



UDK: 616.8-008.6:615.322

Farangiz XURRAMOVA,

O'zbekiston Milliy universiteti magistranti

E-mail: khurramova02@gmail.com

Parizoda YULDASHEVA,

O'zbekiston Milliy universiteti magistranti

Kamila NEBESNAYA,

Ilg'or texnologiyalar markazi, katta ilmiy xodimi, PhD

Oksana CHARISHNIKOVA,

Ilg'or texnologiyalar markazi «Eksperimental biofizika» laboratoriyasi mudiri, katta ilmiy xodimi, PhD

Baxodir OXUNDEDAYEV,

O'zRFA S.Yunusov nomidagi O'simlik moddolari kimyosi instituti, Terpenoidlar va fenol birikmalari kimyosi laboratoriyasi katta ilmiy xodimi, PhD.

Sabir NISHANBAYEV,

O'zRFA S.Y. Yunusov nomidagi O'simlik moddolari kimyosi instituti Lipidlar kimyosi laboratoriyasi mudiri, yetakchi ilmiy xodimi, k.f.d., DSc.

E-mail: sabir78@rambler.ru

Tel: (97) 739 4006

Nafisa KOMILOVA,

Mirzo Ulug'bek nomidagi O'zbekiston Milliy Universiteti Biofizika kafedrasi dotsenti, b.f.f.d., PhD.

E-mail: na.komilova@nuu.uz

Tel: (97) 3456590

Artyom BAEV,

Ilg'or texnologiyalar markazi katta ilmiy xodimi, b.f.f.d., Ph.D.

Mirzo Ulug'bek nomidagi O'zbekiston Milliy Universiteti Biofizika kafedrasi dotsenti

E-mail: baev.a.yu@gmail.com

Tel: (94) 626 0679

O'zMU huzuridagi Biofizika va biokimyo instituti katta ilmiy xodimi, b.f.f.d., PhD., Rustamova S.I. taqrizi asosida

INVESTIGATION OF THE NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF KAEMPFEROL-3-O SOPHOROSIDE IN A CELLULAR MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Annotation

We investigated the effects of kaempferol-3-O-sophoroside (PCS-1) on mitochondrial bioenergetic processes under normal conditions and in a cellular model of Parkinson's disease. Treatment with PCS-1 led to an increase in mitochondrial membrane potential (Ψ_M) both under physiological conditions and in the Parkinson's model. It was found that PCS-1 reduces the activity of respiratory chain complex I and also decreases the contribution of F_1F_0 ATP synthase to the maintenance of Ψ_M in the Parkinson's disease model.

Keywords: Kaempferol 3-O-sophoroside, Parkinson's disease, mitochondria, mitochondrial membrane potential.

ИЗУЧЕНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ КЕМПФЕРОЛ-3-О СОФОРОЗИДА НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Аннотация

В настоящей работе нами было исследовано влияние кемпферол-3-О-софорозида (PCS-1) на биоэнергетические процессы митохондрий в норме и в клеточной модели болезни Паркинсона. Обработка клеток PCS-1 приводила к увеличению митохондриального мембранного потенциала (Ψ_M) в норме и при болезни Паркинсона. Было обнаружено, что PCS-1 снижает активность комплекса I дыхательной цепи как в норме, так и при патологии, а также снижает участие F_1F_0 АТФ синтазы в формировании Ψ_M в модели болезни Паркинсона.

Ключевые слова: Кемпферол-3-О-софорозид, болезнь Паркинсона, митохондрии, митохондриальный мембранный потенциал.

KEMPFEROL-3-O SOFOROZIDINING NEYROPROTEKTOR XUSUSIYATLARINI PARKINSON KASALLIGI HUYAYRA MODELIDA TADQIQ QILISH

Аннотатсия

Mazkur tadqiqot ishida kemperol-3-O-soforozidning (PCS-1) normal fiziologik holatdagi va Parkinson kasalligi imitatsiya qilingan hujayralarda mitoxondriya bioenergetik jarayonlariga ta'siri o'rganildi. Hujayralarga PCS-1 ta'sir ettirilganda har ikkala guruhdagi hujayralarning mitoxondrial membrana potentsiali (Ψ_M) oshishi kuzatildi. PCS-1 mitoxondriya nafas zanjiri I kompleksi faolligini pasaytirishi, shuningdek, Parkinson kasalligi modelida Ψ_M shakllanishida F_1F_0 ATF sintazaning hissasini kamaytirishi aniqlandi.

