

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ  
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**ОЩЕПКОВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА**

***NIGELLA SATIVA*НИНГ АНТИМИКРОБ ПЕПТИДЛАРИ  
СТРУКТУРАСИ, БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ ВА УЛАР АСОСИДА  
ФАРМАЦЕВТИК КОМПОЗИЦИЯ ЯРАТИШ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё  
(кимё фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент - 2016 йил**

**Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси**  
**Оглавление автореферата докторской диссертации**  
**Content of the abstract of doctoral dissertation**

Ощепкова Юлия Игоревна <i>Nigella sativa</i> нинг антимикроб пептидлари структураси, биологик фаоллиги ва улар асосида фармацевтик композиция яратиш.....	3
Ощепкова Юлия Игоревна Структура, биологическая активность антимикробных пептидов <i>Nigella sativa</i> и создание фармацевтической композиции на их основе.....	31
Oshchepkova Yuilia Igorevna Structure, biological activity of antimicrobial peptides of <i>Nigella sativa</i> and creation of pharmaceutical composition on their basis.....	59
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works .....	85

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ  
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 РАҚАМЛИ  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ**

**ОЩЕПКОВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА**

***NIGELLA SATIVA*НИНГ АНТИМИКРОБ ПЕПТИДЛАРИ  
СТРУКТУРАСИ, БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИ ВА УЛАР АСОСИДА  
ФАРМАЦЕВТИК КОМПОЗИЦИЯ ЯРАТИШ**

**02.00.10 – Биоорганик кимё  
(кимё фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент - 2016 йил**

**Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.3-4.К49 рақам билан рўйхатга олинган.**

Докторлик диссертацияси академик О.С.Содиков номидаги Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (<http://ss.biochem.uz>) ва «ZiyoNet» таълим ахборот тармоғида ([www.ziyoNet.uz](http://www.ziyoNet.uz)) жойлаштирилган.

**Илмий  
маслаҳатчи:**

**Вешкурова Ольга Николаевна**  
кимё фанлари доктори

**Расмий  
оппонентлар:**

**Ташмухамедов Мирожиддин Салахович**  
кимё фанлари доктори, профессор

**Салимов Баходир Тахирович**  
кимё фанлари доктори, профессор

**Азизов Умурхан Мухтарович**  
кимё фанлари доктори, профессор

**Етакчи ташкилот:**

**Тошкент фармацевтика институти**

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги 16.07.2013./К/В/Т.13.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2016 йил «\_\_» \_\_\_\_\_соат \_\_\_\_да ўтадиган мажлисида бўлади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 83.Тел.: 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улугбек кўч., 83.Тел.: 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: [asrarov54@mail.ru](mailto:asrarov54@mail.ru)).

Автореферат 2016 йил «\_\_» \_\_\_\_\_да тарқатилди.  
(2016 йил \_\_\_\_\_даги №\_\_\_\_ рақамли реестр баённомаси)

**А.С.Тураев**

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш раиси, к.ф.д., профессор

**М.И.Асраров**

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д., профессор

**А.А.Ахунов**

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш ҳузуридаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

## КИРИШ (Докторлик диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Доривор воситалар ишлаб чиқаришда асосий йўналиш маҳаллий ўсимлик хом ашёларидан олинadиган биологик фаол моддалар асосида янги фармацевтик препаратлар яратиш ҳисобланади.

Ўзбекистоннинг бой ўсимлик ва ҳайвонот олами тиббиёт ва қишлоқ хўжалигида фойдаланиладиган қимматли биологик фаол моддаларнинг потенциал манбаси бўлиб хизмат қилади. Маҳаллий ўсимликлар орасида айиктовондошлар – *Ranunculaceae* оиласига мансуб бўлган седана — *Nigella sativa* L. ўсимлиги доривор хусусиятга эгаллиги билан диққатни ўзига тортади. Седана *Nigella sativa* уруғи юқори самарали сийдик, сафро ҳайдовчи, енгил ич сурувчи ва иммунитетимуллаш воситалари сифатида кўплаб касалликларда қўлланилади. Шунга ўхшаш унинг айрим компонентлари организмдаги нейрогуморал ва гистамин бузилиши билан боғлиқ турли дерматологик касалликларни даволашда жуда яхши натижа беради. Дерматологияда атопик дерматит, идеосинкрязияда қўлланилади, тери иммунитетини тиклайди, кучли антиоксидант таъсир кўрсатади, терида қон тўпланиш жараёнини бартараф этади.

Антимикроб фаоллик намоён қилувчи янги табиий бирикмаларни аниқлаш тиббиётда инфекция ва замбуруғ касалликлари терапиясида доривор воситалар компонентлари сифатида жуда катта амалий аҳамият касб этади. Антимикроб оқсил ва пептидларни тиббиёт соҳасида қўллаш анъанавий қўлланиладиган антибиотиклар ва антимикотикларга муқобил бўлади. Маълумки, сўнгги ўн йилликда тиббиёт амалиётида антибиотиклардан кенг фойдаланиш натижасида микроорганизмлар томонидан уларга нисбатан чидамлилик ортиб бораётганлиги кузатилмоқда. Натижада ҳозирги кунда фойдаланилаётган кўплаб антибиотикларга чидамли штаммлар пайдо бўлди. Бу жиҳатдан антимикроб оқсиллар ва пептидлар жуда ҳам истиқболли ҳисобланади, чунки улар кенг спектрда самарали ва тез таъсир қилади, салбий оқибатлар келтириб чиқармайди.

Седана уруғи кимёвий таркибини ўрганиш соҳасидаги тадқиқотлар етарли даражада кенг. Уруғ таркибидаги липидлар, углеводлар, фенол бирикмалар ажратилган ва тавсифланган, бироқ пептидлар ҳали тавсифланмаган, шунинг учун седана уруғининг янги юқори фаолликка эга бўлган антимикроб пептид ва оқсилларини атрофлича ўрганиш истиқболли йўналиш ҳисобланади, шу каби янги бирикмаларни аниқлаш, ажратиб олиш биоорганик кимё ва тиббиёт соҳасидаги долзарб масалалардан биридир.

Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2006 йил 14 июлдаги ПҚ 416-сон «Маҳаллий дори-дармон ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқарувчиларни қўллаб-қувватлаш чора тадбирлари тўғрисида»ги қарорида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши устувор йўналишларига боғлиқлиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналиши доирасида бажарилган.

**Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.**

Ҳар хил турдаги тирик организмлардан антимикроб пептидларни излаб топиш, ажратиб олиш, тузилиши, биологик хоссалари ва молекуляр таъсир механизмини ўрганишга йўналтирилган илмий тадқиқотлар дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан, Uppsala University (Швеция), The State University of New Jersey (АҚШ), Massey University (Янги Зеландия), акад. М.М.Шемякин ва Ю.А.Овчинников номидаги Биоорганик кимё институти (Россия), University of Calgary (Канада), Centre for Infection and Immunity Amsterdam, University of Amsterdam (Нидерландия) ва Ўзбекистон Миллий университетида амалга оширилмоқда.

Антимикроб пептидларни аниқлаш, ажратиш, тузилишини исботлаш, биологик хоссалари ва молекуляр таъсир механизмини ўрганиш бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида бир қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган; янги дори препаратларини яратиш учун пролин/аргининга бой пептидлар ажратиб олинган ва тавсифланган (Massey University); денгиз халқали чувалчанглари *Arenicola marina* целоцитларидан граммусбат ва грамманфий бактерияларга қарши антимикроб фаоллик намоён қилувчи ареницинлар деб номланган янги пептидлар ажратиб олинган (Uppsala University); ареницинлар ва уларнинг прекурсорлари генларининг аниқланган тўлиқ бирламчи тузилиши улар антимикроб пептидлар гуруҳининг олдин маълум бўлган ҳеч қандай синфига тегишли бўлмаган янги пептид синфи экани аниқланган (University of Calgary); тузилиши билан фарқ қиладиган антимикроб пептидларнинг ўзига хос захарли таъсирларини молекуляр механизмларини аниқлаш мақсадида солиштирма таҳлиллар ўтказилган (Цитология институти, Россия).

Дунёда антимикроб пептидлар бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: тиббиётда янги доривор препаратлар яратиш учун потенциал бирикмаларни излаб топиш; қишлоқ хўжалигида айрим патогенларга чидамли бўлган трансген ўсимликлар яратиш; ажратилган антимикроб пептидларнинг тузилиши ва таъсир механизми ўртасидаги ўзаро боғлиқликни аниқлаш.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Ҳозирги вақтда ўсимликлардан олинган ва кенг миқёсда антимикроб фаоллик намоён қилувчи 4000 дан ортиқ оксиллар ва пептидлар маълум. Ушбу оксил ва пептидларнинг ўзига хос хусусияти липид қаватининг бузилиши ва хужум қилаётган хужайранинг лизисига олиб келувчи мембрана цитоплазмаси билан носпецифик ўзаро таъсирлашувидир.

Кўплаб хорижий олимлар Н.А. Scheraga, М. Khalili, А. Liwo, Y. Zhang, R.F. Murray, Н.W. Harper, D.K. Granner, Р.А. Mayes томонидан ўсимлик, ҳайвонлар, планктонлар ва микроорганизмлардан антимикроб пептидларни

ажратиб олиш, тузилиши, биологик хоссалари ва молекуляр таъсир механизмини ўрганиш бўйича тадқиқотлар олиб борилган. Антимикроб пептидларнинг янги синфлари аниқланган (F. R.Terras, H. M.Schoofs, K.A.T.Silverstein). Биополимерларнинг матрица синтезидаги роли, уларнинг организмлар ҳаётий фаолиятидаги таъсир механизмини тушуниш, тузилиши ва функцияси ўртасидаги боғлиқликни ўрганиш бўйича катта муваффақиятларга эришилди (M.Montal, P.Mueller). Бунда тадқиқот усулларини такомиллаштириш, оксил ва пептидларни ажратиш учун янги усулларнинг вужудга келиши муҳим аҳамият касб этди. 2012 йилда оксиллар ҳақидаги маълумотлар Банки (Protein Data Bank) 87 000 га яқин оксил тузилишини ўз ичига олган.

Антимикроб пептидларни физик-кимёвий тавсифлаш, таъсир механизмини ўрганишга бағишланган илмий изланишлар МДХ давлатларида Е.В.Гришин, Ц.А.Егоров, В.Х.Хавинсон, П.Л.Привалов, В.Б.Белобородов томонларидан олиб борилмоқда.

Ўзбекистонда оксиллар ва пептидларни ажратиш бўйича дастлабки изланишлар, уларнинг биологик фаолликлари тадқиқоти А.С.Содиқов ва Ш.И.Салихов раҳбарликлари остида амалга оширилган. Биоорганик кимё институти ва Ўсимлик моддалари кимёси институтида қатор йиллар давомида доривор препаратлар яратиш учун хом ашё манбаларини аниқлаш мақсадида доривор ўсимлик хом ашёларини излаб топиш ва ўрганиш ишлари олиб борилмоқда (Н.Д.Абдуллаев, У.М.Азизов).

Тошкент фармацевтика институти томонидан седана уруғини кимёвий таркибини ўрганиш ва фармакогностик тадқиқотлар бўйича чуқурлаштирилган изланишлар олиб борилган (И.К.Азизов, Ш.А.Темурова). Олинган натижалар яллиғланишга қарши янги самарали доривор восита сифатида тавсия этилди. Лекин ҳозирги кунга қадар оксил-пептид табиатли бирикмалар асосида доривор препаратлар яратилмаган.

**Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг М-11 «Марказий Осиё айрим заҳарли ҳайвонлари ва ёввойи ўсимликларининг биологик фаол пептидларини ўрганиш» Ўзбекистон-Россия лойиҳаси (2005-2006), МР-38-2008 «Ўзбекистон маҳаллий ўсимликларидан янги биологик фаол бирикмаларни излаб топиш» Ўзбекистон-Россия лойиҳаси (2007-2008), ФА-ФЗ-Т-140 «Ўза ва *Malvaceae* оиласининг бошқа вакилларида дефензинлар ва терпеноидларни идентификациялаш, антимикроб, инсектицид ва канцеролитик фаолликларини молекуляр механизмини ўрганиш» (2007-2011), Ф6-Т018 «Антибиотик фаолликка эга бўлган ўсимлик пептидларни структура-функционал тадқиқоти» (2012-2016), А11-Т017 «Седана уруғи биологик фаол компонентлари асосида фармацевтик композициялар ишлаб чиқиш» (2012-2014) ва ФА-А-11-Т073 «Ярани битирувчи фармацевтик субстанциянинг клиник олди синовлари ва маҳаллий хом ашёдан липолитик ферментнинг

олиниш технологиясини ишлаб чиқилиши» (2015-2017) мавзусидаги амалий ва илмий-техникавий лойиҳалар доирасида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** седана уруғидан цистеин тутган индивидуал пептидларни ажратиш усулларини ишлаб чиқиш, улардан тиббиётда фойдаланиш имкониятларини аниқлаш ва улар асосида фармацевтик композиция яратишдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

антимикроб пептидлар соҳасидаги тадқиқотларнинг замонавий ҳолатдаги таҳлили ва седана *Nigella sativa*нинг оксил-пептидли компонентларини хом ашё манбаи сифатида ўрганишнинг мақсадга мувофиқлигини асослаш;

катион табиатли пептидларни индивидуал ҳолатда ажратиб олиш ва уларнинг физик-кимёвий параметрларини аниқлаш;

уларни EMBL маълумотлар базаси бўйича маълум антимикроб пептидлар типига тегишли эканлигини аниқлаш мақсадида тўлиқ ёки қисман аминокислота кетма кетлиги ва молекула тузилишидаги цистеин қолдиқлари миқдорини аниқлаш;

ажратилган пептидларни турли одам ва қишлоқ хўжалиги экинлари патогенларига нисбатан антимикроб ва замбуруғларга қарши фаоллигини аниқлаш;

ажратилган пептидларни амалиётда қўллаш имкониятларини ўрганиш ва улар асосида фармацевтик композиция ишлаб чиқариш;

ишлаб чиқилган композиция бўйича фармакотоксикологик тадқиқотлар олиб бориш ва специфик фаоллигини ўрганиш.

**Тадқиқот объекти** сифатида Ўзбекистонда ўсувчи *Ranunculaceae* оиласига мансуб маҳаллий седана *Nigella sativa* ўсимлиги уруғи ва ниши.

**Тадқиқот предмети** ажратилган антимикроб пептидларнинг тузилиши ва биологик фаоллигини аниқлашни ташкил этади.

**Тадқиқот усуллари.** Диссертацияда индивидуал антимикроб пептидларни ажратиш ва тозалаш учун экстракция, аффин, эксклюзион ва юқори самарали суюқлик хроматографияси усуллари қўлланилди; янги кимёвий бирикмаларнинг тузилишини аниқлаш учун физик-кимёвий тадқиқот усуллари (электрофорез, УВ- ва MALDI масс-спектрометрия) қўлланилди; фунгицид ва антимикроб фаолликларни текшириш учун турбиметрия, спектрофотометрия, усул газона замбуруғларни, мембранатроп фаоллигини аниқлаш учун эса дифференциал сканирловчи калориметрия ва ёруғлик микроскопияси усулларида фойдаланилди.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

илк бор седана *Nigella sativa* уруғи ва нишлари таркибидаги катион пептидлар ажратиб олинган ва тавсифланган;

седана уруғидан молекуляр массаси 9602 Да га тенг бўлган, таркибида 8 цистеин қолдиқлари тутган янги липид ташувчи оксил Ns-LTP1нинг бирламчи тузилиши аниқланган ва BLAST маълумотлар банкида рўйхатга олинган;

6 та янги пептид (Ns-D1, Ns-D2, Ns-W1, Ns-W2, Ns-N1 ва Ns-G1) ажратиб олинган ва батафсил тавсифланган;

5485 Да ва 5498 Да молекуляр массага эга бўлган 2 та гомологик пептид Ns-D1 ва Ns-D2 фитопатоген замбуруғларига нисбатан юқори ингибирлаш фаоллигига эга эканлиги аниқланган;

молекуляр массалари 5143 Да 5070 Да га тенг бўлган ва таркибида 8 та цистеин қолдиғи тутган пептидлар Ns-W1 ва Ns-W2 бошоқли ўсимликлар γ-пуротионинларга гомолог экани исботланган;

молекуляр массаси 5696 Да га тенг бўлган таркибида 8 та цистеин қолдиғи тутган пептид Ns-N1 ўрнатилган N охириги аминокислота кетма кетлиги бўйича аналоги мавжуд эмаслиги аниқланган;

молекуляр массаси 2794 Да бўлган таркибида 6 та цистеин қолдиғи тутган ажратилган пептид Ns-G1 цистеинга бой пептидларнинг янги синфига тегишли эканлигини ва молекуляр массаси ва цистеин қолдиқлари сони бўйича маълум антимикроб пептидлар орасида аналоги мавжуд эмаслиги аниқланган;

илк бор уруғ ва ниш таркибидаги пептидларнинг солиштирма спектр анализлари асосида седана ниши таркибида уруғида мавжуд бўлмаган молекуляр массаси 9086 Да га тенг бўлган липид ташувчи оксиллар синфига мансуб Ns-LTP2 оксили ва В-тип дефензинларига мансуб 10 та пептид борлиги исботланган.

