

ABDULLAYEV D.M., KLEBLEEVA G.D.,
AXMEDOVA M.M.

**TERI LEYSHMANIOZIDA
MEMBRANOAKTIV
BIRIKMALARINING
XUSUSIYATLARI**

**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
SOG'LIQNI SAQLASH VAZIRLIGI
SAMARQAND DAVLAT TIBBIYOT UNIVERSITETI**

Abdullayev D.M., Klebleeva G.D., Axmedova M.M.



**TERI LEYSHMANIOZIDA
MEMBRANOAKTIV BIRIKMALARINING
XUSUSIYATLARI**

Monografiya

O'quv qo'llanma Samarqand davlat tibbiyot universiteti Ilmiy Kengashining 7-iyun 2023-yilda bo'lib o'tgan yig'ilishidagi "10"- son bayonnomasiga ko'ra tasdiqlanib, chop etishga ruxsat berilgan.



UDK 616.993.162

BBK 55.83

A 15

Abdullayev., D.M., Klebleeva G.D., Axmedova M.M.

Teri leyshmaniozida membranoaktiv birikmalarining xususiyatlari. [Matn] / D.M. Abdullayev, G.D. Klebleeva, M.M. Axmedova. - Samarqand: Samarqand, 2023. - 92 b.

Mualliflar:

- Abdullayev D.M.** -Samarqand davlat tibbiyot universiteti Dermatovenerologiya kafedrasida dotsent
- Klebleeva G.D.** -Samarqand davlat tibbiyot universiteti teri va tanosil kasalliklari kafedrasida mudiri, t.f.n
- Axmedova M.M.** -Samarqand davlat tibbiyot universiteti DKTF Pediatriya kafedrasida dotsent

Taqrizchilar:

- Mavlyanova Sh.Z.** -Toshkent Respublika ixtisoslashtirilgan dermatovenerologiya va kosmetologiya ilmiy-amaliy tibbiyot markazining dermatoz muammolarini o'rganish ilmiy laboratoriya mudiri, tibbiyot fanlari doktori professor.
- Ziyadullayev Sh.X.** -Samarqand davlat tibbiyot universiteti I-son ichki kasalliklar kafedrasida mudiri, tibbiyot fanlari doktori, dotsent.

Teri leyshmaniozi infeksiyaga qarshi kurashish jarayonida mahalliy immunitet tufayli uzoq vaqt davomida sustlashishi bilan tavsiflanadi. Shuning uchun biz ommabop Gramitsidin pastasi yordamida mahalliy immunitetni rag'batlantirishga harakat qildik. Nazorat guruhlaridan birida Gramitsidin S ning antibiotik ta'sirining hissasini baholash uchun teri leyshmaniozini davolashda qo'llaniladigan antibiotiklar orasida leyshmaniyaga qarshi eng samarali dori sifatida Monomitsin mazidun foydalanilgan.

Asosiy guruhdagi Gramitsidinning Monomitsinga nisbatan ancha samarali terapevtik ta'siri Gramitsidinning ta'siri nafaqat uning antibiotik faolligi bilan belgilanishini ko'rsatadi. Gramitsidin S ning mahalliy immunostimulyatsion ta'sirga ega ekanligini ko'rsatish uchun etarli asoslar mavjud, bu antibiotik ta'siri bilan birgalikda teri leyshmaniozida juda yaxshi terapevtik ta'sir ko'rsatadi.

ISBN 978-9910-9423-2-7

© Abdullayev D.M., Klebleeva G.D., Axmedova M.M. 2023 y

© Samarqand 2023 y

MUNDARIJA

QISQARTMALAR RO'YXATI	5
MUQADDIMA	6
KIRISH	7
I BOB. ADABIYOTLAR O'RNI	8
1. Polielektrolitlar bilan immunogenezni stimulyatsiyalash.....	8
2. Poliionlar tomonidan hujayra faollashuvining molekulyar mexanizmlarini o'rganish	10
3. Limfotsitlar faollashuvi mexanizmida membrana ionlarini tashishning ahamiyati	12
II BOB. MATERIALLAR VA TADQIQOT USULLARI	21
1. Antigenler. In vivo antitela genezasini induktsion modeli	21
2. In vitro sharoitda limfoid hujayralarni yetishtirish	24
3. Polimerlar	26
4. Membranani faol effektorlar	27
5. Hujayra membranasining ionlarga o'tkazuvchanligini o'lchash	27
6. Plazma membranasining (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATFazalari vositasida ionlarning faol tashilishini o'rganish	29
III BOB. TADQIQOT NATIJALARI POLYANIONLI IMMUNOSTIMULANTLARNING KALIY VA KALTSIY IONLARI UCHUN LIMFOTSITLAR MEMBRANASINING O'TKAZUVCHANLIGIGA TA'SIRI	35
1. K^+ passiv oqimlari	35
2. Ca^{2+} ning passiv oqimlari	40
3. Ion tashuvchi ATFazaning to'liq bloklanishi sharoitida PAK ning membrananing ion o'tkazuvchanligiga ta'siri.....	41

IV BOB. POLIANIONLARNING (Na, K) - va Ca - ATFAZALARNI LIMFOTSITLAR MEMBRANASIGA TASHILISHINING TA'SIRI.....	45
V BOB. LIMFOTSITLARNING POLIANIONGA TA'SIRINI FAOLLASHTIRISH UCHUN HUYAYRA MEMBRANASINING O'TKAZUVCHANLIGINI OSHIRISH QIYMATINI TAHLIL QILISH	51
1. Polianionning T va B limfoit membranasida ionlarni tashishga ta'siri.....	51
2. Polimer bo'lmagan tabiatdagi membranotrop moddalarning immunostimulyatsion ta'siri.....	57
VI BOB. MUHOKAMA.....	72
XULOSA.....	81
ADABIYOTLAR RO'YXATI.....	83

QISQARTMALAR RO'YXATI

- ATF** – adenozin trifosfat
- IFA** – immunoferment analiz
- AShH** – antitana shaklidagi hujayra
- PAK** – poliakril kislota
- SEA** – suvda eriydigan antigen

MUQADDIMA

Gramitsidin S - rasmiy membrana faol moddalarning immunostimulyator ta'siri to'g'risidagi ma'lumotlar mustaqil ilmiy va amaliy ahamiyatga ega. Ular ushbu moddalarni turli infeksiyalarning patogenlaridan antigenlarga qarshi antikogenezni induksiya qilishda immunoadyuvantlar sifatida tavsiya etishga imkon beradi. Shu bilan birga, monografiyada gramitsidin S ning immunoadyuvant ta'sirining dozaga bog'liqligi, IgM va IgG antitanalarini ishlab chiqarish dinamikasi, birlamchi antikor sintezi va immun xotirasini kuchaytirish imkoniyati to'g'risida batafsil ma'lumotlar keltirilgan. Ikkilamchi antitela ishlab chiqarish, immunoadyuvant ta'sirining og'irligi o'zgaruvchan reaksiya darajasiga (immunogenning dozasiga qarab) va o'rganilayotgan antigenlarning strukturaviy xususiyatlariga bog'liq. Bularning barchasi leishmaniozni davolash amaliyotida gramitsidin S va uning analoglaridan maqsadli foydalanish uchun foydali bo'lishi mumkin bo'lgan ma'lumotlardir. Ushbu ishda olingan natijalar keyingi tadqiqotlarda ishlab chiqilishi kerak. Bu, shuningdek, salmonella antigenlari va kuydirgi qo'zg'atuvchisiga qarshi immunitetni rag'batlantirish uchun gramitsidin S dan foydalanishga bo'lgan muvaffaqiyatli urinishlar bilan bir qatorda, mahalliy immunitetning zaifligi tufayli uzoq davom etishi bilan tavsiflangan teri leishmaniozida gramitsidin S ning sezilarli terapevtik ta'siri bilan tasdiqlanadi.

Ushbu monografiya dermatologlar, yuqumli kasalliklar bo'yicha mutaxassislar va terapevtlar uchun dolzarbdir. Monografiyadan o'quv mashg'ulotlari jarayonida "Dermatologiya", "Yuqumli kasalliklar", "Terapiya" kabi fanlarni o'qitishda, tibbiyot oliy o'quv yurtlari talabalari, shuningdek, magistratura rezidentlari va klinik ordinatorlari ham foydalanishlari mumkin.

KIRISH

Suvda eruvchan polikislotalar yoki izopolikislotalarning organizmga kiritilishi gematopoetik ildiz hujayralaridan boshlab ikkala limfoid hujayralar va ularning prekursorlarining ko'chishi, o'zaro ta'siri, ko'payishi, yetukligi va faoliyati jarayonlarining faollashishiga olib kelishi mumkin. Aniqlangan fenomen immunitet reaksiyalarini samarali kuchaytirish uchun muvaffaqiyatli qo'llaniladi. Bunday holda, agar polielektrolit antigen bilan aralashmada emas, balki kovalent antigen-polimer kompleksi shaklida kiritilsa, stimulyatsiya natijasi ancha sezilarli bo'ladi.

Polielektrolitlarning immunostimulyator ta'sirining mexanizmlari faol o'rganilmoqda. Xususan, immunokompetent hujayralar subpopulyatsiyalarining polimer bilan mustahkamlangan immun reaksiyasidagi ishtirokini tahlil qilishda sezilarli yutuqlarga erishildi.

Ushbu monografiyada immunokompetent hujayraning polielektrolit bilan reaksiyasini faollashtirishning molekulyar mexanizmlarini o'rganish bo'yicha bir qator ishlar ko'rsatib o'tilgan. Leyshmaniozni davolashda poliiionlar tomonidan immunokompetent hujayralarni faollashtirishda hujayra membranasining ion tashuvchi tizimining ishtiroki darajasini aniqlashimiz kerak bo'ladi. Shuningdek, leyshmaniozda polimer bo'lmagan ion o'tkazuvchanligi induktorlari bilan immunitetni faollashtirish imkoniyatini o'rganiladi.

I BOB. ADABIYOTLAR O'RNI

Biz tomonidan o'tkazilgan tajribalarning tavsifiga o'tishdan avval, bizdan oldin aniqlangan faktlarni batafsil ko'rib chiqish kerak. Birinchidan, polielektrolitlarning immunostimulyatsion ta'siri haqida nima ma'lum. Ikkinchidan, limfoid hujayralarni lektinlar bilan faollashtirish mexanizmida ionlarning membrana transporti roli haqida.

1. Polielektrolitlar bilan immunogenezni stimulyatsiyalash

Polielektrolitlar - bir nechta zaryadga ega bo'lgan turli tuzilmalarning eruvchan polimerlaridir. Bu moddalarni hayvonlar organizmiga kiritish orqali qon hosil bo'lish va immunopoez jarayonlarini kuchaytirish mumkinligi ko'rsatildi. Polielektrolitni antigen bilan birgalikda qo'llash antitela ishlab chiqarishga olib keladi, bu antigenning o'zi kiritilgandan 3-5 baravar yuqori (11, 32, 46). Immunitet tizimining reaktsiyasining yakuniy natijasini stimulyatsiya qilish polimer tomonidan immunopoezning o'ziga xos bo'g'inlarini faollashtirish natijasidir. Misol uchun, polielektrolit in vivo ning kiritilishi ildiz gematopoetik hujayralarni suyak iligidan taloqqa (7) ko'chirishni sezilarli darajada faollashtiradi. Bundan tashqari, polimerlar (poliakrilik kislotalar, poli-4-vinilpiridin) ta'siri ostida gematopoetik koloniyalarning o'sish jarayoni (13) kuchayadi.

T-hujayralarning timusdan taloqqa, shuningdek, suyak iligidan limfoid organlarga B-hujayralarning ko'chishi kabi immunopoezning muhim aloqalari sichqon organizmiga polielektrolit kiritilgandan keyin ham kuchayadi (16). Ushbu migratsiya jarayonlari T- va B-hujayralarning bir xil to'qima ichidagi konvergentsiyasi uchun zaruriy shart bo'lib, bu hujayralar o'zaro ta'sir qilishiga imkon beradi.

Bundan tashqari, polielektrolitga ta'sir qilish antikor sintezini induksiya qilish paytida T- va B- hujayralari o'rtasidagi hamkorlik jarayonini kuchaytiradi (16). Bu umumiy gamma nurlanishi tufayli o'z limfotsitlaridan mahrum bo'lgan singenik organizmga T- va B-hujayralari kiritilganda namunaviy tajribalarda aniqlandi. Qizig'i shundaki, xuddi shu

tajribalarda polielektrolitlar T-limfotsitlar bo'lmagan taqdirda ham B - hujayra reaksiyasini rag'batlantirdi (21). Polielektrolitning B-limfotsitlarga bevosita faollashtiruvchi ta'siri haqida taxmin bor edi. Olingan ma'lumotlar antitelalarni induktsiya qilish paytida T-yordamchilarini polielektrolit bilan almashtirish imkoniyatining dalili sifatida qaraldi.

In vivo tajribalarda polimerlarning har qanday ta'siri faqat ma'lum shartlar bilan gematopoetik yoki limfoid hujayralarga to'g'ridan-to'g'ri faollashtiruvchi ta'sir sifatida talqin qilinishi mumkin, chunki garmonal, asab va boshqa tana tizimlari orqali ta'sir qilishni istisno qilish mumkin emas. Shuning uchun ham limfotsitlar va makrofaglar ustida polielektrolitlar to'g'ridan-to'g'ri faollashtiruvchi ta'sirining qat'iy isboti sifatida in vitro hujayra ekmalarida o'tkazilgan tajribalar tan olinishi mumkin. Polianionlar va polikationlar hujayra bo'linishining dastlabki bosqichlarining faollashuvini keltirib chiqarishi aniqlandi. Qolgan limfotsitlarda polimer ta'siri ostida RNK sintezi (G1 fazasi) va makrofaglar mavjudligida - DNK sintezi (S-faza) (4a) faollashdi. Limfotsitlarning poliionga proliferativ reaksiyasi hujayralarning mitogen lektinlarga bo'lgan javobidan sezilarli darajada farq qiladi (34). Ikkinchisi DNK sintezini 20-30 marta oshiradi va bir necha kun davom etadigan bir qator ketma-ket mitozlarni keltirib chiqaradi. Aksincha, poliion ta'sirida DNK sintezi 3-7 martadan ko'p bo'lmagan holda faollashadi. Agar hujayralar shunday bo'lsa, bo'linish sikli bitta bo'ladi. Aksincha, polimer bo'linish siklining faqat boshlang'ich fazalarini induktsiya qiladi, uning to'liq bajarilishi uchun sharoit yaratmaydi. Polielektrolitlarning mitogen signalining yetishmasligi sabablari, bu moddalar, lektinlardan farqli o'laroq, o'sish omillarining sekretsiasini qo'zg'atmaydi (3). Umuman olganda, polielektrolitlarni zaif mitogenlar deb tasniflash mumkin. Ko'rinib turibdiki, polielektrolitlarning B-hujayralarning Ig - sekretsion hujayralarga yetilish jarayoniga zaif poliklonal ta'siri, shuningdek, bir qator to'liq bo'linish va differentsiatsiya omillarining sekretsiasini keltirib chiqarish qobiliyatining yo'qligi bilan bog'liq (33, a). Shu bilan birga, poliionning limfotsitlarga ta'siri B-hujayralarning antigenga bog'liq

differentiallashtirish jarayonini, ularning o'ziga xos antitela ishlab chiqaruvchilarga aylanishini kuchli faollashtiradi. In vitro hujayra ekmalarida antitela sintezini qo'zg'atgandan so'ng, polielektrolit antitelalarni ajratuvchi hujayralar sonini 4-5 marta ko'paytiradi (23). In vivo, antigenlarni polielektrolitlar bilan birgalikda qo'llashda antitela ishlab chiqarish "sof" antigenlarga javob darajasidan 3-7 baravar yuqori bo'lishi mumkin (16).

Shuning uchun polielektrolit limfoid hujayralarga kuchli ta'sir qilib, kuchli yordamchi signalni va zaif mitogen signalni keltirib chiqaradi. Keyinchalik, limfoid hujayralarning polielektrolitlar tomonidan reaktsiyasini faollashtirish haqida gapirganda, biz limfotsitlarning antigenga bog'liq differentsiatsiyasining faollashishini va tinch limfotsitlarning hujayra bo'linish siklining boshlang'ich fazalariga chiqishini tushunamiz.

2. Polionlar tomonidan hujayra faollashuvining molekulyar mexanizmlarini o'rganish

R.I. Atullaxonov va boshqalar bir necha yillar davomida limfoid hujayralarning polionlar tomonidan faollashuvi vaqtidagi eng dastlabki molekulyar o'zgarishlarni o'rganmoqdalar. Dastlab, nazariy tahlil o'tkazilganda, bu birinchi navbatda hujayraning tashqi membranasidagi jarayonlarga e'tibor qaratish imkonini berdi. Bundan tashqari, mualliflar hujayraga ekzogen polielektrolitning ta'siri haqida signal uzatilishi mumkin bo'lgan bir nechta asosiy tizimlarni nomladilar. Tajriba shuni ko'rsatdiki, polielektrolit siklik nukleotidlar darajasini tartibga soluvchi membrana fermentlari tizimi kabi muhim signal mexanizmiga ta'sir qilmaydi (2). Polimer membrananing lipid matritsasi tizimida tez sezilarli o'zgarishlar kuzatilmadi. Bu membrana lipidlarining yopishqoqligi va membrananing lipid matritsasi yuzasi bo'yicha lyuminescent zondlardan foydalangan holda namoyish etildi. Limfotsitlar va makrofaglarni poliation bilan davolashdan keyingi dastlabki daqiqalarda hujayraning plazma membranasining morfologiyasida sezilarli o'zgarishlar aniqlandi (44). Hujayra yuzasi tekislandi: membrana protrusionlari, villi va tizmalari qisqartirildi. Shu bilan

birga, membrana matritsasining elementar "donasi" hujayra yuzasining muhim qismida sezilarli darajada kattalashgan. Hujayra membranasi molekulalari bilan ekzogen polimer molekulalarining ko'p sonli komplekslarini hosil qilish haqida taxmin paydo bo'ldi. Membran kriojarrohligi va parchalanish elektron mikroskopiyasi 5-50 yoki undan ortiq intramembran oqsil zarralaridan iborat membrana oqsillarining mikroagregatlarini aniqladi (5a). Membran oqsillarining to'planishi poliiion hujayralarga ta'siridan keyin birinchi daqiqalarda sodir bo'lgan. Shu bilan birga, hujayra membranasining o'tkazuvchanligi o'zgargan. Birinchidan, bu o'zgarish belgilangan nukleozid oqimlari, keyin esa Ca^{2+} va K^+ oqimlarida aniqlandi (4). Mualliflar, o'tkazuvchanlikning o'zgarishi membrana oqsillarini yig'ish va membrana konfiguratsiyasini yumshatish bilan bog'liq bo'lgan gipotezani taklif qildilar (44). Gipotezaga ko'ra, polielektrolit molekulalari membrana oqsillarining to'ldiruvchi zaryadlangan guruhlar bilan ko'plab elektrostatik komplekslarni hosil qiladi. Protein zarralarining polimer iplari bilan o'zaro "bog'lanishi" oqsil klasterlarining shakllanishiga olib keladi. Aslida, oqsil klasterlarida bo'shliqlar va teshiklar mavjud, buning natijasida membrananing o'tkazuvchanligi oshadi. Bundan tashqari, bo'shliqlar geterogenlar va selektiv emas, ular orqali ionlar, suv va nukleozidlarga bo'lgan kichik molekulalar o'tadi.

Hujayra hajmining biroz oshishi va membrana protrusionlarining tekislanishi o'tkazuvchanlikning o'zgarishi bilan bog'liq.

Hujayra membranasi xossalarida aniqlangan har qanday o'zgarishlar (oqsillarning to'planishi, membrananing yumshashi, membrana o'tkazuvchanligining o'zgarishi) hujayraning polimerga reaksiyasini qo'zg'atish uchun muhimmi yoki yo'qligini aniqlash muhim.

Biz tajribada aniqlangan o'zgarishlardan birining ahamiyatini, membrananing ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshirishni o'rganishimiz kerak edi. Shuning uchun, polielektrolitlar emas, balki lektinlar tomonidan bo'lsa ham, limfoid hujayralar javobini faollashtirishda ion transportining roli haqidagi adabiyotlardagi ma'lumotlarni batafsil ko'rib chiqish kerak.

3. Limfotsitlar faollashuvi mexanizmida membrana ionlarini tashishning ahamiyati

Eukaryotik hujayralarning tarkibi ko'plab ionlarning konsentratsiyasi bo'yicha hujayradan tashqari muhitdan sezilarli darajada farq qiladi. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} va H^+ ionlarining farqi hujayra hayoti uchun ayniqsa muhimdir. Hujayra membranasida maxsus ferment tizimlari ishlaydi, ular hujayralarning ionli o'ziga xosligini ma'lum darajada yaratish va saqlashni ta'minlaydi. Xususan, membrana fermentlari (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - tashuvchi ATFazalar tashqi hujayra membranasiga kirib, ushbu kationlarning konsentratsiya gradientlarini yaratishni ta'minlaydigan noyob tuzilmalardir. Bundan tashqari, bu fermentlar ionlarni konsentratsiya gradientiga qarama-qarshi yo'nalishda doimiy ravishda tashiydi va bir xil ionlarning suv bo'shliqlari va ion kanallari orqali konsentratsiya gradienti bo'ylab tarqalishini qoplaydi. Ikkinchisi, shuningdek, membrananing lipid ikki qavatiga birlashtirilgan oqsil tuzilmalari bilan ifodalanadi. Hujayraning hujayra atrofidagi muhitga nisbatan ionli o'ziga xosligi va hujayra bo'linmalari orasidagi ionlar tarkibidagi farqlar, birinchi navbatda, ko'plab fermentlar va shuning uchun hujayra ichidagi ko'plab metabolik tizimlarning faoliyati uchun juda muhimdir. Bundan tashqari, hujayradan tashqari atrof-muhitga nisbatan hujayraning ion geterogenligi evolyutsiyaning eng muhim yutug'idir, bu tashqi hujayra membranasining eng kichik zararini osongina va tezda "signal" qilish imkonini beradi

Biologiyaning turli sohalarida olib borilgan ko'plab tadqiqotlar hujayraning tashqi stimullarga reaksiyasini qo'zg'atishda ion "signalizatsiyasi" ning asosiy rolini isbotladi. Masalan, tuxum hujayrasi uchun membrananing spermatozoid tomonidan shikastlanganligi bo'linish bo'linmalarining faollashishi uchun signal bo'lib xizmat qilishi mumkin. Mushak hujayralari uchun qisqarish signali neyromediator (masalan, atsetilxolin yoki norepinefrin) tomonidan qo'zg'atilgan tashqi membrananing o'tkazuvchanligining o'zgarishidir. Sekretor hujayra uchun granulalar sekretsiyasini va sekretsianing yangi qismlarini ishlab chiqarishni keltirib chiqaradigan signal tashqi membrananing ionlarga,

xususan Ca^{2+} ga o'tkazuvchanligini oshirishi mumkin. Bu, odatda, sekretor hujayraning mos keladigan membrana retseptorlariga garmon, lizing omil yoki kinin tushishi tufayli yuzaga keladi.

Bundan ko'rinadiki, limfoid tizimining hujayralari ko'plab tashqi omillarga javob berishda bir xil signal tizimidan foydalanadi. Ushbu omillarning tabiati limfoid hujayraning retseptorlari apparatining o'ziga xosligi va xilma-xilligi bilan belgilanadi. Limfotsitlar reaksiyasining tabiati uning oldingi differentsiatsiya bosqichlarida sodir bo'lgan strukturaviy va funktsional moslashuvi bilan oldindan belgilanadi.

Hozirgi zamon adabiyotida limfoid hujayralarning tashqi signallarga javobini qo'zg'atish uchun ionlarni tashish muhimligini ko'rsatadigan juda ko'p ma'lumotlar to'plangan.

Limfoid hujayralarga mitogenlar va immunostimulyatorlar ta'sirida ionlarni tashish parametrlarining o'zgarishi.

a) Passiv ion oqimlari. Allwood va boshqalar [36] birinchilardan bo'lib FGA inson limfotsitlariga ta'sir qilganda hujayralarga Ca^{2+} kirishining ortishi borligini ko'rsatdi. Timus, taloq yoki periferik qondagi limfotsitlarga turli xil mitogenlar ta'sirida shunga o'xshash kuzatishlar boshqa ko'plab ishlarda tasvirlangan [19, 25, 33, 43, 55]. Ma'lum bo'lishicha, Ca^{2+} o'tkazuvchanligining oshishi hujayradagi mitogen ta'siridan keyin birinchi daqiqalarda sodir bo'ladi.

Mitogen ta'sirida Ca^{2+} kirishining oshishi muhitdagi Ca^{2+} kontsentratsiyasiga bog'liq. 0,1-3 mM oralig'ida hujayradan tashqari kaltsiy kontsentratsiyasining oshishi bilan Ca^{2+} kirishining ortishi kuzatiladi, keyin egri chiziq platoga yetadi [52, 57]. Ca^{2+} kirishi ham lektin kontsentratsiyasining oshishi bilan ortadi va bu o'sish lektin mitogen xususiyatga ega bo'lgan past kontsentratsiyalar bilan chegaralanib qolmaydi, balki lektin kontsentratsiyasining yanada oshishi bilan, uning toksik dozalarigacha davom etadi. Bunday natija bir qator ishlarda olingan bo'lib, ularda Ca^{2+} ning kiritilishi mitogenlar kontsentratsiyasidagi keng o'zgarishlari o'rganilgan [60, 43, 26, 17]. Ba'zi mualliflar [52, 59] Ca ni o'rganishda lektinning mitogen kontsentratsiyasi sohasida mahalliy

maksimal darajani kuzatdilar, ammo mitogen konsentratsiyasining yanada oshishi bilan Ca^{2+} kirishi yanada ortishi kuzatilgan [33, 37]. Shuni ta'kidlash kerakki, ba'zi mualliflar konkanovalin A va FGA lektinlarining mitogen konsentratsiyasidan foydalanganda passiv Ca^{2+} oqimlarida sezilarli o'zgarishlarni kuzatmaganlar [52, 42, 27]. Ushbu ishlarda optimal immunogen dozalardan oshib ketadigan konsentratsiyalardan foydalanganda Ca^{2+} kirishining sezilarli o'sishi qayd etilgan.

Kaltsiy o'tkazuvchanligining o'zgarishiga o'xshab, bir qator tadqiqotlar K^+ ning passiv tashilishining oshishini aniqlandi [38, 39, 60, 32]. K^+ ning passiv oqimi hujayradan ushbu kationning transmembran gradientiga muvofiq hujayradan tashqari muhitga yo'naltiriladi.

Mitogenlar ta'sirida Na^+ ning tashilishidagi o'zgarishlar kam o'rganilgan. Adabiyotlarda Na^+ oqimlarini hujayradan tashqari muhitda hujayrani (konsentratsiya gradienti bo'ylab) o'lchash bo'yicha to'g'ridan-to'g'ri natijalar yo'q. Bilvosita, Na^+ oqimining ko'payishini hujayralar ichidagi Na^+ konsentratsiyasining ma'lum bir ortishi va RB^+ izotopining ko'payishi bilan baholash mumkin [38, 39, 56].

b) K^+ , Na^+ , Ca^{2+} kationlarining faol tashilishi.

Ko'pgina mualliflar faollashtirilgan limfotsitlar membranasida (Na^+ , K^+)- va Ca^{2+} - ATFazalarning faolligi oshishini qayd etishgan [37, 60, 31].

Ba'zi ishlarda (Na^+ , K^+) - ATFazalarning faollashuvi konsentratsiya gradientiga nisbatan K^+ oqimining ortishi bilan baholangan. K^+ transportining ko'payishi sezilarli bo'lishi mumkin: K^+ ning limfotsitlarga kirish tezligi ba'zan ikki baravar ko'payadi [33, 45].

Mitogenlar ta'sirida limfotsitlar membranasidagi Ca^{2+} - ATFaza faolligining o'zgarishi masalasi haligacha yakuniy qarordan uzoqdir. Ba'zi tadqiqotlar kaltsiyning faolligi sezilarli darajada oshishini qayd etilgan [58]. Boshqa tadqiqotlarda, tegishli nazorat bilan solishtirganda faol Ca^{2+} tashilishida sezilarli o'zgarishlarni qayd etish mumkin emas edi. To'g'ri, shuni ta'kidlash kerakki, ko'pgina tadqiqotlarda Ca^{2+} - ATFaza faolligi hujayralarni yo'q qilgandan keyin olingan membrana preparatlarida o'lchangan. Shu bilan birga, ma'lumki, membrana yaxlitligi buzilishi Ca^{2+}

ning sitoplazmatik segmentlari yaqinida Ca^{2+} - ATFaza konsentratsiyasining tez ortishiga olib keladi, demak, bu fermentning maksimal mumkin bo'lgan darajaga tez faollashishiga olib keladi.

Ko'rinib turibdiki, ba'zi hollarda nazorat preparatlarida fermentning cheklovchi faollashuvi mitogen tomonidan qo'zg'atilgan hujayra membranalarida preparatlarida fermentning haqiqiy faollashuvini kuzatish mumkin. Shubhasiz, ion tashuvchi ATFazalarning faolligidagi nisbatan kichik fiziologik o'zgarishlarni baholash uchun, boshqa uslubiy yondashuvlar, yuqorida qayd etilgan tajribalarning aksariyatida amalga oshirilganidek, vayron qilingan hujayraning bo'laklarida emas, balki tirik, to'liq ishlaydigan hujayradagi faolligini o'lchash uchun kerak.

d) Hujayra ichidagi ionlarning konsentratsiyasi.

Limfotsitlarga mitogenlar ta'sirida, yuqorida aytib o'tilganidek, kationlar oqimi ularning konsentratsiyasining gradienti bo'ylab sezilarli darajada oshadi. Shu bilan birga, bir xil kationlarni teskari yo'nalishda sakrovchi transport ATFazalarning faolligi ortadi. Boshqacha qilib aytganda, sezilarli darajada faollashtirilgan qarshi transmembran oqimlari fonida K^+ , Na^+ , Ca^{2+} hujayra ichidagi bo'shliq konsentratsiyasiga qarab o'zgaradi.

Adabiyotlarda ushbu masala bo'yicha keskin qarama-qarshi eksperimental natijalarni topish mumkin. Ba'zi tadqiqotlar hujayra ichidagi Ca^{2+} konsentratsiyasining ortishi, boshqalarida esa kamayishi, boshqalarida Ca^{2+} ning hujayra ichidagi tarkibi o'zgarmaganligi aniqlangan.

Vaziyat mitogen tomonidan faollashtirilgan hujayralardagi K^+ tarkibidagi natijalar bilan bir xil.

Dastlabki tadqiqotlar [42, 33] K^+ ning hujayra ichidagi konsentratsiyasining oshishi haqida xabar beradi. Keyinchalik, aniqroq usullardan foydalangan holda [60, 34], K^+ ning konsentratsiyasi sezilarli darajada o'zgarmasligi yoki hatto biroz kamayishi kuzatilgan [38, 39, 42].

Immunostimulyatorning fiziologik faol dozasi membrana o'tkazuvchanligining yengil oshishiga, passiv kation oqimlarining biroz oshishiga olib keladi, bu deyarli bir zumda transport ATFazalarining

kompensatsion faollashuviga aylanadi. Bunday holda, faol ATFGa bog'liq ion transporti passiv oqimlarni qisman yoki to'liq qoplashi mumkin. Birinchi holda, sitozolda K^+ ning konsentratsiyasi pasayadi va Ca^{2+} konsentratsiyasi ortadi. Ikkinchi holda, ikkala kationning konsentratsiyasi - o'zgarishsiz qoladi. Kengaytirilgan faol oqimlar bir muncha vaqt passiv oqimlar qiymatidan oshib ketishi mumkin, bu esa mos ravishda K^+ konsentratsiyasining kichik va vaqtinchalik o'sishiga yoki hujayra ichidagi Ca^{2+} konsentratsiyasining pasayishiga olib keladi. Mualliflarning fikriga ko'ra, eng ko'p ehtimol, ikkita yaqinlashib kelayotgan oqimning intensivligidagi kichik tebranishlar bo'lib, ular hujayra ichidagi ionlar konsentratsiyasining boshlang'ich qiymatlari yaqinida nisbatan zaif tebranishlari bilan birga keladi. Ko'rinishidan, bunday jarayonlar turli eksperimentchilar tomonidan qarama-qarshi ma'lumotlarni olish uchun sabab bo'lishi mumkin.

Adabiyotlardagi ma'lumotlarda qayd etilgan qarama-qarshiliklarga qaramay, shuni ta'kidlash kerakki, limfotsitlar lektin bilan faollashgandan so'ng sitoplazmadagi Ca^{2+} darajasining kinetikasi haqidagi savol so'nggi yillardagi ishlarda sezilarli darajada aniqlangan [48, 54-59, 54, 52]. Aniqlanishicha, limfotsitlarni faollashtiruvchi ligandlar sitozolda Ca^{2+} konsentratsiyasining tezroq oshishiga, so'ngra Ca^{2+} darajasining asta-sekin pasayishiga olib keladi. Ma'lum bo'lishicha, dastlabki lahzada Ca^{2+} hujayra ichidagi muhitdan kelib chiqadi va keyin ta'sir hujayra ichidagi depolardan chiqarilgan Ca^{2+} ta'siri kuchayadi. Bundan tashqari, oxirgi ta'sir membrana fermenti fosfolipaza C ni faollashtirish va ikkinchi xabarchi - inozitoltrifosfat ishlab chiqarish orqali tartibga solinadi.

Limfoid hujayralarning mitogen reaksiyasi sezilarli darajada muhitdagi ionlarning konsentratsiyasiga va ion tashuvchi ATFaalarning funksional holatiga bog'liq.

Ko'pincha tadqiqotchilar limfotsitlarni faollashtirishda ion transportining asosiy roli uchun dalil sifatida ikki guruh faktlardan foydalanadilar. Birinchi guruh ma'lumotlar ozuqa muhitidan turli ionlarni olib tashlash bo'yicha tajribalar bilan ifodalanadi. Faktlarning ikkinchi

guruhiga ion tashuvchi ATFazalar ingibitorlari ishtirokida limfotsitlarning mitogen reaksiyasini o'rganish ishlarini o'z ichiga oladi.

Muhitda Na^+ konsentratsiyasining 30-35% ga pasayishi limfoid hujayralarning Kon A ga reaksiyasini sezilarli darajada boshqarishga olib keldi [43]. Aksincha, muhitda K^+ konsentratsiyasining 5-6 marta kamayishi (1 mM darajasiga) mitogenlarga limfotsitlarning reaksiyasiga deyarli ta'sir ko'rsatmaydi [61]. Muhitdan K^+ ning to'liq olib tashlanishi limfotsitlar proliferatsiyasini boshqarishga olib keldi.

