

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.29.12.2018.V.01.13 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ
БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ**

РАИМОВА ГУЛИ МАДМУРОДОВНА

***TRIFOLIUM PRATENSE* L. (СЕБАРГА) ДАН АЖРАТИБ ОЛИНГАН
ЭКСТРАКТНИНГ ФИЗИК–КИМЁВИЙ ВА АНТИКОАГУЛЯНТ
ХОССАЛАРИ ВА УНДАН РОДЕНТИЦИД СИФАТИДА
ФОЙДАЛАНИШ**

03.00.02 –Биофизика ва радиобиология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Раимова Гули Мадмуродовна

Trifolium pratense L. (себарга)дан ажратиб олинган экстрактнинг физик–кимёвий ва антикоагулянт хоссалари ва ундан родентицид сифатида фойдаланиш..... 3

Раимова Гули Мадмуродовна

Физико–химические и антикоагулянтные свойства экстракта, выделенного из *Trifolium pratense* L. (клевер луговой), и применение его в качестве родентицида..... 21

Raimova Guli Madmurodovna

Physico-chemical and anticoagulant properties of the *Trifolium pratense* L. (meadow clover) extracts and their application as rodenticide..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works..... 42

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.29.12.2018.V.01.13 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ
БИОФИЗИКА ВА БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ**

РАИМОВА ГУЛИ МАДМУРОДОВНА

***TRIFOLIUM PRATENSE* L. (СЕБАРГА) ДАН АЖРАТИБ ОЛИНГАН
ЭКСТРАКТНИНГ ФИЗИК–КИМЁВИЙ ВА АНТИКОАГУЛЯНТ
ХОССАЛАРИ ВА УНДАН РОДЕНТИЦИД СИФАТИДА
Фойдаланиш**

03.00.02 –Биофизика ва радиобиология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2019

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2018.4.PhD/B99 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Биофизика ва биокимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус ва инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси www.ibb-nuu.uz ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:

Насиров Кабил Эркинович
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Мерзляк Петр Григорьевич
биология фанлари доктори

Левицкая Юлия Владимировна
биология фанлари номзоди

Етакчи ташкилот:

Тошкент педиатрия тиббиёт институти

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги DSc.29.12.2018.B.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2019 йил «__» _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси 174-уй (Ўзбекистон Миллий университети, Кимё факультети биноси 4- қавати) Тел.: (99871) 246–68–96.

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти Ахборот–ресурс марказида танишиш мумкин (____ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246–68–96, e–mail: ibb-nuu@mail.ru.

Диссертация автореферати 2019 йил «__» _____ куни тарқатилди.
(2019 йил «__» _____ даги № _____ рақамли реестр баённомаси).

Сабилов Равшан Заирович

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси, б.ф.д., академик

Асраров Музаффар Исламович

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

Ахмеджанов Искандар Гулямович

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
кошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Ҳозирги кунда дунё бўйича зараркунанда кемирувчилар қишлоқ хўжалиги экинларига зарар етказиши билан бирга омборларда сақланадиган озиқ-овқат маҳсулотларини истеъмолга яроқсиз ҳолатга келтириши орқали иқтисодиётга катта зарар келтирмоқда. Жумладан, зараркунанда кемирувчилар одам ва ҳайвонлар учун хавфли ҳисобланган юқумли ва инвазион касалликларнинг тарқалишига сабаб бўлмоқда. Шу сабабли чорвачилик фермалари ва дон сақлаш омборларини зараркунанда кемирувчилардан ҳимоя қилиш мақсадида янги самарали родентицид препаратини яратиш муҳим аҳамиятга эга.

Бугунги кунда жаҳонда зарарли кемирувчиларга қарши курашишнинг кимёвий усуллари яратилган бўлиб, улардан таркибида билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтлар бўлган родентицидларнинг афзаллиги аниқланган. Ушбу родентицидлар бошқа кимёвий бирикмалардан кемирувчилар учун танаб таъсир қилиши, заҳарлилик даражаси маълум муддатдан кейин таъсир этиши, шартли-мудофаа реакцияларининг йўқлиги, уларга антидотнинг мавжудлиги ҳамда одам ва қишлоқ хўжалиги ҳайвонлари учун хавфлилик даражасининг паст эканлиги исботланган. Шунга қарамадан, сўнгги йилларда ўтказилган амалий тадқиқотларда, зарарли кемирувчиларга қарши курашишда бир хил кимёвий препаратлардан фойдаланилганда, кемирувчиларнинг сони ўзгармаётганлиги, бундан ташқари бир нечта авлоддан кейин кемирувчиларда уларга қарши иммунитет ҳосил бўлиши ва вақт ўтиши билан ўз самарасини йўқотиши аниқланган. Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда, зарарли кемирувчиларга қарши курашда янада самарали, одам ва қишлоқ хўжалиги ҳайвонлари учун хавфсиз бўлган родентицид препаратлар ишлаб чиқиш ва амалиётга жорий қилиш долзарб муаммолардан бири ҳисобланади.

Бугунги кунда мамлакатимизда маҳаллий хомашёдан ажратилган ва синтезланган бирикмаларнинг физик-кимёвий ва токсикологик хоссаларини аниқлаш ва уларни синантроп кемирувчиларни йўқотиш учун самарали родентицидлар сифатида қўллаш борасида илмий-амалий тадқиқотлар амалга оширилиб, муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг учинчи йўналишида¹ «қишлоқ хўжалиги маҳсулотларини сақлаш, ташиш ва сотиш, агрокимё, молиявий ва бошқа замонавий бозор хизматлари кўрсатиш...» юзасидан муҳим вазифалар белгилаб берилган. Бу ўринда маҳаллий хом ашёлар асосида родентицид препаратини яратиш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ–4947–сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси» тўғрисидаги Фармони, 2017 йил 1 июндаги ПҚ–3026–сон «Ўзбекистон Республикаси Давлат ветеринария қўмитаси фаолиятини ташкил этиш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарори, Ўзбекистон

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ–4947 сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” ги Фармони

Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2018 йил 23 июлдаги 564-сон «Ветеринария дори воситалари ишлаб чиқаришни янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишларига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Дунёдаги кўплаб илмий текшириш марказларида бир қатор олимлар томонидан кумаринлар кимёсини ўрганиш устида илмий тадқиқот ишлари олиб боришган. Шу жумладан, Kasperkiewicz ва бошқ., (2016)¹ томонидан кумаринларнинг спазмолитик, юрак қон томирини кенгайтирувчи, антикоагулянт ва бошқа хоссаларга эга эканлиги тадқиқ қилинган.

Mingarro–de–Leon and Chaveli–Lopez (2013) олимлари томонидан кумаринлар 37 оилага мансуб 200 дан ортиқ ўсимлик турларида аниқланган бўлиб, сельдерейлар, рутасимонлар, дуккакдошлар оилаларида энг кўп кенг тарқалганлиги ёритилган. Дуккакдошлар оиласига мансуб себарганинг турларидан ажратиб олинган 4-идроксикумаринлар таркибида қон ивишига қарши таъсир кўрсатувчи бирикмалар борлиги аниқланган. Уларнинг таркибида қорамолларда касаллик туғдирувчи дикумарол аниқланган. Srikrishna ва бошқ. (2018)² томонидан ушбу кумаринлар қон ивишига бевосита таъсир кўрсатмаслиги, балки қон ивиш омилларининг синтезланиши учун зарур бўлган витамин К га антагонизм орқали, қоннинг ивиш оксиллари, жумладан проконвертин, протромбин, антигемофил глобулин В (Кристинмас омили) ва Стюарт–Прауэр омилининг биосинтезини бузиши асосида жигар орқали таъсир кўрсатиши аниқланган.

МДХ мамлакатлари олимлари Клементьева С.А. (2015), Zhou ва бошқ. (2009) томонидан кумарин ҳосилалари зараркунанда кемирувчиларни йўқотиш учун родентицидлар сифатида кенг қўлланилиши ва шу билан янги самарали антикоагулянтларни излаш бўйича тадқиқотлар амалга оширилган.

Мамлакатимиз олимлар томонидан маҳаллий себарга ўсимлигининг билвосита антикоагулянт хоссалари аниқланмаган бўлиб, ушбу ўсимликнинг физик-кимёвий, антикоагулянт ва токсикологик хоссаларини тадқиқ қилиш унинг асосида зараркунанда кемирувчиларга қарши курашиш учун родентицид препаратлар рецептурасини ишлаб чиқиш долзарб ҳисобланиб илмий-амалий аҳамиятга эга.

¹Kasperkiewicz K., Małeczka M., Ponczek M.B., Nowak P., Budzisz E. Design, synthesis, X-ray structures of the new coumarin derivatives and perspectives of binding them to albumin and vitamin k epoxide reductase complex subunit // *Cryst. Growth Des.* – 2016. – V.16(1). – P.456–466.

²Srikrishna D., Godugu C., Dubey P.K. A Review on pharmacological properties of coumarins // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2018. – V.18(2). – P.113–141.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институти ҳамда Биофизика ва биокимё институтларининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА–А9–Т049 «Антикоагулянтлар ёрдамида синантроп кемирувчиларга қарши самарали курашиш усулларини яратиш» (2015–2017) мавзусидаги амалий лойиха доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади *Trifolium pratense* L. (себарга) ўсимлигидан ажратиб олинган экстрактнинг физик-кимёвий, антикоагулянт хоссаларини аниқлаш ва унинг асосида родентицид препарат рецептурасини ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари қуйидагилардан иборат:

Trifolium pratense L. (себарга) дан ажратиб олинган экстрактнинг физик-кимёвий, токсикологик ва антикоагулянт хоссаларини терпеноид кумаринлар-фешурин, невескин, самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар аралашмасининг структуравий хоссалари билан солиштириш;

in vivo шароитида экзоген тромбопластинемияда антикоагулянт хоссасига эга экстрактни тромб ҳосил бўлишини юзага келтирувчи омилларга таъсирини аниқлаш, экстрактнинг токсиклиги ва антикоагулянт фаоллиги ўртасидаги боғлиқликни ҳамда унинг родентицидлик хоссаларини аниқлаш;

экстрактнинг родентицид фаоллигини кучайтириш мақсадида антикоагулянтлар орасидан синергистларни излаш, олинган натижалар асосида (антикоагулянт+синергист) комплекс бирикмаларни ишлаб чиқиш;

шунингдек, ишлаб чиқилган комплекс бирикмалар асосида ишлаб чиқилган хўрақларнинг родентицид фаоллигини амалиётда синовлардан ўтказиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида себарганинг (*Trifolium pratense* L.) моғорлаган экстракти, солиштирма тадқиқотлар учун Ўсимлик моддалари кимёси институтининг «Кумаринлар ва терпеноидлар» лабораториясида ажратиб олинган терпенод кумаринлар – фешурин, невескин, самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар аралашмаси танланган.

Тадқиқотнинг предмети айрим биологик фаол моддаларнинг физик-кимёвий, токсикологик ва антикоагулянт хоссаларини аниқлаш ва улар асосида зараркунанда кемирувчиларга қарши курашиш учун родентицид препаратлар рецептурасини ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот ишини бажариш давомида моғорлаган себарга экстрактини ажратиб олиш кимёвий услублар, биологик фаол моддаларнинг *in vitro* ва *in vivo* шароитларида физик-кимёвий, токсикологик ва антикоагулянт хоссаларини тадқиқ қилиш услублари, экзоген тромбопластинемия чақирилган шароитлардаги модель тажрибалар, тромболитик фаолликни аниқлаш, қон кетиш вақти ва қон йўқотиш кўрсаткичини аниқлаш тестлари, гемостаз тизимида $[Ca^{2+}]_{in}$ динамикасини қиёсий таҳлил қилиш учун тромбоцитларни ажратиш услуби, тромбоцитлар

агрегацияси ва уларнинг функционал фаоллигини аниқлаш ва спектрофотометрик услублардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

маҳаллий *Trifolium pratense* L. (себарга) ўсимлигидан кумаринлар каби тромболитик таъсирга эга бўлган экстракт ажратиб олинган ва таркибида дикумарол мавжудлиги аниқланган;

экстрактнинг *in vivo* шароитида экзоген тромбопластинемияда тромб ҳосил бўлишига билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтлар сингари таъсир кўрсатиши исботланган;

экстрактнинг БД-31 синергистлари билан комплекс ҳолда зараркунанда кемирувчиларга кумулятив ва танлаб токсик таъсир кўрсатиши, ундан янги родентицид воситаларни яратиш ва ишлаб чиқаришда фойдаланиш мумкинлиги аниқланган;

фешурин, невескин, самаркандин, бодиун терпеноид кумаринлари, сесквитерпенлар аралашмаси ва моғорлаган себарга экстракти билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянт хоссасига эгаллиги аниқланган ва антикоагулянт сифатида фойдаланиш мумкинлиги исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат.

