

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

ОРИПОВА МУНОЖАТ ЖАЛОЛДИНОВНА

***MALVA SYLVESTRIS* УРУҒИДАН АНТИМИКРОБ ПЕПТИДЛАР,
ARTEMIA ЦИСТАСИДАН ХИТОЗАН АЖРАТИШ, БИОЛОГИК
ФАОЛЛИКЛАРИНИ ЎРГАНИШ ВА УЛАР АСОСИДА КОСМЕТИК
КОМПОЗИЦИЯ ЯРАТИШ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

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

Тошкент - 2020

**Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси
автореферати мундарижаси**
**Оглавление автореферата диссертации доктора философии по
химическим наукам**
**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)
on chemical sciences**

Орипова Муножат Жалолдиновна

Malva Sylvestris уруғидан антимикроб пептидлар, *Artemia* цистасидан хитозан ажратиш, биологик фаолликларини ўрганиш ва улар асосида косметик композиция яратиш..... 3

Орипова Муножат Жалолдиновна

Выделение, биологическая активность антимикробных пептидов из семян *Malva Sylvestris*, хитозана из цист *Artemia* и создание косметической композиции на их основе..... 21

Oripova Munojat Jaloldinovna

Isolation, biological activity of antimicrobial peptides from *Malva Sylvestris* seeds, chitosan from *Artemia* cyst and creation of cosmetic composition based on them..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works..... 42

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

ОРИПОВА МУНОЖАТ ЖАЛОЛДИНОВНА

***MALVA SYLVESTRIS* УРУҒИДАН АНТИМИКРОБ ПЕПТИДЛАР,
ARTEMIA ЦИСТАСИДАН ХИТОЗАН АЖРАТИШ, БИОЛОГИК
ФАОЛЛИКЛАРИНИ ЎРГАНИШ ВА УЛАР АСОСИДА КОСМЕТИК
КОМПОЗИЦИЯ ЯРАТИШ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

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

Тошкент - 2020

Кимё фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2019.3.PhD/К245 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.biochem.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот таълим тармоғида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Ощепкова Юлия Игоревна
кимё фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Рамазанов Нурмурод Шералиевич
кимё фанлари доктори, профессор

Гафуров Махмуджон Боқиевич
кимё фанлари доктори

Етакчи ташкилот:

Ўзбекистон кимё-фармацевтика илмий тадқиқот институти

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.К/В.37/01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «__» _____ соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63).

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83.Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: shsha@mail.ru).

Диссертация автореферати 2020 йил «__» _____ да тарқатилди.
(2020 йил _____даги ____ рақамли реестр баённомаси)

Ш.И.Салихов

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

Ш.А.Шомуротов

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби к.ф.д.

М.Б.Гафуров

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, к.ф.д.

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертация аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда сўнгги йилларда биополимерларни тадқиқ қилиш кўплаб тадқиқотчиларнинг эътиборини тортиб келмоқда, чунки инерт деб ҳисобланган ушбу бирикмалар кенг қамровли биологик фаолликларга эга. Барча маълум биополимерлар синфларнинг амалий аҳамияти ва фармакологик фаолликлари аниқланганлиги сабабли, ҳозирги кунда экспериментал тадқиқотлар уларнинг тузилишни тадқиқ қилиш, ишлаб чиқариш технологияларини ривожлантириш, кимёвий модификациялаш, янги манбаларини излаб топиш, биологик фаолликларини аниқлаш ва уларни амалда қўллаш имкониятларини кенгайтириш каби йўналишларга қаратилган. Биополимерлар кимёсининг бир асрдан кўпроқ давом этган тарихига қарамай, ҳар йили экспериментал ва назарий маълумотлар ҳажми ортиб бормоқда, бу эса табиий бирикмаларга бўлган қизиқишлар тобора ортиб бораётганлигини кўрсатади.

Ҳозирги вақтда жаҳонда табиий манбалардан биологик фаол моддаларни ажратиб олиш, уларнинг структура ва хоссаларини тадқиқ этишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу ўринда табиий полимерлар - оксил ва полисахарид табиатли моддалар асосида олинган биологик фаол моддалар синтетик моддаларга нисбатан биомослашувчанлиги ва организмга нојўя таъсирининг камлиги алоҳида аҳамиятга эга. Шу сабабли бундай биологик фаол бирикмалар асосида препаратлар яратишда биологик фаол моддаларга бой табиий манбаларни топиш, улардан биологик фаол бирикмаларни ажратиб олишнинг арзон ва тежамкор усулларини ишлаб чиқиш, уларнинг структура ва биологик фаолликларини тадқиқ қилашнинг замонавий усулларини аниқлаш ҳамда улар асосида янги самарали дори воситаларини яратиш каби йўналишларда изланишлар олиб борилмоқда.

Мамлакатимизда маҳаллий хом-ашёлар асосида янги, самарали, импорт ўрнини босувчи доривор препаратлар ишлаб чиқишга ва аҳолини сифатли дори-дармонлар билан таъминлашга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг 4-йўналишида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори воситалари билан таъминланишини яхшилаш» юзасидан муҳим вазифалар белгилаб берилган¹. Бу борада, маҳаллий ўсимлик ва ҳайвон хом-ашёлари биологик фаол моддаларини тадқиқ қилиш, уларнинг тузилиши ва фаоллигини ўрганиш ҳамда улар асосида янги, самарали дори воситаларини яратиш муҳим аҳамиятга касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил, 7 ноябрдаги ПФ-5229-сон «Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017-2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги фармони

тўғрисида»ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-2640-сонли «Фармацевтика тармоғини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги Қарори ҳамда ушбу соҳа бўйича қабул қилинган бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация ишида олиб борилган тадқиқотлар муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг Республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ўсимлик ва ҳайвонлардан оксил ва пептидларини ажратиш, уларнинг структур-функционал боғлиқликларини ўрганиш бўйича Lay F.T., Anderson M.A., Stotz H.U., Thomson J.G., Wang Y. каби кўплаб хорижий олимлар томонидан систематик изланишлар олиб борилган. Пептидлар асосида кубизин, фирмагон, фузеон, вантас ва бошқа қатор дори воситалари яратилган.

МДХ давлатларида Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Гришин Е.В., Рогожин Е.А. каби бир қатор олимлар томонидан *Roaceae* оиласи ўсимликларидан тионинлар, дефензинлар, липид ташувчи оксиллар синфига мансуб бирикмаларни ажратиш ва уларнинг таъсир механизмларини ўрганиш бўйича тадқиқотлар олиб борилган.

Республикада ушбу соҳага Биоорганик кимё институти ва Ўсимлик моддалари кимёси институти олимлари (Салихов Ш.И., Азимова Ш.С., Ощепкова Ю.И. ва б.) катта хисса қўшганлар. Ушбу олимлар томонидан *Ranunculaceae*, *Solanaceae* ва *Fabaceae* оиласига мансуб ўсимликлардан янги оксил ва пептидлар ажратиб олинган ва уларнинг кимёвий тузилиши ҳамда биологик фаолликлари ўрганилган, улар асосида келажақда тиббиётда қўлланилиши учун бир қатор препаратлар ишлаб чиқилган.

Ҳозирги кунда дунёда хитин ва хитозаннинг биологик фаолликлари ва бой хом-ашё базаси мавжудлиги сабабли ушбу полисахаридларни тадқиқ қилишга бўлган қизиқишлар тобора ортиб бормоқда. Хориж олимлари Aranaz ва унинг ҳамкасблари томонидан ушбу полисахаридларнинг полиэлектrolит хоссалари, юқори адсорбцион хусусиятлари, биопарчланиши ва биокелишувчанлик хоссалари тадқиқ қилинган. Шунингдек, Lim C.K., Mourya V.K., Inamdar N.N., Tiwari A., Zhang томонидан рН қиймати нейтралга яқин бўлган, сувда эрувчан хитозан ҳосилаларини кимё ва биологиянинг турли соҳаларида қўлланилиш имкониятлари ўрганилган. МДХ давлатлари олимлари Плиско Е.А., Быкова В.М., Гамзаде А.И., Сафронова Т.М., Вихорева Г.А. томонидан хитозан асосида озуқа қўшимчалари, биологик фаол ингредиентлар олиш ва хитозан тутган хом-ашёлардан оқилона фойдаланиш усуллари ишлаб чиқиш бўйича тадқиқотлар олиб борилган. Ўзбекистонда тут ипак қурти чиқиндиларидан олинган хитозанни ўрганиш, унинг асосида наноструктуралар олиш ва терапевтик препаратлар яратиш бўйича Полимерлар кимёси ва физикаси институти (Рашидова С.Ш.) ва Тошкент

тиббиёт академияси Биоорганик ва биологик кимё кафедраси (Иноятова Ф.Х.) томонидан тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Маҳаллий ва хорижий илмий изланиш натижалари оксил ва пептидлар ҳамда хитозанни келгусида қўллаш мақсадида уларни Ўзбекистон табиий объектларидан ажратиб олиш ва физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш муҳимлигини кўрсатади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг Ф6-Т018 «Антибиотик фаолликка эга бўлган ўсимлик пептидларининг структур-функционал тадқиқи» (2012-2016) ва ТА-ФА-А11-005 «*Artemia salina* цистасини комплекс технологиясини ишлаб чиқиш, тиббий ва косметик воситалар яратиш» (2017-2018) мазусидаги фундаментал ва инновацион лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади

Malva Sylvestris уруғи ва яшил қисмидан оксил-пептид компонентлар, *Artemia* цистасидан хитозан ажратиш, уларни физик-кимёвий тавсифлаш, биологик фаолликларини ва тиббиётда қўлланилиш истиқболларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Malva Sylvestris уруғи ва яшил қисмидан оксил-пептид компонентларни ажратиш ва уларнинг физик-кимёвий параметрларини ўрганиш;

ажратилган компонентларини одам ва қишлоқ хўжалиги турли патоген гуруҳларига нисбатан биологик фаоллигини ўрганиш;

Орол денгизи *Artemia* цистасидан хитозан ажратиш ва физик-кимёвий хоссаларини тадқиқ қилиш;

Хитозаннинг фармацевтикада қўлланилиш имкониятларини тадқиқ қилиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида Ўзбекистонда ўсадиган *Malvaceae* оиласига мансуб тугмачагул *Malva Sylvestris* ўсимлиги ва Орол денгизида яшовчи *Artemia* қисқичбақаси цистасидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг предмети *Malva Sylvestris* уруғи оксил ва пептидларининг, *Artemia* қисқичбақаси цистасидан олинган хитозаннинг физик-кимёвий хоссалари ва биологик фаоллигини тадқиқ қилиш ҳамда улар асосида косметик восита яратиш ҳисобланади.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотлар жараёнида экстракция усуллари, моддаларни ажратиш ва идентификациялаш (ИК-спектроскопия, колонкали хроматография, юқори самарали суюқлик хроматографияси, хромато-масс-спектрометрия, оксилларнинг протеом таҳлили, электрофорез, LC-MS спектрометрия) ва тажриба ҳайвонларидаги фармако-токсикологик тадқиқот усулларида фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгиллиги қуйидагилардан иборат:

илк бор *Malva Sylvestris* уруғидан аспартокиназа ва ABC-транспортёр оксилларига гомолог бўлган, юқори антимиқроб фаоллик намоён қилувчи оксиллар ажратиб олинган;

Malva Sylvestris аспартокиназасининг гомологик кетма-кетлиги консерватив гидрофоб соҳа тутган, аспартокиназа фаоллигига жавоб берувчи домен эканлиги аниқланган;

илк бор оксидланиш-қайтарилиш реакцияларида иштирок этувчи, фитопатогенларга қарши ва инсектицид фаолликка эга бўлган S-мотив тутган рецепторга ўхшаш киназа ва глутатион-S-трансфераза оксиллари ажратиб олинган;

Орол денгизи *Artemia* цистасидан хитозан олинган ва унинг молекуляр катталиклари ва тузилиши аниқланган;

Artemia цистасидан олинган хитозанни липид-сорбциялаш, гипогликемик, гипоксияга қарши, гиполипидемик хоссалар намоён қилиши ҳамда унинг таъсирида қон томирлардаги атеросклеротик бузилишлар камайиши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Malva Sylvestris уруғидан ажратилган бир қатор оксил бирикмалар ўсимликларнинг патогенларга қарши ҳимоя механизмларида иштирок этувчи оксиллар эканлиги аниқланган;

фармако-токсикологик усуллар ёрдамида *Artemia* цистасидан олинган хитозан сорбциялаш қобилиятига эга ва экзо- ва эндотоксимия терапияси учун энтеросорбент сифатида фойдаланилиши мумкинлиги аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги таҳлилнинг замонавий физик-кимёвий ва биологик усуллари; тадқиқот натижаларининг республика ва халқаро илмий анжуманларда, шунингдек рецензияланган илмий нашрларда муҳокама этилганлиги билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Malva Sylvestris* уруғи ва яшил қисми оксил-пептид бирикмаларининг солиштирма таҳлили ўтказилганлиги, заҳира ва ташувчи оксиллар, хитозан ажратиб олинганлиги ва уларнинг асосий фармакологик хоссалари ўрганилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти Орол денгизи *Artemia* цистасидан олинган хитозан асосида холестерин алмашинувининг бузилишини комплекс даволаш ва унинг профилактикаси учун Грацит энтеросорбенти ишлаб чиқилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *Malva Sylvestris* уруғидан олинган оксил-пептид компонентлари ва Орол денгизи *Artemia* цистасидан хитозан ажратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Malvaceae оиласи ўсимликларидан ажратилган оксил-пептид компонентлари Россия давлат аграр университети илмий тадқиқотида фитопфтороза *Phytophthora* кўзғатувчисига қарши биологик фаолликни солиштиришда фойдаланилган (Россия давлат аграр университетининг 2020 йил 16 майдаги 90-28/59-сон маълумотномаси). Натижада фитопфтороза кўзғатувчиларини идентификациялаш учун тест тизимлар, намуна тайёрлаш баённомаларини ишлаб чиқиш ва ПЦР (одатий ва реал вақтдаги) таҳлили олиб боришни мақбуллаштириш имконини берган;