Hujayradan tashqari Ca^{2+} limfotsitlarning mitogenga reaksiyasini rivojlantirish uchun zarurdir [49, 37]. Ba'zi bir tajribalarda hujayradan tashqari Ca^{2+} mitogen faollashganining 10-soatidan boshlab zarurligi haqida fikr bildirilgan. Dastlabki bosqichlarda faollashuv hujayradan tashqari muhitda Ca^{2+} ning mavjudligiga bog'liq emas [47, 21]. Ushbu ma'lumotlar hujayra faollashuvining dastlabki bosqichlarida sitoplazmaga chiqarilishi mumkin bo'lgan o'z Ca^{2+} zaxiralari (masalan, Ca^{2+} membrana bilan bog'langan bo'shliq, mitokondriyal Ca^{2+} va boshqalar) mavjudligi hujayra faollashuvining dastlabki bosqichlarida sitoplazmaga chiqarilishi mumkin. Ekmaning muhitdan biron bir komponentni chiqarib tashlash, xususan, atrof-muhitdan ionlarni olib tashlash, hujayraning tashqi ta'sirga reaksiyasini boshlash uchun ushbu ionlarning transmembran oqimlarining ahamiyati yoki ahamiyatsizligi uchun ishonchli dalil bo'lib xizmat qilishi mumkin. Atrof-muhitning muhim tarkibiy qismini olib tashlash hujayradagi metabolik jarayonlarni buzishi mumkin, bu uning fiziologik reaksiyasini taqiqlaydi va bu reaksiyaning boshlang'ich momentiga ta'sir qilmaydi.

Vaziyat limfoid hujayralar reaksiyasini qo'zg'atishda membrana ATFazalarining asosiy rolini "isbotlash" bilan o'xshashdir. Yuqorida ta'kidlab o'tilganidek, ionlarni membrana orqali tashiydigan ATFazalar hujayraning muhim organidir. ATFazalarning normal faoliyatisiz hujayraning to'liq hayotiy faolligi mumkin emas va bundan tashqari, tashqi ta'sirlarga javoban uning metabolizmini faollashtirish mumkin emas. Shuning uchun ko'plab tajribalar, bunda ion tashuvchi (masalan, (Na^+ , K^+) ning kuchayishi - ATFazaning ingibit) ATFazalarning ingibit

limfotsitlarning mitogenlarga bo'lgan javobining buzilishi bilan birga keladi; bizning fikrimizcha, limfotsitlar reaksiyasini qo'zg'atish mexanizmida (Na^+ , K^+) - ATPazaning asosiy rolini aniq ko'rsata olmaydi.

Limfotsitlarning funksional faolligiga ionoforlarning ta'siri

Limfotsitlarning fiziologik reaksiyasini qo'zg'atish mexanizmida K^+ , Na^+ , Ca^{2+} oqimlarining mumkin bo'lgan rolini tekshirish uchun bir qator ishlarda ushbu kationlarning membrana - ionoforlar orqali tarqalishini osonlashtiradigan moddalar ishlatilgan.

Valinomitsin, siklik depsipeptid, K^+ - yuqori ko'rsatkichli ionofor. Valinomitsinning in vitro ekmasiga qo'shilishi limfotsitlarning mitogenga proliferativ reaksiyasini sezilarli darajada ko'payishiga olib keldi. Xuddi shunday harakat boshqa K^+ - nigeritsin ionoforiga ega. H^+ ga Na^+ ni tashiydigan ionofor monensin ham limfotsitlar ko'payishiga sabab bo'lgan [42, 43].

Bu yerda shuni ta'kidlash kerakki, yuqorida sanab o'tilgan barcha tashuvchilar hujayra ichiga kirib, tegishli kationlarni hujayra ichidagi organellalar membranalari orqali tashiydilar. Xususan, valinomitsin mitoxondriyalarga ta'siri tufayli oksidlovchi fosforlanishni ajratadi. Shunday qilib, monovalent kationlarni tashuvchilarning hujayra ichidagi ta'siri hujayraning muhim metabolik tizimlarini to'sib qo'yishi mumkin, bu esa mitogenga ta'sirini susaytiradi. Shu bilan birga, hujayra reaksiyasining boshlanishida bir xil ionoforlarning tashqi hujayra membranasiga ta'sirining ahamiyatini baholash mumkin emas.

Ca^{2+} - ionofor A23187, Ca^{2+} ionlarini membrana orqali tashiydigan antibiotik [18], in vitro limfotsitlar tarkibida zaif mitogen ta'sirga ega. A23187 ionoforining mitogenligi hujayra faollashuvida Ca^{2+} kirishining funksional rolining asosiy dalillaridan biri sifatida ko'rib chiqildi; shuning uchun bir qator ishlar A23187 va mitogen lektinlar keltirib chiqaradigan Ca^{2+} transportidagi o'zgarishlarni taqqoslashga qaratilgan [52, 48, 57, 60]. Ca^{2+} , ionofor, ionomitsin mitogen xususiyatga ega ekanligi haqida xabar ham bor [16]. Uchinchi o'rganilgan Ca^{2+} ionofor X537A hujayralarga mitogen ta'sir ko'rsatadi [40].

Boshqa mitogenlar singari, A23187 ionofori limfotsitlarning hujayra membranasi bilan o'zaro ta'sir qiladi va oxir-oqibat DNK sintezi va hujayra bo'linishiga olib keladi. Ba'zi xususiyatlarga ko'ra, A23187 ionofori lektinlardan farq qiladi. Bu DNK sintezini FGA va Kon A [54] ga qaraganda kamroq darajada kuchaytiradi, lekin RNK va oqsil sintezini boshqa mitogenlar bilan bir xil darajada rag'batlantiradi [32]. Ionofor A23187 shuningdek, hujayra bo'linishining boshlanishiga xos bo'lgan erta biokimyoviy o'zgarishlarni keltirib chiqaradi: fosfoinositidlar almashinuvining kuchayishi, glyukoza va aminokislotalarning hujayraga kirishi [50]. Bundan tashqari, aktivlashtirishning dastlabki soatlarida mitogen nima bo'lishidan qat'iy nazar: Kon A yoki ionofor A23187. Qisqa vaqt ichida Kon A ni ionofor bilan almashtirish - mitogenezning dastlabki 3 soati (keyinchalik ionofordan hujayralarni yuvish va Kon A ni kiritish bilan) - DNK sintezi intensivligini kamaytirmaydi. Agar mitogenez boshlanganidan 15 soat o'tgach Con A ionofor bilan almashtirilsa, u holda DNK sintezining intensivligi pasayadi [37]. Boshqa ionoforlar bilan solishtirganda, A23187 muhitda Ca^{2+} konsentratsiyasiga va hujayradan tashqari kaltsiyning past konsentratsiyasida (10^{-4} M) mitogen xususiyatlarini yo'qotadi [43].

Umuman olganda, taqdim etilgan adabiyotlardagi ma'lumotlar mitogen ligandga limfoid hujayralarning javobini tartibga solish mexanizmlaridan biri sifatida ion transportining shubhasiz muhimligini ko'rsatadi. Ko'rib chiqishda tasvirlangan ma'lumotlar bilan birga polielektrolitlarning siklaz tizimiga va hujayra membranasi lipid matritsasiga ta'siri yo'qligi va R.V.Petrov va boshqalarning kashf qilinishi bilan bog'liq, limfotsitlar poliiionlar tomonidan faollashganda hujayra membranasi o'tkazuvchanligining o'zgarishi, limfotsitlarning nafaqat in vitro reaksiyasini, balki immun reaksiyasini faollashtirish uchun ion tashish modifikatsiyasining ahamiyatini o'rganish kerak edi. Buni faqat adabiy ma'lumotlar asosida amalga oshirish mumkin emas edi. Birinchidan, poliiionlar tomonidan hujayralarni faollashtirish mexanizmlari o'rganilmagan bo'lib qolmoqda. Ikkinchidan, ionoforlarning in vitro ta'siri

haqidagi ma'lumotlar bir-biriga zid edi. Tashqi hujayra membranasi darajasida ion o'tkazuvchanligini induktsiya qilish in vivo polianion kiritilganda immunitetning stimulyatsiyasini aniqlay olishini tekshirish kerak edi. Shu maqsadda biz eksperimental ishlarni boshladik, unda polianionlarning ionoforga o'xshash ta'siri ularning mitogen ta'siri bilan solishtirildi va turli tuzilishga ega bo'lgan membrana faol birikmalarning immunoadyuvant xususiyatlari o'rganildi.

II BOB. MATERIALLAR VA TADQIQOT USULLARI

1. Antigenler. In vivo antitela genezasini induktsion modeli

Maxsus antikorlarning birlamchi yoki ikkilamchi sintezini induktsiya qilish uchun immunogen sifatida donor qo'yning periferik qonidan olingan geterologik eritrotsitlar, shuningdek, Salmonellalarning o'ldirilgan mikroob hujayralari (*S. typhimurium*, 415 shtammi) ishlatilgan. Qo'llashdan oldin geparinlangan qon eritrotsitlari kamida uch marta tozalash orqali Hanksning muvozanatli tuzi eritmasining 20 barobar hajmida (NaHCO_3 , pH 7,2) 1500 rpm tezlikda 10 daqiqa davomida yuviladi.

Emlash paytida eksperimental sichqonlarga formaldegid bilan o'ldirilgan salmonellalar suspenziyasi I dan 100 mkg gacha (quruq mikroob cho'kindisi bo'yicha) yoki 10^6 dan 5×10^8 gacha dozalarda qo'y eritrotsitozi (BE) suspenziyasi qorin bo'shlig'iga yuborildi. Suspenziyalar Hanks eritmasi yordamida tayyorlangan. Har bir sichqonchaga 0,5 ml dan ko'p bo'lmagan hujayra suspenziyasi qilingan.

Bir qator eksperimentlarda sichqonlar kuydirgi qo'zg'atuvchisidan suvda eriydigan P90 protein antigeni bilan emlangan. Stavropol ilmiy-tadqiqot institutining diagnostikumidan xromatografik jihatdan bir hil p90 antigeni ishlatilgan. P90 antigeni fiziologik NaCl eritmasida eritildi va sichqonlarga 3 mkg (sichqoncha) dozasi qorin bo'shlig'iga yuborildi. Xuddi shu p90 dozasi bilan qayta emlash 1 oydan keyin yana amalga oshirildi. Birlamchi va ikkilamchi immunitet reaksiyalari paytida eksperimental sichqonlarda har hafta orbital venoz sinusdan qon to'plangan. Xuddi shu eksperimental guruhdagi 5-7 sichqondan olingan qon zardob olish uchun birlashtirilib, 3 ta bir xil mikroprobirkaga quyilib, -20°C da muzlatilgan. Birlamchi emlashdan 7, 14, 21, 28 kun o'tgach, bir vaqtning o'zida ikkilamchi emlashdan keyin olingan zardoblar to'plangan. Tajriba oxirida barcha to'plangan zardoblarda bir vaqtning o'zida P90 antitela darajasi sinovdan o'tkazildi.

Immunitet reaksiyasini ro'yxatdan o'tkazish

Sichqonlar qo'y eritrotsitlari bilan immunizatsiya qilinganidan 4-5 kun o'tgach, immunli sichqonlarning taloqlarida antitela shaklidagi hujayralar (AShH) tarkibi va 7-8 kundan keyin qon zardobida BE ga xos antitelalar darajasi aniqlangan.

Taloq hujayralarining suspenziyalari shisha gomogenizator yordamida tayyorlangan. Har bir taloq 10 ml Hanks eritmasida gomogenlashtirildi, keyin suspenziya 4 qatlamli neylon filtr orqali filtrlanadi. Usulga ko'ra, 20-200 mkl taloq hujayra suspenziyasi 48 ° C gacha qizdirilgan 2,5 ml 0,65% agaroz eritmasi bilan aralashtiriladi. 20% li BE suspenziyasi oldindan agaroz eritmasiga 1 ml agaroz uchun 27 mkl miqdorida qo'shildi. Taloq va EB hujayralarini o'z ichiga olgan agaroz eritmasi sekin aralashtiriladi va gorizontal tekislikka joylashtirilgan Petri idishlariga (diametri 100 mm) quyiladi. Gel o'rnatilgandan so'ng, idishlar 1,5 soat davomida 37°C da inkubatsiya qilindi va keyin suyultirilgan (1:10) gvineya cho'chqa zardobi qo'shimcha manba sifatida qo'llaniladi. Yana 1 soat davomida 37°C da inkubatsiya qilinadi, shundan so'ng idishlar tahlil qilinadi yoki 4% li formaldegid eritmasi bilan mahkamlanadi va hisoblangunga qadar saqlanadi. Konvergent nurda gemoliz zonalari hisoblab chiqilgan, bu esa gemolitik IgM - antitelalarini chiqaradigan AShH sonini aniqlashga imkon berdi, bu esa BE sirtining antigenlarida o'ziga xos adsorbsiyalanganini ko'rsatadi. IgG antitelalarini aniqlash uchun komplementni qo'llashdan oldin idishlarga sichqonlarning immunoglobulinlariga xos bo'lgan quyon antizardobi qo'shildi. Anti-Ig zardobi (suyultirish 1:60) mavjud bo'lganda, idishlar 30 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi, shundan so'ng ular Hanks eritmasi bilan ehtiyotkorlik bilan yuvilib, to'ldiruvchi sifatida qo'llaniladi.

Salmonella antigenlariga antitelalarni chiqaradigan hujayralarni ro'yxatga olish uchun yuqorida tavsiflangan geldagi gemoliz usuli qo'llanilgan. Ammo bu holda, BE lar agarozga kiritilgan, ular ilgari xuddi shu salmonelladan O - antigen bilan sensibilizatsiya qilingan ("qoplangan"). Eritrositlarni O - antigen bilan sensibilizatsiya qilish V.V. Solovyov va hammualliflar usuli bo'yicha amalga oshirilgan. O - antigen avval suvli

eritmada (5 mg / ml) 100° C da 2 soat davomida "faollashtiriladi". Keyin magnitli aralashtirgich bilan doimo aralashtirib, BE suspenziyasiga "faollashtirilgan" 0 - antigen qo'shiladi. BE yuzasida 0-antigenning adsorbsiyasidan so'ng, ikkinchisi Hanks eritmasining 20 barobar hajmida sentrifugalash yo'li bilan bog'lanmagan antigenni olib tashlash uchun bir necha marta yuviladi.

Sichqonlarni p90 protein antigeni (kuydirgi qo'zg'atuvchisi) bilan immunizatsiya qilingandan so'ng, immunli reaksiyaning intensivligi qon zardobida p90-ga xos antitelalarning to'planishi bilan baholandi. Buning uchun qattiq fazali immunoferment analiz qilindi (IFA). Immunologiya instituti xodimi A.I. Pereverzev tomonidan p90 antigeni bilan IFA uchun maqbul sharoitlar tanlangan.

IFA ishlab chiqarishda biz bosqichma-bosqich quyidagi operatsiyalarni amalga oshirdik. 0,1 M karbonat-bikarbonat tamponidagi 100 mkl p90 eritmasi pH 9,6 (p90 ning yakuniy konsentratsiyasi 3 mkg/ml) maxsus 96 teshikli Linbro panellari teshigiga qo'shildi (Flow Lab., Buyuk Britaniya). Antigenli panellar kechasi 4°C da qoldirildi. Keyin panellarning teshiklari maxsus tozalash eritmasi bilan uch marta yuvildi (0,15 M NaCl eritmasi, 0,01 m fosfat tampon pH 7,2-7,4 bilan 0,05% Twin-20 bilan tamponlangan). Panellar Titertek Microplate Washer 120 mashinasi (Flow Lab., Buyuk Britaniya) yordamida yuvildi.

Plastik bilan bog'lanmagan antigenni yuvib bo'lgach, panellarning teshigiga 150 mkl fosfat tamponi bilan tamponlangan fiziologik NaCl eritmasidagi qoramol zardobi albuminining 1% eritmasiga qo'shiladi. Panellar 1 soat davomida 37° C da inkubatsiya qilinib, keyin uch marta yuviladi.

Tahlil qilingan zardobning ketma-ket suyultirilishi, 1:20 dan 2 bosqichli boshlang'ich suyultirishdan boshlab, antigen bilan oldindan ishlov berilgan panellar teshigiga quyiladi. Zardoblar inkubatsiya eritmasida suyultirildi (0,15 M NaCl, 0,01 M fosfat buferi pH 7,2-7,4, 0,1% tvit - 20). Zardobni suyultirish uchun, shuningdek, Mikropanel teshiklariga biron bir eritmani kiritish uchun Titertek Autodrop avtomatik dozator ishlatilgan

(Flow Lab., Buyuk Britaniya). Zardoblar suyultirilgandan so'ng, panellar 37° C da 1 soat davomida inkubatsiya qilinadi.

Inkubatsiya oxirida panellar uch marta yuvildi va teshiklarga 100 mkl quyon antitelalarining (sichqon IgM ga xos bo'lgan sichqon immunoglobulinlari yoki quyon antitelalarining γ – zanjirlari (Miles Scientific, AQSh)) eritmasi quyildi. Birlamchi antitelalar inkubatsiya eritmasida 1:500 yakuniy suyultirilganda qo'shiladi. Panellar 37° C da 1 soat davomida inkubatsiya qilindi, uch marta yuvildi, shundan so'ng 100 mkl substrat eritmasi - 0,6 mg / ml ortofenilendiamin digidroxlorid (Sigma, AQSh) 0,1 M sitrat-fosfat tamponida pH 5,0 bilan 0,015% vodorod perikss qo'shildi. Panellar qorong'i joyda 10 daqiqa davomida inkubatsiya qilindi. Panelning teshigiga 50 mkl 2 M sulfat kislota qo'shib reaksiya to'xtatildi. Mikropanellar teshiklaridagi eritmalarning absorbsiyasi maxsus Titertek Multiscan MCC fotometri (Flow Lab., Buyuk Britaniya) yordamida 492 nm to'lqin uzunligida o'lchandi. IFA natijalari IBM kompyuterida Immunologiya instituti xodimi A.I. Pereverzev tomonidan yozilgan maxsus dastur yordamida tahlil qilindi. Ushbu dastur qon zardobidagi o'ziga xos antitelalarning titrlarini va ularni $P = 0,05$ da aniqlash uchun ishonchli oraliqlarini hisoblash imkonini berdi.

2. In vitro sharoitda limfoid hujayralarni yetishtirish

Yechimini topishi kerak bo'lgan vazifalarga qarab, biz limfoid hujayralarni bir necha soat davomida qisqa muddatli in vitro inkubatsiyadan ham, ularni bir necha kun davomida uzoq muddatli yetishtirishdan ham foydalanib ko'rdik.

Sichqonlar uchun limfoid hujayralarining suspenziyasi an'anaviy usullar bo'yicha tayyorlangan. Sichqonlar umurtqa pog'onasining servikal dislokatsiyasi tufayli o'ldirilgan. Aseptik sharoitda taloq va limfa tugunlari olib tashlangan. Suspenziya shisha gomogenizator yordamida tayyorlangan. Hujayralar 10-20 mM bilan tamponlangan Hanks eritmasi (NaHCO₃ holda, pH 7,2) bilan 1-2 marta yuvilgan. Eritrositlarni olib tashlash uchun osmotik shok usulidan foydalanilgan. Bu usuldan so'ng, limfotsit suspenziyasi steril

paxta momig'i qatlami orqali filtrlanadi va qo'shimcha ravishda Xanksning buferlangan eritmasining 20 barobar hajmida sentrifugalash orqali yuviladi. Hujayra hayotiyligi 0,1% tripanli ko'k mavjudligida mikroskop bilan baholandi.

Qisqa muddatli inkubatsiya Xanksning tamponlangan eritmasida, 1% embrion buzoq zardobi (ETS) va 50 ED gentamitsin bilan to'ldirilgan yoki 2 mM-glutamin, 5×10^{-5} merkaptotanol, 1% ETS va 50 u gentamitsin va 20 mM HEPES bufer bilan to'ldirilgan RPMI-1640 muhitida amalga oshirildi.

3 kun davomida limfoid hujayralarni yetishtirish RPMI-1640 muhitida bir xil qo'shimchalar bilan amalga oshirildi, ammo atrof muhitda 5% ETS mavjud edi. Ekmalar maxsus inkubatorida havodagi 5% li CO₂ atmosferasida saqlanadi.

Ba'zi tajribalarda limfotsitlar suspenziyasini T-hujayralari bilan boyitilgan va B-limfotsitlari bilan boyitilgan ikkita fraktsiyaga ajratishdi. Ajratish maxsus tayyorlangan neylon paxta yordamida M. Julius hammualliflari usuli bilan amalga oshirildi. Paxta Leuco-Rusk Leuskosyte Filter (AQSh) kuniga bir necha marta suvni almashtirib, distillangan suvda ikki kun qaynatildi. Keyin paxta quritilgan va tortilgan. Plastik ustun (balandligi 140 mm, ko'ngdalang diametri 22 mm) 3 g quruq neylon jun bilan zich to'ldirilgan. Ustun oz miqdorda o'rta 199 bilan yuvilgan, 5% ETS bilan to'ldiriladi, 30 daqiqa davomida 37° C da termostatga joylashtiriladi. Keyin vertikal ravishda o'rnatilgan ustunning yuqori qismiga 1 ml ichida 50×10^6 tirik hujayrani o'z ichiga olgan limfotsitlarning 2 ml suspenziyasi kiritildi. Yana bir 5 ml vosita quyildi va 37°C da termostatga joylashtirildi. 45-50 daqiqadan so'ng, ustun 37° C gacha qizdirilgan 80 ml muhit bilan ehtiyotkorlik bilan yuviladi. Elyuat to'plangan (birinchi qism). Neylon junni mexanik siqishning bir necha tsiklidan so'ng, ustun ETSni o'z ichiga olmagan vosita bilan yana yuviladi. Elyuatning ikkinchi qismi ham to'plangan. Elyuatning ikkala qismida tirik hujayralar mavjud edi. Birinchi fraksiya paxtaga yopishmaydigan hujayralar, ikkinchi fraksiya neylon junga yopishgan hujayralardir. Ushbu bo'linish natijasida olingan hujayralar ilgari tavsiflangan. Yopishmagan hujayralar fraktsiyasi yetuk T-chegaralarga boy

va deyarli B-hujayralari yo'qligi ko'rsatilgan. Aksincha, paxta yopishtiruvchi hujayralar fraksiyasi asosan B-limfotsitlarni o'z ichiga oladi va neylon yopishtiruvchi T-hujayralarning kichik aralashmasiga ega.

Bizning ishimizda ajratish sifatini nazorat qilish uchun biz sitotoksik testdagi fraksiyalarni Thy I, 2-antigenga qarshi va komplement mavjudligida immun zardoblari bilan tavsifladik. Yopishmagan fraksiyada 93-95% Thy I, 2-musbat hujayralar va 1-2% Ig yuzasiga ega hujayralar mavjud. Yopishqoq fraksiyada 6-7% Thy I, 2-musbat va 80-84% Ig-musbat hujayralar mavjud.

Har qanday immunostimulyatorni in vitro qo'shganda limfotsitlarning faollashishini aniqlash uchun biz ta'sir qilishdan keyingi dastlabki 48-72 soat ichida DNK sintezining intensivligini o'rgandik. Inkubatsiyaning ikkinchi kunida ekmalarga 1 mkKyuri ga 1 ml konsentratsiyada ^3H yorliqli timidin qo'shildi. 24 soatdan keyin suspenziyalar Sinpore No_2 filtrlari orqali filtrlanadi. Filtrga joylangan hujayralar Xenks eritmasi bilan yuvilib, 0,5% li trixloroatsetik kislota bilan parchalanadi. Kislota erimaydigan cho'kma 96° etanol bilan yuvilgan. Quritgandan so'ng, radioaktiv moddalar bilan filtrlar sintillyatsion suyuqlikka solinadi. Filtrlarning radioaktivlik darajasi suyuqlik sintillyatsion β - hisoblagichda aniqlandi.

3. Polimerlar

Ishda polianionlar ishlatilgan - poliakril kislota (PAK, molekulyar og'irligi taxminan 100 kilodalton) va dekstran sulfat (SD, molekulyar og'irligi 500 kilodaltondan ortiq). PAK immunologiya instituti xodimi T.V. Abramenko tomonidan sintez qilingan. SD - bu Pharmacy (Shvetsiya) tomonidan ishlab chiqarilgan tijorat dori.

Odatda, polimer eritmalari tajribadan bir kun oldin tayyorlanadi. To'liqroq eritish uchun yangi tayyorlangan eritma bir necha daqiqa davomida faol ravishda aralashtiriladi, so'ngra termostatda 37° C da 1 soat davomida qoldiriladi. Yana yaxshilab aralashtiriladi va diametri 0,22 mkm bo'lgan "Millipore" (AQSh) filtrlari orqali filtrlanadi. Tayyorlangan steril polimer eritmalari muzlatgichda 4°C da saqlanadi. Ishlatishdan oldin

polimer eritmalari bir necha soat davomida xona haroratida qoldiriladi va yaxshilab aralashtiriladi. Polimerlar Xanksning buferli eritmasida belgilanganidan 10-100 baravar yuqori konsentratsiyada eritildi. Bu hujayra ekmasiga polimerni o'z ichiga olgan eritmaning kichik hajmini qo'shish imkonini berdi. Qoida tariqasida shuni aytish mumkinki, mo'ljallangan yakuniy konsentratsiyani yaratish uchun 1 ml ekmaga 10-100 μ l poliiion matritsasi eritmasi kiritiladi.

4. Membrana faol effektorlar

Ishda quyidagi membranaviy faol moddalar qo'llaniladi. Gramitsidin S 2%li mahalliy ishlab chiqarishning spirtli eritmasi, farmakopeya preparati. Levorin, natriy tuzi mahalliy ishlab chiqarishning farmakopeya preparatidir. Nistatin - bu polienli antibiotik, mahalliy dori. Gramitsidin A – “Sigma” (AQSh) tomonidan ishlab chiqarilgan pentadekapeptidli antibiotikdir. Saponin – “Calbiochem” (AQSh) tomonidan ishlab chiqarilgan membrana faol moddasidir.

Membran faol moddalar eritmalari ishlatishdan oldin tayyorlangan.

5. Hujayra membranasining ionlarga o'tkazuvchanligini o'lchash

Limfotsitlar plazma membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligi hujayradan tashqari muhitda K^+ , sitoplazmada Ca^{2+} konsentratsiyasining o'zgarishi bilan aniqlanadi.

Ca^{2+} uchun hujayra membranasining o'tkazuvchanligini o'lchash radio indikator usuli bilan amalga oshiriladi. Buning uchun ^{45}Ca izotopi ishlatilgan. Tajribalar limfotsitlar suspenziyasi (1 ml da 5 - 10 x 10⁶) bilan o'tkaziladi. Hujayralar 20 mM HEPES buferi, 2 mM glutamin, 50 U/ml penitsillin va streptomitsin aralashmasi va 5% embrion buzoq zardobi bilan to'ldirilgan RPMI-1640 muhitiga joylashtiriladi. Tuz $^{45}CaCl$ hujayra suspenziyasiga 1 ml uchun 0,1 mkKyuri yakuniy konsentratsiyasiga qo'shildi. ^{45}Ca borligida 1 soat inkubatsiyadan so'ng, suspenzialardan 200-1000 μ l namunalar olindi. Namunalar tarkibidagi hujayralar hujayradan tashqari izotopdan katta hajmdagi 199 muhitida 2-3 marta sentrafugalash

orqali yuviladi. Keyin zich hujayra pelleti hujayralarni yo'q qilish va hujayra ichidagi tarkibni olish uchun 300 mkl 5% perxlorik kislota bilan lizing qilinadi. Ekstraksiya 1-2 daqiqa davomida namunalarni doimo silkitib, amalga oshiriladi. Olingan ekstraktlar 10 minut davomida 100 aylanish tezligida sentrafuga qilindi. Keyin perxlorik kislota zararsizlantirish uchun 200 μ l ekstraktga 5-10 μ l to'yingan K_2CO_3 eritmasi qo'shildi. Ekstraktlar kaliy perxloritning erimaydigan "bo'laklarini" joylashtirish uchun bir necha daqiqaga qoldirildi. Ekstraktlarning yengil qismi "Intertechnique SL - 40" β - spektrometridagi radioaktivlikni o'lchash uchun tanlangan. Bunday holda, dioksan sintilatori ishlatilgan (900 ml dioksan; 4 g PPO; 0,2 g POPOP; 60 g naftalin). Ekstrakt namunalari sintillyatsion suyuqlik bilan 1/50 nisbatda aralashtiriladi.

Mitogen polianion bilan faollashtirilgan ekmalardan olingan ekstraktlarning radioaktivligi boshqariladigan faollashtirilmagan limfotsitlardan olingan ekstraktlarning radioaktivligi bilan solishtirildi. Bu polianionning ^{45}Ca ning ekma muhitdan hujayralarga kirishiga ta'sirini baholash imkonini berdi.

K^+ uchun hujayra membranalarning o'tkazuvchanligini o'lchash

Limfotsitlarning suspenziyalari buferlangan Xanks eritmasi yordamida tayyorlangan. Buning uchun Xanks ($NaHCO_3$) eritmasi 20 mM HEPES tampon va 50 ED penitsillin - natriy bilan to'ldirildi. Tajribalarda 1 ml Xanks bufer eritmasida $3-5 \times 10^7$ tirik hujayrani o'z ichiga olgan sichqon taloq limfotsitlarining suspenziyalari ishlatilgan. Hujayralar ftoroplastdan tayyorlangan maxsus termostatli ($37^\circ C$) hujayra ichiga kiritildi. Hujayraga K^+ ionlariga selektiv sezgirlikka ega valinomitsin elektrodi, shuningdek, o'lchash yacheykasini EVL-1MZ mos yozuvlar elektrodi bilan bog'lovchi qo'sh elektr ko'prigi o'rnatildi [4]. Kaliy konsentratsiyasi 10^{-4} dan 1 M gacha bo'lgan diapazonda valinomisin elektrodining xarakteristikasining keskinligi K^+ konsentratsiyasi tartibida 60 mV ni tashkil etdi. K^+ / Na^+ ning selektivligi kamida 104. Biz foydalanadigan qurilma K^+ konsentratsiyasini hujayradan tashqari muhitda H-339 yozuvida doimiy ravishda qayd etishga imkon berdi. Hujayra membranasini o'tkazuvchanligining har qanday ortishi

K^+ ning sitoplazmadan hujayradan tashqari muhitga oqib chiqishiga va oziq muhitida K^+ darajasining oshishiga olib kelishi kerak edi.

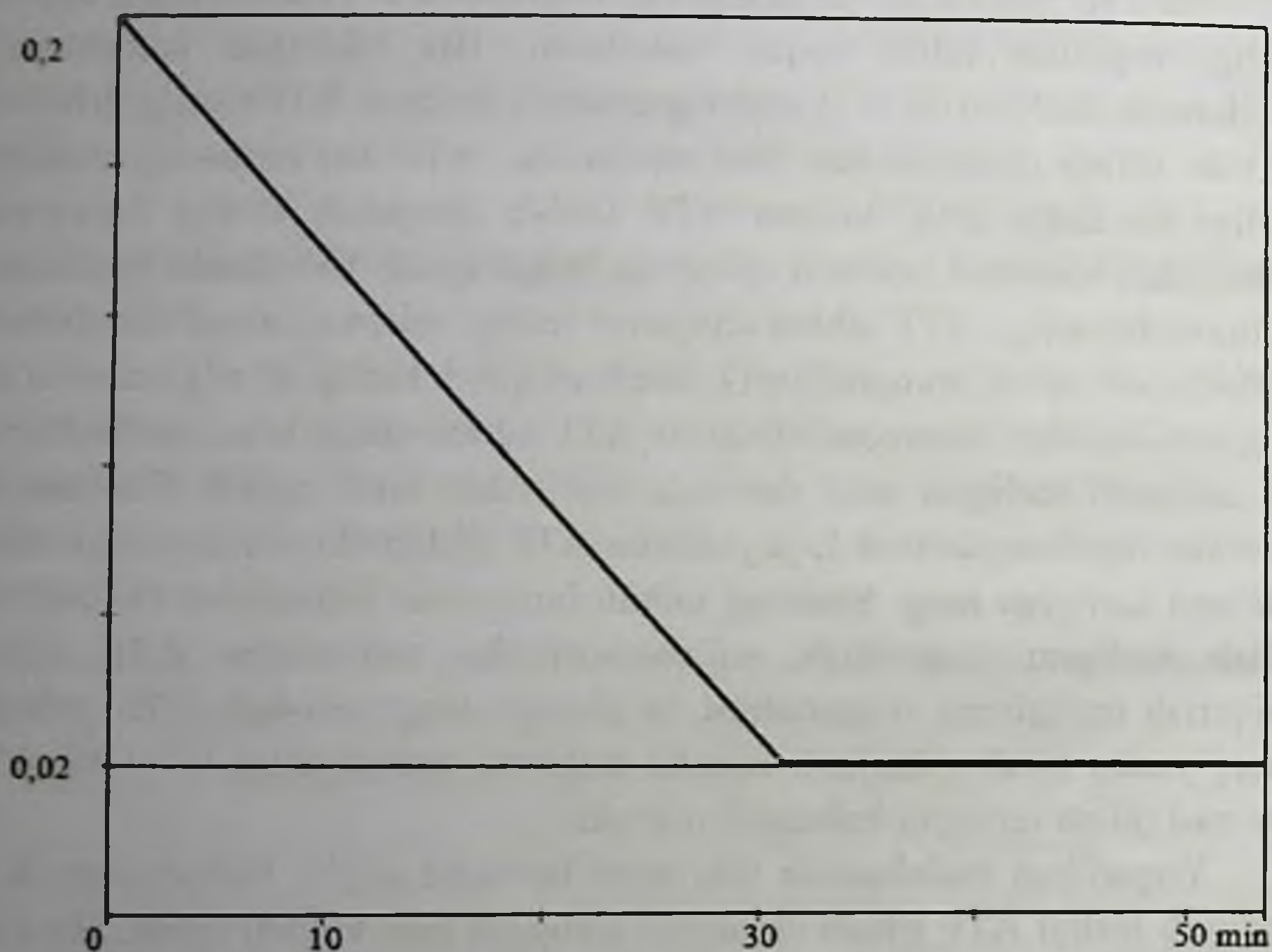
6. Plazma membranasining (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATFazalari vositasida ionlarning faol tashilishini o'rganish

Na^+ , K^+ yoki Ca^{2+} ni tashuvchi membrana ATFazalarining ishlash tezligi ingibitor tahlil orqali baholandi. Biz ishlatgan usuldan [1] foydalanib, ma'lum bir ATFazaning umumiy hujayra ATFazadagi ulushini taxmin qilish mumkin edi. O'z navbatida, ATF iste'molining umumiy tezligi va unga teng bo'lgan ATF ishlab chiqarish tezligi hujayralar tomonidan kislorod iste'mol qilish tezligiga qarab baholandi. Ma'lumki, mitoxondriyadagi ATF ishlab chiqarish tezligi mitoxondriyal oksidlovchi fosforlanish tizimi tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligiga to'g'ridan-to'g'ri proporsionaldir. Mitoxondriyalarda ATF ishlab chiqarishni faollashtirish O_2 iste'moli tezligini teng ravishda oshirishni talab qiladi. Funktsional jihatdan tugallangan tirik hujayralarda ATF ishlab chiqarish tezligi uning iste'mol tezligiga teng. Shuning uchun hujayralar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligini o'zgartirib, mitoxondriyalardan ATF ishlab chiqarish tezligining o'zgarishini va shunga teng ravishda ATF gidroliz energiyasini talab qiladigan barcha hujayra reaksiyalari bo'yicha ATF iste'mol qilish tezligini baholash mumkin.

