

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

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

АМАНЛИКОВА ДИЛЬФУЗА АБДУГАНИЕВНА

**ҚОРА СЕДАНА *NIGELLA SATIVA* УРУҒИДАН ОЛИНГАН ЛИПИД
ТАШУВЧИ ОҚСИЛНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

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

Тошкент - 2023

**Биология фанлари бўйича Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси
автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии по (PhD)
биологическим наукам
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)
on biological sciences**

Аманликова Дилфуза Абдуганиевна Қора седана <i>Nigella sativa</i> уруғидан олинган липид ташувчи оксилнинг биологик фаоллиги.....	3
Аманликова Дильфуза Абдуганиевна Биологическая активность липид-переносящего белка из семян чернушки посевной <i>Nigella sativa</i>	22
Amanlikova Dilfuza Abduganiyevna Biological activity of lipid-transporting protein from seeds of <i>Nigella sativa</i>	41
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works.....	44

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

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

АМАНЛИКОВА ДИЛЬФУЗА АБДУГАНИЕВНА

**ҚОРА СЕДАНА *NIGELLA SATIVA* УРУҒИДАН ОЛИНГАН ЛИПИД
ТАШУВЧИ ОҚСИЛНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ**

02.00.10 – Биоорганик кимё

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

Тошкент - 2023

Биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2022.1.PhD/B677 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.ziyo.net) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:	Ощепкова Юлия Игоревна кимё фанлари доктори, катта илмий ходим
Расмий оппонентлар:	Рамазанов Нурмурод Шералиевич кимё фанлари доктори, профессор Ибрагимов Фазил Ахмедович биология фанлари доктори, катта илмий ходим
Етакчи ташкилот:	Ўзбекистон кимё-фарматевтика илмий-тадқиқот институти

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.K/B.37/01 рақамли Илмий кенгашнинг 2023 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: nigora65@list.ru)

Диссертация автореферати 2023 йил «___» _____ да тарқатилди.
(2023 йил _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси)

Ш.И.Салихов

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

Н.Р.Хашимова

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.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 захарлилиги кам бўлган самарали дори воситалари яратиш учун истиқболли доривор ўсимликларни излаб топиш, энг долзарб вазифалардан бири бўлиб қолмоқда. Ўсимлик препаратларини қўллашнинг афзалликлари, уларнинг кенг қамровли фармакологик хусусиятлари, юмшоқлиги ва узоқ муддат давомида фойдаланилганда ножўя таъсирларнинг йўқлиги билан боғлиқ бўлиб, уларнинг кимёвий табиати инсон организмига яқин ва биокимёвий жараёнларга осонгина киришади. Шунинг учун ўсимликлардан олинган самарали янги дори препаратларини излашга алоҳида эътибор берилмоқда.

Бугунги кунда, дунёда носпецифик ярали колитни тарқалиш тенденциясини ортиши, Марказий Осиё минтақасида ушбу касалликнинг “эпидемия”си тарқалиш башорат қилиниши эътиборга олинган холда ичак яллиғланиш касаллигини даволашда фибробластлар функциясини бошқариш хусусиятига эга бўлган пептидли препаратлар ишлаб чиқиш бўйича тадқиқотлар олиб борилмоқда. Бу борада иммун тизимни мустахкамловчи ва яллиғланишга қарши таъсирга эга терапевтик пептидларни ишлаб чиқиш ярали колитларни даволашга йўналтирилган дори воситаларини яратишга алоҳида эътибор берилмоқда.

Мамлакатимизда маҳаллий хом ашё асосида импорт ўрнини босувчи самарали янги дори препаратлари ишлаб чиқиш ва аҳолини юқори сифатли дори-дармонлар билан таъминлашга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Ўзбекистон Республикаси ривожланиш Стратегиясининг^{1 1} 4-йўналишида “Фармацевтика саноатини янада ривожлантириш бўйича чора-тадбирларни амалга ошириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори-дармон ва тиббий маҳсулотлар билан таъминлашни яхшилаш, дори-дармонларга нарх-навонинг асоссиз ошиб кетишининг олдини олиш” вазифалари баён қилинган. Шу муносабат билан ўсимлик хом ашёсидан таъсири синтетик препаратлардан кам бўлмаган, бироқ бир вақтнинг ўзида кам захарли, юмшоқ терапевтик таъсир этувчи, шунингдек патологик жараённинг турли бўғинларига комплекс таъсир кўрсатиш хусусиятига эга бўлган энг самарали маҳаллий препаратларни излаш ва яратиш муҳим аҳамиятга эгадир.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил февралдаги ПФ-4947-сонли “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги, 2017 йил ноябрдаги ПФ-5229-сонли “Фармацевтика саноатини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида”ги, 2018 йил 14 февралдаги ПҚ-3532-сонли “Фармацевтика саноатини жадал ривожлантириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида” ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларнинг ижросини таъминлашда ушбу диссертация тадқиқоти маълум даражада хизмат қилади.

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисидаги» Фармони

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. Хориж олимлари Westerman J., Kleinnijenhuis A., Bevers L.E. томонидан тўқима зарарланганда эпидермиал ўсиш омили (ЭЎО) мавжуд бўлганда эпителий хужайралари ўсиш жараёнида иштирок этувчи фосфатидил-инозитол ташувчи оксил (PI3P) ва гепатоцеллюляр селекцияда ва билиар фосфолипидлар ташилишида, ўпка сурфактантлари ишлаб чиқаришда, лейкотриенлар биосинтезида ва фосфатидилхолин хужайра метаболизмида қатнашувчи эндоген келиб чиқишга эга бўлган фосфатидилхолин ташувчи оксил PC-TP ўрганилган. МДХ мамлакатларида олимлар Р. И. Атауллаханов ва М. М. Чулкина томонидан тетрадекапептиднинг экспериментал ярали колит моделида ва *in vitro* шароитида хужайра културасида иммуномодуловчи ва регенерация таъсири бўйича тадқиқотлар ўтказилган.

Мамлакатимизда биоорганик кимё институти ва Ўсимлик моддалари кимёси институти олимлари (Салихов Ш. И., Азимова Ш. С., Ощепкова Ю. И. ва бошқалар) ушбу соҳанинг ривожланишига катта ҳисса қўшганлар. Улар томонидан *Ranunculaceae* оилаларига мансуб ўсимликлардан тўқималарни қайта тикловчи ва яраларни битирувчи фаолиққа эга булган янги оксиллар ва пептидлар ажратиб олинган ва улар асосида тери юзаси учун суртма кўринишидаги фармацевтик композициялар яратилган.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим ёки илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг “Табиий иммунотроп ва ўсмага қарши бирикмаларнинг идентификацияси ва структур-функционал тадқиқоти” йўналиши доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади *Nigella sativa* уруғидан липид ташувчи оксил олиш усулини такомиллаштириш ва уларни ярали колитни даволашда тўқималарнинг қайта тикланиши ва битиришда қўллаш имкониятларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Nigella sativa уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оксил олиш усулини такомиллаштириш;

Nigella sativa уруғларидан Ns-LTP1 липид ташувчи оксилдан тўқималарни тиклаш ва битишида фойдаланиш имкониятларини баҳолаш;

Nigella sativa уруғидан олинган Ns-LTP1 асосида композиция ишлаб чиқиш ва унинг ярали колитни даволашда қўллаш имкониятларини баҳолаш;

Nigella sativa уруғидан олинган Ns-LTP1 асосидаги композицияни клиник олди тадқиқотларини олиб бориш.

Тадқиқотнинг объекти Ўзбекистонда ўсадиган *Ranunculaceae* оиласининг *Nigella sativa* ўсимлиги уруғларидан иборат.

Тадқиқотнинг предмети *Nigella sativa* уруғидан олинган пептид табиатли Ns-LTP1 биологик фаол модданинг ўзига хос фаоллиги ва ярали колитни даволашда фойдаланиш истикболларини ўрганишдан иборат.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотларни амалга оширишда моддаларни экстракция қилиш, ажратиш ва идентификация қилиш усуллари ҳамда экспериментал ҳайвонларда биологик фаолликни аниқлаш бўйича тажриба моделлари, гистология ва иммунология усулларида фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

Nigella sativa уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оксил олишнинг такомиллаштирилган усули ишлаб чиқилган;

илк бор *Nigella sativa* уруғидан ажратиб олинган Ns-LTP1 липид ташувчи оксилнинг яллиғланиш ва репарация жараёнларига таъсир этиши аниқланган;

перорал ва ректал дори воситаси сифатида қўллаш имконияти бўлган лиофилизат шаклидаги композицияси ишлаб чиқилган;

Nigella sativa уруғидан олинган Ns-LTP1 ва унинг асосида яратилган композициянинг “ўткир экспериментал колит” моделида каламушларда ҳосил бўлган йўғон ичак яраси юзаси ва шиллик қаватидаги шикастланиш даражасининг камайиши кўринишида яққол намоён бўлган яллиғланишга ва ярага қарши, шу билан бирга тана ҳароратини пасайтирувчи таъсири борлиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Nigella sativa уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оксид олишнинг такомиллаштирилган усули ишлаб чиқилган;

Nigella sativa уруғидан олинган липид ташувчи Ns-LTP1 оксилнинг таъсири ўткир эксудатив ва сурункали пролифератив яллиғланиш моделларида ўрганилди ва ушбу оксил яллиғланиш ҳамда репаратив жараёнларга таъсир қилиши, тўқималарни қайта тикланишида битишида иштирок этиши аниқланган;

Липид ташувчи Ns-LTP1 оксид асосида йўғон ичакнинг ярали шикастланиш моделида яллиғланишга ва ярага қарши таъсир кўрсатадиган лиофилизат ва ректал шамчалар ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги замонавий биология ва биоорганик кимё усуллари қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади, тадқиқотда қўлланилган назарий ёндашув ва усуллар, олиб борилган текширувларнинг услубий жиҳатдан тўғрилиги, текширилган тажриба ҳайвонлари ва тажриба материаллари сонининг етарлиги, натижалар замонавий статистик усуллар ёрдамида таҳлил қилинганлиги, тадқиқот натижаларининг республика ва халқаро илмий анжуманларда муҳокама қилинганлиги, шунингдек, нуфузли илмий журналларда нашр этилганлиги билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Nigella sativa* уруғидан Ns-LTP1 липид ташувчи оксид олиш усули такомиллаштирилди; биринчи марта ажратилган Ns-LTP1 липид ташувчи оксил яллиғланишга ва репаратив жараёнларда, ҳамда тўқималарни қайта тикланиши ва битишида иштирок

этиши ўрганилди; Ns-LTP1 липид ташувчи оксид кимёвий бирикмаларнинг V – синфига тегишли эканлиги, кумулятив таъсирга эга эмаслиги ва узок вақт давомида қўлланилганда организмга захарли таъсир кўрсатмаслигини аниқлаш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, липид ташувчи Ns-LTP1 оксид асосида, каламушларда ярали колит моделида фаол бошланиш сифатида липид ташувчи Ns-LTP1 оксид ва ректал шамчалардан иборат бўлган яллиғланишга ва ярага қарши таъсирга эга бўлган ҳамда тиббий амалиётда қўллаш учун тавсия этилиши мумкин бўлган лиофилизат кўринишидаги композиция ишлаб чиқишга хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Қора седана *Nigella sativa* уруғларидан олинган пептид табиатли биологик фаол моддаларнинг ва улар асосидаги композициянинг ўзига хос фаоллигини аниқлаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Nigella sativa уруғларидан ажратиб олинган Ns-LTP1 оксид асосида трикарбоцианинли бўёқ комплекслари ишлаб чиқишда қўлланилган (А.Н.Севченко номидаги Беларус Давлат университети Амалий физика муаммолари илмий-тадқиқот институти 2021 йил 16 декабрдаги маълумотномаси 90-28/59). Натижада, трикарбоцианинли бўёқларнинг қўллаш кўламини кенгайтириш ва эрозив яллиғланиш радиотерапияси учун макромолекуляр тизимларни ишлаб чиқиш имконини берган;

Nigella sativa уруғидан олинган Ns-LTP1 асосида ишлаб чиқилган композициянинг биологик фаоллиги бўйича олинган натижалар ярали колит касалликлари билан оғриган беморлар патогенезини иммун механизмларни аниқлашда цитокинлар даржасини ўлчаш усули қўлланилган (Россия ФА Урал худудий бўлими Физиология ва иммунология институтининг 01.09.2022й. санадаги тадбиқ қилиш далолатномаси). Натижада, ярали колит касалликлари билан оғриган беморлар патогенезини иммун механизмларни аниқлаш ва тўқималарда локал медиаторлар ҳисобланган цитокинлар даржасини ўлчаш бўйича тадқиқотларнинг бошланишга асос бўлиш имконияти яратилган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 8 та ҳалқаро ва 1 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 18 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссияси томонидан диссертацияларнинг асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда 3 та мақола, жумладан 1 таси хорижий ва 2 таси Республика журналларида нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхати ҳамда иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 118 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурийлиги, уларнинг мақсад ва вазифалари асослаб берилган, тадқиқотнинг объекти ва предмети тавсифланган, тадқиқотнинг Ўзбекистон Республикасида фан ва технологияларни ривожлантириш йўналишига мувофиқлиги кўрсатилган. Тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилиниб, натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий этиш асослари баён этилган, нашр қилинган илмий ишлар ва диссертациянинг таркибий тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Ярали колитнинг патогенези, белгилари, даволаш имкониятлари ва биологик фаол моддалардан фойдаланиш истиқболлари**» деб номланган биринчи бобда ярали колитнинг эпидемиологияси ва патогенези муаммоларига бағишланган илмий тадқиқотлар, яллиғланишли ичак касалликларини даволашнинг замонавий стандартлари ва яллиғланишли ичак касалликларини даволаш учун пептид табиатининг биологик фаол моддалар асосида яратилган дори воситаларни қўллаш истиқболлари батафсил кўриб чиқилган.

“**Оқсил табиатли табиий бирикмаларнинг биологик фаоллиги ва токсикологиясини тадқиқ қилиш материаллари ва усуллари**” деб номланган иккинчи бобда эса тадқиқотида фойдаланилган реактивлар ва жиҳозлар, *Nigella sativa* уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оқсилни ажратиб олиш ва идентификациялаш усуллари, лиофилизат шаклидаги композиция яратиш, унинг биологик хоссалари ва токсикологиясини ўрганиш усуллари баён этилган.