Орол денгизи *Artemia* цистасидан ажратилган хитозан Евроосиё миллий университети томонидан Қозоғистон шўр кўлларида яшовчи *Artemia* цистасидан олинган хитозанни ўрганишга бағишланган илмий тадқиқотларда фойдаланилган (Л.Н.Гумилев номидаги Евроосиё миллий университетининг (Қозоғистон) 2020 йил 6 мартдаги 03-01-24/6926-сон маълумотномаси). Натижада Марказий Осиё худудлари, Қозоғистон ва Сибир шўр кўлларида яшовчи *Artemia* турларини солиштирма тавсифлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 4 та халқаро ва 3 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 12 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 5 та мақола, жумладан, 3 таси Республика ва 2 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 108 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

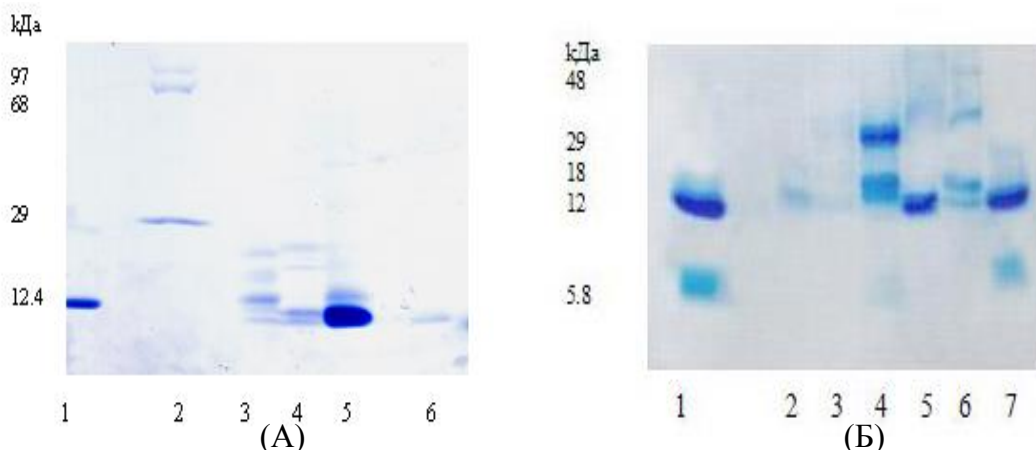
Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурийлиги, мақсад ва вазибалари асослаб берилган, тадқиқотнинг объекти ва предмети ифодаланган, тадқиқотнинг Ўзбекистон Республикасида фан ва технологияларни ривожлантириш йўналишига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий этиш асослари келтирилган, нашр қилинган илмий ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Биологик фаол бирикмаларнинг табиий синфларидан фойдаланиш истиқболлари»** деб номланган биринчи бобида диссертация мавзуси бўйича илмий тадқиқотлар ва муаммонинг ўрганилганлик даражаси батафсил таҳлил қилинган, антимикроб пептидлар, уларнинг синфланиши, тузилиши, таъсир механизмлари, биологик фаолликлари тўғрисида маълумотлар баён этилган. Шунингдек, хитин ва хитозан, уларнинг асосий манбаалари, тузилиши ва улардан тиббиёт, косметология ва ветеринарияда фойдаланиш истиқболларини тадқиқ қилиш бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Тугмачагул *Malva Sylvestris* уруғи ва яшил қисмидан оқсил ва пептидларни ажратиш ва физик-кимёвий тавсифлаш»** деб номланган иккинчи бобида *Malva Sylvestris* ўсимлиги уруғи ва яшил қисмидан оқсил-пептид компонентларини ажратиш ва уларни физик-кимёвий тавсифлаш бўйича илмий тадқиқот натижалари баён этилган.

Оқсил-пептид фракциялари сирка кислотада ёрдамида экстракциялаш ҳамда ацетонда чўктириш орқали олинди. Олинган экстрактлар ион-алмашилиш хроматографияси ёрдамида DEAE-целлюлоза ва CM-TSK колонкаларида фракцияларга ажратилди. Ўсимликнинг уруғидан 4 та ва яшил қисмидан 3 та фракция олинди.

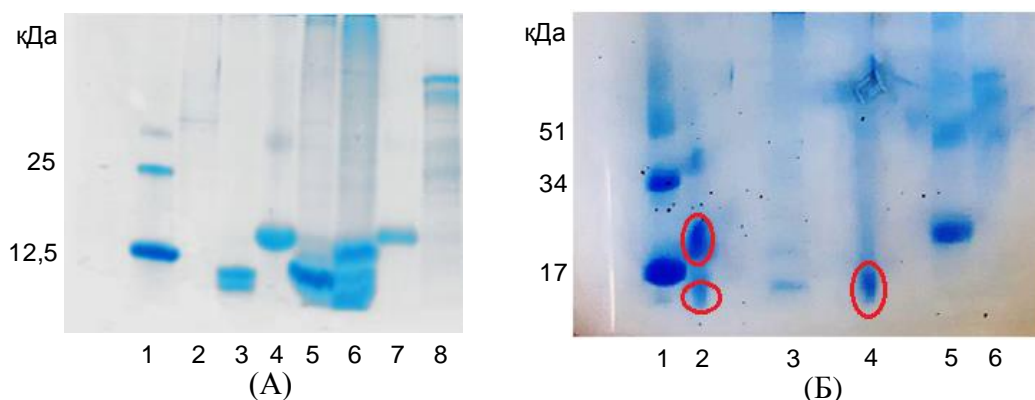
Фракциялардаги оқсил миқдори Лоури усули бўйича аниқланди ва 15% ПААГ да гель-электрофорез усули ёрдамида таҳлил қилинди.



1-расм. *Malva Sylvestris* яшил қисми (А) ва уруғи (Б) экстрактларининг CM-TSK колонкасида бўлинишидан олинган фракцияларнинг 15% ПААГ даги электрофоретик таҳлили. (А) 1,2-маркерлар, 3-экстракт; 4-СМ-1 фракция, 5-СМ-2 фракция, 6-СМ-3 фракция. (Б) 1,7-маркерлар, 2-СМ-1 фракция, 3-СМ-2 фракция, 4-экстракт, 5-СМ-3 фракция, 6-СМ-4 фракция

Ўсимлик уруғи ва яшил қисмидан оқсил-пептид компонентларини ажратилиши натижасида олинган фракцияларнинг гель-электрофоретик таҳлил натижалари фракциялар молекуляр массаси 5-20 кДа бўлган компонентлар тутишини кўрсатди.

Фракциялар таркибидаги компонентларнинг структуравий параметрларини ўрганиш учун икки ўлчамли электрофорез амалга оширилди.



2-расм. *Malva Sylvestris* ўсимлиги уруғи экстрактини CM-TSK колонкада ажратилиши натижасида олинган фракцияларнинг (А) ва СМ-3, СМ-4 фракцияларининг изоэлектрофокусировкашдан кейинги олинган оқсилларнинг (Б) 15% ли ПААГ даги электрофоретик таҳлили

Оқсилнинг бирламчи тузилиши масс-спектрометрия усули ёрдамида тадқиқ қилинди. Бунинг учун электрофрез гелидаги тегишли доғлар (2-расм, 2-, 4-қаторлар) кесиб олинди ва оқсилдаги цистеин боғлар дитиотреитол ёрдамида сульфгидрил гуруҳларигача қайтарилди, йодацетамид ёрдамида карбоксиметилланди. Трипсин билан гидролиз қилинди ва олинган пептидлар трифторсирка кислота ёрдамида экстракцияланди. Намунадан олинган пептидлар Agilent Technologies CHIP-LC-MS Q-TOF 6520V масс-спектрометрида таҳлил қилинди. Натижада ҳар бир доғ учун пептид фрагментларининг аминокислота кетма-кетликлари идентификацияланди.

СМ-3 (1) фракцияси учун 15 та фрагментар пептидлар идентификацияланди. Идентификацияланган аминокислота кетма-кетликлари NCBI маълумотлар базасида ўрганилди. Ушбу кетма-кетлик Буғдойдошлар (*Poaceae*) ва Дуккакдошлар (*Fabaceae*) оиласи ўсимликлари аспартакиназа синфи оқсиллари билан қисман гомолог бўлган аспартокиназа суббирлиги эканлиги аниқланди. Аспартокиназа аспарагин кислотасининг фосфорланишини катализловчи фермент ҳисобланади. Бу реакция «аспартат оиласи» сифатида танилган учта алмашинмайдиган аминокислота: метионин, лизин ва треонин биосинтезида биринчи босқич ҳисобланади.

```

-GRVKLKEATEIVE DMEKSFGE CMSTRIFAAYLNKIRI- Malva sylvestris
-GVAMMKELTRRTQDYLVSFGE CMSTRIFAAYLNKLGV- Arachis hypogaea
-GIAMMKELTPRTSDYLVSFGE CMSTRIF SAYLNKIRV- Zea mays
-GIAMMKELTPRTKDYLASFGE CMSTRIFAAYLNKIDV Olea europaea var. sylvestris
  
```

3-расм. *Malva Sylvestris* аспартокиназасининг аспартокиназа гидрофоб соҳасига мос келувчи қисман гомологик аминокислота кетма-кетлиги

Аниқланган гомологик кетма-кетлик гидрофоб соҳа тутган, аспартокиназа фаоллигига жавоб берувчи суббирликни ифодалайди. Гидрофоб соҳа аспартокиназанинг учта консерватив соҳаларидан бири ҳисобланади.

СМ-3 (2) фракцияси учун 18 та фрагментар пептидлар идентификацияланди. Тадқиқотлар Ms-ABC деб номланган ушбу оқсилнинг бирламчи тузилиши ABC-транспортёрлар (ATP-Binding Cassette) супериоиласи вакилларига қисман гомолог эканлигини кўрсатди. ABC-транспортёрлар супериоиласи оқсилларини ABC доменлар деб номланувчи трансмембрана ва АТФ боғловчи умумий доменларнинг мавжудлиги бирлаштиради (4-расм).

```

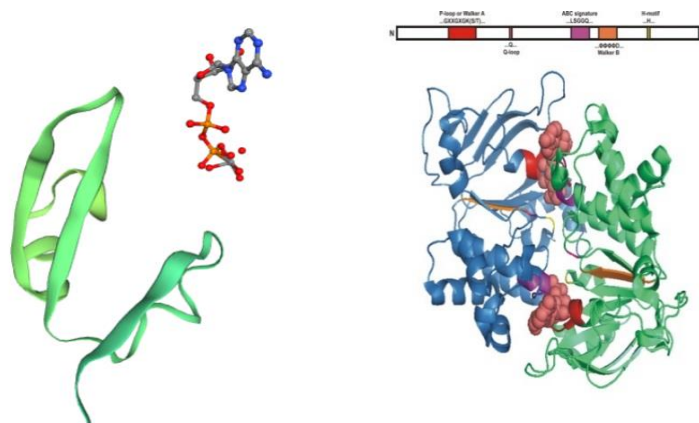
89-KDRVLTNQLHFLSQVDKIRTVVTGRAKIK-LLRVLNMEGLLFVSKNKIVLSSTSEAEKV
   K RVLVTNQLHFLSQVD+I V G K+ L+ + GLLF K++ A K+
-KTRVLTNQLHFLSQVDRIILVHEGMVKEEGTFEELSSQGLLF---QKLM----ENAGKM

148 RSIIEVR EVDVTRDKVTVYKHKDRVVVVG- 175
   E +VD+ + T K + VV G
   EYEEEKVDI---EATDQKSSSKPVVNG-
  
```

4-расм. Ms-ABC оқсилнинг ABC-транспортёрлар супериоиласи ABC-доменига мос келувчи қисман гомологик аминокислота кетма-кетлиги

Ms-ABC оқили доменининг фазовий тузилиши SWISSMODEL дастури ёрдамида компьютер моделлаштириш орқали тадқиқ қилинди.

Аниқланган оқсил домени ушбу оқсил кетма-кетлигини ҳамда (учламчи) тузилишини сақловчи қисми ҳисобланади. Молекуляр эволюция доменлардан турли функцияларга эга бўлган оқсилларни яратиш учун қурилиш блоки сифатида фойдаланганини адабиётлардан маълум.



5-расм. Ms-ABC оқили доменининг ABC-транспортёрлар супероиласи ABC-доменига мос келувчи учламчи моделини ABC-транспортёрлар билан солиштириш

СМ-3 (3) фракциясидан 7 та фрагментар пептидлар идентификацияланди. Ушбу оқсил NCBI маълумотлар базаси билан солиштирилганда, унинг бирламчи тузилиши *Fabaceae* ва *Brassicaceae* оиласи ўсимликларида аниқланган хужайра ташқи доменидаги S-мотив тутган рецепторга ўхшаш киназага (РПК) гомолог эканлиги аниқланди.