Yuqoridagi mulohazalar ikki shart bo'yicha to'g'ri. Birinchidan, ATF iste'moli tezligi ATF ishlab chiqarish tezligiga mos kelishi kerak. Bu shart bizning tajribalarimizda to'liq bajarildi. Limfotsitlar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligini o'lchashning butun davri davomida o'rganilayotgan hujayralardagi ATF darajasi o'zgarmadi [1]. Ikkinchi shart - hujayralar tomonidan O_2 ning yalpi iste'moli va mitoxondriyalarda oksidlovchi fosforlanish ehtiyojlari uchun bir xil hujayralardagi O_2 dan foydalanish o'rtasidagi nisbat. Haqiqat shundaki, ba'zi hujayralarda O_2 ning muhim qismi peroksidlanish jarayonlarini yoki boshqa mitoxondrial bo'lmagan reaksiyalarni ta'minlash uchun iste'mol qilinishi mumkin. Masalan, bunday hujayralar fagotsitlar, gepatotsitlardir. Ammo bizning tajribalarimizdagi

limfoid hujayralar iste'mol qilingan O_2 ning 99% dan ortig'ini mitoxondriyadagi oksidlovchi fosforlanish ehtiyojlari uchun sarflagan. Natriy sianidi yordamida mitoxondriyalarning "nafas olishini" o'chirish O_2 iste'mol qilish tezligini deyarli nolga tushirishga olib keldi.

$[O_2]$ mM



1-rasm. Muhrlangan polarografik hujayraga joylashtirilgan sichqonning taloq hujayralari tomonidan O_2 qabul qilinishi. 0 vaqt nuqtasi muhrlangan polyarograf hujayrasida hujayralarni inkubatsiya qilish boshlanishiga to'g'ri keladi. 0,2 mM ga teng O_2 darajasi 37°C haroratda 0 vaqtda muhitda inkubatsiya O_2 ning boshlang'ich tarkibiga to'g'ri keladi. O_2 darajasi 0,02 mM ga teng (ingichka gorizontaal chiziq bilan belgilangan) - hujayraning ma'lum darajada muhrlanishida ma'lum bir polyarografik hujayraga joylashtirilgan inkubatsiya muhitida mumkin bo'lgan minimal kislorod kontsentratsiyasi.

Biz O_2 limfotsitlarini iste'mol qilish tezligini polarografik usulda, platina O_2 - elektrod o'rnatilgan maxsus germetik hujayrada o'lchadik. $700 - 2 \times 3$ sichqonni taloq limfotsitlari (10^7 ml ozuqa vositasi uchun) o'z ichiga olgan 1 ml suspenziya hujayraga joylashtirildi. Shuni ta'kidlash kerakki, platina elektrodida O_2 ning kamayishi tufayli, hujayra muhrlanganda, O_2 platina elektrodning o'zi tomonidan so'riladi. Shunga qaramay, elektrodning ta'siri o'lchangan va har bir tahlilda hisobga olingan. Buning uchun hujayra suspenziyasi tomonidan O_2 ni qabul qilish tezligini o'rganishdan oldin, biz O_2 ni elektrod tomonidan qabul qilishni buyurdik. Hujayra "nafas olish" ning har bir o'lchovi "elektrod effekti" uchun tuzatildi.

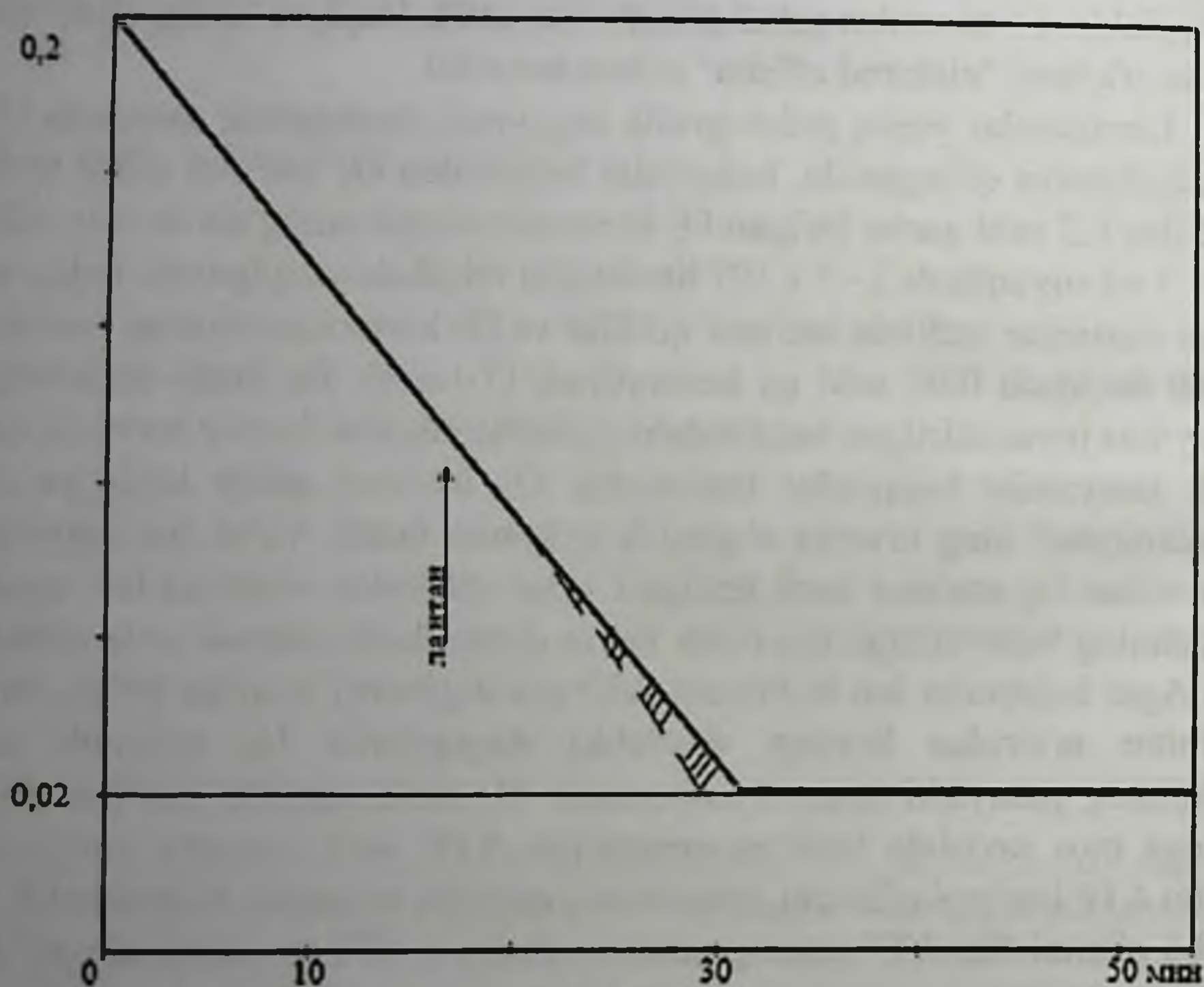
Limfotsitlar yopiq polarografik hujayrada termostatik sharoitda ($37^\circ C$) inkubatsiya qilinganida, hujayralar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligi 0,02 dan 0,2 mM gacha bo'lgan O_2 konsentratsiyasi oralig'ida doimiy edi.

1 ml suyuqlikda $2 - 3 \times 10^7$ limfotsitni inkubatsiya qilganda, hujayralar O_2 ni statsionar tezlikda iste'mol qildilar va O_2 konsentratsiyasini taxminan 45-60 daqiqada 0,02 mM ga kamaytiradi (1-rasm). Bu bizga muhrlangan hujayraga joylashtirilgan hujayralarning nafas olishini doimiy ravishda qayd etish jarayonida hujayralar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligiga dori "inyektsiyasi" ning ta'sirini o'rganish imkonini berdi. Ya'ni, biz hujayralar tomonidan O_2 iste'mol sarfi tezligini ta'sir qilishdan oldin va har qanday moddaning hujayralarga ta'siridan keyin dinamikada o'lchashimiz mumkin edi. Agar hujayralar ion tashuvchi ATFaza ingibitori ta'sirida bo'lsa, keyin ingibitor ta'siridan keyingi dastlabki daqiqalarda O_2 iste'moli sarfi tezligining pasayishi hujayra tomonidan O_2 ning umumiy iste'molida va shunga mos ravishda hujayra tomonidan ATF ning umumiy iste'molida ushbu ATF iste'mol qiluvchi jarayonning ulushini ko'rsatdi. Keyinchalik, biz ushbu qismni "bu ATFazaning umumiy hujayra ATFazasidagi ulushi" deb nomlaymiz.

Shunday qilib, ion-tashuvchi ATFazalarning o'ziga xos ingibitorlarining buzilmagan (faollashtirilmagan) limfotsitlar tomonidan O_2 iste'mol qilish intensivligiga ta'siri tahlil qilindi. Tanlangan blokator (Na^+ , K^+) - va ATFaza - suabain yakuniy konsentratsiyasi 10^{-4} M va 10^{-3} M yakuniy konsentratsiyasida Ca^{2+} - ATFaza - lantan ($LaCl_3$) selektiv ingibitori

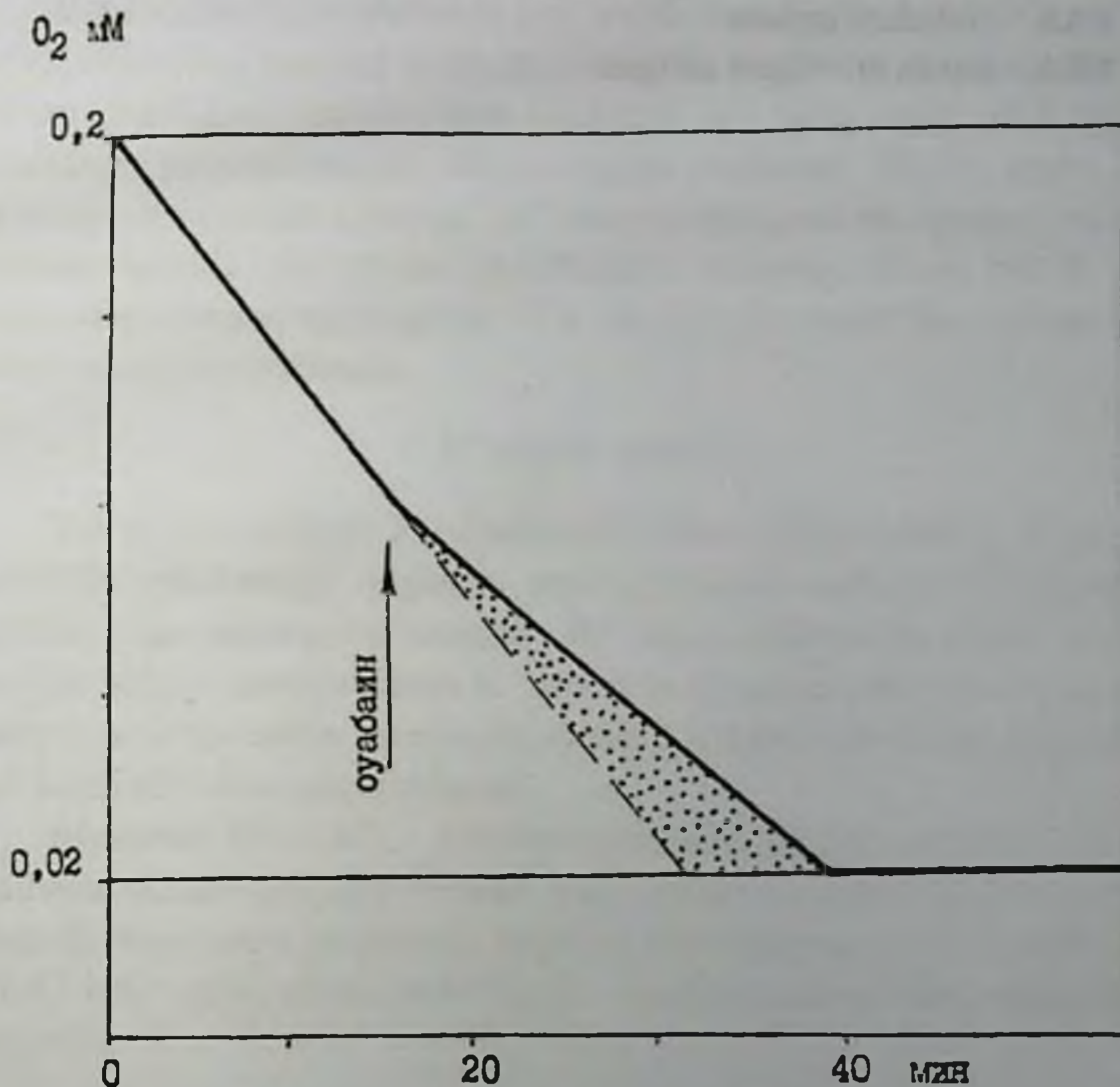
ishlatilgan. Lantan ta'sirida faollashtirilmagan limfotsitlarning shunday zaif nafas olish depressiyasi kuzatildi, uni ishonchli o'lchash mumkin emas edi. O'rtacha lantan O_2 hujayralari tomonidan iste'mol qilish tezligini 4-5 foiz o'lchov xatosida 5 foizga kamaytirdi. Bu shuni anglatadiki, Ca^{2+} - ATFazaning ishlashi davomida faollashtirilmagan limfotsitlar hujayrada ishlab chiqarilgan umumiy ATFning 5% dan ko'pini iste'mol qilmaydi.

$[O_2]$ mM



2-rasm. Muhrlangan polyarografik hujayraga joylashtirilgan sichqon taloqidagi limfoid hujayralar tomonidan O_2 ni qabul qilish tezligiga Ca^{2+} - ATFaza ingibitori lantanning ($10^{-3} M$) ta'siri. Abstissa - yopiq hujayradagi hujayra inkubatsiya vaqti (min), ordinata - inkubatsiya muhitidagi O_2 konsentratsiyasi (mM). Inkubatsiya muhitida O_2 ning boshlang'ich darajasi 0,2 mM ni tashkil qiladi; inkubatsiya muhitida O_2 ning minimal darajasi 0,02 mM ni tashkil qiladi. O'q ingibitorning hujayra suspenziyasiga "inyektsiya" momentini ko'rsatadi.

(Na^+ , K^+) - tashuvchi ATFazaning o'ziga xos ingibitor hujayrali nafas olish intensivligining o'rtacha 18% ga pasayishiga olib keldi (3-rasm). Ya'ni faollashtirilmagan limfotsitlarda hujayrada hosil bo'lgan umumiy ATFning taxminan 18% plazma membranasining ATFazasi (Na^+ , K^+) ishlash uchun ishlatilgan.



3-rasm. Ouabain (10^{-4} M), (Na^+ , K^+) - ATFaza ingibitori, muhrlangan polarografik hujayraga joylashtirilgan sichqon taloqidagi limfoid hujayralar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligiga ta'siri. Abtissa - hujayraning muhrlanganidan keyin hujayradagi inkubatsiya vaqti (min), ordinata - inkubatsiya muhitidagi O_2 konsentratsiyasi (mM). Inkubatsiya muhitidagi boshlang'ich O_2 darajasi 0,2 mM, inkubatsiya muhitidagi minimal O_2 darajasi 0,02 mM. O'q ingibitorning hujayra suspenziyasiga "inyektsiya" momentini ko'rsatadi.

Platin O_2 elektrodi o'rnatilgan maxsus germetik hujayrada polarografik usul yordamida limfotsitlar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligini o'lchadik.

ATF – adenzin trifosfat

IFA – immunofermant analiz

AShH – antitana shaklidagi hujayra

PAK – poliakril kislota

SEA – suvda eriydigan antigen



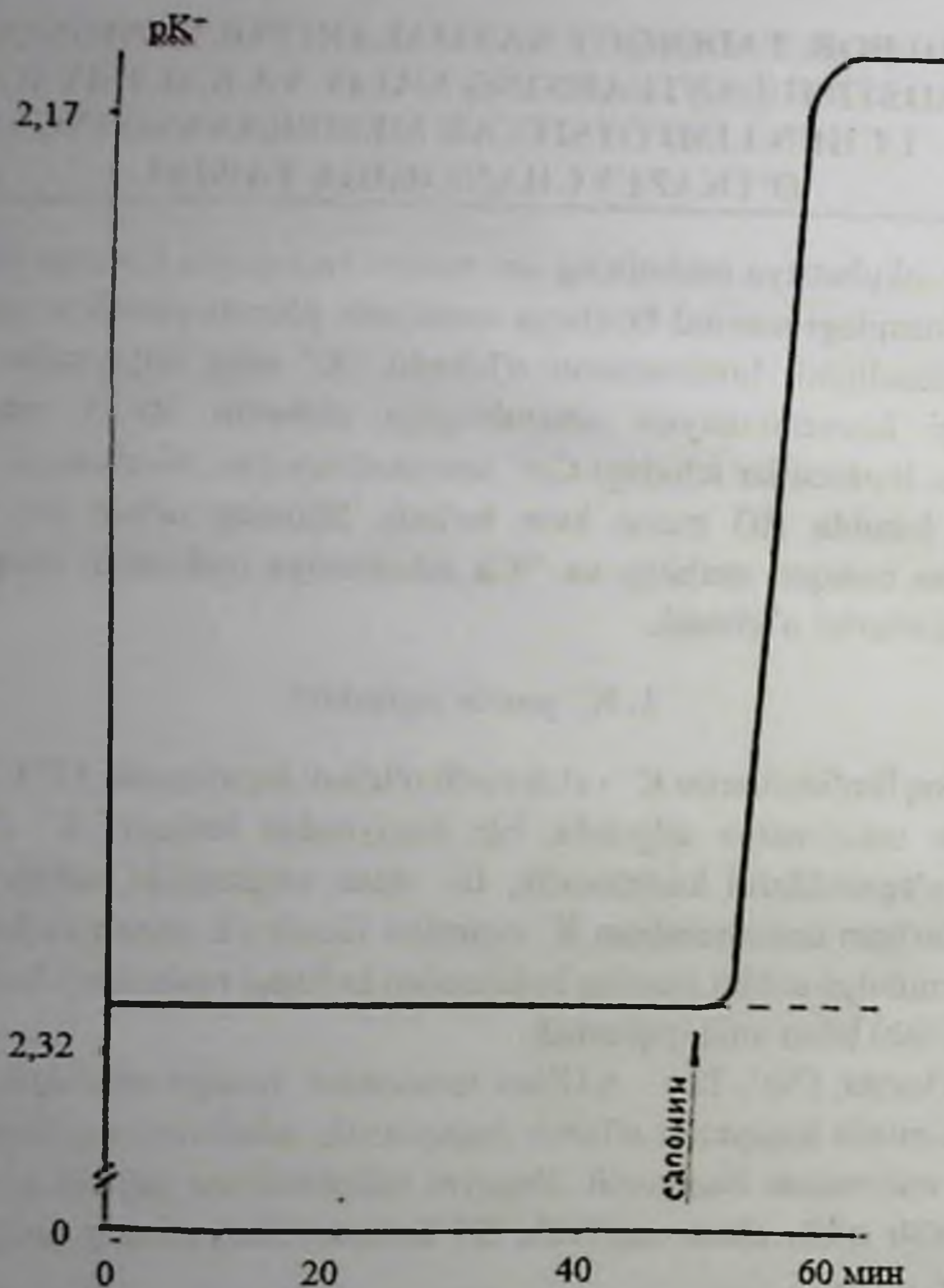
III BOB. TADQIQOT NATIJALARI POLYANIONLI IMMUNOSTIMULANTLARNING KALIY VA KALTSIY IONLARI UCHUN LIMFOTSITLAR MEMBRANASINING O'TKAZUVCHANLIGIGA TA'SIRI

Biz inkubatsiya muhitining ion tarkibi va hujayra ichidagi ionlarning tarkibi o'rtasidagi mavjud farqlarga asoslanib, plazma membranasining ion o'tkazuvchanligini, limfotsitlarni o'lchadik. K^+ ning hujayradan tashqari muhitdagi konsentratsiyasi sitozoldagiga nisbatan 30-35 marta past. Aksincha, limfotsitlar ichidagi Ca^{2+} konsentratsiyasi inkubatsiya muhitiga nisbatan kamida 103 marta kam bo'ladi. Shuning uchun biz K^+ ning hujayradan tashqari muhitga va ^{45}Ca inkubatsiya muhitidan sitoplazmaga passiv oqimlarini o'lchadik.

1. K^+ passiv oqimlari

Taloq limfotsitlarini K^+ - elektrodli o'lchov hujayrasida $37^{\circ}C$ da 1 soat davomida inkubatsiya qilganda, biz hujayradan tashqari K^+ darajasida sezilarli o'zgarishlarni kuzatmadik. Bu shuni anglatadiki, tabiiy ravishda mavjud bo'lgan transmembran K^+ oqimlari fiziologik sharoitda hujayradan tashqari muhitga ushbu ionning hujayradan tashqari muhitdan sitoplazmaga faol tashilishi bilan aniq qoplanadi.

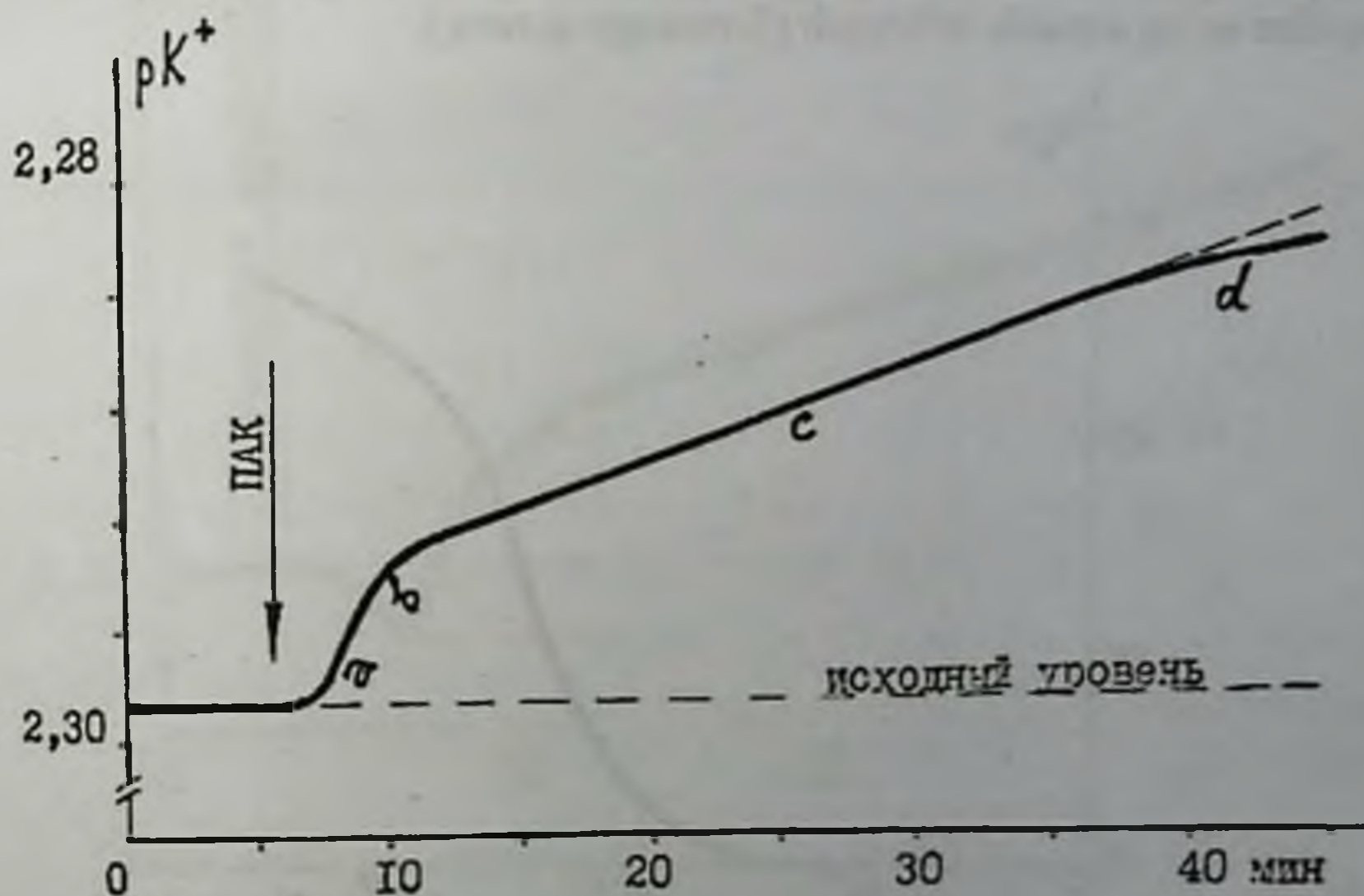
Ma'lumki, (Na^+, K^+) - ATFaza tomonidan amalga oshiriladi. Bizning tajribalarimizda hujayralar o'lchov hujayrasida inkubatsiya qilinganida, bu dinamik muvozanat buzilmadi. Hujayra inkubatsiyasi paytida polianionga (PAK) ta'sir qilib, ekma muhitida K^+ konsentratsiyasining aniq o'sishini aniqladik.



4-rasm. Termostatlangan (37°C) hujayrada valinomitsin elektrodi bilan inkubatsiya paytida taloqning limfoid hujayralari suspenziyasida hujayradan tashqari K^+ darajasining barqarorligi. Abscissa hujayraning in vitro inkubatsiyasi vaqtini, ordinatada K^+ ning hujayradan tashqari muhitdagi konsentratsiyasini ko'rsatadi ($pK^+ = -\lg [K^+]$). Hujayralarning 50 minut va inkubatsiyasi davomida muhitdagi K^+ konsentratsiyasi o'zgarmaydi. Hujayralardan K^+ ning maksimal chiqarilishini ko'rsatish uchun hujayralarning saponin bilan to'liq lizisga oid ma'lumotlar keltirilgan. Lizis momenti o'q bilan belgilanadi.

K^+ uchun membrana o'tkazuvchanligini o'lchash kinetikasi

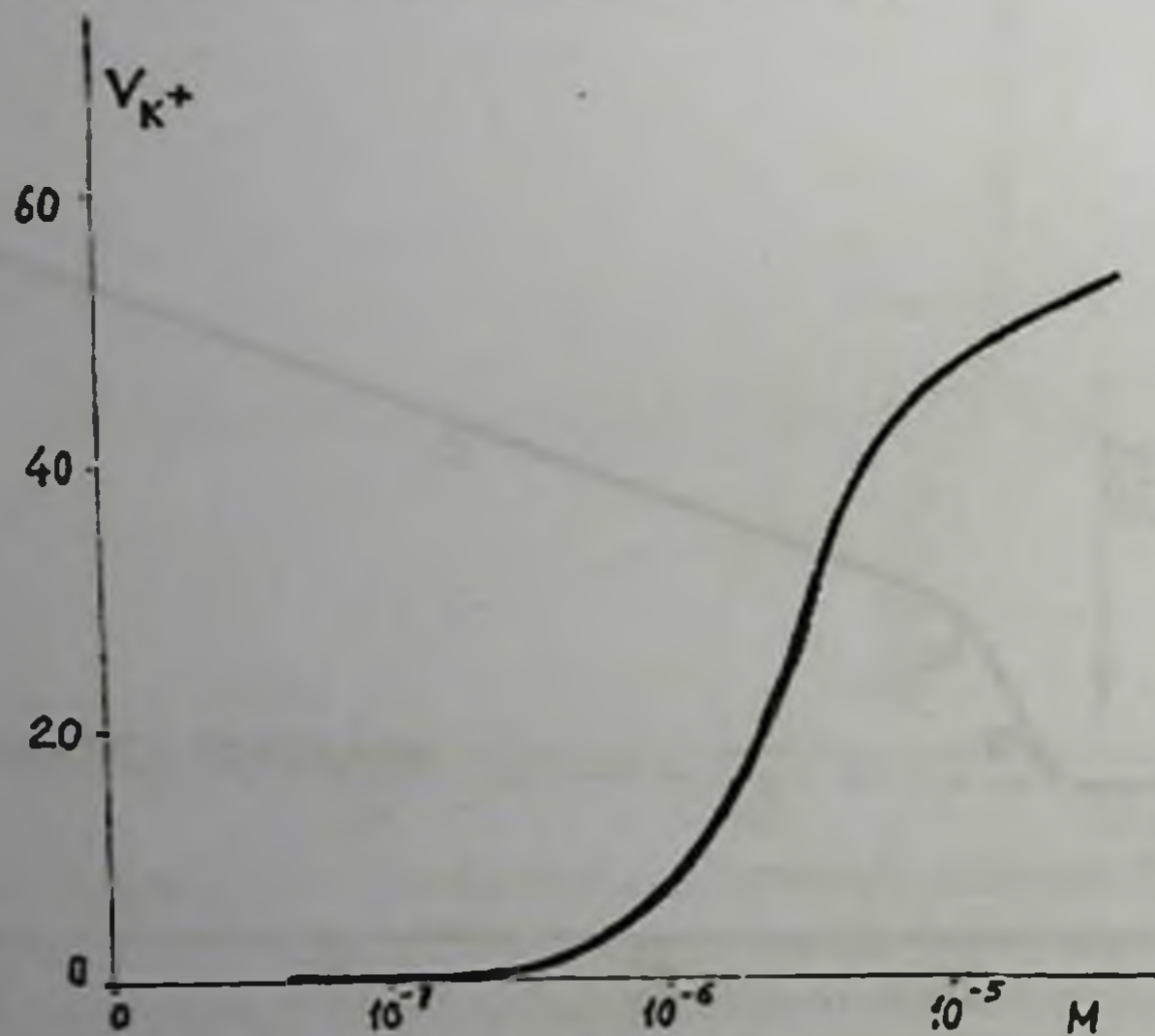
PAK bilan faollashtirilgan hujayralardan K^+ oqish jarayoni aniq chiziqli bo'lmagan kinetikaga ega edi. 5-rasmda PAK ni limfotsitlar suspenziyasiga kiritilgandan keyin hujayradan tashqari kaliy darajasini o'lchash kinetikasi ko'rsatilgan. K^+ hujayralaridan chiqish belgilari PAK ta'siridan keyin birinchi daqiqada ko'rinadi. K^+ ning eng yuqori o'rtacha oqim tezligi birinchi 3-5 daqiqada (a fazasi) kuzatildi. Bundan tashqari, bu davrda, qoida tariqasida, u statsionar qiymatga ega bo'lmadi. Aksincha, 5 dan 10 minutgacha bo'lgan vaqt oralig'ida (b fazasi) K^+ ning oqish tezligi biroz pasayib, barqarorlashdi. K^+ oqishining statsionar tezligi odatda keyingi 15-20 daqiqada (c fazasi) kuzatildi. Aynan shu davrda biz K^+ chiqish tezligining statsionar qiymatini aniq o'lchashimiz mumkin edi. Keyinchalik, polianionning limfotsit suspenziyasiga (d fazasi) "inyektsiyasi" dan 30-40 minut o'tgach, K^+ oqish tezligi asta-sekin deyarli nol qiymatlarga kamaydi.



5-rasm. Polianion ta'sirida hujayralardan hujayradan tashqari muhitga K^+ oqimining ko'payishi kinetikasi (poliakril kislota, yakuniy konsentratsiya 10^{-6} M). O'q polianionning limfoid hujayralari suspenziyasiga "inyektsiya" momentini ko'rsatadi. Kinetik egri chiziqning fazalari a, b, c, d bilan belgilanadi. O'qlar bo'ylab: abtissa - *in vitro* hujayra inkubatsiya vaqti; ordinata - hujayradan tashqari muhitda K^+ konsentratsiyasi ($pK^+ = -\lg [K^+]$).

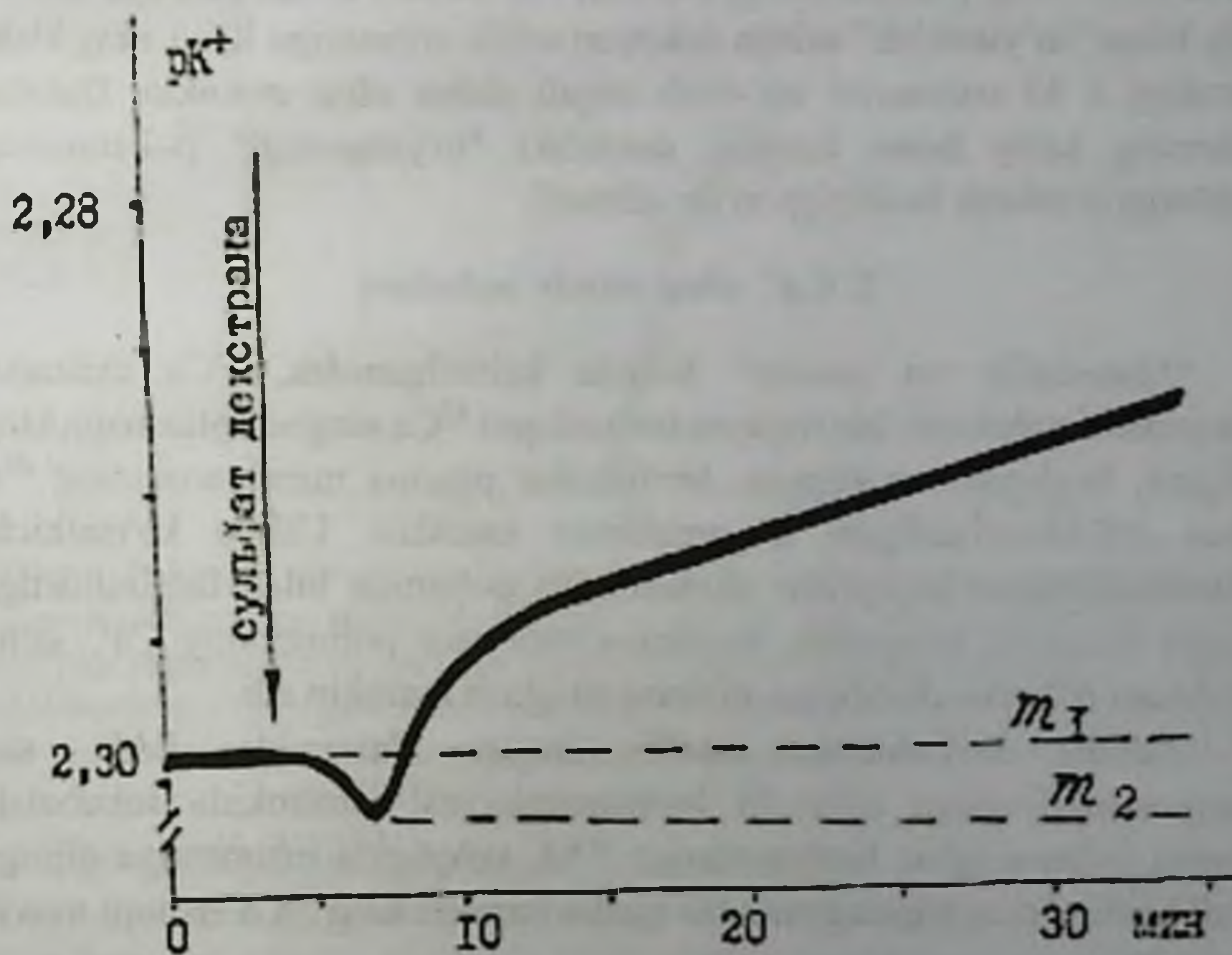
Dozaga bog'liqlik

Hujayralardan PAK qo'zg'atadigan oqish (V_{K^+}) intensivligi to'g'ridan-to'g'ri polimerning yakuniy konsentratsiyasiga bog'liq edi. Dozaga bog'liqligi S - shaklga ega (b-rasm). Shuni ta'kidlash kerakki, aniq "to'yinganlik" yo'q. Ya'ni, polianionning yuqori konsentratsiyasini yaratishda biz polimerning dozasini qo'shimcha oshirishga ta'sirning yo'qolishini yoki sezilarli darajada pasayishini kuzatmadik. Katta ehtimol bilan, biz hujayralar uchun halokatli bo'lmagan konsentratsiyalar oralig'ida ishlaganimiz sababli, dozaga bog'liqlik bo'yicha "plato" ga mos keladigan konsentratsiyaga erisha olmadik. Polianionning mitogen konsentratsiyasi hujayra membranasining o'tkazuvchanligining "yengil" o'sishiga olib keldi. 1 soat davomida immunostimulyatsiya qiluvchi polimer ta'sirida hujayralardan bir xil hujayralarning saponin bilan to'liq parchalanishiga qaraganda 100-1000 marta kam K^+ ajraldi. Bundan tashqari, yuqorida aytib o'tilganidek, K^+ ning oqishi ta'siri, polianion tomonidan qo'zg'atilgan, ta'sir boshlanganidan keyin 35-40 daqiqadan so'ng amalda to'xtaydi (5-rasmga qarang).