“***Nigella sativa* уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оқсил олиш усулини такомиллаштириш ва уни тўқималарни қайта тиклаш ҳамда битишида қўллаш имкониятларини ўрганиш**” деб номланган диссертациянинг учинчи бобда эса липид ташувчи Ns-LTP1 оқсилни олишнинг такомиллаштирилган усулини ишлаб чиқиш ва унинг стеарин кислота мисолида липид молекулалари билан ўзаро таъсирини натижалари ёритилган. Ns-LTP1 нинг яллиғланиш ва терининг битиш жараёнларига таъсирини механик яралар ва термик куйиш моделларида ўрганиш натижалари ҳамда носпецифик ярали колит моделида битиш жараёнларига таъсири муҳокама қилинган.

Липид ташувчи оқсилни олиш учун *Nigella sativa* уруғлари олиниб, кукунсимон майдаланди ва липидлар ҳамда бошқа гидрофоб компонентларни йўқотиш учун учун Сокслет аппаратида гексан ёрдамида ёғсизлантирилди. Оқсил-пептид суммаси ва индивидуал кўринишдаги липид ташувчи оқсилни ажратиб олиш жараёнлари ишлаб чиқилган схема бўйича амалга оширилди (1-схема).

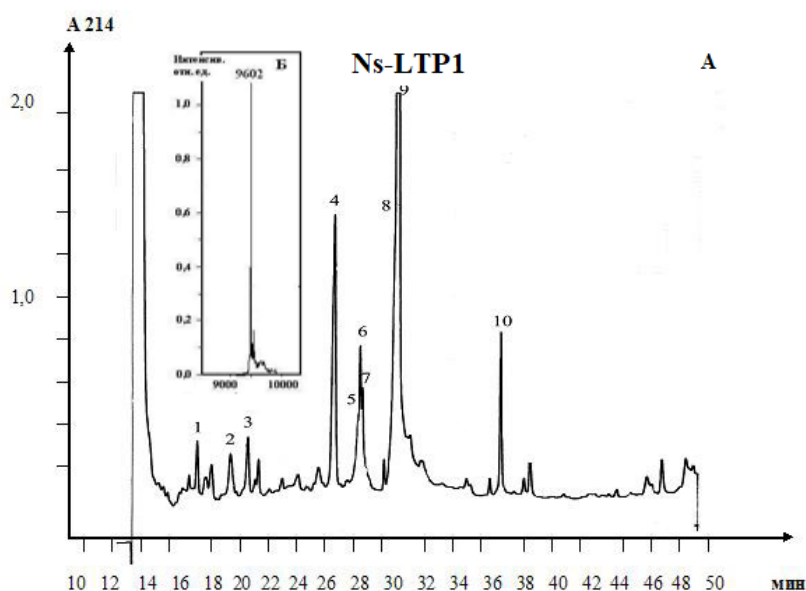
Nigella sativa уруғидан липид-ташувчи оқсил олишнинг такомиллаштирилган схемаси



Майдаланиб ёғсизлантирилган уруғлар 1:3 нисбатда 10% сирка кислотаси ёрдамида экстракция қилинди. Экстракциялаш хона ҳароратида, 1 соат давомида ўтказилди. Олинган супернатантдаги оқсил-пептид фракцияси 1:5 нисбатда ацетон билан чўктирилди. Чўкма филтрланиб қуритилди ва музлатгичда -4°C ҳароратда сақланди.

100 г ёғсизланган уруғдан 4,5 г оқсил ва пептидлар йиғиндиси олинди.

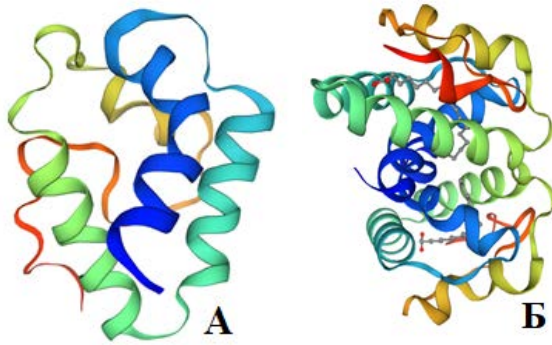
Хроматографик усуллар мажмуасини қўллаш натижасида таркибида молекуляр оғирлиги 9602 Да бўлган Ns-LTP1 оқсили тутган гомоген фракция олинди (1- расм).



1-расм. А) C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 (250 x 4 мм) (Dr. A. Maisch, Ammerbuch, Германия) колонкасида ион алмашиниш хроматографияси усулида олинган 4-фракциянинг чизикли (10-50%) эритувчи градиентида 0,1% УФСК сувли эритмасида 1 соат давомида оқим тезлиги 1 мл / мин ва 40°C ҳароратдаги ТФ-ЮССХ Б) Натив Ns-LTP1 оқсининг масс-спектри.

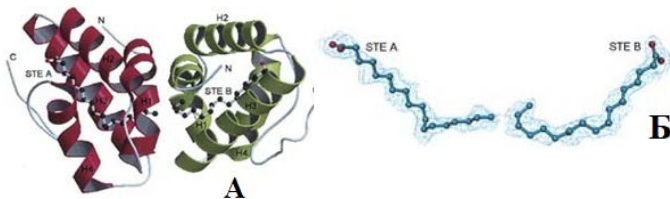
100 г ёғсизлантирилган уруғдан 425 мг ёки 0,4% тоза ҳолдаги липид ташувчи оқсил олинди.

SWISSMODEL дастури ёрдамида Ns-LTP1 липид ташувчи оқсили ва унга боғланган липидларнинг фазовий тузилмасини стеарин кислотаси мисолида компьютер моделлаштириш тадқиқотлари ўтказилди (2-расм).



2-расм. Ns-LTP1 оқили (А) ва Ns-LTP1 оқили билан стеарин кислотаси комплексининг (Б) уч ўлчовли модели

Ns-LTP1 комплекси тутами, охирида узун С- сегмент бўлган тўртта спиралдан иборат умумий тузилмага (Н1- дан Н4-гача) эгадир (3-расм). Улар тўртта дисульфид боғлари бўлган ихчам доменга жойлашади. Бу тузилмалар катта ички гидрофоб бўшлиққа эга бўлиб, унга липидлар боғланади. Ns-LTP1 комплекси липид молекулаларини спираллар охиридаги С-халқаси ва тўртта спирал билан ўралаган тунелли гидрофоб чўнтак ёрдамида боғлайди. Липидларнинг углеводород думлари Ns-LTP1 нинг гидрофоб бўшлиғига киритилади, липидларнинг бош гуруҳлари эса боғловчи чўнтагидан ташқарига чиқади ва эритувчи томон йўналтирилади (3А, Б-расм).



3-расм. Ns-LTP1 комплексининг умумий тузилиши: А- Ns-LTP1 -STE. В - Ns-LTP1 -STE комплексининг иккита стеарин кислоталари (STE А ва STE В).

Ns-LTP1-STE комплексида ҳар бир асимметрик бирликка иккита молекула тўғри келади ва ҳар бир молекула битта ёғ кислотасини боғлайди. STE А ва STE В иккита Ns-LTP1 молекуласининг асимметрик бўғинида кузатилиши мумкин бўлган иккита ёғ кислотасидир. STE А ва STE В (С17-С18) думлари турли ориентацияларга эга (3.Б-расм). STE А боғловчи чўнтагидан чиқарилади, STE Б нинг думи орқага букланади ва Ns-LTP1 билан бир нечта қўшимча сольватларни ҳосил қилади. Бу эса Ns-LTP1-STE комплексидаги STE В молекуласи энг қулай липид боғловчи конформацияга эга эканлигини англатади.

Шундай қилиб, тажрибалар жараёнида *Nigella sativa* уруғидан липид ташувчи Ns-LTP1 оқилини олишнинг такомиллаштирилган усули ишлаб чиқилган ва стеарин кислотаси мисолида липид молекулалари билан ўзаро таъсирлашиш модели кўрсатиб берилган.

Яллиғланиш организмнинг турли экзоген ва эндоген зарар етказувчи омиллар таъсирига универсал жавоб реакцияси ҳисобланади. Яллиғланиш жараёни кўплаб касалликларнинг етакчи патогенетик бўғини бўлиб, у шифокор амалиётидаги барча касалликларнинг 80% ни ташкил этади. *Nigella sativa* уруғидан олинган липид ташувчи Ns-LTP1 оқилининг яллиғланишга қарши фаоллигини ўткир экссудатив ва сурункали пролифератив яллиғланиш моделларида баҳолаш тадқиқотнинг асосий вазифалардан бири бўлди.

Липид ташувчи Ns-LTP1 оксилнинг яллиғланишга қарши фаоллиги шиш камайишининг % ифодаланди. 0,1 мл ҳажмдаги 2% формалин эритмасини каламуш панжаси остига субплантар юбориш натижасида шиш пайдо бўлганлиги аниқланди ва бу унинг ҳажмининг сезиларли даражада ортиши билан тасдиқланади. Тадқиқ қилинаётган Ns-LTP1 оксилнинг сувдаги эритмаси 0,01; 0,1; 1,0 мг/кг дозаларда формалин киритилмасдан 1 соат олдин оғиз орқали киритилди (1- жадвал).

1-жадвал

Ns-LTP1 нинг формалин шиши моделида яллиғланишга қарши таъсир кўрсаткичлари

Препаратлар мг/кг	Ҳайвонлар сони	Бошланғичга нисбатан оёқ-қўлларининг ҳажмини ошиши, %				
		Формалин киритилгандан кейинги ку)				
		3 соат	1 кун	3 кун	5 кун	7кун
назорат	5	38,4±1,0	44,8±0,25	43,7±0,25	30,4±0,25	15,1±1,0
Ns-LTP1 0,01	5	31,25±1,1	43,9±1,8	31,25±2,1	23,8±1,6	9,82±1,2
Ns-LTP1 0,1	5	23,0±1,2	42,8±1,9	31,3±1,0	20,0±1,2	8,6±0,65
Ns-LTP1 1,0	5	35,7±1,2	43,8±1,05	12,5±1,1	11,1±0,6	6,0±0,25

p < 0.01 назоратга нисбатан

Ns-LTP1 липид ташувчи оксилнинг 0,01 мг/кг дозада қабул қилган каламушлар гуруҳида каламуш панжасининг максимал шишиши фармалин киритилгандан 1 кун кейин ҳам ривожланишда давом этиб, назоратга нисбатан ўртача ҳажм 43,9±1,8% гача кўтарилган. Формалинни киритилганидан 3 кун ўтгач, шиш ҳажми статистик сезиларли даражада 31,25 ± 2,1% гача, 5-куни - 23,8±1,6% гача ва 7- кун - назорат билан солиштирганда - 9,82±1,2% гача камайди. Ns-LTP1 0,1 мг/кг дозада қабул қилинган каламушларда панжанинг максимал шишиши 1 кундан кейин ривожланиб, назоратга нисбатан 42,8 ± 1,9% гача ортди ва формалин киритилганидан 3 кун ўтгач, шиш аста-секин 31,3±1,0 % гача, 5 куни 20,0 ± 1,2% гача ва 7-кунга келиб шиш сезиларли даражада 8,6 ± 0,65% гача камайди. 1,0 мг/кг дозада Ns-LTP1 киритилган ҳайвонларда каламуш панжасининг максимал шишиши 1-куни 43,8±1,05%, 3-кунида эса шиш ҳажми 12,5±1,1%гача, 5-кун 11,1±0,6%гача, 7-куни назорат билан солиштирганда сезиларли даражада 6,0±0,25% гача камайди. Тадқиқотлар шуни кўрсатдики, синалаётган Ns-LTP1 оксиди 0,1 ва 1,0 мг/кг концентрацияларда 3-кундан 7- кунгача ишонарли антиэкссудатив таъсир кўрсатди, энг юқори самарали таъсир 1,0 мг/кг дозада кузатилди.

Сичқонлар оёқ-панжаларининг каррагинин шиши янги потенциал яллиғланишга қарши дорилар ва яллиғланиш жараёнининг ривожланиш механизмларини ўрганиш учун қўлланилади. Шу билан бирга яллиғланишнинг асосий белгилари – шиш, гипералгезия, эритема - субплантар киритишдан кейин яллиғланган панжа тўқималарига зарар етказмасдан дарҳол ривожланади ва бу модел формалин шиши моделидан тубдан фарқ қилади.

Тадқиқ қилинаётган Ns-LTP1 липид ташувчи оксилнинг 0,1 ва 1,0 мг/кг дозадаги сувли эритмалари зонд ёрдамида ошқозонга киритилди. Ундан кейин 1 соат ўтгач, 0,1 мл 1% ли каррагинин эритмаси каламушнинг орқа

ўнг оёғи апоневроз соҳасига киритилди. Яллиғланишга қарши таъсир яллиғланиш индукциясидан 3 соат кейин баҳоланди. Шиш катталиги яллиғланмаган ва яллиғланган орқа оёқ панжалари ҳажмлари ўртасидаги фарқ билан ҳисоблаб чиқилган. Антиэкссудатив фаоллик назорат ҳайвонларига нисбатан тажриба ҳайвонларида шишнинг камайиш даражаси билан аниқланди ва фоизларда ифодаланди (2-жадвал).

2-жадвал

Ns-LTP1 нинг каламушларда каррагенин шиши кечишига таъсири (бошланғичга нисбатан оёқ – қўл ҳажмининг % га ошиши, $M \pm m$; $n=6$)

Гуруҳлар	Доза, мг/кг	3 соат ўтгач панжа ҳажмининг ўзгариши, %	Антиэкссудатив таъсири, %	P
Назорат	-	112,5±12,5		-
Ns-LTP1	0,1	75,0±6,8*	33,3±2,0	p=0.027
	1,0	62,5±5,0*	44,5±2,8	p=0.004

* $p < 0,01$ -(назоратга нисбатан ишончилиги)

Тадқиқотлар шуни кўрсатдики, Ns-LTP1 оқсили, 0,1 ва 1,0 мг/кг дозаларда яллиғланишга қарши сезиларли фаолликка эга бўлиб, 3 соатдан кейин каррагенин шишининг даражасини мос равишда 33,3 ва 44,5 % га камайтиради ва бунда юқори кўрсаткич 1,0 мг/кг дозада кузатилди.