--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Malva sylvestris</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Camelina sativa</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Oleracea</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Raphanus sativus</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Arabidopsis thaliana</i>

6-расм. *Malva Sylvestris* S-мотив тутган рецепторга ўхшаш киназасининг S-мотив тутган рецепторга ўхшаш киназалар гидрофоб соҳасига мос келувчи қисман гомологик аминокислота кетма-кетлиги

Хужайрада юқори концентрацияда мавжуд бўладиган S-мотивли РПК хужайрада патоген ва ўтхўр ҳашаротларга қарши химоя реакцияларида иштирок этади, шунингдек, микроорганизмлар билан симбиоз таъсир кўрсатиши исботланган.

СМ-4 фракциясидан 14 та фрагментар пептидлар идентификацияланди.

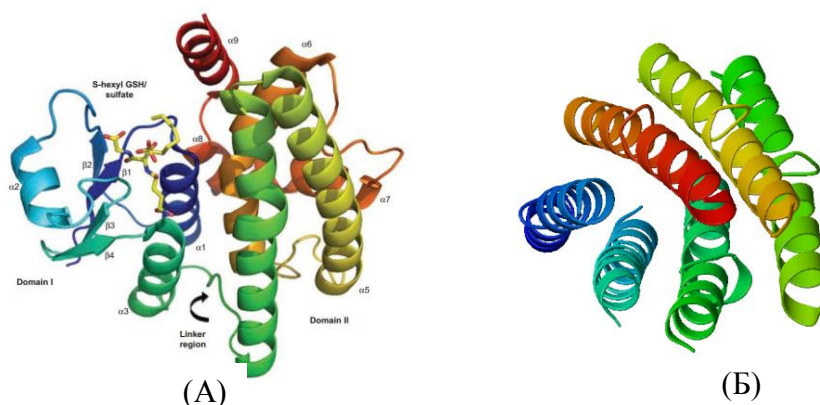
Натижалар NCBI маълумотлар базасида солиштирилганда, ушбу оқсилнинг бирламчи тузилиши *Brassicaceae* оиласи ўсимликларида аниқланган глутатион-S-трансферазалар билан гомологик эканлиги кўрилди.

SKLFEPADKIWQTKGRLTSEQKNDLKRKNYEQKLQEKVKELSETLRKSEAYDIQELA	<i>Malva sylvestris</i>
TKLFEPADKIWQTKG-----EEQETAKKEYIEALKILETELGDKPYFGGDTFGFVDIA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TKLFEPADKLIWQTKG-----EEQETAKKDYIEALKILESELGDKPYFGGDTFGFVDIA	<i>Camelina sativa</i>

7-расм. Глутатион-S-трансферазаларнинг қисман гомологик аминокислота кетма-кетлиги

Глутатион-S-трансфераза ЛПО гидрофоб маҳсулотларини зарарсизлантирган ҳолда уларни қайтариш, қайтарилган глутатион молекуласининг бирикиши ёки гидрофоб гуруҳларнинг нуклеофил алмашилиши йўли орқали антиоксидантлик вазифасини бажаради.

Malva Sylvestris глутатион-S-трансферазасининг фазовий тузилиши SWISSMODEL дастури компьютер моделлаштириш ёрдамида тадқиқ қилинди.



8-расм. Ўсимлик глутатион-S-трансферазаси (А) ва *Malva Sylvestris* глутатион-S-трансферазаси (Б) нинг учламчи тузилиши

Ушбу оксилнинг тузилиши спиралсимон оксил тузилиши билан ифодаланган, унда α -спираллар буралган ҳолатда ўзаро бир-бирини ўраб туради ва ўсимлик глутатион-S-трансферазаларига ўхшаш тузилишга эга.

Malva Sylvestris яшил қисми компонентларини солиштирма структур тадқиқотларини ўтказиш учун фракциялар ЮССХ си ёрдамида ацетонитрил концентрацияси градиентида фракцияларга ажратилди.

MALDI TOF масс-спектрометрия усулида индивидуал пептидларнинг молекуляр массалари аниқланди. Ушбу пептидларни тавсифлаш учун молекуладаги цистеин қолдиқлари сони аниқланди.

Масс-спектрометрик таҳлил маълумотларига кўра, тугмачагул *Malva Sylvestris* яшил қисми молекуляр массаси 9691 Да бўлган, таркибида 8 та цистеин қолдиғи тутган, липид ташувчи оксиллар синфига мансуб пептид ва 3645-6000 Да молекуляр массага эга бўлган, таркибида 6, 8 цистеин қолдиқлари тутган, тионинлар ва дефензинларга мансуб бўлган қатор пептидлар мавжудлиги аниқланди (1-жадвал).

***Malva Sylvestris* яшил қисми индивидуал компонентларининг молекуляр массалари**

Фракция №	1-4	1-6	1-8	1-11	2-2	3-1	3-4	3-6
Молекуляр масса, Да	5856	4297 4568 5116	4210 5529	9691	3645	5856	4984	3888
Цистеин сони	8	8	8	8	6	8	8	6

Ўсимлик уруғи ва яшил қисми экстрактларининг бўлинишидан кейинги олинган натижалар улардаги оксил-пептид компонентлар таркиби жиддий фарқ қилишини кўрсатди. Ушбу фарқ уруғ таркибидаги оксилларнинг тузилиши уларнинг ўсаётган уруғ функциялари билан боғлиқлиги билан тушунтирилади.

Ион-алмашилиш хроматографияси ёрдамида олинган СМ-1-СМ-4 фракцияларнинг ўсимлик фитопатогенларига ва илдизни чиритувчи микроорганизмларга (гоммоз) сезгирлиги ўрганилди (тадқиқотлар «Ўсимликларни ҳимоя қилиш» ИТИ да бажарилган).

***Malva Sylvestris* уруғи ва яшил қисмидан олинган фракцияларнинг биологик фаоллиги**

№	Фракциялар	IC ₅₀ мкг/мл* <i>Fusarium oxysporum</i>	IC ₅₀ мкг/мл <i>Verticillium dahliae</i>	IC ₅₀ мкг/мл <i>Xanthomonas malvacearum</i>
Яшил қисм	СМ-1	0	60,9±0,2	156,3±0,30
	СМ-2	29,1±0,02	23,6±0,15	112,0±0,23
	СМ-3	31,9±0,04	54,3±0,12	98,0±0,02
Уруғ	СМ-1	21,2±0,1	23,9±0,02	30,0±0,06
	СМ-2	15,3±0,06	34,3±0,01	31,2±0,15
	СМ-3	14,6±0,01	16,6±0,07	28,0±0,04
	СМ-4	24,4±0,02	54,1±0,23	135±0,5

*IC₅₀ - замбуруғ ўсишини 50% га пасайтирадиган оксилнинг мкг даги концентрацияси.

Олиб борилган тадқиқотлар, фракциялар *Verticillium dahliae* ва *Fusarium oxysporum* замбуруғлари ўсишини камайтиришини ва гоммозга сезгирлик намоен қилишини кўрсатди. Ўсимликнинг яшил қисми ва уруғи СМ-2 ва СМ-3 фракциялари оксилларнинг тузилиши натижаларига боғлиқ ҳолда энг юқори фаоллик намоен қилди (2-жадвал).

Ўсимлик уруғи оксил компонентларининг инсектотоксиклиги *Agrotis segetum* (*Den*) капалак қурти эпидермиси остига стерилланган апироген сувни Hamilton типдаги шприц ёрдамида (1 та қуртга 1 мкл гача) микроинъекция

йўли билан юбориш орқали аниқланди. Қуртларнинг ўлим ҳолати 5 кун давомида кузатиб борилди.

Олиб борилган тадқиқотлар ўрганилаётган фракциялар текширилаётган хашаротларга қарши юқори даражада токсиклик намоён қилишини кўрсатди. Энг юқори фаоллик СМ-4 фракцияда 89% қуртларнинг ўлими билан кузатилди.

Структур-функционал ўзаро боғлиқликларни ўрганиш бўйича олиб борилган тадқиқот натижасида СМ-3 ва СМ-4 фракциялардаги оксил-пептидлар ўсимлик уруғларига таъсир қилган ҳолда уларнинг ўз метаболитлари ва табиий кушандаларини жалб қилувчи учувчан бирикмалари ёрдамида, инфекция ва зараркунандаларга қарши курашувчанлигини яхшиланишига олиб келадиган, генетик чидамлилиқ потециалини тўлиқ намоён қилишига имкон берувчи пептид элиситорларига, яъни, глутатион-S-трансферазалар ва рецепторларга ўхшаш киназалар синфига кириши аниқланди.

Ажратилган оксил-пептид фракцияларининг одам организми патоген бактерияларига қарши антимикроб фаоллиги ўрганилди (тадқиқотлар Тошкент Тиббиёт Академияси, микробиология кафедрасида бажарилган).

Назорат сифатида кенг таъсир доирасига эга бўлган грамицидин антибиотигидан фойдаланилди (концентрация 10 мкг/мл).

3-жадвал

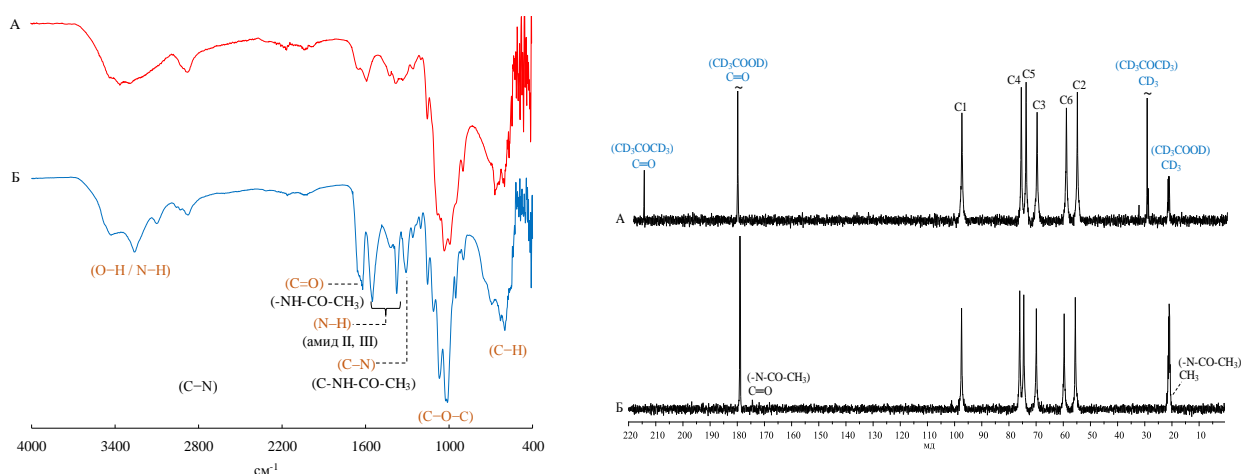
***Malva Sylvestris* уруғидан ажратилган оксил-пептидли фракцияларнинг одам патоген бактерияларига қарши антимикроб фаоллиги**

№	Микроб гуруҳлари	Ўсишнинг секинлашиш зонаси, мм				
		Грамицидин	СМ-1	СМ-2	СМ-3	СМ-4
	Концентрация	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	18,0±0,1	8,0±0,1	9,0±0,1	17±0,1	11,0±0,2
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	8,0±0,1	18,0±0,1	11,0±0,1
3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19,01±0,1	9,01±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	11,0±0,1
4	<i>Streptococcus Pyogenes</i>	21,0±0,2	11,0±0,2	9,0±0,1	16,0±0,2	11,0±0,3
5	<i>Enterococcus faecales</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	16,0±0,2	11,0±0,4
6	<i>Escherichia Coli ЛП</i>	17,0±0,1	0	11,0±0,2	13±0,2	11,0±0,1
7	<i>Escherichia Coli ЛН</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	7,0±0,01	0	13±0,2
8	<i>Proteus vulgaris</i>	16,0±0,1	9,0±0,1	0	0	12±0,1
9	<i>Klebsiella</i>	18,0±0,2	11,0±0,2	9,0±0,1	11±0,1	13±0,2
10	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	11±0,1	9,0±0,1

Фракцияларнинг турли патогенларга нисбатан антимикроб фаоллиги ўрганилганда, уруғдан олинган СМ-3 фракция *S. aureus* ва *S. epidermidis* штамmlарига нисбатан грамицидинга солиштирилганда юқори антимикроб фаоллик намоён қилди (ўсишнинг секинлашиш зонаси 18 мм). Олинган натижалар ушбу фракциянинг тадқиқи тиббиёт ва косметологияда бактерияларга қарши препаратлар яратиш учун истикболли эканини кўрсатди.

Диссертациянинг «Хитозаннинг олиниши ва унинг биологик фаоллиги» деб номланган учинчи бобида *Artemia* цистасидан хитозанни олиниши, унинг физик-кимёвий характеристикалари ва биологик фаолликлари келтирилган.

Майдаланган *Artemia* цистасидан хитин ажратиб олинди ва уни деацетиллаш йўли билан хитозан олинди. Олинган хитозаннинг назорат хитозан намунаси (хитозан Sigma-Aldrich) билан солиштириш учун ИҚ- ва ^{13}C ЯМР спектроскопия (9-расм) усуллари ёрдамида тадқиқотлар олиб борилди.



9-расм. *Artemia* цистасидан ажратиб олинган хитозан (А) ва назорат хитозан (Б) (Sigma-Aldrich) намуналарининг ИҚ- ва ^{13}C ЯМР спектрлари

Олинган ИҚ-спектрлардаги боғларнинг ютилиш соҳалари асосида молекуладаги атомларнинг гуруҳланиши ва шу билан бирга молекуланинг тузилиши аниқланди.

