2.2. Тимоцитлардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига анион каналлари блокаторларининг таъсири

Глутатион молекуласи манфий зарядга эга ва шу сабабли назарий жихатдан анион транспорт системалари орқали хужайра ташқи муҳитига чиқарилиши мумкин. Дарҳақиқат, кенг таъсир спектрига эга бўлган анион

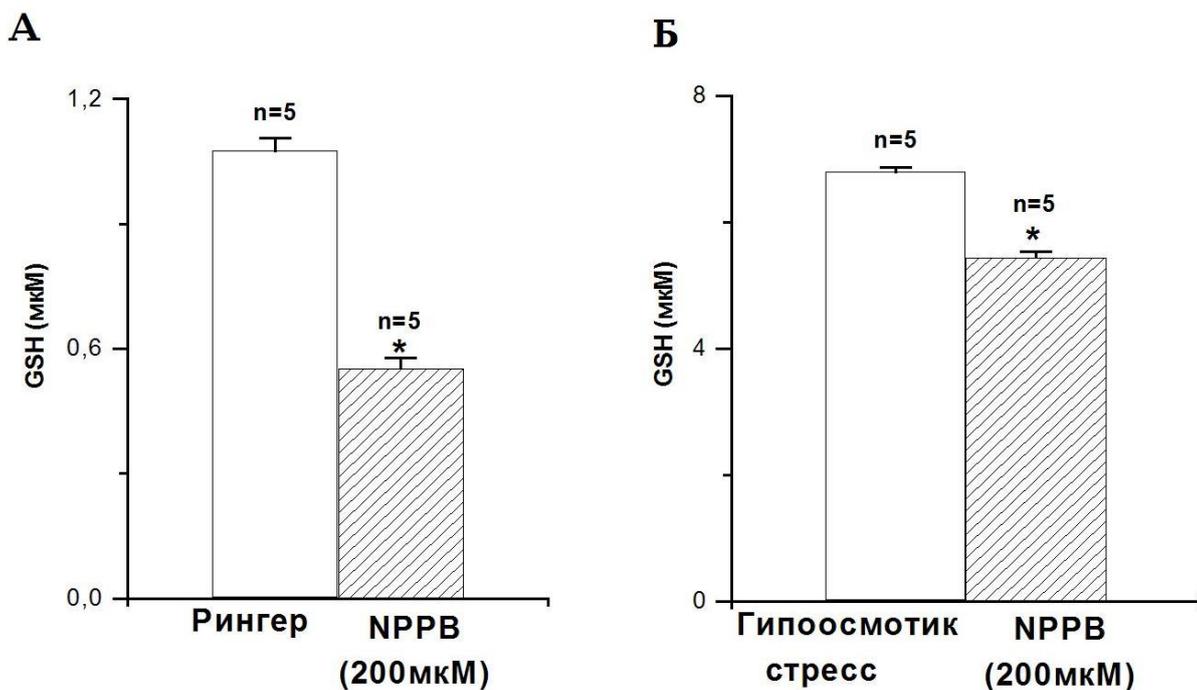
транспорти блокаторлари SITS (4-ацетамидо-4-изотиоцианатостилбен-2,2-дисульфон кислотаси) ва NPPB (5 нитро-2-(3-фенилпропиламино) бензой кислотаси) гипоосмотик стресс шароитида нормал изоосмотик шароитдаги каби глутатион чиқишини сезиларли даражада камайтирди. Тажрибаларамизда, гипоосмотик стресс шароитида 200 мкМ концентрацияда SITS ва NPPB хужайри ички муҳитидан глутатион чиқишини назоратга нисбатан $66,0 \pm 5,3\%$ ва $18,8 \pm 1,7\%$ га камайтирди (3.8А,Б- ва 3.9А,Б-расмлар).



3.8-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига анион транспорти блокатори бўлган SITSнинг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n = 6$).



3.9-расм.

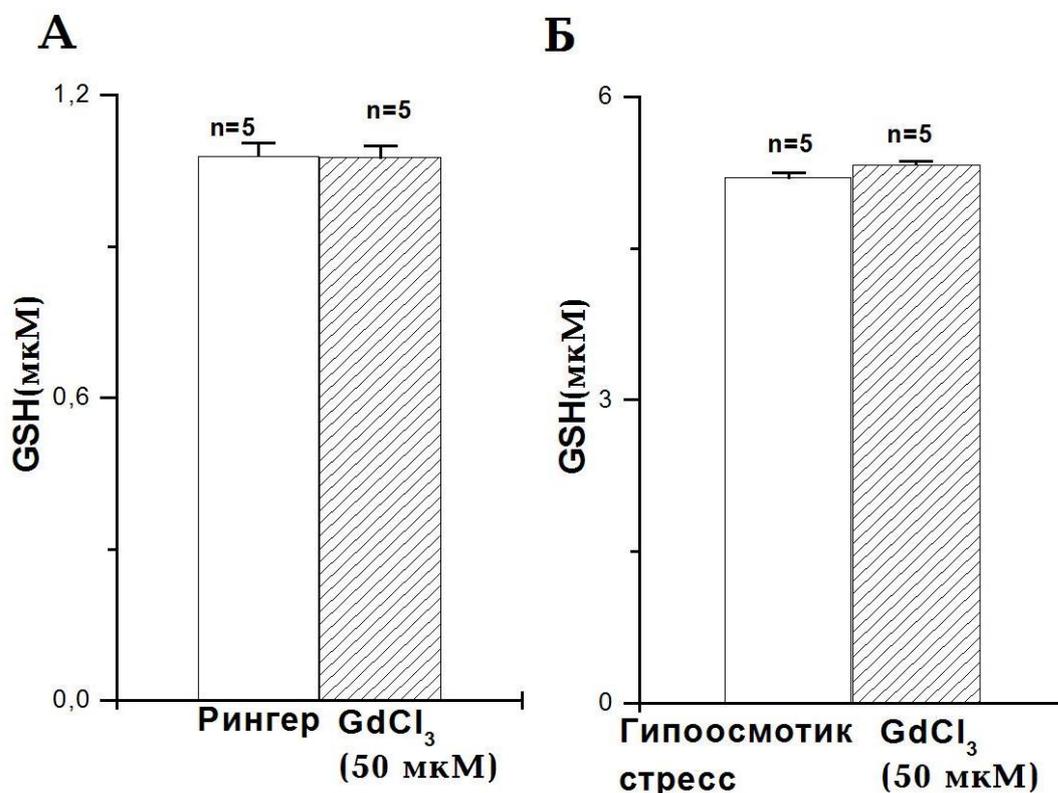
Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига анион транспорти блокатори бўлган NPPB нинг таъсири.

Хужайра сони 100млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$).

Хужайраларда осмотик стресс ҳолатида асосан икки хил анион каналлари фаоллашади, улар: ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали ва макси-анион канали. Gd^{3+} (50 мкМ) ионлари анион каналлари орасидан фақатгина макси-анион каналини блокаб, тимоцитларда глутатион чиқарилишига сезиларли таъсир ўтказмади (3.10-расм), бу эса мазкур каналнинг глутатион чиқарилиш жараёнида иштирок этмаслигини кўрсатади.

Айни вақтда ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали блокаторлари - флоретин (200 мкМ), 4-(2-бутил-6,7-дихлор-2-циклопентил 1-индан-1-он-5-ил) оксимой кислотаси (DCPIВ) (20 мкМ), тамоксифен (50 мкМ) ва глибенкламид (200 мкМ) тимоцитлардан глутатион чиқишини сезиларли даражада сусайтирди. Хусусан, гипоосмотик стресс шароитида флоретин

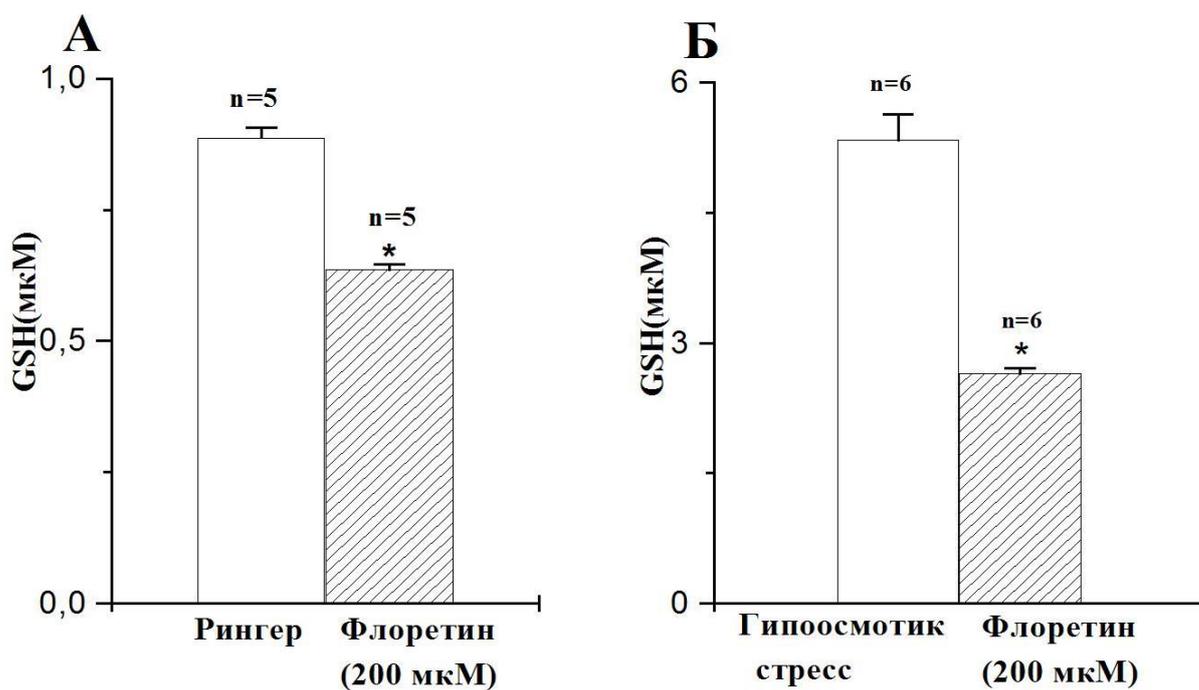
моддаси глутатион чиқишини $61,9 \pm 2,3$ %га ва DCPiBда $35,8 \pm 2,0$ %га, глибенкламид эса $14,2 \pm 1,2$ %га камайтирди (3.11-, 3.12-, 3.13- ва 3.14-расмлар). Бу натижалар ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналининг глутатион транспортида асосий роль ўйнашини кўрсатади.



3.10-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига макси-анион каналлари блокатори бўлган гадолинийнинг таъсири.

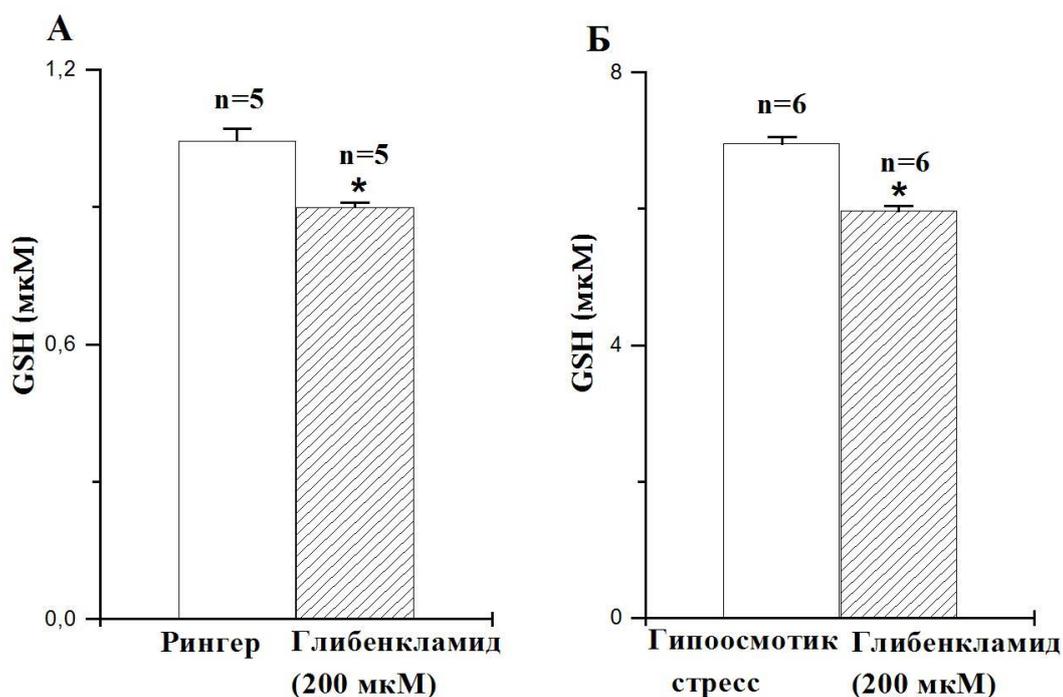
Хужайра сони 100млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган.. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$).



3.11-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган флоритеннинг таъсири.

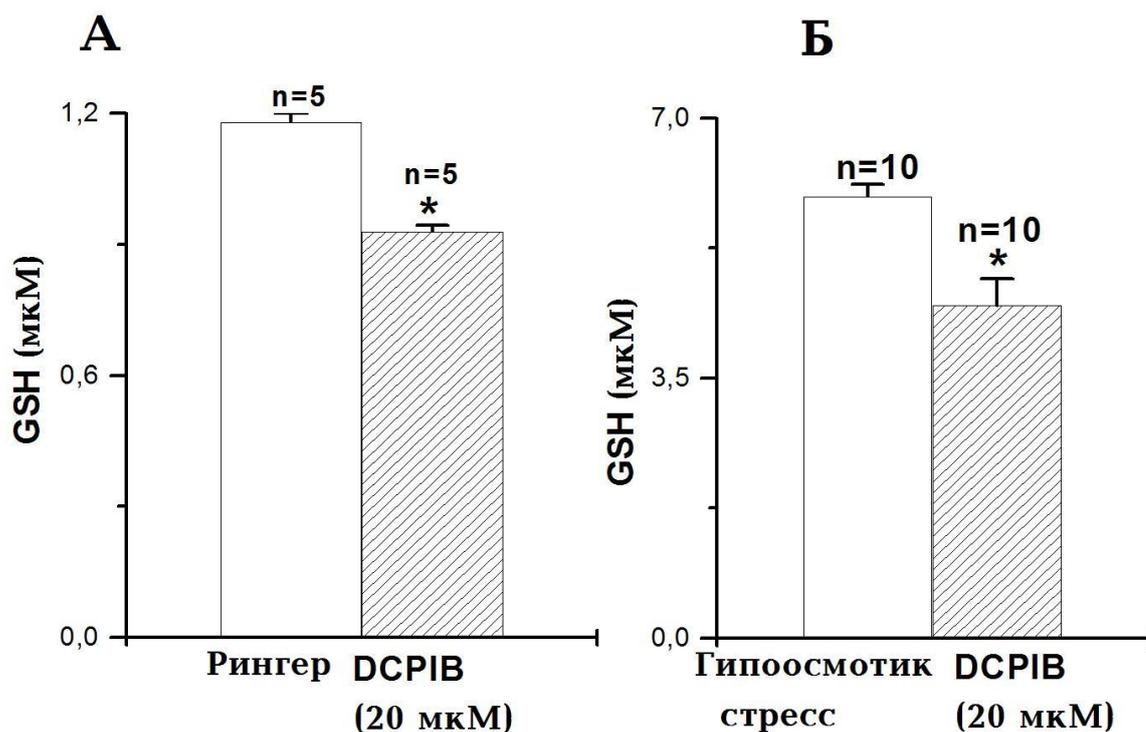
Хужайра сони 100млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- таъриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ (n=6).