Ns-LTP1нинг антипролифератив ва антиэкссудатив таъсирини баҳолаш учун Ф. П. Тринус усули бўйича “пахта гранулёмаси” усули қўлланилган. Енгил эфирли анестезия остидаги каламушлар терисининг елка соҳасидаги юнги эҳтиёткорлик билан олинган ва асептик шароитда 1-2 см узунликдаги тери ва тери ости тўқималарининг бўйлама кесма қилинган. Кейин пинцет билан терининг кесилиши натижасида тери ости тўқимасида ҳосил бўлган бўшлиққа 10 мг оғирликдаги олдиндан стерилланган пахта қўйилди ва 1-2 чок туширилди. Пептид фракцияси ошқозон орқали суткасига 1 марта 7 кун давомида киритилди. 7 кундан кейин ҳосил бўлган толали-грануляция тўқимаси билан имплантация қилинган пахта олиб ташланди ва 55-60°Сда 24 соат давомида оғирлиги барқарорлашгунча қуритилди. Ҳосил бўлган грануляция-толали тўқиманинг массаси қуритилган гранулёма массаси билан имплантация қилинган пахтанинг массаси ўртасидаги фарқ бўйича аниқланди. (3-жадвал).

3-жадвал

Ns-LTP1 нинг каламушларда яллиғланиш ўчоғида грануляция-толали тўқималарнинг ҳосил бўлишига таъсири ($n=6$)

Гуруҳлар	Доза мг/кг	Экссудат массаси, мг	Экссудациянинг г камайиши, %	Гранулёма тўқимаси массаси, мг	Пролиферациянинг г бостирилиши, %
Назорат	-	384,3±25,6	-	79,8±11,5	-
Ns-LTP1	10	311,0±32,1	19,1	56,0±2,43	29,8
	20	308,0±30,0	19,8	53,5±2,56	33,0

$p < 0.05$ назоратга нисбатан

Олинган натижалар “пахта гранулёмаси” усулида Ns-LTP1 оқсили 10 ва 20 мг/кг дозаларда пролифератив жараёнларни 29,8 ва 33,0 %га

камайтириши ва унинг антипролифератив таъсири назоратга нисбатан 1,4-1,5 марта юқорилигини.

Шундай қилиб, тажрибалар натижалари *Nigella sativa* уруғидан олинган липид ташувчи Ns-LTP1 оксилнинг аналгетик, яллиғланишга қарши, антипролифератив ва антиэксудатив таъсирга эга эканлигини кўрсатди

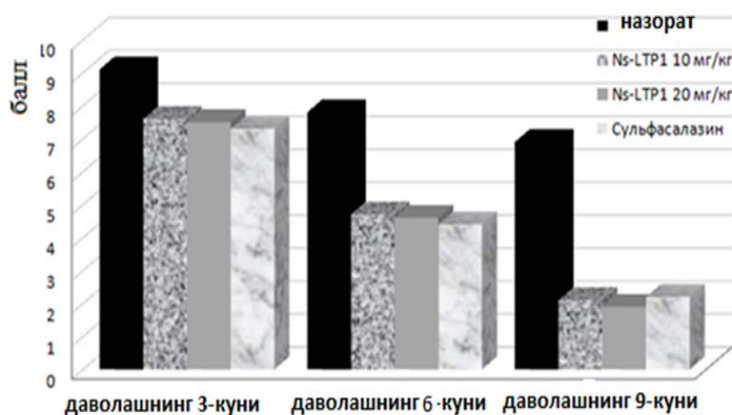
Сигмасимон ичак шиллиқ пардасининг ярали зарарланиши билан экспериментал колит Фицпатрик усули бўйича сирка кислотаси билан чақирилди. Гистоморфологик ва биокимёвий кўрсаткичларга кўра, бу усул одамларда ярали колитга мос келади. Сирка кислотаси билан чақирилган носпецифик ярали колит йўғон ичак шиллиқ қавати шароитида шиш, гиперемия ва геморрагиялар билан аниқ деструктив ўзгаришлар ривожланиши билан бирга кечади. Каламушларда модел патологияси ҳосил қилинганда организмнинг умумий интоксикацияси белгилари кузатилди, бу ҳаракат фаоллигининг ортиши, хавотирланиш ва агрессивлик ҳолати билан ифодаланади.

Ҳайвонлар 4 гуруҳга бўлинди: 1 – назорат гуруҳи – патология чақирилиб даволанмаган ҳайвонлар, 2-гуруҳ – 10 мг/кг дозада ва 3 – гуруҳ – 20 мг/кг дозада Ns-LTP1 қабул қилган, шунингдек 4-гуруҳ-140 мг/кг дозада таққослаш препарати Сульфасалазин (KRKA, Словения) қабул қилган ҳайвонлар. Экспериментал ҳайвонларга колит чақирилганидан кейин препаратлар тегишли дозаларда перорал киритилган ва ҳар гуруҳда 9 бош каламуш бўлиб, макроскопик текширувлар учун ҳар 3-,6-,9-кунларда 3 бошдан сўйилган. Колитнинг биринчи белгилари ҳайвонларда шилимшиқ ва қон аралашмали диарея, тез-тез дефекация қилиш, ҳайвон тана вазнининг динамикасида ўзгаришлар кузатилди. Макроскопик тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, ярали колит моделлаштирилганда, барча тажриба ҳайвонларининг ЙИШҚда сезиларли ўзгаришларга олиб келди. Патологияли назорат гуруҳи ҳайвонларда кўплаб қон кетиши, шишлар, яққол гиперемия ва ЙИШҚ бурмаланишида бузилишлар кузатилди.

Ns-LTP1 ошқозон орқали 10 ва 20 мг/кг дозада юборилган ҳайвонларда даволашнинг 3-кунида яллиғланиш жараёнининг сезиларли пасайиши кузатилди: унинг даражаси 7,6 ва 7,5 баллни ташкил этди, бу даволанмаган назорат ҳайвонларига нисбатан 1,2 марта кам ва Сульфасалазин билан даволанган ҳайвонларга нисбатан 1,09 марта юқори бўлди.

Ns-LTP1 билан даволашнинг 6-кунида 10 ва 20 мг/кг дозада яллиғланиш жараёнининг оғирлиги сезиларли даражада камайди: шиллиқ қаватнинг зарарланиши 4,7 ва 4,6 баллни ташкил этди, бу назорат гуруҳидаги ҳайвонлардагига нисбатан 1,7 марта кам ва Сульфасалазин киритилган ҳайвонларга нисбатан 1,05 марта юқори. Ns-LTP1 муолажасининг 9-кунида ҳайвонларда ЙИШҚдаги зарарланишлар деярли кўринмаган, яъни регенератив жараёнлар содир бўлди. Липид ташувчи оксил Ns-LTP1 20 мг/кг дозада киритилган ҳайвонлар гуруҳида регенератив жараёнлари янада яққолроқ намоён бўлди. Сульфасалазин қиёсий препарати киритилган паталогияли ҳайвонлар гуруҳида ЙИШҚ ҳолати бўйича ҳам ижобий ўзгаришлар кузатилди, лекин регенерация жараёнлари Ns-LTP1 билан

даволанган ҳайвонлардагига нисбатан статистик ишонарсиз фарқ билан камроқ намоён бўлди. (расм-4.).



4- расм Экспериментал ярали колит муҳитида Ns-LTP1 оксилнинг ЙИШҚ ҳолатига таъсири (балларда)

Таққослаш препарати Сульфасалазин қўлланилган ҳайвонлар гуруҳида патологияга нисбатан ЙИШҚ ҳолати бўйича ҳам ижобий ўзгаришлар кузатилди, лекин регенерация жараёнлари Ns-LTP1 билан даволанган ҳайвонларга нисбатан камроқ намоён бўлди.

Шундай қилиб, ушбу ишда ўтказилган тадқиқот натижалари *Nigella sativa* уруғларидан олинган Ns-LTP1 липид ташувчи оксил таъсирида яллиғланиш аломатларини самарали камайиши кузатилди: ҳайвонларнинг тана вазнини ва экспериментал ярали колит муҳитида тажриба ҳайвонларида ректал ҳароратини меъёрлаштирди, 20 мг/кг дозада ярали колит моделида яллиғланишга ва ярага қарши самарали таъсир кўрсатиб, бу ЙИШҚ ҳолати кўрсаткичлари билан тасдиқланди.

"*Nigella sativa* уруғидан Ns-LTP1асосида ярали колитни даволаш учун композицияни ишлаб чиқиш ва клиник олди тадқиқотларини ўрганиш" деб номланган тўртинчи бобда ярали колит модели ва даволаш жараёнлари учун ишлаб чиқилган композицияни токсикологиясини ўрганиш натижалари келтирилган.

Nigella sativa уруғларидан олинган биологик фаол модда Ns-LTP1 асосида к.ф.д. Ощепкова Ю.И. раҳбарлигида оксиллар ва пептидлар кимёси лабораториясида лиофилизат шаклидаги композиция ишлаб чиқилди. Лиофилизат, фаол бошланғич сифатида Ns-LTP1 липид ташувчи оксил, стабилизатор иштирокида 10:1 нисбатдаги сув:ёғ фазалари ва тухум лецитини фосфолипидларини ўз ичига олган «сув ва ёғ» туридаги эмульциясини лиофил қуриштириш орқали олинди.

Шамча шаклида дори тайёрлаш учун таркибида глицерол ва натрий стеарат бўлган глицеринли шамчалар асос қилиб олинган. Глицеринли шамчалар сув ҳаммомида эритилди ва ишлаб чиқилган лиофилизат 50: 1 нисбатда қўшилди. Кейин тайёрланган ингредиентлар бутунлай эригунча аралаштирилиб, тайёр бўлган аралашма қолипларга қуйилди ва музлатилди.

Ишлаб чиқилган композицияни ярали колитни даволашда лиофилизат ва ректал шамча шаклида қўллаш мумкинлигини тасдиқловчи маълумот сифатида йўғон ичак шиллиқ қаватининг ҳолати макроскопик ва

микроскопик таҳлил қилиниб, унда катта ёшли, тана вазни 180-200 г бўлган эркак каламушларда экспериментал ярали колит муҳотида ярали шикастланишлар сони, зарарланиш ўчоғига антипролифератив таъсир, ҳайвонларнинг тана вазни ва ректал ҳароратининг меъралшуви баҳоланди.

Патология 0,5 мл 10% сирка кислотасини анестезия таъсирида бўлган каламушларнинг йўғон ичагига ва 10 секунддан кейин - 3 см³ ҳаво киритиш орқали чақирилди. Колит моделлаштирилгандан кейин, 2-кундан бошлаб 9 кун давомида тажриба ҳайвонларига Ns-LTP1 20 мг / кг, Сульфасалазин 140 мг/кг оптимал дозаларда ошқозонга киритилди. Тажриба ҳайвонлари даволашнинг 3-,6-,9-кунларида сўйилиб, йўғон ичаги олинди. Визуал текширув ўтказилиб, унда ЙИШҚ ҳолати, ярали шикастланишлар сони баҳоланди. Зарарланиш даражаси баллар шкаласи бўйича баҳоланди: шиш – 1 балл; гиперемия – 2 балл; қон кетиши: нуқтачалик – 3 балл; бирлашган – 4 балл; эрозиялар: битталиқ, ҳар бир эрозия – 5 балл, қонли эрозия – 6 балл; яра – 7 балл. Баллар йиғиндиси ҳар бир ҳайвон учун ҳисобланди. Яра юзаси, тана вазни ва ректал температура даволашнинг 3,6,9 кунларида ўлчаб олинди.

Ректал ҳарорат кўрсаткичлари таҳлил қилинганда, патологияли гуруҳ ҳайвонларида ҳароратнинг ортганлиги кузатилиб, 3-куни дастлабки кўрсаткичга нисбатан 2° С гача ортгани ва синалаётган препаратлар киритилган тажриба гуруҳларидаги ҳайвонларникидан юқори эканлиги аниқланган. Шу билан бирга даволашнинг 3-, 6-ва 9-кунларидаги ректал ҳарорат кўрсаткичлари даволаш ва профилактика тартибида Ns-LTP1 киритилаётган ҳайвонларда дастлабки кўрсаткичлардан ишонарли фарқ қилган. Бу кўрсаткич Ns-LTP1нинг ҳароратни тушириш хоссалари борлигини тасдиқлайди.

Лупа ёрдамида ЙИШҚнинг макроскопик тадқиқотлари ўтказилди. Экспериментал ҳайвонларда йўғон ичак шиллиқ қавати соҳаси макроскопик текширилиб, 3-кундаги олинган маълумотларга кўра назорат гуруҳи ҳайвонларида йўғон ичак яраси ўртача 4,32±0,35 балл билан баҳоланган (4-жадвал).