моғорлаган себарга экстракти, терпеноид кумаринлар - фешурин, невескин, самаркандин, бодиун, сесквитерпенлар аралашмасининг антикоагулянт ва токсикологик хоссаларига эга эканлиги аниқланган;

моғорлаган себарга экстракти таркибидаги кумаринларнинг маълум замбуруғлар (*Acremonium Zink*, *Scopulariopsis Bainier* и *Graphium Corda*) ёрдамида дикумаринга айланиши исботланган;

моғорлаган себарга экстракти ва терпеноид кумаринлар- фешурин, невескин, самаркандин, бодиун, сесквитерпенлар аралашмасининг антикоагулянт хоссалари асосида родентицид препарати рецептураси ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги тадқиқотларни замонавий биофизикавий-биокимёвий услублар ва қурилмалардан, дастурий таъминотлардан фойдаланиш асосида бажарилганлиги билан тасдиқланади. Ҳар бир тадқиқот энг камида 4-6 марта такрорлаш орқали амалга оширилган. Олинган маълумотларни қайта ишлаш Origin Pro 7.5 (Origin Lab Corporation, АҚШ) компьютер дастурида ёрдамида ўртача қийматнинг ишончлилик интервали оралиқ қийматларини ҳисоблаган ҳолда статистик таҳлил қилинди.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти шундаки, МСЭ ҳамда фешурин, невескин, самаркандин, бодиун терпеноид кумаринлари ва сесквитерпенлар аралашмасининг физик-кимёвий, антикоагулянт ва токсикологик хоссаларини тадқиқ қилиш натижасида уларнинг билвосита антикоагулянт хоссаларининг очиб берилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти МСЭ ҳамда терпеноид кумаринлари- фешурин, невескин, самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар

аралашмасининг антикоагулянт хоссаларидан ветеринария ва санитария-эпидемиология хизматларида чорвачилик фермалари ва дон сақлаш омборларини синантроп кемирувчилардан ҳимоя қилишда ҳавфсиз родентицид препаратлар ишлаб чиқишга хизмат қилиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Моғорлаган себарга экстрактининг антикоагулянт хоссалари бўйича олинган илмий натижалар асосида:

моғорлаган себарга экстрактининг коагуляцион ва тромбоцитар гемостазни ингибирлаш хусусиятлари ФА-А11-Т040 рақамли «*Pulicaria gnaphalodes* ўсимлиги компонентларидан антиоксидант «Пуликарон» дори воситасини яратиш» мавзусидаги лойиҳада сальвифолин ва пуликарон флаваноидини антикоагулянт хоссасини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2018 йил 11 июндаги 4/1255-1809-сон маълумотномаси). Натижада дитерпен, кумарин ва флаваноидларнинг билвосита антикоагулянт хоссасини тавсифлаш имконини берган;

себарга экстрактининг антикоагулянт хоссаларидан Хитой Фанлар академияси Шинжон Физика ва кимё техника институтининг мақсадли илмий тадқиқотида кумаринларнинг фармакологик хоссаларини тавсифлашда фойдаланилган (Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry of CASнинг 2019 йил 15 мартдаги маълумотномаси). Натижада янги кумарин бирикмалари ёрдамида гемостаз тизимини бошқариш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 12 та халқаро ва 4 та республика миқёсидаги илмий-амалий анжуманларда муҳокама қилинган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 19 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 4 та мақола, жумладан 1 таси хорижий ва 3 таси республика журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 110 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий-амалий аҳамияти

очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Антикоагулянтлар классификацияси ва таъсир механизми**» деб номланган биринчи бобида антикоагулянт родентицидлар, бевосита ва билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтларнинг таъсир механизмлари, антикоагулянтлар – кумарин ва индандион ҳосилалари, терпенли кумаринларнинг физиологик роли, каламушларнинг антикоагулянтларга чидамлилиги ва синергистлар – родентицидларнинг таъсирини кучайтирувчи кимёвий моддалар, синергистларнинг таъсир механизми ҳақидаги адабиётлар шарҳи келтирилган, ҳамда ушбу шарҳда гемостазнинг асосий биокимёвий механизмлари ва гемостаз бузилишини аниқлашнинг умумий услубияти батафсил баён қилинган.

Диссертациянинг «***Trifolium pratense* L. (себарга)дан ажратиб олинган экстрактнинг физик-кимёвий, токсикологик ва антикоагулянт хоссаларини аниқлаш услублари**» деб номланган иккинчи бобида, фойдаланилган объектлар, материаллар ва услублар келтирилган.

Тадқиқотларда моғорлаган себаргадан экстракт ажратиб олиш, каламушларнинг тадқиқ қилинаётган антикоагулянтларга нисбатан бошланғич сезгирлик даражасини асослаш бўйича ўткир ва сурункали захарлиликни аниқлаш услуби, экзоген тромбопластинемия чақирилган модель тажрибалар, тромболитик фаолликни аниқлаш, қон кетиш вақти ва қон йўқотиш кўрсаткичини аниқлаш тестлари, препаратларнинг тромб ҳосил бўлишига таъсирини аниқлаш учун коагуляцион тадқиқот услублари, уларнинг таъсирини баҳолашда маълум бўлган гемостаз тестлари, тромбоцитларнинг функционал фаоллигини тадқиқ қилиш услублари, хроматографик ва спектрофотометрик таҳлиллар, шунингдек олинган натижаларни математик ва статистик таҳлил қилиш услубларидан фойдаланилган.

Диссертациянинг «***Trifolium pratense* L. (себарга)дан ажратиб олинган экстрактнинг физик-кимёвий ва антикоагулянт хоссалари**» деб номланган учинчи бобида моғорлаган *Trifolium pratense* L. (себарга)дан экстракт ажратиб олиш ва унинг физик-кимёвий хоссаларини ҳамда токсикологик ва антикоагулянт хоссаларини терпенли кумаринлар- фешурин, невескин, самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар аралашмаси билан солиштирган ҳолда аниқлаш бўйича олинган натижалар келтирилган.

Дастлабки тадқиқотларда аниқланишича, лаборатория ҳайвонлари (қуёнлар)ни бижғитилган, моғорлаган *Trifolium pratense* L. (себарга) экстракти билан озиклантирганда 7-8 суткадан кейин улардан кучли қон кетиши ва нобуд бўлиши кузатилади, бу эса *Trifolium pratense* L. (себарга)дан экстракт ажратиб олиш ва уни қон ивиш тизимига ва токсикологик хоссасини тадқиқ қилиш учун асос бўлиб хизмат қилди.

Моғорлаган себарга экстрактини олиш учун *Trifolium pratense* L. ўсимлигининг ер устки қисмини герметик махсус пакетда қоронғу жойда барглари моғор билан қоплангунга қадар сақладик. Сўнгра себарга барглари (200 г) 5 мм заррачаларга майдаладик ва 1:100 нисбатдаги ашё ва

экстрагентда экстракцияладик. Дикумаринни 60⁰ ҳароратда 96%ли этил спиртидан фойдаланиб экстракцияладик. Дикумаринлар суммасини ёт моддалардан тозалаш учун экстрагентни ҳайдашдан кейин олинган қуюқ экстрактни хлороформ билан қайта ишладик ва дикумаринлар аралашмасини ажратиб олдик. Экстрактни концентрациялаб ва қуритганимиздан сўнг кристалл ҳолатдаги моддани олдик. Бунда олинган модданинг миқдори моғорлаган себарганинг бошланғич массасининг 0,16% (320 мг) ташкил қилди. Моғорлаган себаргадан ажратиб олинган экстрактни биз моғорлаган себарга экстракти (МСЭ) деб номладик.

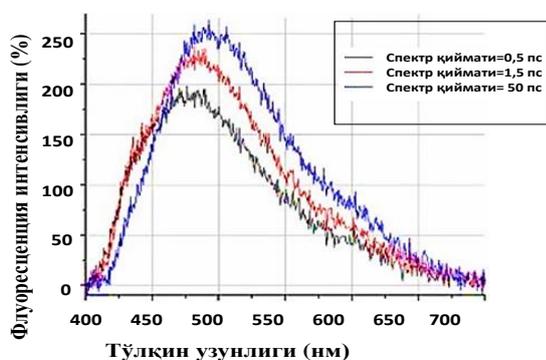
Токсикологик тадқиқотларда интоксикацияда юзага чиққан умумий белгилар орасида, худди дикумаринлар таъсирида бўлганидек, аъзо ва тўқималарнинг қон билан таъминланишини бузилиши, тромбогеморрагик синдромлар (терининг шиллиқ қаватига қон қуйилиши, қон кетиши) олдинги ўринни эгаллаши аниқланди.

МСЭ таркибида кумариннинг дикумаролга айланишидаги ферментатив жараёнларда иштирок этадиган моғор замбуруғлари борлигига ишонч ҳосил қилиш мақсадида Микробиология институти ходимлари (Сайдиева Ф. Х. ва Бахтиярова М.Х.) билан ҳамкорликда тадқиқотлар олиб бордик.

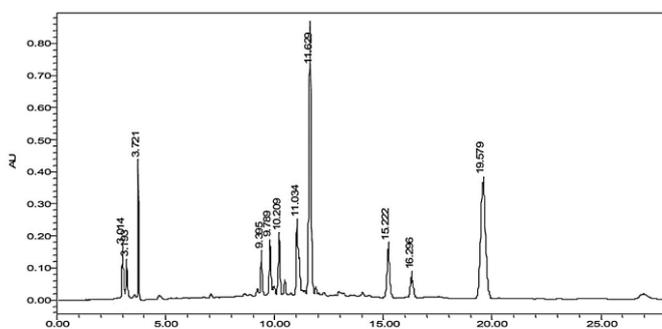
Микробиологик тадқиқотларда моғорлаган себарганинг суяқ экстракти таркибида бижғиш жараёнида кумариннинг дикумаролга иштирок этадиган микроорганизмларнинг камида учта тури борлиги аниқланди: *Acremonium Zink*, *Scopulariopsis Bainier* ва *Graphium Corda*.

Экстракт (кумаринлар аралашмаси)нинг флуоресцент таҳлили кўрсатишича, бром эритмаси билан тўйинган ишқорий муҳитда улар асосида қўзғалиш (380 нм) ва эмиссия (480 нм)нинг бир хил бўлган максимумларини идентификациялаш имконини берган.

Экстрактнинг концентрацияга боғлиқ равишда флуоресценциянинг аниқланган спектрлари уларнинг интенсивлигини концентрацияга чизиқли боғлиқ эканлигини кўрсатди. Бу эса мазкур экстракт таркибида дикумаринлар миқдорини баҳолаш имконини берди (1–расм).



1-расм. Флуоресценция интенсивлигининг МСЭ концентрациясига кўра кўрсаткичлари



2-расм. Моғорлаган себарга қуюқ экстрактининг хроматограммаси

Хамкорликда олиб борилган тадқиқотларда (Биоорганик кимё институти «Оқсиллар ва пептидлар кимёси» лабораторияси ходими Ж.Зиявитдинов билан) ЮССХ методи ёрдамида ушлаб туриш вақти стандарт дикумарол каби билан бир хил бўлган – 15,22 мин. компонент мавжудлиги аниқланди (2–расм).

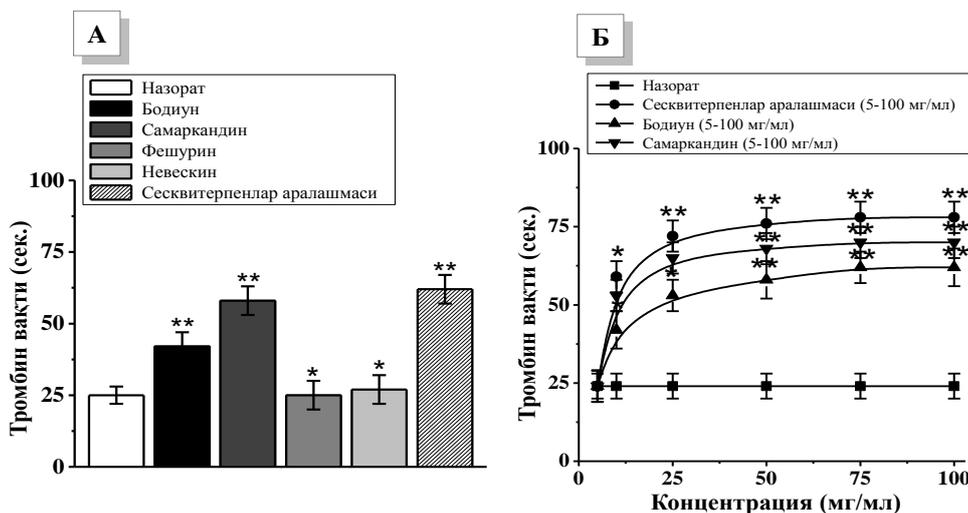
Куюқ экстрактдаги дикумарол миқдорини стандарт намуна (“Sigma Aldrich», Германия) ва синалаётган намуналар хроматограммасидаги чўккилар майдонини солиштирган ҳолда ҳисобладик. Олиб борилган тадқиқотлар натижасида куюқ экстракт (4,7 г) таркибидаги дикумарол миқдори 0,64% (30 мг), кристалл фракцияда эса (320 мг) хлороформ ёрдамида аниқланган дикумаринлар суммаси 6,5% (20,8 мг) ни ташкил қилиши аниқланди.

МСЭ ни токсикологик, антикоагулянт ва физик-кимёвий хоссаларини маълум бўлган кумаринларнинг хоссалари билан солиштириш учун терпенли кумаринлар – фешурин, невескин, самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар аралашмасининг токсикологик ва антикоагулянт хоссалари тадқиқ қилинди.

Терпенли кумаринларнинг токсиклиги аниқланганида моддалар сичқонларга оғиз орқали юборилганида ЛД₅₀ самаркандин, бодиун ва сесквитерпенлар аралашмаси учун 3 кун давомида ≥ 500 мг/кг, фешурин, невескин учун 7 кун давомида ≥ 700 мг/кг ни ташкил қилганлиги аниқланди. Нобуд бўлган ва тирик қолган ҳайвонларнинг ичи ёриб кўрилди. Бунда ичи ёрилган ҳайвонларнинг ўпка, қорин плеврал бўшлиғига нуқтали характердаги қон қуйилиши аниқланди. Аъзоларнинг қон томирлари ва капиллярларида анча яққол ифодаланди.