6-rasm. Limfotsitlar plazma membranasiga polianionning ionoforga o'xshash ta'sirining dozaga bog'liqligi. O'qlar bo'yicha: abscissa - in vitro limfoid hujayralar suspenziyasida poliakril kislotaning yakuniy konsentratsiyasi (M); polimerning ionoforga o'xshash ta'sirining intensivligi (V_{K^+} , matnga qarang). Polianionning turli konsentratsiyalari yordamida olingan kinetik egri chiziqning statsionar qismida V_{K^+} qiymatlaridan olingan doza-ta'sir egri chizig'i.

PAK singari, boshqa polianionik mitogen, dekstran sulfat ham K^+ uchun limfotsitlar membranasining o'tkazuvchanligini oshiradi. K^+ oqimining kinetikasi amaliy jihatdan foydalanish bilan deyarli bir xil edi (7-rasm). Faqat "a" fazasidan oldingi kechikish fazasi bir necha o'n soniya emas, balki 2-3 daqiqa edi. Dekstran sulfat ta'sirida dozaga bog'liqlik PAKga o'xshardi. Shuningdek, u aniq "to'yinganlik" ga ega bo'lmagan S shaklidagi ko'rinishga ega edi. Shu bilan birga, shuni ta'kidlash kerakki, dekstran sulfatning ionoforga o'xshash ta'siri PAK ishlatilgandan ko'ra ko'proq molyar konsentratsiyalarda o'zini namoyon qiladi (8-rasm).



7-rasm. Dekstran sulfatning K^+ uchun limfotsitlar membranasining o'tkazuvchanligiga ta'siri. O'qlar bo'ylab: abscissa - limfoid hujayralarni inkubatsiya qilish vaqti, in vitro; ordinata - hujayradan tashqari muhitda K^+ kontsentratsiyasi ($pK^+ = - \lg [K^+]$). m_1 - muhitdagi K^+ ning boshlang'ich darajasi, m_2 - muhitga dekstran sulfat qo'shgandan keyin o'rnatilgan K^+ darajasi (2×10^{-6} M, yakuniy konsentratsiya). Polianionning hujayra suspenziyasiga "inyektsiya" momenti o'q bilan ko'rsatilgan.

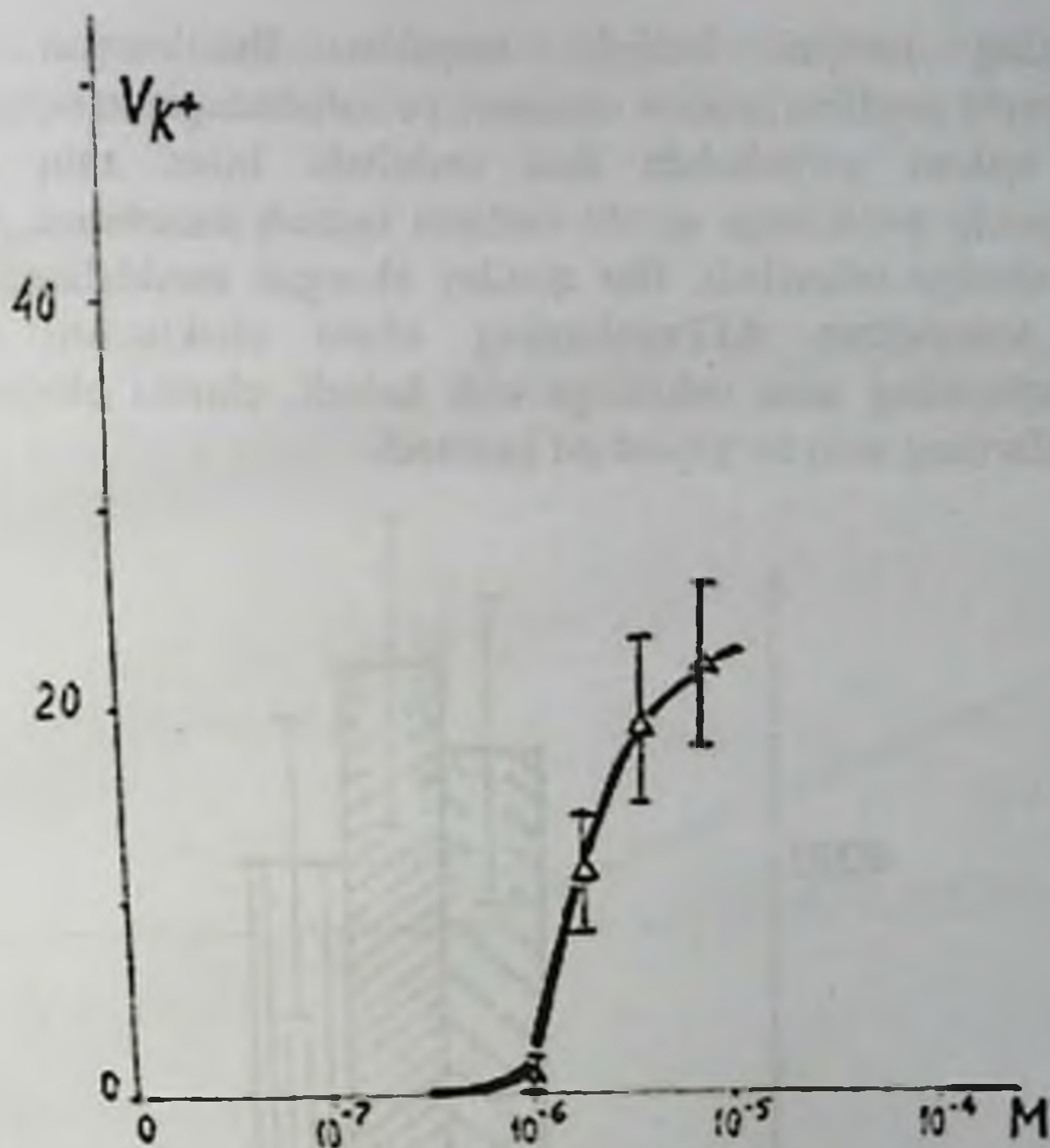
Dekstran sulfat ta'sirining yana bir xususiyati uning ionlar, shu jumladan K^+ bilan komplekslar hosil qilish qobiliyati bilan bog'liq. Dekstran sulfatning bu xususiyatining natijasi kaliy o'z ichiga olgan har qanday muhitda (hujayralar mavjudligidan qat'iy nazar) K^+ darajasining tez pasayishi hisoblanadi. Shuning uchun, dekstran sulfat lag fazasida limfotsitlar suspenziyasiga "in'ektsiya" qilinganida, biz hujayradan tashqari muhitda K^+ darajasining biroz pasayishini, keyin esa polianionga xos bo'lgan hujayralardan K^+ oqib chiqishining butun sxemasini kuzatishimiz mumkin. Muhitda K^+ ning pasayishining dastlabki ta'siridan avval dekstran sulfatni kaliy bilan "to'yintirish" uchun dekstran sulfat eritmasiga KC 1 ning kichik hajmdagi 1 M eritmasini qo'shish orqali oldini olish mumkin. Dekstran sulfatning kaliy bilan bunday dastlabki "to'yinganligi" polianionning ionoforga o'xshash faolligiga ta'sir qilmadi.

2. Ca^{2+} ning passiv oqimlari

"Materiallar va usullar" bobida keltirilganidek, ^{45}Ca radioaktiv izotopidan foydalanib, biz hujayradan tashqari ^{45}Ca ning sitoplazmaga kirish tezligini, boshqacha aytganda, limfotsitlar plazma membranasining ^{45}Ca uchun o'tkazuvchanligini o'rganishimiz mumkin. Ushbu ko'rsatkichni faollashtirilmagan hujayralar ekmasini va polianion bilan faollashtirilgan hujayra ekmasini taqqoslab, immunostimulyator polimerning Ca^{2+} uchun membrana o'tkazuvchanligiga ta'sirini aniqlash mumkin edi.

Ma'lum bo'lishicha, 30-60 daqiqa davomida PAK ning immunostimulyatsiya qiluvchi kontsentratsiyasi ishtirokida inkubatsiya qilingan sichqon taloq limfotsitlarida PAK yo'qligida inkubatsiya qilingan bir xil limfotsitlarga qaraganda bir necha baravar ko'p ^{45}Ca izotopi mavjud (9-rasm).

Dekstran sulfat ham xuddi shunday ta'sirga ega edi, chunki uning mavjudligida hujayradan tashqari muhitdan sitoplazmaga ^{45}Ca kirib borish intensivligi ham sezilarli darajada oshdi (9-rasm).



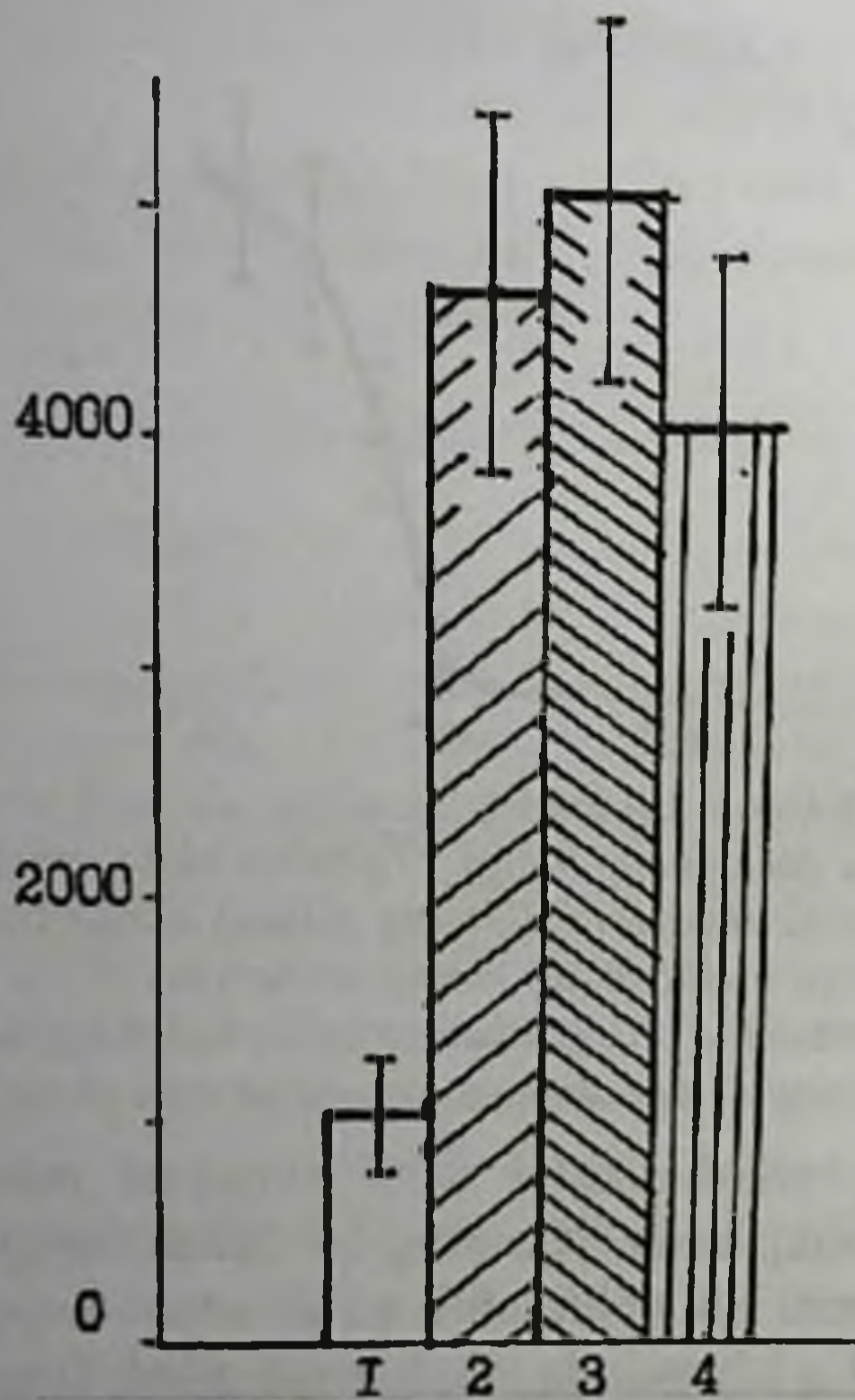
8-rasm. Polianion, dekstran sulfatning ionoforga o'xshash ta'sirining limfotsitlar plazma membranasiga dozaga bog'liqligi. O'qlar bo'ylab: abscissa - in vitro limfoid hujayralar suspenziyasida dekstran sulfatning yakuniy konsentratsiyasi (M); ordinata - polimerning ionoforga o'xshash ta'sirining intensivligi (V_{K^+}). Polianionning turli konsentratsiyalari yordamida olingan kinetik egri chiziqning statsionar qismida V_{K^+} qiymatlaridan olingan doza-ta'sir egri chizig'i.

Biz qo'llagan radioindikator usuli versiyasi polianionlar ta'siridan keyingi dastlabki daqiqalarda ^{45}Ca ning qo'shilish tezligini aniq o'lchashga imkon bermadi, chunki ishonchli tahlil qilish uchun hujayralarni kamida 30 daqiqa davomida ^{45}Ca ishtirokida inkubatsiya qilish kerak edi.

3. Ion tashuvchi ATFazaning to'liq bloklanishi sharoitida PAK ning membrananing ion o'tkazuvchanligiga ta'siri.

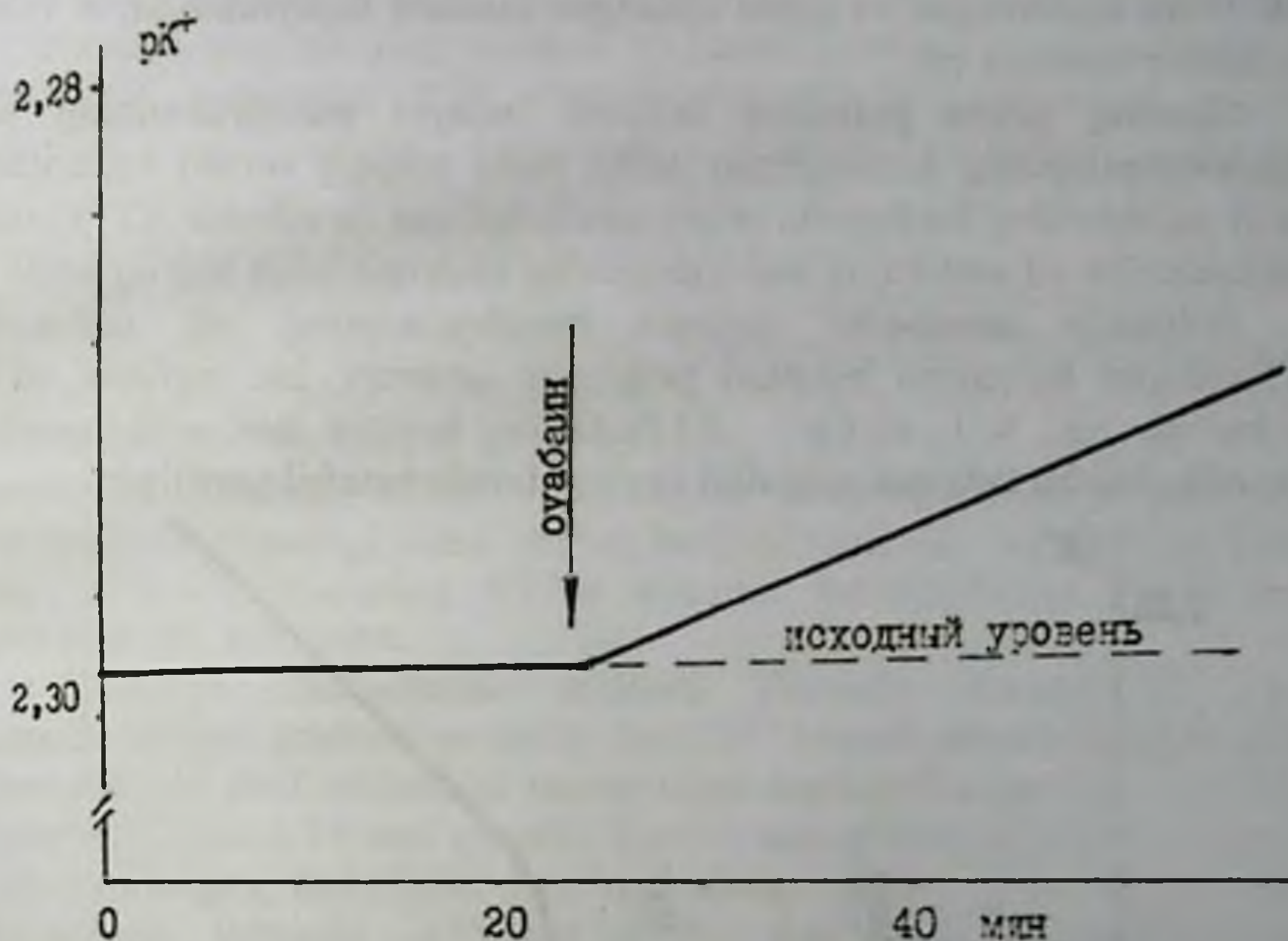
Biz aniqlagan plazma membranasi bo'ylab K^+ va Ca^{2+} passiv oqimlarining ko'payishi polianion ta'sirida ion tashuvchi ATFazalarning

cheklanishining natijasi bo'lishi mumkin. Buzilmagan hujayrada elektrokimyoviy gradient (passiv oqimlar) yo'nalishidagi ion oqimlari bir xil ionlarning teskari yo'nalishda faol tashilishi bilan aniq qoplanadi. Elektrokimyoviy gradientga qarshi ionlarni tashish membrana ATFazalari tomonidan amalga oshiriladi. Har qanday ekzogen moddalarga (masalan, polianion) tomonidan ATFazalarning ishini cheklanishi membrana o'tkazuvchanligining aniq oshishiga olib keladi, chunki eksperimentator passiv oqimlarning aniq ko'payishini kuzatadi.



9-rasm. Polianionlarning limfoid hujayralar sitozoliga muhitdan ^{45}Ca qo'shilishiga ta'siri. Y o'qi - hujayra ekstraktining radioaktivligi (imp/min). Ekstraktlar quyidagi hujayra variantlaridan olingan: (1) sichqon taloqidan limfotsitlarning faollashtirilmagan ekmasini nazorat qilish; (2) PAK bilan faollashtirilgan hujayralar (50 mkg/ml); (3) PAK (200 mkg/ml) bilan faollashtirilgan hujayralar; (4) dekstran sulfat bilan faollashtirilgan hujayralar (100 mkg/ml).

Aslida, passiv oqimlar o'zgarishsiz qolishi mumkin edi, ammo bu oqimlarning kompensatsiyasi transport ATPazlarining faol ishi bilan bloklandi.



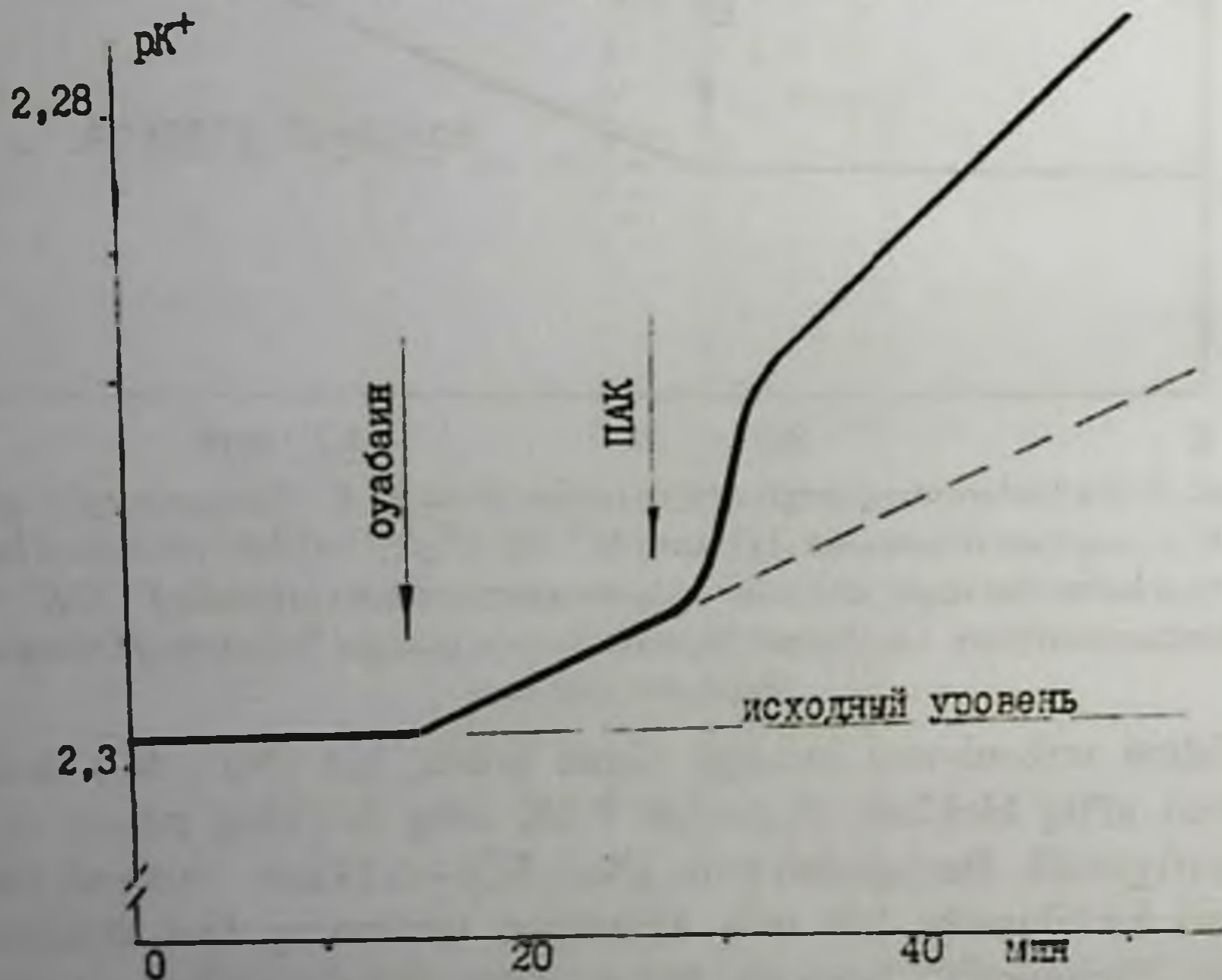
10-rasm. To'liq blokirovka qilingan hujayradan tashqari K^+ darajasining o'zgarishi (Na^+ , K^+) - ouabain tomonidan ATFaza (10^{-4} M). O'qlar bo'ylab: abtissa - in vitro hujayra inkubatsiya vaqti; ordinata - hujayradan tashqari muhitda K^+ ($pK^+ = - \lg [K^+]$) konsentratsiyasi. Ouabainni hujayra suspenziyasiga "inyektsiya" momenti o'q bilan ko'rsatilgan.

Ushbu imkoniyatni hisobga olgan holda, biz (Na^+ , K^+) tashuvchi ATFazani to'liq bloklash sharoitida PAK ning K^+ ning passiv oqimiga ta'sirini o'rgandik. Haqiqatdan ham, (Na^+ , K^+) - ATFaza - ouabain (10^{-4} M) ingibitori kiritilganda, biz mos keladigan ionlarning faol o'tkazilishini butunlay "o'chiramiz". Natijada, biz K^+ ning sitoplazmadan - hujayradan tashqari muhitga passiv oqimining aniq ko'payishini kuzatamiz. Qo'llaniladigan ortiqcha konsentratsiyalarda ouabain (Na^+ , K^+) - ATFazani to'liq bloklaydi, ingibitor konsentratsiyasining qo'shimcha oshishi hujayralardan K^+ ning chiqarilishining oshishiga olib kelmaydi. Shunga

qaramay, PAK ning to'liq bloklangan (Na^+ , K^+) - ATPaza fonida limfotsitlar suspenziyasiga kiritilishi K^+ ning hujayradan tashqari muhitga passiv oqimining sezilarli darajada oshishiga olib keldi (11-rasm). Shu bilan birga, PAK ta'siri buzilmagan va qayta ishlangan ouabain hujayralar hajmi bilan solishtirish mumkin edi.

Shuning uchun polianion ta'sirida hujayra membranasining ion o'tkazuvchanligining ko'rinadigan emas, balki haqiqiy ortishi kuzatiladi. Passiv oqimlarning kuchayishi ta'siri mos keladigan membrana ATPazalari tomonidan bir xil ionlarning faol transportini cheklash bilan bog'liq emas.

Polianion tomonidan hujayra membranasining ion tashuvchi ATPazalarini ko'payish belgilari yo'qligiga qaramay, biz ingibitiv tahlil yordamida (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATPazlarning holatini maxsus tadqiqotlar o'tkazdik. Ushbu tadqiqot natijalari keyingi bobda batafsil yoritilgan.



11-rasm. Ouabain (10^{-4} M) tomonidan (Na^+ , K^+) - ATPazani to'liq blokirovka qilish sharoitida PAK polianionining hujayra membranasini o'tkazuvchanligiga ta'siri. O'qlar bo'ylab: abscissa - in vitro limfoid hujayralarni inkubatsiya qilish vaqti; ordinata - hujayradan tashqari muhitda K^+ ($\text{pK}^+ = -\lg [\text{K}^+]$) konsentratsiyasi. Hujayra suspenziyasiga effektorlarni "inyeksiya" momentlari strelkalar bilan ko'rsatilgan.

IV BOB. POLIANIONLARNING (Na, K) - va Ca - ATFAZALARNI LIMFOTSITLAR MEMBRANASIGA TASHILISHINING TA'SIRI

3-bobda venno (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATFazalarning selektiv ingibitorlari, mos ravishda ouabain va lantan yordamida ushbu fermentlar tomonidan sarflangan ATF ning buzilmagan limfotsitlarning umumiy hujayrali ATFazasiga nisbatan ulushini aniqlash mumkin. Faollashtirilmagan limfotsitlardagi (Na^+ , K^+) -ATFaza ishi ushbu hujayralarda ishlab chiqarilgan va sarflangan umumiy ATFning 18% gacha sarflanishi ma'lum bo'ldi (3-rasm). Tashqi hujayra membranasining natriy-kaliy nasosining hujayra miqyosidagi "energiya sig'imi" bu mexanizmning hujayra hayotiyligida muhimligini ko'rsatadi. Shu bilan birga, bu haqiqat bo'linmaydigan limfotsitda katta energiya sarfini talab qiladigan barcha jarayonlar (masalan, DNK, oqsil, RNK makromolekulalari biosintezi) minimallashtirilganligi bilan bog'liq bo'lishi mumkin. Va shuning uchun (Na^+ , K^+) - ATFazaning ATPni umumiy sarflanishidagi ulushi tinch limfotsitlarda juda katta.

Energiya xarajatlarini sezilarli darajada kamaytirish uning konsentratsiyasi gradientiga qarshi faol Ca^{2+} tashish jarayonini talab qiladi. Dam oluvchi limfotsitlardagi lantan bilan ingibitorlangan Ca^{2+} - ATFaza shunchalik kam ATF sarf qiladiki, biz uni aniq o'lchay olmadik. Amaldagi usul xatosining kattaligini hisobga olsak, ushbu hujayralarda ishlab chiqarilgan umumiy ATFning 4-5% dan ko'pi faollashtirilmagan limfotsitlardagi Ca^{2+} - ATFaza ishiga sarflanishini qat'iy taxmin qilishimiz mumkin (2-rasm).

Mitogen polianion inyektsiyasi - PAK - limfotsitlarning suspenziyasiga aylanishi umumiy ATF - bu hujayralarning sarf qiluvchi faolligini sezilarli darajada faollashishiga olib keldi. Hujayralar tomonidan O_2 sarflash tezligi, demak, ATF sintezi va iste'moli polianion ta'sirida o'rtacha 1,3-1,5 martaga oshdi (1-jadval). Shu bilan birga, ingibitor tahlil shuni ko'rsatdiki, bunday polianion bilan faollashtirilgan hujayralarda ion tashuvchi ATFazalar ishining sezilarli faollashuvi sodir bo'ladi. Lantanning limfotsitlarning nafas olishiga ingibitor ta'siri keskin oshdi. PAK bilan oldindan faollashtirilgan limfotsitlar tomonidan O_2 sarflash darajasi lantan ta'sirida 19-39% ga kamaydi (1-jadval, 12,13-rasm). Shuning uchun, mitogen PAK polianioniga ta'sir qilgandan so'ng, limfotsitlarning plazma membranasida Ca^{2+} tashuvchi ATFazaning kuchli faollashuvi sodir bo'ldi.

PAK qo'shilgandan keyin ish tezligi (Na^+ , K^+) - ATFaza ham oshdi, lekin Ca^{2+} - ATFazadan kamroq darajada. Shunday qilib, PAK bilan faollashtirilgan limfotsitlarda ATFazaning ouabain (Na^+ , K^+) tomonidan ingibitorlanishi hujayralar tomonidan O_2 iste'mol sarfi tezligini 26-27% ga pasayishiga olib keldi.

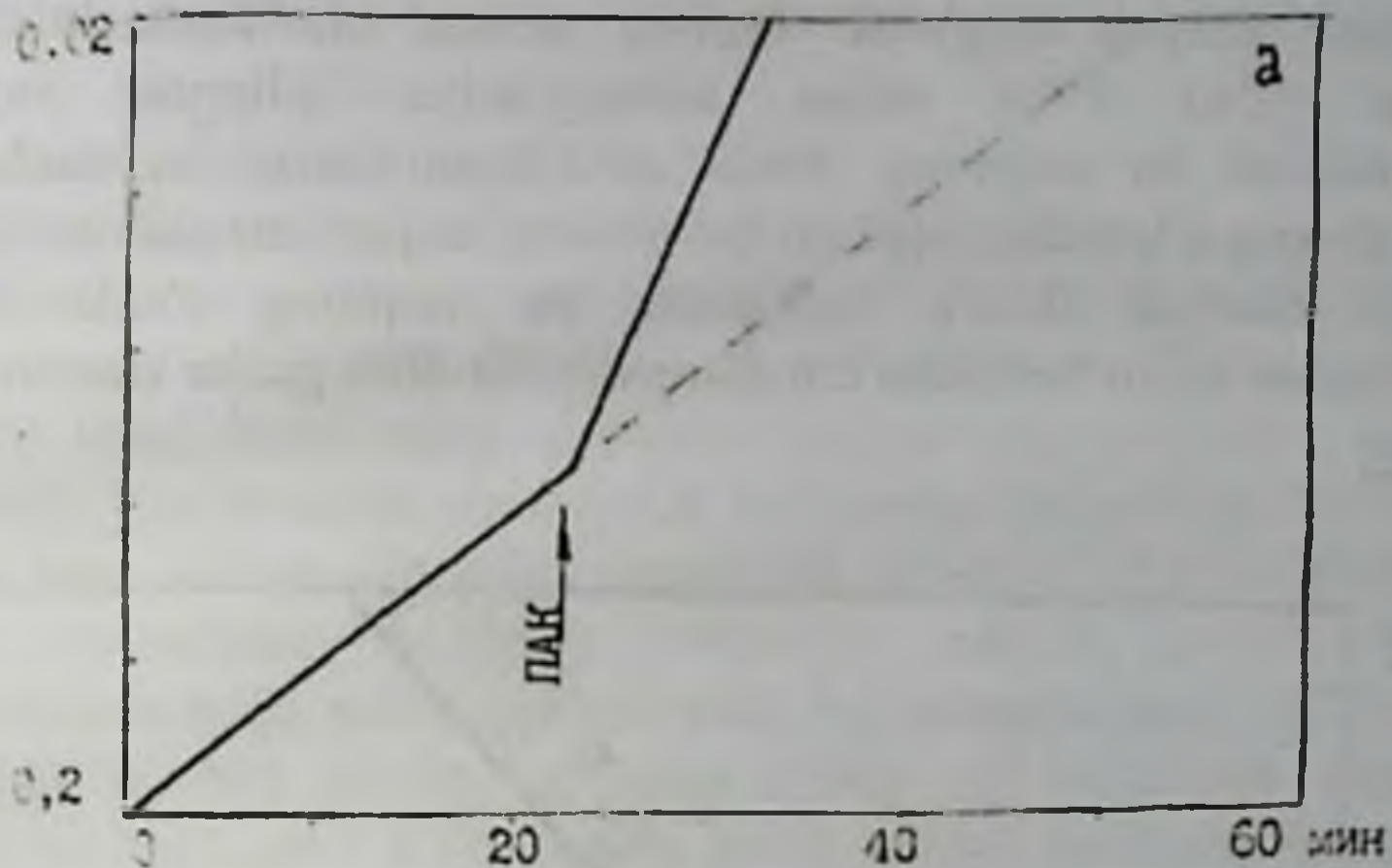
1-jadval.