Хитозан намуналарининг ИҚ-спектрларида 3200-3600 см⁻¹ соҳаларда О–Н/Н–Н боғларининг симметрик ва ассиметрик тебранишларига хос ютилишлар аниқланди. Н–С–Н боғларининг симметрик тебранишларига мос келувчи сигналлар 2850-2950 см⁻¹ да кузатилди. С=О (амид I, -NH-CO-CH₃) ва N–Н (амид II, III) боғларига тегишли бўлган сигналлар 1300-1620 см⁻¹ да аниқланди. Бундан ташқари, С–Н (C-NH-CO-CH₃), скелетал ва β-гликозид С–О–С боғларининг тебранишлари ҳамда Н–С–Н боғларининг ассиметрик тебранишларига хос сигналлар 560-1060 см⁻¹ да кузатилди.

Хитозан намуналарининг ^{13}C ЯМР спектрларида макромолекуланинг С2, С6, С3, С5, С4 ва С1 атомлари учун мос келувчи ЯМР сигналлари 56,58, 60,61, 71,40, 75,45, 77,22 ва 99,10 м.у. соҳаларда аниқланди. Назоратдаги хитозан намунасида ушбу сигналларга қўшимча равишда О N-ацетил гуруҳларидаги (-NH-CO-CH₃) CH₃ ва С=О углерод атомлари учун характерли сигнал мос равишда 20,83 ва 174,46 м.у. соҳада кузатилди. Бироқ, бу сигналлар *Artemia* цистасидан олинган хитозан намунасининг спектрларида кўринмади, бу эса ушбу намунанинг деацетилланиш даражаси юқори эканлигини кўрсатади. Спектрда 21,02 (CD₃, CD₃COOD), 30,89 (CD₃, CD₃COCD₃), 179,01 (C=O, CD₃COOD) ва 216,18 м.у. (C=O, CD₃COCD₃) соҳаларда аниқланган сигналлар

дейтерийланган назорат эритувчилар ацетон ва сирка кислота учун хос хисобланади.

Кейинги тадқиқотларда олинган хитозан намунасини назорат хитозанга солиштирган ҳолда, унинг физик-кимёвий характеристикаларини аниқлаш бўйича тадқиқотлар олиб борилди.

4-жадвал

Хитозан намуналарининг физик-кимёвий характеристикалари

Физик-кимёвий характеристикалар	Рухсат этилган интервал	<i>Artemia</i> цистаси хитозани	Қисқичбақа хитозани
Деацетилланиш даражаси, %	≥75	82,0 ± 0,05	70,0 ± 0,20
2% ли сирка кислотадаги қовушқоклиги, Дл/г	4-30	5,9	12,0
Солиштирма юзаси, м ² /г	1-200	31,5 ± 0,44	7,88 ± 0,23
Минерал қолдиқ (кул таркиби), %	≤0,5	0,27 ± 0,058	0,36 ± 0,063
Оқсил қолдиқ, %	≤0,1	0,08 ± 0,018	0,49 ± 0,038
Ўртача молекуляр масса	1,0·10 ⁵ -1,4·10 ⁶	1,62·10 ⁵	1,29·10 ⁶
pH	6,8-7,3	7,2 ± 0,12	7,3 ± 0,25

Цистадан ажратилган хитозан қисқичбақасимонлар хитозанига хос физик-кимёвий хоссаларга эга бўлган ҳолда 2% ли сирка кислотада қовушқок эритмалар ҳосил қилиши (мос равишда 5,9 ва 12,0 Дл/г), метилен кўкига нисбатан юқори сорбциялаш хусусиятини (31,5±0,44 м²/г) намоён қилиши аниқланди. Ушбу натижалар Орол денгизи *Artemia* цистасидан ажратилган хитозандан гель ва иммобилизацияланган дори шаклидаги етказиб берувчи матрицалар олишда истиқболли қўшимча модда сифатида фойдаланиш имконини беради.

Орол денгизи *Artemia* цистасидан ажратиб олинган хитозаннинг сорбциялаш хусусиятларини тасдиқлаш мақсадида олма пектини - Пектолакт ва натрий альгинати каби озуқа толалари билан солиштирилди (*in vitro*). Бунда ошқозон ва ичакда овқат ҳазм қилишнинг сунъий шароитини яратиш усулидан фойдаланилди (тадқиқотлар Л.Н. Гумилев номидаги ЕМУда бажарилган).

5-жадвал

Табиий сорбентларнинг сорбциялаш хусусиятларини солиштирма ўрганиш

Кўрсаткич	N	Триглицеридлар (г/г)		Ёғ кислоталар (г/г)	
		М±m	Чегаралар	М±m	Чегаралар
Пектолакт (пектин асосидаги симбиотик)	5	4,61±0,09	4,49-4,69	3,22±0,04	3,17-3,27
Кальций альгинати	5	4,16±0,05	4,10-4,21	3,17±0,03	3,13-3,21
<i>Artemia</i> цистаси хитозани	5	4,43±0,59	3,35-4,75	3,21±0,06	3,15-3,29

Натижалардан олинган хитозаннинг сорбциялаш имконияти кальций альгинати имкониятидан устунлиги ва Пектолактдан деярли қолишмаслиги кузатилди. Ўтказилган тажрибаларда хитозан липид-боғловчи хоссага эга эканлиги аниқланди, унинг таъсири ичакдаги ёғ кислоталари ва триглицеридларни боғлаши билан боғлиқ. Ўрганилаётган озуқа толаси юқорида баён этилган липид компонентларини сорбциялаган ҳолда боғлайди ва уларнинг сўрилишини камайтиради. Шундай қилиб, хитозан ва Пектолакт

кондаги умумий холестерин ва ЖҚЗЛП миқдорини камайтиради, яъни дислипидемия, гиперлипидемия ва атеросклероз ривожланишига тўсқинлик қилади.

Хитозаннинг ўткир захарлилигини ўрганиш натижалари ушбу препарат V синф захарли бўлмаган бирикмалар каторига киришини, сичқонларда ошқозон ичига юборилганда унинг захарлилиги $LD_{50} \geq 10000$ мг/кг эканлигини кўрсатди.

Хитозанни атеросклероз ривожланишини олдини олувчи дри воситаси сифатида фойдаланиш мумкинлигини тахмин қилган ҳолда, ушбу касаллик билан бирга кечадиган гипогликемик ва антигипоксик фаолликларини ўрганиш бўйича тадқиқотлар олиб борилди. Хитозаннинг гипогликемик фаоллигини ўрганиш алиментар гипергликемия моделида олиб борилди. Хитозаннинг гипогликемик фаоллиги «Табиий инулин концентрати» (БФҚ) билан таққослаган ҳолда аниқланди. Хитозаннинг гипогликемик фаоллигини 10 ва 20 мг/кг дозада алиментар гипергликемия моделида ўрганиш натижалари препарат тажриба намунаси таъсирида қондаги шакар миқдорини камайиши аниқланди. Хитозаннинг энг юқори гипергликемик самараси 10 мг/кг дозада, 2 соатдан кейин 58,5% ни ташкил қилди. Тадқиқотлар хитозан иккала дозада ҳам «Табиий инулин концентрати» (гипергликемик самара 2 соатдан кейин 37,3%) ўсимлик БФҚси таъсиридан устун келишини кўрсатди.

Хитозаннинг антигипоксик таъсири гемик гипоксия моделида ўрганилди. Гемик гипоксияни $NaNO_2$ ни 400 мг/кг дозада (хайвонларнинг 100% ўлимига олиб келадиган) тери остига юбориш йўли билан чақирилди. Тажриба хайвонларининг яшаш давомийлиги 50 ва 100 мг/кг дозада мос равишда $9,5 \pm 1,0$ ва $11,0 \pm 1,2$ минутни, антигипоксик самара эса 12,6 ва 24,5% ни ташкил этди. Хитозаннинг 50 ва 100 мг/кг дозасида назорат гуруҳи хайвонларига нисбатан ҳаёт давомийлигига мойиллиги кузатилди. Сичқонларга витамин B_{12} ни 0,09 мг/кг дозада юборилганда ҳаёт давомийлиги $13,0 \pm 1,5$ минутгача ортди, антигипоксик самара эса 36,2% ни ташкил этди (тадқиқотлар Биоорганик кимё институти Фармакология лабораторияси к.и.х. Г. Раҳмонова томонидан бажарилган).

Қонда холестерин ва липидлар концентрациясининг ортиши атеросклероз ривожланишининг хавфли омилларидан ҳисобланади. Диетологлар томонидан қондаги холестеринни камайтириш учун тавсия этилган самарали усуллардан бири овқатланиш рационини крахмал бўлмаган полисахаридларни ўз ичига олган озуқа толаси билан бойитиш ҳисобланади.

Олиб борилган тадқиқотларда экспериментал гиперлипидемия шароитида хитозаннинг қон ва жигардаги липидлар миқдорини камайтириш имконияти ўрганилди. Цистадан олинган хитозанни гиполлипидемик хоссаларини парентераль (твин) хайвон моделларида тадқиқ қилиш натижасида унинг организмда липидлар мувозанатини нормаллаштириш эффекти борлиги кузатилди. Хитозаннинг липидлар мувозанатини нормаллаштириш эффекти қондаги липидлар атероген кўрсаткичлари (умумий холестерин, триглицеридлар, ҚЗЛП) нинг камайиши ва антиатероген кўрсаткичлар (ЮЗЛП) билан баҳоланди. Солиштириш учун Аторвастатин ва Фенофибрат препаратлари олинди.

Олинган натижаларга (6-жадвал) кўра, назорат гуруҳи атерогенлик коэффициенти ($AK=1,7\pm 0,03$) соғлом хайвонлар (интакт гуруҳ) ($AK=0,71\pm 0,02$) га нисбатан сезиларли даражада ортди ($p<0,001$). Жадвалга мувофиқ, хитозандан фойдаланиш қон зардобдаги атероген кўрсаткичларни, жумладан, УХС, ТГ ва ҚЗЛП ни камайтиради, ХС, ЮЗЛП миқдорига яхши таъсир кўрсатади. Гиперлипидемиянинг твин моделида хитозан намунаси таъсирида каламушларда назоратга нисбатан ($p<0,001$) УХС концентрацияси 19,6% га, ТГ 14,5% га ҳамда ХС ҚЗЛП миқдори 14,2% га камайиши аниқланди. Хитозан назорат препаратлари аторвастатин ва фенофибратга нисбатан УХС миқдорини 19,6% га камайтирди ($p<0,01$).

6-жадвал

Қондаги липид спектридаги кўрсаткичлар

Гиперлипидемия модели						
N	Гуруҳ	Липид профили кўрсаткичлари				
		УХС (мг/дл) M±s	ТГ (мг/дл) M±s	ЮЗЛП (мг/дл) M±s	ҚЗЛП (мг/дл) M±s	АК M±s
5	Интакт(1)	74,1 ± 0,3*	49,0±0,6*	43,3±0,5*	28,4±0,4	0,71±0,02*
5	Назорат (2)	98,4±0,5	57,1±0,4	36,4±0,5	49,3±0,5	1,70±0,03
5	Аторвастатин (3)	82,4±0,6*	44,2±1,4*	39,4±0,4*	43,7±0,5	1,09±0,02*
6	Фенофибрат(4)	83,4±0,4*	47,7±0,2*	41,4±0,3*	42,3±0,3	1,01±0,02*
6	Artemia цистаси хитозани	79,1±0,4 - 19,6%	48,8±0,4 - 14,5%	39,3±0,5 + 8,0%	42,3±0,5 - 14,2%	1,01±0,03 -40,6%

Эндотелиал дисфункция тажриба моделларида гиперлипидемияни ўрганиш асосида хитозан таъсирида каламуш томирларидаги морфологик ўзгаришлар ўрганилди (тадқиқотлар Л.Н. Гумилев номидаги ЕМУда бажарилган). Ушбу усул экспериментал гиперлипидемия усули билан таққослаганда, мустаҳкам қон томир деворларида структуравий бузилишларини ҳосил қилиш имконини беради. Тадқиқотлар давомида магнит-резонанс томографияси (МРТ) ёрдамида экспериментал хайвонларда қон томирларнинг тозалик ҳолати баҳоланди. Артерия деворидаги локал атероген ўзгаришларни кўрсатувчи нотекис артериал контрастланиш 10-расмда кўрсатилган, бунда гиперлипидемия (тажриба гуруҳ) ва хитозан қўллангандан кейинги гиперлипидемиянинг комплекс моделида (назорат гуруҳ) ёғ босган томирлар инфильтрацияси тасвирланган.



10-расм. Каламуш томирларининг компьютер магнит резонанс томографияси

Олиб борилган тадқиқотларда олинган хитозанни тиббиёт амалиётида профилактика ва соғломлаштириш учун энтеросорбент препарати сифатида тавсия қилиниши мумкинлиги аниқланди.

Диссертациянинг «**Оқсил ва полисахарид табиатли табиий бирикмаларнинг тадқиқот усуллари, материаллари, биологик фаоллиги ва фармакотоксикологияси**» деб номланган тўртинчи бобида тадқиқотларда фойдаланилган реактив ва қурилмалар, ажратиш усуллари, тузилиш ва биологик хоссаларни, фармако-токсикологик хусусиятларни тадқиқ қилиш усуллари баён этилган.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор *Malva Sylvestris* уруғидан *Poaceae* ва *Fabaceae* оиласи ўсимликлари аспартокиназалари ва ABC-транспортёрлар оқсилларига гомологик бўлган, юқори антимиқроб фаоллик намоён қилувчи ташувчи-оқсиллар ажратиб олинди. *Malva Sylvestris* аспартокиназасининг гомологик кетма-кетлиги консерватив гидрофоб соҳа тутган, аспартокиназа фаоллигига жавоб берувчи домен эканлиги аниқланди. Ms-ABC оқсили ABC-доменининг гомологияси NCBI маълумотлар базаси ва SWISSMODEL бўйича аниқланди.