4-жадвал

**Каламушларда экспериментал ярали колит фониди Ns-LTP1ли
композициянинг ЙИШҚ и ҳолатига таъсири**

Препаратлар умумий дозаси	Шиш 1 балл	Геперемия 2 балл	Қон кетиш нуқтаси 3 балл	Бирлашган 4 балл	Ягона эрозия, ҳар бир эрозия 5 балл	Эрозия қон билан 6 балл	Яра 7 балл	Балларнинг йиғиндиси
	назорат							
3-кун	0,62±0,04	1,23±0,01	1,8±0,15	2,5±0,1	3,10±0,25	3,7±0,27	4,32±0,35	17.3±1,17
6-кун	0,48±0,01	0,97±0,07	1,4±0,10	1,9±0,03	2,4±0,25	2,9±0,28	3,38±0,37	13.4± 1,11
9-кун	0,023±0,005	0,05±0,007	0,07±0,005	0,093±0,005	0,12±0,01	0,14±0,025	0,2±0,03	0.70±0,087
	Композиция (Ns-LTP1 20 мг/кг)							
3-кун	0,33± 0,05	0,67±0,05	0,99±0,05	1,33±0,1	1,67±0,3	2,00±0,2	2,33±0,25	9.32±1,0* p=0.01
6-кун	0,08±0,005	0,17±0,05	0,25±0,035	0,33±0,025	0,42±0,02	0,5±0,05	0,6±0,05	2.35±0,24* p=0.002
9-кун	0,01±0,003	0,02±0,003	0,03±0,003	0,04±0,004	0,05±0,002	0,06±0,004	0,07±0,006	0.28±0,02*

									p=0.01
Сульфасалазин 140мг/кг									
3-кун	0,42±0,05	0,83±0,07	1,25±0,13	1,67±0,15	2,1±0,23	2,5±0,15	2,92±0,27	11.7±1,05 *	p=0.03
6-кун	0,29±0,027	0,56±0,04	0,86±0,065	1,15±0,12	1,4±0,12	1,73±0,17	2,02±0,22	8.01±0,76*	p=0.02
9-кун	0,01±0,002	0,02±0,003	0,04±0,003	0,05±0,003	0,06±0,004	0,07±0,005	0,08±0,005	0.33±0,02*	p=0.02

Патологияли назорат гурҳи ҳайвонларида регенерация жараёнлари аста-секин содир бўлди, буни узоқ сақланиб қолган геморрагия, шиш, гиперемия каби яллиғланиш белгилари тасдиқлайди. Даволаш ва профилактик тартибда Ns-LTP1 композиция ошқозон орқали юборилган ҳайвонлардаги яллиғланиш жараёнида сезиларли пасайиш кузатилди: унинг намоён бўлиши $2,33 \pm 0,25$ бални ташкил этди, бу даволанмаган ҳайвонларга нисбатан 1,85 марта ва Сульфасалазин билан даволанган ҳайвонларга нисбатан 1,25 марта кам бўлди.

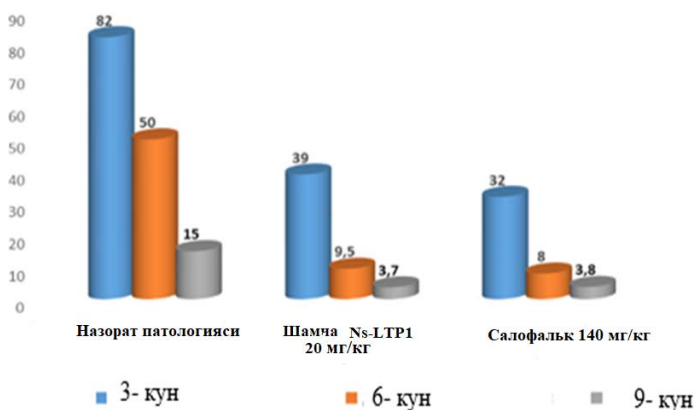
Ns-LTP1 композицияси билан даволашнинг 6-кунида яллиғланиш жараёнининг намоён бўлиши сезиларли даражада камайди: шиллик қаватнинг шикастланиши жами $2,35 \pm 0,24$ баллни ташкил этди, бу модел патологияли назорат гуруҳи ҳайвонларга қараганда 5,7 марта, Сульфасалазин юборилган ҳайвонларга қараганда эса 3,4 марта кам эканлиги аниқланди. Тажрибанинг 9-кунида патологияли назорат гуруҳи ҳайвонларида, Ns-LTP1 композиция ва сульфасалазин билан даволанган ҳайвонлардагидан ишонарли даражада фарқ қилувчи яллиғланиш белгилари сақланиб қолишда давом этди: назоратдаги ҳайвонларда йўғон ичак зарарланган қисмининг умумий юзаси $0,70 \pm 0,087$ балл билан баҳоланиб, бу Ns-LTP1 композиция қабул қилган ҳайвонларга нисбатан 2,3 марта, сульфасалазинга нисбатан 2,1 марта юқоридир.

Тажрибанинг 3-кунида йўғон ичак яраси юзасини аниқлаш орқали Ns-LTP1 композицияси ва Сульфасалазиннинг ярага таъсири баҳоланди, шунингдек даволанмаган патологияли назорат гуруҳи ҳайвонларида ҳам аниқланди. Ушбу юза патологияли назорат гуруҳида $61,67 \pm 6,16\%$, Ns-LTP1 композиция ва Сульфасалазин киритилган гуруҳларда мос равишда $33,33 \pm 3,4$ ва $41,67 \pm 4,72\%$ ташкил этиб, Ns-LTP1 композиция гуруҳида яра юзаси назорат гуруҳидан 1,85 марта, Сульфасалазин гуруҳидан 1,25 мартаги кичрайганлигини кўриш мумкин. Тажрибанинг 6-кунида худди шу кўрсаткич назорат гуруҳида $48,3 \pm 4,1\%$, Ns-LTP1 композицияси ва Сульфасалазин киритилган гуруҳларда мос равишда $8,33 \pm 0,78\%$; $28,8 \pm 2,7\%$ ташкил этди. Ns-LTP1 композицияси киритилган гуруҳда яра юзаси назоратдан 5,8 мартагача, Сульфасалазин гуруҳидан эса 3,5 мартагача кичрайганлиги аниқланди. Тажрибанинг 9-кунидаги текширувларда яра юзаси Ns-LTP1 композицияси киритилган ҳайвонлар гуруҳида ($1 \pm 0,09\%$) назорат гуруҳидагига ($2,33 \pm 0,29\%$) қараганда 2,3 мартагача камайган, Сульфасалазин гуруҳи ($1 \pm 0,1\%$) билан эса деярли тенг эканлиги аниқланди.

Шундай қилиб, олинган натижалар Ns-LTP1 композицияси 20 мг/кг дозада яллиғланиш белгиларини самарали камайтириб, тажриба хайвонларида чақирилган ярали колит ҳолатида яллиғланишга ва ярага қарши, шунингдек регенерация жарёнининг интенсивлигига ижобий таъсир кўрсатар экан.

Ўхшаш тажриба ацетат яраси моделида композициянинг ректал шамлар шакли учун ҳам ўтказилди. ЯК чақирилгандан сўнг 2 ва 9 кундан бошлаб экспериментал хайвонларга 20 мг/кгги Ns-LTP1нинг мақбул дозасидаги ректал шамчалар шаклидаги композиция ва таққослаш препарати сифатида эса 500 мгги Салофальк ректал шамчалари (ишлаб чиқарувчи: Doktor Falk, Германия) киритилди (5-расм).

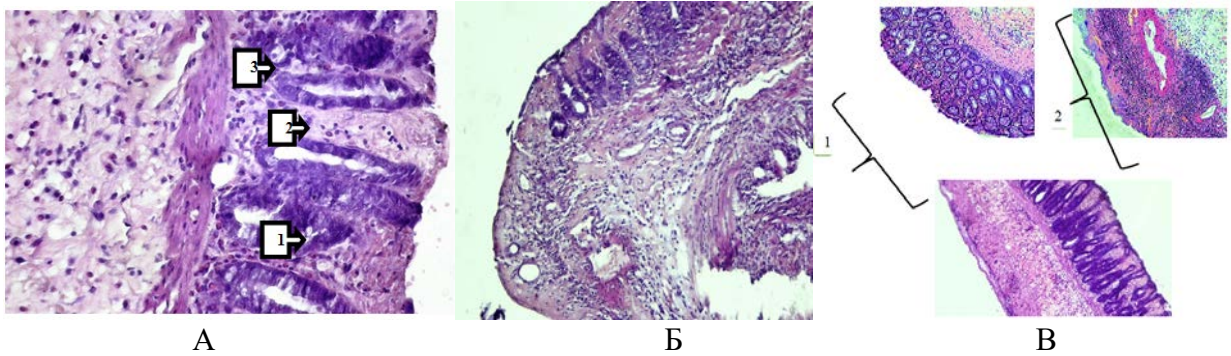
Хайвонларни Ns-LTP1ли ректал шамчалар билан даволашнинг 9-кунда ЙИШҚ зарарланишлари амалда намоён бўлмади, бу эса регенерация жараёнлар содир бўлганлигини англатади. Олинган натижаларни Салофальк қиёсий препарати киритилган хайвонлар гуруҳида бўлган ижобий ўзгаришлар билан таққослаш мумкин бўлди



5-расм. Ns-LTP1 ва Салофальк билан композициянинг каламушларда экспериментал ярали колит фонида ЙИШҚ ҳолатига таъсири (балларда)

Шундай қилиб, лиофилизат ва ректал шамча кўринишида 20 мг/кг дозадаги Ns-LTP1ли композиция самарали яллиғланиш аломатларини енгиллаштирди ва ЙИШҚ ҳолати кўрсаткичлари билан тасдиқланган экспериментал ярали колит моделида яллиғланишга ва ярага қарши таъсир кўрсатади.

Йўғон ичак қаватининг соғайиш жараёнларини баҳолаш учун каламушларни ҳар бир тажрибанинг 3- ва 9-кунларида ҳар бир гуруҳдан 3 тадан хайвон олиниб, шиллиқ қават ҳолатини визуал баҳоланди ва патоанатомик текширув ўтказилди. Йўғон ичак намуналари 12% формалин эритмасида сақланиб, улардан тайёрланган гистологик препаратлар гемотоксиллин-эозин билан бўялди ва ёруғлик микроскопи остида текширилди (6-расм).



6-расм.9-кун даволлаш: А) Назорат гуруҳида қопланётган эпителий ўртача метаплазияси кузатилди (1). Интерстициал тўқималарнинг (2) чандиқлашиши туфайли без қисқариши (3) кузатилади. Б) Сульфасалазин – ўткир эрозия ўзгаришлари бўлган жойда бириктирувчи тўқималарнинг сийраклашган чандиқлари, ўрта даражадаги сероз экссудация излари ҳосил бўлган. Строма бириктирувчи тўқималар фибробластлар ва фиброцитлардан ташкил топган. Унда фиброз (коллаген) тузилмалар шаклланивчи қисмлар ҳам бор, капиллярлар гиперемияси аниқланмади. В) Ns-LTP1 композицияси ҳужайра мембранасига (гликолилипид ва гликопротеин қават- гликокаликс) таъсир қилади. Ҳужайралар регенерацияси, трансформацияси ва эрозив (1), некротик (2) зарарланишлар дифференциациясига шиллик қават эпителий ҳужайраларининг регенерацияси ҳисобига эришилади. Препаратлар гематоксилин-эозин бўёғида бўялди, микроскоп таҳлили 4x10 ва 4x20 кўриш катталикларида бажарилди.

Йўғон ичакнинг эрозияланган намуналарини микроскопда текшириш шуни кўрсатдики, Ns-LTP1нинг ошқозон-ичак тракти шиллик қаватига таъсири анъанавий дориларга қараганда тезроқ ва тўлиқроқ бўлиб, яллиғланиш инфильтрацияси майдонини кескин чекламайди ва айнан шу билан яра битишини тезлаштиради. Ns-LTP1 таркибига кирувчи фосфолипидлар зарарланган ҳужайра мембраналарида деструктив ўзгаришларни камайтириш йўли билан ҳужайра мембранасини барқарорлаштиради. Препаратларда зарарланган ҳужайралар ядроларида гетерохрамин доначаларининг пайдо бўлиши ҳужайра бўлиниши ва регенерациясини кўрсатади. Шунга асосланиб зарарланган ҳудуд атрофида қисман (субтитучия) ва тўлиқ (реституция) репаратив регенерациянинг ўчоқлари аниқланган.

Каламушларда экспериментал ярали колит фониди липид ташувчи оксил ва унинг асосида тузилган композицияларнинг таъсирини ўрганиш бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қора седана *Nigella sativa* уруғидан олинган Ns-LTP1 ва унинг асосидаги композиция ярани битирувчи, яллиғланишга қарши ва ҳароратни туширувчи таъсирга эга эканлиги аниқланди.

Ns-LTP1 композициясининг сувли эритмаси сичқонлар ошқозонига 2000,3000, 4000 ва 5000 мг/кг дозаларда юборилиб, унинг ўткир заҳарлаш хусусияти баҳоланди. Олинган натижаларига кўра, ўртача ўлим дозаси LD50 > 5000 мг/кг эканлиги ва ушбу композиция заҳарлилиги бўйича кимёвий моддаларнинг V–деярли заҳарсиз моддалар синфига мансублиги аниқланган. Шунингдек, тажрибаларда Ns-LTP1 композицияси кумулятив хоссаларига эга эмаслиги маълум бўлди. Ns-LTP1 композицияси 20; 40; 80 мг/кг дозаларда каламушлар ошқозонига 1 ой давомида ҳар куни юборилиб,

унинг умумий захарлаш хусусияти баҳоланди. Тадқиқотларда Ns-LTP1 композицияси тажриба ҳайвонларининг периферик қон таркиби хужайраларининг миқдори ва морфологиясига, жигар ва буйраклар фаолиятига захарли таъсир кўрсатмаган.

Ns-LTP1 композициясининг специфик захарлаш хусусияти бўлган маҳаллий ачиштирувчи таъсири тадқиқ қилиниб, композициянинг 0,5 ва 5 %-ли сувли эритмаси каламуш терисига, куёнларнинг кўз конъюнктивасига ачиштирувчи таъсир кўрсатмаслиги аниқланди. Шунингдек, эмбриотоксик ва тератоген таъсирларни ўрганиш натижалари *Nigella sativa* уруғидан олинган Ns-LTP1 композиция каламушларнинг репродуктив функцияси ва эмбрион ривожланишига салбий таъсир кўрсатмади. Ns-LTP1 композициясининг мумкин бўлган мутаген фаоллиги *in vivo* шароитида сичқонларнинг суяк илиги хужайраларида хромосома абберацияларини микроскопик таҳлил қилиш усулида амалга оширилди. Олинган натижалар Ns-LTP1 композициянинг 20 мг/кг, 500 мг/кг, 1000 мг/кг дозаларида қўлланилган усулнинг сезгирлиги чегарасида сичқон суяк илиги хужайралари хромосомаларига мутаген таъсир кўрсатмади. Ўтказилган цитогенетик таҳлиллар б.ф.н., Фармакология ва БФМ скрининги лабораторияси катта илмий ходими Якубова Р.А. билан ҳамкорликда ўтказилди.

ЎзРФА Инсон иммунологияси ва геномикаси институти ходими т.ф.д. Исмаилова А.А. билан ҳамкорликда олиб борилган тадқиқотларда ишлаб чиқилган Ns-LTP1-ли композициянинг ЯК беморларида фаол яллиғланиш даврида – яллиғланишга қарши жавоб реакциясини сафарбар этувчи проcitoкинлар ва яллиғланишга қарши цитокинларни ишлаб чиқарилишига индукцияловчи таъсир кўрсатиб, ушбу жарёнларни дозага боғлиқ ҳолда рағбатлантириши аниқланди.