Poliakril kislotaning limfotsitlar tomonidan O_2 sarf qilish tezligiga ta'siri

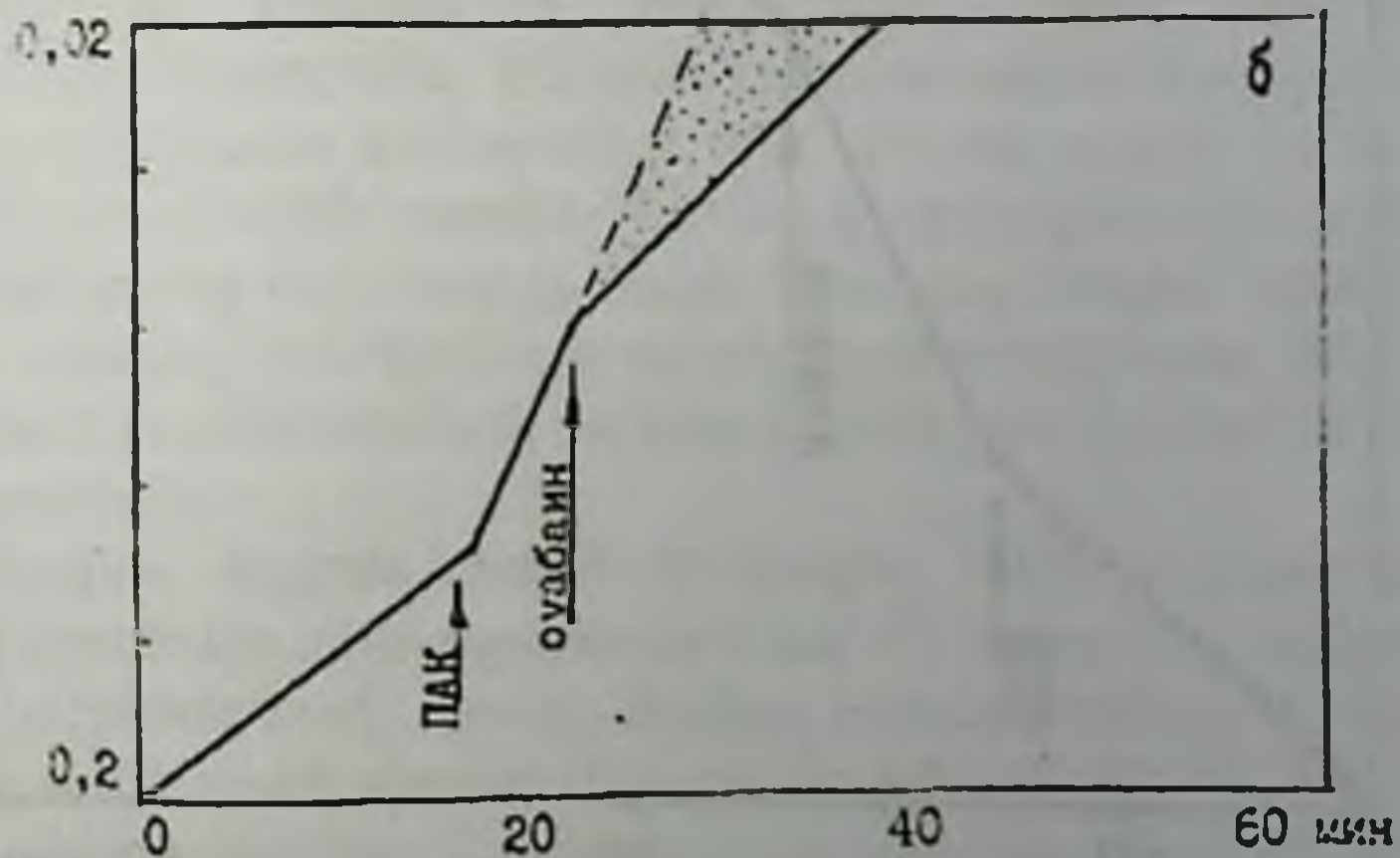
Uzluksiz ro'yxatga olish jarayonida $V\text{-O}_2$ dinamikasi*	Tajribalar seriya raqami				Izoh
	1	2	3	4	
V_{ISX} , mM/s	0,130	0,104	0,117	0,125	-
"Ineksiya" PAK in vitro, mgk/ml	50	50	200	200	-
V_{PAK} , mM/s	0,166	0,135	0,176	0,183	-
$(V_{\text{PAK}} - V_{\text{ISX}})/V_{\text{ISX}}$, %	28	30	50	46	PAK ta'sirida ATFazasining umumiy faollashuv ko'rsatkichlari
V_{LANT} , mM/ч	0,134	-	0,130	-	-
$(V_{\text{PAK}} - V_{\text{LANT}})/V_{\text{ISX}}$, %	25	-	39	-	PAK ning "inyektsiyasidan" keyin Ca^{2+} ga bog'liq ATFazaning faollashuv ko'rsatkichlari
$(V_{\text{PAK}} - V_{\text{LANT}})/V_{\text{PAK}}$, %	19	-	26	-	
$V_{\text{LANT}}/V_{\text{ISX}}$, %	103	-	111	-	-
V_{STR} , mM/ч	-	0,107	-	0,150	-
$(V_{\text{PAK}} - V_{\text{STR}})/V_{\text{ISX}}$, %	-	27	-	26	Faollashish ko'rsatkichlari (Na^+ , K^+) - PAK "ineksiya" sidan keyin ATFaza
$(V_{\text{PAK}} - V_{\text{STR}})/V_{\text{PAK}}$, %	-	21	-	18	
$V_{\text{STR}}/V_{\text{PAK}}$	-	103	-	121	

* $V - \text{O}_2$ - kislorod sarfi darajasi (mM/s); V_{ISX} = ta'sir qilishdan oldin buzilmagan hujayralarning $V - \text{O}_2$; V_{PAK} = $V - \text{O}_2$ PAK "inyektsiyasidan" keyin; V_{LANT} = $V - \text{O}_2$ PAK bilan faollashtirilgan hujayralarga lantan (10^{-3} M) qo'shilgandan keyin; V_{STR} = $V - \text{O}_2$ PAK bilan faollashtirilgan hujayralarga strofantin (10^{-4} M) qo'shilgandan keyin.

$[O_2]$ mM

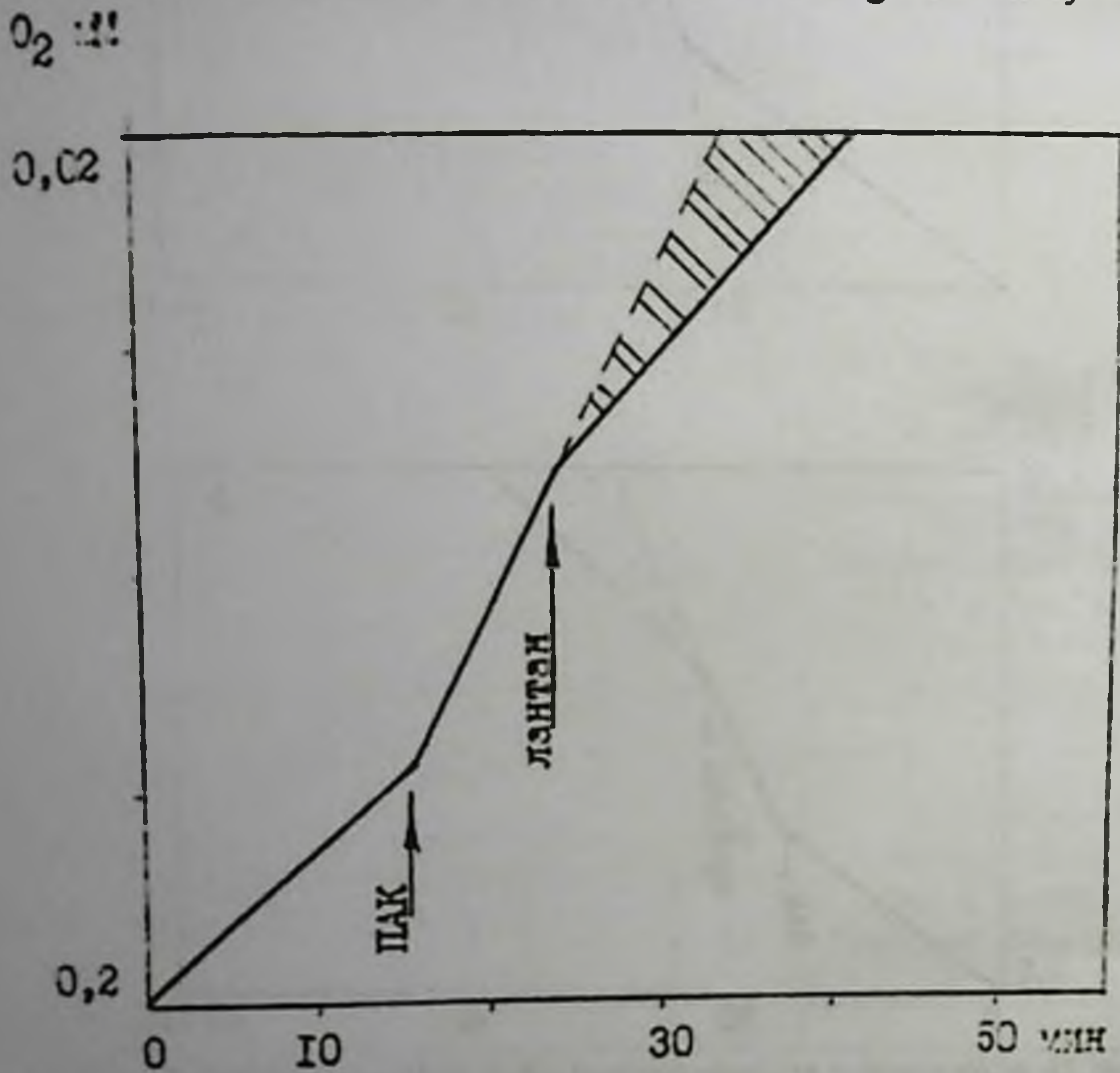


$[O_2]$ mM



12-rasm. O_2 ni limfotsitlar ta'sirida iste'mol qilish tezligining o'zgarishi: (a) poliakril kislotasi (10^{-6} M) a yoki (b) ketma – ket poliakril kislotasi (10^{-6} M), so'ngra Inhibitor (Na^+ , K^+) - ATFaz, ouabain. O'q bo'yicha: abscissa- in vitro hujayralarining inkubatsiya vaqti, ordinat-inkubatsiya muhitida O_2 ning konsentratsiyasi (mM). O'qlar tekshirilayotgan limfotsitlar suspenziyasiga effektorlarni "inyektsiya qilish" lahzalarini ko'rsatadi.

PAKni faqat aktivlashtirish (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} -ATFaza qo'shilishi bilan jami hujayra ATFazasining barcha faollashuvi ta'minlanganligini bilish katta qiziqish uyg'otdi. Buning uchun biz faollashtirilmagan limfotsitlar yoki PAA bilan stimulyatsiya qilingan hujayralar suspenziyalarida bir vaqtning o'zida qo'shilgan lantan va ouabainning ingibitor ta'sirini o'lchadik. Ma'lum bo'lishicha, hujayralar tomonidan O_2 ni sarf qilish darajasi ikkala ingibitorni bir vaqtning o'zida in vitro inyektsiyasidan keyin boshlang'ich darajadan 78-80% gacha kamayadi.



13-rasm. Poliakril kislota (PAK, 10^{-6} M) va keyin Ca - ATFaza ingibitori lantan (10^{-3} M) bilan ketma-ket ta'sir qilish paytida limfotsitlar tomonidan O_2 iste'mol qilish tezligining o'zgarishi. Abscissa o'qi bo'ylab in vitro hujayralarining inkubatsiya vaqti, ordinat o'qi bo'ylab - inkubatsiya muhitida O_2 konsentratsiyasi (mM). O'qlar limfotsitlar suspenziyasiga effektorlarni "inyektsiya qilish" lahzalarini ko'rsatadi.

Umumiy hujayra ATFazasi boshlang'ich darajasining 148% ga yetdi. Shuning uchun, PAKni qayta ishlashdan so'ng (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATFazalarni tashishdan tashqari, ATF iste'mol qiladigan boshqa jarayonlar faollashadi. Biroq, PAK ta'siri ostida yuzaga keladigan umumiy hujayra ATFazasining o'sishining katta qismi Ca^{2+} - ATFaza va kamroq darajada (Na^+ , K^+) - ATFazaning faollashishi bilan bog'liq edi.

Polianion ta'siridan keyin ATFaza faolligining o'zgarishi kinetikasiga kelsak, shuni ta'kidlash kerakki, faollashtirish ATFaza faolligining o'zgarishi bilan boshlangan. ATFaza faolligining o'zgarishi 3-5 daqiqa davom etdi. Biz tebranish davrida O_2 hujayralari tomonidan iste'mol qilish tezligini aniq o'lchay olmadik, chunki biz foydalanadigan asbob bunday tezkor jarayonlarni miqdoriy o'rganish uchun moslashtirilmagan. Tebranishlar oxirida, polianion ta'siridan 3-5 minut o'tgach, O_2 hujayralari tomonidan iste'mol qilishning yangi tezligi asl nusxadan oshib ketdi. Ortiqcha miqdor, ya'ni ATFazalarni polianion bilan faollashtirish ta'sirining kattaligi to'g'ridan-to'g'ri polimer dozasi bog'liq edi. PAK immunostimulyatsion dozalarini qo'llashda, qoida tariqasida, biz ATFazalarning boshlang'ich darajasining 150% dan ko'prog'ini faollashtirishni kuzatmadik. Polimer konsentratsiyasining yanada oshishi ta'sirining qo'shimcha kuchayishiga olib kelmadi, ammo bu uning keskin pasayishiga olib kelishi mumkin. Bunday natijaning sabablari ma'lum emas. Bu polianionning hujayralarga toksik ta'sirining natijasi bo'lishi mumkin. Bundan tashqari, polioksidning yuqori konsentratsiyasida atrof-muhitning kislotalanishi sezilarli bo'ladi, bu bilan ko'plab "tushunarsiz" ta'sirlar bog'liq bo'lishi mumkin.

Umuman olganda, toksik bo'lmagan PAK immunostimulyatsion dozalari membrana iontransportirukshchik ATFazalarning ishini sezilarli va tez faollashtirishi aniq. Asosan, boshqa immunostimulyatsion polianion - dekstran sulfat xuddi shunday ta'sirga ega edi [1]. Biz [4] K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ionlarini faol tashishning kuzatilgan stimulyatsiyasi bir xil ionlarning passiv oqimlarining ko'payishi natijasida yuzaga keladigan ikkinchi darajali hodisa deb taxmin qildik. Ko'rinib turibdiki, polianion hujayra membranasini bilan o'zaro aloqada bo'lib, uning ion o'tkazuvchanligining tez o'sishiga olib keladi. Transmembran ion gradyanlarining o'zgarishi, o'z navbatida, bir xil ionlarni membrana bo'ylab passiv oqimga qarama-qarshi yo'nalishda

tashiydigan tegishli ATFazalarning ishlashini tez faollashishiga olib keladi. Ya'ni, ATFazlarning faollashishi ortib borayotgan ion oqimlarini qoplashga va hujayra va atrof-muhit o'rtasidagi ionlarning asl nisbatini tiklashga qaratilgan.

Limfoid hujayralarning polianionlarga fiziologik reaksiyasini faollashtirish uchun hujayra membranasining o'tkazuvchanligidagi aniqlangan o'zgarishlarning ahamiyati masalasi tubdan muhimdir. Boshqacha qilib aytganda, hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshirish hujayraning polianionga javobini qo'zg'atishning asosiy bo'g'inlaridan biri bo'ladimi yoki bu o'zgarish polimerning hujayra bilan o'zaro ta'sirining immunitet reaksiyasini faollashtirish bilan bevosita bog'liq bo'lmagan oqibatlaridan biri bo'ladimi. Dissertatsiyaning keyingi bobi ushbu masalani tahlil qilishga bag'ishlangan.

V BOB. LIMFOTSITLARNING POLIANIONGA TA'SIRINI FAOLLASHTIRISH UCHUN HUJAYRA MEMBRANASINING O'TKAZUVCHANLIGINI OSHIRISH QIYMATINI TAHLIL QILISH

Polianion hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligining tez o'sishini va iontransport qiluvchi ATPazalarning kompensatsion reaksiyasini keltirib chiqaradi. Bu qanday ahamiyatga ega, asosiy (limfoid hujayra javobini boshlash uchun) yoki limfotsitlarni faollashtirish jarayoni bilan bog'liq bo'lmagan hamrohmi? Tajribada ushbu savolni tahlil qilish uchun biz ikkita yondashuvdan foydalandik. Birinchidan, polianionning in vitro proliferatsiya orqali poli anioniga javob beradigan va javob bermaydigan limfotsitlar subpopulyatsiyasining membrana o'tkazuvchanligiga ta'siri o'rganildi. Ikkinchidan, ular kimyoviy tuzilishdagi polimer bo'lmagan, ammo ionlar uchun hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshirishga qodir bo'lgan turli xil moddalarning immunomodulyatsion xususiyatlarini o'rganildi.

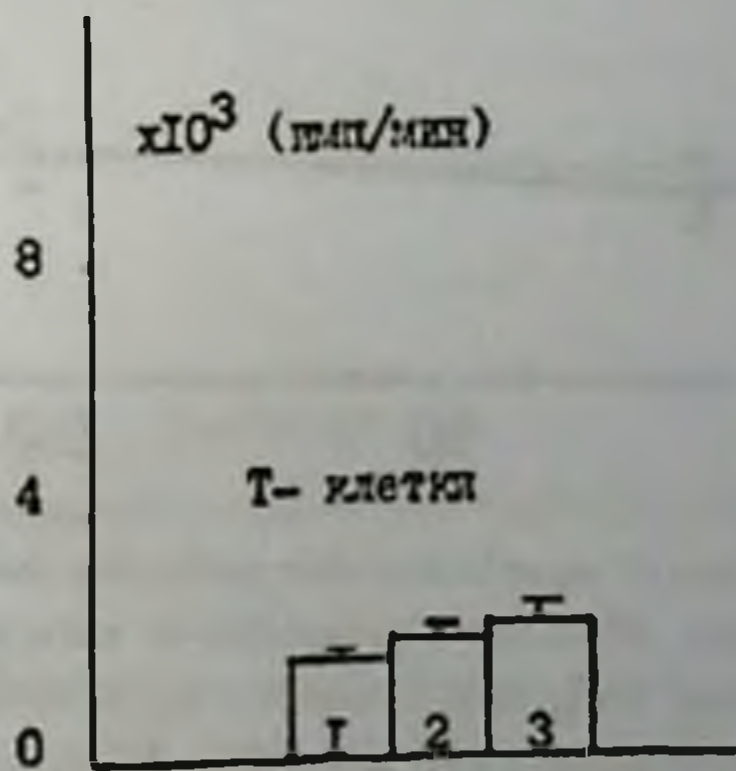
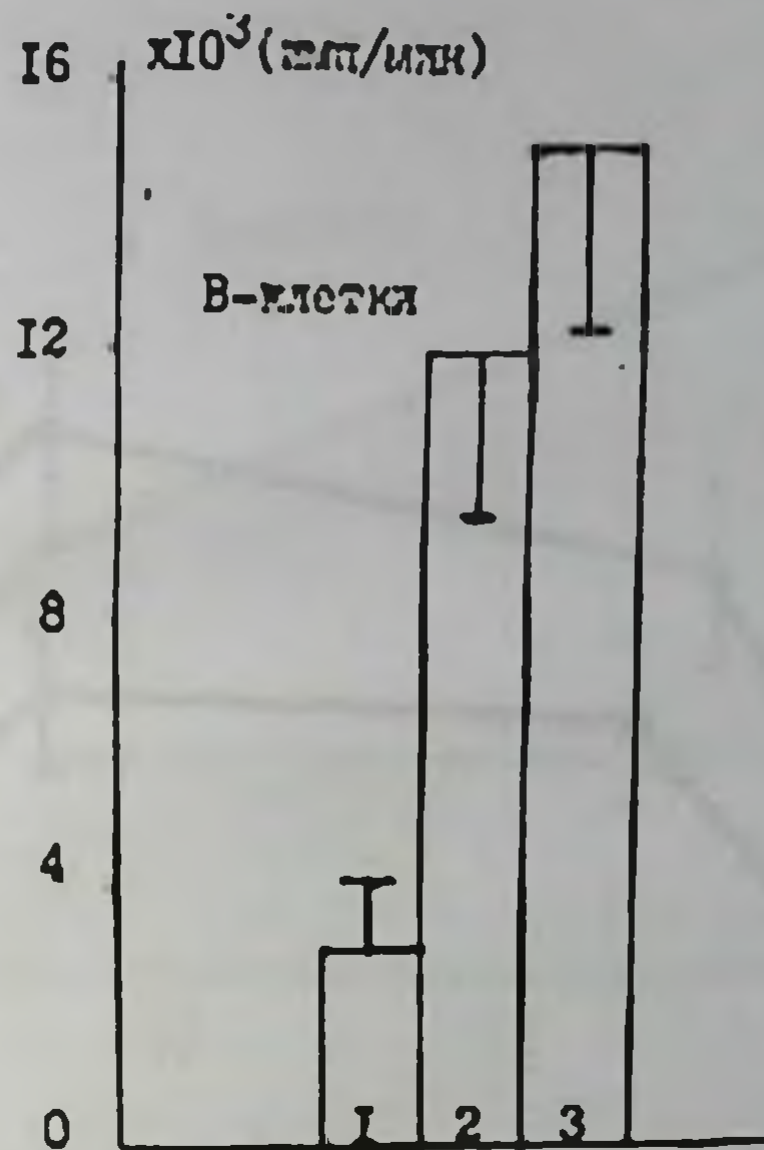
1. Polianionning T va B limfosit membranasida ionlarni tashishga ta'siri.

Ma'lumki, polianionlar (PAK, dekstran sulfat) B-hujayrali mitogenlarning xususiyatlarini namoyish etadi, T - limfotsitlar reaksiyasini faollashtirmaydi [44]. Shuning uchun Polianionning T va B limfotsitlariga membrananing faol ta'sirini alohida o'rganish qiziq edi. "Materiallar va tadqiqot usullari" bobida tasvirlanganidek, taloq limfotsitlari neylonga yopishish qobiliyatiga ko'ra ajratilgan. Shu bilan birga, neylonga yopishgan fraksiya B hujayralari bilan boyitilgan va T - limfotsitlarning ozgina aralashmasini o'z ichiga olgan. T-limfotsitlarning aksariyati neylonga yopishmaydigan hujayralar fraksiyasida joylashgan. Neylonga yopishmaydigan hujayralarning bu qismi B limfotsitlarida kam

edi. Shartli ravishda biz yopishadigan va yopishmaydigan hujayralarni mos ravishda "T - fraktsiya" va "B - fraktsiya" deb ataymiz.

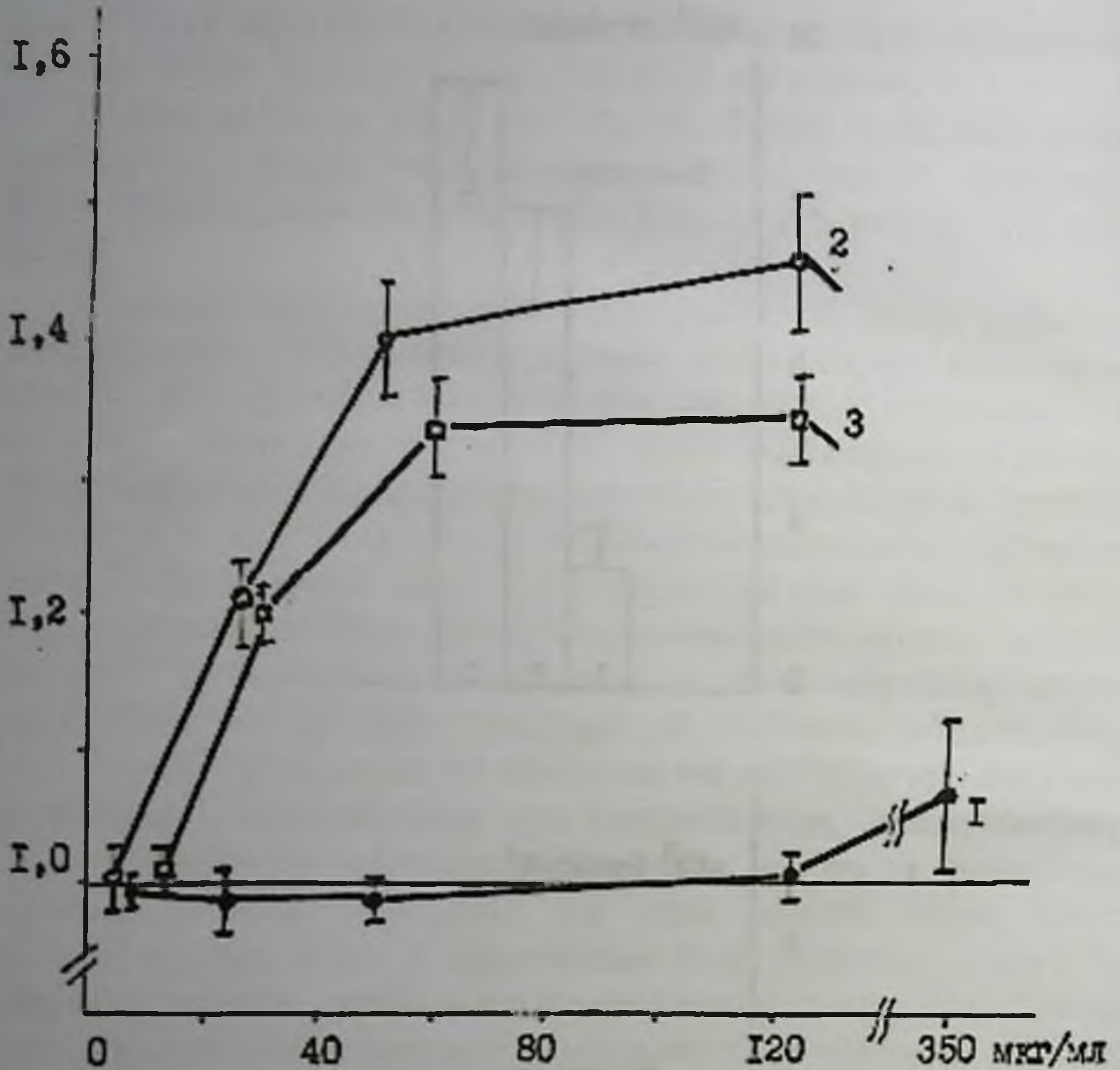
In vitro polianion (PAK, 50 mkg/ml) ta'sirida DNK sintezining faollashishi T - hujayra fraktsiyasida emas, balki faqat B - fraksiyada qo'zg'atilgan (14-rasm). Bu ilgari e'lon qilingan ma'lumotlarga juda mos edi [44].

Ionlarning membranani tashish darajasida PAK ta'sirini o'rganish, shuningdek, B - limfotsitlarga nisbatan polianionning selektivligini ko'rsatdi. Shunday qilib, membrananing ion uzatish ATFazalarining faollashishi, shuningdek K^+ va Ca^{2+} passiv oqimlarining ko'payishi bizning tajribalarimizda faqat B hujayralarining suspenziyasida kuzatildi (15-rasm a, b, v.). Yetilgan taloq T-limfotsitlari membrana iontransport tizimlarini faollashtirish orqali polianion qo'shilishiga javob bermadi. Olingan ma'lumotlar bilan bog'liq holda quyidagi ishchi gipoteza bildirildi [90]. Bu T va B limfotsitlari o'rtasidagi sirt elektr zaryadidagi farqlar haqida ko'plab ma'lumotlarga asoslangan edi. Ma'lumki, sichqonchaning yetuk T-limfotsitlari yuqori sirt manfiy zaryad zichligiga ega. Bu elektr maydonidagi T hujayralarining katta harakatchanligi, T hujayralarining bir xil zaryadlangan substratga - plastmassa, neylon va boshqalarga yopishmasligi bilan ifodalanadi. Biz ishda rahbarlik qilgan ishchi gipoteza, yetilgan taloq T hujayralariga PAK ta'sirining yo'qligi bu hujayralar yuzasida manfiy zaryadlangan guruhlarining yuqori zichligi bilan belgilanadi, deb taxmin qildi. Gipotezadan kelib chiqadiki, PAK sirt zaryadi kamroq bo'lgan T hujayralariga, xususan, sichqon timusidan yetilmagan T hujayralariga va neyronlar bilan oldindan davolangan yetilgan T hujayralariga ta'sir qilishi kerak.

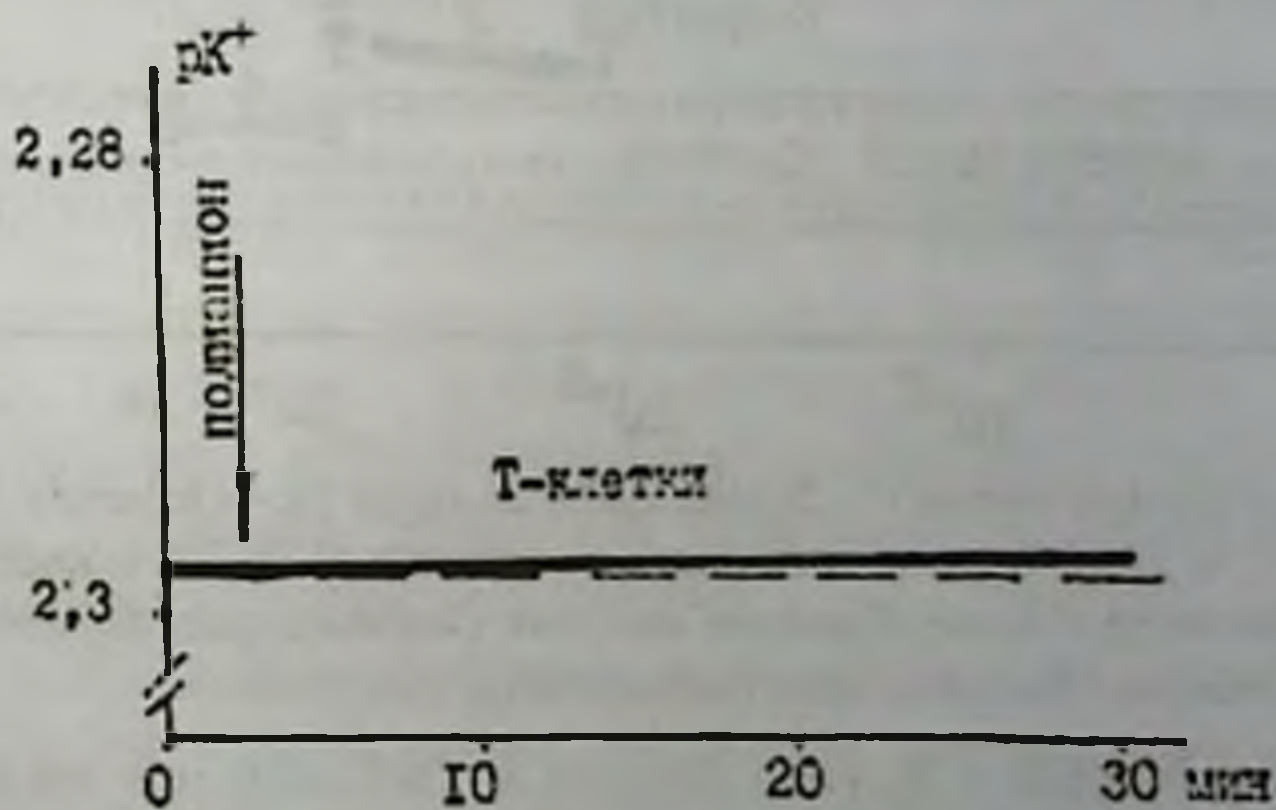
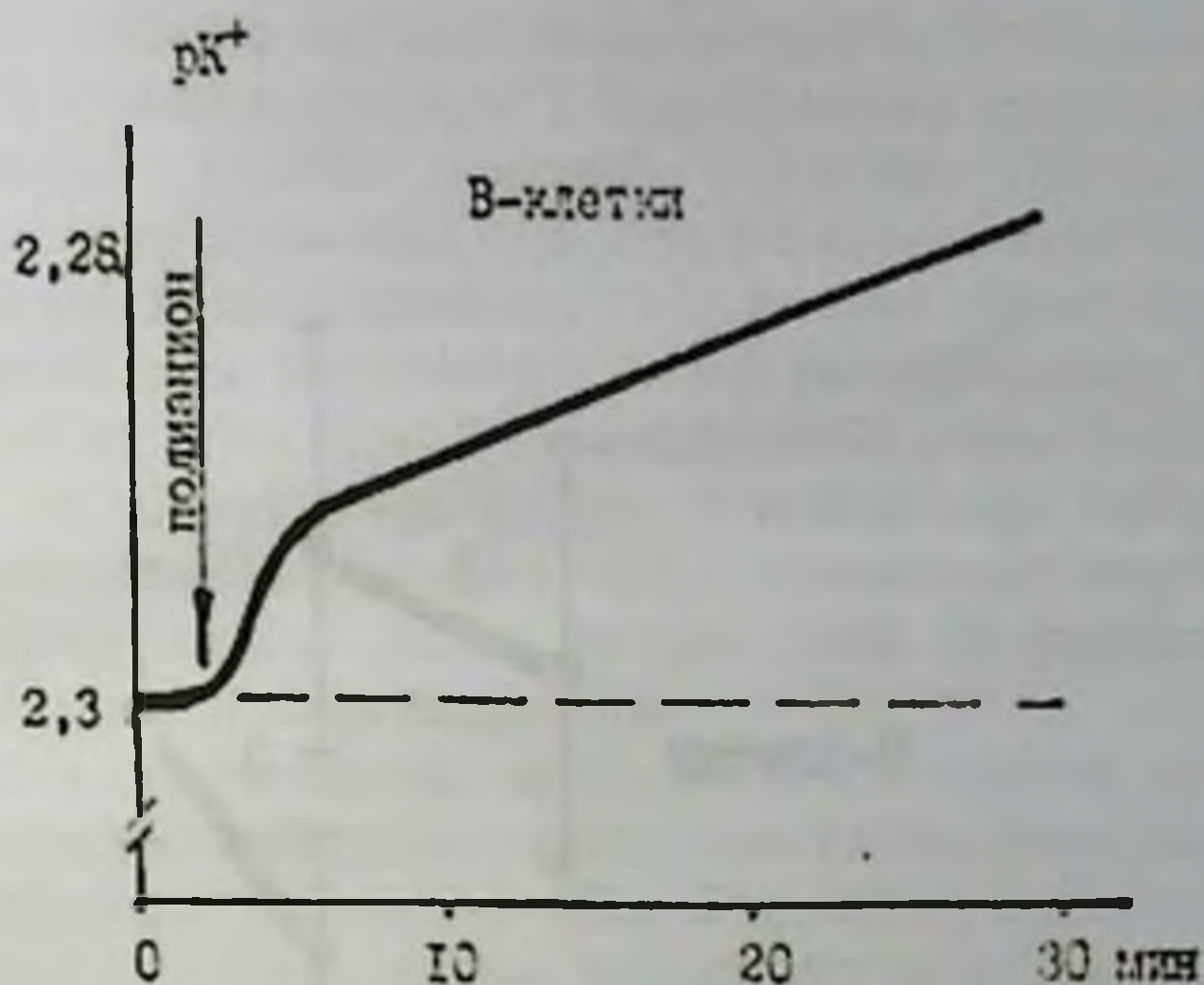


14-rasm. Polianionlarning vitro hujayra ekmasida T va B limfotsitlarining boyitilgan subpopulyatsiyasiga mitogen ta'siri.

1-buzilmagan faol bo'lmagan hujayralar; 2 - poliakril kislota bilan faollashtirilgan hujayralar; 3-dekstran sulfat bilan faollashtirilgan hujayralar. Ordinats o'qlari bo'ylab - 3H - timidin hujayralari tomonidan qo'shilish intensivligi (imp/min).