2. Илк бор оксидланиш-қайтарилиш реакцияларида иштирок этувчи, фитопатогенларга қарши ва инсектицид фаолликка эга бўлган S-мотив тутган рецепторга ўхшаш киназа ва глутатион-S-трансфераза оқсиллари ажратиб олинди.

3. Орол денгизи *Artemia* цистасидан хитин ажратилди ва уни деацетиллаш орқали хитозан олинди. Олинган хитозаннинг молекуляр катталиклари ва тузилиши аниқланди. Олиб борилган тадқиқотларда унинг тузилиши ва асосий катталиклари сотувдаги хитозанга ўхшаш эканлиги аниқланди, *Artemia* цистаси хитозан олиш учун хом-ашё манбаси бўлиши мумкинлиги исботланди.

4. Хитозанни *in vitro* ва *in vivo* шароитларда биологик фаоллигини ўрганиш натижалари унинг сорбциялаш, гипогликемик, гипоксияга қарши ва гипополидемик хоссалар намоён қилишини кўрсатди. Эндотелиал дисфункция гиперлидемик моделида хитозан таъсирида тажриба хайвонларида қон томирлардаги атеросклеротик бузилишлар камайиши аниқланди.

5. *Artemia* цистасидан олинган хитозан асосида холестерин алмашинуви бузилишини комплекс даволаш ва уни олдини олиш учун фойдаланиш мумкин бўлган «Грацит» энтеросорбентининг тажриба намунаси олинди. Шунингдек, *Artemia* хитозанини гель кўринишида тиббиёт ва косметологияда қўллаш имкониятлари тадқиқ қилинди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.К/В.37.01
ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ОРИПОВА МУНОЖАТ ЖАЛОЛДИНОВНА

**ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ СЕМЯН *MALVA SYLVESTRIS*,
ХИТОЗАНА ИЗ ЦИСТ *ARTEMIA* И СОЗДАНИЕ КОСМЕТИЧЕСКОЙ
КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ**

02.00.10 - Биоорганическая химия

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

Ташкент - 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2019.3.PhD/K245.

Диссертация выполнена в Институте биорганической химии

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.biochem.uz) и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель: **Ощепкова Юлия Игоревна**
доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Рамазанов Нурмурод Шералиевич**
доктор химических наук, профессор

Гафуров Махмуджон Бакиевич
доктор химических наук

Ведущая организация: **Узбекский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт**

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 года в ___ часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.K/B.37/01 при Институте биорганической химии (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биорганической химии (зарегистрировано под № ___). (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: shsha2@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2020 г.
(реестр протокола рассылки № «___» от _____ 2020 г).

Ш.И.Салихов

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

Ш.А.Шомуротов

Ученого секретаря Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.х.н.

М.Б.Гафуров

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.х.н.

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире, в последние годы, изучение биополимеров привлекает внимание многих исследователей в связи с тем, что ранее считавшиеся инертными, они оказались веществами с широким спектром биологической активности. Наличие практической значимости и фармакологической активности выявлено для всех известных классов биополимеров, поэтому экспериментальные работы в настоящее время ориентированы в таких направлениях, как исследование структуры, разработка технологий производства, химическая модификация, поиск новых источников, определение биологической активности и расширение спектра их практического применения. Несмотря на более чем вековую историю химии биополимеров, объем экспериментальной и теоретической информации продолжает увеличиваться с каждым годом, что свидетельствует о неугасающем интересе к природным соединениям.

В настоящее время в мире особое внимание уделяется выделению биологически активных веществ из природных источников, изучению их структуры и свойств. Особое значение имеют биодоступность биологически активных веществ, полученных на основе природных полимеров - белков и полисахаридов, а также их низкий побочный эффект на организм. В связи с этим проводятся исследования по разработке лекарственных препаратов на основе таких биологически активных соединений, по поиску природных источников, богатых биологически активными веществами, разработке недорогих и экономически эффективных методов выделения биологически активных соединений из них, выявлению современных методов изучения их структуры и биологической активности.

В нашей стране особое внимание уделяется разработке новых эффективных, импортозамещающих лекарственных препаратов на основе местного сырья и обеспечению населения качественными лекарствами. В 4-направлении Стратегии развития Республики Узбекистан изложены задачи по «реализации мер по дальнейшему развитию фармацевтической промышленности, улучшению обеспечения населения и медицинских учреждений недорогими, высококачественными лекарственными средствами и медицинскими изделиями, недопущению необоснованного роста цен на лекарства»¹. В связи с этим важное значение имеют исследования биологически активных веществ из местного растительного и животного сырья, изучения их структура и активности, создание на их основе новых, эффективных лекарственных препаратов.

Настоящее диссертационное исследование в определённой степени соответствует решению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан от февраля 2017 года УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», от 7 ноября 2017 года,

¹ Указ Президента Республики Узбекистан от февраля 2017 года УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан 2017-2021гг.»

УП-№5229 «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью», в Постановлении Президента Республики Узбекистан №ПП-3532 от 14 февраля 2018 года «О дополнительных мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы.

Зарубежными учеными Lay F.T., Anderson M.A., Stotz H.U., Thomson J.G., Wang Y. проведено систематическое изучение по выделению и изучению структурно-функциональной зависимости белков и пептидов животного и растительного происхождения. На основе пептидов создан ряд лекарственных средств, таких как кубикин, фирмагон, фузеон, вантас и др.

В странах СНГ учеными Егоровым Ц.А., Одинцовой Т.И., Гришиным Е.В., Рогожиным Е.А. проведены исследования по выделению и изучению механизма действия соединений, относящихся к классам тионинов, дефензинов и липид-переносящих белков из растений семейства *Poaceae*.

В нашей стране огромный вклад в развитие этой отрасли внесли ученые Института биоорганической химии и Института химии растительных веществ (Салихов Ш.И., Азимова Ш.С., Ощепкова Ю.И. и др.) Этими учеными были выделены новые белки и пептиды из растений, относящихся к семействам *Ranunculaceae*, *Solanaceae* и *Fabaceae*. Для ряда выделенных соединений установлены структуры с изучением их биологической активности и разработан ряд препаратов на их основе для дальнейшего использования в медицине.

В настоящее время во всем мире отмечается возросший интерес специалистов к полисахаридам природного происхождения, а именно хитину и хитозану. Это связано с биологическими свойствами данных полисахаридов, а также с наличием богатой сырьевой базы. Зарубежными учеными изучены полиэлектролитные свойства, адсорбционная способность, биodeградация, биосовместимость (Aranaz et al.). Lim C.K., Mourya V.K., Inamdar N.N., Tiwari A., Zhang et al. изучили возможность применения в разных областях химии и биологии производных хитозана, растворимых в воде при значениях pH близких к нейтральному. В разработку подходов к рациональному использованию хитозансодержащего сырья, а также получению на его основе пищевых добавок, покрытий, биологически активных ингредиентов внесли большой вклад ученые стран СНГ: Плиско Е.А., Быкова В.М., Гамзаде А.И., Сафронова Т.М., Вихорева Г.А. и многие другие. В Узбекистане изучением хитозана, полученного из отходов тутового шелкопряда, получением наноструктур на его основе и созданием терапевтических препаратов занимаются в Институте физики химии полимеров (Рашидова С.Ш.) и кафедре

биоорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии (Иноятова Ф.Х.).

Результаты отечественных и зарубежных научных работ доказывают целесообразность изучения физико-химических характеристик белков и пептидов и хитозана из объектов природного происхождения – эндемиков Узбекистана с целью их дальнейшего применения.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ проектов Института биоорганической химии: Ф6-Т018 «Структурно-функциональные исследования пептидов растительного происхождения, обладающих антибиотической активностью» (2012-2016 гг.) и инновационного проекта ГА-ФА-А11-005 «Разработка технологии комплексной переработки цист *Artemia salina* и создание медицинских и косметических средств» (2017-2018).

Целью исследования является выделение белково-пептидных компонентов из семян и зеленой части просвирника *Malva Sylvestris*, хитозана из цист *Artemia*, их физико-химическая характеристика, установление биологической активности и перспектив применения в медицине.

Задачи исследования:

выделение белково-пептидных компонентов из семян и зеленой части растения *Malva Sylvestris* и изучение их физико-химических параметров;

изучение биологической активности выделенных компонентов к различным группам патогенов сельхозкультур и человека;

выделение хитина и хитозана из цист *Artemia* Аральского моря и изучение физико-химических свойств;

исследование возможности практического применения хитозана в фармацевтике.

Объектами исследования являются семена просвирника *Malva Sylvestris* семейства *Malvaceae*, произрастающей в Узбекистане и цисты рачка рода *Artemia*, обитающего в Аральском море.

Предметом исследования является изучение физико-химических свойств и биологической активности пептидов и белков из семян *Malva Sylvestris* и хитозана из цист рачка рода *Artemia*, и создание косметического средства на их основе.

Методы исследования. При выполнении исследований использовались методы экстракции, выделения и идентификации веществ (методы ИК-спектроскопии, колоночной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии, протеомный анализ белков, электрофорез, LC-MS спектрометрия) и методы фармако-токсикологических исследований на экспериментальных животных.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

впервые из семян *Malva Sylvestris* выделены белки, гомологичные аспартокиназам и АВС-транспортерам, обладающие высокой антимикробной активностью;

установлено, что гомологичная последовательность аспартокиназы *Malva Sylvestris* представляет собой домен, содержащий консервативный гидрофобный участок, ответственный за активность аспартокиназы;

впервые выделены белки, гомологичные рецептор-подобной киназе с S-мотивом и глутатион-S-трансферазе, обладающие фитопатогенной и инсектицидной активностями и участвующие в окислительно-восстановительных реакциях;

проведено выделение хитозана из цист *Artemia* Аральского моря, для которого определены молекулярные параметры и структура;

определено что, хитозан в условиях *in vitro* и *in vivo* обладает липидсорбирующими, гипогликемическими, антигипоксическими и гипополидемическими свойствами и снижает атеросклеротические нарушения сосудов.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

ряд белковых соединений, выделенных из семян *Malva Sylvestris*, идентифицированы белки, участвующие в механизмах защиты растений от патогенов;

фармако-токсикологическими методами установлено, что хитозан, полученный из цист *Artemia* обладает сорбирующей способностью и может быть применен в качестве энтеросорбента для терапии экзо- и эндотоксмии.

Достоверность результатов исследований обосновывается использованием современных физико-химических и биологических методов анализа; обсуждением результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, а также публикациями в рецензируемых научных изданиях.

Научная и практическая значимость результатов исследования

Научная значимость исследований заключается в том, что проведен сравнительный анализ белково-пептидных соединений семян и зеленой части *Malva Sylvestris* и выделены запасные белки и белки-транспортеры; проведено выделение хитозана и изучены основные фармакологические свойства.

Практическая значимость исследования заключается в том, что разработан энтеросорбент Грацит на основе хитозана *Artemia* Аральского моря для профилактики и комплексного лечения нарушения холестеринового обмена. По результатам фармакологических исследований этот препарат может быть внедрен в медицинскую практику.

Внедрение результатов исследования. На основе результатов, полученных при изучении белково-пептидных компонентов из семян *Malva Sylvestris* и хитозана из цист *Artemia* Аральского моря:

выделенные белково-пептидные компоненты из семян растения рода *Malvaceae* использованы при сравнительном изучении биологической активности на возбудителях фитопфторозов *Phytophthora* (справка Российского государственного аграрного университета имени К.А. Тимирязева 90-28/59 от 16.05.2020 года). Научные результаты позволили разработать и оптимизировать тест-системы и протоколы пробоподготовки и проведения

ПЦР (обычного и «в реальном времени») для идентификации возбудителей фитофторозов;

выделенный хитозан из цист *Artemia* Аральского моря использован в рамках научного направления, посвященного изучению хитозана из цист *Artemia*, обитающей на территории соленых озер Казахстана в Евразийском Национальном Университете (справка Евразийского Национального Университета им.Л.Н.Гумилева (Казахстан) 03-01-24/6926 от 06.03.2020 года). Результаты исследований дали возможность провести сравнительную характеристику видов *Artemia*, обитающей в соленых озерах Центральноазиатского региона, Казахстана и Сибири.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 4 международных и 3 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 научных статей, в том числе 2 в зарубежных и 3 в республиканских журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 108 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснованы актуальность и востребованность проведенных исследований, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет исследования, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологии Республики Узбекистан. Излагаются научная новизна и практические результаты исследования, научно-практическая значимость полученных результатов, внедрение результатов исследования в практику, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Перспективы использования природных классов биологически активных соединений**» осуществлен подробный обзор научных исследований по теме диссертации, посвященный классификации антимикробных пептидов, структуре, механизму действия и биологической активности. Представлены данные по изучению основных источников хитина и хитозана, их структуре и перспективам применения в медицине, косметологии и ветеринарии.

Во второй главе диссертации «**Выделение и физико-химическая характеристика белков и пептидов из семян и зеленой части просвирника *Malva Sylvestris***» описаны результаты выделения белково-пептидных компонентов из семян и зеленой части *Malva Sylvestris* и их физико-химические характеристики.

Белково-пептидную фракцию получали экстрагированием уксусной кислотой с последующим осаждением ацетоном. Полученные экстракты

последовательно разделяли методом ионообменной хроматографии на колонках с DEAE-целлюлозой и CM-TSK.

Из экстракта семян и зеленой части получено 4 и 3 фракции, соответственно.