3.12-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган глибенкламиднинг таъсири.

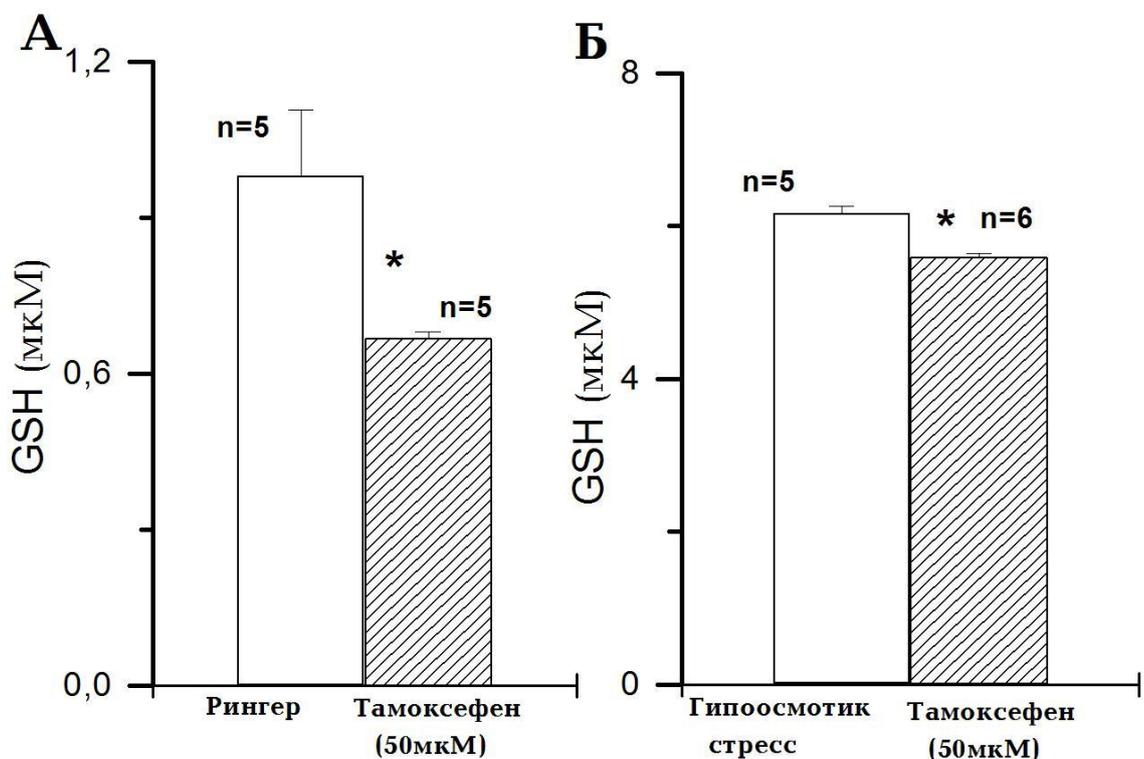
Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ (n=6).



3.13-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган DCPIVнинг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=10$).



3.14-расм.

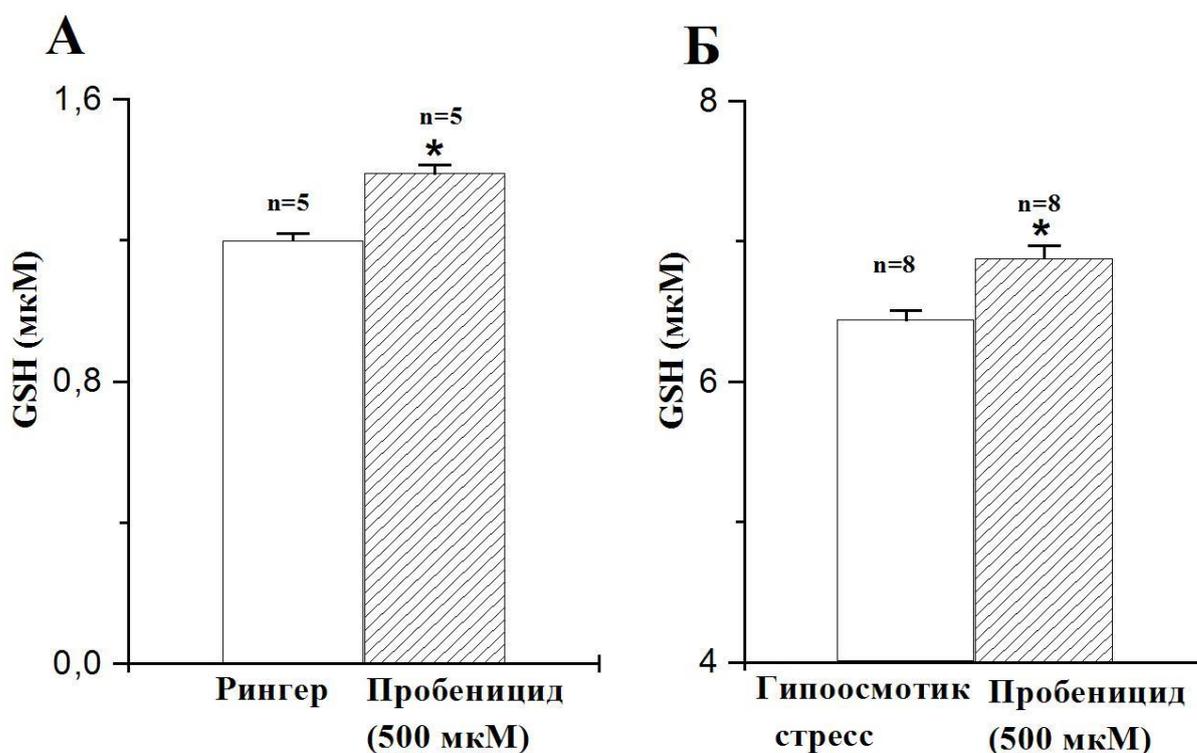
Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган тамоксифеннинг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=6$).

§3.2.3. Тимоцитлардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига мембрана транспортерларининг роли

Глутатионнинг трансмембрана ўтказилишида нафақат ион каналлари, балки анион транспортерлари ҳам иштирок этиши мумкин [67; 213-б]. Маълумки, АВСС/MRP мембрана оқсили АТФаза бўлиб,

АТФ гидролизи ҳисобига хужайрадан органик анионларни чиқаради. Лекин тажрибаларимизда мазкур оқсил субстратори бўлган ва хужайра ташқи томонидан қўшилиш орқали унинг функциясини бостирувчи пробенецид, глутатион чиқарилишини ингибирланиши эмас, балки $6,8 \pm 1,3\%$ га стимулланишига олиб келди (3.15- расм). Бундай натижа бир томондан АВСС/MRPнинг глутатион чиқарилишидаги ролига қарши гувоҳлик берса, бошқа томондан бошқа анион транспортерининг мавжудлигини кўрсатади, ва у алмаштирувчи бўлиб, унинг фаоллиги мембрананинг хужайра ташқи томонида субстрат мавжудлигида ортади.



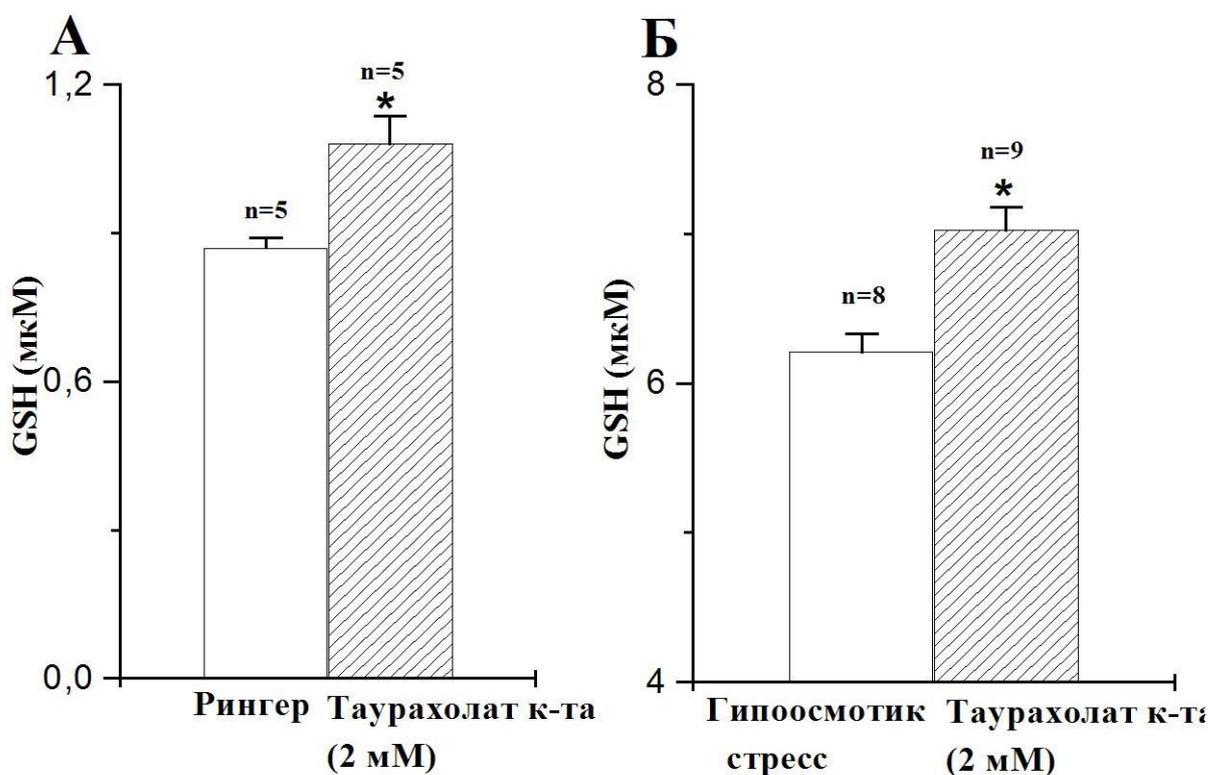
3.15-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига АВСС/MRP мембрана транспортери субстрати бўлган пробенециднинг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$

(n=5).

Дарҳақиқат, пробенецид нафақат ABCС/MRP учун, балки органик анионлар транспортери SLCO/OATP учун ҳам субстрат бўлиб, улар мембранадан қарама-қарши томондан анионлар алмашади. Мазкур транспортернинг ролини тасдиқлаш учун бошқа SLCO/OATP субстрати – тауроҳолат кислотаси иштирокидаги глутатион чиқишини тадқиқ қилдик. Тажрибаларимизда мазкур модда ҳам глутатион чиқишини $13,2 \pm 2,1$ %га транс-стимуляциясини юзага келтирди (3.16-расм) ва мазкур транспортернинг иштирокини тасдиқлади.



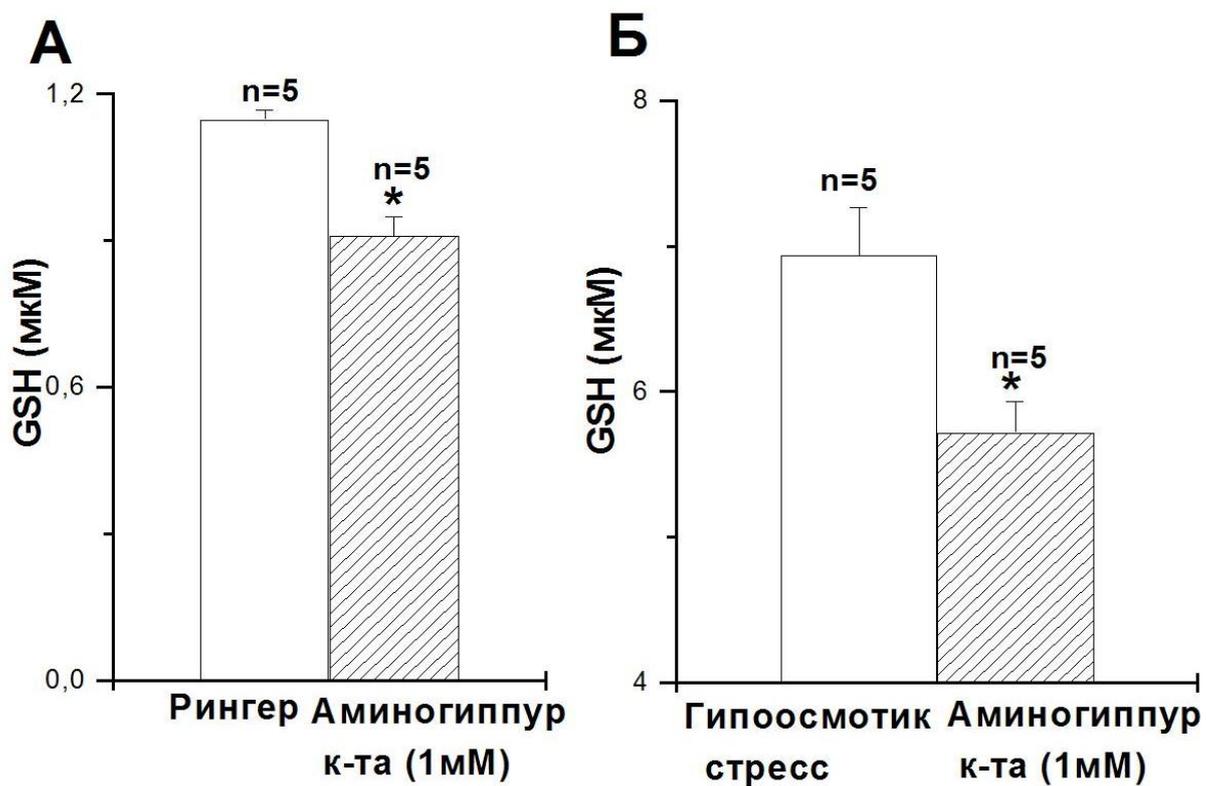
3.16-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига органик анион ташувчи полипептид SLCO/OATP субстрати бўлган тауроҳолат кислотасининг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$

SLC22A/OAT мембрана оксигени анионлар учун натрийга боғлиқ транспортерлар гуруҳига мансуб бўлиб, аминокислотасидан ингибирланади. Тажрибаларимизда мазкур модда глутатион чиқишини $17,5 \pm 3,8$ %га камайтирди (3.17- расм). Шундай қилиб, олинган натижалар тимоцитлардан глутатион чиқарилиши гипоосмотик стресс шароитида бир неча транспорт йўлларида амалга оширилишини кўрсатади. Мазкур жараёнда асосий рольни ташқи тўғриланишли ҳажмий боғлиқ анион каналлари бажариб, глутатион чиқарилишининг 60%и айнан шу каналлар орқали содир бўлади. Қолган қисми эса хужайралардан SLCO/OATP ва SLC22A/OAT каби транспортерлар орқали амалга оширилиши мумкин. Кўринишича, бизнинг тажриба шароитларимизда ABCG2/MRP 1 АТФазаси глутатион чиқарилишида иштирок этмайди.