#### **Тадқиқотнинг амалий натижаси.**

Полипептидлар асосида яраларни битирувчи «Седанил» фармацевтик композицияси яратилди. Клиник олди фармакотоксикологик тадқиқотлар ўтказилди ва композиция токсик бўлмаган моддаларга тегишли эканлиги, кумулятив хоссага эга эмаслиги аниқланди. Карагеннин шиш моделларида яллиғланишга қарши ўртача таъсирга эга, аллергик хоссаларга эга эмас, эмбриотоксиклик, терратогенликка ва иммун тизимига захарли таъсир кўрсатмайди.

«Седанил» фармацевтик композициясининг клиник олди тадқиқотлари композиция токсик бўлмаган моддаларга тегишлилиги ва у кумулятив хоссалар намоён қилмайди деган хулосага келишга имкон берди. Экспериментал моделлар карагеннин шишларида яллиғланишга қарши ўртача таъсир кўрсатади, аллергик хоссалар намоён қилмайди, эмбриотоксиклик, терратогенликка ва иммун тизимига захарли таъсир кўрсатмайди.

**Тадқиқот натижаларнинг ишончлилиги** уларнинг замонавий физик-кимёвий тадқиқот усуллари қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Олинган маълумотларни статистик қайта ишлаш Стьюдент критерияси ёрдамида ўртача қийматнинг ишончлилиги интервали оралик қийматларини ҳисоблаган ҳолда олиб борилди. Олинган натижаларнинг исботи бўлиб мутахассисларнинг эксперт баҳолари ва тадқиқот натижаларининг амалий реализацияси, тадқиқот натижаларининг республика ва халқаро конференциялардаги муҳокамаси, шунингдек, уларнинг рецензияланган илмий нашрларда чоп этилганлиги ва олинган патентлар

хизмат қилади.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Олинган натижаларнинг назарий аҳамияти шундаки, седана *Nigella sativa* уруғи ва нишидан янги қатор антимикроб пептидлар ажратилди ва тадқиқ қилинди. Липид ташувчи оксил бўйича олинган маълумотлар EMBL p86527 маълумотлар базасида рўйхатдан ўтказилди. Антимикроб пептидларни ажратиб олиш бўйича ишлаб чиқилган схема, уларнинг идентификацияси ва тузилишини физик-кимёвий усуллар билан аниқлаш, оксиллар ва пептидлар кимёси соҳасида изланишлар олиб борувчи, Ўзбекистон Миллий университети табиий бирикмалар кимёси кафедраси ўқув жараёнларида кимёгарларнинг амалий ишларида янги изланишлар олиб боришлари учун кўмак сифатида хизмат қилиши мумкин.

Ишнинг амалий аҳамияти шундан иборатки, седана уруғи антимикроб пептидлари асосида йирингли-септик ҳолатларда ярани битирувчи хоссага эга бўлган «Седанил» фармацевтик композицияси яратилди. «Седана *Nigella sativa* уруғи», «Полипептидлар комплекси» ва «Ярани битирувчи фармацевтик композиция» га лаборатория регламенти ва ВФМ лойиҳалари ишлаб чиқилди.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Ажратиб олинган антимикроб фаоллик намоён қилувчи дефензинга Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти олинган (30.11.2012, № IAP 04614), ушбу пептид биотехнологияда қишлоқ хўжалиги экинлари патогенларига чидамли шаклларни яратишда ва тиббиётда қўлланилган. Дефензинлар антибиотикларга альтернатив сифатида дори препаратларини яратиш учун биологик фаол компонент сифатида фойдаланиш имконини беради;

тўқималарни қайта тикловчи ва антибактериал хоссага эга бўлган турли этиологияларни даволашда фойдаланиш бўйича яратилган композицияга Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти олинган (16.03.2016, № IAP 20130250). Ишлаб чиқарилган композиция механик яралар ва термик куйишларда йирингли-септик ҳолатларни даволаш учун дори воситаси сифатида қўлланилади.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Тадқиқот натижалари 14 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, «Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривож ва келажаги» (Тошкент, 2007); «7<sup>th</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds» (Тошкент, 2007); «1 Международный симпозиум по ресурсам съедобных растений и их биоактивным ингредиентам» (Хитой, Урумчи, 2008); Табиий фанларнинг долзарб муаммолари» Республика ёш олимлар илмий-амалий анжумани (Самарқанд, 2008); XXI ёшлар қишки илмий мактаби «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Россия, Москва, 2009); IV Бутунроссия конференцияси «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Россия, Барнаул, 2009); Халқаро илмий-амалий конференция «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства» (Қозоғистон, Шимкент, 2009); Илмий-

амалий конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Крим, Украина, 2009); X Ёшлар илмий конференцияси «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2010); Халқаро илмий конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Тошкент, 2010); «Симбиоз Россия 2011» (Воронеж, 2011); «3<sup>rd</sup> International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients» (Urumchi, China, 2012); Халқаро конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Тошкент, 2013); «X Табиий бирикмалар бўйича халқаро симпозиум», (Тошкент-Бухоро, 2013) мавзуларидаги республика ва халқаро илмий-амалий конференцияларда маъруза кўринишида баён этилган ҳамда апробациядан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация мавзуси бўйича жами 30 та илмий иши чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 11 та мақола, жумладан, 3 таси республика ва 8 таси хорижий журналларда нашр этилган, 2 та ихтирога патент олинган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 193 бетни ташкил этган.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурийлиги асослаб берилган, мақсад ва вазифалар, шунингдек тадқиқотнинг объект ва предмети ифодаланган, тадқиқотнинг Ўзбекистон Республикаси фан ва технологияларни ривожлантириш йўналишига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг ишончлилиги асосланган, натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий этиш рўйхати келтирилган, чоп этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар берилган.