Шундай қилиб, Ns-LTP1 ва у асосидаги композициянинг терапевтик ва профилактик таъсири йўғон ичакнинг ярали зарарланишлари моделида липид ташувчи оксил Ns-LTP1ни ярали колитни даволаш учун препаратлар ишлаб чиқишда фойдаланиш учун тавсия этишга имкон беради.

ХУЛОСАЛАР

1. *Nigella sativa* уруғидан Ns-LTP1 оксилени олишнинг такомиллаштирилган усули ишлаб чиқилди, натижада гомоген оксил унумининг 0,19% -дан 0,4% -гача ортишига эришилган. Стеарин кислотаси мисолида компьютер моделлаштириш орқали Ns-LTP1-нинг липид молекулалари билан ўзаро таъсирлашуви кўрсатиб берилган.

2. Биринчи марта қора седана *Nigella sativa* уруғларидан олинган Ns-LTP1 оксиленинг яллиғланиш ва репаратив жараёнларга таъсир этиши, тўқималарнинг битишида ва регенерациясида иштирок этиши аниқланган.

3. Липид ташувчи оксил Ns-LTP1нинг кам захарли бирикмалар V синфига тегишлилиги, кумулятив таъсирга эга эмаслиги, периферик қоннинг миқдорий таркиби ва морфологиясига, буйрак ва жигар функциясига захарли таъсири мавжуд эмаслиги, терига маҳаллий ачиштирувчи ва аллергияк таъсирининг йўқлиги, анафилактик шок чақирмаслиги аниқланди.

4. Лиофилизат кўринишидаги композиция фаол бошланғич сифатида Ns-LTP1 липид ташувчи оқсил, стабилизатор иштирокида 10:1 нисбатдаги сув:ёғ фазалари ва тухум лецитини фосфолипидларини ўз ичига олган «сув ва ёғ» туридаги эмульциясини лиофил қуритиш орқали олинди.

5. Липид ташувчи оқсил Ns-LTP1 ва унинг асосидаги композиция ошқозон яраси соҳасининг ва йўғон ичак шиллик қавати зарарланиш даражасининг камайишида намоён бўладиган каламушлардаги ўткир экспериментал колит моделида ярага, яллиғланишга қарши ва ҳароратни туширувчи таъсирга эга эканлиги аниқланди.

6. Махсус токсикологияни ўрганиш натижасида липид ташувчи оқсил Ns-LTP1нинг *in vivo* шароитида илик кўмиги хужайраларида хромосома абберрациялари индукцияси тестида мутаген фаоллик кўрсатмаслиги, эмбриотоксик ва тератоген таъсирга эга эмаслиги ва репродуктив функцияда ўзгаришларга олиб келмаслиги аниқланди.

7. Ns-LTP1 липид ташувчи оқсил асосида каламушларда ярали колит моделида, яллиғланишга ва ярага қарши таъсирга эга бўлган ректал шамчалар ишлаб чиқилди.

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

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

АМАНЛИКОВА ДИЛЬФУЗА АБДУГАНИЕВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПИД-ПЕРЕНОСЯЩЕГО
БЕЛКА ИЗ СЕМЯН ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ *NIGELLA SATIVA***

02.00.10 - Биоорганическая химия

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

Ташкент - 2023

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2022.1.PhD/В677.

Диссертация выполнена в Институте биоорганической 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, старший научный сотрудник

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

Ибрагимов Фазил Ахмедович
доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Узбекский научно-исследовательский химико-фармацевтический институт

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 года в ___ часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.К/В.37/01 при Институте биоорганической 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 биоорганической химии (зарегистрировано под № ___). (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: nigora65@list.ru).

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2023 г.
(реестр протокола рассылки № «___» от _____ 2023 г).

Ш.И.Салихов

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

Н.Р.Хашимова

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

М.Б.Гафуров

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

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире одной из актуальных задач является поиск новых перспективных лекарственных растений для создания эффективных, малотоксичных лекарственных средств. Преимущества применения растительных средств обусловлены широким спектром фармакологических свойств, мягкостью, отсутствием побочных действий при длительном применении, так как они по своей химической природе близки организму человека и легко включаются в биохимические процессы. Важным является в связи с этим поиск новых эффективных лекарственных препаратов растительного происхождения.

На сегодняшний день в мире наблюдается тенденция к увеличению частоты неспецифического язвенного колита и прогнозируется «эпидемия» этого заболевания в Восточной Европе, в том числе и на территории Центрально-Азиатского региона. Для лечения воспалительных заболеваний кишечника применяют целый ряд пептидных препаратов, обладающий широким спектром механизма действия, включая регуляцию функции фибробластов. Разработка терапевтических пептидов, обладающих противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами, является перспективной областью в разработке лекарственных препаратов, направленных на лечение язвенных колитов.

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 Узбекистан¹ 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». В связи с этим, важное значение имеет поиск и создание наиболее эффективных отечественных препаратов из растительного сырья, не уступающих по эффективности синтетическим, но при этом обладающих низкой токсичностью, мягким терапевтическим действием, способностью комплексно влиять на различные звенья патологического процесса.

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, 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.

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

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 Westerman J., Kleinnijenhuis A., Bevers L.E. проведено изучение фосфатидил-инозитол переносящего белка (PI3P), участвующего в процессе роста клеток эпителия при повреждении тканей в присутствии эпидермального фактора роста (ЭФР) и фосфатидилхолин переносящего белка PC-TP эндогенного происхождения, участвующего в гепатоцеллюлярной селекции и транспорте билиарных фосфолипидов, в производстве сурфактанта легких, в биосинтезе лейкотриенов и в клеточном метаболизме фосфатидилхолина. В странах СНГ учеными Атауллахановым Р.И. и Чулкиной М.М. проведены исследования по изучению механизма иммуномодулирующего и регенерирующего действия тетрадекапептида в модели экспериментального язвенного колита и в культуре клеток *in vitro*.

В нашей стране огромный вклад в развитие этой отрасли внесли ученые Института биорганической 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*, обладающие тканерегенерирующей и ранозаживляющей активностями, на основе которых проведено создание фармацевтических композиций в виде мазей для наружного применения.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами исследовательского учреждения, где выполнена работа. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ Института биорганической химии по направлению «Идентификация и структурно-функциональные исследования иммуностропных и противоопухолевых соединений природного происхождения».

Целью исследования является определение усовершенствованного способа получения липид-переносящего белка из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и изучение возможности применения в заживлении и регенерации тканей в терапии язвенных колитов.

Задачи исследования:

усовершенствование способа получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa*;

изучение возможности применения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* в заживлении и регенерации тканей;

создание и изучение возможности применения композиции на основе Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* в терапии язвенных колитов;

доклиническое изучение композиции на основе Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa*.

Объектами исследования являются семена чернушки посевной *Nigella sativa* семейства *Ranunculaceae*, произрастающей в Узбекистане.

Предметом исследования является изучение специфической активности биологически активного вещества пептидной природы Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и перспективность применения в терапии язвенных колитов.

Методы исследования. При выполнении исследований использовались методы экстракции, выделения и идентификации веществ, экспериментальные модели для определения биологической активности, методы гистологии и иммунологии.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

разработан усовершенствованный способ получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa*;

впервые определено, что липид-переносящий белок Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* влияет на воспалительные и репаративные процессы;

разработана композиция в виде лиофилизата с возможностью его применения как в качестве перорального, так и ректального лекарственного средства;

определено, что Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella Sativa* и композиция на его основе оказывает выраженное противовоспалительное, противовоспалительное и жаропонижающее действия на модели острого экспериментального колита у крыс, которые проявляются в уменьшении площади язв и степени повреждения слизистой оболочки толстого кишечника.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

разработан усовершенствованный метод получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян *Nigella sativa*;

выявлено действие липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян *Nigella sativa* на моделях острого экссудативного и хронического пролиферативного воспаления и установлено, что белок влияет на воспалительные и репаративные процессы, участвует в регенерации и заживлении тканей;

на основе липид-переносящего белка Ns-LTP1 разработаны лиофилизат и ректальные, обладающие противовоспалительным и противовоспалительным действием на модели язвенного поражения толстого кишечника.

Достоверность результатов исследований подтверждается тем, что они получены с использованием современных методов биологии и биоорганической химии, применением в научном исследовании теоритических подходов и методов, использованием достаточного числа экспериментальных животных и анализов, проанализированы с использованием современных статистических методов, 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 проведено усовершенствование способа получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa*; впервые проведено изучение выделенного липид-переносящего белка Ns-LTP1 на воспалительные и репаративные процессы и участие в заживлении и регенерации тканей; определено, что липид-переносящий белок Ns-LTP1 относится к V классу практический соединений, не обладает кумулятивным действием и не оказывает токсического действия на организм при длительном применении.

Практическая значимость исследования заключается в том, что на основе липид-переносящего белка Ns-LTP1 разработана композиция в виде лиофилизата, содержащей в качестве активного начала липид-переносящий белок Ns-LTP1 и суппозитории ректальные, обладающие противовоспалительным и противоязвенным действием на модели язвенного колита у крыс, которые могут быть рекомендованы для внедрения в медицинскую практику.

Внедрение результатов исследования. На основе научных результатов, полученных при изучении специфической активности биологически активных веществ пептидной природы из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и композиции:

выделенный Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* использован при разработке комплексов трикарбоцианиновых красителей (справка Научно-исследовательского института прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко Белорусского государственного университета 90-28/59 от 16.12.2021 года). В результате это позволило расширить область применения трикарбоцианиновых красителей и разработать высокомолекулярные системы для лучевой терапии эрозивного воспаления;

полученные результаты по изучению биологической активности разработанной на основе Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* методом измерения уровня цитокинов использовали для определения иммунных механизмов патогенеза больных язвенным колитом (акт внедрения Института физиологии и иммунологии Уральского отделения Российской Академии Наук от 01.09.2022 года). В результате удалось начать исследования по выявлению иммунных механизмов патогенеза больных язвенным колитом и измерению уровня цитокинов, являющихся локальными медиаторами в тканях.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 8 международных и 1 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, из них 3 статьи опубликованы в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертаций, в том числе 1 в зарубежных и 2 в республиканских журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 118 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 **«Патогенез, симптоматика, возможности лечения язвенного колита и перспективность применения биологически активных веществ»** осуществлен подробный обзор научных исследований по теме диссертации, посвященный проблемам эпидемиологии и патогенеза язвенного колита, современным стандартам терапии воспалительных заболеваний кишечника и перспективам применения препаратов на основе биологически активных веществ пептидной природы для лечения воспалительных заболеваний кишечника.

Во второй главе под названием **«Материалы и методы исследования природных соединений белковой природы, биологической активности и токсикологии»** описаны реактивы и оборудование, методики выделения и идентификации липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и создание композиции в виде лиофилизата, методы изучения биологических свойств и токсикологии, использованные в диссертации.

В третьей главе диссертации **«Усовершенствование способа получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и изучение возможности применения в заживлении и регенерации тканей»** описаны результаты разработанного усовершенствованного способа получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и взаимодействие липид-переносящего белка с молекулами липидов на примере стеариновой кислоты. Обсуждены результаты изучения влияния Ns-LTP1 на воспалительные процессы и процессы заживления на моделях механических ран и термических ожогов, влияния на процессы заживления на модели неспецифического язвенного колита.

Для получения липид-переносящего белка были взяты семена чернушки *Nigella sativa*, которые измельчали и полученную муку обезжиривали над гексаном в аппарате Сокслета для удаления липидов и других гидрофобных компонентов.

Дальнейшее извлечение белково-пептидной суммы и получение липид-переносящего белка в индивидуальном виде проводили по разработанной схеме (схема 1).

Обезжиренные измельченные семена экстрагировали раствором 10% уксусной кислоты в соотношении 1:3. Экстракцию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. В полученном супернатанте осаждали белково-пептидную фракцию ацетоном в соотношении 1:5. Осадок высушивали и хранили в холодильнике при -4°C.

Из 100 г обезжиренных семян получено 4,5 г суммы белков и пептидов.

В результате использования комплекса хроматографических методов, получена гомогенная фракция, содержащая в своем составе Ns-LTP1 с молекулярной массой 9602 Да (рис.1).

Схема 1

Усовершенствованный способ получения липид-переносящего белка из семян чернушки посевной *Nigella sativa*



Из 100 г обезжиренных семян получено 425 мг или 0,4% чистого липид-переносящего белка.

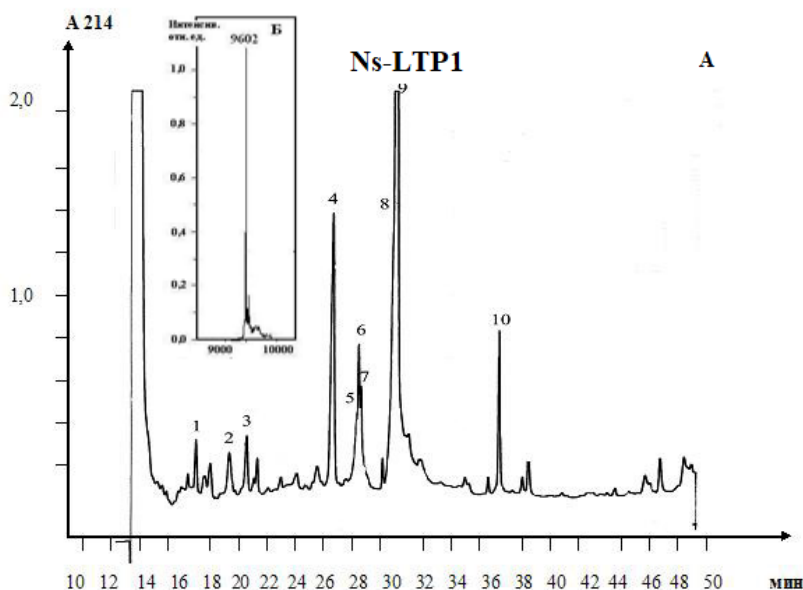


Рис.1. А) ОФ ВЭЖХ 4 фракции, полученной в результате ионнообменной хроматографии на колонке C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 (250 x 4 мм) (Dr. A. Maisch, Ammerbuch, Германия) в линейном (10-50%) градиенте растворителя В в 0,1% TFA в воде в течение 1 ч при скорости потока 1 мл/мин и температуре 40°C. Б) Масс-спектр нативного Ns-LTP1.