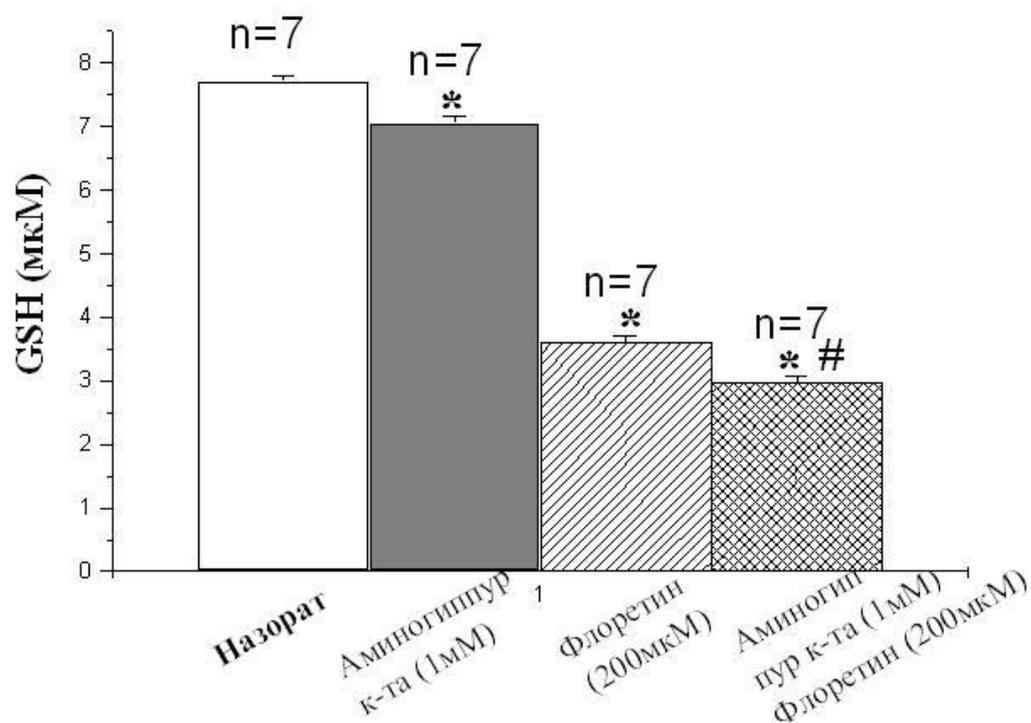
Тажрибаларимизнинг кейинги қисмларида биз тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали блокаторлари - флоретин (200 мкМ) ёки DCPIB (20 мкМ) ва SLC22A/OAT мембрана оксигени анионлар учун натрийга боғлиқ транспортерлар гуруҳи ингибитори аминокислотасининг биргаликдаги таъсирини ўргандик. Натижада аминокислотаси флоретин (3.18- расм) ва DCPIB (3.19-расм) билан биргаликда қўшилганда ҳам глутатион чиқишини сезиларли даражада камайтирди. Олинган натижалар тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион каналлари ва SLC22A/OAT мембрана оксигени анионлар учун натрийга боғлиқ транспортерлар гуруҳи алоҳида-алоҳида (бир-бирига боғлиқ бўлмаган ҳолда) иштирок этишини исботлайди, чунки акс ҳолда флоретин ёки DCPIB хузурида аминокислотаси таъсир этмаган бўларди.



3.17-расм.

Нормал (А) ва гипоосмотик стресс (Б) шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига SLC22A/OAT мембрана оқсили ингибитори аминогиппур кислотасининг таъсири.

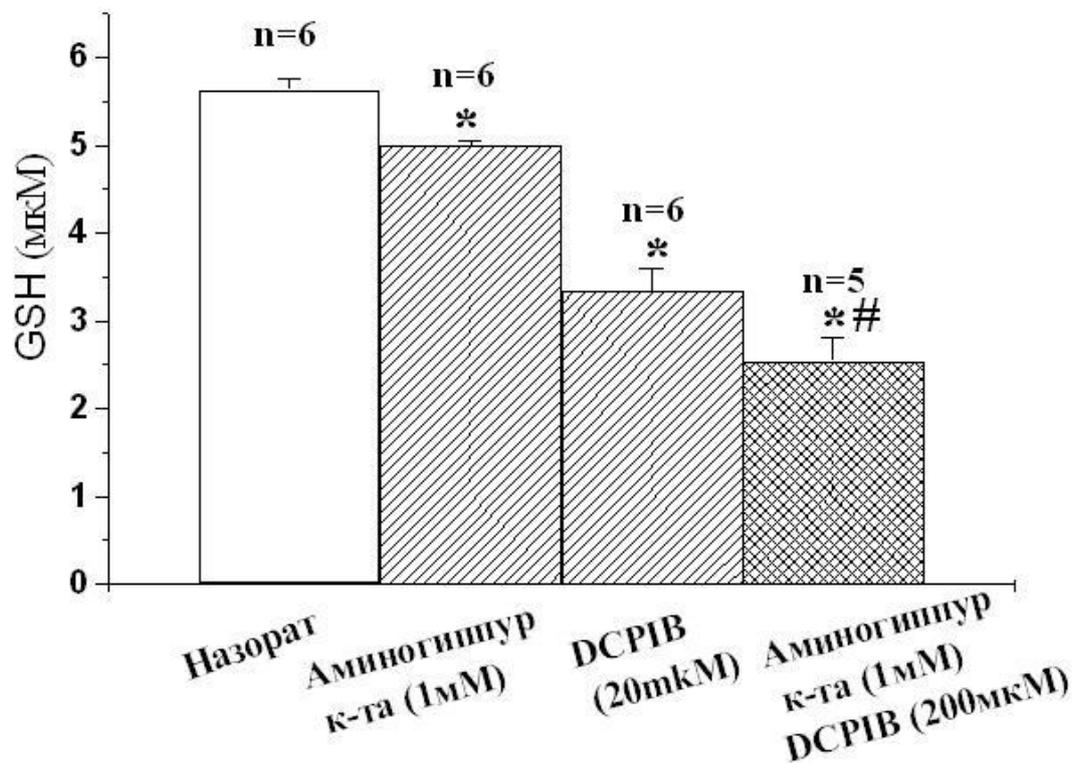
Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ (n=5).



3.18-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига SLC22A/OAT мембрана оксиди ингибитори аминогипшур кислотаси ва ҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган флоритеннинг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$).



3.19-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига SLC22A/OAT мембрана оксиди ингибитори аминогипшур кислотаси ваҳажмга боғлиқ анион каналлари блокатори бўлган ДСРІВнинг таъсири.

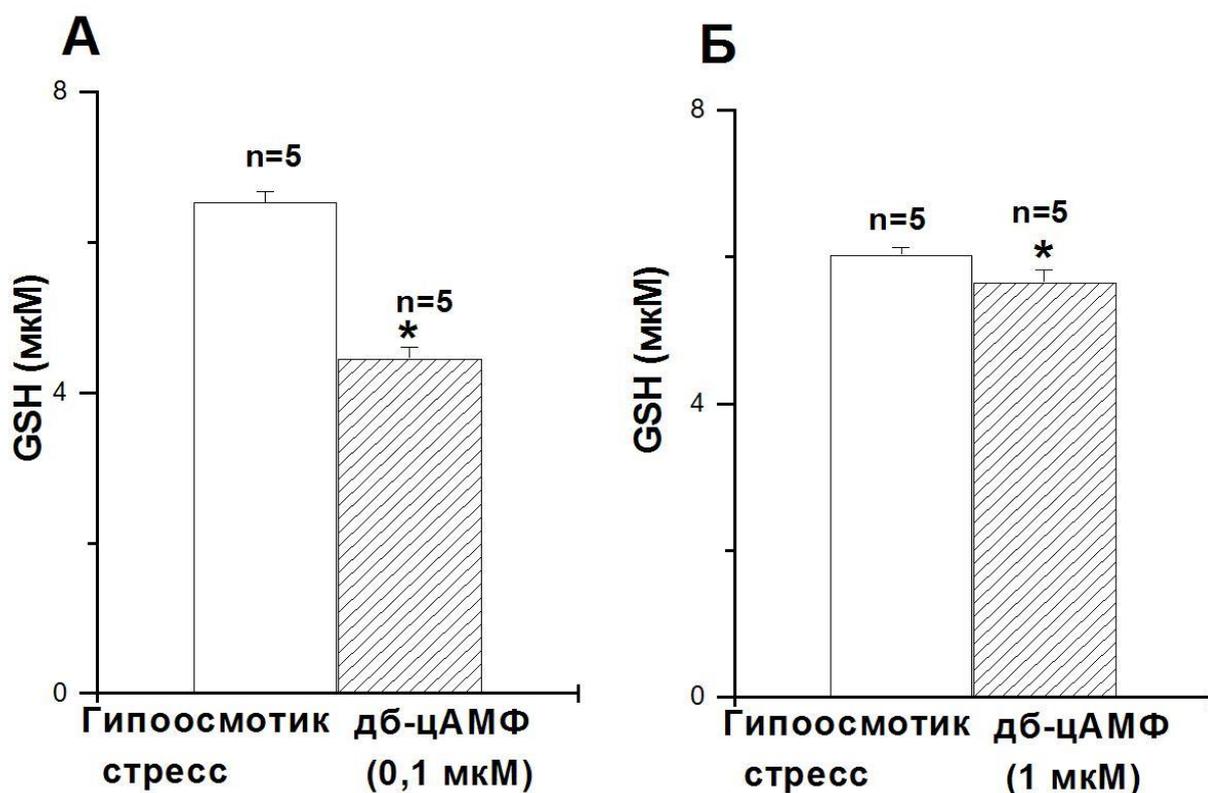
Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- тажриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ (n=5).

§3.2.4. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига хужайра ичидаги цАМФ нинг роли

Циклик аденазинмонофосфат организмда хужайра мембранаси орқали ўта олмайдиган айрим гормонлар сигналларини хужайра ичкарисида узатилишида иштирок этувчи иккиламчи воситачи ролини бажаради. цАМФ айрим гармонал стимулларга жавоб равишида аденилатциклаза ферменти ёрдамида синтезланиб, хужайра ички протеинкиназалар симуляцияси орқали иккиламчи воситачи сифатида таъсир этади. цАМФ парчаланиши фосфодиэстераза ферменти ёрдамида амалга оширилади. Биз тадқиқотларимизда гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишида аденилатциклаза сигнал каскадини ролини ўргандик. 100 млн/мл хужайрадан 20 минут давомида назоратда $6,53 \pm 0,15$ мкМ глутатион ажралди, худди шу жараёнга 0,1 мкМ дб-цАМФ (цАМФнинг мембрананад ўтувчи хосиласи) эритмасини таъсирини кузатганимизда $4,45 \pm 0,15$ мкМ глутатион чикди (3.20А-расм). Тажрибамизнинг кейинги босқичида биз дб-цАМФнинг концентрациясини 1 мкМга етказдик, бунда назоратда $6,026 \pm 0,1$ мкМ ва модда таъсирида $5,65 \pm 0,17$ мкМ глутатион ажралди (3.20Б- расм). Демак, дб-цАМФ тимоцитлардан глутатион чиқишини сезиларли даражада пасайтиради

Хужайра ички цАМФ миқдорини аденилатциклаза активатори бўлган форсколин ва фосфодиэстераза ингибитори теофиллин моддалари ёрдамида ҳам кўпайтириш мумкин. Бизнинг тажрибаларамизда, 100 млн/мл хужайрадан 20 минут давомида назоратда $6,6 \pm 0,08$ мкМ, форсколиннинг 10 мкМли эритмаси таъсир этирилганда эса $5,8 \pm 0,2$ мкМ глутатион ажралди (3.21А-расм). Шу жараёнга теофиллиннинг 3 мМли эритмаси таъсирида $4,74 \pm 0,11$ мкМ глутатион чикса, назоратда $5,28 \pm 0,13$ мкМ глутатион ажралди (3.21Б-