Дастлабки *in vitro* шароитида каламуш қони плазмасида олиб борилган тадқиқотларда аниқланишича, аниқланган терпенли кумаринлар орасида самаркандин, бодиун, сесквитерпенлар аралашмаси дозага боғлиқ равишда тромбин вақтини турли даражада узайтирди, невескин ва фешурин тромбин вақтига деярли таъсир қилмади (3А–расм). Бунда бодиун, самаркандин ва сесквитерпенлар аралашмаси 5-100 мг/мл концентрацияларда дозага боғлиқ ҳолда тромбин вақтини назоратга нисбатан узайтирди. Бунда фибрин лахтасини ҳосил бўлиши сустлашди, бу эса IXa, Xa, XIIa омилларидан бирининг ёки антитромбин III нинг фаоллигини пасайишидан далолат бериши мумкин (3Б–расм).

Навбатдаги тажрибаларда терпенли кумаринларни *in vivo* да қон ивиш параметрларига таъсирини аниқладик. Дастлаб ўрганилаётган бирикмаларни лаборатория каламушларига бир мартаба 100-1000 мг/кг дозада оғиз орқали юбордик. Уч кун ўтгач, ушбу каламушлардан қон ивиш параметрларининг коагуляцион фаоллигини ўрганилаётган кумаринлар фонида аниқлаш учун қон олдик. Каламуш қони плазмасида *in vivo* да ўтказилган тажрибаларда терпенли кумаринлар – бодиун, невескин, фешурин, самаркандин ва сесквитерпенлар аралашмаси антикоагулянт хоссасини турли даражада намоён қилди.



3-расм. А. Кумаринларнинг (100 мг/мл) тромбин вақтига таъсири. Ордината ўқида – тромбин вақти (сек) ифодаланган. **Б. Кумаринларнинг тромбин вақтига дозага боғлиқ таъсири.** Ордината ўқида – тромбин вақти (сек) ифодаланган; Абсцисса ўқида – кумаринлар концентрацияси (мг/мл) ифодаланган. * – назоратга нисбатан $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ ($n=4-6$).

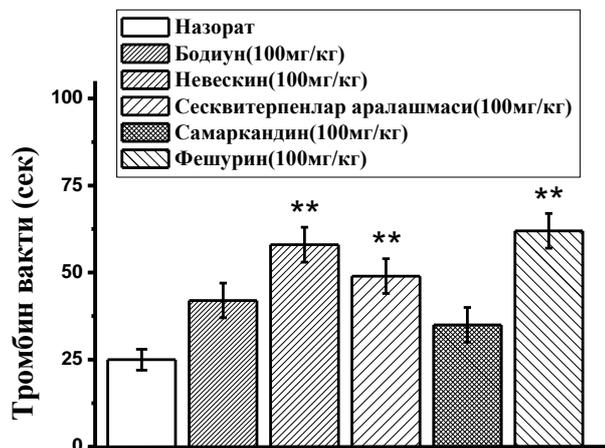
Каламуш қони плазмасида *in vivo* да ўтказилган тажрибаларда терпенли кумаринлар – бодиун, невескин, фешурин, самаркандин ва сесквитерпенлар аралашмаси антикоагулянт хоссасини турли даражада намоён қилди. Хусусан, терпенли кумаринлар – фешурин ва невескин тромбин вақтини энг кўп узайтирди (4-расм).

Терпенли кумаринларни плазма рекальцификацияланишининг фаоллашган вақтига (ПРФВ) ва протромбин вақтига (ПТВ) га таъсири аниқланилганда ушбу препаратлар ичида энг фаоли терпенли кумаринлар – невескин ва фешурин эканлиги аниқланди. Улар 10 мг/мл концентрацияда қон ивиш вақтини анча узайтирди.

Терпенли кумаринлар – невескин, фешурин таъсирида ПРФВ ни ҳам узайиши III омил ва ивишнинг бошқа плазма омилларини (VII ва XIII омиллардан ташқари) ингибирланишига ҳам боғлиқ бўлиши мумкин.

Варфарин, фешурин, невескин фонида ПТВни узайганлигидан келиб чиқиб фибрин ҳосил бўлишини фаоллаштирувчи омилларнинг билвосита таъсир қилувчи асосида ингибирланиши ҳақида хулоса чиқариш мумкин.

Навбатдаги тажрибаларда терпенли кумаринлар – фешурин, невескин ва варфарин препаратини қон ивиш жараёнига, ва қисман фаоллашган тромбопластин вақти (ҚФТВ) тестларига таъсири аниқланди. Бу тажрибаларда терпенли кумаринлар – фешурин, невескин варфарин препаратининг назоратга караганда бирозгина ингибирловчи таъсирга эгаллиги аниқланди, бу эса ушбу терпенли кумаринларнинг XII, XI, IX, VIII омилларнинг фаоллигига таъсир кўрсатмаслигидан далолат беради.



4-расм. Препаратларнинг тромбин вақтига *in vivo* да таъсири. * – назоратга нисбатан $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ ($n=4-6$).

Ушбу тадқиқотларда тузилиши варфарин препаратига ўхшаш бўлган невескин, фешурин терпенли кумаринлари қон ивиш тизимига кўрсатадиган физиологик таъсири бўйича яқин эканлиги аниқланди.

Эҳтимол, кумаринлар – невескин, фешурин XII, XI, IX, VIII омиллардан бирининг фаоллигини сусайтириб, қон ивишининг ички йўлининг омилларига таъсир қилади. Бодиун ва самаркандин, IXa, Xa, XIIa омиллардан бири ва антитромбин III фаоллигини сусайтириб, фибрин лаҳтасини ҳосил бўлишини сустлашишига олиб келган бўлиши мумкин.

Навбатда терпенли кумаринларнинг экзоген тромбопластинемия шароитида, плазма ва тромбоцитар гемостазга таъсирини аниқлаш мақсадида, уларнинг тромбозластографик кўрсаткичларга таъсирини аниқлаш бўйича тадқиқотлар олиб бордик.

Шуни таъкидлаш лозимки, ўрганилган терпенли кумаринлар орасида тромбопластинемияга энг кўп ижобий таъсирни самараси бўйича варфарин препаратиникига яқин бўлган невескин ва фешурин қўлланилганида кузатилди.

Эҳтимол, структураси варфарин препарати структурасига яқин бўлган фешурин ва невескин кумаринлари XII, XI, IX, VIII омиллардан бирининг фаоллигини ингибирлаб, қон ивишининг ички йўли омилларига таъсир қилиши мумкин.

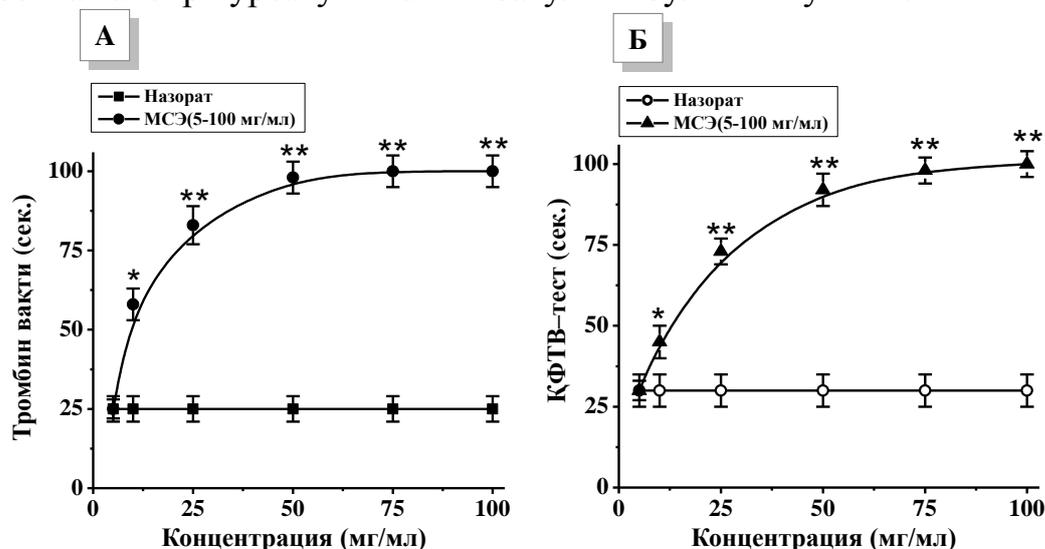
Ушбу тажрибаларда параллел равишда терпенли кумаринлар билан солиштирган ҳолда МСЭ нинг антикоагулянт ва токсикологик хоссалари аниқланди.

Қон плазмасида ўтказилган тажрибалардан (*in vitro*) маълум бўлишича, МСЭ тромбин вақтини аниқлаш тестида дозага боғлиқ ҳолда (5-100 мг/мл) антикоагулянт фаолликни намоён қилади (5A–расм). Олинган натижалар таҳлили МСЭ фибриноген фаоллигига таъсир кўрсатмаслиги, балки асосан қон ивишининг бошқа омилларига таъсир қилишини кўрсатди.

Навбатдаги тажрибада МСЭни плазма рекальцификацияланишининг фаоллашган вақтига (ПРФВ) таъсирини аниқладик.

МСЭ таъсирида плазма ивишининг рекальцификация вақти дозага қараб узайди. МСЭ таъсирида вақтнинг узайиши гипокоагуляцияга бўлган тенденцияни кўрсатади, ва бунинг сабаби III омил ва қон ивишининг бошқа плазма омилларининг кўпчилигини (VII ва XIII омиллардан ташқари) ингибирланиши бўлиши мумкин. Агар кальций ионлари қон ивишининг ҳам ташқи, ҳам ички йўлини фаоллашиш жараёнида қатнашишини ҳисобга олсак, у ҳолда препаратларнинг таъсири унинг қон ивишининг иккала йўлига ҳам таъсир қилишига боғлиқ бўлиши мумкин.

МСЭ ни ҚФТВ-тестига таъсири тадқиқ қилинганида, ушбу экстрактнинг 5-100 мг/мл концентрацияларда дозага боғлиқ равишда фибрин лахтасининг ҳосил бўлишини сусайтириб, тромб ҳосил бўлиш вақтини назоратга нисбатан узайтириши аниқланди, бу эса қон ивишининг XII, XI, IX, VIII омилларидан бирининг фаоллигини ингибирланишидан далолат бериши мумкин (5Б-расм). МСЭ қон ивиш жараёнига таъсири бўйича қон ивиши омиллари – протромбин ва проконвертинни жигардаги синтезини издан чиқарадиган билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянт бўлиши мумкин.



5-расм. МСЭ нинг тромбин вақти (А) ва ҚФТВга таъсири (Б).

Ишончилилик кўрсаткичи: *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$ ($n=4-6$).

Ихтисослаштирилган ва клиник-диагностик лабораторияларда қўлланиладиган энг кенг тарқалган тестлардан бири Квик тести бўлиб, у протромбин комплекси омилларининг даражасини аниқлаб беради. Айнан ушбу тест билвосита таъсир қилувчи антикоагулянтлар билан даволашни назорат қилишда ва жигар касалликларини диагностикасида ишлатилади [Козлова, 2001].

МСЭ нинг ПТВга таъсири тадқиқ қилинганида, МСЭ терпенли кумаринлар –невескин ва фешурин билан бирга қон ивиш вақтини дозага боғлиқ ҳолда узайтириши аниқланди. МСЭ таъсирида протромбин вақтини узайишидан келиб чиқиб, V, II ва VII прокоагулянт омилларининг, протромбиназанинг протромбинга айланиши ва кейинчалик фибриннинг ҳосил бўлиши ингибирланади, деб хулоса чиқариш мумкин.

Шундай қилиб, олинган натижалар кўрсатишича, МСЭ рекальцификация, ҚФТВ ва техпластин тестларида плазманинг ивиш

вақтини узайтириб гемостаз системасига сезиларли таъсир кўрсатади. Ушбу натижалар МСЭ нинг антикоагулянт таъсирга эга бўлиб, фибрин лахтасининг ҳосил бўлишини сусайишига олиб келувчи омилларга таъсир кўрсатишидан далолат бериши мумкин.

Буни исботлаш учун биз экстрактнинг томир ичида тромб ҳосил бўлишини чақирадиган таъсирга ҳайвонларнинг толерантлигини оширадиган билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянт сифатидаги самарасини баҳолаш имконини бера оладиган экзоген тромбопластинемиядан модел сифатида фойдаландик.

Ушбу тажрибада олдиндан натрий хлориднинг изотоник эритмаси юборилган фонда тажриба каламушларига томир орқали тромбопластин 40 мг/кг тана массасига дозада юборилганда леталлик даражаси 63,3% ни ташкил қилди. Бунда ҳайвонларнинг асосий қисми 12 соат ичида нобуд бўлди. Олдиндан перорал МСЭ 10 мг/кг дозада юборилган фонда тромбопластин юборилганидан кейин нобуд бўлиш даражаси 30%ни, 25 мг/кг дозада эсаатиги 13,3% ни ташкил қилди. Бунда ҳар иккала гуруҳдаги тажриба ҳайвонларининг нобуд бўлиши сутка давомида кузатилди.

Шундай қилиб, МСЭ лаборатория ҳайвонларига превентив перорал юборилганида тажриба ҳайвонларининг нобуд бўлиш частотаси камаяди.

Мазкур натижалар ЭЗК билан чақирилган гипокоагулемияни тромботик, микроциркулятор бузилишларни ривожланишига олиб келадиган қон томирларни ички қисмида қонни ивиши билан боғлиқ эканлигини инкор қилмайди.

Қон ивиш жараёнларида фаол қатнашадиган хужайралар – тромбоцитларнинг миқдори сезиларли даражада ўзгариши кузатилган.