Фракции, после определения количественного содержания белка по методу Лоури, анализировали методом гель-электрофореза в 15% ПААГ.

Гель-электрофорез фракций, полученных в результате разделения семян и зеленой части, показал наличие компонентов с молекулярными массами в диапазоне 5-20 кДа.

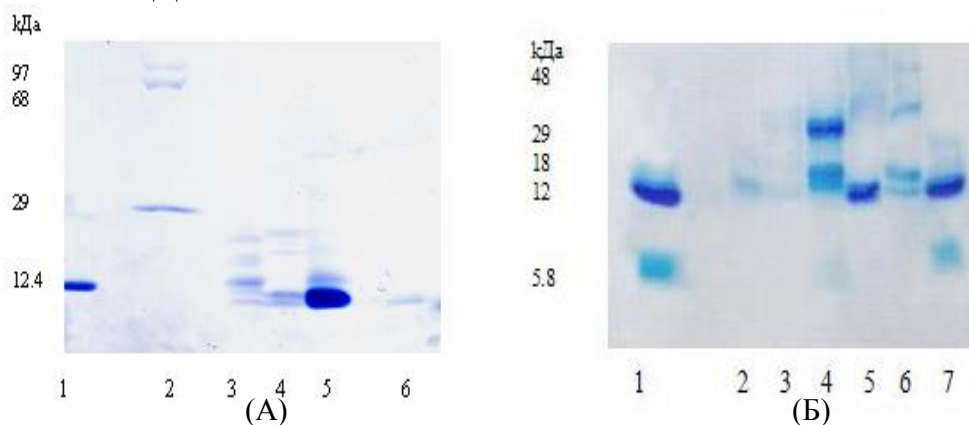


Рис.1. Электрофоретический анализ фракций в 15% ПААГ, полученных после разделения экстракта зеленой части (А) и семян (Б) *Malva Sylvestris* на колонке с CM-TSK. (А) 1,2-маркеры, 3-экстракт, 4-фракция CM-1, 5-фракция CM-2, 6-фракция CM-3. (Б) 1,7-маркеры, 2-фракция CM-1, 3-фракция CM-2, 4-экстракт; 5-фракция CM-3, 6-фракция CM-4

Для изучения структурных параметров компонентов, содержащихся во фракциях, полученных после разделения экстракта *Malva Sylvestris*, проводили двумерный электрофорез.

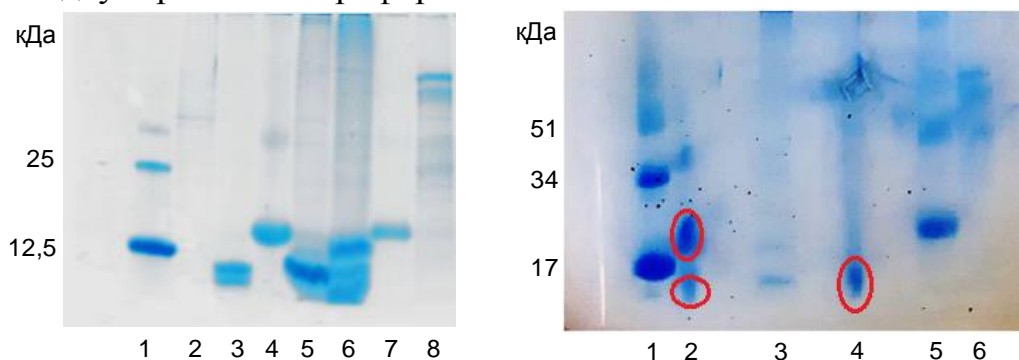


Рис.2. Электрофоретический анализ фракций в 15% ПААГ, полученных после разделения экстракта семян *Malva Sylvestris* на колонке с CM-TSK (А) и белков, полученных после изоэлектрофокусирования фракций CM-3, CM-4 (Б)

Первичная структура белков была исследована масс-спектрометрическим методом. Для этого соответствующую часть геля электрофореза (рис. 2, дорожки 2,4) отсекали и цистеиновые связи в белках восстанавливали до сульфгидрильных групп с использованием дитиотреитола и карбоксиметилировали йодацетамидом. Проводили гидролиз трипсином и полученные пептиды экстрагировали трифторуксусной кислотой.

Извлеченные пептиды из образца анализировали на масс-спектрометре Agilent Technologies CHIP-LC-MS Q-TOF 6520V. В результате были идентифицированы аминокислотные последовательности фрагментарных пептидов для каждого из пятен.

Для фракции **СМ-3 (1)** идентифицировано 15 фрагментарных пептидов. Идентифицированная аминокислотная последовательность была изучена в базе данных NCBI. Определено, что последовательность является субъединицей аспартокиназы, частично гомологичной классу аспартокиназ растений семейства Злаковых (*Poaceae*) и Бобовых (*Fabaceae*). Аспартокиназа представляет собой фермент, который катализирует фосфорилирование аспарагиновой кислоты. Эта реакция является первым шагом в биосинтезе трех незаменимых аминокислот: метионина, лизина и треонина, известных как «семейство аспартатов».

```

-GRVKLKEATEIVE DMEKSFGE CMSTRIFAAYLNKIRI- Malva sylvestris
-GVAMMKELTRRTQDYLVSFGE CMSTRIFAAYLNKLGV- Arachis hypogaea
-GIAMMKELTPRTSDYLVSFGE CMSTRIFSAAYLNKIRV- Zea mays
-GIAMMKELTPRTKDYLASFGE CMSTRIFAAYLNKIDV Olea europaea var. sylvestris
  
```

Рис.3. Сравнительная аминокислотная последовательность активного участка аспартокиназ из различных источников

Определенная гомологичная последовательность представляет субъединицу, содержащую гидрофобный участок, ответственный за активность аспартокиназы. Гидрофобный участок является одним из трех консервативных участков аспартокиназы.

Для фракции **СМ-3 (2)** идентифицировано 18 фрагментарных пептидов. Исследования показали, что первичная структура данного белка, названного Ms-ABC, частично гомологична представителям суперсемейства ABC-транспортёров (ATP-Binding Cassette). Разнообразные белки суперсемейства ABC-транспортёров объединяет общая доменная организация - наличие трансмембранных и АТФ-связывающих доменов, которые также называют ABC-доменами (рис.4).

```

89-KDRVLTNQLHFLSQVDKIRTVVTGRAK LK-LLRVLNMEGLLFVSKNKIVLSSTSEAEKV
  K RVLVTNQLHFLSQVD+I V G K+ L+ + GLLF K++ A K+
-KTRVLVTNQLHFLSQVDRIILVHEGMVKEEGTFEELSSQGLLF---QKLM----ENAGKM

148 RSIEVRVVDVTRDKVTVYKHKDRVVVVG- 175
  E +VD+ + T K + VV G
  EYEYEEKVDI---EATDQKSSSKPVVNG-
  
```

Рис.4. Частичная аминокислотная гомологичная последовательность белка Ms-ABC, соответствующая ABC-домену суперсемейства ABC-транспортёров

С использованием программного продукта SWISSMODEL были проведены исследования по компьютерному моделированию пространственной структуры домена белка Ms-ABC.

Определенный домен белка является сохраняющейся частью данной последовательности белка и (третичной) структуры. Как известно из литературы, молекулярная эволюция использует домены в качестве строительных блоков для создания белков с различными функциями.

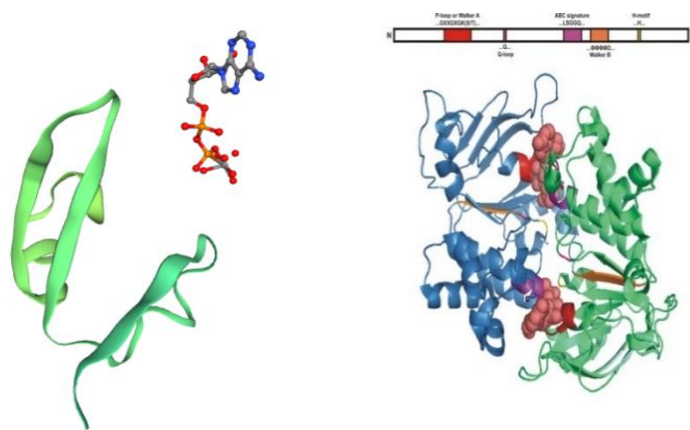


Рис.5. Трехмерная модель Ms-ABC, соответствующая ABC-омени суперсемейства ABC-транспортёров в сравнении с ABC-транспортёром

Для фракции **СМ-3 (3)** идентифицировано 7 фрагментарных пептидов. При сравнении в базе данных NCBI установлено, что первичная структура данного белка гомологична рецептор-подобной киназе (РПК) с S-мотивом во внеклеточном домене, обнаруженной в растениях семейств *Fabaceae* и *Brassicaceae*.

--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Malva sylvestris</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Camelina sativa</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Brassica oleracea var. Oleracea</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Raphanus sativus</i>
--RLSSSSGQGKEEFMNEIVLISKL	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Рис.6. Частичная аминокислотная гомологичная последовательность рецептор-подобной киназы

Доказано, что РПК с S-мотивами, которые находятся в высоких концентрациях в клетках, участвуют в защитных реакциях клеток против патогенов и растительноядных насекомых, а также оказывают влияние на симбиоз с микроорганизмами.

Для фракции **СМ-4** идентифицировано 14 фрагментарных пептидов. Изучения в базе данных NCBI показали, что первичная структура данного белка гомологична глутатион-S-трансферазе, обнаруженной в растениях семейств *Brassicaceae*.

SKLFEPADKIWQTKGRLTSEQKNDLKRKNYEQKLQEKVKELSETLRSKSEAYDIQELA	<i>Malva sylvestris</i>
TKLFEPADKIWQTKG-----EEQETAKKEYIEALKILETELGDKPYFGGDTFGFVDIA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TKLFEPADKLIWQTKG-----EEQETAKKDYIEALKILESELGDKPYFGGDTFGFVDIA	<i>Camelina sativa</i>

Рис.7. Частичная аминокислотная гомологичная последовательность глутатион-S-трансферазы

Глутатион-S-трансфераза выполняет антиоксидантные функции, обезвреживая гидрофобные продукты ПОЛ путем их восстановления, присоединения молекулы восстановленного глутатиона или нуклеофильного замещения гидрофобных групп.

С использованием программного продукта SWISSMODEL были проведены исследования по компьютерному моделированию пространственной структуры глутатион-S-трансферазы *Malva Sylvestris*.

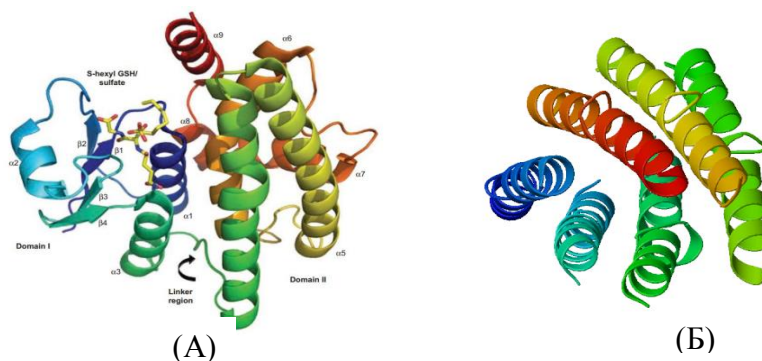


Рис.8. Трехмерная структура: (А) растительных глутатион-S-трансфераз; (Б) глутатион-S-трансферазы *Malva Sylvestris*

Структура данного протеина представлена белковой структурой со спиральной спиралью (СС), в которой α -спирали оборачиваются вокруг друг друга, образуя веревочные узлы и является подобной структуре растительных глутатион-S-трансфераз.

Для проведения сравнительных структурных исследований компонентов, содержащихся во фракциях зеленой части *Malva Sylvestris*, фракции разделяли методом ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила.

Методом MALDI TOF масс-спектрометрии определены молекулярные массы полученных индивидуальных пептидов. Для характеристики индивидуальных пептидов проведено определение числа остатков цистеина в молекуле (таблица 1).

Таблица 1

Молекулярные массы индивидуальных компонентов зеленой части *Malva Sylvestris*

№ фракции	1-4	1-6	1-8	1-11	2-2	3-1	3-4	3-6
Молекулярная масса, Да	5856	4297 4568 5116	4210 5529	9691	3645	5856	4984	3888
Количество цистеинов	8	8	8	8	6	8	8	6

По данным масс-спектрометрического анализа в зеленой части просвирника *Malva Sylvestris* содержится пептид с молекулярной массой 9691 Да, содержащий в своем составе 8 цистеиновых остатков, относящийся к классу липидпереносящих белков и ряд пептидов с молекулярной массой в диапазоне 3645-6000 Да, содержащих 6, 8 цистеиновых остатков, предположительно относящихся к тионинам и дефензинам (таблица 1). Сравнительный структурный анализ молекулярных масс соединений, полученных после разделения экстрактов семян и зеленой части, показал существенное отличие в них по содержанию белково-пептидных компонентов.

Фракции СМ-1-СМ-4, полученные после разделения методом ионообменной хроматографии, были проанализированы на фитопатогенную активности и на чувствительность к микроорганизмам корневой гнили (гоммоз) (Исследования выполнены в НИИ Защиты растений).