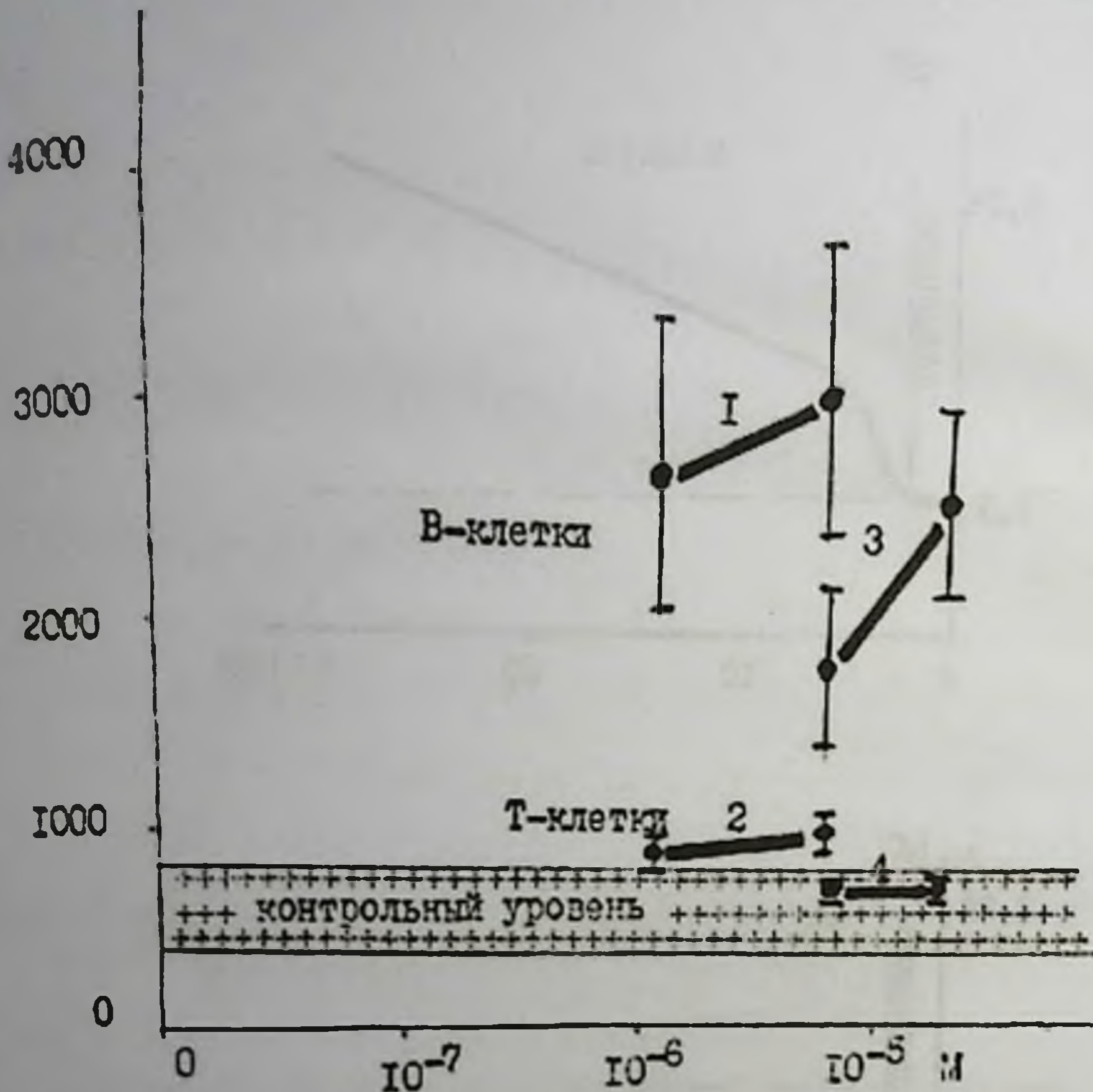


15-rasm. T va B limfotsitlar membranasida polianion iontransport qiluvchi ATFazalarning faollashishi. Abscissa o'qi bo'ylab-in vitro poliakril kislotasining yakuniy konsentratsiyasi (mkg/ml). Ordinats o'qi bo'ylab-umumiy hujayra ATFazasining faollashuv koeffitsienti (ATF darajasi - hujayralar faollashuvidan oldin darhol hujayralar faolligini sarf qilish orqali 1,0 deb qabul qilinadi). Taloq T hujayralari fraktsiyasi (1), taloq B hujayralari fraktsiyasi (2) va neyraminidaza bilan oldindan davolangan taloq T hujayralari (3) faollashishi natijasida olingan ma'lumotlar keltirilgan.



15 b - rasm. Polianionning B-limfotsillar (a) va T-limfotsitlarning boyitilgan fraksiyasi suspenziyasida hujayralardan hujayradan tashqari muhitga passiv K^+ oqimlariga ta'siri. O'q bo'yicha: ordinat - hujayradan tashqari muhitda K^+ ($pK^+ = \lg [K^+]$) konsentratsiyasi; abscissa - in vitro hujayralarining inkubatsiya vaqti (min).

Strelkalar limfoid hujayralar suspenziyasiga poliakril kislotani (oxirgi konsentratsiyasi 10^{-6} M) "inyektsiya" lahzalarini ko'rsatadi.



15 v - rasm. Poliakril kislota (1, 2) yoki dekstran sulfat (3, 4) ta'sirida T - limfotsitlardan (2, 4) farqli o'laroq, B-limfotsit ekmalarida (1, 3) ^{45}C izotopi uchun hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshirish. Ordinatsiya o'qida - hujayralardan olingan ekstraktlarning radioaktivligi (imp/min).

Abscissa o'qi bo'ylab – in vitro hujayralar faollashganda inkubatsiya muhitida polianionning konsentratsiyasi. T hujayralarini neyraminidaza bilan davolash tashqi membranadagi terminal N-asetilneuramin guruhlarining zichligini keskin kamaytirishga imkon beradi. Aynan shu guruhlar yuqori salbiy sirt zaryadining asosiy elementi bo'lganligi sababli, neyraminidaza bilan davolash T-limfotsitlar yuzasida salbiy zaryad zichligini sezilarli darajada kamaytirishga imkon beradi.

Biz o'tkazgan tajribalar shuni ko'rsatdiki, PAK neyraminidaza bilan oldindan davolangan yetilgan T hujayralarining iontransport tizimida aniq o'zgarishlarni keltirib chiqaradi (15-rasm). Ushbu hujayralardagi ATFazalarning faollashishi PAK ning B limfotsitlariga ta'siridan kam emas edi va boshlang'ich darajasining 135% ga yetdi. Timotsitlar membranasida ion transportining modifikatsiyasi ham samarali amalga oshirildi. Ya'ni, polianionning ta'siri faqat B hujayralari bilan chegaralanmaydi. Bu kichik manfiy sirt zaryadiga ega bo'lgan T-limfotsitlarga faollashtiruvchi ta'sir ko'rsatishi mumkin. Faqatgina tashqi membranada manfiy zaryadlangan guruhlarning zichligi yuqori bo'lgan yetuk T hujayralari PAK ning faollashtiruvchi ta'siriga sezgir emas.

Ushbu eksperimental tadqiqotning asl vazifasi nuqtai nazaridan, polianionning membranotrop ta'siri faqat bo'linishlarni faollashtirish bilan javob beradigan hujayralarda (B - limfotsitlar) sodir bo'lishi muhimdir. Polianion qo'shilishiga javoban bo'linmagan taloq T hujayralarida biz erta membrana ta'sirini kuzatmadik.

2. Polimer bo'lmagan tabiatdagi membranotrop moddalarning immunostimulyatsion ta'siri.

Aytaylik, membrana o'tkazuvchanligining o'zgarishi hujayraning polianionga javobini faollashtiradigan va shuning uchun polianionning immunostimulyatsion xususiyatlarini aniqlaydigan asosiy jarayondir. Ushbu taxminga asoslanib, polimer bo'lmagan taqdirda ham hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshiradigan polimer bo'lmagan moddalar yordamida limfotsitlar reaktsiyasi va immunitet reaktsiyasini faollashtirish mumkin deb taxmin qilish mumkin. Ushbu taxminga asoslanib, biz bir nechta membrana faol effektorlari - levorin, gramitsidin - S, nistatin bo'yicha immunomodulyatsion xususiyatlarni o'rganib chiqdik. Amaldagi moddalar turli xil kimyoviy tuzilmalarga ega edi, ammo hujayra membranalarning tropikligi va fosfolipid membranalarning ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshirish qobiliyatiga o'xshash edi [10, 35]. Biz ushbu moddalarning in vitro limfoid hujayra ekmalarida mitogen ta'sirini va in vitro antitela sintezini induktsiyalashda immunostimulyatsion ta'sirini sinab ko'rdik.

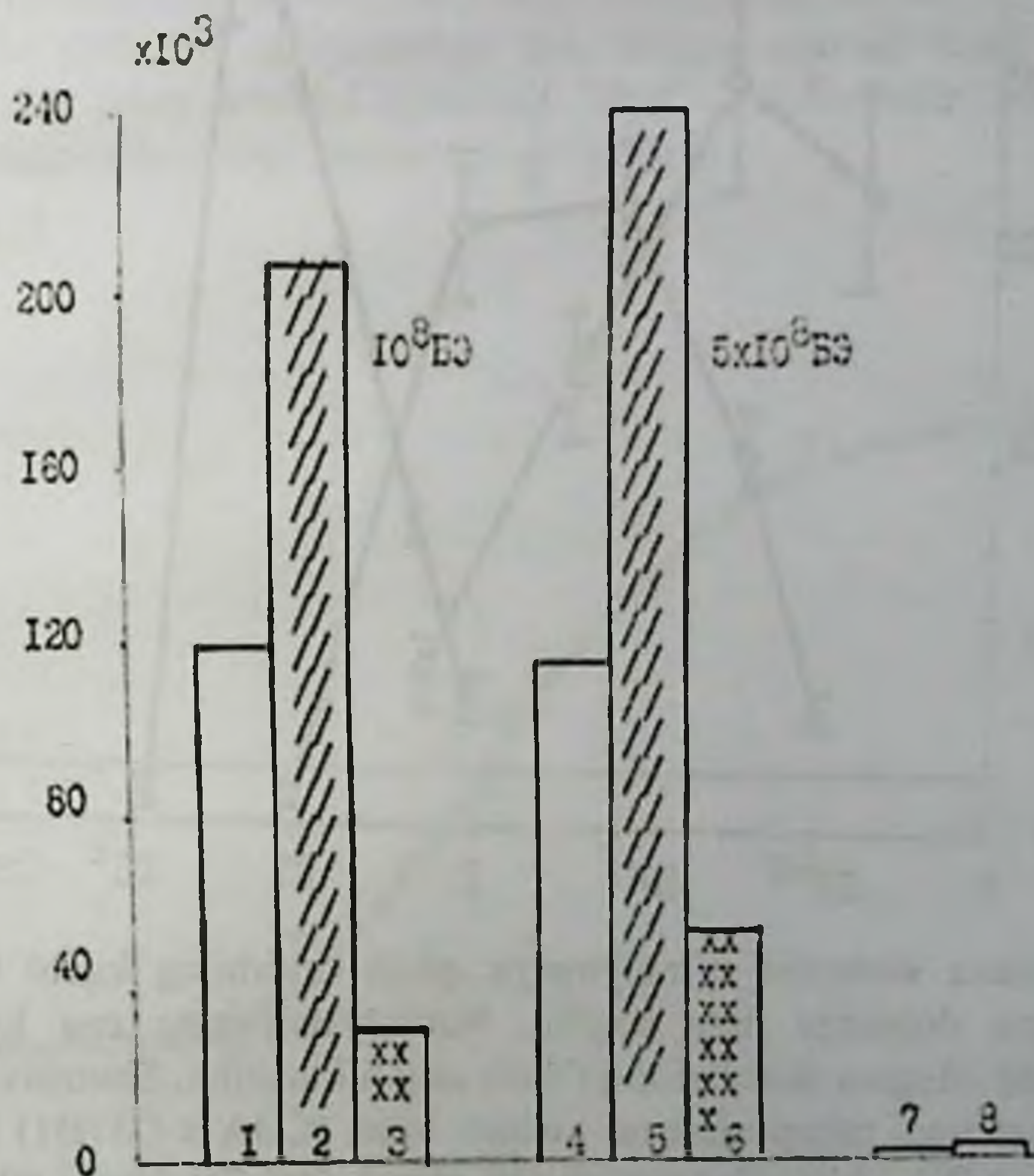
Mitogen ta'sir.

Sichqoncha hujayralarining suspenziya ekmasiga nistatin yoki levorinning kiritilishi DNK sintezi intensivligining oshishiga olib keldi (16-rasm). 3H - timidinning 48-72 soat oralig'ida kiritilishi, ekinlar faollashgandan so'ng, nazorat darajasiga nisbatan 3-7 baravar ko'paydi. DNK sintezining bunday faollashuv koeffitsientlari ichak guruhidagi bakteriyalardan konkanavalin A yoki lipopolisakkariddan foydalanganda faollashuv koeffitsientlaridan sezilarli darajada past bo'ladi. Ushbu "an'anaviy" mitogenlardan foydalanganda 3H-timidinni kiritish uchun stimulyatsiya koeffitsientlari 20-30 ga yetdi. Shu bilan birga, shuni ta'kidlash kerakki, ilgari poliionlardan foydalanganda DNK sintezining nisbatan zaif stimulyatsiyasi qayd etilgan. Poliionlar mitogen hujayra javobining birinchi bosqichini, hujayra siklining G₀-dan G₁ fazasiga chiqishini keltirib chiqarishi aniqlandi. G₁ - S birikmasi poliionlar tomonidan kuchsiz induktsiya qilinadi. Shu ma'noda membrana faol moddalarining mitogen ta'siri - levorin, gramitsidin S va nistatin-poliionlar ta'siriga o'xshash. Bundan tashqari, Ca²⁺ - ionofor - A23187 bizning tajribalarimizda ham xuddi shunday ta'sirga ega edi. A23187 harakati 3H - timidinni 4-5 marta yoqishni faollashtirishdan iborat edi, bu adabiyotlardagi ma'lumotlarga juda mos edi [152, 74, 75].

In vitro antitelalarning birlamchi sintezini rag'batlantirish.

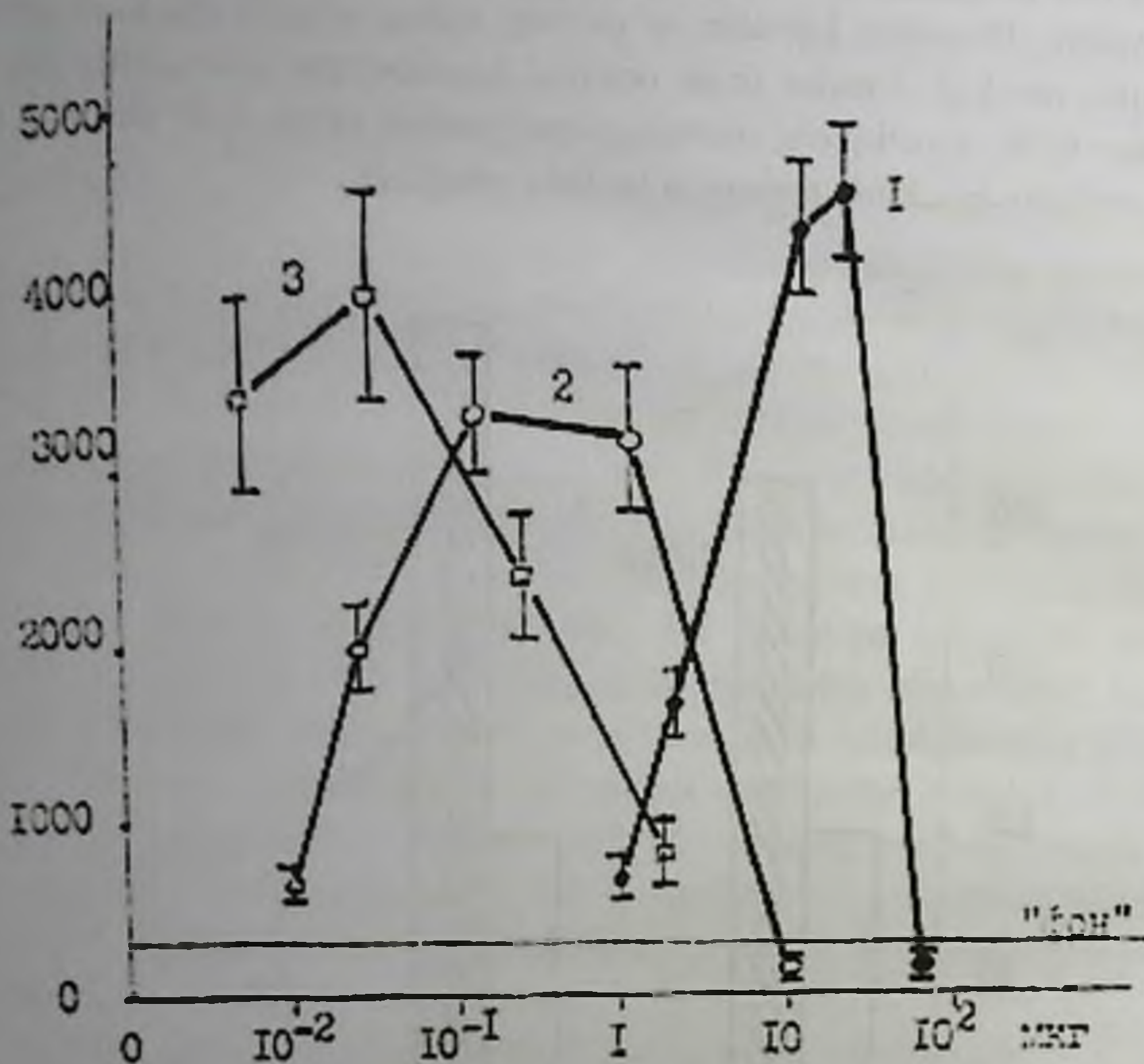
Sichqonlarda antitelalarni sintez qilish modelida geterologik eritrotsitlar antigenlariga (xususan, qo'zichoq eritrotsitlari, BE) javoban immunostimulyatorlarni tekshirish juda qulaydir. Gramitsidin S ni 10 yoki 100 mkg dozada (sichqoncha uchun) 108 EB bilan birgalikda qo'llaganimizdan so'ng, biz taloqlarda EB ga xos antitela hosil qiluvchi hujayralar (AFC) darajasida sezilarli o'zgarishlarni kuzatdik (17-rasm). 10 mkg dozasi AFC ishlab chiqarishni rag'batlantirdi va 100 mkg dozasi uni sezilarli darajada o'zgardirdi. Birinchi tajribalardan boshlab doza-ta'sir munosabatlarini batafsil o'rganish zarurati paydo bo'ldi. Natijada, gramitsidinni EB bilan birgalikda 1 dan 30 mkg gacha bo'lgan dozalarda qo'llash antitelalarning paydo bo'lishini sezilarli darajada rag'batlantirishga

olib kelishi aniqlandi. 50 mkg dan ortiq dozalar - AOK ishlab chiqarishni kuchaytirdi (18-rasm). Levorin va nistatin uchun shunga o'xshash dozaga bog'liqlik mavjud. Farqlar faqat optimal kontsentratsiyalar oralig'ida edi. Shunday qilib, levorinning immunostimulyatsion ta'siri 0,01 dan 0,2 mkg gacha bo'lgan dozalarda namoyon bo'lishi aniqlandi.



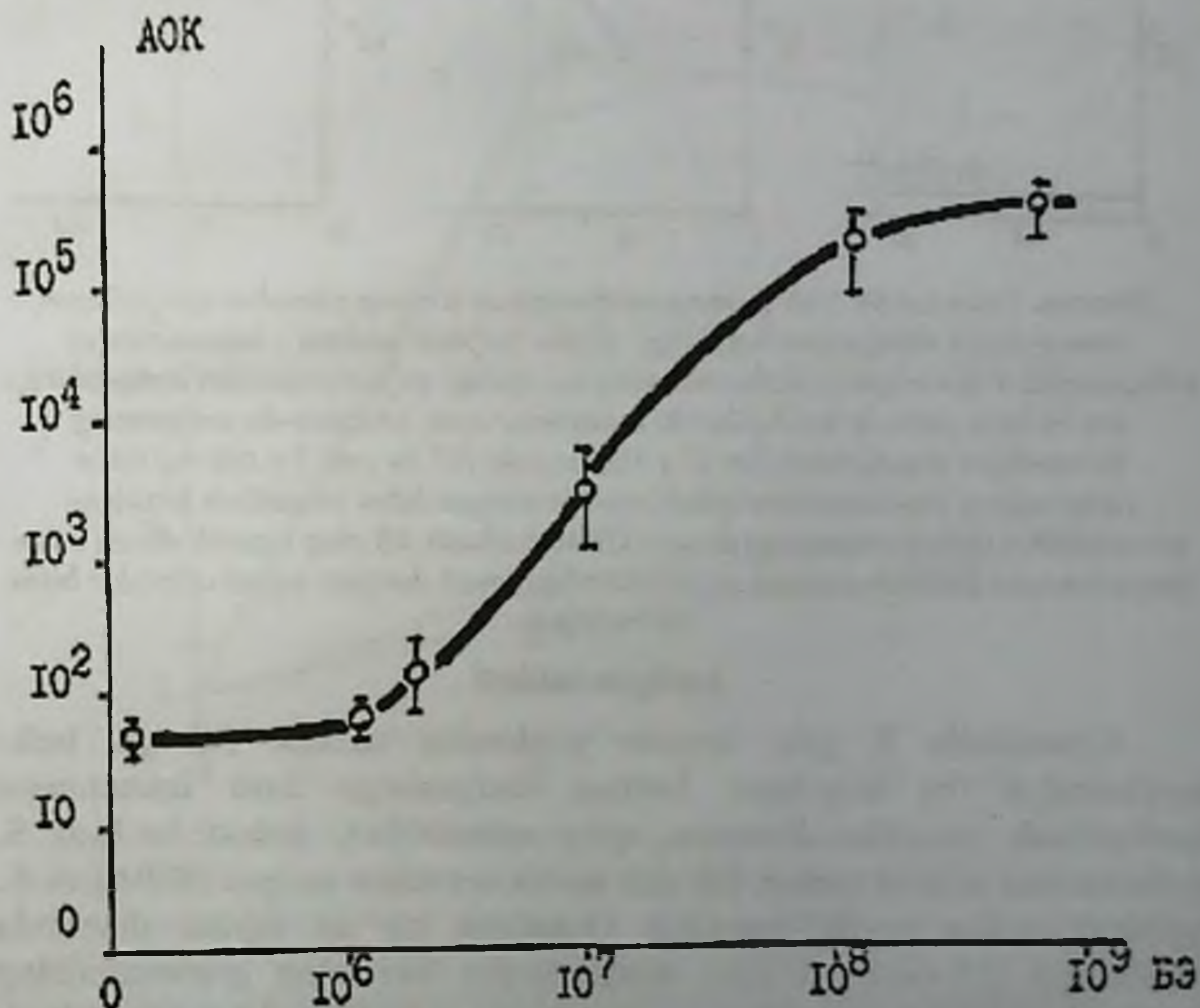
17-rasm. Geterologik eritrotsitlar (BE, qo'zichoq eritrotsitlari) antigenlariga qarshi antitela hosil bo'lish reaksiyasiga gramitsidin S ning immunomodulyator ta'siri. Ordinat o'qida: sichqonlarning taloqlarida BE antigenlariga xos antitelar hosil qiluvchi hujayralar to'planishi (emlashdan keyingi 4 - kun). Sichqonlar intraperitoneal 10⁸ BE (1, 2, 3) yoki 5x10⁸ be (4, 5, 6) bilan emlangan. Antigen bilan birgalikda sichqonlarga 10 mkg (2, 5) yoki 100 mkg (3, 6) gramitsidin S berildi, 7 va 8-guruhlarda sichqonlarga antigensiz mos ravishda 10 yoki 100 mkg gramitsidin yuborildi.

Antigen dozasi

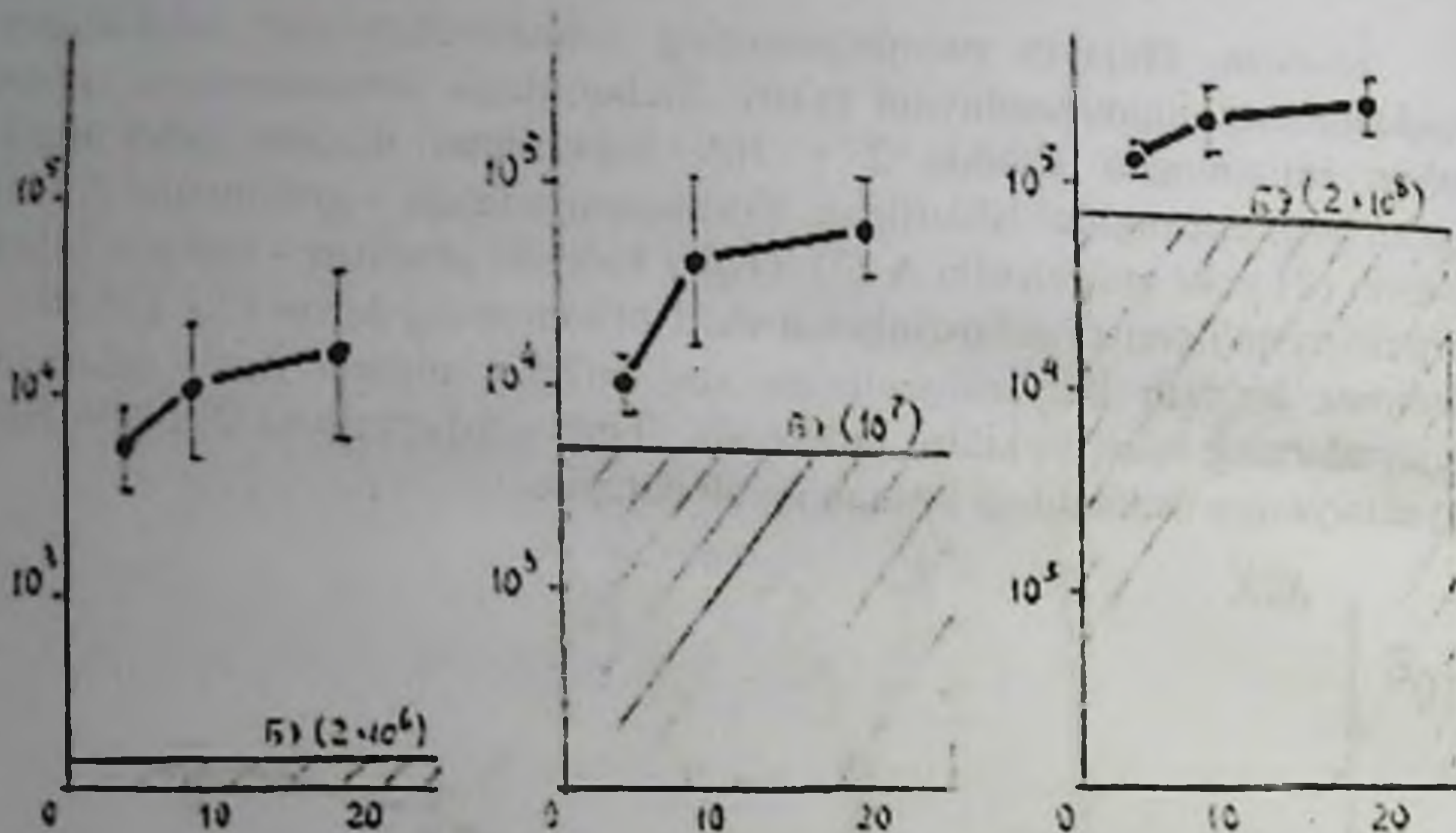


Antitana sintezini stimulyatsiya qilish ta'sirining kuchi ishlatilgan immunogen dozasi juda bog'liq. Stimulyatsiyaning eng katta ta'siri antigenning chegara dozalarini qo'llash orqali kuzatildi. Shunday qilib, 106 BE sichqonchani intraperitoneal kiritish bilan (CBA x C57B1) F1 deyarli o'ziga xos AOK ishlab chiqarmadi (19-rasm). 107 BE dozasi taloqda 5-10 ming o'ziga xos AOK hosil bo'lishiga olib keldi. Va 108 BE dozasi taxminan - 50 - 100 ming AOK. Be gramitsidin bilan birgalikda qo'llanilgandan so'ng, chegara reaksiyasini rag'batlantirish koeffitsientlari 20-50 ga etdi. Masalan, AOK mahsulotlari nazoratda 400-500 ga nisbatan 10 mingga etdi. O'rtacha intensivlikdagi javob o'rtacha 7-8 baravar oshdi, 5-10 ming AOK dan 35-80 ming AOK gacha. Maksimal darajaga yaqin bo'lgan reaksiya atigi 1,5 - 2 baravarga oshdi (20-rasm).

18-rasm. Hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshiradigan moddalarning immunoaduvant ta'siri. Sichqonlarni immunizatsiya qilish uchun immunogen sifatida 2×10^6 Suboptimal dozada geterologik (qo'zichoq) eritrotsitlar ishlatilgan. Yordamchi sifatida - gramitsidin S (1), levorin (2) yoki gramitsidin A (3). O'qlar bo'ylab: abscissa - antigen bilan birgalikda qo'llaniladigan membrana-aktiv effektorning dozasi (2×10^6 BE). Ordinata bo'ylab BE antigenlariga xos bo'lgan antitela hosil qiluvchi hujayralarning taloq tarkibini ko'rsatadi. "Fon" - adyuvantsiz 2×10^6 BE inyektsiyasiga nazoratdagi immun javob darajasi.



19-rasm. Antitela hosil bo'lish darajasining sichqonlarga berilgan antigen (BE) dozasi bog'liqligi. Abscissa bo'ylab: antigen dozasi (sichqonchada BE hujayralari miqdori). Y o'qi: antigen inyektsiyasidan 4 kun o'tgach, sichqonlarning taloqidagi BE antigenlariga xos bo'lgan antitela hosil qiluvchi hujayralar (AOK) tarkibi.

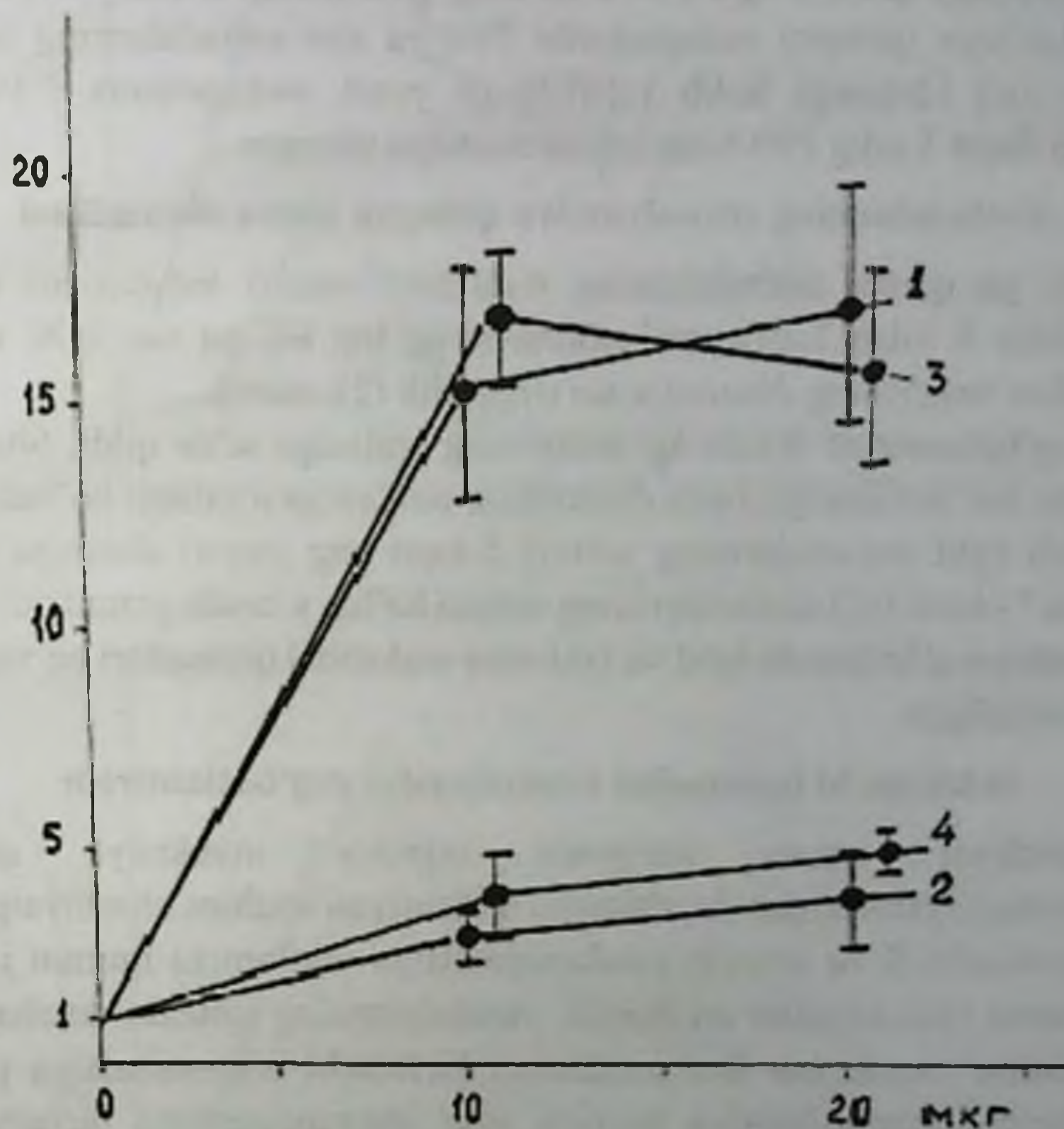


20-rasm. Gramitsidin S ning immunoadyuvant ta'sirining stimulyatsiya qilingan immun javob darajasiga bog'liqligi. O'qlar bo'ylab: ordinat - immunizatsiya qilinganidan 4 kun o'tgach, sichqonlarning taloqidagi qo'y eritrotsitlari antigenlariga xos bo'lgan antitela hosil qiluvchi hujayralar soni; abscissa-bu antigenning ko'rsatilgan dozalaridan biri (2×10^6 be yoki 10^7 be yoki 2×10^8 be) bilan sichqonlarni immunizatsiya qilish paytida antigen bilan birgalikda kiritilgan gramitsidin s (mkg/sichqoncha) dozasi. Gramitsidinsiz BE ning tegishli dozasi bilan immunizatsiya qilingan nazorat hayvonlaridagi javob darajasi soyali chiziqlar bilan ko'rsatilgan.

Antigen tabiati

Gramitsidin S yoki levorin yordamida nafaqat BE ga, balki korpuskulyar va eriydigan boshqa antigenlarga ham immunitetni kuchaytirish mumkin. Xususan, qo'y eritrotsitlari, nobud bo'lgan *S. typhimurium* mikroob tanasi, BE dan suvda eruvchan antigen (WPA) va *S. typhimurium*dan suvda eruvchan O-antigen bir xil tajriba sharoitida solishtirildi (21-rasm). Ushbu antigenlardan biri bilan gramitsidinning kiritilishi antitelalarning o'ziga xos sintezining oshishiga olib keldi. Mikroob hujayralariga javobni rag'batlantirish darajasi begona eritrosit hujayralariga javobni kuchaytirish darajasiga yaqin edi (rag'batlantirish koeffitsienti taxminan 20 ga teng). Xuddi shu begona hujayralardan (be yoki *S.*

typhimurium) suvda eriydigan antijenler bilan emlash paytida Antikor sintezining past darajalariga e'tibor qaratiladi. Membranotropik agent suvda eriydigan antijen bilan birgalikda qo'llanilganda, Antikor ishlab chiqarishning daromad omillari 3-5 dan oshmadi (1 - rasm). 21).