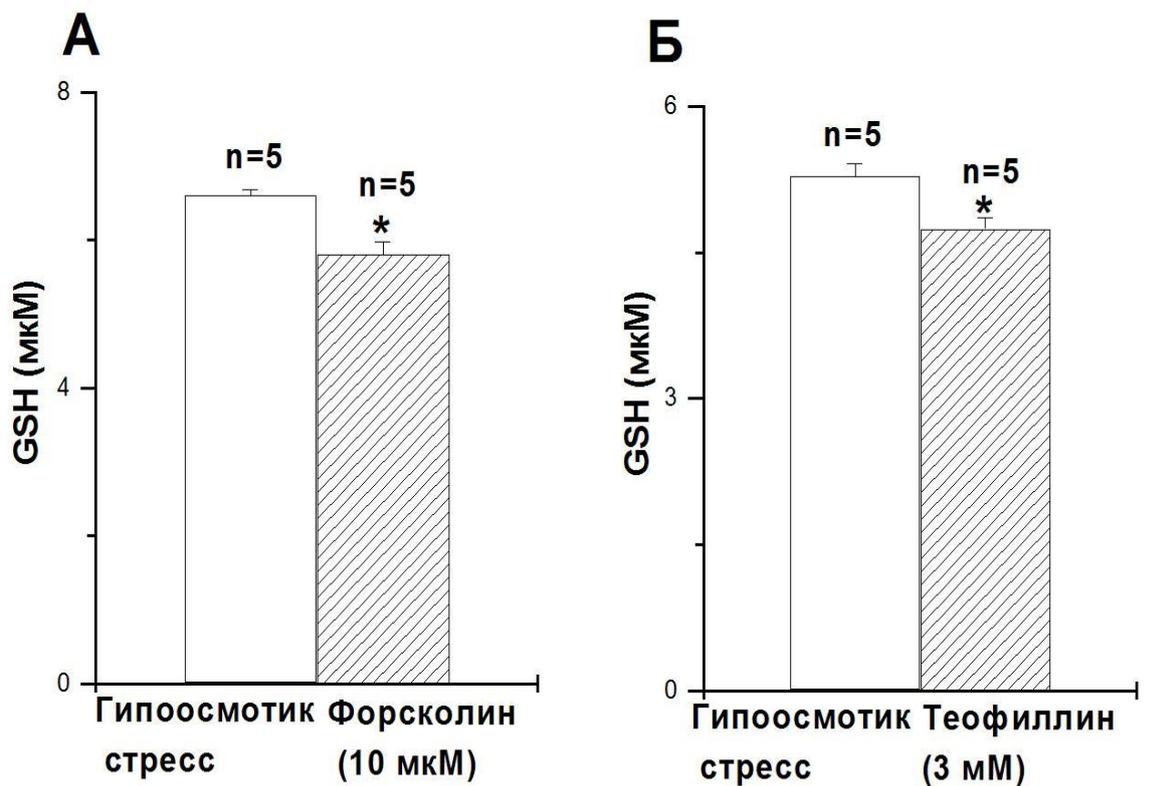
расм). Олинган натижалар гипоосмотик стресс шароитида глутатион ажралиш механизмида аденилатциклаза сигнал каскадининг роли борлигидан далолат беради. Ушбу хулоса глутатион чиқарилиш системаси ва гормонларга боғлиқ бўлган иккиламчи мессенджер цАМФ сигналлаш йўллари орасида узвий боғланиш мавжудлигига ишорадир.



3.20-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига дб-цАМФнинг 0,1 мкМ (А) ва 1мкМ (Б) эритмаларининг таъсири.

Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- таъриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$).



3.21-расм.

Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишига аденилатциклаза активатори форсколин (А) ва фосфодиэстераза ингибитори теофиллин (Б) моддаларини таъсири

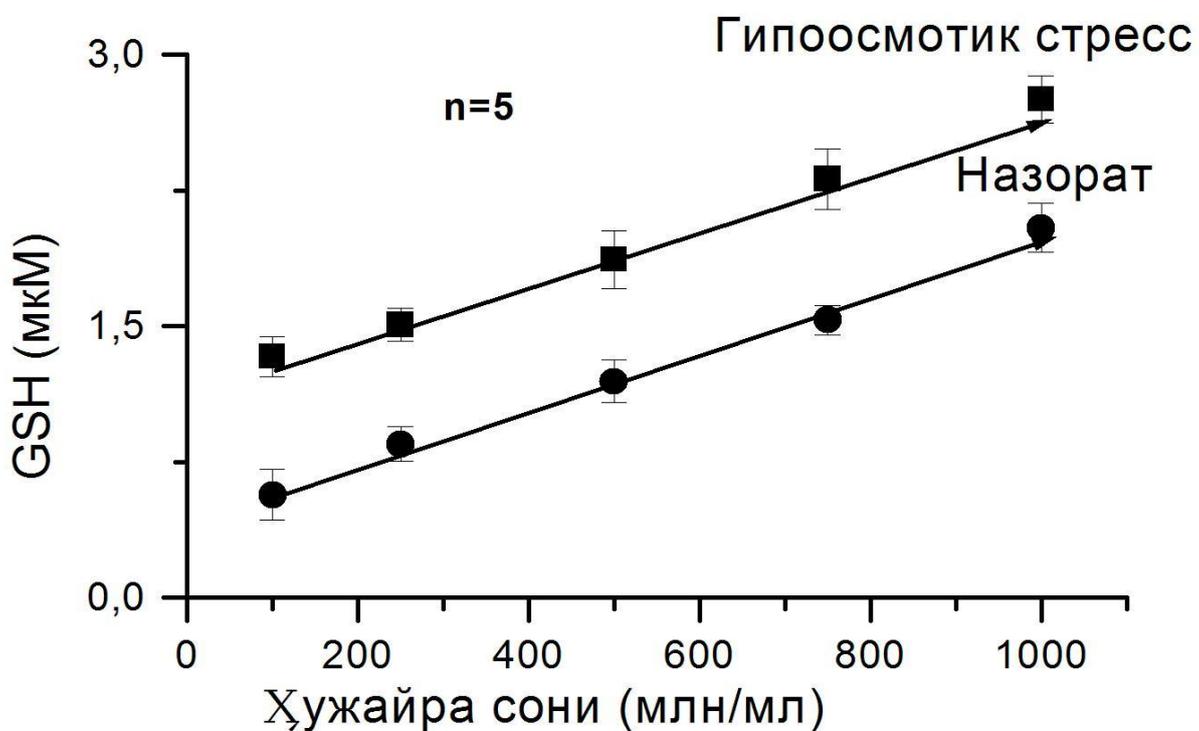
Хужайра сони 100 млн/мл. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида- таъриба гуруҳлари ифодаланган. Барча ҳолатларда моддасиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$).

§3.3. Турли хил хужайралардан глутатион чиқиш характеристикасини таққослаш

Юқоридаги олинган натижалар Т-лимфоцитлар туркумига мансуб тимоцит хужайраларидан нормал изоосмотик шароитида ҳам, гипотоник стресс шароитида ҳам массив равишда глутатионнинг хужайрадан ташқарисига чиқарилишидан далолат беради. Таббий савол туғиладики, бошқа турдаги хужайралардан ҳам глутатион ташқарига чиқа оладими? Тадқиқотимизнинг куйинги босқичида биз одам қони таркибида сон жаҳатиждан энг кўп қизил қон хужайралари ҳамда меланома рак хужайраларидан глутатион чиқиш жараёнини ўргандик.

§3.3.1. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитда қизил қон хужайраларидан глутатион чиқиши

Тадқиқотларимизда биз одам қизил қон хужайраларидан глутатион моддасининг чиқишини 20 минут давомида кузатдик. Олинган натижалардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатионнинг хужайра ташқи муҳитига чиқиш миқдори хужайра сонига боғлиқлиги аниқланди (3.22-расм). Нормал шароитда хужайралар сони 100 млн/мл бўлганда хужайралардан $0,57 \pm 0,14$ мкМ ($n=5$) глутатион ажралган бўлса, хужайралар сони 1 млрд/мл бўлганда хужайралардан $2,04 \pm 0,13$ мкМ ($n=5$) глутатион ажралди. Гипоосмотик стресс шароитида хужайралар сони 100 млн/мл бўлганда хужайрадан $1,33 \pm 0,11$ мкМ ($n=5$), хужайралар сони 1 млрд/мл бўлганда хужайрадан $2,75 \pm 0,13$ мкМ ($n=5$) глутатион моддаси хужайра ташқи муҳитига чиқиши маълум бўлди. Натижаларимиз тахлилидан битта хужайрадан нормал шароитда $0,09 \times 10^{-15}$ г/мин, гипоосмотик стресс шароитида эса $0,2 \times 10^{-15}$ г/мин глутатион чиқиши аниқланди.



3.22-расм.

Одам қизил қон хужайраларидан нормал (290 мОсм/кг Н₂О) ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг Н₂О) шароитида глутатион чиқиши.

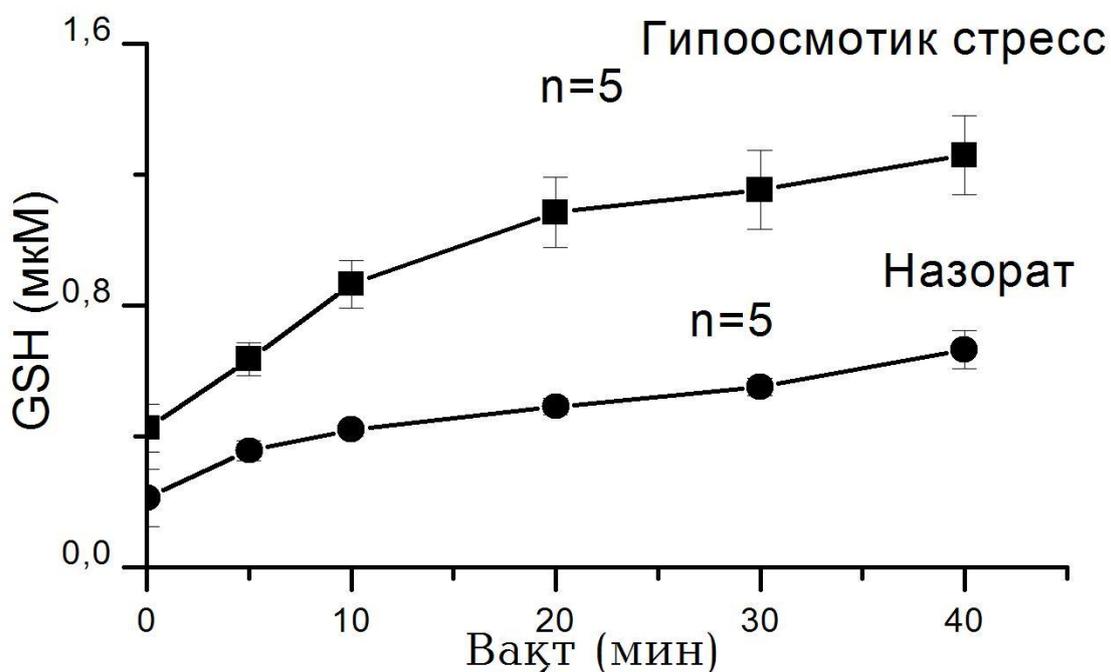
Тадқиқотлар одам қизил қон хужайраларида олиб борилди. Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – хужайра сони (млн/мл)да ифодаланган. Барча ҳолатларда изотоник назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n = 5$).

Олинган натижани тимоцит хужайраларида кузатилган глутатион чиқиш тезлиги билан таққослаш учун биз юқорида 3.1-расмда қайд этилган натижаларни қайта таҳлил қилиб, битта хужайрага тўғри келувчи глутатион чиқиш тезлигини аниқладик. Яъни нормал шароитда хужайралар сони 50 млн/мл бўлганда глутатионнинг хужайра ташқи муҳитига чиқиш миқдори $0,855 \pm 0,09$ мкМ га тенг, хужайралар сони 100млн/мл бўлганда эса $1,105 \pm 0,038$ мкМга тенг бўлди. Гипоосмотик стресс шароитда хужайралар сони 50 млн/мл бўлганда $3,96 \pm 0,04$ мкМ, хужайралар сони 100 млн/мл бўлганда $6,37 \pm 0,04$ мкМ миқдорда глутатион чиқиши 10 минут давомида кузатилди. Олинган натижалар таҳлили битта хужайрадан нормал шароитда хужайра ташқи муҳитига $0,34 \times 10^{-15}$ г/мин миқдорида глутатион чиқишини, гипоосмотик стресс шароитида эса $1,96 \times 10^{-15}$ г/мин миқдорида глутатион чиқишини кўрсатди. Демак, одам қизил қон хужайраларидан глутатионнинг чиқиш тезлиги тимоцит хужайраларига нисбатан нормал шароитда 4 баробар ва гипоосмотик стресс шароитида 10 баробар паст. Албатта, эритроцитларнинг умумий миқдори қонда анча кўп бўлишлиги туфайли кузатилган паст тезликдаги глутатион чиқиши ҳам физиологик миқдорларни бемалол таъминлаб бериши мумкин. Тимоцитлардан глутатионнинг катта тезлик билан чиқиши, ушбу модданинг тимусдаги интерстициал муҳитда кечувчи жараёнлардаги муҳим ролдан далолат беради.

§3.3.2. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитда меланома рак хужайраларидан глутатион чиқиши

Тажрибаларимизнинг кейинги босқичида биз сичқон меланома тери рак хужайрасининг культурасидан (КМЛ линияси) глутатион чиқишини кузатдик. Бунда хужайра культураси 37°C ҳароратда махсус идишлар (кареллар)да конфлуэнт ҳолатгача (яъни моноқават

ҳосил бўлгун қадар) ўстирилди. Бу тажрибаларда, хона температурасида 40 минутлик инкубациядан сўнг, глутатионнинг муҳитдаги концентрацияси нормал шароитда $0,66 \pm 0,06$ мкМни, ва гипоосмотик стресс шароитида $1,26 \pm 0,012$ мкМ ни ташкил этди. Олинган натижа меланома рак хужайраларида ҳам глутатион чиқиш механизми мавжудлигидан ва хужайра ташқисидидаги глутатион меланогенез ва канцерогенез жараёнларида маълум роль ўйнаши мумкинлигидан далолат беради (3.23-расм).



3.23-расм.

Сичқон меланома тери рак хужайрасининг культурасидан нормал (290 мОсм/кг H_2O) ва гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг H_2O) шароитида глутатион чиқиши.

Ордината ўқида – хужайрадан глутатион чиқиши мкМ ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – вақт (мин.) ифодаланган. Барча ҳолатларда $P < 0,05$ ($n=5$).