С использованием программного обеспечения SWISSMODEL были проведены исследования по компьютерному моделированию пространственной структуры данного липид-переносящего белка Ns-LTP1 и связыванию с липидами на примере стеариновой кислоты (рис.2).

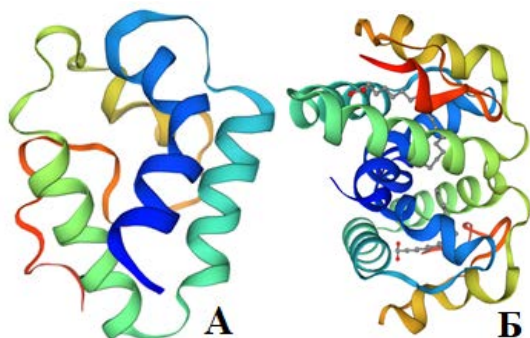


Рис. 2. Трехмерная модель А – Ns-LTP1; Б – комплекса Ns-LTP1 со стеариновой кислотой

Комплекс Ns-LTP1 имеет общую структуру пучка из четырех спиралей (от H1 до H4) с длинным С-концевым сегментом (Рис.3А). Они складываются в компактный домен с четырьмя дисульфидными связями. Эти структуры имеют большую внутреннюю гидрофобную полость, в которой связываются липиды.

Комплекс Ns-LTP1 связывает молекулы липидов с помощью туннельного гидрофобного кармана, окруженного С-концевой петлей и четырьмя α -спиралями. Углеводородные хвосты липидов вставлены в гидрофобную полость Ns-LTP1, в то время как головные группы липидов выступают из кармана связывания и направлены в сторону растворителя.

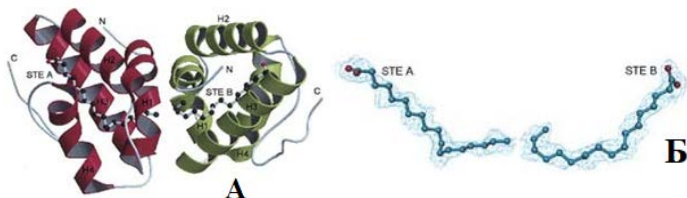


Рис.3. Общая структура комплекса Ns-LTP1: А – Ns-LTP1–STE. Б – две стеариновые кислоты (STE A & STE B) комплекса Ns-LTP1–STE.

На каждую асимметричную единицу в комплексе Ns-LTP1–STE приходится две молекулы, и каждая молекула связывает одну жирную кислоту. STE А и STE В представляют собой две жирные кислоты, наблюдаемые в асимметричном звене двух молекул Ns-LTP1. Хвосты STE А и STE В (С17–С18) имеют разную ориентацию (рис. 3.Б). STE А вытягивается из кармана связывания, хвост STE В загибается назад и образует несколько дополнительных сольватаций с Ns-LTP1. Это означает, что молекула STE В в комплексе Ns-LTP1–STE имеет наиболее благоприятную липидсвязывающую конформацию.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов разработка усовершенствованного получения липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* и показана модель взаимодействия с молекулами липидов на примере стеариновой кислоты

Воспаление является универсальной реакцией организма на действие разнообразных экзогенных и эндогенных повреждающих факторов. Воспалительный процесс является ведущим патогенетическим звеном

многих заболеваний, которые составляют около 80% всей патологии в практике врача. Одной из основных задач являлась оценка противовоспалительной активности липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* на моделях острого экссудативного и хронического пролиферативного воспаления.

Противовоспалительную активность липид-переносящего белка Ns-LTP1 выражали в % угнетения отека. Было выявлено, что при субплантарном введении 0,1 мл 2% раствора формалина у подопытных крыс развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Водный раствор липид-переносящего белка Ns-LTP1 в дозах 0,01; 0,1; 1,0 мг/кг вводили перорально за 1 час до введения формалина (таблица 1).

Таблица 1

Результаты показателей противовоспалительного действия Ns-LTP1 на модели формалинового отека

Препараты мг/кг	Кол-во животных	Прирост объема конечности относительно исходного, %				
		Сутки после введения формалина				
		3 часа	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
контроль	5	38,4±1,0	44,8±0,25	43,7±0,25	30,4±0,25	15,1±1,0
0,01	5	31,25±1,1	43,9±1,8	31,25±2,1	23,8±1,6	9,82±1,2
0,1	5	23,0±1,2	42,8±1,9	31,3±1,0	20,0±1,2	8,6±0,65
1,0	5	35,7±1,2	43,8±1,05	12,5±1,1	11,1±0,6	6,0±0,25

p < 0,05 по отношению к контролю

Так, в группе крыс, получавших липид-переносящий белок Ns-LTP1 в дозе 0,01 мг/кг, максимальный отек лапы развился через 1 сутки после введения формалина и увеличился в среднем на 43,9±1,8% по сравнению с контролем. Отек лап статистически значимо уменьшился через 3 дня после введения формалина до 31,25 ± 2,1%; к 5-му дню - до 23,8±1,6% и через 7 дней – до 9,82±1,2% по сравнению с контролем. У крыс, получавших Ns-LTP1 в дозе 0,1 мг/кг, максимальное отек лапы развилось через 1 сутки, увеличившись до 42,8 ± 1,9% относительно контроля, и постепенно уменьшилось до 31,3 ± 1,0 % через 3 дня после введения формалина и 20,0 ± 1,2% через 5 дней, а отек значительно уменьшился до 8,6 ± 0,65% к 7-му дню. У животных, получавших Ns-LTP1 в дозе 1,0 мг/кг, максимальная отечность лапы крыс составила 43,8±1,05%, а на 3-й день до 12,5±1,1, на 5-й день до 11,1±0,6%, на 7-й день снизился на 6,0±0,25 по сравнению с контролем. Исследования показали, что испытуемый белок Ns-LTP1 в концентрации 0,01; 0,1 и 1,0 мг/кг показали выраженный антиэкссудативный эффект по сравнению с контролем с 3 по 7 сутки, причем наиболее выраженный эффект наблюдался при дозе 1,0 мг/кг.

Каррагинановый отек лап мышей используется для изучения, как новых потенциальных противовоспалительных средств, так и механизмов развития воспалительного процесса. При этом кардинальные признаки воспаления – отек, гипералгезия, эритема – развиваются сразу после субплантарной инъекции без повреждения тканей воспаленной лапы, что принципиально отличает эту модель от модели с формалиновым отеком.

Исследуемый липид-переносящий белок Ns-LTP1 вводили в виде водных растворов внутрижелудочно с помощью зонда. Затем через 1 час после введения растворов под апоневроз задней лапки крысы инъецировали 0,1 мл 1 % раствора каррагинана. Оценку противовоспалительного эффекта проводили через 3 часа после индукции воспаления. Величину отека вычисляли по разнице между объемами невоспаленной и воспаленной конечности. Антиэкссудативную активность определяли по степени уменьшения отека у опытных животных в сравнении с контрольными и выражали в процентах. Через 24 часа отек стопы в контроле был еще заметен, тогда как в опыте объем стопы возвратился к исходному состоянию (таблица 2).

Таблица 2

**Влияние Ns-LTP1 на течение каррагинанового отека у крыс
(прирост объема конечности в % относительно исходного, $M \pm m$; n=6)**

Препараты	Доза, мг/кг	Прирост объема лапки через 3 часа, %	Антиэкссудативный эффект, %	P
Контроль	-	112,5±12,5		-
Ns-LTP1	0,1	75,0±6,8*	33,3±2,0	p=0.027
	1	62,5±5,0*	44,5±2,8	p=0.004

*p<0,01-достоверность по отношению к контролю

Исследования показали, что липид переносящий белок Ns-LTP1 обладает достоверной противовоспалительной активностью в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг, он через 3 часа снижает уровень отека на 33,3±2,0 и 44,5±2,8% соответственно, по сравнению с контролем и максимальное снижение наблюдалось при дозе 1,0 мг/кг.

Для оценки антипролиферативного и антиэкссудативного действия Ns-LTP1 был использован метод «ватной гранулёмы» по методу Ф.П.Тринус. Крысам, находящимся под лёгким эфирным наркозом, в области спины тщательно выстригали шерсть и в асептических условиях делали продольный разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 1-2 см. Затем пинцетом, через образовавшийся разрез кожи, в подкожной клетчатке формировали полость, в которую помещали предварительно простерилизованный ватный шарик массой 10 мг и накладывали 1–2 шва. Пептидную фракцию вводили внутрижелудочно 1 раз в сутки в течение 7 дней. Через 7 дней имплантированный шарик с образовавшейся фиброзно-грануляционной тканью извлекали и высушивали до постоянной массы при 55-60°C в течение 24 часов. Массу образовавшейся грануляционно-фиброзной ткани определяли по разнице между массой высушенной гранулёмы и массой имплантированного ватного шарика (таблица 3).

Таблица 3

Влияние Ns-LTP1 на образование грануляционно-фиброзной ткани в очаге воспаления у крыс (n=6)

Группы	Доза мг/кг	Масса экссудата, мг	Угнетение экссудации, %	Масса грануляционной ткани, мг	Угнетение пролиферации, %
Контроль	-	384,3±25,6	-	79,8±11,5	-
Ns-LTP1	10	311,0±32,1	19,1	56,0±2,43	29,8

	20	308,0±30,0	19,8	53,5±2,56	33,0
--	----	------------	------	-----------	------

p < 0,05 по отношению к контролю

Установлено, что Ns-LTP1 угнетает пролиферативные процессы на 33 % и 29,8 % и превосходит действие по антипролиферативному свойству - в 1,4 - 1,5 раза по отношению к контролю.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что изучаемый липидпереносящий белок Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* обладает анальгетическим, противовоспалительным, антипролиферативным и антиэкссудативным действием.

Экспериментальный колит с язвенными поражениями слизистой оболочки сигмовидной кишки вызывали уксусной кислотой (10 %) по методу Фицпатрик. Данный метод по гистоморфологическим и биохимическим показателям соответствует язвенному колиту у человека. Неспецифический язвенный колит, вызванный уксусной кислотой, сопровождается развитием выраженных деструктивных изменений состояний слизистой оболочки толстой кишки с отеком, гиперемией и кровоизлияниями. При воспроизведении модельной патологии у крыс наблюдали признаки общей интоксикации организма, что выражалось увеличением двигательной активности, состоянием беспокойства и агрессивности.

Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа – животные с модельной патологией, 2-я группа – животные, получавшие Ns-LTP1 в дозе 10 мг/кг, 3-я группа – животные, получавшие Ns-LTP1 в дозе 20 мг/кг, 4-я группа – животные, получавшие препарат сравнения Сульфасалазин (KRKA, Словения) в дозе 140 мг/кг. После моделирования колита экспериментальным животным перорально вводили соответствующие дозы испытуемых препаратов и по 9 крысы, по 3 животных из каждой группы забивали на 3, 6 и 9 сутки для макроскопических исследований. Первыми симптомами колита были понос с примесью слизи и крови, частые позывы на дефекацию, изменение динамики массы тела животных. Визуально, с помощью лупы, осуществляли макроскопическое исследование СОТК. Результаты исследования показали, что моделирование язвенного колита вызвало выраженные изменения слизистой оболочки толстого кишечника. У животных контрольной патологии наблюдались множественные кровоизлияния, отек, выраженная гиперемия и нарушения складчатости СОТК.

У животных, которым вводили внутривентрикулярно Ns-LTP1 в дозе 10 и 20 мг/кг, на 3-й день лечения наблюдали достоверное уменьшение воспалительного процесса: его выраженность составила 7,6 и 7,5 балла, что в 1,2 раз ниже, чем у нелеченых животных, и в 1,09 раза выше, чем у животных, леченых сульфасалазином. На 6-й день лечения Ns-LTP1 в дозе 10 и 20 мг/кг выраженность воспалительного процесса заметно уменьшилась: поражение слизистой оболочки составило 4,7 и 4,6 балла, что в 1,7 раз меньше, чем у животных в группе модельной патологии, и в 1,05 раза выше, чем у животных, которым вводили Сульфасалазин. На 9-е сутки лечения Ns-LTP1 у животных поражения СОТК были практически не выражены, т.е.

произошли регенеративные процессы. Наиболее выраженные регенеративные процессы наблюдались в группе животных, леченных Ns-LTP1 в дозе 20 мг/кг. Положительные изменения в состоянии СОТК наблюдались и в группе патологических животных, получавших препарат сравнения сульфасалазин, но процессы регенерации были менее выражены, чем у животных, получавших Ns-LTP1, и статистически значимой разницы между ними не было. (рис.4.).

В группе животных, которым вводили препарат сравнения Сульфасалазин, также наблюдали положительные изменения со стороны состояния СОТК в сравнении с патологией, но процессы регенерации были менее выражены, чем у животных, которых лечили Ns-LTP1.

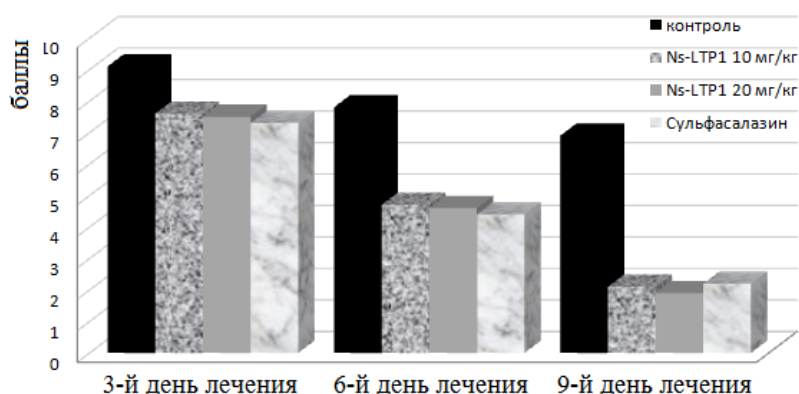


Рис. 4. Влияние Ns-LTP1 на состояние СОТК (в баллах) на фоне экспериментального язвенного колита у крыс

Таким образом, результаты проведенных исследований в данной работе показывают, что применение Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa* эффективно снимает симптомы воспаления: нормализует показатели массы тела животных и ректальной температуры опытных животных на фоне экспериментального язвенного колита, в дозе 20 мг/кг оказывает противовоспалительный и противоязвенный эффекты на модели экспериментального язвенного колита, что подтверждается показателями состояния СОТК.