Диссертациянинг «**Антимикроб пептидлар: замонавий аҳволи, таъсир механизми ва амалиётда қўлланилиши**» деб номланган биринчи бобида кексалик мавзуси бўйича илмий тадқиқот иши, муаммонинг ўрганилиш даражаси, ўсимликлардан олинган антимикроб пептидларнинг классификацияси, таъсир механизми ва қўлланилишига оид батафсил шарҳ берилган. Седана *Nigella sativa* уруғи компонентлари ва ёғининг фармакологик хоссалари баён қилинган. Шарҳ асосида ушбу иш учун объект танлаш тўғрисида хулоса қилинган.

Диссертациянинг «**Седана *Nigella sativa* уруғи ва нишидан антимикроб пептидларни ажратиш ва физик-кимёвий характерлаш**» деб номланган иккинчи бобида кексаларни индивидуал пептидларни ажратиш, уларнинг физик-кимёвий параметрлари ва структуравий характеристикаси ёритилган.

Седана уруғидан антимикроб пептидларни ажратишда экстракция самарадорлигини солиштириш учун 0.05н сульфат кислота ва 10% сирка кислотатада экстракцияланди. Экстракция эндоген протеазанинг фаоллигини пасайтириш учун протеаза ингибитори иштирокида ва оқсилларни фракциялаб чўктириш билан олиб борилди.

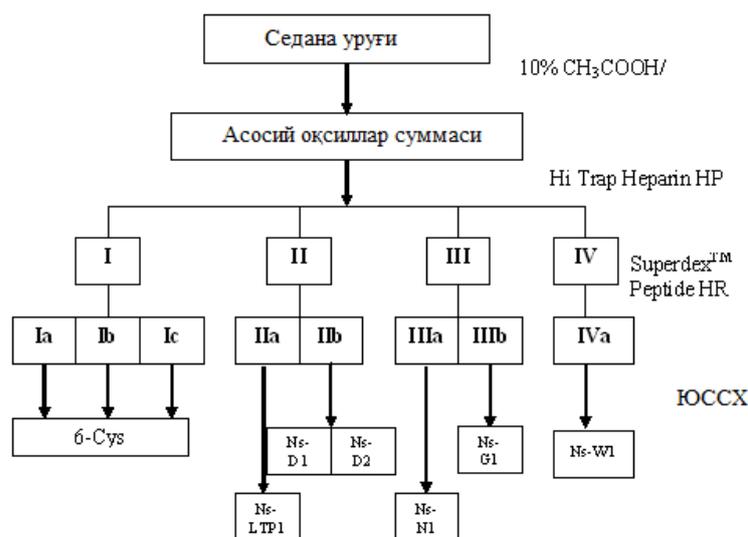
Оқсил-пептидли экстрактнинг ЮССХ усулида аналитик бўлинишидан олинган мажор фракциялар MALDI масс-спектрометрия усулида анализ қилинганда сирка кислотали экстракт кўп миқдорда оқсил ва пептидлар тутиши аниқланди. Сульфат кислотали экстракцияда оқсил ва пептидларнинг асосий қисми денатурацияга учрайди, шунинг учун кейинги бўлинишлар учун сирка кислотали экстрактдан фойдаланилди.

**Седана *Nigella sativa* уруғидан антимикроб пептидларни ажратиш**

Седана уруғидан индивидуал АМП ажратиш олиш учун комплекс хроматография усуллари ўз ичига олувчи схема ишлаб чиқилди.

- 1) оқсил-пептидли фракцияларнинг кислотали экстракцияси;
- 2) аффин хроматографияси;
- 3) ЮССХ ёрдамида олинган фракцияларни тузсизлантириш;
- 4) тузсизлантирилган фракцияларнинг эксклюзион хроматографияси (гель-филтрация);
- 5) гель-филтрациядан олинган оқсил-пептидли фракцияларнинг юқори самарали суюқлик хроматографияси (ОФ-ЮССХ).

## Седана уруғидан антимиқроб бирикмаларни ажратиб олиш



Экстракт суммаси NaCl концентрациясининг босқичли градиентиди HiTrap Heparin HP колонкада тўртта фракцияга ажратилди. Ҳар бир фракция Superdex™ Peptide HR колонкада эксклюзион хроматография (гель-филтрация) усулида фракцияларга бўлинди.

Молекуляр массаси АМП учун хос диапазонда бўлган фракцияларни индивидуал компотентларга ажратиш учун ЮССХ усулида бўлиш ишлари олиб борилди.

Биринчи фракциянинг аффин хроматографиясидан кейин гель-филтрация ва ОФ ЮССХ усуллари ёрдамида бўлинишидан молекуляр массалари АМП учун хос диапазонда бўлган 5 та асосий компонентлар олинди.