§3.4. Хужайранинг физиологик функцияларига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири

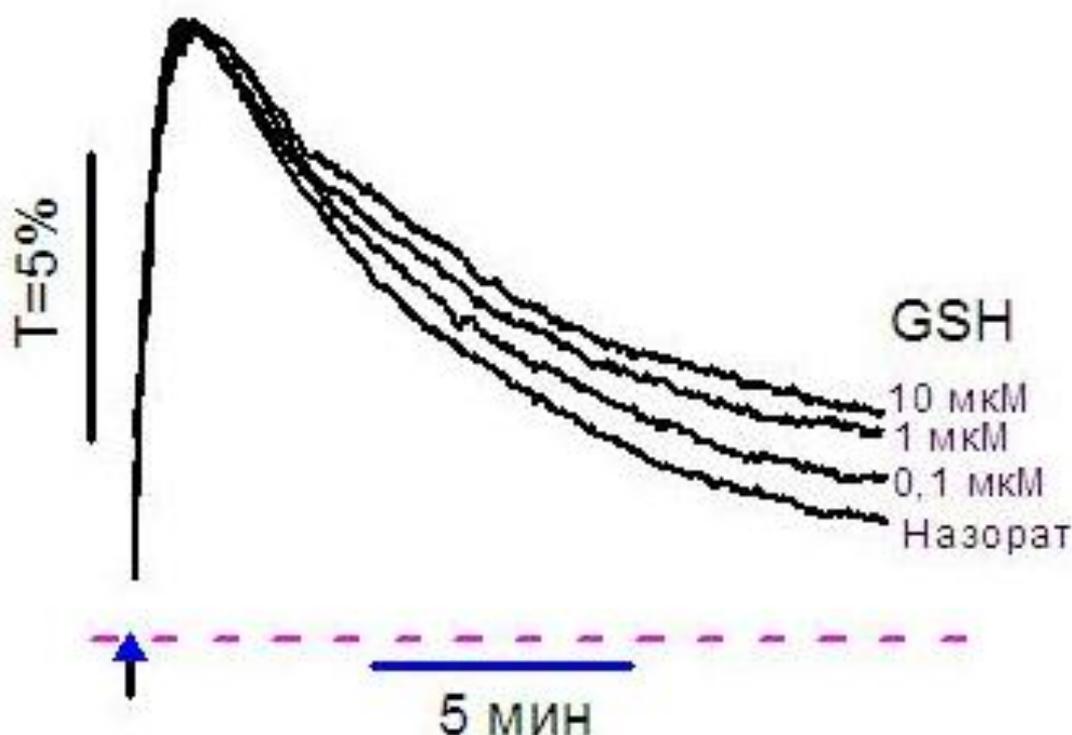
Бизга адабиётлардан маълумки глутатион тирик организмларда универсал, муҳим антиоксидант ҳисобланиб, бир қанча биологик жараёнларда иштирок этади. Бизнинг тадқиқотимиз натижалари уч хил хужайра – тимоцитлар, эритроцитлар ва меланома рак хужайраларидан сезиларли миқдорда глутатион хужайра ташқарисига нормал, ҳамда гипоосмотик стресс шароитларида чиқарилшидан далолат беради. Хужайрадан чиққан глутатион ўз хужайраси ёки атрофдаги бошқа хужайра ва тўқималарга аутокрин ва паракрин таъсир кўрсатиши мумкин, лекин ушбу жараён тимоцит ва эритроцит хужайраларида деярли ўрганилмаган.

§3.4.1. Гипоосмотик стресс шароитда тимоцит хужайралари ҳажм бошқарилишига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири

Тирик организм хужайралари юқори ташкиллашган тизим бўлиб, атроф – муҳитнинг ўзгарувчи шароитларида ўз-ўзини бошқара олиш хусусиятига эгадир. Хужайра бутунлигини сақлаш унинг ҳажмининг доимийлигини актив ҳолатда бошқариб туриш билан чамбарчас боғлиқдир. Тирик хужайра ҳажмини бошқарилиши механизмларини ўрганиш замонавий биофизика ва хужайра физиологиясининг марказий муаммоларидан биридир. Биз тажрибаларимизда тимоцит хужайралари ҳажмини бошқарилиши системаларига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсирини ўргандик. Бунда биз 15 минут давомида тимоцит хужайра суспензиясига глутатионнинг турли хил концентрацияларини таъсир этирдик.

Назоратда хужайра ҳажми $78,09 \pm 5,6\%$ га қайтди, шу жараёнга глутатионнинг $0,1$ мкМ концентрациясидан бошлаб сезиларли таъсири кузатилди. Глутатионнинг 1 мкМ концентрациясида хужайра ҳажми $71,12 \pm 1\%$ га, 10 мкМда $69,05 \pm 1,3\%$ га ва 100 мкМда

65,06±1,4%гача қайтди (3.24-расм). Хужайралар ҳажм ўзгариши кинетикаси назоратда ва глутатионнинг баъзи концентрацияларида 3.24-расмда кўрсатилган.



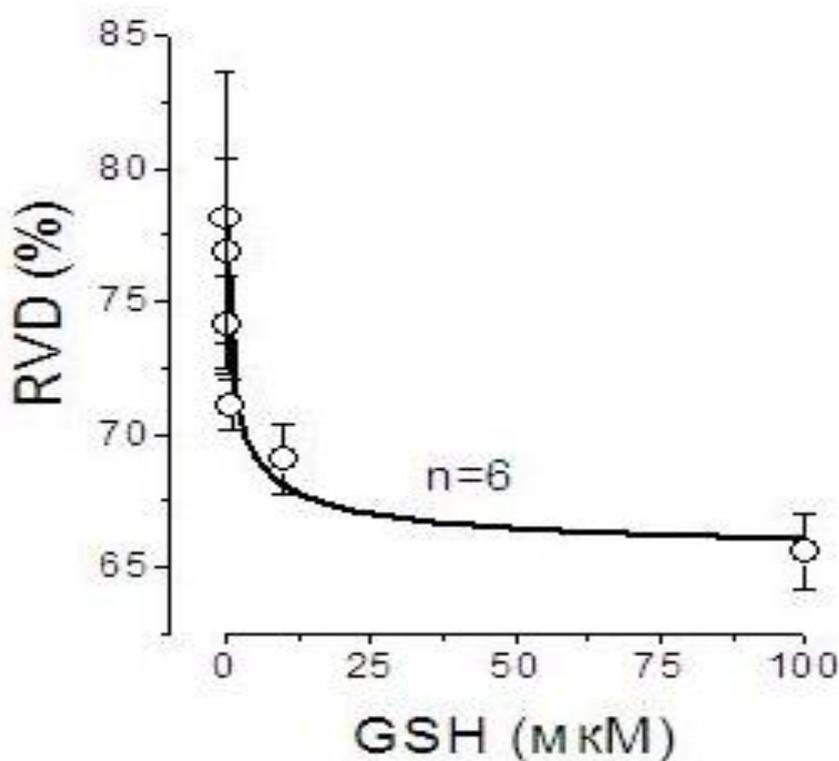
3.24-расм.

Гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг Н₂О) шароитида тимоцитлар хужайра ҳажм бошқарилишига хужайра ташқарисидаги глутатион таъсирини ёруғлик ўтказувчанлик методи ёрдамида ўлчаш ёзуви.

Оордината ўқида – хужайра суспензиясининг ёруғлик ўтказувчанлиги % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – вақт

Олинган «доза-жавоб» чизиғи 3.25-расмда кўрсатилган. Бунда тимоцитлар ҳажми бошқарилиши глутатионнинг дозасига боғлиқ ҳолда сусайиши аниқ кўринаяпти. Лекин ҳатто энг баланд концентрацияда ҳам хужайра ҳажми бошқарилиши фақат қисмангина блокланаяпти. Бу

натижа глутатионнинг таъсири ҳажм бошқарилиш тизимларини (хусусан, кальций, калий ва хлор траснпорти системаларини) модуляцияси, лекин тўлиқ блоклаш эмаслигидан далолат беради. Ярим-максимал таъсир қилувчи концентрация $1,3 \pm 0,1$ мкМни ташкил этиши, кузатилган жараён тимусдаги глутатионнинг физиологик концентрацияларида ҳам содир бўлишидан далолат беради. Олинган натижа хужайра ташқи глутатиони эффектив иммуномодулятор сифатида фаолият кўрсатишига ишора қилади.



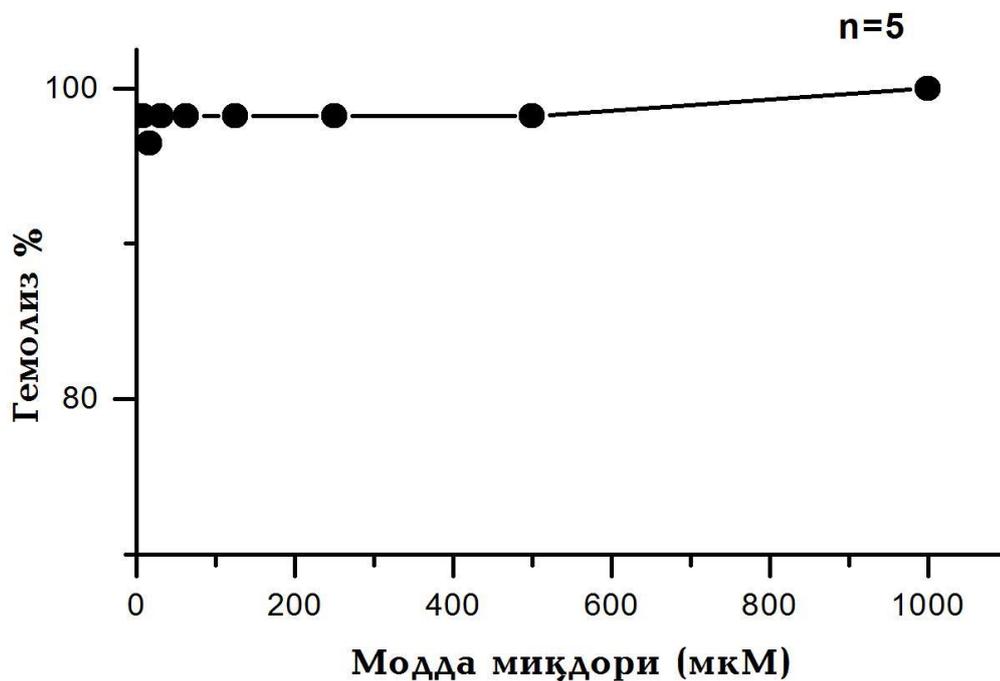
3.25-расм.

Гипоосмотик стресс (147 мОсм/кг H_2O) шароитида тимоцитлар хужайра ҳажм бошқарилишига хужайра ташқарисидаги глутатион таъсири.

Ордината ўқида – хужайра ҳажмининг бошқарилиши % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – глутатион миқдори мкМда ифодаланган Барча ҳолатларда глутатионсиз назоратга нисбатан $P < 0,05$ ($n=5$). Эгри чизик Хилл тенгламаси асосида чизилган, ярим-максимал эффект $1,3 \pm 0,1$ мкМ ва Хилл коэффициенти $0,64 \pm 0,31$ га тенг.

§3.4.2. Қизил қон ҳужайралари коллоид- осмотик чидамлилигига ҳужайра ташқарисидаги глутатион моддасининг таъсири

Тимоцитлар каби, қизил қон ҳужайралари ҳам ўз ҳажмини бошқариш хусусиятига эга, ва бу хусусият турли пора ҳосил қилувчи моддалар (масалан бактериал токсинлар ва баъзи антибиотиклар) таъсирида кечадиган коллоид-осмотик лизис жараёнида катта аҳамиятга эга. Биз тажрибаларимизнинг кейинги қисмида қизил қон ҳужайраларининг коллоид-осмотик лизисга нисбатан чидамлилигига ҳужайра ташқи муҳитидаги глутатионнинг таъсирини ўргандик. Гемолиз жараёнини биз полиен антибиотиклари синфига мансуб нистатин моддасининг 500 мкМли эритмаси таъсирида келтириб чиқардик, ва бу жараёнга ҳужайра ташқи муҳитидаги глутатионнинг таъсирини кўриб чиқдик. Бунда биз глутатионнинг 1 мМли эритмасидан бошлаб титрладик. Олинган натижа 3.26-расмда кўрсатилган. Ушбу тажрибаларда глутатионнинг нистатин ёрдамида чақирилган коллоид-осмотик гемолизига таъсири сезиларли даражада йўқлиги аниқланди.



3.26-расм.

Қизил қон хужайраларинг нистатиннинг 500 мкМли эритмасидаги гемолиз жараёнига хужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири.

Тадқиқотлар одам қизил қон хужайраларида олиб борилди. Ордината ўқида-гемолиз даражаси % ҳисобида кўрсатилган, абсцисса ўқида – глутатион моддасининг миқдори мкМларда ифодаланган. (n=5).

ЯКУНИЙ ҚИСМ

Хужайра цитоплазмаси таркибига кирувчи метаболитлар хужайра физиологиясига зарур бўлган кўпгина жараёнларда қатнашади. Лекин баъзи физиологик шароитларда улар хужайра ташқарисига чиқарилади ва сигнал молекулалари сифатида атрофдаги бошқа хужайраларга эмиттер (яъни сигнал манбаи) бўлган хужайранинг физиологик ҳолати ҳақидаги информацияни етказиб беради. Бунга мисол қилиб АТФ молекулаларини келтириш мумкин. Ушбу модда хужайранинг энг асосий энергия манбаи бўлибгина қолмай, турли ҳил стресс шароитларида (масалан метаболик стресс, осмотик стресс, механик стимуллаш, ва бошқалар) хужайра ташқарисига чиқарилади. Деярли ҳамма хужайраларнинг плазматик мембраналарида АТФ сезувчи маҳсус пуринэргик рецепторлар мавжуд. Булар хужайра ташқи АТФини боғлаганда, пуринэргик сигнал хужайра ичкарисига узатилади, ва бу жараён пуринэргик сигналлаш деб аталади [60; 423-б; 126; 312-б; 127; 4-б]. Глутамат кислотаси бошқа бир сигнал молекуласига мисол бўла олади. Бу қуйи молекуляр модда хужайра цитоплазмасида оксил биосинтезида қатнашади. Лекин баъзи стресс ҳолатларда, ва айниқса мияда гиперқўзғалиш ҳолатида глутамат хужайраларда ташқарига чиқади ва бошқа хужайраларда мавжуд глутаматэргик рецепторларга таъсир қилади. Бу жараён мияда нейронларнинг нобуд бўлишига ҳам сабаб бўлиши мумкин.

Глутатионнинг хужайралар аро сигналлаш жараёнларида қатнашиши охириги вақтларда катта баҳсларга сабаб бўляпти. Албатта, глутатионнинг асосий функцияси – бу хужайра ички муҳитини кучли қайтарувчи ҳолатда сақлаб туриш ва хужайрани оксидатив стрессдан ҳимоя қилиш. Глутатион асосан цитоплазмада мавжуд бўлади, лекин интерстициал суюқликларда ва қон плазмасида ҳам глутатионнинг маълум бир миқдори кузатилади. Бу экстрацеллюляр глутатионнинг

чиқиш йўллари ва хужайра ташқарисидаги функцияси ҳозирги кунда жуда кам тадқиқ қилинган.