В четвертой главе «Разработка и доклиническое изучение композиции для терапии язвенных колитов на основе Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella sativa*» представлены результаты изучения разработанной композиции на процессы заживления на модели неспецифического язвенного колита и результаты токсикологических исследований.

На основе биологически активного вещества из семян чернушки посевной *Nigella sativa*, представленного Ns-LTP1, в лаборатории Химии белков и пептидов под руководством д.х.н. Ощепковой Ю.И. разработана композиция в виде лиофилизата. Лيوфилизат получен путем лиофильного высушивания эмульсии типа «масло в воде», содержащей в качестве активного начала липид-переносящий белок Ns-LTP1, в соотношении водной и масляной фаз 10:1 в присутствии стабилизатора, представленного фосфолипидами яичного лецитина.

Для получения лекарственного средства в виде свечей за основу были взяты глицериновые свечи, содержащие в своем составе глицерол и стеарат натрия. Глицериновые свечи растворяли на водяной бане, и вносили разработанный лиофилизат в соотношении компонентов 50:1. Затем подготовленные ингредиенты перемешивали до полного растворения, заливали в формы для приготовления свечей и замораживали.

В качестве сведений, подтверждающих возможность использования в терапии язвенных колитов разработанной композиции в виде лиофилизата и ректальных свечей, проведено микро-и макроскопическое изучение состояния слизистой оболочки толстой кишки, количество язвенных поражений, антипролиферативное действие в очаге поражения и нормализация показателей массы тела и ректальной температуры опытных животных на фоне экспериментального язвенного колита на взрослых крысах-самцах массой 180-200 г.

Патологию воспроизводили путем введения наркотизированным крысам в толстую кишку 0,5 мл 10 % уксусной кислоты и через 10 сек - 3 см³ воздуха. После моделирования колита экспериментальным животным со 2-дня и 9 дней вводили перорально композицию, содержащую оптимальную дозу Ns-LTP1 20 мг/кг и 140 мг/кг Сульфасалазин. Подопытных животных забивали на 3, 6 и 9 сутки лечения и брали на исследование толстую кишку. Проводили визуальный осмотр, оценивали состояние слизистой оболочки толстой кишки (СОТК), количество язвенных поражений. Степень поражения оценивали в баллах по шкале: отек - 1 балл; гиперемия - 2 балла; кровоизлияния: точечные - 3 балла; слитые - 4 балла; эрозии: единичные, каждая эрозия - 5, эрозия с кровотечением - 6 баллов; язва - 7 баллов. Сумма баллов подсчитывалась для каждого животного. Измеряли площадь язв, массу тела и ректальную температуру экспериментальных животных на 3, 6, 9-е сутки лечения.

Анализируя показатели ректальной температуры, обнаружено, что в группе животных контрольной патологии температура резко возросла и на 3-и сутки была выше исходных данных на 2°C (максимум повышения ректальной температуры) и выше, чем у животных опытных групп, получавших лечение испытываемыми препаратами. В то же время, у животных, которым в лечебно-профилактическом режиме вводили композицию с Ns-LTP1, показатели ректальной температуры на 3, 6 и 9-е сутки лечения достоверно отличались от исходных данных. Этот показатель подтверждает жаропонижающие свойства Ns-LTP1.

Визуально, с помощью лупы, осуществляли макроскопическое исследование СОТК. У подопытных животных макроскопически исследовали участок слизистой оболочки толстой кишки и по данным, полученным на 3-и сутки, язву толстой кишки у животных контрольной группы оценили в среднем в $4,32 \pm 0,35$ балла (таблица 4).

У животных контрольной патологии процессы регенерации происходили медленно, о чем свидетельствуют сохраняющиеся признаки воспаления: кровоизлияния, отечность, гиперемия. У животных, которым вводили внутривенно в лечебно-профилактическом режиме

композицию с Ns-LTP1 наблюдали достоверное уменьшение воспалительного процесса: его выраженность составила $2,33 \pm 0,25$ сумма балла, что в 1,85 раз ниже, чем у нелеченных животных, и в 1,25 раза ниже, чем у животных, леченых Сульфасалазином.

На 6-й день лечения композицией с Ns-LTP1 выраженность воспалительного процесса заметно уменьшилась: поражение слизистой оболочки составило в сумме $2,35 \pm 0,24$ балла, что в 5,7 раза меньше, чем у животных в группе модельной патологии, и в 3,4 раза меньше, чем у животных, которым вводили Сульфасалазин. На 9-е сутки эксперимента у животных группы патологического контроля сохранялись признаки воспаления, которые достоверно отличались от таковых у животных, получавших композиции с Ns-LTP1 и сульфасалазин: у контрольных животных общая площадь поверхности поврежденного участка толстой кишки оценивалась баллом $0,70 \pm 0,087$, что в 2,3 раза выше, чем у животных, получавших композицию Ns-LTP1, и в 2,1 раза выше, чем у получавших сульфасалазин.

Таблица 4

Влияние композиции с Ns-LTP1 на состояние СОТК (в баллах) на фоне экспериментального язвенного колита у крыс

Препараты Суммарная доза	Отек 1 балл	Гиперемия 2 балла	Кровоизлияния: точечные 3 балла	Слитые 4 балла	Эрозии единичные, каждая эрозия 5 баллов	эрозия с кровотечением 6 баллов	Язва 7 баллов	Сумма баллов
Контроль								
3-й день	$0,62 \pm 0,04$	$1,23 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,1$	$3,10 \pm 0,25$	$3,7 \pm 0,27$	$4,32 \pm 0,35$	$17,3 \pm 1,17$
6-й день	$0,48 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,10$	$1,9 \pm 0,03$	$2,4 \pm 0,25$	$2,9 \pm 0,28$	$3,38 \pm 0,37$	$13,4 \pm 1,11$
9-й день	$0,023 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,007$	$0,07 \pm 0,005$	$0,093 \pm 0,005$	$0,12 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,025$	$0,2 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,087$
Композиция (Ns-LTP1 20 мг/кг)								
3-й день	$0,33 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,1$	$1,67 \pm 0,3$	$2,00 \pm 0,2$	$2,33 \pm 0,25$	$9,32 \pm 1,0^*$ $p=0,01$
6-й день	$0,08 \pm 0,005$	$0,17 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,035$	$0,33 \pm 0,025$	$0,42 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,05$	$2,35 \pm 0,24^*$ $p=0,002$
9-й день	$0,01 \pm 0,003$	$0,02 \pm 0,003$	$0,03 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,004$	$0,05 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,004$	$0,07 \pm 0,006$	$0,28 \pm 0,02^*$ $p=0,01$
Сульфасалазин 140мг/кг								
3-й день	$0,42 \pm 0,05$	$0,83 \pm 0,07$	$1,25 \pm 0,13$	$1,67 \pm 0,15$	$2,1 \pm 0,23$	$2,5 \pm 0,15$	$2,92 \pm 0,27$	$11,7 \pm 1,05^*$ $p=0,03$
6-й день	$0,29 \pm 0,027$	$0,56 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,065$	$1,15 \pm 0,12$	$1,4 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,17$	$2,02 \pm 0,22$	$8,01 \pm 0,76^*$ $p=0,02$
9-й день	$0,01 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,004$	$0,07 \pm 0,005$	$0,08 \pm 0,005$	$0,33 \pm 0,02^*$ $p=0,02$

На 3-й день лечения оценивали влияние композиции Ns-LTP1 и сульфасалазина на язву, а также у животных контрольной группы с патологией путем определения поверхности язвы толстой кишки (рис.4). В контрольной группе с патологией она составила $61,67 \pm 6,16\%$, а в группах композиции Ns-LTP1 и Сульфасалазина $33,33 \pm 3,4$ и $41,67 \pm 4,72\%$ соответственно и можно видеть, что площадь язвы в группе композиции с

Ns-LTP1 была в 1,85 раза меньше, чем в контрольной группе, и в 1,25 раза меньше, чем в группе Сульфасалазина. На 6-й день эксперимента этот же показатель составил $48,3 \pm 4,1\%$ в контрольной группе, в группах, получавших композицию Ns-LTP1 и Сульфасалазин $8,33 \pm 0,78\%$; $28,8 \pm 2,7\%$ соответственно. Было установлено, что язвенная поверхность в группе композиции Ns-LTP1 была в 5,8 раза меньше, чем в контрольной группе, и в 3,5 раза меньше, чем в группе, получавшей Сульфасалазин. При осмотре на 9-й день эксперимента, площадь ($1 \pm 0,09\%$) язвы толстого кишечника в группе животных, получивших композиции с Ns-LTP1, уменьшилась в 2,3 раза по сравнению с контрольной группой ($2,33 \pm 0,29\%$), а по сравнению с группой Сульфасалазина ($1 \pm 0,1\%$) оказались практически равными.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что композиция с Ns-LTP1 в дозе 20 мг/кг эффективно уменьшает симптомы воспаления и оказывает положительное влияние на воспалительно-противоязвенное, а также на интенсивность процесса регенерации при индуцированном язвенном колите у экспериментальных животных.

Аналогичный эксперимент на модели язвенного колита был проведен на композиции в виде ректальных свечей. Экспериментальным животным со 2-дня и 9 дней после моделирования колита вводили ректально композицию в виде свечей, содержащую оптимальную дозу Ns-LTP1 20 мг/кг и Салофальк, свечи ректальные, 500 мг (Производитель: Др Фальк, Германия) в качестве препарата сравнения (рис.5).

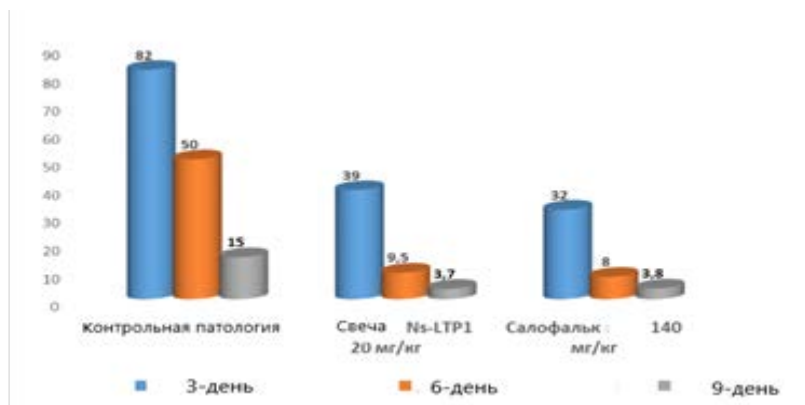


Рис. 5. Влияние композиции с Ns-LTP1 и Салофальком на состояние СОТК (в баллах) на фоне экспериментального язвенного колита у крыс

На 9-е сутки лечения композицией с Ns-LTP1 в виде ректальных свечей поражения толстого кишечника у животных СОТК были практически невыражены, это означает, что произошли регенеративные процессы. Полученные результаты сравнимы с положительными изменениями, произошедшими в группе животных, которым вводили препарат сравнения Салофальк.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что композиция с Ns-LTP1 в дозе 20 мг/кг эффективно уменьшает симптомы воспаления и оказывает положительное влияние на воспалительно-противоязвенное, а также на интенсивность процесса регенерации при индуцированном язвенном колите у экспериментальных животных.

Для оценки процессов заживления слизистой оболочки толстого кишечника на 3-й и 9-й дни эксперимента было отобрано по 3 животных из каждой группы, проведено патологоанатомическое вскрытие для визуального осмотра состояния слизистой оболочки. Образцы толстого кишечника консервировали в 12% растворе формалина, приготовленные из них гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали под световым микроскопом (рис.6.)

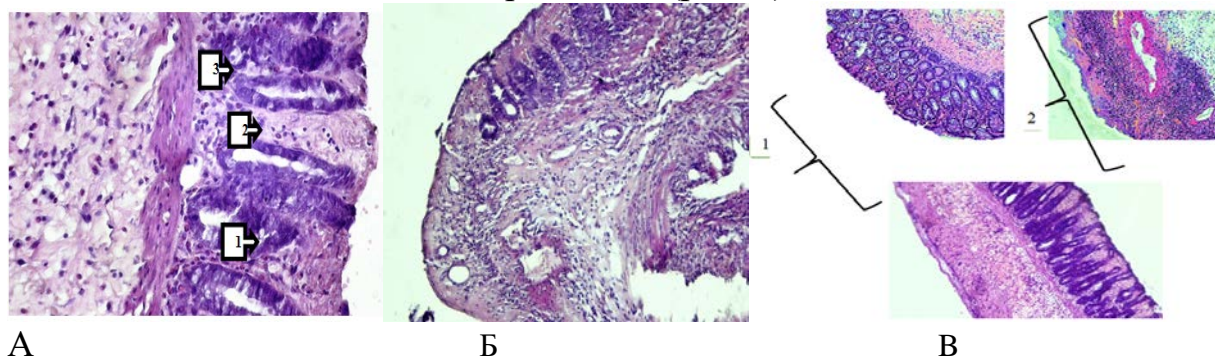


Рис.6: 9-й день лечения: А) контрольная группа - наблюдается средняя метаплазия покрывающего эпителия (1). Из-за рубцевания интерстициальной ткани (2) наблюдается железистое сужение (3). Б) Сульфасалазин - на месте острых эрозивных изменений образуются разреженные соединительнотканые рубцы, умеренные следы серозного экссудата. Строма состоит из соединительной ткани, фибробластов и фиброцитов. Есть участки, где формируются фиброзные (коллагеновые) структуры, а гиперемия капилляров не обнаруживается, В) композиция с Ns-LTP1. Ns-LTP1 оказывает стабилизирующее действие на клеточную мембрану (гликолипидный и гликопротеиновый слой - гликокаликс). Регенерация, трансформация клеток и дифференцировка эрозивных (1) некротических (2) поражений достигаются за счет регенерации эпителиальных клеток слизистой оболочки. Окрашивание препаратов проведены гематоксилин-эозином, микроскопический анализ проводили при увеличении 4x10 и 4x20.