Таблица 2

Биологическая активность фракции из семян и зелёной части *Malva Sylvestris*

№	Фракции	IC ₅₀ мкг/мл* <i>Fusarium oxysporum</i>	IC ₅₀ мкг/мл <i>Verticillium dahliae</i>	IC ₅₀ мкг/мл <i>Xanthomonas malvacearum</i>
Зеленая часть	СМ-1	0	60,9±0,2	156,3±0,30
	СМ-2	29,1±0,02	23,6±0,15	112,0±0,23
	СМ-3	31,9±0,04	54,3±0,12	98,0±0,02
Семена	СМ-1	21,2±0,1	23,9±0,02	30,0±0,06
	СМ-2	15,3±0,06	34,3±0,01	31,2±0,15
	СМ-3	14,6±0,01	16,6±0,07	28,0±0,04
	СМ-4	24,4±0,02	54,1±0,23	135±0,5

* IC₅₀ – концентрация белка в мкг, при которой рост грибов подавляется на 50%.

Проведенные исследования показали, что фракции подавляли рост грибов *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum*, и обладали чувствительностью к гоммозу. Наиболее высокой активностью обладали фракции СМ-2 и СМ-3, выделенные из зеленой части и из семян, что напрямую коррелирует с полученными результатами по структуре белков

Инсектицидная активность белковых компонентов из семян определяли путем микроинъекций в стерильной апиrogenной воде под эпидермис гусениц *Agrotis segetum* (Den) с помощью шприца типа Hamilton до 1 мкл на одну гусеницу. Учет летальности наблюдали в течение 5 дней.

Проведенные исследования показали, что исследуемые фракции обладают высокой степенью токсичности для гусениц испытываемых насекомых, а наиболее высокой обладает фракция СМ-4, вызывая 89% гибели гусениц.

В результате проведенных исследований по изучению взаимосвязи структура-функция, определено, что соединения фракций СМ-3 и СМ-4 относятся к пептидным элиситорам, точнее к классу глутатион-S-трансферазы и рецептор-подобной киназы, действующим на семена и позволяющие им полнее реализовать свой генетический потенциал устойчивости, в результате чего растение справляется с инфекцией и вредителями с помощью собственных метаболитов, включая летучие вещества для привлечения их естественных врагов.

Были проведены исследования антимикробной активности против бактерий, патогенных для человеческого организма (исследования выполнены в Ташкентский Медицинской Академии МЗ РУз, на кафедре микробиологии).

В качестве контроля использовался антибиотик широкого спектра действия – грамицидин в концентрации 10 мкг/мл.

Таблица 3

Антимикробная активность фракций из семян *Malva Sylvestris* против бактерий, патогенных для человека

№	Группы микробов	Зона задержки роста в мм				
		Грамицидин	СМ-1	СМ-2	СМ-3	СМ-4
	Концентрация	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл	10мкг/мл
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	18,0±0,1	8,0±0,1	9,0±0,1	17±0,1	11,0±0,2
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	8,0±0,1	18,0±0,1	11,0±0,1
3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19,01±0,1	9,01±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	11,0±0,1
4	<i>Streptococcus Pyogenes</i>	21,0±0,2	11,0±0,2	9,0±0,1	16,0±0,2	11,0±0,3
5	<i>Enterococcus faecales</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	16,0±0,2	11,0±0,4
6	<i>Escherichia Coli ЛП</i>	17,0±0,1	0	11,0±0,2	13±0,2	11,0±0,1
7	<i>Escherichia Coli ЛН</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	7,0±0,01	0	13±0,2
8	<i>Proteus vulgaris</i>	16,0±0,1	9,0±0,1	0	0	12±0,1
9	<i>Klebsiella</i>	18,0±0,2	11,0±0,2	9,0±0,1	11±0,1	13±0,2
10	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	19,0±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	11±0,1	9,0±0,1

При изучении антимикробного действия семян по отношению к патогенам отмечено, что по отношению к штамму *S. aureus* и *S. epidermidis* у фракции СМ-3, полученной из семян, наблюдается наиболее выраженное антибактериальное действие в сравнении с грамицидином (диаметр зон задержки роста составляет 18 мм). Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследования данной фракции перспективны в направлении создания и изучения препаратов медицинского и косметического назначения, обладающих антибактериальным действием.

В третьей главе диссертации «**Получение хитозана и его биологическая активность**» представлены исследования по получению хитозана из цист *Artemia*, его физико-химические характеристики и биологическая активность.

Из измельченных цист *Artemia* был получен хитин с последующим деацетилизацией в хитозан. Для полученного хитозана в сравнении с

эталонным образцом (хитозан Sigma-Aldrich) проведено исследование методом ИК- и ^{13}C ЯМР спектроскопии (рис.9).

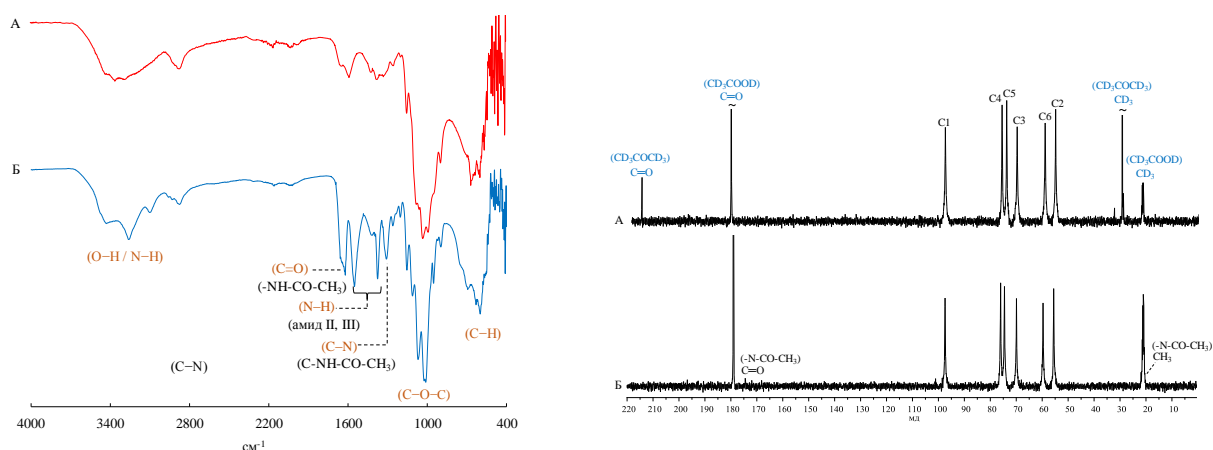


Рис.9. ИК- и ^{13}C ЯМР спектры (А) хитозана, полученного из цист *Artemia*, контрольного хитозана (Б) (Sigma-Aldrich)

На основании табличных характеристических частот поглощения по полученным ИК и ЯМР-спектрам определялись группировки атомов в молекуле, и тем самым устанавливалось строение молекулы.

В спектрах образцов хитозана специфические полосы для симметричных и ассиметричных растяжений связей $\text{O}-\text{H}/\text{N}-\text{H}$ были обнаружены при $3200-3600\text{ см}^{-1}$. Характерные сигналы для симметричных растяжений связей $\text{H}-\text{C}-\text{N}$ наблюдались при $2850-2950\text{ см}^{-1}$. Сигналы, относящиеся к связям $\text{C}=\text{O}$ (амид I, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$) и $\text{N}-\text{H}$ (амид II и III), появились при $1300-1620\text{ см}^{-1}$. Кроме того, сигналы для симметричного растяжения $\text{C}-\text{N}$ ($\text{C}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$), скелетных и β -гликозидных колебаний $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и ассиметричного растяжения связей $\text{H}-\text{C}-\text{N}$ наблюдались при $560-1060\text{ см}^{-1}$.

В ^{13}C ЯМР-спектрах образцов хитозана ЯМР-сигналы для атомов $\text{C}2$, $\text{C}6$, $\text{C}3$, $\text{C}5$, $\text{C}4$ и $\text{C}1$ макромолекулы обнаружены при 56,58, 60,61, 71,40, 75,45, 77,22 и 99, 10 м.д. соответственно. В спектрах контрольного хитозана наблюдался характерный сигнал для CH_3 и $\text{C}=\text{O}$ *N*-ацетильной группы ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$) при 20,83 и 174,46 м.д., соответственно. Однако эти сигналы не были видны в спектрах хитозана цист *Artemia*, что свидетельствует о высокой степени деацетилирования образца. В спектрах сигналы, появившиеся в 21,02 (CD_3 , CD_3COOD), 30,89 (CD_3 , CD_3COCD_3), 179,01 ($\text{C}=\text{O}$, CD_3COOD) и 216,18 м.д. ($\text{C}=\text{O}$, CD_3COCD_3) являются специфическими для контрольных растворителей - дейтерированного ацетона и уксусной кислоты.

Для дальнейшего изучения проведено определение физико-химических свойств полученного хитозана в сравнении с эталонным хитозаном (таблица 4).

Определено, что хитозан цист имеет физико-химические свойства, характерные для хитозана крабообразных, при этом образует в 2% растворе уксусной кислоты вязкие растворы (5,9 и 12,0 Дл/г соответственно), обладает выраженными сорбционными свойствами по отношению к метиленовому синему ($31,5 \pm 0,44\text{ м}^2/\text{г}$).

Физико-химические свойства хитозана

Физико-химические характеристики	Допустимый интервал	Хитозан цист <i>Artemia</i>	Хитозан краба
Степень деацетилирования, %	≥75	82,0 ± 0,05	70,0 ± 0,20
Вязкость растворов в 2 % уксусной кислоте, Дл/г	4-30	5,9	12,0
Удельная поверхность, м ² /г	1-200	31,5 ± 0,44	7,88 ± 0,23
Минеральный остаток (зольность), %	≤0,5	0,27 ± 0,058	0,36 ± 0,063
Остаточный белок, %	≤0,1	0,08 ± 0,018	0,49 ± 0,038
Средняя молекулярная масса	1,0·10 ⁵ -1,4·10 ⁶	1,62·10 ⁵	1,29·10 ⁶
pH	6,8-7,3	7,2 ± 0,12	7,3 ± 0,25

Данные результаты позволяют рассматривать хитозан цист *Artemia* Аральского моря как перспективное вспомогательное вещество для получения лекарственных форм в виде гелей и матрицы-носителя в иммобилизованных лекарственных формах.

С целью подтверждения сорбционной способности хитозана, полученного из цист *Artemia* Аральского моря в сравнении с пищевыми волокнами, такими как яблочный пектин, представленный в виде Пектолакта и альгинат натрия, был применен метод, включающий этапы создания условий, имитирующих переваривание пищи в желудке и в кишечнике *in vitro*. (исследования выполнены в ЕНУ им. Л.Н.Гумилева)

Таблица 5

Сравнительное изучение сорбирующей способности природных сорбентов

Показатель	N	Триглицериды (г/г)		Жирные кислоты (г/г)	
		M±s	Пределы	M±s	Пределы
Пектолакт (симбиотик на основе пектина)	5	4,61±0,09	4,49-4,69	3,22±0,04	3,17-3,27
Альгинат кальция	5	4,16±0,05	4,10-4,21	3,17±0,03	3,13-3,21
Хитозан цист <i>Artemia</i>	5	4,43±0,59	3,35-4,75	3,21±0,06	3,15-3,29

Показано, что полученная сорбционная емкость хитозана превосходит емкость альгината, и почти не уступает Пектолату. Хитозан в проведенных экспериментах показал себя «жиропоглотителем», действие которого направлено на сорбцию жирных кислот и триглицеридов в условиях кишечника. Сорбируя описанные компоненты липидов, исследуемые пищевые волокна связывают и уменьшают их всасывание. Следовательно, хитозан наравне с Пектолатом снижает уровень ОХС и ЛПОНП в крови, а значит: препятствует развитию дислипидемии, гиперлипидемии и атеросклероза.

Изучение острой токсичности хитозана показало, что этот препарат относится к V классу практически нетоксичных соединений, LD₅₀ при внутрижелудочном введении на мышах составила более ≥10000 мг/кг.

Предполагая использование хитозана в качестве препарата, препятствующего развитию атеросклероза, проведены исследования по изучению гипогликемической и антигипоксической активности, которые

сопровождает течение данного заболевания. Изучение биологической гипогликемической активности хитозана проводили на модели алиментарной гипергликемии в сравнении с препаратом «Природный инулиновый концентрат» (БАД).

Изучение гипогликемического действия хитозана в дозах 10 и 20 мг/кг на моделях алиментарной гипергликемии показало, что препарат обладает сахароснижающим действием. Наибольшую эффективность хитозан проявлял в дозе 10 мг/кг, где гипергликемический эффект через 2 часа составил 58,5%. Действие хитозана в обеих дозах превосходило действие растительного БАДа «Природный инулиновый концентрат», в котором гипергликемический эффект через 2 часа составил 37,3%.

Антигипоксическое действие хитозана изучено на модели гемической гипоксии. Гемическую гипоксию вызывали подкожным введением нитритом натрия NaNO_2 в дозе 400 мг/кг массы тела, от которой погибали 100% животных. Продолжительность жизни экспериментальных животных при дозах 50 и 100 мг/кг хитозана составляла $9,5 \pm 1,0$ и $11,0 \pm 1,2$ мин, а антигипоксический эффект составлял 12,6 и 24,5%, соответственно.

Выявлена тенденция к увеличению продолжительности жизни экспериментальных животных на фоне хитозана в дозах 50 и 100 мг/кг, в сравнении с контрольной группой. При введении мышам препарата сравнения Витамин B_{12} в дозе 0,09 мг/кг продолжительность жизни увеличилась до $13,0 \pm 1,5$ мин., а антигипоксический эффект соответственно составил 36,2%. (исследования выполнены в институте Биоорганической химии, в лаборатории Фармакологии м.н.с. Г. Рахроновой)

Состояния, сопровождающиеся повышенной концентрацией липидов и холестерина крови, рассматриваются в качестве факторов риска развития атеросклероза. Одним из эффективных методов, рекомендуемых диетологами для снижения уровня холестерина крови, считается обогащение рациона пищевыми волокнами, к которым относятся и некрахмальные полисахариды.