## 1-жадвал

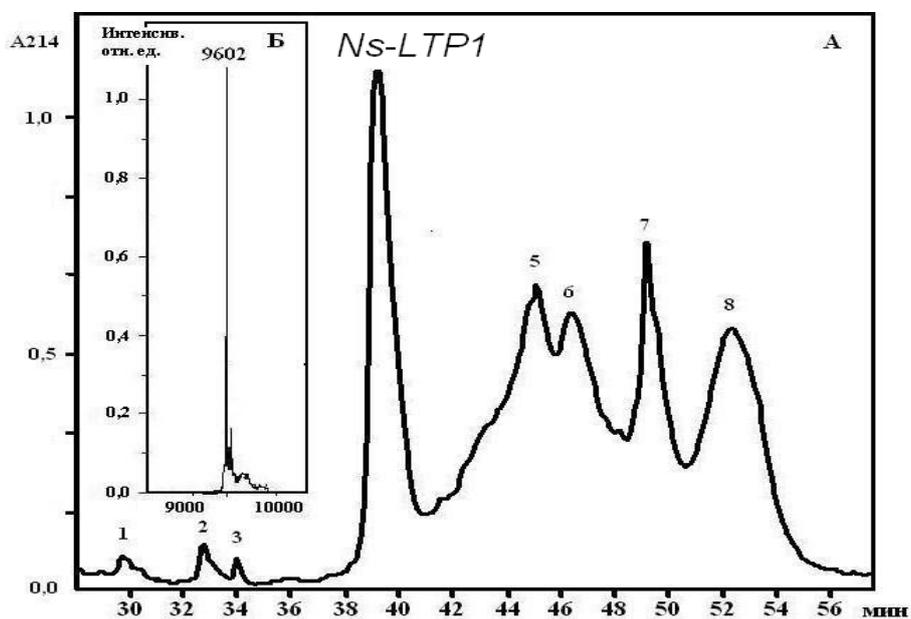
## I фракциянинг масс-спектрометрия маълумотлари бўйича компонентлари таркиби

Фракция Рақами	1 (I-a-1)	2 (I-a-3)	3 (I-b-5)	4 (I-c-8)	5 (I-c-9)
Мол. Масса, Да	3371	3530	4219	4082	4067

Ажратилган пептидларни характерлаш учун молекула таркибидаги цистеин сонини аниқладик. Бунинг учун пептидлар қайтарилди ва алкилланди. Қайтарилган ва алкилланган пептидларнинг молекуляр массаси биринчи фракцияда натив ҳолатга солиштирилганда 638 Да га ошди, бу эса ушбу пептидлар молекуласида 6 та цистеин қолдиғи мавжуд эканлигини билдирди. Ажратилган пептидларнинг физик-кимёвий хоссалари маълум антимиқроб пептидлар билан солиштирилганда, уларнинг молекуляр масса ва цистеин қолдиқлари сони бўйича аналоглари мавжуд эмаслиги кўрилди.

II фракциянинг гель-филтрация усули ёрдамида бўлинишидан II-a и II-b деб номланувчи иккита фракция олинди.

II-а фракциянинг ЮССХ усулида Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентида бўлинишидан 8 та компонент олинди (1а расм) улардан биттаси молекуляр массаси 9602 Да га тенг бўлган Ns-LTP1 деб номланган гомоген компонент ҳисобланади (1б расм).



1-расм. Седана уруғидан Ns-LTP1 ни ажратиш: а) Аффин хроматографияси натижасида олинган II фракциянинг ОФ ЮССХси ; б) Натив Ns-LTP1нинг масс-спектри.

Ажратилган оксил Ns-LTP1ни цистеинга бой пептидларнинг маълум бир синфига тегишлилигини аниқлаш учун N-охирги секвенирлаш, (2 расм), аминокислота таркиби ва молекуладаги цистеин қолдиқлари сонини аниқлаш ишлари олиб борилди. Ns-LTP1 молекуласи таркибидаги цистеин қолдиқлари сони натив (қайтарилмаган) оксил (9602 Да) билан қайтарилган ва алкилланган оксил (10440 Да) нинг молекуляр массалари фарқи бўйича аниқланди.

Ns-LTP1 молекуласида 8 та цистеин қолдиғи мавжудлиги аниқланди; қайтарилмаган оксил алкилланганда LTP нинг молекуляр массаси ўзгармади, бу эса оксил молекуласида эркин SH-гуруҳлар йўқлигини ва барча 8 та сульфгидрил гуруҳлар ички молекуляр дисульфид боғлар ҳосил қилишда қатнашишини аниқлатади.

Ажратилган оксилнинг аминокислота таркиби аниқланди ва натижалар шуни кўрсатдики, седана уруғи оксилида Met топилмади, бу эса LTP учун характерли, асосий аминокислоталар (Lys, Arg, His) умумий аминокислоталар қолдиғининг 13% ини ташкил этади.

Седана LTP ининг N-охирги кетма кетлиги бошқа ўсимликлар LTP нинг аминокислота кетма кетлиги билан солиштирилганда юқори даражадаги гомология кузатилди, бу ажратилган пептиднинг липид-ташувчи АМП гуруҳига тегишли эканлигини тасдиқлайди.

Аминокислота кетма кетлиги маълум бўлган молекуляр массаси 9 кДа ўсимлик LTPи аминокислота кетма кетликлари билан солиштирилганда Cys, Val-6, Tyr-16 консерватив қолдиқларидан ташқари (рақамлаш Ns-LTP1

бўйича келтирилмоқда) барча турлар солиштирилганда аминокислота қолдиқлари катори кўпчилик турларда топилганлиги кўрилди (Leu-10, Ala-11, Pro-12).

Вид растения	N-концевая аминокислотная последовательность	Номер*
<i>Nigella sativa</i>	-ISCQDVKQSLAPCLPYVTGRAPKPA	P86527
<i>Oryza sativa</i>	-LSCGQVDSKLAPCVAYVTGRASAIIS	AAA70046
<i>Capsicum annuum</i>	-LSCSQVTSGLAPCLPYLQGRGPLGG	AAF23459
<i>Beta vulgaris</i>	-PSCTDVISNTAPCLPYISRTSPAPS	BAF02666
<i>Nicotiana tabacum</i>	LSCGQVQSGLAPCLPYLQGRGPLGS	Q03461
<i>Brassica oleracea</i>	ALSCGTVSGYVAPCIGYLAGNAPAPT	AAA73948
<i>Brassica rapa</i>	-LSCGTVSGNLAACIGYLTGNGPLPR	AAT40130
<i>Cicer arietinum</i>	AITCGRVDTALAPCLGYLQGGPGPSA	CAA05771
<i>Spinacea oleracea</i>	-ITCGMVSSKLAPCIGYLLKGGPLGGG	S00060
<i>Daucus carota</i>	-LTCGQVTGALAPCLGYLRSQVNVFV	P27631
<i>Hordeum vulgare</i>	AISCGQVSSALSPCISYARGNGAKPP	CAA91436
<i>Triticum aestivum</i>	--SCGQVSSALSPCISYARGNGASPS	ABB90546
<i>Prunus persica</i>	-ITCGQVSSNLAPCIPYVRVGGAVPP	AAM22768
<i>Fragaria ananassa</i>	-ITCGQVASNISPCCLTYVKSGGAVPA	AAAY83342