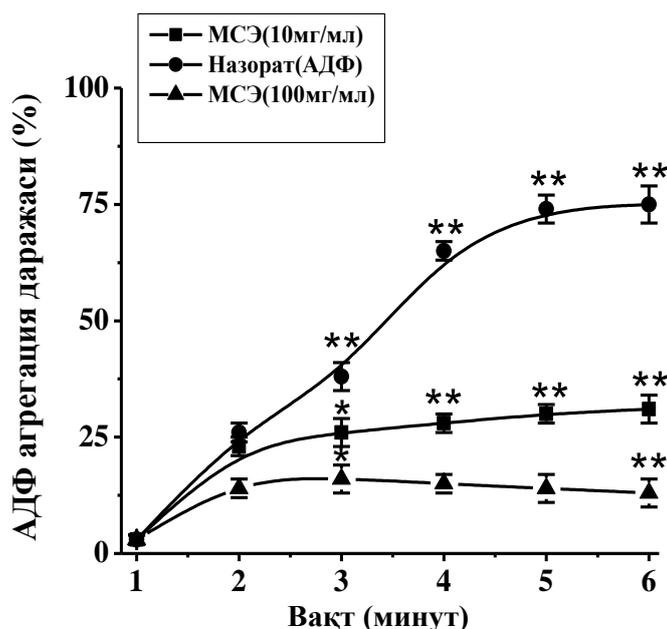
Тромбоцитларнинг ташқи стимул реакцияси хужайра ҳаракатчанлигини фаоллаштирувчи ва ингибирловчи хужайра ички сигналларига боғлиқ.

Экзоген тромбопластинемияда *in vivo* шароитида моғорланган себарга экстрактининг тромбоцитлар сонига таъсири ўрганилганда тромбопластинни назоратдаги ҳайвонларнинг қорин бўшлиғига юборилганда 30 минутдан сўнг тромбоцитопенияга олиб келиши аниқланган. Бу ҳолат тромбоцитларни 2,6 маротаба камайиши билан изоҳланган. Тажриба гуруҳи ҳайвонларда, олдиндан 10 мг/кг миқдорда МСЭ юборилган бўлиб, тромбоцитларнинг миқдори қисман 25-30 % камайганлиги кузатилган, бир соатдан сўнг интакт гуруҳ кўрсаткичларига яқинлашган. Натижага кўра, назорат гуруҳдаги ҳайвонлар тромбопластинни таъсирига яқин эканлиги ва уларда сезиларли тромбоцитопения ривожланиши аниқланган. Тажриба гуруҳи ҳайвонларида эса мазкур ўзгаришлар физиологик нормалардан четлашмаган.

Шундай қилиб, экзоген тромбопластинемияда МСЭ ни қорин бўшлиғига юборилиши натижасида ҳайвонларнинг аъзоларида юз берадиган деструктив ўзгаришларни чекланиши натижасида уларнинг яшовчанлигини ортиши аниқланди. Бу эса МСЭ нинг тромбопластинемияда гемокоагуляцион силжишларни сусайиши билан ифодаланадиган ҳимояловчи таъсири тромбоцитларнинг функционал фаоллигини ўзгариши ҳисобига амалга ошади, деб тасдиқлаш имконини беради.

МСЭни тромбоцитлар агрегациясига таъсири аниқланганда, тромбоцитлар агрегациясини фаоллашиши МСЭ таъсирида концентрацияга боғлиқ ҳолда (10–100 мг/мл) пасайиши аниқланди. МСЭнинг яққол кўринган сусайтирувчи таъсири адреналинга қараганда АДФ билан чақирилганда кўринди. МСЭ паст концентрацияларда чақирилган агрегациянинг иккинчи фазасини сусайтирди. МСЭнинг юқори концентрациялари АДФ билан чақирилган агрегациянинг иккала фазасини ҳам ингибирлайди (6–расм).

Агар, тромбоцитлар фаоллашувининг асосий бўғини ҳужайра ичидаги деполардан кальций ионларининг мобилизацияланиши эканлигини ҳисобга олсак, у ҳолда МСЭ нинг таъсири ҳужайра ички деполаридан кальций ионлари мобилизациясини ингибирлаши билан боғлиқдир, деб тахмин қилиш мумкин.



6-расм. МСЭ нинг АДФ таъсирида чақирилган тромбоцитлар агрегациясига таъсири. А– МСЭ нинг 10 мг/мл; Б– МСЭ – 100 мг/мл концентрациядаги таъсири.

Шу сабабли, терпенли кумаринлар таъсирида тромбоцитларда ҳужайра ички Ca^{2+} миқдорини ўзгариши аниқланди. Бунда кальцийнинг ҳужайра ички депосидан чиқиши учун стимулятор сифатида АДФ (0,5 мкг/мл)дан фойдаланилди. МСЭ нинг кальций ионларини хелатлаш хоссаси ЭГТА билан солиштирган ҳолда интакт тромбоцитларда амалга оширилди.

МСЭ ва терпенли кумарин бўлган бирикма –фешурин 100 мкМ концентрацияда АДФ индукциясидан 2 мин олдин қўшилганда ҳужайра ичидан Ca^{2+} чиқишини 45–55%га сусайтирди. Ушбу бирикмалар тромбоцитлар цитоплазмасида эркин Ca^{2+} ионлари концентрациясини тезда пасайишига олиб келиши, ва тромбоцитларнинг фаоллашувини блоклаш қобилятига эга бўлиб, унинг исталган фазасида тромб ҳосил бўлиш хавфини камайтира олиши мумкин, деб тахмин қилинди.

МСЭнинг таъсир механизмини ойдинлаштириш учун *in vivo* шароитида экзоген тромбопластинемияда тромб ҳосил бўлиш жараёнига таъсирини

аниқладик. Олинган натижаларнинг таҳлили, МСЭнинг билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтлар қаторига киради, деган хулосага келиш имконини берди, чунки препаратнинг максимал эффекти 24 соатдан сўнг намоён бўлади ва бу курантил препаратининг таъсири сингари тромбопластин таъсирини пасайиши билан боғлиқдир.

МСЭнинг тромболитик фаоллиги *in vivo* шароитида каламушларда чақирилган вена тромбози моделида Варфарин препарати ва стрептокиназа – бевосита, фибринолитик таъсирига солиштирган ҳолда ўрганилганда, қорин пастки ковак венасини қисман стенозлаб, 10% ли темир хлорид билан 5 минут давомида аппликация қилинганидан кейин 60 минут ўтгач, каламушларда қон кетиш вақти 2 мартага, қон йўқотиш кўрсаткичи эса 3 мартага камайганлиги аниқланди (жадв.). Бунда ПВ интакт кўрсаткичлардан фарқ қилмади, ҚФТВ кўрсаткичи 65,3±5,7 секундгача узайганлиги аниқланди, фибриноген миқдори эса 2 мартага ортиши кузатилди. Нам ҳолатдаги тромб оғирлиги 78,5±6,6 мг, қуруқ ҳолатдаги тромб оғирлиги эса 40,0±3,4 мг ни ташкил қилди.

жадвал

МСЭ нинг *in vivo* шароитида каламушларда чақирилган вена тромбози моделига тромболитик таъсири ($M \pm m$, $n=6$)

Тестлар	Препаратлар				
	Интакт	Назорат	Стрептокиназа 1600 МЕ/кг	Варфарин 10 мг/кг	МСЭ 50 мг/кг
Қон кетиш вақти (мин)	6±0,4		3,2±0,2	8,3±0,4	9,8±0,4
Қон йўқотиш миқдори (г)	0,57±0,0 2		0,048±0,004	0,1±0,06	0,028±0,00 2
ПТВ (сек)	18±4,7	65,3±5,7	54,0±4,7	76±4,7	85±4,7
ҚФТВ (сек)	20,6±0,2 6	20,8±2	33,1±0,26	28±0,14	37,4±0,26
Фибриноген (г/л)	215±16	512±46	207±16	452,8±36	496±16
Нам тромб оғирлиги (мг)		78,5±6,6	16,3±1	24,8±1	20±1
Қуруқ тромб оғирлиги (мг)		40±3,4	5,3±0,4	8,8±0,4	6,7±0,2

Олинган натижалар шуни кўрсатадики, таъсири бўйича МСЭ ни билвосита антикоагулянт ҳисобланган варфарин препаратига тенглаштирса бўлади, ва унинг таъсири фибринолитик модда ҳисобланган стрептокиназа таъсиридан бировгина камроқдир.

Диссертациянинг «МСЭ ни синергистлар билан комбинациясидаги таъсирини аниқлаш ва МСЭ ва синергист асосида хўрак тайёрлаш ва уларни синовдан ўтказиш» деб номланган тўртинчи қисмда МСЭ ни синергистлар билан комбинациясида қон ивиш системаси, ҳамда уларнинг токсик таъсири синантроп кемирувчиларда аниқланди.

Ушбу тадқиқотларда объект сифатида антикоагулянт фаолликка эга бўлган потенциал синергистлар- натрий цитрати, ацетилсалицил кислотаси, БД-31 ва сульфатланган целлюлоза хизмат қилди.

Аниқланган синергистлар орасида энг самаралиси фосфорорганик бирикмалар гуруҳига киритилган БД-31 (0,0–диалкилтиофосфат) бўлиб, у

Биоорганик кимё институти «Биологик фаол қуйи молекуляр моддалар» лабораториясида синтезланган. Мазкур модданинг *in vivo* шароитида гемостаз тизимига минимал концентрацияда (5 мг/кг) самарали таъсир кўрсатиши ва МСЭ нинг антикоагулянт ҳамда захарли таъсирини кучайтириши, сичқонларнинг ўлимига олиб келиши аниқланди.

Каламуш қони плазмасида *in vitro* шароитида олиб борилган қиёсий тадқиқотларда ўрганилган моддалар –БД-31 ва МСЭнинг тромбин вақти тестида турли хил даражада антикоагулянт фаолликни намоён қилиши аниқланди.

Токсикологик тадқиқотларда интоксикациянинг умумий юзага чиқишида аъзо ва тўқималарнинг қон билан таъминланишини оммавий бузилиш белгилари (терининг шиллиқ қаватида қон қуйилиши, қон кетиши) сезиларли ўринни эгаллаши аниқланди.

Олинган натижалар зарақунанда кемирувчиларга қарши курашишда моғорлаган себарга экстракти ва БД-31 синергисти асосида родентицидларни ишлаб чиқариш технологияси учун асос сифатида хизмат қилади.

Тайёр хўрақларнинг родентицид хоссалари дастлаб лаборатория шароитида, кейин эса дон сақлаш омборлари биноларида аниқланди.

Олинган натижаларга кўра, лаборатория ҳайвонларида моғорлаган себаргадан ажратиб олинган экстракт синергистлар билан комплекс ҳолда билвосита таъсирга эга антикоагулянт сифатида таъсир кўрсатиши ва кумулятив таъсирга эгаллиги, зарақунанда кемирувчилар учун танлаб таъсир қилиши ва захарлилик даражасининг пастлиги, ўз навбатида инсон ва қишлоқ хўжалиги ҳайвонлари учун хавфи сезиларсиз даражадалиги аниқланди.

Ушбу хўрақ препаратнинг навбатдаги синовлари серияси «Тошкентдонмахсулотлари» АЖ ва «Сайра дон маҳсулотлари» ОАЖ дон омборларида амалга оширилди. Синов натижалари антикоагулянтлар (МСЭ ва БД-31 синергистлари) қўшилган хўрақ каламуш ва сичқонлар учун родентицид фаолликка эга эканлиги: сутка давомида хўрақнинг умумий микдоридан 36% истеъмол қилинганлигини кўрсатди. Каламуш ва сичқонлар 6-9 кунга келиб нобуд бўлиши қайд қилинди.

Тадқиқот натижалари билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтлар асосида зарақунанда кемирувчиларни энг кам марта озиклантирганда энг юқори самарадорликка эга бўлган хўрақ рецептураларини ишлаб чиқиш мумкин.

Ушбу хўрақ препаратлардан ветеринария ва санитария-эпидемиология хизматларида хавфсиз родентицидлар сифатида, чорвачилик фермалари ва дон сақлаш омборларини синантроп кемирувчилардан химоя қилишда фойдаланиш мумкин.

Родентицид хўрақ препаратини маҳаллий хом ашё асосида ишлаб чиқариш имконияти ва уни ички бозорда, келгусида эса ташқи бозорда ҳам сотишдан келадиган иқтисодий самара кутилади.

ХУЛОСАЛАР

1. Маҳаллий себарга (*Trifolium pratense* L) хомашёсидан ажратиб олинган экстракт сичқон ва каламушларда киритилган дозасига (50–100 мг/кг) боғлиқ кумарин таъсирига ўхшаш, тромбогеморрагик синдром типдаги интоксикация белгиларини намоён қилади.

2. Юқори самарали суюқлик хроматографияси, флуоресценция ва УБ–спектрал таҳлил услублари ҳамда микробиологик тадқиқотлар ёрдамида себаргадан ажратиб олинган экстракт таркибида дикумаринлар мавжудлиги исботланди.

3. Кумаринлар – фешурин, невескин, бодиун, самаркандин ва сесквитерпенлар аралашмаси структурасининг изошаклларига боғлиқ ҳолда қон ивишининг ички ва шунингдек, ташқи йўли омилларига таъсир кўрсатади.

4. Себаргадан ажратиб олинган экстракт, терпеноид кумаринлар – невескин ва фешурин сингари қон ивишининг ташқи механизмини фаоллаштирувчи омилларини ингибирлаб, антикоагулянт таъсирни намоён қилади ва заҳарлилиги бўйича кам заҳарли бирикмаларнинг IV синфига киради.

5. Тромбопластинемия моделлаштирилган *in vivo* шароитида себаргадан ажратиб олинган экстракт ва терпеноид кумаринлар –невескин ва фешурин қон томирларида тромб ҳосил бўлишини чақирувчи тромбопластиннинг таъсирига чидамлилиқ даражасини билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянтларнинг таъсири каби ошириши аниқланди.