Олиб борилган тадқиқотларимизда биз каламуш тимусидан ажратиб олинган тимоцитлардан массив равишда глутатионнинг чиқишини кузатдик. Ушбу жараён нормал изотоник ҳолатда ҳам кузатилди, лекин осмотик стресс таъсирида стресс кучига (яъни муҳитнинг осмотик босимига) боғлиқ ҳолда кескин ошди. Хужайра сонига, муҳитнинг ҳароратига, инкубация вақтига ва осмотик босимга боғлиқлиги аниқланди. Осмотик босим пасайишининг таъсири бу жараёнга ҳажмга боғлиқ механизмларнинг ролини кўрсатади. Глутатион чиқиши муҳит ҳарорати ва инкубация вақтига боғлиқ равишда ошганлигини таҳлили хужайрадан глутатион чиқишининг бир неча механизмлари мавжудлигини тасдиқлади.

Айтиш жоизки, гипоосмотик стресс шароитида тимоцит хужайралардан хужайрааро муҳитга катта миқдорда глутатион чиқарилиши аввал адабиётларда тавсифланмаган. Шу сабабли мазкур тадқиқотларимизда биз тимоцитлардан глутатион чиқарилишининг фармакологиясини систематик равишда тадқиқ қилишни, ҳамда бу жараёндаги ион каналлари ва транспортерларнинг эҳтимолий ролини ўрганишни режалаштирдик. Глутатион молекуласи учта элементар зарядга эга бўлиб, бу трипептиднинг N-якуний қисмидаги мусбат, C-учидаги манфий ва глутамат кислотасидаги яна бир манфий зарядлардир. Шундай қилиб, молекуланинг умумий заряди -1 га тенг. Бизнинг лаборатория ходимлари Molecular Modeling Pro дастури ёрдамида глутатионнинг молекуляр моделини яратиб, молекула ўлчамини аниқлашган. Аниқланишича, молекула чўзилган ҳолда $1,47 \times 1,01 \times 0,956$ нм чизиқли ўлчамли параллелипипедга жойланиши мумкин. Энергияни минималлаштириш нисбатан кичикроқ шакл ҳам мавжудлигини кўрсатиб, у $0,978 \times 1,12 \times 1,03$ нм параллелипипедга жойлашади. Бу икки шаклнинг ўртача геометрик радиуси (яъни ҳамма

каналнинг блокатори гадолиний (50 мкМ) моддасини текширилганда, у глутатион чиқишига сезиларли таъсир кўрсатмади ва бу натижа глутатион транспортида макси-анион канали иштирок этмаслигини кўрсатади.

Кўпгина адабиётларда мембрана транспортерларининг глутатион транспортидаги роли кўрсатиб ўтилган. Шу сабабли биз тимоцит хужайраларидан глутатион чиқишида мембрана транспортерларининг ролини ўргандик. Бунда ABC/MRP мембрана транспортери субстрати бўлган пробеницид моддаси глутатион чиқишини сезиларли даражада орттирди. SLCO/OATP органик анион ташувчи полипептидлар субстрати бўлган тауроҳолат кислотаси таъсири ҳам шундай натижа берди. Демак, икала транспортер ҳам глутатион чиқишида иштирок этади. Натрийга боғлиқ SLC22A/OAT транспортери ингибитори аминокислотаси текширилганда глутатион чиқишини камайтириши, SLC22A/OAT натрийга боғлиқ транспортери ҳам глутатион транспортида иштирок этишини тасдиқлайди. Бу хулосамиз натрий ионларини НМДГ ионларига ўзгартирилганида кузатилган глутатион чиқарилишининг камайишига тўла мос келади.

Аденилатциклаза тизимининг фаоллашуви тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишини пасайтирди ва бу натижа осмотик стресс шароитидаги глутатионнинг чиқарилиши цАМФ сигнал йўллари билан узвий боғланганлигини кўрсатади.

Осмо-реактив глутатион транспорти механизми қанчалик кенг тарқалган? Бу саволга жавоб топиш мақсадида биз тажрибаларимизда глутатион моддасининг одам қизил қон хужайраларидан чиқишини аниқладик. Дарҳақиқат, эритроцитлар ҳам, тимоцитлар каби, глутатион транспорти механизмига эга, ва бу механизм гипоосмотик стресс шароитида фаоллашди. Лекин, натижаларимиз таҳлилидан шу нарса маълум бўлдики, одам қизил қон хужайраларидан глутатионнинг чиқиш тезлиги тимоцит хужайраларига нисбатан нормал шароитда 4

баробар ва гипоосмотик стресс шароитида 10 баробар паст экан. Бунинг сабаби ҳажма боғлиқ анион каналларининг ва транспортерларнинг экспрессиясининг камлиги бўлиши мумкин. Албатта, эритроцитларнинг умумий миқдори қонда анча кўп бўлишлиги туфайли кузатилган паст тезликдаги глутатион чиқиши ҳам глутатионнинг плазмадаги физиологик миқдорларини бемалол таъминлаб бериши мумкин.

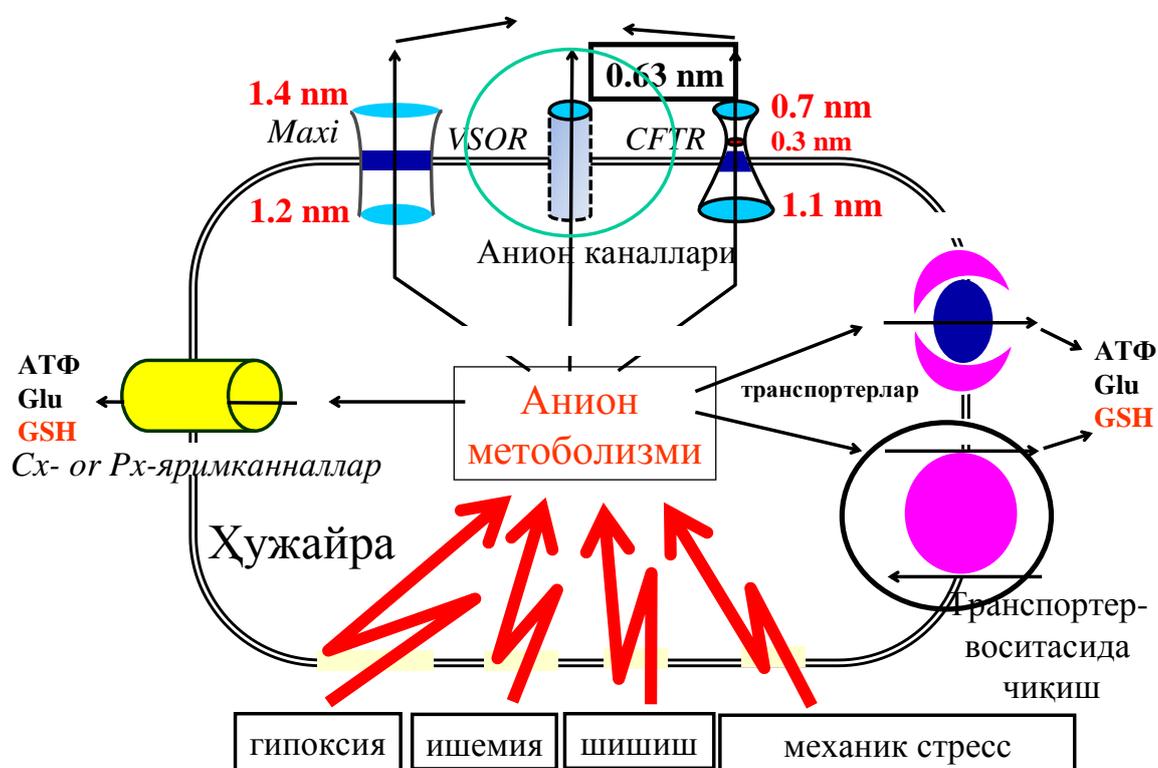
Сичқон меланома тери раки ҳужайрасининг культурасидан глутатион чиқиши кузатилганда, олинган натижалар меланома рак ҳужайраларида ҳам глутатион чиқиш механизми мавжудлигидан ва ҳужайра ташқисидаги глутатион меланогенез ва канцерогенез жараёнларида маълум роль ўйнашидан далолат беради.

Тадқиқотларимизнинг кейинги қисмида ҳужайранинг физиологик функцияларига ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири кузатилди. Бунда гипоосмотик стресс шароитида тимоцит ҳужайралари ҳажм бошқарилишига ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири ва одам қизил қон ҳужайралари коллоид-осмотик лизисига чидамлилигига ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири ўрганилди. Гипоосмотик стресс шароитида тимоцит ҳужайралари ҳажм бошқарилишига ҳужайра ташқарисидаги глутатион сезиларли даражада таъсир кўрсатиши аниқланди. Бу натижа экстрацеллюлар глутатион иммун системасининг эффектив модулятори сифатида фаоллик кўрсатишидан далолат беради. Одам қизил қон ҳужайраларининг коллоид-осмотик лизисига чидамлилигига эса ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири кузатилмади.

Хулоса қилиб айтганда, биз биринчи мартаба тимоцит ҳужайраларидан гипосмотик стресс шароитида глутатионнинг катта миқдорда ажралиб чиқишини ва ушбу жараёнда ҳажмга боғлиқ анион каналларининг салмоқли ҳиссаси борлигини кўрсатдик. Олинган натижалар глутатион ҳам, АТФ ва глутамат кислотаси билан бир қаторда ҳужайра ташқи сигнал молекуласи сифатида фаоллик

кўрсатишини кўрсатади. Глутатионнинг плазма мембранасидаги специфик рецепторлари ҳали аниқланмаган. Глутатион нерв хужайраларидаги НМДА глутамат рецепторлари билан боғланиши маълум. G-оқсиллар туркумига мансуб орфант (яъни ҳали агонисти номаълум) рецепторларининг баъзилари глутатион рецепторлари сифатида фаоллик кўрсатиши эҳтимолдан ҳоли эмас.

Олинган натижалар асосида глутатионнинг хужайрадан чиқиш механизмларини оидинлаштириш мумкин (3.27-расм).



3.27-расм.

Глутатионнинг хужайрадан чиқиш механизмлари.

Глутатионнинг хужайрадан ташқарига чиқишида анион транспортёрлари ва стресс шароитида фаоллашувчи анион каналлари (яъни ҳажмга боғлиқ ташқи ўтказувчан анион канали ва макси-анион канали) иштирок этиши мумкин. Тажрибалармиздан олинган натижаларга асосларган ҳолда тимоцит хужайраларидан глутатионнинг чиқиш йўллари доира шаклида белгиланган.

ХУЛОСАЛАР

1. Биринчи марта тимоцит хужайраларидан гипосмотик стресс шароитида глутатионнинг катта миқдорда ажралиб чиқиши аниқланди ва батафсил тав-сифланди. Нормал шароитда яқка тимоцит хужайрасидан ташқи муҳитига $0,34 \times 10^{-15}$ г/мин, гипоосмотик стресс шароитида эса $1,96 \times 10^{-15}$ г/мин глутатион чиқиши кўрсатилди. Ярим-максимал глутатион чиқиши муҳитининг осмотик босими $125,1 \pm 4,3$ мОсм/кг H_2O га тенг бўлганда кузатилди.
2. Хужайралардан глутатион чиқишининг $15-37^\circ C$ диапазонда фаоллашув энергияси нормотоник шароитда $11,1 \pm 1,8$ ккал/моль, ва гипоосмотик стресс шароитида $5,4 \pm 0,6$ ккал/моль ни ташкил этди. Икки хил фаоллашув энергияси ва икки фазали кинетика глутатион чиқишининг камида икки хил меҳа-низмдан далолат берди.
3. Гипоосмотик шароитда глутатионнинг асосий қисми ҳажмга боғлиқ анион каналлари орқали хужайрадан чиқади, қолган қисми эса SLCO/OATP ва SLC22A/OAT мембрана транспортерлари иштирокида ташилади. ABCС/MRP транспортери ва макси-анион канали бу жараёнда иштирок этмайди.
4. Аденилатциклаза тизимининг фаоллашуви тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишини пасайтиради.
5. Одам эритроцитлари ва сичқон меланома тери рак хужайраларида ҳам тимоцитлар каби глутатион чиқиш механизми мавжуд. Эритроцитлардан глутатион чиқиши нормотоник шароитда тимоцитларга нисбатан 4 баробар ва гипоосмотик шароитда 10 баробар пастлиги аниқланди.
6. Хужайра ташқарисидаги глутатион микромоляр миқдорда тимоцитларнинг ҳажм бошқарилишини сезиларли

даражада пасайтириши аниқланди, лекин эритроцитларнинг коллоид-осмотик лизисига таъсир этмади.