Kalit so'zlar: Kempferol 3-O-soforozid, Parkinson kasalligi, mitoxondriya, mitoxondriya membrana potentsiali.

Kirish. Kempferol-3-O-soforozid (PCS-1) – bu flavonoid kaempferolning glikozidi bo'lib, uchinchi pozitsiyaga soforoza (ikki glukozadan iborat disaxarid) bog'langan. PCS-1 ning farmakologik xususiyatlarini o'rganishga bag'ishlangan ilmiy nashrlar juda kam va bu birikmaning mitoxondriya funksiyasiga to'g'ridan-to'g'ri ta'siri bo'yicha nashrlar mavjud emas. Biroq, kempferolning o'zi mitoxondriya funksiyalarini ya'ni energiya metabolizmini yaxshilovchi, oksidlanishli stressni kamaytiruvchi va kalsiy gomeostazini boshqarishda samarali modulyator sifatida keng tadqiq qilingan [1]. Shu sababli, tadqiqotlarimiz uchun ushbu birikma tanlab olinib, uning neyrohimoyaviy ta'siri baholandi. Mavjud tadqiqotlarda kempferol mitoxondrial jarayonlarning samarali modulyatori ekanligi va F_1F_0 ATF sintaza va ETZ (elektron transport zanjiri) I kompleksi faolligiga bevosita ta'sir ko'rsatishi tadqiq qilingan edi [1, 2]. Shu sababli ushbu tadqiqot uchun kempferol hosilasi bo'lgan PCS-1 tanlab olindi va uning nazorat va Parkinson kasalligining hujayra modelida bioenergetik jarayonlarga ta'sirini o'rganish maqsad qilib olindi.

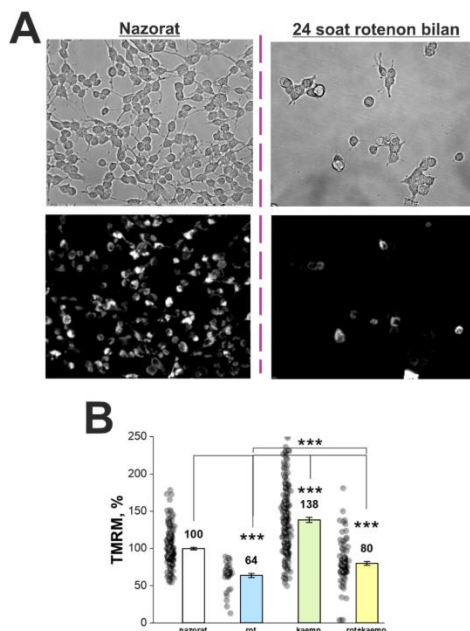
Material va metodlar. SH-SY5Y hujayra liniyasini o'stirish. Neuroblastoma hujayralarini saqlash va o'stirish uchun Eagle's Minimal Essential Medium va F12 muhitining (Gibco F12, ThermoFisher Scientific #11765054) 1:1 nisbatdagi aralashmasidan foydalanildi. Harorat 37 °C va atmosfera muhitida 95% havo va 5% CO₂ bo'lgan inkubatorida saqlandi. Ozuqa muhiti tarkibida 1% antibiotik qo'shildi va uning ta'sir etish davomiyligi qo'shilganidan so'ng 1 oy muddatda hisoblanadi. Muhit har 4-7 kunda yangilab turiladi. Parkinson kasalligini hujayra darajasida modellashtirish uchun SH-SY5Y hujayralari kulturasini 1 μ M rotenon bilan 24 soat inkubatsiya qilindi kаk показано в [3]. Kempferol 3-O-soforozid ta'sirini baholash guruhiga ushbu modda 10 μ M konsentratsiyada rotenon bilan bir vaqtda qo'shildi. Mazkur modda O'zR FA O'simlik moddolari kimyosi instituti tomonidan ajratib, tozalab olingan va bizga tadqiqot uchun xolisona taqdim etildi.