6. Себаргадан ажратиб олинган экстракт билвосита таъсир кўрсатувчи антикоагулянт хоссасига эга бўлиб, келгусида ҳавфсиз родентицид сифатида қўллаш тавсия этилди.

7. Себарга экстрактининг синергистлар билан комплекси кемирувчиларга специфик таъсир қилиши, заҳарлилиқ даражаси камлиги, одам ва қишлоқ хўжалиги ҳайвонлари учун паст даражада ҳавфли ҳисобланиши исботланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.29.12.2018.В.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И
БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ
УЗБЕКИСТАНА**

**ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

РАИМОВА ГУЛИ МАДМУРОДОВНА

**ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКИЕ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА
ЭКСТРАКТА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ *TRIFOLIUM PRATENSE L.*
(КЛЕВЕР ЛУГОВОЙ) И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО В КАЧЕСТВЕ
РОДЕНТИЦИДА**

03.00.02 – Биофизика и радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент – 2019

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована Высшей аттестационной комиссией при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2018.4.PhD/B99

Диссертация выполнена в Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском и английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета www.ibb-nuu.uz и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyo.net).

Научный руководитель

Насиров Кабил Эркинович
доктор биологических наук

Официальные оппоненты

Мерзляк Петр Григорьевич
доктор биологических наук

Левицкая Юлия Владимировна
кандидат биологических наук

Ведущая организация

**Ташкентский педиатрический
медицинский институт**

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании Научного совета DSc.29.12.2018.V.01.13 при Институте биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская, дом-174.тел. 246-68-96.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана (зарегистрировано под №___). Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, Университетская дом-174. Тел: (99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2019 года.

(реестр протокола рассылки №___ от _____ 2019 года).

Сабиров Равшан Заирович
Председатель Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., академик

Асраров Музаффар Исламович
Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

Ахмеджанов Искандар Гулямович
Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время во всем мире проблема борьбы с грызунами–вредителями и причиняемого ими вреда пищевым продуктам, хранящимся, в складах наносят огромный экономический ущерб. В частности, грызуны-вредители являются переносчиками возбудителей инфекционных и инвазионных заболеваний, опасных для человека и животных. В связи с этим, в целях защиты животноводческих ферм и зернохранилищ от грызунов, имеет важное значение, создание новых и эффективных родентицидных препаратов.

В настоящее время в мире особое предпочтение при борьбе с грызунами-вредителями отдается безопасному химическому способу, среди которых распространение получили родентициды, содержащие антикоагулянты непрямого действия. Эти родентициды по сравнению с другими химическими соединениями обладают рядом преимуществ такими как: избирательная невысокая степень токсичности для грызунов, отсутствие условно-оборонительной реакции, наличие антидота, незначительная степень опасности для человека и сельскохозяйственных животных. Несмотря на то, что ранее проводились различные химические методы и способы борьбы с грызунами-вредителями, их численность не уменьшается, а более того, они за несколько поколений вырабатывают иммунитет к ядам, что приводит к тому, что многие родентициды, применяющиеся в борьбе с грызунами, утрачивают свою эффективность. Учитывая вышеизложенное, разработка и внедрение в практику все более эффективных родентицидных препаратов, которые являются безопасными для человека и сельскохозяйственных животных имеет актуальную значимость.

В настоящее время в Республике проводятся исследования, направленные на поиск и внедрение в практику новых родентицидов, выделенные и синтезированные на основе местного сырья, определение их физико-химических и токсикологических свойств для борьбы с синантропными грызунами. Внедрение комплексных мер послужат ориентиром для дальнейшего расширения третьего направления Стратегии дальнейшего развития Республики Узбекистан¹ «хранение сельскохозяйственной продукции, транспортировка и продажа, агрохимия, финансовые и другие современные рыночные услуги...». В связи с этим разработка родентицидного препарата на основе местного сырья имеет важное значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени послужит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан УП–4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 1 июня 2017 года «О мерах по организации деятельности Государственного комитета ветеринарии

¹ Указ Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан» № УП-4947

Республики Узбекистан» № ПП-3026 и в Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан от 23 июля 2018 года № 564 «О мерах по дальнейшему развитию производства ветеринарных лекарственных средств» а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики Узбекистан V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Степень изученности проблемы. В мире изучение химии кумаринов проводилось во многих научно-исследовательских центрах. В частности, Kasperkiwicz и другие, (2016) ¹ исследованы спазмолитические, коронарорасширяющее, антикоагулянтное и др. свойства кумаринов.

Учеными Mingarro-de-Leon и Chaveli-Lopez (2013) были найдены кумарины более чем в 200 видах растениях, относящихся к 37 семействам. Наиболее распространены они среди растений семейств сельдерейных, рутовых, бобовых. Обнаружено, что 4-гидроксикумарины, выделенные из различных видов клевера семейства бобовых, включают соединения, оказывающие антикоагулирующее действие на кровь. В их составе был найден дикумарол, который вызывает заболевание крупного рогатого скота. Srikrishna и др. (2018) ² показали, что кумарины не оказывают непосредственного влияния на сгустки крови, а действуют через печень, нарушая биосинтез белков свертывания крови, в частности, проконвертина, протромбина, антигемофильного глобулина В (фактора Кристмаса) и фактора Стюарта–Прауэра, через антагонизм с витамином К, необходимого для синтеза факторов свертываемости крови.

В странах СНГ Клементьевой С.А. (2015), Zhou и другими учёными (2009) проведены исследования по применению производных кумаринов для уничтожения грызунов–вредителей в качестве родентицидов и вместе с этим проведены исследования по поиску новейших эффективных антикоагулянтов на основе кумаринов.

У нас в стране учеными, антикоагулянтное свойство местного клевера не изучено, изучение физико-химических, антикоагулянтного и токсикологического свойств данного растения и разработка рецептур родентицидных препаратов на их основе для борьбы с грызунами-вредителями является актуальной и имеет научно-практическое значение.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами института, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ- прикладного проекта

¹Kasperkiewicz K., Małeczka M., Ponczek M.B., Nowak P., Budzisz E. Design, synthesis, X-ray structures of the new coumarin derivatives and perspectives of binding them to albumin and vitamin k epoxide reductase complex subunit // *Cryst. Growth Des.* – 2016. – V.16(1). – P.456–466.

²Srikrishna D., Godugu C., Dubey P.K. A Review on pharmacological properties of coumarins // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2018. – V.18(2). – P.113–141.

института Биоорганической химии, а также института Биофизики и биохимии ФА–А9–Т049 «Разработка эффективных методов борьбы с синантропными грызунами при помощи антикоагулянтов» (2015–2017).

Целью исследования является определение физико-химических и антикоагулянтных свойств экстракта, выделенного из растения *Trifolium pratense* L. (клевера лугового) и разработка на его основе рецептуры родентицидных препаратов.

Задачи исследования:

сравнение физико-химических, токсикологических и антикоагулянтных свойств экстракта, выделенного из *Trifolium pratense* L. (клевера лугового) с терпеноидными кумаринами- фешурин, невескин, самаркандин, бодиун и смеси сесквитерпенов;

in vivo исследование влияния экстракта, обладающего антикоагулянтными свойствами, на факторы тромбообразования в условиях экзогенной тромбопластинемии, корреляция между токсичностью и антикоагулянтной активностью, а также определение его родентицидных свойств;

с целью усиления родентицидной активности экстракта поиск синергистов среди антикоагулянтов, разработка комплексных соединений (антикоагулянт+синергист) на основе полученных данных;

а также испытание родентицидной активности в производственных условиях рецептуры приманок, разработанных на основе комплексных соединений.

Объектом исследования является экстракт заплесневелого клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), в качестве сравнения применялись терпеноидные кумарины: фешурин, невескин, самаркандин, бодиун и смесь сесквитерпенов, полученные в лаборатории «Кумаринов и терпеноидов» Института химии растительных веществ.

Предметом исследования является определение физико-химических, токсикологических и антикоагулянтных характеристик некоторых биологически активных соединений и разработка на их основе рецептур родентицидных препаратов для борьбы с грызунами-вредителями.

Методы исследования. В ходе выполнения диссертационной работы использовались методы экстракции заплесневелого клевера, в условиях *in vitro* и *in vivo* методы определения физико-химических, токсикологических и антикоагулянтных свойств биологически активных соединений, модельные эксперименты в условиях экзогенной тромбопластинемии, определение тромболитической активности, тесты определения времени кровотечения и кровопотери; методы выделения тромбоцитов для сравнительного анализа динамики $[Ca^{2+}]_{in}$ в системе гемостаза, спектрофотометрические методы для изучения агрегации и функциональной активности тромбоцитов.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

из местного клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) выделен экстракт с тромбогеморрагическим действием подобно кумаринам и определено присутствие дикумарола в его составе;

доказано, что этот экстракт, *in vivo* в условиях экзогенной тромбопластинемии, действует как антикоагулянт непрямого действия на тромбообразование;

определено, что экстракт в комплексе с синергистом БД-31 обладает кумулятивной и избирательной токсичностью для грызунов, тем самым показано возможность на основе его создания и разработка нового родентицидного средства;

установлено, что экстракт заплесневелого клевера и терпеноидные кумарины – фешурин, невескин, самаркандин, бодиун, а также смеси сесквитерпенов обладают свойствами антикоагулянта непрямого действия и доказано возможность использования их в качестве антикоагулянта.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

установлено, что экстракт заплесневелого клевера и терпеноидные кумарины – фешурин, невескин, самаркандин, бодиун, смеси сесквитерпенов обладают антикоагулянтными и токсикологическими свойствами;

доказано, что кумарины, которые были в составе экстракта заплесневелого клевера, превращаются в дикумарин с помощью определенных грибов (*Acremonium* Zink, *Scopulariopsis* Bainier и *Graphium* Corda);

на основе антикоагулянтных свойств экстракта заплесневелого клевера и терпеноидных кумаринов-невескина, фешурина, самаркандина, бодиуна, смеси сесквитерпенов разработана рецептура родентицидных препаратов.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что эксперименты были проведены с применением современных биохимических, биофизических методов, приборов и программных обеспечений. Каждый эксперимент проводился как минимум в 4-6 кратном повторениях. Статистическая обработка данных проводилась с учетом среднего коэффициента интервальной достоверности и средних величин с использованием компьютерную программу Origin Pro 7.5 (Origin Lab Corporation, США).

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования заключается в интерпретации свойств антикоагулянта непрямого действия ЭЗК, а также фешурина, невескина, самаркандина, бодиуна и смеси сесквитерпенов терпеноидных кумаринов, что было выявлено на основании полученных результатов по изучению их физико-химических, антикоагулянтных и токсикологических свойств.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что антикоагулянтные свойства ЭЗК и терпеноидных кумаринов- фешурина, невескина, самаркандина, бодиуна, смеси сесквитерпенов послужат как основание при разработке безопасных родентицидных препаратов в

санитарно–эпидемиологической службе, в защите животноводческих ферм, зернохранилищ от синантропных грызунов.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных научных результатов, об антикоагулянтного свойства экстракта заплесневелого клевера:

ингибиторное действие экстракта заплесневелого клевера на тромбоцитарный и коагуляционный гемостаз были использованы в научно-прикладном проекте ФА–А11–Т040 «Создание антиоксидантного лекарственного средства Пуликарон из компонентов растения *Pulicaria gnaphalodes*» при определении свойств антикоагулянта сальвифолина и флавоноида пуликарона (справка Академии наук Республики Узбекистан № 4/1255–1809 от 11 июня 2018 года). В результате это позволило охарактеризовать непрямые антикоагулянтные свойства дитерпенов, кумаринов и флавоноидов;

антикоагулянтные свойства экстракта заплесневелого клевера использованы при исследовании фармакологических характеристик кумаринов в Синьцзянского Технического института физики и химии Китайской Академии Наук (справка от 15 марта 2019 года Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry of CAS). В результате получена возможность управления гемостазной системой при помощи новых кумариновых соединений.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований были обсуждены на 12 международных и 4 республиканских научно–практических конференциях.

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 4 научные статьи, в том числе 1 в зарубежных и 3 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, выводов, списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 110 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснована актуальность и востребованность проведенных научных исследований, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики, сформулированы цель и задачи, выявлены объект и предмет исследования, изложены научная новизна и практические результаты, обоснована достоверность полученных результатов, раскрываются теоретическая и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Классификация и механизм действия антикоагулянтов**» приведены сведения об антикоагулянтах родентицидах, механизм антикоагулянтов прямого и непрямого действия, физиологическая

роль кумаринов, антикоагулянты – производные кумарина и индандиона, резистентность крыс к антикоагулянтам и синергисты– химические вещества, усиливающие токсичность родентицидов, изложен механизм действия синергистов, а также в этом обзоре подробно описываются основные биохимические механизмы гемостаза и общая методология распознавания нарушений гемостаза.

Во второй главе **«Методы определения физико-химических, токсикологических и антикоагулянтных свойств экстракта, выделенного из *Trifolium pratense* L. (клевера лугового)»** в диссертации приведены использованные объекты, материалы и методы. В этих исследованиях использованы методы; выделения экстракта из заплесневелого клевера, методы определения острой и хронической токсичности по изучению исходного уровня чувствительности крыс к исследуемым антикоагулянтам, модельные эксперименты в условиях экзогенной тромбопластинемии, определения тромболитической активности, тесты на определение времени кровотечения и величины кровопотери, коагуляционные методы исследования для определения влияния препаратов на тромбообразование, известные тесты гемостаза для оценки их влияния, методы изучения функциональной активности тромбоцитов, хроматографические и спектрофотометрические анализы, а также методы математической и статистической обработки полученных результатов.