При микроскопическом изучении эрозированных образцов толстого кишечника определено, что действие Ns-LTP1 на слизистую желудочно-кишечного тракта происходит быстрее и полнее, чем у традиционных препаратов, без резкого ограничения площади воспалительной инфильтрации, тем самым ускоряя заживление ран. Фосфолипиды, входящие в Ns-LTP1, стабилизируют клеточную мембрану, подавляя деструктивные изменения в поврежденных клеточных мембранах. Появление гранул гетерохрамина в ядрах поврежденных клеток в препаратах указывает на деление и регенерацию клеток. На основании этого выявляются частичный (субституция) и полный (реституция) очаги репаративной регенерации вокруг пораженной области.

В результате проведенных исследований по изучению влияния липид-переносящего белка и композиции на его основе на фоне экспериментального язвенного колита у крыс установлено, что Ns-LTP1 из семян чернушки посевной *Nigella Sativa* и композиция на его основе оказывает выраженное противоязвенное, противовоспалительное и жаропонижающее действия на модели острого экспериментального колита у крыс, которые проявляются в уменьшении площади язв и степени повреждения слизистой оболочки толстого кишечника.

Водный раствор композиции Ns-LTP1 вводили в желудок мышей в дозах 2000, 3000, 4000 и 5000 мг/кг и оценивали его острую токсичность. По полученным результатам установлено, что средняя летальная доза составляет $LD_{50} > 5000$ мг/кг, а данная композиция по токсичности относится к классу V – практически нетоксичных химических веществ. Также в ходе экспериментов выяснилось, что композиция Ns-LTP1 не обладает кумулятивными свойствами. В течение 1 месяца крысам ежедневно внутрижелудочно вводили композицию с Ns-LTP1 в дозах 20; 40; 80 мг/кг и оценили его хроническую токсичность. В исследованиях композиция с Ns-LTP1 не оказывал токсического действия на количество и морфологию клеток состава периферической крови подопытных животных, а также на функциональное состояние печени и почек.

Исследовано местнораздражающее действие композиции с Ns-LTP1, являющееся специфическим токсическим свойством, и установлено, что 0,5 и 5% водные растворы композиции не оказывали раздражающего действия на кожу крыс и конъюнктиву глаз кроликов. Также результаты экспериментов по эмбриотоксичному и тератогенному действию показали, что композиция с Ns-LTP1, полученная из семян *Nigella sativa*, не оказывает негативного влияния на репродуктивную функцию и развитие эмбрионов крыс. Возможную мутагенную активность композиции с Ns-LTP1 определяли путем микроскопического анализа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мыши *in vivo*. Полученные результаты показали, что композиция с Ns-LTP1 в дозах 20 мг/кг, 500 мг/кг и 1000 мг/кг не оказывает мутагенного действия на хромосомы клеток костного мозга мыши в пределах чувствительности метода. Цитогенетические анализы проводились совместно со старшим научным сотрудником лаборатории Фармакологии и скрининга БАВ, к.б.н. Якубовой Р.А.

Исследования, проведенные совместно с сотрудником Института Иммунологии и геномики человека АН РУз д.м.н. Исмаиловой А.А., по изучению индуцирующей способности разработанной композиции на выработку про- и противовоспалительных цитокинов у больных язвенным колитом в фазе активного воспаления показали, что композиция дозозависимо оказывает стимулирующее действие на выработку противовоспалительных цитокинов и ингибирующее действие на выработку провоспалительных цитокинов.

Таким образом, выраженные лечебно-профилактические эффекты Ns-LTP1 и композиций на его основе на модели язвенного поражения толстого кишечника позволяют рекомендовать липид-переносящий белок Ns-LTP1 для использования при разработке лекарственных препаратов для лечения язвенный колит.

ВЫВОДЫ

1. Разработан усовершенствованный метод выделения белка Ns-LTP1 из семян *Nigella sativa*, в результате чего выход гомогенного белка увеличился с

0,19% до 0,4%. Компьютерным моделированием показано взаимодействие Ns-LTP1 с молекулами липидов на примере стеариновой кислоты.

2. Впервые установлено, что белок Ns-LTP1, полученный из семян посевной чернушки *Nigella sativa*, влияет на воспалительные и репаративные процессы, участвует в процессах заживления и регенерации тканей.

3. Определено, что липид-переносящий белок Ns-LTP1 относится к V классу малотоксичных соединений, не обладает кумулятивным действием и не оказывает токсического действия на количественный состав и морфологию периферической крови, на функцию почек и печени, не оказывает раздражающего и аллергизирующего действия на кожу, не вызывает анафилактического шока.

4. Разработана композиция в виде лиофилизата путем лиофильного высушивания эмульсии типа «масло в воде», содержащей в качестве активного начала липид-переносящий белок Ns-LTP1, в соотношении водной и масляной фаз 10:1 в присутствии стабилизатора, представленного фосфолипидами яичного лецитина.

5. Установлено, что липид-переносящий белок Ns-LTP1 и композиция на его основе оказывают выраженное противовоспалительное, противовоспалительное и жаропонижающее действия на модели острого экспериментального колита у крыс, которые проявляются в уменьшении площади язв и степени повреждения слизистой оболочки толстого кишечника.

6. В результате изучения специфической токсикологии определено, что липид-переносящий белок Ns-LTP1 не проявляет мутагенной активности в тесте на индукцию аббераций хромосом в клетках костного мозга *in vivo*, не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия, и не вызывает изменений репродуктивной функции.

7. На основе липид-переносящего белка Ns-LTP1 разработаны суппозитории ректальные, обладающие противовоспалительным и противоязвенным действием на модели язвенного колита у крыс.

**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

AMANLIKOVA DILFUZA ABDUGANIEVNA

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF LIPID-TRANSPORTING PROTEIN FROM
SEEDS OF *NIGELLA SATIVA***

02.00.10 –Bioorganic chemistry

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

Tashkent – 2023

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 B2022.1.PhD/B677

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, Senior Researcher

Official opponents: **Ramazanov Nurmurod Sheralievich**
doctor of chemical sciences, professor
Ibragimov Fazil Akhmedovich
doctor of biological sciences, Senior Researcher

Leading organization:

Defense will take place on _____ 2023 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: nigora65@list.ru).

Abstract of the dissertation is distributed on «___» _____2023.
(protocol at the register No _____ dated ___ 2023).

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

N.R.Khashimova
Acting Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, D.B.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 to determine an improved method for obtaining lipid-transfer protein from the seeds of *Nigella sativa* and to study the possibility of using it in healing and tissue regeneration in the treatment of ulcerative colitis.

The object of the research work is black cumin *Nigella sativa* seeds of the family *Ranunculaceae* growing in Uzbekistan.

Scientific novelty of the research work:

developed an improved method for obtaining lipid-transfer protein Ns-LTP1 from the seeds of *Nigella sativa*;

for the first time, it was determined that the lipid-transferring protein Ns-LTP1 from the seeds of *Nigella sativa* affects inflammatory and reparative processes;

a pharmaceutical composition has been developed in the form of a lyophilizate with the possibility of its use both as an oral and rectal drug;

It was determined that Ns-LTP1 from *Nigella Sativa* seeds and the composition based on it has a pronounced antiulcer, anti-inflammatory and antipyretic effect on the model of acute experimental colitis in rats, which manifests itself in a decrease in the area of ulcers and the degree of damage to the mucous membrane of the large intestine.

Implementation of the results. Based on the results obtained in the study of the specific activity of biologically active substances of a peptide nature from the seeds of *Nigella sativa* and a pharmaceutical composition based on them:

Ns-LTP1 isolated from seeds of *Nigella sativa* was used in the development of tricarbocyanine dye complexes (reference of the A.N. Sevchenko Scientific Research Institute of Applied Physical Problems of the Belarusian State University 90-28/59 of 16.12.2021). As a result, this made it possible to expand the scope of tricarbocyanine dyes and develop high-molecular systems for radiation therapy of erosive inflammation;

the obtained results on the study of the biological activity of Ns-LTP1 developed from the seeds of *Nigella sativa* by measuring the level of cytokines were used to determine the immune mechanisms of the pathogenesis of patients with ulcerative colitis (act of implementation of the Institute of Physiology and Immunology of the Ural Department of the Russian Academy of Sciences dated September 1, 2022). As a result, it was possible to start research on identifying the immune mechanisms of the pathogenesis of patients with ulcerative colitis and measuring the level of cytokines, which are local mediators in tissues.

The structure and scope of the dissertation. The content of the dissertation consists of introduction, four chapters, conclusions, list of references and appendices. The volume of the dissertation is 118 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS
I бўлим (I часть; I part)

1. Аманликова Д.А., Баратов К., Ощепкова Ю.И. Влияние биологически активных веществ на массу тела и температуру при экспериментальных язвенных колитах // Инфекция, иммунитет и фармакология, – 2021. – № 2. – С.232-239 (03.00.00; №7)

2. Amanlikova D.A. and Oshchepkova Yu.I. Influence of biologically active peptides on the course of experimental ulcerative colitis // Pharmaceutical Chemistry Journal, – 2021. – Vol. 55. – No.7. – P.679-683. DOI: 10.1007/s11094-021-02477-y (Scopus, IF 0.63)

3. Султанова Э.М., Аманликова Д.А., Абдугафурова Д.Г., Ощепкова Ю.И. Изучение иммуотропной активности экстрактов *RAPHANUS SATIVUS* // Инфекция, иммунитет и фармакология, – 2022. – № 4. – С.210-216 (03.00.00; №7).

II бўлим (II часть; Part II)

1. Аманликова Д.А., Рахмонова Г.Г., Ощепкова Ю.И. Антиэкссудативный и антипролиферативный эффект биологически активных веществ пептидной природы из семян чернушки посевной *Nigella sativa* // SCI-ARTICLE, – 2019. – №75 – С.105-114.

2. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Biochemical and morphological parameters of peripheral blood in the study of acute and chronic toxicity of biologically active compounds of plant origin // International Independent Scientific Journal, – 2020. – Vol.13 – No.2. – P.51-53.

3. Amanlikova D.A., Oshepkova Y.I. Tissue generating activity on models of mechanical wounds and thermal burns // XIII International Symposium “Actual problems of Chemistry, Biology and Technology of Natural Compounds” Shanghai, October 16–19, – 2019. – P.60.

4. Аманликова Д.А., Рахмонова Г.Г., Ощепкова Ю.И. Противовоспалительная активность биологически активных веществ пептидной природы // Биофармацевтический журнал, – 2020. – Т. 12. – № 5. – С. 33-36. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-5-33-36.

5. Amanlikova D.A., Abdugafurova D.G., Babaev Kh.N., Allaberganov D.Sh., Oshchepkova Yu.I. The research of the application possibility of the composition based on lipid-transporting protein (Ns-Ltp1) from the seeds of *Nigella Sativa* in the treatment of ulcer collites// Nat. Volatiles & Essent. Oils, – 2021. – Vol. 8. – No.4. – P.14885-14891 (IF 0.65).

6. Ощепкова Ю.И., Аманликова Д.А. Изучение эмбриотоксического и терратогенного действия биологически активных веществ пептидной природы// Биофармацевтический журнал, 2022. – Т.14. – № 1. – С.46-50. DOI: 10.30906/2073-8099-2022-14-1-46-50.

7. Аманликова Д.А., Рахмонова Г.Г., Ощепкова Ю.И. Изучение противовоспалительной активности биологически активных веществ при формалиновом отеке лапы у крыс // Научно-практическая конференция с международным участием «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы», Ташкент, 15-16 ноября, – 2019 г. – С.378-380.

8. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Тканерегенерирующая активность биологически активных веществ на моделях механических ран и термических ожогов // Международная научно-практическая конференция ТГМУ им.Абу али ибни Сино «Медицинская наука XXI века – взгляд в будущее», г.Душанбе, Таджикистан, 29 ноября, – 2019 г. – том III. – С.223-225.

9. Аманликова Д.А., Рахмонова Г.Г., Ощепкова Ю.И. Противовоспалительные свойства биологически активных веществ *Nigella sativa* // Материалы научной конференции «Проблемы биофизики и биохимии-2020», г.Ташкент, 22 мая, – 2020 г. – С.43-44.

10. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия биологически активных веществ // “Инновации в науке и образовании” Материалы докладов I республиканской научно-практической конференции с международным участием, г. Андижан, 20 июля, – 2020 г. – С.99-100.

11. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Биологически активные пептиды семян чернушки посевной *NIGELLA SATIVA*, обладающие противовоспалительной активностью // III Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке», ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г.Москва, Россия, 25 ноября, – 2020 г. – С.174-177.

12. Аманликова Д.А., Баратов К., Ощепкова Ю.И. Влияние биологически активных веществ пептидной природы на заживление ацетатной язвы // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации», г.Электрогорск, Московская область, Россия, 27 ноября, – 2020 г. Известия ГГТУ, – 2020, – №4. – С.53.

13. Кузиева З.Н., Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Изучение взаимодействия липид-переносящего белка из семян чернушки посевной *Nigella sativa* с молекулами липидов // V international scientific and practical conference "Abu Ali Ibn Sino (Avicenna) and innovations in modern pharmaceuticals", Tashkent city, Republic of Uzbekistan, May 21th, – 2022. – P.162-163.

14. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Возможность применения фармацевтической композиции на основе липидпереносящего белка в терапии язвенных колитов // V international scientific and practical conference "Abu Ali Ibn Sino (Avicenna) and innovations in modern pharmaceuticals", Tashkent city, Republic of Uzbekistan, May 21th, – 2022. – P.128.

15. Аманликова Д.А., Ощепкова Ю.И. Моделирование связывания липид-переносящего белка из семян *Nigella sativa* с молекулами липида // VI

international scientific and practical conference "Abu Ali Ibn Sino (Avicenna) and innovations in modern pharmaceuticals", Tashkent city, Republic of Uzbekistan, May 18 th, – 2023. – P.201-202.

Автореферат «Ўзбекистон биология журналы» тахририятида тахрирдан
ўтказилди ва унинг ўзбек, рус ва инглиз тили матнлари мос келади