7. Глутатионнинг янги ҳужайралар аро сигнал молекуласи функцияси гипотезаси таклиф қилинди

Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

1. Арипов А.И, Фесенко Л. М “Клиническая биохимия” Ташкент. 2000. – С. -271
2. Василенко К.П., Бурова Е.Б., Антонов В.Г., Никольский Н.Н. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и мар-киназ ERK1,2 // Цитология.2006.– Т.48. № 6.– С.500-507.
3. Клаус Дж. Лимфоциты: Методы.-М.:Мир.1990.– С. -395
4. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. 1975–. С.– 46-47.
5. Коленсникова Л.И., Вантеева О.А., Курашова Н.А., Дашиева БГ. Глутатионзависимые ферменты и глутатион при бесплодии мужчин с различной массой тела // Вестник РАМН. 2015. – № 1.– С 12-16.
6. Мазо В.К. Глутатион как компонент антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта // Гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии –1998.–№1.– С. 47-53
7. Тўракулов Ё.Х. Биохимия.- Тошкент “Ўзбекистон”.1996. –Б.56, 378
8. Alexander R.L., Bates D.J., Wright M.W., King S.B., Morrow C.S. Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitro linoleic acid-induced, PPARgamma-dependent transcription activation // Biochemistry. – 2006 – V. 45.– P. 7889-7896.
9. Anderson C.P., Tsai J.M., Meek W.E., Liu R.M., Tang Y., Forman H.J., Reynolds C.P. Depletion of glutathione by buthionine sulfoxine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis // Exp Cell Res. – 1999. –V.246.–P.183-192.
10. Anselmo A.N., Cobb M.H. Protein kinase function and glutathionylation. //Biochem J. – 2004. – V.381.– P.1-2.
11. Aracena P., Sánchez G., Donoso P., Hamilton S.L., Hidalgo C. S-

- Glutathionylation decreases Mg^{2+} inhibition and *S*-nitrosylation enhances Ca^{2+} activation of RyR1 channels. // *J Biochem.* – 2003– V.278.–P.42927-42935.
12. Ardite E., Barbera J.A., Roca J., Fernandez-Checa J.C. Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation.// *Am.J.Pathol* – 2004. – V.165.–P.719.-728.
 13. Arrazola A., Rota R., Hannaert P., Soler A., Garay R. P. Cell volume regulation in rat thymocytes // *J. Physiol.* – 1993.– V.465.– P.403-414.
 14. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state // *Free. Radic. Biol. Med.* –1999.– V.27.– P.936-944.
 15. Bakos E., Evers R., Sinko E., Varadi A., Borst P., Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions // *Mol Pharmacol.* – 2000.– V. 57.– P.760-768.
 16. Ballatori N., Gatmaitan Z., Truong A.T. Impaired biliary excretion and whole body elimination of methylmercury in rats with a congenital defect in biliary glutathione excretion // *Hepatology.* –1995 – V.22.– P.1469-1473.
 17. Ballatori N., Christine L., Hammond., Jennifer Cunningham., Transport of toxic metals by molecular mimicry// *Environ Health Perspect.* – 2002.– V.110.– P.689-694.
 18. Ballatori N., Hammond C. L., Cunningham J.B., Krance S.M., Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2005.– V. 204.– P.238-255.
 19. Ballatori N., Suzanne M., Krance., Rosemarie M., Christine L. Hammond Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology.// *Mol. Aspects. Med.* – 2009.–V. 30.– P.13-28.
 20. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond

- CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases.// *Biol Chem.* – 2009.–V. 390.– P.191-214.
- 21.Banhegyi G., Csala M., Nagy G., Sorrentino V., Fulceri R., Benedetti A. Evidence for the transport of glutathione through ryanodine receptor channel type 1.// *Biochem J.* – 2003.– V.376.– P.807-812.
- 22.Barrett WC, DeGnore JP, Konig S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215.//*Biochemistry.* –1999. – V.38.– P.699-705.
- 23.Beaver J.P., Waring P. A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes // *Eur. J. Cell. Biol.* – 1995.– V. 68.– P.47-54.
- 24.Beck K., Hayashi K., Dang K., Hayashi M., Boyd C.D. Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues //*Histochem Cell. Biol.* – 2005.– V. 123.–P.517-528.
- 25.Belinsky M.G., Bain L.J., Balsara B.B., Testa J.R., Kruh G.D. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins //*J. Natl. Cancer. Inst.* – 1998.– V.90.– P.1735-1741.
- 26.Benard O., Balasubramanian K.A. Modulation of glutathione level during butyrate-induced differentiation in human colon derived HT-29 cells //*Mol. Cell. Biochem.* –1997.–.V.170.–.P.109-114.
- 27.Benlloch M., Ortega A., Ferrer P., Segarra R., Obrador E., Asensi M., Carretero J., Estrela J.M. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity.//*J. Biol. Chem.* – 2005.–V.280.–P.6950-6959.
- 28.Blackburn R.V., Spitz D.R., Liu X., Galoforo S.S., Sim J.E., Ridnour L.A., Chen J.C., Davis B.H., Corry P.M., Lee Y.J. Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells. // *Free. Radic. Biol. Med.* –

- 1999.– V. 26.– P.419-430.
29. Bosello-Travain V., Forman H., Roveri A., Toppo S., Ursini F., Venerando R., Warnecke C., Zaccarin M., Maiorino M. Glutathione Peroxidase 8 is transcriptionally regulated by HIF α and modulates growth factor signaling in HeLa cells // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014– V.113– P.304-310
30. Bojes H.K., Datta K., Xu J., Chin A., Simonian P., Nunez G., Kehrer J.P. Bcl-xL overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal. // *J. Biochem.* – 1997.– V.325.– P.315-319.
31. Borst P., de Wolf C., van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5 // *Eur. J. Physiol.* – 2007.– V.453.– P.661-673.
32. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2000.– V.92. – P.1295-1302.
33. Borst P., Oude Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease // *Ann. Rev. Biochem.* – 2002.– V.71.– P. 537-592.
34. Brigelius-Flohe R., Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases // *Free. Radic. Biol. Med.* – 1999.– V.27. – P.951-965.
35. Buchler M., Konig J., Brom M., Kartenbeck J., Spring H., Horie T., Keppler D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats // *J. Biol. Chem.* – 1996.– V.271.– P.15091-15098.
36. Burnstock, G.. Introductory overview of purinergic signalling // *Front Biosci.* – 2011.– V.3.– P.896-900.
37. Celli A., Que F.G., Gores G.J., La Russo N.F. Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes // *Am. J. Physiol.* – 1998. – V. 275.– P.749-757.
38. Chai Y.C., Hoppe G., Sears J. Reversal of protein S-

- glutathiolation by glutaredoxin in the retinal pigment epithelium.// *Exp. Eye. Res.*– 2003.–V.76.– P.155-159.
- 39.Chenais B., Andriollo M., Guiraud P., Belhoussine R., Jeannesson P. Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2000. – V.28.– P.18-27.
- 40.Circu ML, Rodriguez C, Maloney R, Moyer MP, Aw TY. Contribution of mitochondrial GSH transport to matrix GSH status and colonic epithelial cell apoptosis// *Free Radic Biol Med.*–2008.–V.44.–P.768–778.
- 41.Chiarugi P., Cirri P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction // *Trends Biochem. Sci.* – 2003.– V.28.– P.509-514.
- 42.Chiba T., Takahashi S., Sato N., Ishii S., Kikuchi K. Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells. // *Eur. J. Immunol.* – 1996.– V.26.– P.1164-1169.
- 43.Childers M., Eckel G., Himmel A. A new model of cystic fibrosis pathology:Lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates // *Medical Hypotheses.* – 2007.– V. 68.– P.101-112
- 44.Christine L., Hammond C., Marchan R., Suzanne M., Ballatori N. Glutathione Export during Apoptosis Requires Functional Multidrug Resistance-associated Proteins*// *J. Biol. Chem.* – 2007.– V.282.– P.14337-14347
- 45.Chu X.Y., Strauss J.R., Mariano M.A., Li J., Newton D.J., Cai X., Wang R.W., Yabut J., Hartley D.P., Evans D.C., Evers R. Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2) // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006.– V.317. – P.579-589.
- 46.Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M., Deeley R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line // *Science.* – 1992.– V.258.– P.1650-1654.
- 47.Cole S.P., Deeley R.G. Transport of glutathione and glutathione

- conjugates by MRP1 // Trends Pharmacol Sci. – 2006. – V.27.– P.438-446.
48. Conseil G., Deeley R.G., Cole S.P. Polymorphisms of MRP1 (ABCC1) and related ATP-dependent drug transporters // Pharmacogenet Genomics. – 2005. – V.15.– P.523-533.
49. Coppola S., Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signaling // Biochem Soc. Trans. – 2000. – V.28. – P.56-61.
50. Csala M., Fulceri R., Mandl J., Benedetti A., Bánhegyi G. Ryanodine receptor channel-dependent glutathione transport in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle // Biochem Biophys Res. Commun. – 2001.– V.287.– P.696-700.
51. Cui Y., König J., Buchholz J.K., Spring H., Leier I., Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells // Mol. Pharmacol. – 1999. – V.55. – P.929-937.
52. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation // Free. Radic. Biol. Med. – 2007. – V.43.– P.883-898.
53. Davison K., Cote S., Mader S., Miller W.H. Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines // Leukemia. – 2003. – V.17.– P.931-940.
54. Debbas V., Arai R.J., Ferderbar S., Schindler F., Stern A., Monteiro H.P. Regulation of p21Waf1 expression and TNF α biosynthesis by glutathione modulators in PMA induced-THP1 differentiation: involvement of JNK and ERK pathways // Biochem Biophys Res. Commun. – 2007.– V.363.– P.965-970.
55. Diotallevi M., Checconi P., Palmara A., Celestino I., Coppo L., Holmgren A., Abbas K., Peyrol F., Mengozzi M., Chezzi P. Glutathione fine-tunes the innate immune response toward antiviral pathways in a macrophage cell line independently of its antioxidant properties // J.

- Immunology. – 2017. – V. 973. – P.488-504.
- 56.Elizabeth A., Linsdell P., Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3: implications for cystic fibrosis lung disease // *Physiology*. – 2002.– V. 543.1.– P.201-209
57. Eyer P., Podhradsky D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent // *Anal. Biochem.* –1986.– V.153.– P.57-66.
- 58.Fabienne M., Younes M., Kenji M. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode // *J. Membrane Biol.* – 2005 – V.208. – P.213-227.
- 59.Feray, J. C.; Guerrouache, K.; Garay, R. P. Dramatic Magnesium Efflux Induced by High Potassium in Rat Thymocytes. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V.268.– P. 673-676
- 60.Fields. R. D., G. Burnstock. Purinergic signalling in neuron-glia interactions // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2006.–V.7.– P.423-436.
- 61.Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis // *Mol. Aspects.Med.* – 2009.– V.30.–P.1-12.
- 62.Forman H., Davies M., Kramer A., Miotto G.,Zaccarin M., Zhang H., Ursini F. Protein cysteine oxidation in redox signaling: Caveats on sulfenic acid detection and quantification // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2016 P- 1-12
- 63.Forman H.J., Ursini F., Maiorino M. An overview of mechanisms of redox Signaling.// *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2014– V.73– P.2-9.
- 64.Forman Henry Jay . Glutathione - From antioxidant to post-translational modifier // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2016– V.595– P.64-67
- 65.Franco R., Cidlowski J.A. SLCO/OATP-like transport of

- glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2006.–V. 281. – P.29542-29557.
- 66.Franco R., Cidlowski J.A Glutathione Depletion Is Necessary for Apoptosis in Lymphoid Cells Independent of Reactive Oxygen Species Formation // *J. Biol. Chem.* – 2007.– V. 282.– P.30452-30465.
- 67.Franco R., Cidlowski J.A., Maria I. Glutathione Depletion and Disruption of Intracellular Ionic Homeostasis Regulate Lymphoid Cell Apoptosis*// *J. Biol. Chem.* – 2008. – V.283.– P.36071-36087.
- 68.Franco R., Cidlowski J Glutathione efflux and cell death // *Antioxid redox signal* 2012 v-17 -p 1694-1713
- 69.Franco R., Bortner C., Schmitz I., Cidlowski J. Glutathione depletion regulates both extrinsic and intrinsic apoptotic signaling cascades independent from multidrug resistance protein1 // *Apoptosis.* – 2014. – V.9. – P.117-134
- 70.Giordano F.J., Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure // *J. Clin. Invest.* – 2005.– V.115.– P.500-508.
- 71.Hammond C.L., Lee T.K., Ballatori N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes// *J. Hepatol.*2001.–V.34.–P.946-954.
- 72.Hammond C.L., Madejczyk M.S., Ballatori N. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells // *Toxicol Appl. Pharmacol.* – 2004. – V. 195. – P.12-22.
- 73.Hammond C.L., Marchan R., Krance S.M., Ballatori N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. // *J. Biol. Chem.* – 2007.– V.282.– P.14337-14347.
- 74.He Y.Y., Huang J.L., Ramirez D.C., Chignell C.F. Role of reduced glutathione efflux in apoptosis of immortalized human keratinocytes induced by UVA // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.8058-

8064.

75. I'Hoste S., Chargui A., Belfodil R., Corcelle E. CFTR mediates apoptotic volume decrease and cell death by controlling glutathione efflux and ROS production in cultured mice proximal tubules // *J. Physiol Renal Physiol.* –2010. – V.298. – P.435-453
76. Imai H., Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2003.–V.34. – P.145-169.
77. Janáky R., Shaw C. A., Varga V., Hermann A., Dohovics R., Saransaari P., Oja S. S., Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical Synaptic membranes // *Neuroscience.* – 2000.– V.95.– P.617-624.
78. Janáky R., Ogita K., Pasqualotto B.A., Bains J.S., Oja S.S., Yoneda Y., Shaw C.A. Glutathione and signal transduction in the mammalian CNS// *J. Neurochem.* – 1999.– V.73.– P.889-902.
79. Janáky R., Shaw C. A., Oja S. S., Saransaari P. Taurine release in developing mouse hippocampus is modulated by glutathione and glutathione derivatives // *Amino Acids.* – 2008.– V.34.– P.75-86.
80. Janáky R., Shaw C.A., Varga V., Hermann A., Dohovics R., Saransaari P., Oja S.S. Specific glutathione binding sites in pig cerebral cortical synaptic membranes // *Neuroscience.* – 2000.– V.95. – P.617-624.
81. Janáky R., Varga V., Jenei Zs., Saransaari P., Oja S.S. Glutathione and glutathione derivatives: possible modulators of ionotropic glutamate receptors. In: Shaw, CA., editor. *Glutathione in the nervous system* // Washington DC: Taylor & Francis. –1998. – P.163-196.
82. Janáky R., Varga V., Saransaari P., Oja SS. Glutathione modulates the N-methyl-D-aspartate receptor-activated calcium influx into cultured rat cerebellar granule cells // *Neurosci Lett.* – 1993.–V.156.–P.153-157.
83. Janáky R., Cruz-Aguado. R., Oja S,S., Shaw C.A. *Glutathione in the nervous system: roles in neural function in health and implications for neurological disease* // New York: Springer. – 2007.–V.6.–

P.347-399.