В третьей главе диссертации **«Физико-химические и антикоагулянтные свойства экстракта, выделенного из *Trifolium pratense* L. (клевер луговой)»** приведены результаты исследований по выделению экстракта из заплесневелого клевера *Trifolium pratense* L. (клевер луговой) и исследование их физико–химических характеристик, а также токсикологических и антикоагулянтных свойств в сравнении с терпеноидными кумаринами- фешурина, невескина, бодиуна, самаркандина и смеси сесквитерпенов.

В предварительных исследованиях было установлено, что при скармливании лабораторных животных (кроликов) прокисшим, заплесневевшим клевером (*Trifolium pratense* L.), в течение 7–8 суток, наблюдается сильное кровотечение и гибель животных, что послужило основанием для выделения и изучения влияния экстракта из растений (*Trifolium pratense* L.) на систему свертывания крови и его токсикологических свойств.

Для получения экстракта заплесневелого клевера, сырую надземную часть растений *Trifolium pratense* L. хранили в герметичном специальном пакете в темном месте до тех пор, пока листья не покроются плесенью. После этого листья клевера (200 г) измельчали до размера частиц не более 5 мм и подвергали экстракции при соотношении сырья и экстрагента 1:100. Экстракция кумаринов проводили 96 % этиловым спиртом при температуре 60 градусов. Для очистки суммы кумаринов от сопутствующих веществ, густой экстракт, полученный после отгонки экстрагента, обрабатывали хлороформом и извлекали смесь кумаринов. После концентрирования и

высушивания экстракта получено вещество в кристаллическом состоянии. При этом выход составил 0,16% (320мг) от исходной массы заплесневелого клевера. Выделенный экстракт заплесневелого клевера, назван как экстракт заплесневелого клевера (ЭЗК).

При токсикологических исследованиях среди общих проявлений интоксикации, значительное место занимали такие симптомы, как поражение органов кровоснабжения и тканей, тромбгеморрагические изменения (кровоизлияния слизистых оболочек кожи, кровотечения), подобные действию дикумаринов.

Для убеждения, о наличии в составе ЭЗК плесневых грибов, участвующих в ферментативных процессах превращения кумаринов в дикумарол, были проведены исследования совместно с сотрудниками (Сайдиевой Ф. Х. и Бахтияровой М.Х.) института Микробиологии.

При микробиологических исследованиях обнаружено, что в жидком экстракте заплесневелого клевера имеются, как минимум три микроорганизма рода: *Acremonium* Zink, *Scopulariopsis* Bainier и *Graphium* Corda, участвующие в превращение кумарина в дикумарол, в процессе брожения.

Флуоресцентный анализ экстракта (смесь кумаринов) показал, что с насыщенным раствором брома в щелочной среде позволило идентифицировать их на основании одинаковых максимумов возбуждения (380 нм) и эмиссии (480 нм).

Полученные спектры флуоресценции, в зависимости от концентрации экстракта, показали линейную зависимость их интенсивности от концентрации. Это позволило оценить количественное содержание дикумаринов в данном экстракте (рис.1.).

В совместных исследованиях (сотрудниками лаборатории «Химии белков и пептидов» Д. Зиявитдиновым института Биоорганической химии) методом ВЭЖХ обнаружен компонент, со временем удерживания идентичной стандартным дикумаролом – 15,22 мин (рис.2).

Количество дикумарола в густом экстракте рассчитывали в сравнении площади пиков в хроматограмме стандартного образца («Sigma Aldrich», Германия), и в испытуемом образце. В результате проведенных исследований установлено, что в густом экстракте (4,7 г) количество дикумарола составило 0,64% (30 мг), а в кристаллической фракции (320 мг) суммы дикумаринов, полученных с помощью хлороформа, – 6,5%(20,8 мг).

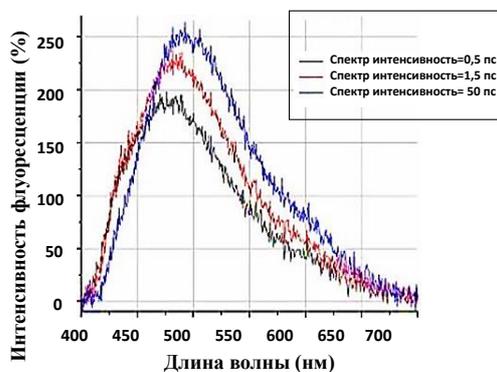


Рис. 1. Показания интенсивности спектра флуоресценции от концентрации ЭЗК.

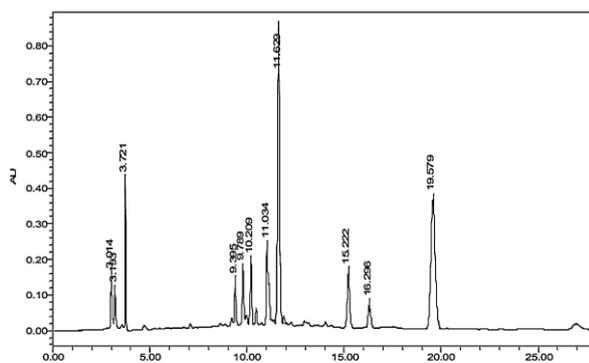


Рис.2. Хроматограмма густого экстракта заплесневелого клевера.

Для сравнения физико-химических, антикоагулянтных свойств ЭЗК с известными кумаринами были изучены токсикологические и антикоагулянтные свойства следующие терпеноидных кумаринов – фешурин, невескин, самаркандин, бодиун, смеси сесквитерпенов.

При определении токсичности терпеноидных кумаринов: при пероральном введении мышам ЛД₅₀ составила для самаркандина, бодиуна и смеси сесквитерпенов ≥ 500 мг/кг, в течение трех суток; для фешурина, невескина ≥ 700 мг/кг, в течение семи суток, соответственно. Погибшие и выжившие животные были вскрыты. При вскрытии животных обнаружено точечное кровоизлияние в легких, брюшную плевральную полость. Сосуды и капилляры органов были более выражены.

В предварительных исследованиях *in vitro*, проведенных на плазме крови крыс было выявлено, что среди исследованных терпеноидных кумаринов: самаркандин, бодиун и смесь сесквитерпенов в разной степени в зависимости от дозы удлиняли тромбиновое время, тогда как невескин и фешурин практически не влияли на тромбиновое время (рис.3А). При этом обнаружено, что бодиун, самаркандин и смесь сесквитерпенов в концентрациях 5-100 мг/мл дозозависимо удлиняют время тромбообразования, относительно контроля, приводя к ослаблению образования фибринового сгустка, что может свидетельствовать об ингибировании активности одного из факторов IXa, Xa, XIIa и антитромбина III (рис. 3Б).

В следующих экспериментах было изучено влияние терпеноидных кумаринов на параметры свертывания крови в условиях *in vivo*. Предварительно изучаемые нами кумарины перорально вводили лабораторным крысам однократно в дозе 100–1000 мг/кг. По истечении трех суток из этих крыс брали кровь для исследования коагуляционной активности параметров свёртывания крови на фоне исследуемых кумаринов.

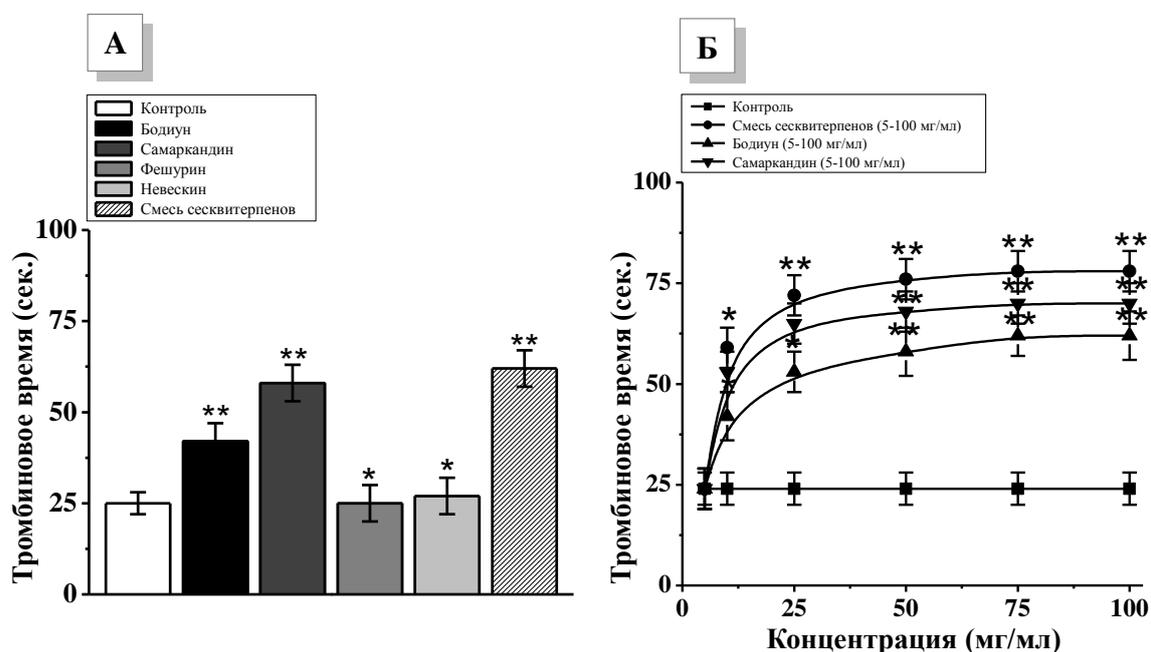


Рис. 3. А. Влияние кумаринов на тромбиновое время. По оси ординат – тромбиновое время. **Б. Дозозависимое влияние кумаринов на тромбиновое время.** По оси ординат – тромбиновое время. По оси абсцисс – концентрация кумаринов (мг/мл). * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$, относительно контроля ($n=4-6$).

В исследованиях *in vivo*, проведенных на плазме крови крысы, было выявлено, что исследуемые терпеноидные кумарины – бодиун, невескин, фешурин, самаркандин и смеси сесквитерпенов в разной степени проявляют антикоагулянтную активность. В частности, терпеноидные кумарины невескин, фешурин наиболее удлиняли тромбиновое время (рис. 4).

При исследовании влияния терпеноидных кумаринов на активированное время рекальцификации плазмы (АВРП) и протромбиновое время (ПТВ) обнаружено, что среди этих препаратов наиболее активным оказались терпеноидные кумарины – фешурин, невескин, которые в концентрации 10 мг/мл значительно удлиняют время свертываемости крови.

Удлинение АВРП также под влиянием терпеноидных кумаринов невескина, фешурина, возможно обусловлено ингибированием фактора III и других плазменных факторов свертывания (кроме факторов VII и XIII).

По удлинению ПТВ на фоне препаратов варфарина, фешурина, невескина можно судить об ингибировании факторов активации образования фибрина на основе антикоагулянтов непрямого действия.

В следующих экспериментах исследовано действие терпеноидных кумаринов – фешурина, невескина и препарата варфарина на процесс свертывания крови, и их влияние на активированное частичное тромбопластиновое время в тесте (АЧТВ). В этих экспериментах обнаружено терпеноидные кумарины – фешурин, невескин и препарат варфарин обладали незначительным ингибирующим эффектом, относительно контроля, что, возможно, свидетельствует о том, что данные терпеноидные кумарины не действуют на активность факторов XII, XI, IX, VIII.

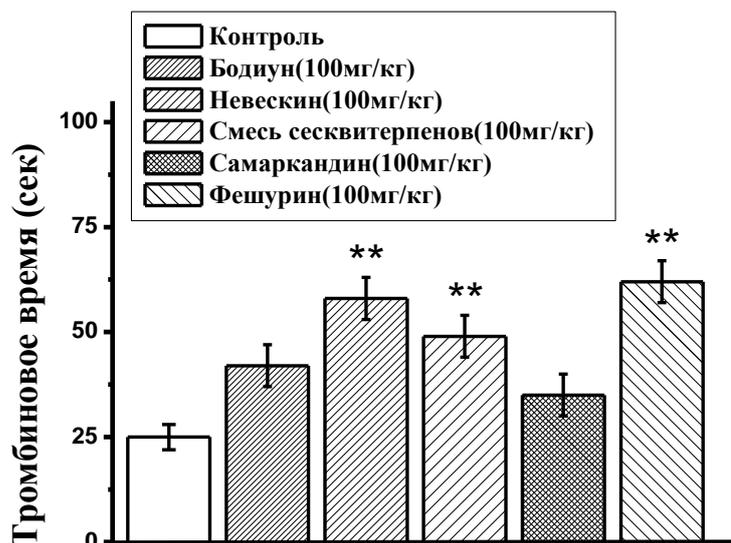


Рис.4. Влияние препаратов на тромбиновое время *in vivo*. * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$, относительно контроля ($n=4-6$).

В этих исследованиях выявлено, что терпеноидные кумарины – невескин, фешурин, имеющие схожую структуру с препаратом варфарином, близки по физиологическому действию на систему свертывания крови.

Возможно, кумарины – невескин, фешурин, ингибируя активности одного из факторов XII, XI, IX, VIII, влияют на факторы внутреннего пути свертывания крови. Бодиун и самаркандин, ингибируя активность одного из факторов IXa, Xa, XIIa и антитромбина III, возможно приводят к ослаблению образования фибринового сгустка.

Далее проводили исследования по изучению действия терпеноидных кумаринов, в условиях экзогенной тромбопластинемии на плазменный и тромбоцитарный гемостаз, на тромбоэластографические показатели.

Следует отметить, что из исследуемых терпеноидных кумаринов, наиболее положительное влияние на тромбопластинемия мы наблюдали при применении кумаринов невескина и фешурина, наиболее близких по эффективности к препарату варфарина.