Mitoxondriya membrana potentsiali ($\Delta\Psi_M$)ni o'lchash. $\Delta\Psi_M$ baholash CELENA® S (logos Biosystems) fluorestsensiya mikroskopi yordamida olib borildi. Dastlab tajriba uchun hujayra kulturalari HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) muhiti bilan 3 marta yuvib tashlanib, $\Delta\Psi_M$ ga sezgir bo'lgan TMRM fluoretsent zondi (25 nM) yordamida 20 daqiqa davomida qorong'u muhitda doimiy va sekinlik bilan aralashtirish sharoitida bo'yalandi. Fluoretsent mikroskop har 20 sekundda bitta tasvirga oladi va har bir tajriba 12-15 daqiqa davom etadi. Tajriba 20 $\times$ obyektiv va 548^{qo'zg'atish}/574^{emissiya} da TMRM uchun RFP filtrida ko'riladi.

Statistik tahlil uchun Origin Pro 2024 dasturidan foydalanildi. Statistik tahlil bir omilli dispersion tahlil usullari (ANOVA, Tukey testi) yordamida amalga oshirildi. Farqlar $p < 0.05$ bo'lganda statistik jihatdan ahamiyatli deb hisoblandi.

Tahlil va natijalar. Tajribada 4 ta guruh ajratib olindi: 1-nazorat, 2-kempferol, 3-rotenon, 4-rotenon va kaempferol bilan inkubatsiya qilingan hujayralar guruhi. 4-guruhda kempferol rotenon bilan bir vaqtda 24 soat davomida inkubatsiya qilindi. Tadqiqot natijalariga ko'ra, nazorat hujayralarga **kaempferol** ta'sir ettirish Ψ_M **38% ga oshirganini** kuzatish mumkin. Shu bilan birga, **rotenon** ta'sirida bo'lgan hujayralarda Ψ_M **36% ga keskin pasaygan**. Rotenon va **kempferol bilan inkubatsiya qilingan hujayralar** esa sezilarli o'zgarish ko'rsatib, 16% ga Ψ_M ni tiklagan. Bu esa kempferolning ushbu sharoitdagi biologik ta'sir doirasini yanada chuqurroq o'rganish zarurligini ta'kidlaydi (1-A va B rasm).

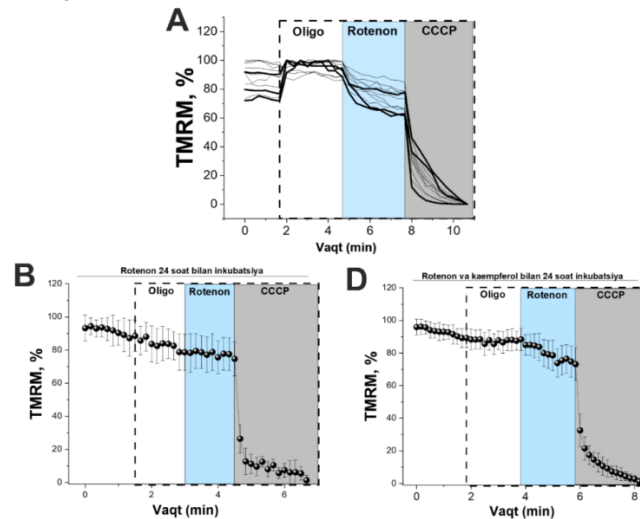
Rotenon guruhidagi hujayralarda Ψ_M sezilarli darajada kamaygani kuzatildi. 10 μ M konsentratsiyadagi PCS-1 qo'llanganda esa bu pasayish oldi olinib, rotenon bilan zararlangan hujayralarda Ψ_M qisman tiklangani aniqlandi. Shuningdek, 10 μ M PCS-1 sog'lom hujayralarda ham Ψ_M ni sezilarli darajada oshirgan (1-B rasm). Mitoxondriyal membrana potentsialini barqaror saqlashni F_1F_0 ATF sintez qilishdan ustun vazifa sifatida bajaradi. Shuning uchun, elektron transport zanjiri membrana potentsialini yetarlicha ta'minlay olmagan holatlarda, mitoxondriya F_1F_0 ATF sintazasi gidroliz rejimiga o'tib, protonlarni matritsadan membranalararo bo'shliqqa tashlash uchun F_1F_0 ATF energiyasidan foydalanadi. Normal sharoitida F_1F_0 ATF sintazalarning katta qismi F_1F_0 ATF sintez rejimida ishlaydi, lekin turli patologik sharoitlarda gidroliz rejimida faoliyat yurituvchi F_1F_0 ATF sintazalar foizi ortadi [4, 5].