**2-расм. Ns-LTP1 оксиди билан айрим ўсимликлар 9 кДа LTP ининг N-охирги аминокислота кетма кетлигини солиштириш.**

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. маълумотлар базаси бўйича.

Аммо Gln-4 ва Gln-8 да алмашилишлар бор, ҳолбуки кўпчилик солиштирилаётган кетма кетликларда ушбу ҳолатларда (Gly-4 ва Ser-8, мос равишда) юқори даражада консервативлик мавжуд.

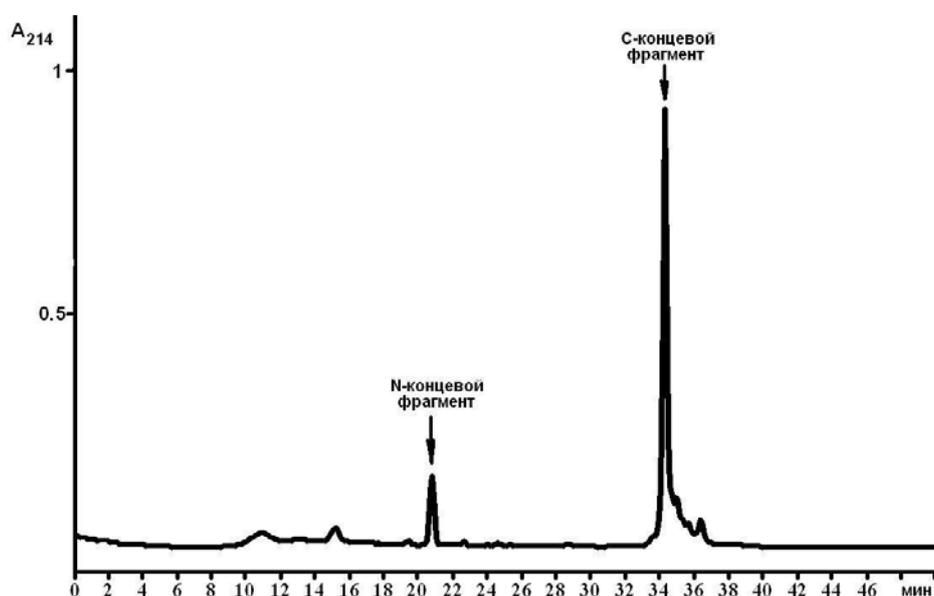
II-b фракциянинг Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентда бўлинишидан молекуляр массалари 5485 ва 5498 Да бўлган 2 та компонент II-b-2 ва II-b-4 олинди. Ажратилган пептидлар II-b-2 ва II-b-4 ни характерлаш учун молекуладаги цистеин қолдиқлари сони аниқланди. Қайтарилган ва алкилланган пептидлар II-b-2 ва II-b-4 нинг молекуляр массалари натив ҳолатга солиштирилганда мос равишда 850 Да га ошди, бу эса ушбу пептидлар молекуласида 8 та цистеин қолдиғи мавжуд эканлигини билдирди. Натив пептидларни қайтаришсиз алкиллаш эркин сульфгидрил гуруҳларнинг мавжуд эмаслигини кўрсатди. Бу ушбу пептиддаги барча 8 та цистеин қолдиқлари 4 та молекулалараро боғлар ҳосил қилишда қатнашганлигини исботлайди. Сўнгра қайтарилган ва алкилланган пептидлар II-b-2 ва II-b-4 Эдман усули бўйича N-охирги аминокислота кетма кетлигини аниқлаш учун автоматик секвенирлашга учратилди.

II-b-2: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

II-b-4: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

Иккала пептидда ҳам 35 та аминокислотанинг аниқланган N-охирги аминокислота кетма кетлиги бир хил. UniProt маълумотлар базаси бўйича гомология қидируви иккала пептид ҳам дефензинлар оиласига тегишли эканлигини кўрсатди.

4 ва 28- ҳолатларда глютамин кислота мавжуд. Пептидларни ушбу ҳолат бўйича тўлиқ кетма кетлигини аниқлаш учун қайтарилган ва алкилланган пептидларни глютамин кислота билан асосан –Glu-X- типдаги C-охирги пептид боғига специфик бўлган протеаза V8 билан парчалашга қарор қилинди. Бу ерда X ўрнида пролин ва глютаминдан бошқа ҳар қандай аминокислота қолдиғи бўлиши мумкин. Гидролиздан кейинги реакция маҳсулотлари ОФ-ЮССХ усули ёрдамида фракцияларга ажратилди.



**3-Расм.** Дефензинларнинг протеаза V8 билан парчаланish реакцияси маҳсулотларининг Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентда 40 мин. давомида хроматографик бўлиниши. Элюция тезлиги 0,75 мл/мин.

Ҳосил бўлган пептидларнинг молекуляр массалари MALDI TOF масс-спектрометрия усули ёрдамида аниқланди. Натижаларга кўра Ns-D1 ва Ns-D2 дефензинлари учун мос равишда пептидларнинг C-охирги фрагменти 2-фракцияда ва 2495.8 Да ва 2510.4 Да молекуляр массага эга, N-охирги фрагменти эса 1-фракцияда ва 2999.1 Да ва 2999.3 Да молекуляр массага эга деб тахмин қилинди.