Возможно, кумарины фешурин и невескин, имеющие близкую структуру с варфарином, ингибируя активность одного из факторов XII, XI, IX, VIII, влияют на факторы внутреннего пути свертывания крови.

В этих исследованиях параллельно были изучены антикоагулянтные и токсикологические свойства ЭЗК в сравнении с терпеноидными кумаринами.

В исследованиях, проведенных на плазме крови крыс (*in vitro*), было выявлено, что ЭЗК проявляет дозозависимую (5-100 мг/мл) антикоагулянтную активность в тесте на тромбиновое время (рис. 5А). Анализ полученных результатов показывает, что ЭЗК не влияет на активность фибриногена, а главным образом действует на другие факторы свертывания крови.

В следующем эксперименте было изучено влияние ЭЗК на активированное время рекальцификации плазмы (АВРП).

Под воздействием ЭЗК, в зависимости от дозы, время рекальцификации свертывания плазмы удлиняется. Удлинение времени под влиянием ЭЗК, указывает на общую тенденцию к гипокоагуляции, и может быть обусловлено ингибированием фактора III и большинством других плазменных факторов свертывания (кроме факторов VII и XIII). Если учесть, что ионы кальция участвуют в процессе активации как внутреннего, так и внешнего путей свертывания крови, действия препаратов может быть связано с его влиянием на оба пути свертывания крови.

При исследовании влияния ЭЗК на АЧТВ обнаружено, что данный экстракт в концентрациях 5–100 мг/мл дозозависимо удлиняет время тромбообразования относительно контроля, приводя к ослаблению образования фибринового сгустка, что может свидетельствовать об ингибировании активности одного из факторов XII, XI, IX, VIII (рис.5Б).

Возможно, по механизму влияния на процесс свертывания крови ЭЗК является антикоагулянтом непрямого действия, которые нарушают синтез в печени факторов свертывания крови – протромбина и проконвертина.

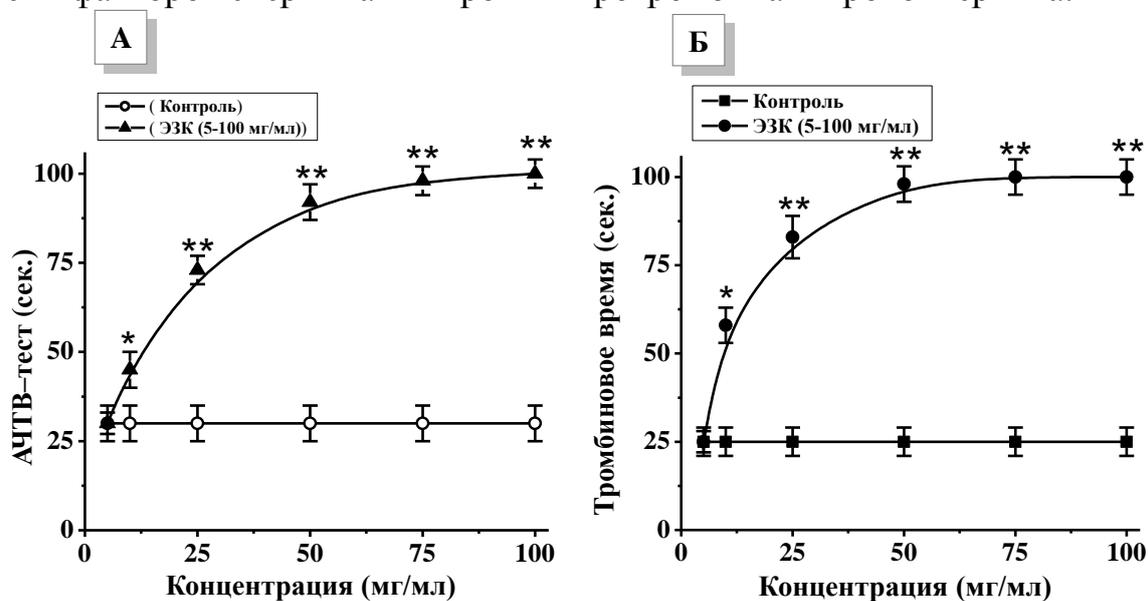


Рис. 5. А – Влияние ЭЗК на тромбиновое время. Б – Влияние ЭЗК на АЧТВ. Показатель достоверности: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ ($n=4-6$).

Одним из наиболее распространенных тестов, применяемых в специализированных и клинико–диагностических лабораториях, является тест Квика, выявляющий уровень факторов протромбинового комплекса. Именно этот тест используется при контроле терапии антикоагулянтами непрямого действия и диагностике заболеваний печени [Козлова, 2001].

При исследовании влияния ЭЗК на ПТВ обнаружено, что ЭЗК с терпеноидными кумаринами –невескин, фешурин и варфарин дозозависимо удлиняет время свертываемости крови. По удлинению протромбинового времени ЭЗК, можно судить об ингибирование факторов активации внешнего механизма свертывания, то есть ингибирование активности V, II и VII

факторов, образования протромбиназы, ее действия на протромбин и последующее образование фибрина.

Таким образом, полученные результаты показали, ЭЗК оказывает заметное влияние на систему гемостаза, удлиняя время свертываемости плазмы в тестах рекальцификации, АЧТВ и с техпластином. Эти результаты свидетельствуют о том, ЭЗК обладая антикоагулянтным действием, оказывают влияние на факторы приводящие к ослаблению образования фибринового сгустка.

Чтобы это доказать мы использовали экзогенную тромбопластинемию как модель, которая позволяла бы оценить эффективность экстракта в качестве антикоагулянта непрямого действия, повышающего толерантность животных к воздействиям, вызывающим внутрисосудистое тромбообразование.

В этом эксперименте выявлено, что внутривенное введение подопытным крысам тромбопластина в дозе 40 мг/кг массы тела на фоне предварительного введения изотонического раствора натрия хлорида, летальность составила 63,3%. При этом, основная часть животных гибла в течение 12 часов. На фоне предварительного перорального введения ЭЗК в дозе 10 мг/кг, после введения тромбопластина, летальность составила 30%, а при дозе 25 мг/кг – только 13,3%. Причем гибель животных в обеих группах наблюдалась на протяжении суток. Таким образом, превентивное пероральное введение ЭЗК лабораторным животным, снижает частоту гибели подопытных животных.

Эти результаты не исключают возможность того, что гипокоагулемия, вызываемая ЭЗК, связана с ускорением внутрисосудистого свертывания крови, приводящее к развитию тромботических, микроциркуляторных нарушений.

Наблюдалось существенное изменение содержания тромбоцитов – клеток, активно участвующих в процессах свертывания крови.

Реакция тромбоцитов на внешние стимулы зависит от соотношения внеклеточных сигналов, активирующих и ингибирующих активность клеток.

При исследовании влияния концентрата заплесневелого клевера на число тромбоцитов в условиях экзогенной тромбопластинемии *in vivo* обнаружено, что внутрибрюшинное введение тромбопластина контрольным животным уже через 30 минут привело к тромбоцитопении, что выразилось в уменьшении тромбоцитов в 2,6 раза. В группе опытных животных, предварительно введенным ЭЗК в дозе 10 мг/кг, также наблюдалось незначительное понижение количества тромбоцитов всего на 25–30%, которое через час приближалось к показателям интактной группы. При этом обнаружено, что организм контрольных животных более остро реагирует на стрессовое воздействие тромбопластина развитием выраженной тромбоцитопенией, тогда как в опытных группах животных эти изменения не выходили за рамки физиологических норм.

Таким образом, показано, что внутрибрюшинное введение ЭЗК повышает выживаемость животных при экзогенной тромбопластинемию,

ограничивая деструктивные изменения внутренних органов, что позволяет утверждать, что защитное действие ЭЗК, проявляющееся ослаблением гемокоагуляционных сдвигов при тромбоцитозе, реализуется за счет изменения функциональной активности тромбоцитов.

При исследовании влияния ЭЗК на агрегацию тромбоцитов показано, что активность агрегации тромбоцитов снижается под действием ЭЗК дозозависимо (10–100 мг/мл).

Выраженное ингибиторное действие ЭЗК проявлялось, когда индуцируется АДФ по сравнению с адреналином. ЭЗК в низкой концентрации подавляет вторую фазу индуцированной агрегации. Высокие концентрации ЭЗК ингибируют обе фазы АДФ-индуцированной агрегации (рис.6).

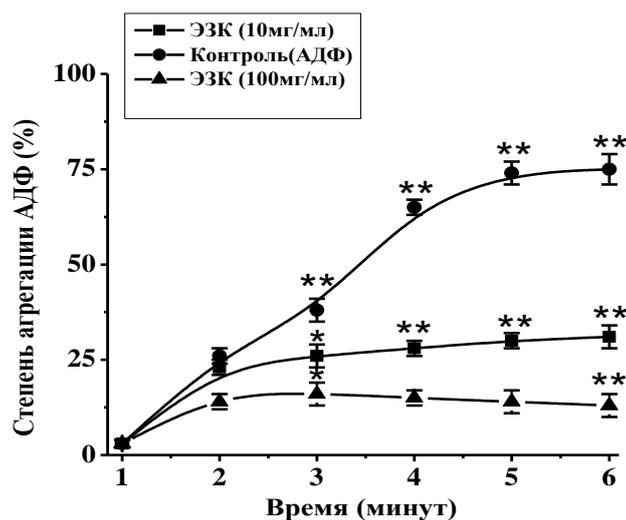


Рис.6. Влияние ЭЗК в концентрации 10–100 мг/мл на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Если учесть, что ключевым звеном активации тромбоцитов является мобилизация ионов кальция из внутриклеточных депо то, можно предположить, что действие ЭЗК связано с ингибированием мобилизации ионов кальция из внутриклеточных депо.

В связи с этим было исследовано изменение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в тромбоцитах, под действием кумарин содержащих препаратов.

В качестве стимулятора выхода кальция из внутриклеточных депо был использован АДФ (0,5 мкг/мл). Хелатирующая способность ЭЗК по отношению к ионам кальция была изучена на интактных тромбоцитах в сравнении с ЭГТА. В результате было показано, что ЭЗК в отличие от ЭГТА не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах, что свидетельствует в пользу того, что ЭЗК не является хелатором ионов кальция.

ЭЗК и терпеноидный кумарин– фешурин в концентрации 100 мкМ, добавленные за 2 мин до индукции с АДФ ингибировали выход внутриклеточного Ca^{2+} на 45–55%. Возможно, эти соединения ведут к быстрому снижению концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме

тромбоцита, и способны блокировать активацию тромбоцитов, в любой её стадии снизить риск тромбообразования.

Для уточнения механизма действия ЭЗК исследовано его влияние на процесс тромбообразования в условиях экзогенной тромбопластинемии в условиях *in vivo*. Полученные результаты позволяют предположить, что ЭЗК относится к антикоагулянтам непрямого действия, поскольку максимальный эффект препарата проявляется через 24 часа и связан с снижением действия тромбопластина подобно действию препарата курантила.

В исследованиях тромболитической активности ЭЗК на модели венозного тромбоза *in vivo* у крыс в сравнении с действием препарата варфарина и стрептокиназы – прямого, фибринолитика выявлено, что через 60 минут после частичного стенозирования брюшной нижней полой вены и 5-минутной аппликацией 10% хлорида железа у крыс время кровотечения сократилось в 2 раза, а величина кровопотери в 3 раза (табл.).

При этом ПВ не отличалось от интактных показателей, а АЧТВ увеличивалось до $65,3 \pm 5,7$ сек., а количество фибриногена увеличилось в 2 раза. Вес влажного тромба составил $78,5 \pm 6,6$ мг, а вес сухого тромба $40,0 \pm 3,4$ мг.

Полученные результаты показывают, что по эффективности ЭЗК сравним, с действием непрямого антикоагулянта препарата варфарина и незначительно уступает фибринолитику стрептокиназе.

Таблица

Тромболитическая активность ЭЗК на модели венозного тромбоза у крыс *in vivo* ($M \pm m$, $n=6$)

Тесты	Препараты				
	Интакт	Контроль	Стрептокиназа 1600 МЕ/кг	Варфарин 10 мг/кг	МСЭ 50 мг/кг
Время кровотечения (мин.)	$6 \pm 0,4$		$3,2 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,4$
Величина кровопотери (г)	$0,57 \pm 0,02$		$0,048 \pm 0,004$	$0,1 \pm 0,06$	$0,028 \pm 0,002$
ПТВ (сек.)	$18 \pm 4,7$	$65,3 \pm 5,7$	$54,0 \pm 4,7$	$76 \pm 4,7$	$85 \pm 4,7$
АЧТВ (сек.)	$20,6 \pm 0,26$	$20,8 \pm 2$	$33,1 \pm 0,26$	$28,0 \pm 0,14$	$37,4 \pm 0,26$
Фибриноген (г/л)	$215 \pm 16,0$	512 ± 46	207 ± 16	$452,8 \pm 36$	496 ± 16
Вес влажного тромба (мг)		$78,5 \pm 6,6$	$16,3 \pm 1$	$24,8 \pm 1$	20 ± 1
Вес сухого тромба (мг)		$40,0 \pm 3,4$	$5,3 \pm 0,4$	$8,8 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,2$

В четвертой главе диссертации «Исследование действия ЭЗК в комбинации с синергистами, приготовление приманок на основе ЭЗК и синергистов и их испытание» исследовано действие ЭЗК в комбинации с синергистами на систему свертывания крови, а также их токсичное влияние на грызунах.

В этих исследованиях объектами служили потенциальные синергисты цитрат натрия, ацетилсалициловая кислота, БД-31 и сульфатированная целлюлоза, обладающие антикоагулянтной активностью.