1-rasm. Parkinson kasalligi model hujayralarida PCS-1 ning Ψ_M ga ta'siri. A. Nazorat va rotenon guruhi hujayralarining TMRM fluorestsensiyasi aks etgan namunaviy tasvirlar. **B.** Barcha guruhlarda tegishli moddalar bilan 24 soat davomida inkubatsiya qilingandan so'ng hujayralarning Ψ_M o'zgarishi. Nazorat – N=8; n=263, rotenon – N=7; n=58, PCS-1 – N=8; n=259, rotenon+PCS-1 – N=6; n=142 (N – tajribalar soni; n – statistik tahlilga kiritilgan hujayralar soni). *** – $p \leq 0,001$

Tajriba davomida ATF sintazaning mitoxondriya membranasi potentsialiga ta'sirini baholash uchun ATF sintazaning selektiv ingibitori hisoblangan oligomitsin A qo'shish orqali Ψ_M ni TMRM nurlanish intensivligi o'zgarishiga bog'liq ravishda tekshirildi (2-rasm). Tajriba natijalarini tahlil qilishda barcha o'lchovlar 100% ko'rsatkichga nisbatan normallashtirildi, ya'ni har

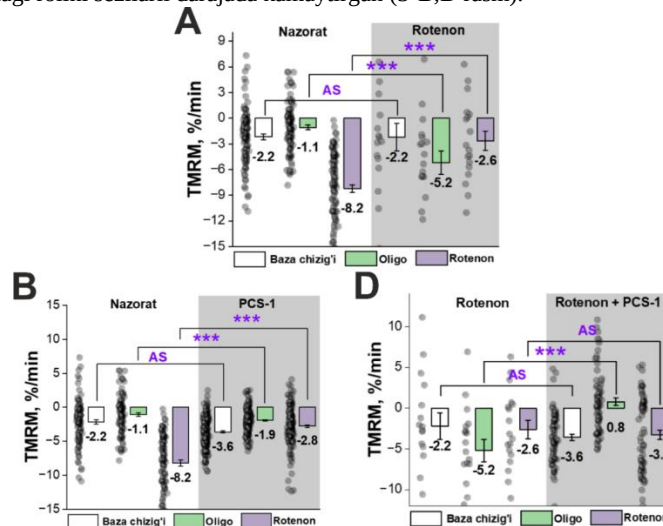
bir hujayraning maksimal TMRM fluorestsensiyasi intensivligi 100%, minimal qiymati esa (depolarizatsiya moddalari qo'shilgandan so'ng) nol sifatida belgilandi.



2-rasm. Nazorat, rotenon, rotenon+PCS-1 guruhidagi hujayralarda Ψ_M ni baholash. Nazorat (A) rotenon (B) va rotenon+PCS-1 (D) guruhidagi hujayralarning na'munaviy natijalari tasvirlari. TMRM signali 100 % ga normalashtirilgan, chiziqlar tajribadagi barcha hujayralarning o'rtacha qiymati $\pm$ standart xatolik ko'rinishida berilgan.

Ma'lumotlar Origin Pro 2024 dasturining "normalize curves" funksiyasi yordamida standartlashtirildi, bu esa hujayralar orasidagi nisbiy o'zgarishlarni yanada aniqroq baholash imkonini berdi. Nazorat hujayralarda oligomitsin ta'sirida TMRM intensivligi ya'ni Ψ_M deyarli o'zgarmagan (2-A rasm). Nafas zanjiri birinchi kompleksi ingibitori hisoblangan rotenon qo'shilganda Ψ_M ni pasayishi kuzatildi (2-A rasm). Har bir tajriba oxirida Ψ_M ni shartli ravishda nolga tushirish maqsadida CCCP qo'shildi. Rotenon bilan 24 soat inkubatsiya qilingan hujayralarda oligomitsin qo'shilishi Ψ_M ni pasayishiga olib keldi (2-B rasm). Rotenon ta'sirida esa yanada ko'proq pasayish kuzatildi (2-B rasm). Rotenon bilan bir vaqtda kempferol bilan inkubatsiya qilingan hujayralarda esa oligomitsin ta'sir ettirilgandan so'ng Ψ_M qayta tiklandi (2-D rasm).