21-rasm. Korpuskulyar (1, 3) yoki suvda eriydigan (2, 4) antigenler yordamida antitela sintezini qo'zg'atishda gramitsidin S ning immunoadyuvant ta'siri. Ordinatsiya o'qi bo'yicha: antitelagenezni stimulyatsiya qilish koeffitsienti (faqat antigen bilan emlash paytida tegishli nazoratda antitelagenez darajasi 1,0 ga qabul qilinadi); abscissa bo'ylab-antigen bilan birgalikda berilgan gramitsidin S dozasi. Immunizatsiya: 1 - 2×10^6 BE; Simone usuli bilan ajratilgan BE dan 2 - 1 mg suvda eriydigan antigen; o'ldirilgan salmonellalarning 3 - 100 mkg mikrob massasi (*S. typhimurium*); 4 - 1 mkg 0-xuddi shu salmonellalarning antigeni.

Gramitsidin S ning immunoadyuvant dozalarini p90 protein antigeni (sibir yarasi qo'zg'atuvchisidan) bilan birga kiritish, faqat oqsilga bo'lgan javob bilan solishtirganda, antitelalarning yanada kuchli shakllanishiga olib keldi. Shunday qilib, 3 kg P90 va 10 mkg gramitsidin S aralashmasi bilan immunizatsiya qilingan sichqonlarda P90 ga xos antitelalarning darajasi (IFA – titr) 12-kunga kelib 1:30720 ga yetdi, sichqonlarda 1:1920 ga nisbatan faqat 3 mkg P90 bilan immunizatsiya qilingan.

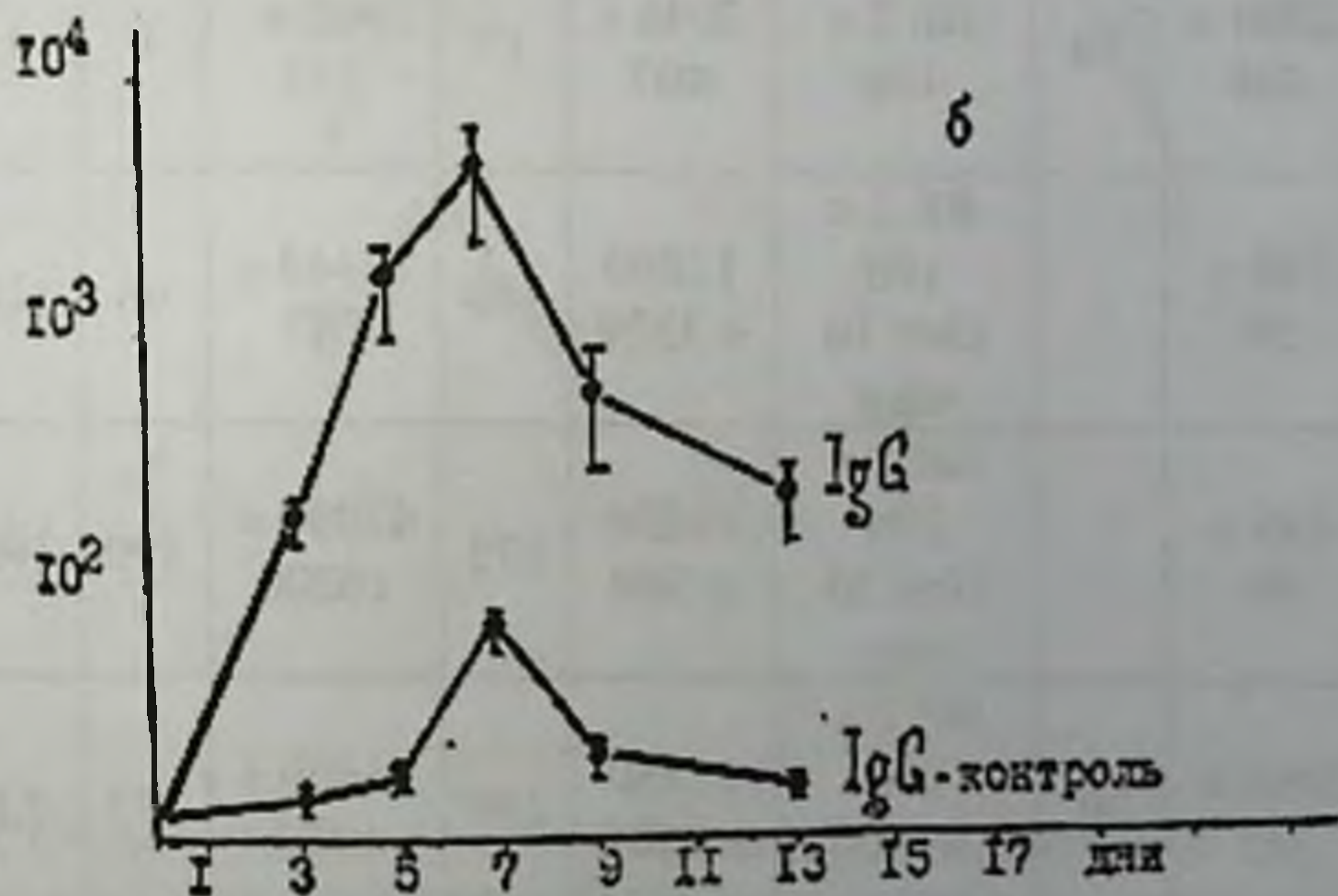
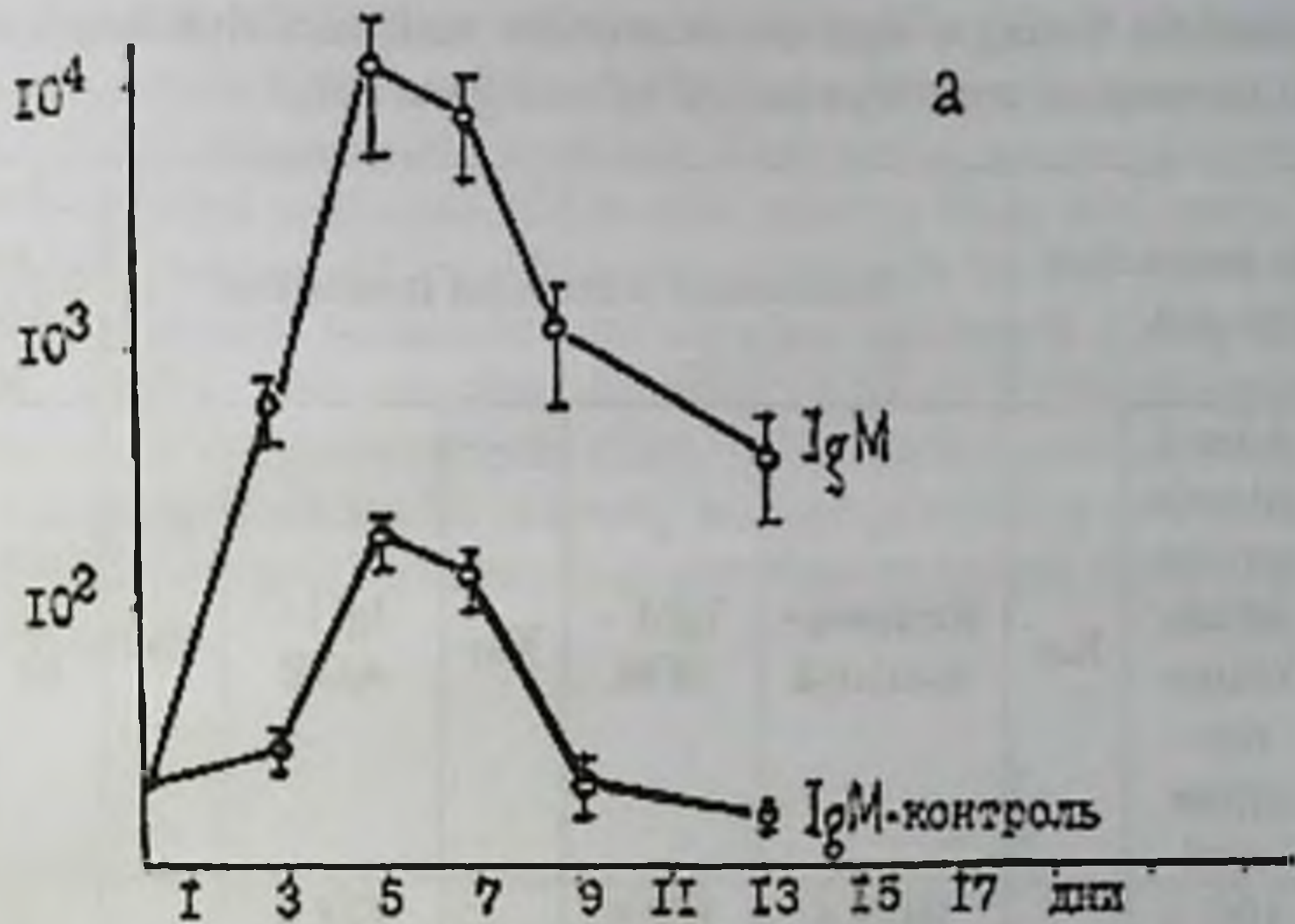
Antitelalarning stimulyatsiya qilingan sintez dinamikasi

BE ga qarshi antitelalarning birlamchi sintezi induksiyasi va uni gramitsidin S bilan kuchaytirilgandan so'ng biz BE ga xos IgM va IgG antitelalari sintezining dinamikasini o'rgandik (22-rasm).

Rag'batlantirish ikkala Ig izotipining sinteziga ta'sir qildi. Shu bilan birga, har bir izotipning sintez dinamikasi nazoratga o'xshash bo'ladi. Agar nazoratda IgM antitelalarining sintezi 5-kuni eng yuqori darajaga yetgan bo'lsa va 7 - kuni IgG antitelalarining sintezi bo'lsa, u holda gramitsidin bilan stimulyatsiya qilinganida IgM va IgG ning maksimal qiymatlari bir vaqtning o'zida kuzatilgan.

Ikkilamchi immunitet reaksiyasini rag'batlantirish

Amaliyot uchun antigenni takroriy inyektsiya qilishda immunostimulyatorlardan foydalanish imkoniyati muhim ahamiyatga ega. Biz gramitsidin S va levorin yordamida BEga ikkilamchi immun javobni kuchaytirish imkoniyatini tekshirdik. Antitelalarning sintezini kuchaytirish uchun ushbu membrana faol moddalari birlamchi immunizatsiya paytida yoki takroriy immunizatsiya paytida yoki immunogenning birlamchi va takroriy kiritilishi bilan ikki marta qo'llanilishi mumkinligi ma'lum bo'ldi (1-jadval). Ikkilamchi IgG antikori sintezining eng yuqori darajasi birinchi emlash paytida yoki ikki marta, birinchi va ikkinchi emlash paytida membranotropik modda kiritilganda kuzatilgan. Bundan tashqari, biz gramitsidin faqat birinchi yoki faqat ikkinchi emlashda qo'llanilganda, javob darajalariga nisbatan membrana faol moddasini ikki marta yuborish bilan stimulyatsiya ta'sirining yig'indisini kuzatmadik.



22-rasm. IgM - (a) va IgG - (b) 2×10^6 BE (nazorat) yoki 2×10^6 BE aralashmasi va 10 mkg gramitsidin aralashmasi bilan immunizatsiya qilingan sichqonlarning taloqida IgM - (a) va IgG - (b) antitela ajratuvchi hujayralar to'planish dinamikasi S. O'q bo'ylab: ordinat-taloq uchun antitela ishlab chiqaruvchilar soni; abscissa - sichqonlar emlanganidan keyingi kunlar ko'rsatgichi.

Gramitsidin S ning o'ziga xos immunitet xotirasini shakllantirishga va ikkilamchi immunitet reaksiyasini qo'zg'atishga ta'siri.

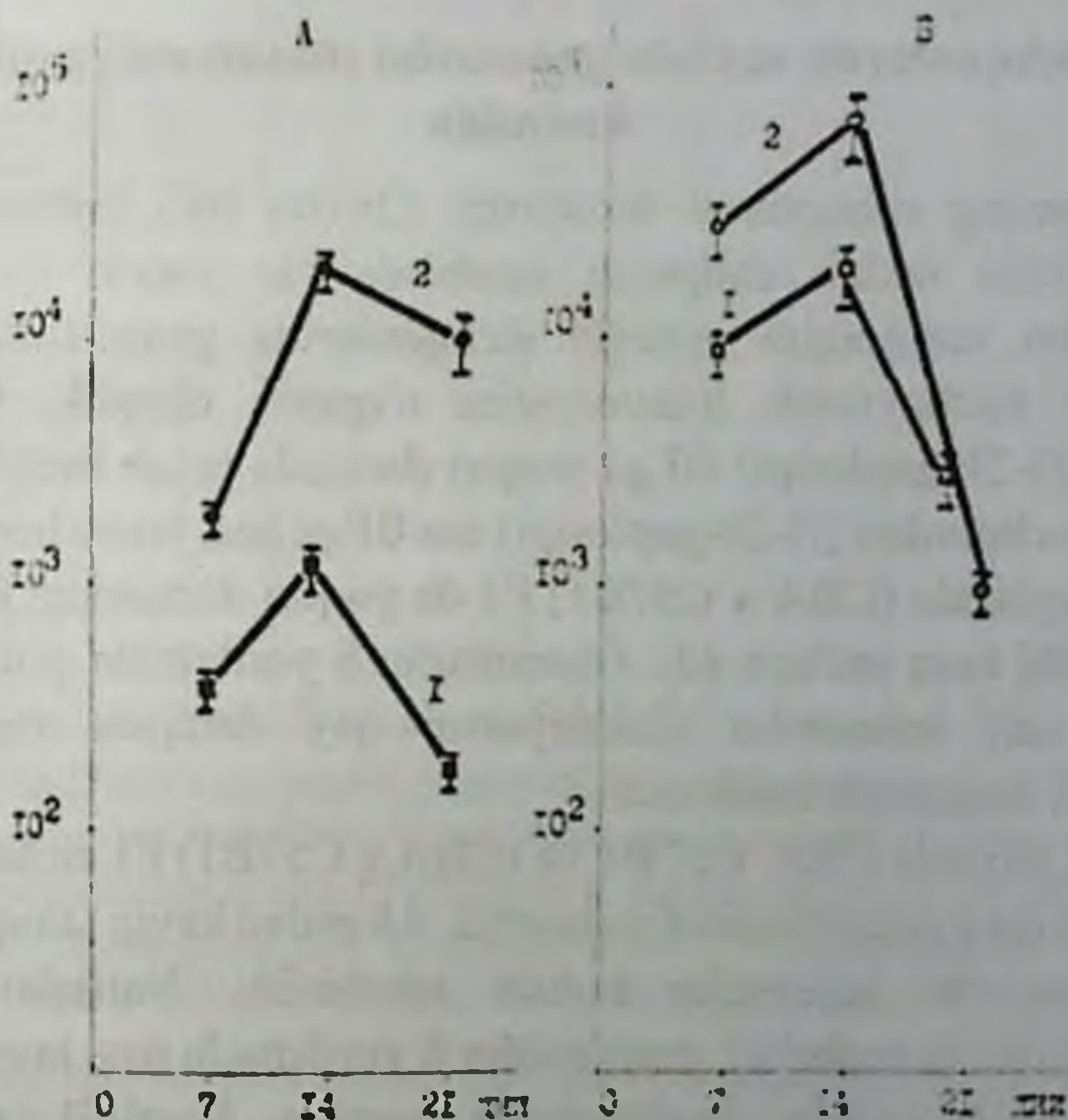
Birlamchi immunitet reaksiyasi			Ikkilamchi immunitet reaksiyasi					Immun xotira koeffitsienti	
Immunizatsiya	4-kuni taloqda antitela ishlab chiqaruvchilar soni	K _{ST}	Reimmunizatsiya	IgM - AOK	K _{ST}	IgG - AOK	K _{ST}	Ig M	IgG
BE 2 x 106	100 ± 37	-	BE 2 x 106	120 ± 44	-	128 ± 51	-	1,2	1,3
BE 2 x 106 Grst 10 mkg	2300 ± 396	23	BE 2 x 106	2046 ± 407	17	992 ± 113	8	1	1
BE 2 x 106	150 ± 29	-	BE 2 x 106 Grst 10 mkg	17860 ± 3329	160	12444 ± 287	96	110	100
BE 2 x 106	136 ± 49	-	BE 2 x 106 Grst 20 mkg	21050 ± 589	175	47990 ± 10200	390	160	375
BE 2 x 106 Grst 10 mkg	2005 ± 345	20	BE 2 x 106 Grst 20 mkg	15780 ± 3100	130	35600 ± 6400	273	7,8	17,5

Izoh: Grts - gramitsidin S; BE - qo'y eritrotsitlari.

K_{ST}-stimulyatsiya koeffitsienti, immunizatsiya paytida tegishli nazoratga nisbatan gramitsidin S ni be bilan birgalikda yuborish natijasida immunitet reaksiyasi necha marta oshdi. Immunitet xotirasi koeffitsienti-sichqonlarning

bir xil guruhidagi ikkilamchi darajaning birlamchi javob darajasiga nisbati (birlamchi javobda IgM - va IgG – AOK soni taxminan teng edi).

Quyidagi qiziq ma'umotlarni ta'kidlash joiz. Immunogenning juda past chegara dozalarini qo'llashda (25 kunlik interval bilan ikki marta 10^6 EB), nazoratdagi asosiy va ikkilamchi reaksiyalar juda kichik. Bundan tashqari, ikkilamchi reaksiya birlamchi reaksiyadan oshmaydi (taloq uchun atigi 100-200 AOK). Gramitsidin S ning optimal immunostimulyatsion dozasidan faqat antigeni birinchi marta yuborishda foydalanish antigenning chegara dozasi juda kuchli ikkinchi darajali javobning rivojlanishiga olib keldi. Ikkinchi antigen inyektsiyasiga javoban taxminan 50,000 IgG – AOK ishlab chiqarildi.



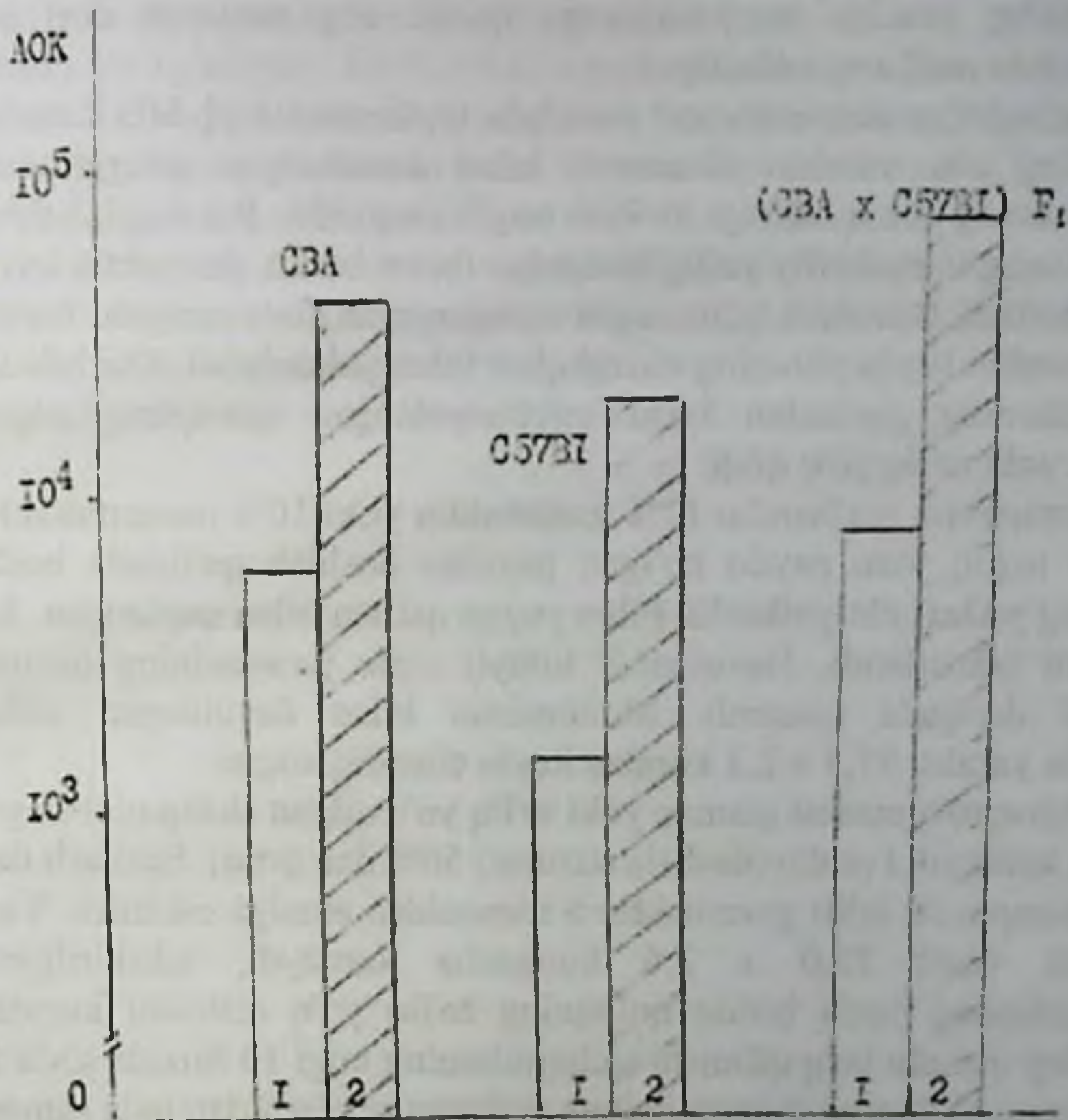
23-rasm. Gramitsidin S yordamida kuydirgi qo'zg'atuvchisidan p90 oqsil antijeniga antikor hosil bo'lishini rag'batlantirish. O'q bo'ylab: ordinat - immunizatsiya qilingan sichqonlar zardobida p90 ga antitelalarning darajasi (IFA - titri); abscissa - takroriy emlashdan keyingi uzunlik (1) p90 oqsili yoki (2) p90 + gramitsidin S aralashmasi bilan. Emlash uchun p90 dozalari ishlatilgan: 3 mkg/sichqoncha (A) yoki 30 mkg/sichqoncha (B). Gramitsidinning dozasi ikkala holatda ham sichqon uchun 10 mkg ni tashkil etadi.

Biz P90 oqsil antigeniga ikkilamchi immunitet reaksiyasi bilan IgG antitelalarini ishlab chiqarishni sezilarli darajada rag'batlantirishni kuzatdik (23-rasm). 10 mkg gramitsidin S ni 3 mkg yoki 30 mkg p90 antigeni bilan bir vaqtda kiritish faqat antigenni kiritishdan ko'ra 3-10 baravar kuchli antitela reaksiyasini keltirib chiqardi. Bunday holda, shuningdek, gramitsidin S bilan mustahkamlangan antitela hosil bo'lish dinamikasi, asosan, gramitsidin Ssiz antigen bilan immunizatsiya qilingan nazorat guruhida antitelalarning to'planish dinamikasidan farq qilmasligini ta'kidlaydi. Dinamikani saqlab turganda, maksimal reaksiya sezilarli darajada oshadi (23-rasm).

Turli xil sichqonlarda antitela genezasini stimulyatsiya qilish inbred kesimida

Antigenning suboptimal dozalarini (2×10^6 BE) immunizatsiyasiga javoban antitela ishlab chiqarish modelida biz yuqori va past javob beradigan (bu antigenga) genotip sichqonlarida gramitsidin S immun reaksiyasini kuchaytirish imkoniyatini o'rganib chiqdik. Ilgari, CBA sichqonlari (H-2k gaplotipi) BEga yuqori darajada javob berishlari ma'lum edi, C57B1 sichqonlari (H-2b gaplotipi) esa BEga past javob beradi. Birinchi avlod duragaylarida (CBA x C57B1) F1 da yuqori darajadagi javob genlari ustunlik qilishi ham ma'lum edi. Gramitsidin S yordamida genetik jihatdan aniqlangan zaif immunitet reaksiyasini qay darajada rag'batlantirish mumkinligini tushunish kerak edi.

Emlash paytida CBA, C57B1 va (CBA x C57B1) F1 sichqonlariga 2×10^6 BE va 10 mkg gramitsidin S yuborildi. 4 kundan keyin taloqdagi antitela ishlab chiqaruvchi hujayralar tarkibi tekshirildi. Natijalar 24-rasmda keltirilgan. Ko'rinib turibdiki, gramitsidin S yordamida past javob beradigan C57B1 genotipida javobni kuchaytirish mumkin. Amplifikatsiya omillari yuqori sezgir CBA sichqonlari bilan bir xil edi. Yuqori va past javob beruvchi ota-onalarni kesib o'tishdan F1 duragaylarida gramitsidinning javob darajasi va stimulyator ta'siri darajasi yuqori javobli genotipli sichqonlardagi kabi deyarli bir xil edi.



24-rasm. Gramitsidin S ning yuqori reaktiv (C3A) yoki past reaktiv (C57B1) genotipli sichqonlarda va shu kabi birinchi avlod duragaylarida BE antijenlariga qarshi antikor shakllanishiga ta'siri. O'q bo'ylab 4 kundan keyin BE ga antitela ishlab chiqaruvchilar sonini ko'rsatadi. Sichqonlarni 10⁷ BE (1-ustun) yoki 10⁷ BE va 10 mkg gramitsidin S aralashmasi bilan immunizatsiya qilgandan keyin (2-ustun).

Sichqonlarda teri leishmaniozi modelida mahalliy infeksiyaga qarshi immunitetni rag'batlantirish.

Teri leishmaniozi jarayoni mahalliy infeksiyaga qarshi immunitet tufayli sust uzoq davom etishi bilan tavsiflanadi. Shuning uchun biz rasmiy gramitsidin pastasi bilan mahalliy immunitetni rag'batlantirishga harakat qildik. Nazorat guruhlaridan birida gramitsidin S ning antibiotik ta'sirining hissasini baholash uchun teri leishmaniozini davolashda qo'llaniladigan

antibiotiklar orasida leyshmaniyaga qarshi eng samarali dori sifatida monomitsin malhami ishlatilgan.

Sichqonlar eksperimental ravishda leyshmanioz (2 MB Leushmania majorning o'ta virulent shtammi) bilan kasallangan qo'zg'atuvchining ekmasini o'ng quloq terisiga kiritish orqali yuqtirildi. Patologik ko'rinishlar sekin o'tadigan mahalliy yallig'lanishdan iborat bo'lib, destruktiv teri yarasi paydo bo'ladi. Davolash qilinmagan sichqonlarda ifoda jarayoni faqat $123,9 \pm 2,9$ kundan keyin yaraning chandiqlari bilan yakunlandi. Shu bilan birga, sichqonlarning yarmidan ko'pi infektsiyalangan quloqning to'qimasini qisman yoki to'liq yo'q qildi.

Terapevtik malhamlar (2% gramitsidin yoki 10% monomitsin) quloq terisida ochiq yara paydo bo'lgan paytdan boshlab qo'llanila boshlandi. Yaraning yuzasi ehtiyotkorlik bilan yupqa qatlam bilan qoplangan. Jarayon har kuni takrorlandi. Davolanish tufayli shifo jarayonining davomiyligi sezilarli darajada qisqardi. Monomitsin bilan davolangan sichqonlar guruhida yaralar $97,3 \pm 2,1$ kundan keyin chandiqlangan.

Quloq to'qimasini qisman yoki to'liq yo'q qilgan sichqonlarning ulushi 25% ga kamaydi (va davolashsiz nazorat) 50% dan ortiq). Sezilarli darajada kuchli terapevtik ta'sir gramitsidin S tomonidan amalga oshirildi. Yaralarni davolash vaqti $75,0 \pm 2,6$ kungacha kamaydi, tekshirilgan 152 sichqonchanning hech birida quloqning to'liq yo'q qilinishi kuzatilmadi, quloqning qisman yo'q qilinishi sichqonlarning atigi 10 foizida sodir bo'ldi.

Gramitsidinning monomitsinga nisbatan sezilarli darajada samaraliroq terapevtik ta'siri gramitsidinning ta'siri nafaqat uning antibiotik faolligi bilan belgilanishini ko'rsatadi. Gramitsidin S ning mahalliy immunostimulyatsiya qiluvchi ta'siriga ega ekanligiga ishonish uchun yetarli asoslar mavjud, bu antibiotik ta'siri bilan birgalikda teri leyshmaniozida juda yaxshi terapevtik ta'sir ko'rsatadi.

Umuman olganda, hujayra membranalarning ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshiradigan polimer bo'lmagan membrana faol moddalarni sinovdan o'tkazish shuni ko'rsatdiki, bunday effektorlar in vivo immun reaksiyasini samarali rag'batlantirishi va in vitroda limfotsitlarning bo'linishini faollashtirishi mumkin. Shuning uchun hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshirish limfotsitlarning javobini va

umuman immun javobini faollashtirish uchun yetarli. Ya'ni, polianionlar tomonidan qo'zg'atilgan limfotsitlar membranasining o'tkazuvchanligini oshirishni bir vaqtda ta'sir deb hisoblash mumkin emas, lekin limfoid hujayralar javobining faollashuvi mexanizmi bilan bevosita bog'liq. Ushbu xulosa bilvosita 6.1-bandda keltirilgan ma'lumotlar bilan tasdiqlanadi, unga ko'ra limfotsitlarning faollashishi faqat polianion membrana darajasida (B-limfotsitlar) ionlarni o'zgartirganda sodir bo'ladi. Membranada ionlarni tashish darajasida polianion ta'sirining yo'qligi hujayralar (yetuk T-limfotsitlar) proliferativ reaksiyasining yo'qligi bilan birga keldi.

VI BOB. MUHOKAMA

Suvda eruvchan polielektrolitlar (R.M. Xaitov, R.I. Ataulloxonov va boshqalar) tomonidan immun javob faollashuvining molekulyar mexanizmini o'rganish bo'yicha kompleks dastur doirasida ishning bir qismini yakunladik. Biz immunokompetent hujayralarning javobini faollashtirish uchun ion o'tkazuvchanligi rolini o'rganib chiqdik. Birinchidan, biz limfoid hujayralar subpopulyatsiyalariga polianionlarning ionoforga o'xshash va mitogen ta'siri o'rtasidagi bog'liqlikni o'rgandik. Ikkinchidan, biz polimer bo'lmagan birikmalarning immunomodulyatsion xususiyatlarini tahlil qildik, ular polielektrolitlar singari hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshirish qobiliyatiga ega.

Salbiy zaryadlangan poliionlar - poliakril kislota va dekstran sulfatning limfoid hujayralar tashqi membranasining ion o'tkazuvchanlik xususiyatlariga ta'siri o'rganildi. Oldingi tajribalarda polianionning immunostimulyator ta'siri uning immunokompetent hujayralarga bevosita ta'siri bilan aniqlanishi isbotlangan [22, 34, 23]. Adabiyotlarni ko'rib chiqishda xabar berganimizdek, poliion limfotsitlarni hujayra bo'linish siklining boshlang'ich bosqichiga (G1 fazasi) samarali ravishda chiqarishi aniqlandi. Makrofaglar ishtirokida keyingi qadam, G1 – S o'tish sodir bo'ladi. DNK sintezini boshlash jarayoni polianionlar tomonidan lektinlar va lipopolisakkaridlarga qaraganda ancha zaifroq induksiya qilinadi [22]. Limfoid hujayraning reaksiyasini qo'zg'atish mexanizmlarini tashqi hujayra membranasida izlash kerakligi nazariy jihatdan asoslandi [33]. Lipid matritsa tizimi va siklaza fermentlari tizimi kabi muhim membranani tartibga solish tizimlaridagi o'zgarishlarni izlash immunostimulyator poliion ta'sirida sezilarli tez o'zgarishlarni aniqlashga olib kelmadi [5, 2].

Bizning ishimizda keltirilgan ma'lumotlardan ko'rinib turibdiki, polianionlar membrana ionlarini tashish tizimida juda tez va sezilarli o'zgarishlarni keltirib chiqaradi. K^+ ning hujayradan va Ca^{2+} ning hujayraga passiv oqimlari aniq ortadi. Bu o'sish ion tashuvchi membrana ATFazalarining ishini blokirovka qilish natijasi emas. Shuning uchun polianion hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshiradi. Membrananing o'tkazuvchanligidagi o'zgarishlar kinetikasi tasvirlangan. Umuman olganda, ikkita fakt ajralib turadi: ta'sir qilishdan keyingi dastlabki

3-4 daqiqada ion chiqishi tezligining beqarorligi va membrana o'tkazuvchanligining o'zgarishining vaqtinchalik tabiati. Ikkinchisi juda muhim, chunki 35-40 daqiqadan so'ng ionlarning chiqishi deyarli to'xtaydi. Bu polianionning ionoforga o'xshash ta'siridan himoya qilishning hujayra mexanizmlari mavjudligini ko'rsatadi. Polianion tomonidan qo'zg'atilgan K^- ning yo'qolishining bir xil hujayralarni parchalashida K^+ ning yo'qolishi bilan solishtirganda miqdorini aniqlash polianionning ionoforga o'xshash ta'sirini nisbatan "yumshoq" deb hisoblash imkonini beradi. Hech bo'lmaganda, hujayra membranasining polimer ta'sirida o'tkazuvchanligining oshishi natijasida toksik bo'lmagan immunostimulyatsion dozalardan foydalanganda, limfotsitlar 35-40 daqiqada saponin bilan bir xil hujayralarni lizis qilish paytida chiqarilgan K^- ionlari miqdorining taxminan 1/1000 qismini yo'qotdi.

Hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligining o'zgarishi bilan bir qatorda, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ni tashuvchi membrana ATFazalari ularning konsentratsiya gradientiga nisbatan faollashishini aniqladik. Ion tashuvchi ATFazalarning faollashuv kinetikasini membrana o'tkazuvchanligidagi o'zgarishlar kinetikasi bilan solishtirish bu hodisalar o'rtasidagi aniq bog'liqlikni ko'rsatadi. O'zgarishlarning boshlanish vaqti, beqarorlik davri va o'zgartirilgan parametrlarning barqarorlashuv davri mos keladi (5-rasm va 12-rasm). Hujayra membranalarning (Na^+ , K^+) - va Ca^{2+} - ATFazalari faolligi birinchi navbatda membrananing har ikki tomonidagi tegishli ionlar darajasi bilan tartibga solinishini hisobga olsak, biz membrana o'tkazuvchanligining o'zgarishini birlamchi deb hisoblaymiz va ATFazalarning faollashishi ikkinchi darajali bo'ladi. Hujayra membranasining o'tkazuvchanligi oshishi transmembran ion gradientlarining pasayishiga olib keladi. Hujayra ichida Ca^{2+} va Na^+ konsentratsiyasi ortadi, K^+ darajasi pasayadi. Bu hujayra uchun normal bo'lgan sitoplazma va muhitdagi ion konsentratsiyasining nisbatini tiklashga qaratilgan tegishli membrana "nasoslari" ning faollashishi uchun signal bo'lib xizmat qiladi. Shuning uchun biz (Na^+ , K^+)- va Ca^{2+} - ATFazalarning polianion tomonidan induksiyalangan faollashuvini kompensator deb hisoblaymiz, bu ionlar uchun hujayra membranasini o'tkazuvchanligi oshishi bilan bog'liq buzilishlarni bartaraf etishga qaratilgan.