Таблица 6

Показатели липидного спектра крови

Модель гиперлипидемии						
N	Группа	Показатели липидного профиля				
		ОХС (мг/дл) M±s	ТГ (мг/дл) M±s	ЛПВП (мг/дл) M±s	ЛПНП (мг/дл) M±s	КА M±s
5	Интактная(1)	74,1 ± 0,3*	49,0±0,6*	43,3±0,5*	28,4±0,4	0,71±0,02*
5	Контроль (2)	98,4±0,5	57,1±0,4	36,4±0,5	49,3±0,5	1,70±0,03
5	Аторвастатин (3)	82,4±0,6*	44,2±1,4*	39,4±0,4*	43,7±0,5	1,09±0,02*
6	Фенофибрат(4)	83,4±0,4*	47,7±0,2*	41,4±0,3*	42,3±0,3	1,01±0,02*
6	Хитозан цист <i>Artemia</i>	79,1±0,4 - 19,6%	48,8±0,4 - 14,5%	39,3±0,5 + 8,0%	42,3±0,5 - 14,2%	1,01±0,03 -40,6%

В проведенных исследованиях изучали способность полученного хитозана снижать уровень липидов в печени и крови в условиях экспериментальной гиперлипидемии (таблица 6). При изучении

гиполипидемических свойств хитозана цист на парентеральной (твиновой) модели у животных, у данных веществ был выявлен липид-корректирующий эффект. Сила липид-корректирующего эффекта веществ расценивалась относительно потенциала снижения атерогенных показателей липидного спектра крови (ОХС, ТГ, ЛПНП) и повышения антиатерогенных показателей (ЛПВП).

В качестве препаратов сравнения взяты Аторвастатин и Фенофибрат.

Из представленных в таблице 6 результатов следует, что коэффициент атерогенности группы контроля ($КА=1,7\pm 0,03$) значительно вырос по отношению к здоровым особям (интактная группа) ($КА=0,71\pm 0,02$), при уровне значимости $p<0,001$.

Согласно таблице, применение хитозана снижает концентрацию атерогенных показателей липидного профиля плазмы крови. Применение хитозана при твиновой модели гиперлипидемии у крыс, приводило к снижению концентрации ОХС на 19,6%, ТГ на 14,5%, и ХС ЛПНП на 14,2%, при уровне значимости по отношению к контролю ($p<0,001$). Лучше всего ОХС при твиновой модели ГЛП снижал хитозан на 19,6% при уровне значимости $p<0,01$ по отношению к препаратам сравнения аторвастатину и фенофибрату.

На экспериментальной модели эндотелиальной дисфункции на основе изучения влияния гиперлипидемии изучена морфологическая структура сосудов крыс при применении хитозана (исследования выполнены в ЕНУ им. Л.Н.Гумилева).

Данная методика позволяет получить стойкие структурные нарушения сосудистой стенки, по сравнению с изолированной экспериментальной гиперлипидемией. В ходе эксперимента проведена оценка состояния просвета сосудов у экспериментальных животных методом компьютерной магниторезонансной томографии (МРТ).

На рисунке 10 показано определение неравномерного контрастирования артерий, что предполагает локальные атерогенные изменения стенки артерий, изображена инфильтрация сосуда жировыми включениями в модели гиперлипидемии (II группа) и в комплексной модели гиперлипидемии после применения хитозана (I группа).



Рис.10. Компьютерная магниторезонансная томография сосудов крыс

На основе проведенных исследований установлено, что полученный хитозан может быть рекомендован как препарат-энтеросорбент для профилактики и оздоровления в медицинской практике.

В четвертой главе под названием «**Материалы и методы исследования природных соединений белковой и полисахаридной природы, биологической активности и фармакотоксикологии**» описаны реактивы и оборудование, методики выделения, методы изучения структурных и биологических свойств и фармакотоксикологии, использованные в диссертации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из семян *Malva Sylvestris* выделены белки-транспортеры, гомологичные аспартокиназам и ABC-транспортерам растений семейства *Poaceae* и *Fabaceae*, обладающие высокой антимикробной активностью. Гомологичная последовательность аспартокиназы *Malva Sylvestris* представляет домен, содержащую консервативный гидрофобный участок, ответственный за активность аспартокиназы. Для белка Ms-ABC определена гомология ABC-домена по базам данных NCBI и SWISSMODEL.

2. Впервые выделены белки, гомологичные рецептор-подобной киназе с S-мотивом и глутатион-S-трансферазе, обладающие фитопатогенной и инсектицидной активностями и участвующие в окислительно-восстановительных реакциях.

3. Проведено выделение хитозана деацетилированием хитина из цист *Artemia* Аральского моря, для которого определены молекулярные параметры и структур. Проведенные исследования показали схожесть по структуре и основным параметрам с коммерческим образцом хитозана. Доказано, что цисты могут быть источником сырья для производства хитозана.

4. В результате изучения биологической активности хитозана в условиях *in vitro* и *in vivo* показано, что хитозан обладает сорбционными, гипогликемическими, антигипоксическими и гиполипидемическими свойствами. На гиперлипидемической модели эндотелиальной дисфункции определено снижение атеросклеротических нарушений сосудов у экспериментальных животных после применения хитозана.

5. На основе хитозана, полученного из цист *Artemia*, получен экспериментальный образец энтеросорбента «Грацит» для профилактики и комплексного лечения нарушений холестеринового обмена. Проведено изучение возможности применения хитозана *Artemia* в виде гелей в медицине и косметологии.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.02/30.12.2019.K/B.37.01 AT THE INSTITUTE OF BIOORGANIC
CHEMISTRY**

INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

ORIPOVA MUNOJAT JALOLDINOVNA

**ISOLATION, BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL
PEPTIDES FROM *MALVA SYLVESTRIS* SEEDS, CHITOSAN FROM
ARTEMIA CYST AND CREATION OF COSMETIC COMPOSITION
BASED ON THEM**

02.00.10 –Bioorganic chemistry

**DISSERTATION ABSTRACT
FOR THE DOCTOR OF PHILOSOPHY ON CHEMICAL SCIENCES (PhD)**

Tashkent – 2020

The title of the dissertation of 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 B2019.3.PhD/K245

The dissertation has been prepared at the Institute of Bioorganic chemistry

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

Scientific supervisor:

Oshepkova Yulia Igorevna
doctor of chemical sciences

Official opponents:

Ramazanov Nurmurod Sheraliyevich
doctor of sciences in chemistry, professor

Gafurov Makhmudjan Bakiyevich
doctor of sciences in chemistry

Leading organization:

**Uzbek Scientific Research Chemical-
Pharmaceutical Institute**

Defense will take place on _____ 2020 year ____ at the meeting of the Scientific council DSc.02/30.12.2019.K/B.37/01 of the Institute of Bioorganic Chemistry. Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262-35-40, Fax: (99871) 262-70-63).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of Bioorganic Chemistry (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63), e-mail:shsha2@mail.ru).

Abstract of the dissertation is distributed on «__» _____ 2020.
(protocol at the register No _____ dated ____ 2020).

Sh.I.Salikhov

Chairman of scientific council on award of
scientific degrees, D.B.Sc., academician

Sh.A.Shomurotov

Acting Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, D.Ch.Sc.

M.B.Gafurov

Chairman of scientific seminar under scientific council
on award of scientific degrees, D.Ch.Sc.

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the study is the isolation of protein-peptide components from the seeds and green part of the *Malva Sylvestris* mallow, chitosan from *Artemia* cysts, studying their physicochemical characteristics and biological activity, the establishing prospects for use in medicine.

The objects of the research work include the seeds of the mallow *Malva Sylvestris* of the family *Malvaceae* growing in Uzbekistan and cysts of the crustacean of the genus *Artemia* living in the Aral Sea.

Scientific novelty of the research work:

proteins with high antimicrobial activity, which are homologous to aspartokinase and ABC-transporter proteins were for the first time isolated from *Malva Sylvestris* seeds;

homologous sequence of *Malva Sylvestris* aspartokinase was found to be a domain responsible for aspartokinase activity, occupying a conservative hydrophobic side;

receptor-like kinase with S-motive and glutathione-S-transferase proteins involving in oxidation-reduction reactions, having activity against phytopathogens and insects were isolated for the first time;

chitosan was obtained from the Aral Sea *Artemia* cyst, its molecular parameters and structure were determined, proving that *Artemia* cyst could be a source of raw material for obtaining chitosan;

it was found that chitosan possess *in vitro* and *in vivo* lipid-absorbing, hypoglycemic, antihypoxic and lipid-lowering properties and reduces atherosclerotic vascular disorders.

Implementation of the results. Based on the results obtained in the study of protein-peptide components from the seeds of *Malva Sylvestris* and chitosan from the *Artemia* cysts of the Aral Sea:

protein-peptide components isolated from seeds of a plant of the genus *Malvaceae* were used in a comparative study of biological activity on *Phytophthora* phytophthora pathogens (reference FSBEI HE RGAU-MAA named after K.A. Timiryazev 90-28/59 dated 16.05.2020). Scientific results made it possible to develop and optimize test systems and protocols for sample preparation and PCR (conventional and “real-time”) to identify late blight pathogens;

chitosan isolated from *Artemia* cysts of the Aral Sea was used as part of a scientific field dedicated to the study of chitosan from *Artemia* cysts living on the territory of the salt lakes of Kazakhstan at the L.N. Gumilyov Eurasian National University (reference of the Eurasian National University named after L.N.Gumilyov of the Ministry Education and Science of the Republic of Kazakhstan 03-01-24/6926 from 06. 03.2020). The research results made it possible to conduct a comparative characterization of the species of brine shrimp living in the salt lakes of the Central Asian region, Kazakhstan and Siberia.

The structure and volume of the thesis. The content of the dissertation consists of introduction, four chapters, conclusions, list of references and appendices. The volume of the dissertation is 108 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И., Султанова Э.М., Узбеков В.В., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Инсекто- и фунгиотоксичные пептиды из *Malva Sylvestris* // Узбекский химический журнал. –2011. –№6. –С.3-5. (02.00.00. №6).
2. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Султанова Э.М., Орипова М.Ж., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И. Катионные пептиды и белки из семян растений семейства *Malvaceae* // Химия природных соединений. –2012. –№2. –С.257-259. (02.00.00. №1).
3. Орипова М.Ж., Султанова Э.М., Вешкурова О.Н., Мухамедов И.М., Салихов Ш.И. Антимикробная активность пептидов просвирника *Malva Sylvestris* // Вестник Национального Университета Узбекистан. –2014. –№3. – С.14-16. (02.00.00. №12).
4. Халмуратов М.К., Орипова М.Ж., Султанова Э.М., Выпова Н.Л., Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Биологическая активность цист *Artemia Salina* // Инфекция, иммунитет и фармакология. –2017. –№2. – С.299-305. (03.00.00. №7).
5. Султанова Э.М., Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И. Гелеобразная композиция на основе хитозана и мегосина //Химико-фармацевтический журнал. –2020. –Т.54. –№5. –С.43-46. (IF Web of Science 0,510).

II бўлим (II часть; Part II)

1. Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И., Султанова Э.М., Вешкурова О.Н. Выделение пептидов из семян растений семейства *Malvaceae* // Конференция молодых ученых, посвященной памяти академика С.Ю.Юнусова., 17 марта, 2011. г. Ташкент. С.42.
2. Oripova M.J., Sultanova E.M., Veshkurova O.N., Khodjayev Sh.T., Salikhov Sh.I. Insecticide properties of fractions isolated from seeds of *Malva Sylvestris* // 9th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. 16-19 October. 2011. Urumqi, Xinjiang China. P. 257.
3. Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И., Султанова Э.М., Зиявитдинов Ж.Ф., Вешкурова О.Н. Антимикробная активность пептидов из *Malva Sylvestris* // Международная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» 15-16 ноября. 2013 г. Ташкент. С. 11.
4. Munajat J. Oripova, Elvira M. Sultanova, Olga N. Veshkurova, Shavkat I. Salikhov Chitinases in *Malvaceae* plants family // «Ёш олимлар конференцияси – 2015» 22 декабря. 2015г. Ташкент. С. 200.
5. Sultanova E.M., Oripova M.J., Oshchepkova Yu.I., Salikhov Sh.I. Preparation of chitosan hydrogels for the treatment of genital herpes // XIII

International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (ISCNC 2019) October 16-19. 2019. Shanghai.P.212.

6. Oripova M.J., Oshchepkova Yu.I., Salikhov Sh.I. Comparative study of lipid-binding properties of chitosan, alginate, and pectin // Scientific Conference of PhD. Students of FAFR, FBFS and FHLE SUA in Nitra with international participation. November 7. 2019. Nitra, Slovak Republic.P.73.

7. Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И. Сравнительное изучение сорбирующей способности пищевых волокон. // Конференция Проблемы биофизики и биохимии -2020. 22 мая, 2020 г.Ташкент. С.119.

Автореферат «Ўзбекистон биология журнали» таҳририятида таҳрирдан ўтказилди ва унинг ўзбек, рус ва инглиз тили матнлари мос келади

Босишга рухсат этилди 12.06.2020 й. Бичими 60x84 1/16 Офсет қоғози. Ризограф усулда.
Times гарнитураси. Шартли босма табағи 2.75.
Адади 25 нусхада. Буюртма № 11/27.

“IMPRESS MEDIA” МЧЖ босмахонасида чоп этилди. Манзил: Тошкент ш., Қушбеги кўчаси, 6 уй.