Olingan natijalar tahlilining keyingi bosqichida Ψ_M ning o'zgarish tezligi hisoblab chiqildi. Unga ko'ra nazorat hujayralarida tajriba avvalidan TMRM signalining biroz pasayish tendensiyasi mavjud bo'lib, Ψ_M pasayish tezligi 2.2 %/min. ni tashkil etdi (3-A rasm). Oligomitsin ta'sirida bu pasayish tezligi 1.1 %/min. gacha kamaydi, rotenone qo'shilishi esa Ψ_M ning pasayish tezligini 8.2 %/min. gacha oshirdi (3-A rasm). Rotenon guruhida bazaviy chiziqdagi potensial pasayish tezligi nazorat hujayralaridan unchalik farq qilmadi, lekin oligomitsin qo'shilganda Ψ_M pasayish tezligi 5.2 %/min.ga yetib, nazorat hujayralaridan sezilarli darajada farq qildi (3-A rasm). Rotenon ta'sirida esa rotenon guruhida Ψ_M pasayish tezligi o'rtacha 2.6 %/min. ni tashkil etdi, bu ham nazorat hujayralari ko'rsatkichlaridan ancha farq qiladi. PCS-1 bilan preinkubatsiya qilingan hujayralar F_1F_0 ATF sintazaning Ψ_M shakllanishidagi rolini sezilarli darajada kamaytirgan (3-B,D rasm).



3-rasm. Nazorat, rotenon, rotenon+PCS-1 guruhidagi hujayralarda Ψ_M shakllanishida F_1F_0 ATF-sintaza va elektron tashish zanjiri ishtirokini baholash. TMRM fluorestsensiyasi o'zgarishining tezligi nazorat (A,B) va rotenon guruhidagi hujayralarda (D) o'lgandi. Oligomitsinning funksional qo'shilishidan keyin PCS-1 ning qo'llanilishi hujayralar Ψ_M ga sezilarli ta'sir ko'rsatganligini ko'rish mumkin. Rotenon guruhida oligomitsin ta'siri sezilarli darajada kam bo'lgan (D). Grafik barlarining ostidagi raqamlar grafikning har bir qismida barcha hujayralar uchun o'rtacha tezlik qiymatini bildiradi. Nazorat N=4; n=134, Rotenon – N=3; n=25, Rotenon+kaempferol-o-soforozid – N=5; n=75, Kaempferol-o-soforozid – N=6; n=221 (N – chashka, n – statistikaga chiqqan hujayralar soni). *** - $p \leq 0,001$ – Student test, AS – ahamiyatsiz

PCS-1 bilan 24 soat inkubatsiya qilingan nazorat hujayralarining Ψ_M oligomitsin ta'sirida 1.9 %/min., rotenon ta'sirida esa 2.8 %/min ga pasayib, nazorat hujayralariga nisbatan yuqori potensialni ko'rsatgan (3-B rasm). Shuningdek, rotenon+PCS-1

hujayralarga oligomitsin qo'shilganda Ψ_M 0.8 %/min. ga pasayib, rotenon guruhiga nisbatan sezilarli darajada farq qilgan. Shu bilan birga, rotenon ta'siri sezilarli o'zgarish kuzatilmagan (3-D rasm). Tadqiqot natijalariga ko'ra rotenon guruhidagi hujayralarda oligomitsin ta'siri teskari tomonga o'zgargan, ya'ni bu hujayralarda potensialning bir qismi F_1F_0 ATF sintaza faolligi orqali shakllanayotgani taxmin qilinadi, bu holat avvalgi adabiyotda qayd etilgan [4]. Bundan tashqari, rotenon ETZ I kompleksi ingibitori sifatida kompleks faoliyatining pasayishiga olib kelishi kerak, bu esa tajribalarimizda ham tasdiqlandi, chunki rotenon guruhi hujayralarida rotenon qo'shilganda kuzatilgan ta'sir nazorat hujayralariga nisbatan ancha past bo'lgan (3-A rasm).