Limfoid hujayralarning lektinlarga javobini faollashtirish mexanizmlarini o'rganishda ko'plab mualliflar ionlarning membrana tashishidagi o'zgarishlarga e'tibor berildi. Adabiyotlarni ko'rib chiqishda biz ushbu masala bo'yicha faktik materiallarni ko'rib chiqdik. Ba'zi mualliflar lektinlar ta'sirida limfotsitlarda (Na^+ , K^+) - ATPazaning faollashishini qayd etganlar [44, 53]. Boshqalar - shunga o'xshash sharoitlarda Ca^{2+} - ATPazning faollashishi [18]. Boshqalar aminokislotalar, shakar va nukleozidlar uchun hujayra membranasining o'tkazuvchanligi oshishini aniqladilar [34]. To'rtinchisi sitozolda Ca^{2+} kontsentratsiyasining ortishiga e'tibor berdi (ammo bunday ishlar so'nggi yillarda ko'p miqdorda paydo bo'la boshladi [32, 57, 59]. Har bir holatda, tadqiqotchilar topilgan o'zgarishni hujayraning reaksiyasini qo'zg'atuvchi asosiy rol bilan bog'lashdi. Biz olgan ma'lumotlar ushbu tadqiqotlarga zid emas. Bundan tashqari, ular sanab o'tilgan barcha ta'sirlarni - o'tkazuvchanlikning o'zgarishi, hujayrada Ca^{2+} to'planishi va ATPazalarning faollashishini bog'lashga imkon beradi. Biz birinchi navbatda o'tkazuvchanlik o'zgarishiga ishonamiz. Kationlarning ortib borayotgan oqimlari qisman faollashtirilgan ATPazalar ishi bilan qoplanadi. Ammo shunga qaramay, ionlarning kontsentratsiyasi o'zgarishi va xususan, hujayra ichidagi kaltsiy darajasi oshishi mumkin.

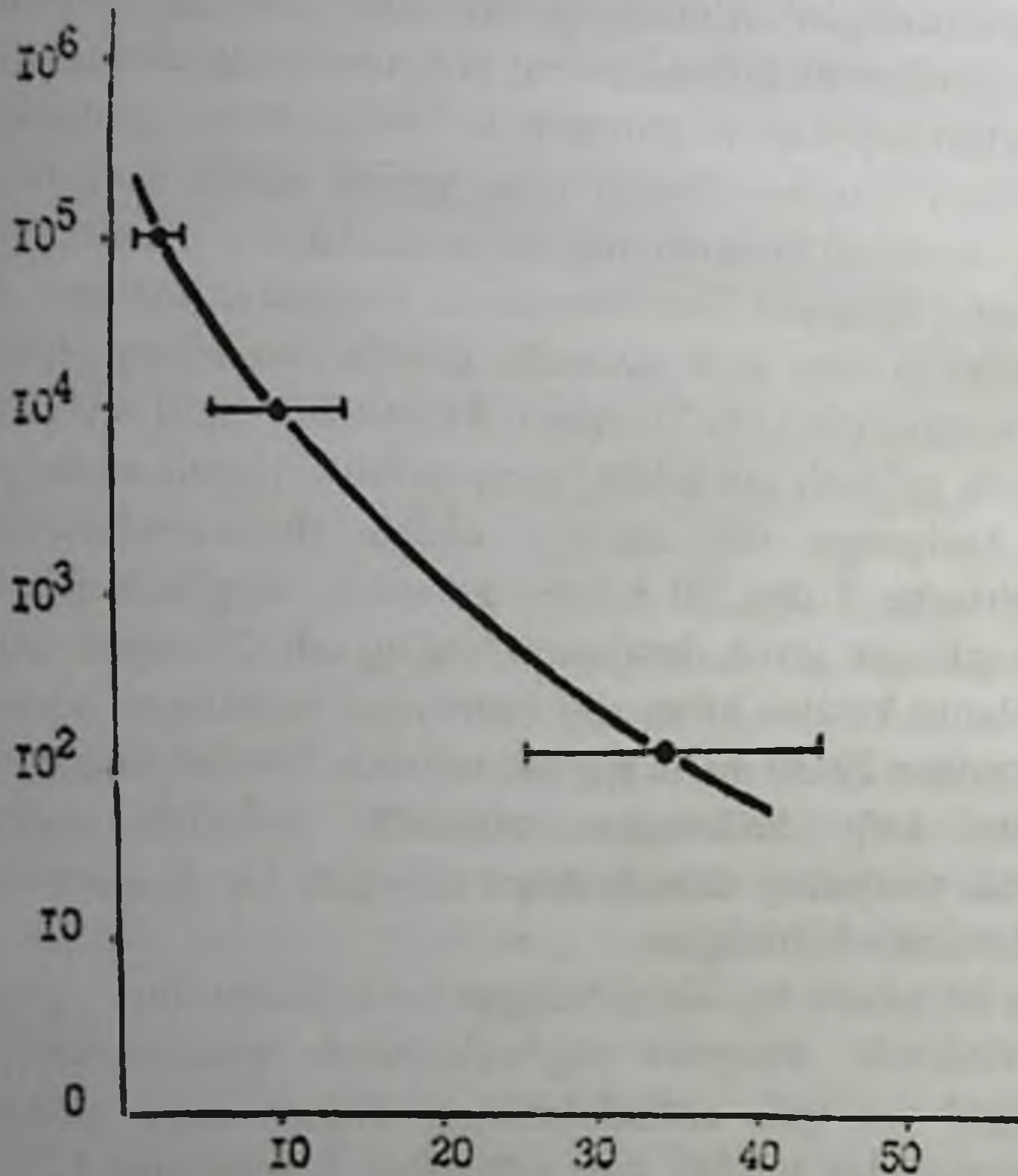
Bizning ishimizda (polianion ta'sirida) va boshqa tadqiqotchilarning ishlarida (lektinlar ta'sirida) ionlarning membrana tashishidagi aniqlangan o'zgarishlar o'z-o'zidan hujayraning tashqi ta'sirga javobini faollashtirishda bu o'zgarishning asosiy rolini isbotlamaydi. Biz tajribamizdagi ushbu masalaga alohida e'tibor qaratdik. Ma'lum bo'lishicha, membrananing ion tashuvchi tizimlarining modifikatsiyasi faqat polianionga bo'linishni faollashtirish orqali reaksiyaga kirishadigan hujayralarda (B-limfosit) sodir bo'ladi. Agar hujayralar yetuk T-limfotsitlardagi kabi bo'linish yo'li bilan polianionga javob bermagan bo'lsa, u holda biz ionlarning membrana tashishidagi o'zgarishlarni kuzatmadik (15-rasm). Erta membranani qayta qurish va keyinchalik hujayralarning fiziologik reaksiyasi o'rtasidagi bunday bog'liqlik bilvosita limfotsitlarning javob reaksiyasini boshlash mexanizmida va shuning uchun polianion bilan immunitetni rag'batlantirish mexanizmida ion o'tkazuvchanligini oshirishning muhim ahamiyatini ko'rsatadi.

Bunday xulosa foydasiga, lekin bilvosita emas, balki polimer bo'lmagan membrana faol moddalarining immunostimulyatsion xususiyatlarini sinash natijalari to'g'ridan-to'g'ri tasdiqlanadi (6-bob). Bizning tajribalarimiz shuni ko'rsatdiki, hujayra membranasining ionlar uchun o'tkazuvchanligini oshiradigan moddalar, xususan, levorin, nistatin, gramitsidin S yordamida polianionning immunostimulyator ta'sirini ham in vivo, ham in vitro taqlid qilish mumkin. Ushbu moddalar yordamida hujayra membranasining IES uchun o'tkazuvchanligining oshishi in vitro limfotsitlar bo'linishining dastlabki bosqichining polianionlarga o'xshash faollashuvini keltirib chiqardi (16-rasm). Membranoaktiv moddalar, ayniqsa, mitogenlar kabi emas, balki in vivo jonli ravishda antitela sintezining stimulyatorlari sifatida ham samaralidir (18, 21-rasm). Gramitsidin yoki levorinni antigen bilan birgalikda qo'llash antitelalar genezasining kuchli stimulyatsiyasiga olib keldi. Antigenga xos antitela ishlab chiqaruvchilarning ishlab chiqarilishi o'rtacha 3 dan 30 barobarga oshdi. Rag'batlantirish darajasi stimulyatsiya qilingan javob darajasiga bog'liq edi (20-rasm). Antigenning chegara dozalarini kiritish bilan zaif immunitet reaksiyasi membranotrop vositalar tomonidan 20-30 marta rag'batlantirildi. Dastlab yuqori reaksiyani 2-3 martadan ko'p bo'lmagan miqdorda oshirish mumkin edi. Rag'batlantirish ta'sirining stimulyatsiya qilingan javob darajasiga teskari bog'liqligi 25-rasmda keltirilgan.

Bizning ishimizda biz ishlatiladigan vositalardan biri - gramitsidin S yordamida antitela sintezini rag'batlantirish parametrlarini batafsil tavsifladik. IgM- va IgG- antitelalarining stimulyatsiya qilingan sintezi dinamikasi nazoratdan tubdan farq qilmasligi ko'rsatilgan (22-rasm). Bu shuni ko'rsatadiki, membrana faol moddasi bilan birgalikda yuborilganda antigenga immunitet reaksiyasi faqat antigeni kiritishda bo'lgani kabi bir xil qonuniyatlar va mexanizmlarda rivojlanadi.

25-rasm. Gramitsidin S ning immunoadyuvant ta'sirining qo'zg'atilayotgan immun javob darajasiga bog'liqligi. Abscissa o'qida - 10 mkg gramitsidin S ni turli dozalarda antigen (BE) bilan birga kiritish bilan immun javobni rag'batlantirish koeffitsienti. Rag'batlantirish koeffitsienti eksperimentdagi (BE plus gramitsidin bilan immunizatsiya) antitela

ajratuvchi hujayralar (ASC) sonining nazoratdagi antitelalarni ajratuvchi hujayralar soniga nisbati sifatida aniqlandi (faqat BE bilan emlash). Y o'qi BE ning turli dozalarini kiritgandan keyin nazoratdagi AOK sonini ko'rsatadi.



Ko'rinishidan, ionlar uchun membrana o'tkazuvchanligining oshishi antigenni taniydigan hujayralar uchun "ikkinchi signal" bo'lib xizmat qiladi. Biroq, bizning fikrimizcha, membrana-faol moddalar tomonidan immunitet reaksiyasini kuchaytirish mexanizmlarini jiddiy o'rganish kerak. Hozirgacha ishlatilgan membrana faol moddalari kuchli immunostimulyator ekanligini aytish mumkin. Shuni ta'kidlash kerakki, ularning yordami bilan antigenning chegara dozalariga zaif reaksiyani kuchaytirish mumkin. Bundan tashqari, antigenlarning eruvchan emas, balki korpuskulyar

versiyalaridan foydalanish yaxshiroqdir. Ehtimol, oxirgi fakt membrana faol moddalarining fagotsitik hujayralarga faollashtiruvchi ta'sirini ko'rsatishi mumkin, ularning vazifasi korpuskulyar antigenlarni kiritishda ayniqsa muhimdir. Shuningdek, membranali faol gramitsidin S yordamida ikkilamchi immunitet reaksiyasi juda faollashishi ham muhimdir (2-jadval, 23-rasm).

Membrana faol moddalarining immunostimulyatsion xususiyatlarini aniqlash, bizning fikrimizcha, laboratoriya va, ehtimol, veterinariya va tibbiy amaliyot uchun katta ahamiyatga ega. Bugungi kunda immunostimulyatorlarning assortimenti hali ham juda yetarli emas. Umid qilamizki, membrana faol moddalari immunoaktivant sifatida keng qo'llaniladi. Usul shundan iboratki, membrana faol gramitsidin S ning bir yoki bir nechta guruhi toksik bo'lmagan, hujayra membranasiga inert, immunoaktivant sifatida faol bo'lmagan, suvda eruvchan polimerning tuzilishiga kovalent bog'lanish yordamida kiritiladi. Sintez mahsulotlari - membrana faol gramitsidin S ni o'z ichiga olgan neytral polimerlar - suvli muhitda yaxshi eruvchanligi, juda past toksikligi va juda yuqori immunostimulyator faolligiga ega. Xususan, neytral dekstran va gramitsidin S konyugati ("gradex" deb ataladi) sintez qilingan va faol o'rganilmoqda [9]. Gradex zaif immunitet reaksiyasini 10-20 marta rag'batlantirishni ta'minlaydi, in vivo jonli ravishda pasayadi, toksik emas. Bundan tashqari, u antigenlar uchun immunitetni kuchaytiruvchi vosita sifatida samarali ishlatiladi. Hozirgi vaqtda gapten, zardob oqsillari, virusli va mikrobial antigenlarga, agar ular gradeksga tikilgan bo'lsa, immunitet reaksiyasining sezilarli darajada oshishi ko'rsatilgan. Shunday qilib, taqdim etilgan ma'lumotlardan kelib chiqqan holda, biz membrana faol moddalar ko'rinishidagi immunostimulyator moddalarning yangi sinfini topdik. Dissertatsiya boshida tuzilgan vazifalar nuqtai nazaridan ("kirish" bo'limi), in vitro limfoid hujayralarning javobini boshlash va in vivo jonli immunitet reaksiyasini kuchaytirish uchun hujayra membranasining ionlarga o'tkazuvchanligini oshirish yetarli bo'lishi muhimdir. Biz olgan faktlar shuni isbotlaydiki, polianion tomonidan qo'zg'atilgan hujayra membranasini

o'tkazuvchanligining oshishi limfoid hujayra reaksiyasini boshlash mexanizmining asosiy bo'g'ini bo'lib xizmat qilishi mumkin.

Yuqorida biz xorijlik tadqiqotchilarning ishlarini tasvirlab berdik, unda limfotsitlarning lektinlar bilan faollashishi jarayonida ionlarning membrana transportini o'zgartirishning ahamiyati katta ahamiyatga ega. So'nggi 2-3 yil ichida ig antikorlari [48], T - limfotsitlari antigen retseptorlari antitelalari [55] va T limfotsitlari antigen taqdim etuvchi hujayralar bilan o'zaro ta'sirlashganda B - limfotsitlarini faollashtirish mexanizmida membrananing ion o'tkazuvchanligi muhimligini isbotlovchi xabarlar paydo bo'ldi [3]. Umuman olganda, hozirgi vaqtda limfoid hujayraning turli ligandlar bilan faollashishi uning tashqi membranasining ionlarga o'tkazuvchanligini o'zgartirishdan boshlanadi degan fikr shakllanmoqda.

Limfotsitlarning faollashishi haqida ko'plab sxemalar va farazlar taklif qilingan. Ularning eng tipik turlarini ko'rib chiqamiz. Ayrim mualliflar [45] (Na^+, K^+) -ATFaza faolligini almashtirishga katta ahamiyat berishadi. Taxminlarga ko'ra, (Na^+, K^+) -ATFazaning faollik kuchayishi rejimiga o'tishi oxir-oqibat hujayra bo'linishi boshlanishiga olib keladi. Aksincha, (Na^+, K^+) - ATFaza faolligini kuchayishi limfotsitlarning terminal differentsiatsiyasini yoqishning boshlang'ich bosqichi bo'lib xizmat qiladi.

Boshqa tadqiqotchilar [55] Lektinning hujayra membranasini bilan o'zaro ta'sirini ko'rsatuvchi xabarchi sifatida hujayradan tashqari muhitdan hujayra ichidagi Ca^{2+} oqimini afzal ko'rishadi. Ma'lumki, Ca^{2+} hujayra ichida ko'plab muhim fermentativ reaksiyalarni keltirib chiqarishi mumkin. So'nggi yillarda tobora ko'proq mutaxassislar hujayraning javobini faollashtirish mexanizmiga moyil [48, 54-59, 61].

Lektinlar, bivalent antitelalar, lipopolisaxaridlarning tashqi hujayra membranasini bilan o'zaro ta'siri membrana ion o'tkazuvchan tuzilmalar hosil bo'lishiga olib keladi. Mualliflarning fikriga ko'ra, barcha holatlarda ikki va ko'p valentli ligandlar integral membrana oqsillarini mikroagregatlarga, 10 yoki undan ortiq protein zarralari holatiga qayta taqsimlashga qodir. Bu agregatlarda oqsil-oqsil birikmasida ion o'tkazuvchi g'ovaklarning hosil bo'lishi uchun sharoit yaratiladi.

Xuddi shunday gipotetik sxema Norcross [61] tomonidan T-nobud prekursorining faollashuv mexanizmiga nisbatan qo'llanilgan holda taklif qilingan. Ma'lumki, bu hujayralarning faollashuvi T-hujayra retseptorlari antigenni gistologik muvofiqlik oqsillari bilan birgalikda taniganda sodir bo'ladi. Hozirgacha bunday ikki tomonlama tan olish zarurati tushunilmagan. Norcross ikki tomonlama tan olishning ma'nosi retseptor va taniqli tuzilma o'rtasidagi aloqani barqarorlashtirishni taklif qildi. Assotsiatsiya (MHC + antigen) bilan T-retseptorlar kompleksining umrini uzaytirish T-hujayra va antigenni taqdim qiluvchi hujayra o'rtasidagi aloqa zonasida juda ko'p miqdordagi bunday komplekslarning to'planishiga yordam beradi. Ushbu komplekslar mos ravishda T-hujayra va antigen taqdim etuvchi hujayraga tegishli bo'lgan "tanish" va "tanib olish" molekulalaridan iborat. Plazma membranasida T-hujayra retseptorlarining qandaydir agregatsiyasi mavjud va Norcross ta'kidlaganidek, T-hujayra retseptorlarining membrana domenlari (T3M), klasterlashgan holda ion o'tkazuvchi kanallarni hosil qiladi. Bu kanallarning paydo bo'lishi va membrana o'tkazuvchanligining kuchsizroq o'sishi hujayra metabolizmini qayta qurish boshlanishini ko'rsatadi.

Ko'rinib turibdiki, ionlarning passiv oqimlari atpazalar yordamida bir xil ionlarning faol tashilishining ko'payishi bilan tezda qoplanadi. Biroq, muvozanatning buzilishi haqiqati allaqachon ligand haqida signal berish va hujayra tomonidan javobni boshlash uchun yetarli. R. V. Petrov va hammualliflarning fikriga ko'ra, ion muvozanatining buzilishi hujayra bo'linishining faollashuvining birinchi bosqichlarini boshlaydi, xususan, RNK makromolekulalarining sintezi faollashadi, oqsil, hujayra yuzasida ba'zi oqsillarning ifodasi kuchayadi. Masalan, hujayra membranasida Ia - molekulalarning miqdori ortadi, maxsus oqsillar - o'sish va differentsiatsiya omillari uchun retseptorlar paydo bo'ladi. O'sish omillarini qabul qilish DNK sintezi va replikatsiyasini qo'zg'atadi.

Umuman olganda, ekzogen ta'sirga hujayra reaksiyasini boshlash mexanizmlari yuqorida aytib o'tilgan gipotezalarning birida ko'rsatilganidan ancha murakkabroqdir. Masalan, membrana siklaza fermentlari va oqsil kinazalarining faollashishi, membrana fosfolipazlarining faollashishi va

diatsilgliserinlar, inositol trifosfat, lizoletsitin, araxidon kislotasi va boshqa ko'plab moddalarning shakllanishi kabi muhim jarayonlarning rolini umuman ko'rib chiqmadik.

Ayni paytda tilga olingan voqealarning birortasiga ustunlik berish qiyin. Ular, ehtimol, ligand tomonidan qo'zg'atilgan murakkab biokimyoviy yo'llarning turli bo'g'inlaridir. Shunga qaramay, plazma membranasi darajasida ion tashishning o'zgarishi limfotsitlarning reaksiyasi turli ligandlar, shu jumladan polianionlar tomonidan qo'zg'atilganda asosiy hodisalardan biri ekanligiga shubha yo'q.

XULOSA

Bizning ishimiz, umuman olganda, ikkita muhim fakti aniqlashga imkon berdi: a) polianionlarning (PAA va SD) T va B-limfotsitlar subpopulyatsiyalariga membrana-aktiv va immunostimulyator ta'siri o'rtasidagi korrelyatsiya; b) polianionlar bo'lmagan membrana faol moddalar yordamida immunitetni rag'batlantirish imkoniyati. Ikkala fakt ham limfotsitlarning polianionlar tomonidan faollashishi jarayonida membrana o'tkazuvchanligidagi o'zgarishlarning asosiy roli foydasiga bilvosita dalil sifatida ko'rib chiqilishi mumkin.

Shu bilan birga, rasmiy membrana-faol moddalarning immunostimulyator ta'siri to'g'risidagi ma'lumotlar mustaqil ilmiy va amaliy ahamiyatga ega: gramitsidin S, levorin va nistatin. Ular turli infeksiyalarning patogenlaridan antigenlarga qarshi antikorlar genezisini induktsiya qilishda ushbu moddalarni immunoadjuvantlar sifatida qo'llashni tavsiya qilish imkonini beradi. Shu bilan birga, maqolada gramitsidin S ning immunoadyuvan ta'sirining dozaga bog'liqligi, IgM va IgG antitelalarini ishlab chiqarish dinamikasi, antitelalarning birlamchi sintezini va immun xotirasini kuchaytirish imkoniyati to'g'risida batafsil ma'lumotlar keltirilgan. Shuningdek, antitelalarning ikkilamchi ishlab chiqarilishi, immunoadyuvan ta'sirining og'irligi o'zgartirilgan reaktsiya darajasiga (immunogenning dozasi) va o'rganilayotgan antijenlarning (eruvchan yoki korpuskulyar) struktur xususiyatlariga bog'liq. Bularning barchasi gramitsidin S va uning analoglarini amalda maqsadli qo'llash uchun foydali bo'lishi mumkin bo'lgan ma'lumotlardir. Ushbu ishda olingan natijalar keyingi tadqiqotlarda ishlab chiqilishi kerak. Bu, shuningdek, salmonella antigenlari va kuydirgi qo'zg'atuvchisiga qarshi immunitetni rag'batlantirish uchun gramitsidin S dan foydalanishga bo'lgan muvaffaqiyatli urinishlar bilan bir qatorda, mahalliy immunitetning zaifligi tufayli uzoq davom etadigan sust kurs bilan tavsiflangan teri leyshmaniozida gramitsidin S ning sezilarli terapevtik ta'siri bilan tasdiqlanadi.

1. Polianionning limfotsitlarga ionoforga o'xshash va mitogen ta'siri o'rtasida bevosita bog'liqlik mavjud. Poliakril kislota va dekstran sulfat B-limfotsitlar plazma membranasining ion tashuvchi xususiyatlarining tez o'zgarishiga olib keladi va bu hujayralarning bo'linishini faollashtiradi. T-

limfotsitlar suspenziyasida xuddi shu polianionlar ionlarning membrana tashishida o'zgarishlarga ham, hujayra bo'linishlarining faollashishiga ham olib kelmaydi.

2. Membran-faol birikmalar - gramitsidin S, nistatin va levorin - polianionlarning immunostimulyator ta'sirini samarali modellashtiradi. In vitro hujayra madaniyatida bu moddalar limfotsitlar bo'linishini faollashtiradi. In vivo antigen bilan membrana-faol birikmalarning birgalikda kiritilishi bilan o'ziga xos antitelalar sintezini ko'p marta rag'batlantirish sodir bo'ladi.

3. Gramitsidin S bilan antikor ishlab chiqarishni kuchaytirishning ko'pligi immun javob darajasiga bog'liq. Zaif antitela sintezi 20-30 marta yoki undan ko'proq oshishi mumkin. O'rtacha intensivlikdagi immunitet reaksiyasini 5-7 marta oshirish mumkin. Maksimal darajaga yaqin bo'lgan yuqori immunitet reaksiyasi gramitsid S tomonidan 1,5-2 marta rag'batlantiriladi.

4. Gramitsidin S ham birlamchi, ham ikkilamchi antitela sintezini rag'batlantirishi mumkin. Shu bilan birga, IgM- va IgG-antitelalarini ishlab chiqarish teng darajada oshadi. Antitelalarning stimulyatsiya qilingan sintezi dinamikasi antigenga (S gramitsidinsiz) nazorat reaksiyasining dinamikasidan farq qilmaydi.

5. Membran-faol immunoadyuvant - gramitsidin S - turli antigenlarga antitela ishlab chiqarishni rag'batlantirish uchun javob beradi: geterologik qizil qon tanachalari, geterologik qizil qon tanachalaridan suvda eriydigan membrana antigeni, o'ldirilgan mikroob hujayralari S, salmonellalardan eriydigan O antijeni, shuningdek kuydirgi qo'zg'atuvchisidan eriydigan oqsil antigeni (P90).

ADABIYOTLAR RO'YXATI

1. Артемьев М.М. Классификация москитов (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Дис. д-ра биол. наук. – М., 1990.
2. Атауллаханов Р.И., Абдуллаев Д.М. Повышение проницаемости плазматической мембраны лимфоцитов для одно- и двухвалентных катионов и низкомолекулярных метаболитов под действием митогенных полианионов. - Билл.эксперим.биол. и мед., 1984, 7, 81-84.
3. Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М., Губарев М.И. Участие макрофагов в реакции лимфоцитов на полиион-иммуностимулятор. - Иммунология, 1986, 5, 26-29.
4. Баранец М.С., Видовой состав и распространение москитов (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) Центральной Азии. Понировский Е.Н., Кадамов Д.С.// Мед. паразитол. – 2015. - № 4. – С.
5. Вульф К., Джонсон Р., Сюмонд Д. Дерматология по Т. Фицпатрику. Атлас-справочник. – М., Практика, 2007. – 1228 с.
6. Долматова А.В. Об основных факторах, определяющих эпидемиологическое значение отдельных видов москитов (Phlebotominae) в очагах лейшманиозов.//Мед. паразитол. № 3, с.298.
7. Европейское руководство по лечению дерматологических заболеваний / под ред. А.Д. Кацамба, Т.М. Лотти; пер. с англ. – 2-е изд. – М.: МЕДпрессинформ, 2009. – 736 с. 3. 45.
8. Жахонгиров Ш.М., “Анализ изменений эпидемиологической ситуации в по кожному лейшманиозу в регионах Узбекистана”. Коваленко Д.А., Абдиев Ф.Т. и др.//Проблемы биологии и медицины, № 3-2017, стр. 45-
9. Лейшманиоз. – Публикация ВОЗ. – № 375. – 2014.
10. Маджидов А.В. Стимуляция продукции интерлейкина-2 синтетическими полиэлектролитами. - В кн. "Актуальные вопросы" современной гистологии", Москва, 1984, с.35.
11. Муратов Т.И., “Современные эпидемиологические аспекты кожных лейшманиозов в Узбекистане” Ачилова О.Д, Сувонкулов

У.Т.// Журнал Вестник Ташкентской медицинской академии №1, 2018, стр. 28.

12. Пальцев М.А., Потехаев Н.Н., Казанцева И.А., Лысенко А.И., Лысенко Л.В., Червонная Л.В. Кликоморфологическая диагностика заболеваний кожи: атлас. – 2-е изд., стереотипное. – М.: Медицина, 2005. – 432 с.

13. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Лиознер А.Л. и др. Полностью синтетические пептид-полиионные комплексы обладают протективным эффектом при гриппозной инфекции. - Иммунология, 1986, 1, 29-32.

14. Понировский У.Н., Аридные экосистемы. Дарченкова Н.Н.// Москва-2005 – Т. 11 – №28 – С.39-50.

15. Потехаев Н.Н., Акимов В.Г. Дифференциальная диагностика и лечение кожных болезней. – М.: ГЭОТАРМедиа, 2016. – 456 с.

16. Раббимова Н.Т., “Моделирование процессов распространения кожных лейшманиозов в Узбекистане” Сувокулов У.Т, Муратов Т.И., Маликов М.Р. // Вестник врача №3, стр. 78.

17. Свиридов Б.Д., Скворцов В.Й., Атауллаханов Р.И., Некрасов А.В. Синтетические высокомолекулярные иммуностимуляторы на основе модифицированных сополимеров винилпирролидона. - Иммунология, 1986, 2, 25-27.

18. Сергеев В.П. Паразитарные болезни человека / В.П. Сергеев, Ю.В. Лобзин, С.С. Козлов. – СПб.: Фолиант, 2011. – 608 с.

19. Соколовский Е.В., Михеев Г.Н., Красносельских Т.В. и др. Дерматовенерология: учебник для студентов учреждений высш. проф. мед. образования / под ред. Е.В. Соколовского. – СПб.: СпецЛИТ, 2017. – 687 с.

20. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной терапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов. – НИИАХ СГМА, 2007. – 420 с.

21. Сувокулов У.Т., Современная характеристика природного очага зоонозного кожного лейшманиоза в Мубарекском районе

Кашкадарьинской области Узбекистана. Абдиев Т.А., Усаров Г.Х., // *Инфекция, иммунитет и фармакология*". Ташкент-2019г. Стр.45

22. Сувонкулов У.Т., *Этиология кожных лейшманиозов в эндемичных регионах Узбекистана на примере Джизакской области*. Ачилова О.Д., Муратов Т.И. *Эпидемиология и инфекционные болезни*" изд. "Медицина". Том 24 №3 -2019 ст.123

23. Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. Митогенное действие полиакриловой кислоты на лимфоциты. II. Кинетика пролиферации лимфоцитов Т- и В- суб-классов. - *Иммунология*, 1982, 4, 30-32.

24. Шуйкина Э.Е. *Возможность антибиотикотерапии при лейшманиозах / Э.Е. Шуйкина [и др]. // Мед. паразитол. – 2009. – № 3, – С. 45–47.*

25. Ajdary S., Riazi–Rad F., Alihomomadian M.H. et al. Immune response to Leishmania antigen in anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1999; 21: 423-431.

26. Alexander J, Bryson K. T helper (h) 1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol. Lett.* 2005 Jun 15; 99(1):17-23.

27. Almeida R.P., Brito J., Machado P.R. et al. Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(1): 79081.

28. Anthony R.M., Rutitzky LK.I., Urban J.F. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; 7; 975-987.

29. Arimand R., Fard S., Saberi S., et al. Antigenic profile of heat-killed versus thimerosal-treated Leishmania major using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Adv Biomed Res.* 2015; 4: 128.

30. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, et al: Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis* 63 (12):e202-e264, 2016. doi: 10.1093/cid/ciw670.

31. Barbosa J.F., de Figueiredo S.M., Monteiro F., et al. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review on Recent Patents. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 2015 Sep 21.
32. Berman J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 24:684-703.
33. Chakravarty J., Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* 2010; 2(2):167-176.
34. Choi B.S., Kropf P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing Leishmaniasis reveals difference in T helper cell polarization ex vivo and vitro. *Parasite Immunol.* 2009; 31:199-209.
35. Clem, Angela A : Current Perspective on Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases.* May 2010, Vol. 2 Issue 2, p125.
36. Costa D.L., Carregaro V., Lima-Júnior D.S., et al. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 1;5(3):e965.
37. Croft S.L., Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011. 17 (10): 1478-1483.
38. Desjeux P. Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country of territory. WHO, 1991, Switerland, Geneva.
39. Haas N., Hauptmann S., Paralikoudi D. et al. Interferongamma treatment induces granulomatous tissue reactions in a case of localized cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Dermatopathol.* 2002, Aug; 24 (4):319-323.
40. Harms G., Zwinngenberger K., Chahade A.K. et al. Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. *Lancet.* 1989; 1(8650): 1287-1292.
41. Kunzler B. Cutaneous leishmaniasis: the efficacy of nonantimony treatment in the austere environment. Using cryotherapy, thermotherapy and photodynamic therapy as an alternative method of treatment. *J. Spec. Oper. Med.* 2013; 13(4):40- 45.

42. Launois P., Louis J.A., Milon G. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. *Parasitology*. 1997; 115 Suppl: S25–S32
43. Lazarski Ch.A., Ford J., Katzman Sh.D. et al., IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PloS One*. 2013; 8 (8): e71949.
44. Lessa H.A., Machado P., Lima F. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Aug; 65(2):87-89.
45. Maizels R., Hewitson J.P., Smith K. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current Opinion in Immunology*. 2012; 24: 459-466.
46. Matos I., Mizenina O., Lubkin A. et al. Targeting *Leishmania major* antigens to dendritic cells in vivo induces protective immunity. *PLoS one*, 2013; 8(6): e67453.
47. Mock D.J., Hollenbaugh J.A., Daddacha W. et al. *Leishmania* induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV-co-infection. *PloS Pathog*. 2012; 8(4):e1002635
48. Moreno E., Schwartz J., Fernandez C. et al. Nanoparticles as multifunctional devices for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014. –Vol.11, N 4. – 579-597.
49. Neumayr A.L., Morizot G., Visser L.G. et al. Clinical aspects and management of cutaneous leishmaniasis in rheumatoid patients treated with INF- α antagonists. *Travel Med. Infect. Dis*. 2013; 11(6):412-420.
50. Olliaro P., Vaillant M., Arana B. et al. Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2130. doi: 10.1371/journal.pntd.0002130. Epub 2013 Mar 21.
51. Reiner S.L., Locksley R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol*. 1995; 13:151-177.

52. Rezaei Riabi T., Sharifi I., Miramin Mohammadi A., Khamesipour A. et al. Evaluation of a Possible Synergistic Effect of Meglumine Antimoniate with Paromomycin, Miltefosine or Allopurinol on in Vitro Susceptibility of *Leishmania tropica* Resistant Isolate. *Iran J Parasitol.* 2013 Jul;8(3):396-401.
53. Sacks D., Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 845–858.
54. Santos J.B., de Jesus A.R., Machado P.R. et al. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis.* 2004 Nov 15;190(10):1793-6. Epub 2004 Oct 18.
55. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2015 Jul 4;9(6):588-96.
56. Schwarz T., Remet K., Nahrendorf W. et al. T-cell derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLOS Pathog.* 2013; 9(56): e1003-476.2013).
57. Scott P., Artis D., Uzonna J., Zaph C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development// *Immunol Rev.* 2004; 201: 318–338.
58. Taheri A.R., Govonlo V.M., Nahidi Y. et al. Plasma levels of interleukin-4 and interferon- γ in patients with chronic or healed cutaneous leishmaniasis. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2014; Mar; 17 (3):216-219.
59. Tripathi P., Singh V., Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 229–242.
60. Valencia C., Arévalo J., Dujardin J.C. et al. Prediction score for antimony treatment failure in patients with ulcerative leishmaniasis lesions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(6): e1656. doi: 10.1371/journal.pntd.0001656. Epub 2012.

61. Castellano L.R., Filho D.C., Argiro L., Dessen H., Prato A., Dessen A., et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous Leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon – gamma production. *Hum immunol.* 2009; 99:17-23.

Abdullayev D.M., Klebleeva G.D., Axmedova M.M.

**TERI LEYSHMANIOZIDA
MEMBRANOAKTIV BIRIKMALARINING
XUSUSIYATLARI**

Monografiya

“SAMARQAND” nashriyoti

Mas'ul muharrir — Dildora TURDIYEVA

Musahhih — Anvar UMRZOQOV

Texnik muharrir — Akmal KELDIYAROV

Sahifalovchi — Dilshoda ABDIAXATOVA

Dizayner — Davron NURULLAYEV

“SARVAR MEXROJ BARAKA” bosmaxonasida chop etildi.

Guvohnoma raqami — 704756. Pochta indeksi 140100.

Samarqand shahar, Mirzo Ulug'bek ko'chasi, 3-uy.

Bosishga 7.06.2023 ruxsat etildi. Bayonnoma raqami: 10

Bichimi 60x841/16. “Times New Roman” garniturasida. 5,35 bosma taboq.

Adadi: 200 nusxa. Buyurtma raqami: 156/2023

Tel/faks: +998 94 822-22-87, e-mail: sarvarmexrojbaraka@gmail.com