84. Jonica Campolo., Renata De Maria., Raffaele Caruso., Roberto Accinni., Fabio Turazza., Marina Parolini., Elèna Roubina., Benedetta De Chiara., Giuliana Cighetti., Maria Frigerio., Ettore Vitali., Oberdan Parodi. Blood glutathione as independent marker of lipid peroxidation in heart failure // *Cardiology*. – 2007. – V.117. – P.45-50.
85. Johnson W.M., Wilson-Delfosse A.L., Mieyal J.J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases.// *Nutrients*. – 2012– V.4 – P.1399-440.
86. Jungas T., Motta I., Francis Duffieux. Glutathione levels and bax activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator// *J. Biol. Chem.* – 2002.– V. 277. – P. 27912-27918
87. Kannan R., Chakrabarti R., Tang D., Kim K. J., Kaplowitz N. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Naq-dependent GSH transport in HCEC // *Brain Research*. – 2000.– V. 852. – P. 374-382
88. Kloek J., Mortaz E., Glutathione prevents the early asthmatic reaction and airway hyperresponsiveness in guinea pigs // *Physiology and Pharmacology*. –2010.– V 61.– P. 67-72
89. Kogan I., Ramjeesingh M., Canhui Li., Kidd J.F., Wang Y., Leslie E.M. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux // *EMBO*. – 2003. – V. 22.– P. 1981-1989
90. Kurbannazarova, R. S., Tashmukhamedov, B. A., Sabirov, R. Z. Osmotic water permeability and regulatory volume decrease of rat thymocytes // *Gen. Physiol Biophys*. – 2003.– V.22. – P. 221-232.
91. Kurbannazarova, R. S., Tashmukhamedov, B. A., Sabirov, R. Z. Role of potassium and chlorine channels in the regulation of thymocyte volume in rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2008.– V.145.– P.606-609.
92. Linsdell P., Hanrahan J.W. Glutathione permeability of

- CFTR // *Am. J. Physiol.* – 1998.– V.275.– P.323-326.
- 93.Lu S.C., Glutathione synthesis.// *Biochim Biophys Acta.* – 2013– V.5– P. 3143-53.
- 94.Magdalenal L., Circul., Sarah Stringerl. Awlthe role of gsh efflux in staurosporine-induced apoptosis in colonic epithelial cells // *Biochem Pharmacol.* – 2009. – V.77.– P. 76-85
- 95.Marchan R., Christine L., Hammond., Ballatori N,Multidrug resistance-associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release // *Biochim Biophys Acta.* – 2008.– V.1778(10).– P. 2413-2420
- 96.Meister A. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor // *J. Nutrit. Sci. Vitaminol. Spec No:* – 1992.– P. 1-6.
- 97.Mittal M.,. Siddiqui M.R, Tran K., Reddy S.P., Malik A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury.// *Antioxid Redox Signal.* – 2014– V. 20 – P.1126-1167.
- 98.Oja S.S., Saransaari P. Modulation of taurine release by glutamate receptors and nitric oxide // *Prog. Neurobiol.* – 2000.– V.62.– P.407-425.
- 99.Oja S.S., Saransaari P. Taurine as a neuromodulator and osmoregulator // *Metab Brain.* – 1996.– V.11. – P.153-164.
100. Oja, S.S., Saransaari P. Taurine. In: Oja, SS.; Schousboe, A.; Saransaari, P., editors. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology* // New York: Springer. –2007. – V.6. – P. 155-206.
101. Ortega A., Ferrer P., Carretero J., Obrador E., Asensi M., Pellicer J.A., Estrela J.M. Down-regulation of glutathione and Bcl-2 synthesis in mouse B16 melanoma cells avoids their survival during interaction with the vascular endothelium // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278 (41). – P.39591-39599.
102. Oude Elferink R.P., de Haan J., Lambert K.J., Hagey L.R., Hofmann A.F., Jansen P.L. Selective hepatobiliary transport of nordeoxycholate side chain conjugates in mutant rats with a canalicular transport

- defect // *Hepatology*. –1989. – V. 9 (6). – P.861-865.
103. Pallardy F.V., Markovic J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – V.30.– P. 77-85.
104. Paranjpe A., Cac-lano N.A., Hume W.R., Jewett A. N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2007. – V.43. – P. 1394-1408.
105. Parasassi T., Brunelli R., Bracci-Laudiero L., Greco G., Gustafsson A.C., Krasnowska E.K., Lundeberg J., Lundeberg T., Pittaluga E., Romano M.C., Serafino A. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms // *Cell Death Differ.* –2005.– V.12.– P.1285-1296.
106. Patrizio P., Salameh W.A. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis // *J. Reprod Fertil Suppl.* – 1998.– V.53.– P. 261-270.
107. Paulusma C.C., van Geer M.A., Evers R., Heijn M., Ottenhoff R., Borst P., Oude Elferink R.P. Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione // *Biochem J.* – 1999.– V.338. – P.393-401.
108. Pullar J.M., Vissers M.C. Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells // *IUBMB Life.* – 2000.– V. 50.– P. 259-266.
109. Qian Y.M., Song W.C., Cui H., Cole S.P., Deeley R.G. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1 // *J. Biol. Chem.* – 2001.– V. 276. – P. 6404-6411.
110. Ralat L.A., Manevich Y. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes // *Biochemistry.* – 2006.– V.45 (2).– P. 360-372.

111. Rappa G., Lorico A., Flavell R.A., Sartorelli A.C. Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins // *Cancer Res.* – 1997.–V.57. – P. 5232-5237.
112. Rebbeor J.F., Connolly G.C., Ballatori N. Inhibition of Mrp2- and Ycf1p-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2 // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – V.1559. – P. 171-178.
113. Rebbeor J.F., Connolly G.C., Dumont M.E., Ballatori N. ATP-Dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles // *Biochem J.* –1998a. – V.334.– P.723-729.
114. Rebbeor J.F., Connolly G.C., Henson J.H., Boyer J.L., Ballatori N. ATP-dependent GSH and glutathione S-conjugate transport in skate liver: role of an Mrp functional homologue // *Am. J. Physiol.* – 2000.– V. 279. –P. 417-425.
115. Rebbeor JF, Connolly GC, Dumont ME, Ballatori N. ATP-Dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins // *J. Biol. Chem.* – 1998b.– V. 273.– P. 33449-33454.
116. Reed J.C. Apoptosis-based therapies. // *Nat. Rev. Drug. Discov.* –2002. – V. 1 (2).– P. 111-121.
117. Renes J., de Vries E.G., Nienhuis E.F, Jansen P.L., Muller M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1 // *Br. J. Pharmacol.* – 1999.– V.126 (3). – P. 681-688.
118. Reynaert N.L., Ckless K., Guala A.S., Wouters E.F., van der Vliet A., Janssen-Heininger Y. M. In situ detection of S-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization. // *Biochim Biophys Acta.* – 2006.– V. 1760.–380-387.
119. Rius M., Hummel-Eisenbeiss J., Hofmann A.F., Keppler D.

- Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione // *Am. J. Phys.* – 2006. – V. 290.– P. 640-649.
120. Rius M., Hummel-Eisenbeiss J., Keppler D. ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP4) // *J. Pharmacol Exp. Ther.* – 2008. – V.324.– P. 86-94.
121. Rius M., Nies A.T., Hummel-Eisenbeiss J., Jedlitschky G., Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane // *Hepatology.* – 2003.– V. 38 (2). – P. 374-384.
122. Ronaldson P.T., Bendayan R. HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 produces oxidative stress and regulates the functional expression of multidrug resistance protein-1 (Mrp1) in glial cells // *J. Neurochem.* – 2008. – V. 1760. – P. 360-367
123. Rosilene C. R., Wei Zhang., Eduard P.A.van Wijk., Thomas Hankemeier., Rawi Ramautar., Jan van der Greef . Cellular glutathione levels in HL-60 cells during respiratory burst are not correlated with ultra-weak photon emission // *Journal of Photochemistry & Photobiology.* – 2017. – V. 17. – P. 160-167
124. Sabirov R. Z., Manjosova M. A., Tadjibaeva E. T., Krasilnikov O. V. The interaction of amphotericin B with cell membrane of rat thymocytes // *Gen. Physiol Biophys.* – 1993.– V.12.– P. 249-257.
125. Sabirov R., Okada Y. ATP-Conducting Maxi-Anion Channel: A New Player in Stress-Sensory Transduction // *Jap. J. Physiol.* – 2004. – V 54. – P.7-14.
126. Sabirov R., Okada Y. ATP release via anion channels // *Purinergic Signalling.* – 2005. –V.1. – P.311-328
127. Sabirov R. Z., Y. Okada. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity // *J. Physiol. Sci.* – 2009. –V.59. – P 3-21.

128. Salmeen A., Barford D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases // *Antioxid Redox Signal.* – 2005.– V.7. – P. 560-577.
129. Sanyukta Rana., Ralf Dringen. Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes // *Neuroscience Letters.* – 2007.– V. 415.– P. 45-48
130. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation // *Cell Physiol Biochem.* – 2001.– V. 11.– P. 173-186.
131. Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // *Endocr. Rev.* – 2000.– V.21.– P. 412-443.
132. Scheffer G. L., Kool M., de Haas M., de Vree J.M., Pijnenborg A.C., Bosman D.K., Elferink R.P., van der Valk P., Borst P., Scheper R.J. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. // *Lab. Invest.* – 2002.– V. 82 (2).– P.193-201.
133. Schneider E., Yamazaki H., Sinha B. K., Cowan K. H. Buthionine sulphoximine-mediated sensitisation of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance associated protein involves increased drug accumulation // *Br. J.Cancer.* – 1995. – V.71 (4). – P. 738-743.
134. Schuetz E. G., Strom S., Yasuda K., Lecureur V., Assem M., Brimer C., Lamba J., Kim R.B., Ramachandran V., Komoroski B. J., Venkataramanan R., Cai H., Sinal C. J., Gonzalez F. J., Schuetz J. D. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450 // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 39411-39418.
135. Skuppa N., Dolezel P., Ruzickova E., Mlejnek P. Apoptosis induced by the curcumin analogue EF-24 is neither mediated by oxidative stress-related mechanisms nor affected by expression of main drug transporters ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells // *J. Mol.Sci.* –

- 2017 . – V.18. – P. 3-23.
136. Shen M., Zhao D., Qiao Q., Liu L., Wang J. Identification of glutathione S-Transferase (GST) genes from a dark septate endophytic fungus (*Exophiala pisciphila*) and their expression patterns under varied metals stress // *PLoS One* –2015. –V.10.– P. e0123418
137. Sevastos A., Labrou N., Flouri F., Malandrakis A. Glutathione transferase-mediated benzimidazole-resistance in *Fusarium graminearum* // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. –2016. –V.2.– P. 60-66
138. Scarcella S., Lamenza P., Virkel G., Solana H. Expression differential of microsomal and cytosolic glutathione-S-transferases in *Fasciola hepatica* resistant to Triclabendazole // *Mol. Biochem. Parasitol.* –2012. –V.12.– P. 37–39
139. Suzanne M., Krance., Rosemarie M. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins // *Toxicology and Applied Pharmacology*. –2005. –V.12.– P. 210 -214
140. Tomasi M.L., Ryoo M, Yang H., Iglesias Ara A., Ko K.S., Lu S.C., Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-mediated inhibition of glutathione synthesis in mice.// *Free Radic Biol Med.* – 2014– V.68 – P.148-58.
141. Zhang.H., FormanH., Temporal changes in glutathione biosynthesis during the lipopolysaccharide-induced inflammatory response of THP-1macrophages // *Free radical Biology and medicine.* – 2017– V.113– P.304-310
142. Zhang H., Shih A., Rinna A., Forman H.J., Resveratrol and 4-hydroxynonenal act in concert to increase glutamate cysteine ligase expression and glutathione in human bronchial epithelial cells.// *ArchBiochem Biophys* – 2009– V. 481(1) – P.110-120

МУНДАРИЖА

ҚИСҚАРТМА СЎЗЛАР РЎЙХАТИ	2
КИРИШ	5
I БОБ. ҲУЖАЙРАЛАР ИЧКИ ВА ТАШҚИ МУҲИТИДА ГЛУТАТИОНИНГ АҲАМИЯТИ ВА УНИНГ БИОСИНТЕЗИ	8
§1.1. Тимуснинг анатомияси ва физиологияси.....	9
§1.2. Глутатион моддасининг умумий характеристикаси ва унинг биосинтез йўли	12
§1.3 Ҳужайра ички глутатион моддасининг биологик роли	18
§1.4 Ҳужайра ташқи муҳитидаги глутатион моддасининг	22
§1.5 Ҳужайрадан ҳужайра ташқи муҳитига глутатион моддасининг чиқиши ва унинг механизми	25
II БОБ. ҲУЖАЙРАЛАРНИ АЖРАТИБ ОЛИШ, ГЛУТАТИОНИ МИҚДОРИ ВА ТАЪСИР МЕХАНИЗМЛАРИНИ АНИҚЛАШ УСУЛЛАРИ	32
§2.1. Тадқиқот материаллари	32
§2.2. Каламуш тимусидан тимоцитларни ажратиб олиш.....	33
§2.2.1. Тимоцитларнинг яшовчанлигини аниқлаш	34
§2.3. Эритроцитлар суспензиясини тайёрлаш.....	34
§2.4. Меланома тери рак ҳужайраларини культураси.....	35
§2.5. Таҷриба протоколлари (схемалари).....	35
§2.5.1. Глутатион моддасини аниқлаш усули	35
§2.5.2. Тимоцитлардан глутатион ажралиб чиқишини аниқлаш	37
§2.5.3. Тимоцитлар ҳажмининг ўзгаришини ёруғлик ўтказиш.....	38
§2.5.4. Гемолиз миқдорини аниқлаш	39
§2.6. Натижаларнинг статистик таҳлили	40
III БОБ. ҲУЖАЙРАЛАРДАН НОРМАЛ ВА ГИПООСМОТИК СТРЕСС ШАРОИТИДА ГЛУТАТИОН ЧИҚИШИГА ТАЪСИР ЭТУВЧИ ОМИЛЛАР ВА МЕХАНИЗМЛАРИ	41
§3.1. Тимоцитлардан глутатион моддасини чиқиш системасининг	41
§3.1.1. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг ҳужайра сонига боғлиқлиги	41
§3.1.2. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг инкубация вақтига боғлиқлиги.....	43
§3.1.3. Тимоцитлардан глутатион чиқишига эритма	

осмотик босимининг таъсири	45
§3.1.4. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитида тимоцитлардан глутатион чиқишининг ҳароратга боғлиқлиги	46
§3.2 Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион	48
§3.2.1. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига эритма ион таркибининг боғлиқлиги.....	48
§3.2.2. Тимоцитлардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига анион каналлари блокаторларининг таъсири	51
§3.2.3. Тимоцитлардан нормал ва гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига мембрана транспортерларининг роли	58
§3.2.4. Тимоцитлардан гипоосмотик стресс шароитида глутатион чиқишига ҳужайра ичидаги цАМФ нинг роли	65
§3.3. Турли хил ҳужайралардан глутатион чиқиш характеристикасини таққослаш	68
§3.3.1. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитда қизил қон ҳужайраларидан глутатион чиқиши	68
§3.3.2. Нормал ва гипоосмотик стресс шароитда меланома рак ҳужайраларидан глутатион чиқиши	70
§3.4. Ҳужайранинг физиологик функцияларига ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири	72
§3.4.1. Гипоосмотик стресс шароитда тимоцит ҳужайралари ҳажм бошқарилишига ҳужайра ташқарисидаги глутатионнинг таъсири	72
§3.4.2. Қизил қон ҳужайралари коллоид- осмотик чидамлилигига ҳужайра ташқарисидаги глутатион моддасининг таъсири.....	75
ЯКУНИЙ ҚИСМ	77
ХУЛОСАЛАР	83
Фойдаланилган адабиётлар рўйхати	85