Xulosa. Mazkur tadqiqotda PCS-1 normal fiziologik holatlarda ham, neyroblastoma hujayralari Parkinson kasalligining rotenon modelida ham hujayraning bioenergetik jarayonlariga modulyatsiyalovchi ta'sir ko'rsatishga qodirligi ko'rsatildi. Olingan natijalarga asosanib, ushbu birikmaning potensial ta'sir nishonlari mitoxondriya nafas zanjirining I kompleksi va F_1F_0 -ATF-sintaza bo'lishi mumkin degan xulosaga kelish mumkin. Ma'lumki, I kompleks hujayradagi turli xil stress sharoitlarga nisbatan yuqori sezgirlikka ega va shikastlovchi ta'sir boshlanganidan 2-3 daqiqa o'tgach, nofaol holatga o'tishi mumkin [6]. Bundan tashqari, ko'pchilik patologik holatlarda Ψ_M ning pasayishi kuzatiladi, bu esa o'z navbatida F_1F_0 -ATF-sintazaning gidroliz rejimiga o'tishiga sabab bo'lishi mumkin. Nafas zanjirining I kompleksi va gidrolitik rejimdagi F_1F_0 -ATF-sintazaning har ikkisi ham mitoxondriya disfunktsiyasi bilan kechadigan patologiyalarda muhim farmakologik nishon hisoblanadi. Shu sababli bu fermentlar faolligini to'g'ridan-to'g'ri modulyatsiya qila oladigan yangi biologik faol moddalarni izlash zamonaviy tadqiqot yo'nalishi hisoblanadi. Kelgusi tajribalarda ajratib olingan mitoxondriyalarga PCS-1 ning bevosita ta'sirini tadqiq qilish rejalashtirilgan.

Minnatdorchilik. Ushbu tadqiqot Ilg'or Texnologiyalar Markazi byudjet mablag'lari, shuningdek № AL-7823051647 (K.N.R.) amaliy loyihasi ko'magida amalga oshirilgan.

Mualliflarning hissi. X.F.T., Yu.P.B. – tadqiqotlarni o'tkazish, ma'lumotlarni tahlil qilish, nashr uchun rasmlar tayyorlash, dastlabki qo'lyozma variantini yozish; N.K.S. – tadqiqotlarni o'tkazish; Ch.O.S., O.B.S., N.S.Z. – konseptualizatsiya, resurslar; K.N.R. – tadqiqotlarni o'tkazish, qo'lyozmani tahrirlash, resurslar; B.A.Y. – tadqiqotlarni konseptualizatsiya qilish va dizayni, tadqiqotlarni o'tkazish, ma'lumotlarni tahlil qilish, qo'lyozma yozish va tahrirlash.

ADABIYOTLAR

1. Althaher A.R., Alwahsh M. (2023) An overview of ATP synthase, inhibitors, and their toxicity. *Heliyon* 9(11): e22459. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e22459
2. Lagoa R. et.al. (2011) Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1807(12): 1562-1572. DOI: 10.1016/j.bbabo.2011.09.022
3. Небесная К.С. и др. (2024) β экдистерон оказывает положительное влияние на биоэнергетику нейронов и астроцитов при ротеноновой модели болезни Паркинсона. *Узбекский биологический журнал* 4: 3-8.
4. Acin-Perez R. et.al. (2023) Inhibition of ATP synthase reverse activity restores energy homeostasis in mitochondrial pathologies. *EMBO J* 42(10): e111699. DOI: 10.15252/embj.2022111699
5. Connolly N.M.C. et.al (2018) Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 25(3): 542-572. DOI: 10.1038/s41418-017-0020-4
6. Hernansanz-Agustin P.et.al. (2020) Na(+) controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. *Nature* 586(7828): 287-291. DOI: 10.1038/s41586-020-2551-y