Среди исследованных синергистов наиболее эффективным был БД–31 (0,0– диалкилтиофосфата), относящихся к группам фосфорорганических соединений, синтезированный в лаборатории «Биологически активные низкомолекулярные соединения» Института биоорганической химии на систему гемостаза *in vivo*, который, в минимальных концентрациях 5 мг/кг, эффективно усиливал антикоагулянтное и токсическое действие ЭЗК и вызывал гибель мышей.

В сравнительных исследованиях, проведенных на плазме крови крыс *in vitro*, было выявлено, что исследуемое соединение БД–31 и ЭЗК, в разной степени проявляют антикоагулянтную активность в тесте на тромбиновое время.

В токсикологических исследованиях, среди общих проявлений интоксикации значительное место занимали такие симптомы как массивное поражение кровоснабжения органов и тканей, (кровοизлияния слизистых оболочек кожи, кровотечения).

Полученные результаты послужили основанием для разработки технологии родентицидов на основе экстракта заплесневелого клевера и синергиста БД–31, против для борьбы с грызунами.

Родентицидные свойства готовых приманок предварительно исследованы в лабораторных условиях, а затем и на складских помещениях зернохранилищ.

Полученные результаты на лабораторных животных свидетельствуют, что выделенный экстракт из заплесневелого клевера, в комплексе с синергистами, проявляет свойства антикоагулянта непрямого действия и обладает кумулятивным эффектом, избирательной и невысокой токсичностью для грызунов, тем самым имеет незначительную степень опасности для человека и сельскохозяйственных животных.

Следующая серия испытаний данной приманки проведена в зернохранилищах АО «Тошкентдонмахсулотлари» и ООО «Сайра дон махсулотлари».

Результаты испытаний показали, что приманка с антикоагулянтами (ЭЗК и синергистом БД–31) обладает родентицидной активностью для крыс и мышей: поедаемость в течение суток составляет 36% от общего количества приманки. Гибель крыс и мышей наступала в среднем на 6–9 день.

Данные исследования использованы при разработке рецептур приманок, на основе антикоагулянтов непрямого действия, имеющие наибольшие эффекты при минимальной кратности скармливания приманок грызунами.

Эти препараты приманок могут быть использованы в ветеринарии и санитарно – эпидемиологической службе, в качестве безопасных родентицидных препаратов, в защите животноводческих ферм и индивидуальных хозяйств от синантропных грызунов.

Ожидается экономический эффект, связанный с возможностью производства родентицида на основе местного сырья и их реализации на внутреннем и, в перспективе, и на внешнем рынке.

ВЫВОДЫ

1. Из местного сырья клевера (*Trifolium pratense* L.) выделен экстракт, который, в зависимости от введенной мышам и крысам дозы (50–100 мг/кг), проявляет симптоматику интоксикации по типу тромбгеморрагического синдрома, подобно действию кумаринов.

2. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, флуоресцентного и УФ–спектрального анализа, а также микробиологическими исследованиями доказано наличие дикумаринов в экстракте выделенного из клевера.

3. Показано, что в зависимости от изоформы структуры кумарины – фешурин, невескин, бодиун, самаркандин и смесь сесквитерпенов оказывают влияние как на внутренние, так и на внешние факторы свертывания крови.

4. Экстракт клевера подобно терпеноидным кумаринам – невескин и фешурин проявляет антикоагулянтное действие, ингибируя факторы активации внешнего механизма свертывания, и по токсичности относятся к IV классу практически нетоксичных соединений.

5. На модели тромбопластинемии *in vivo*, установлено, что выделенный из клевера экстракт и терпеноидные кумарины – невескин и фешурин повышают толерантность животных к воздействиям тромбопластина, вызывающим внутрисосудистое тромбообразование, подобно действию антикоагулянтам непрямого действия.

6. Выделенный экстракт клевера обладает свойством антикоагулянта непрямого действия и рекомендуется для дальнейшего использования в качестве безопасного родентицида.

7. Доказано, что экстракт клевера в комплексе с синергистами, обладает специфической и невысокой токсичностью для грызунов, тем самым имеет незначительную степень опасности для человека и сельскохозяйственных животных.

**SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.29.12.2018. B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND
BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

**INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY AT THE
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

RAIMOVA GULI MADMURODOVNA

**PHYSICO-CHEMICAL AND ANTICOAGULANT PROPERTIES OF THE
TRIFOLIUM PRATENSE L. (MEADOW CLOVER) EXTRACTS AND
THEIR APPLICATIONS AS RODENTISIDE**

03.00.02 – Biophysics and Radiobiology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD) OF
BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2019

The title of the doctor of philosophy (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2018.4.PhD/B99

The dissertation has been prepared at the Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian and English) on the website of the Scientific Council www.ibb-nuu.uz on the website of «ZiyoNet» information–educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor:

Nasirov Kabil Erkinovich
doctor of biological sciences

Official opponents:

Merzlyak Petr Grigoryevich
doctor of biological sciences

Leviskaya Yuliya Vladimirovna
candidate of biological sciences

Leading organization:

Tashkent Pediatric Medical Institute

The defense of the dissertation will take place on _____ 2019 year ___ at the meeting of the Scientific Council DSc.29.12. 2018.B.01.13 scientific degrees at the Institute of biophysics and biochemistry at the National University of Uzbekistan at the following Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Students town, University st., 174 (4 th floor of the building of the Faculty of Chemistry, National University of Uzbekistan). Phone: 262–68–96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of biophysics and biochemistry National University of Uzbekistan. Address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Students town, University st., 174. Phone: 262–68–96, E-mail: ibb-nuu@mail.ru.

Abstract of the dissertation is distributed on « _____ » _____ 2019.
(Protocol at the register No _____ dated _____ 2019).

Sabirov Ravshan Zairovich,
Chairman of Scientific council on award
of scientific degrees, Doctor of biological sciences, Academician

Asrarov Muzaffar Islamovich
Acting Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, Doctor of Biological Sciences, Professor

Ahmedzhanov Iskandar Gulyamovich
Chairman of Scientific Seminar at Scientific council on award of
scientific degrees, Doctor of biological sciences, professor

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The aim of the research work to determine of the physical–chemical, anticoagulant properties of the extract isolated from *Trifolium pratense L.* plant and to develop a rodenticide preparation prescription.

The object of the research work is an extract of moldy red clover (*Trifolium pratense L.*), in comparison with terpenoid coumarins: feshurin, neveskin, samarkandin, bodyun and a mixture of sesquiterpenes obtained in the coumarin and terpenoids laboratory of the Institute of Chemistry of Plant Substances.

Scientific novelty of the research work:

from local raw materials (*Trifolium pratense L.*) an extract with thrombohemorrhagic effect like coumarins was isolated and dicumarol presence was found;

it is shown that this extract, in vivo under conditions of exogenous thromboplastinemia, acts as an anticoagulant of indirect effect on thrombosis;

it was found that the extract in combination with the synergist BD-31 has cumulative and selective toxicity for rodents, thereby was shown the possibility of creating and developing a new rodenticide agent on its base;

it has been proved that moldy clover extract and terpenoid coumarins - feshurin, neveskin, samarkandin, bodyun, as well as mixtures of sesquiterpenes have indirect anticoagulant properties and it has been established that they can be used as an anticoagulant.

Implementation of the research results. Based on the scientific results obtained, on the anticoagulant properties of the moldy clover extract:

the inhibitory effect of moldy clover extract on platelet and coagulation hemostasis were used in the research and development project FA–A11–T040 «Development of antioxidant means «Pulikaron» by components of *Pulicaria gnaphales* plant» in determining the properties of anticoagulant salvifolin and flavonoid pulicarone (Reference from the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan № 4 / 1255–1809, dated on June 11, 2018). As a result, this made it possible to characterize the indirect anticoagulant properties of diterpenes, coumarins and flavonoids;

the anticoagulant properties of the moldy clover extract were used at the Shinjon Institute of Physics and Chemical Engineering of the Chinese Academy of Sciences (Reference dated March 15, 2019 at the Xinjiang Technical Institute of Coumarins). As a result, the ability to control the hemostatic system with the help of new coumarin compounds was obtained.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction four chapters, conclusion and list of used literature. The volume of the thesis is 110 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Raimova G.M., Khoshimov N.N., Nasirov K.E., Ziyavitdinov J.F. Isolation and physical and chemical characteristics of anticoagulants from the fire-blind clever trifolieae // European Science Review (Austria). – 2016. – №3–4. – P.7–10. (03.00.00; №6).

2. Раимова Г.М, Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Действие КЗК (*Melilotus*) на систему свертывания крови крыс *invitro* // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2016. – №6. – С.133–140(03.00.00; №7).

3. Раимова Г.М, Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Матчанов А.Д. Влияние некоторых биологически активных соединений на систему гемостаза // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2016. – №6. – С.140–150(03.00.00; №7).

4. Раимова Г.М., Хошимов Н. Н., Насиров К. Э., Бабаев Б. Н. Исследование антикоагулянтных свойств препаратов концентрат Заплесневелого клевера и 0,0–Диалкилтиофосфата // Узбекский биологический журнал. – 2017, № 2. С. 3–7 (03.00.00; №5).

II бўлим (II часть; II part)

5. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Наджимова Х.К., Насиров К.Э., Далимов Д.Н. Ингибиторное действие МАСГКа на агрегации тромбоцитов // Международная конференция молодых учённых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пушкино (Россия), 2015. – С.99–100.

6. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Маматова З.А., Насиров К.Э., Далимов Д.Н. Влияние МАСГКа на систему гемостаза // Международная конференция молодых учённых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пушкино (Россия), 2015. – С.100–101.

7. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Маматова З.А., Насиров К.Э., Далимов Д.Н. Действие МАСГКа на уровень внутриклеточного $[Ca^{2+}]_{in}$ в тромбоцитах // Международная конференция молодых учённых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пушкино (Россия), 2015. – С.101–102.

8. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Маматова З.А., Насиров К.Э., Далимов Д.Н. Исследование действие ГЛАСа на агрегацию тромбоцитов и уровень внутриклеточного кальция Международная конференция молодых учённых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пушкино (Россия), 2015. – С.103–104.

9. Хошимов Н.Н., Раимова Г.М., Абидова Н.Ж., Насиров К.Э., Бабаев Б.Н. Влияние ВД (0,0– Диалкилтиофосфат) на систему гемостаза. Международная конференция молодых учённых «Экспериментальная и теоретическая биофизика». – Пушкино (Россия), 2015. – С.115–116.

10. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Худойбердиев М.А. Действие биологически активного вещества на протромбиновое время и активированное частичное тромбопластиновое время // XIX международной научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина». – Санкт–Петербург (Россия), 2016. – С.472–474.

11. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Матчанов А.Д. Изучение влияния биологически активного вещества на активированное время рекальцификации плазмы крови крыс // XIX международной научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина». – Санкт–Петербург (Россия), 2016. – С.474–475.

12. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Худойбердиев М.А. Изменение агрегации тромбоцитов под влиянием биологически активного вещества // XIX международной научной конференции молодых учёных «Фундаментальная наука и клиническая медицина». – Санкт–Петербург (Россия), 2016. – С.475–476.

13. Raimova G.M., Khoshimov N.N., Nasirov K.E. Studying anticoagulant property of the GLAS of *in vitro* in system of a hemostasis // «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2016»: Сборник тезисов докладов LXX Международной научно–практической конференции студентов и молодых ученых. В авторской редакции. (Под редакцией А.В.Сикорского, О.К.Дорониной). – Минск: БГМУ, 2016. – 1506 с. – С.285.

14. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Наджимова Х.К. Влияние КЗЛ (Medikago) на тромбиновое время // Соғлиқни сақлаш ва кишлоқ хўжалигининг долзарб муаммоларини ечишда биоорганик кимёнинг роли. Ёш олимлар республика конференцияси. Тезислар тўлами. – Тошкент, 2016. – С.18.

15. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Наджимова Х.К. Влияние КЗЛ (Medikago) на параметры свертывания крови // Соғлиқни сақлаш ва кишлоқ хўжалигининг долзарб муаммоларини ечишда биоорганик кимёнинг роли. Ёш олимлар республика конференцияси. Тезислар тўлами. – Тошкент, 2016. – С.18–19.

16. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Бабаев Б.Н. Исследование действия некоторых биологически активных соединений на тромбиновое время // Abstract Book of «XXth International medical biological conference of young researchers» (Fundamental Science and Clinical Medicine). – St. Petersburg (Russia), 2017. – V.20. – 1–680). – P.456–457.

17. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Камолиддинов Х.Ш. Влияние смеси сесквитерпена на параметры системы гемостаза // Abstract Book of «XXth International medical biological conference of young researchers» (Fundamental Science and Clinical Medicine). – St. Petersburg (Russia), 2017. – V.20. – 1–680). – P.457–458.

18. Раимова Г.М., Хошимов Н.Н., Насиров К.Э., Бабаев Б.Н. Комплексное действие КЗК и ВД–31 на протромбиновое время // Abstract Book of «XXth International medical biological conference of young researchers»

(Fundamental Science and Clinical Medicine). – St. Petersburg (Russia), 2017. – V.20. – 1–680). – P.458–459.

19. Raimova G.M., Nasirov K.E., Ziyavitdinov J.F. Definitions of coumarin in clovers 12th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. Actual Problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds. – Tashkent, 2017. – P.400.

Автореферат “Ўзбекистон биология журнали” журналида
тахрирдан ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 16.04.2019.
Бичими: 60x84 1/16. «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 2,75. Адади:100. Буюртма: № 16-04

«IMPRESS MEDIA» босмахонасида чоп этилди.
100071, Тошкент, Қушбеги кўчаси, 6.