Икки фракциядаги иккала дефензинни секвенирлаш давомида молекуланинг N-охирги фрагменти кетма кетлиги аниқланди. Олинган N-охирги ва C-охирги кетма кетликларни солиштириш пептидларнинг тўлиқ аминокислота кетма кетлигини аниқлашга имкон берди:

**Ns-D1:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Pro**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

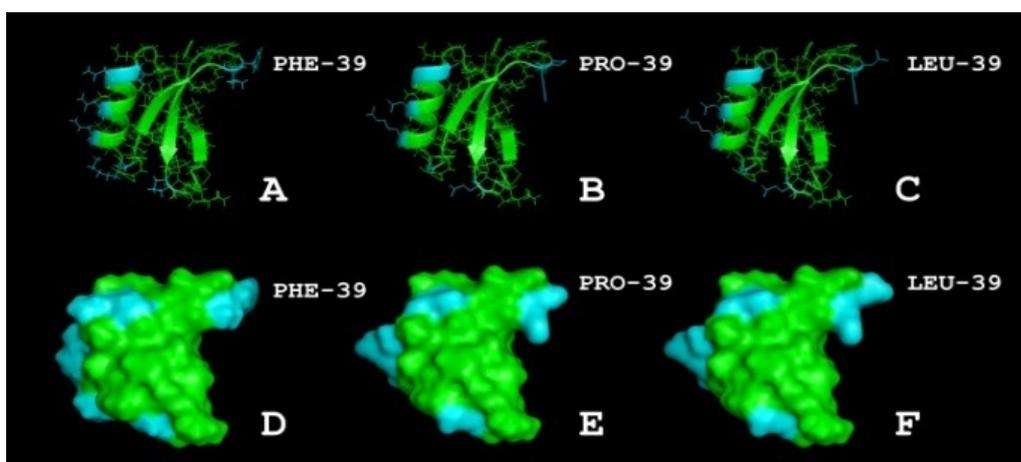
**Ns-D2:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Leu**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

Натижалар иккала полипептид ҳам 50 тадан аминокислота қолдигидан иборат эканлигини ва полипептид занжирида 39 ҳолатда битта Pro қолдигининг Leu га алмашганлиги билан фарқ қилишини кўрсатди. Бундан ташқари, ажратилган АМПлар аввалроқ *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* оиласи уруғларида топилган ва *in vitro* тестларида юқори антимиқроб фаоллик намоён қилган дефензинлар билан гомологик эканлигини кўрилди.

Name	Amino acid sequence														
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50				
Ns-D1	---	KFC	-EKPSGTWSGV	CGNSGACKDQ	---	IRLEGA	KHG-	SCNYKPPAHR	CI	CYYE	C	50			
Ns-D2	---	KFC	-EKPSGTWSGV	CGNSGACKDQ	---	IRLEGA	KHG-	SCNYKLP	PAHR	CI	CYYE	C	50		
Rs-AFP2	ZKLC	-	QRPSGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	IRLEK	ARHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	51		
Rs-AFP1	ZKLC	-	ERPSGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	INLEK	ARHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	51		
Br-AFP2	---	KLC	-ERS	SGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	IRLEGA	QHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	50	
Bn-AFP1	---	KLC	-ERS	SGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	IRLEGA	QHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	50	
Br-AFP1	---	KLC	-ERS	SGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	INLEGA	RHG-	SCNYV	FPYHR	CI	CYFC	50	
At-AFP1	---	KLC	-ERPSGTWSGV	CGNSN	ACKNOC	---	INLEK	ARHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	50		
Sa-AFP1	---	KLC	-ERPSGTWSGV	CGNNA	CKNOC	---	INLEK	ARHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	50		
Sa-AFP2	---	KLC	-	QRPSGTWSGV	CGNNA	CRNOC	---	INLEK	ARHG-	SCNYV	FPAHK	CI	CYFC	50	
Ah-AMP1	---	LC	NERPSQTWSGN	CGNTA	CDKQC	---	QDWEK	ASHG-	ACH	KRENH	WKCF	CYFC	50		
Ct-AMP1	---	NLC	-ERAS	LWTWTG	CGNTG	---	CDTCC	RNWE	SAKHG-	ACH	KRGN	-WKCF	CYFC	49	
Dm-AMP1	---	ELC	-EKAS	KTWSGN	CGNTG	---	CDNQC	CKSWE	GAAHG-	ACH	VRNG	KHMCF	CYFC	50	
Hs-AFP1	DGVKLC	-	DVPSGTWSGH	CGSSK	CSQC	---	CKDREH	FAYGGA	CHYQ	FPSV	KCF	CKRC	54		
Consensus	---	LC	---	S-TW	-G-CG	---	C-QC	---	E	---	G-C	---	C-C	---	C

β1                      α-helix                      β2                      β3

4-расм. Ns-D1 ва Ns-D2 нинг айрим ўсимликлар 5 қДа дефензинлари билан N-охирги аминокислота кетма кетлигини солиштириш.



5-расм. *Nigella sativa* дефензинларининг учламчи модели. Солиштириш учун редиска дефензини Rs-AFP1 нинг 3D структураси келтирилган. А ва D Rs-AFP1 (PDB да рўйхатга олиш рақами 1AYJ); В ва Е Ns-D1, С ва F Ns-D2. Ns-D1, Ns-D2 ва Rs-AFP1 дефензинлари ўртасидаги ўзгараётган қолдиқлар ҳаво рангда кўрсатилган.

Олинган дефензинларнинг аминокислота кетма кетлиги бошқа дефензинлар билан солиштириш натижалари улар учламчи структураси аниқланган редиска *Raphanus sativus* уруғи дефензинлари билан юқори даражада гомолог эканлигини кўрсатди (консерватив аминокислоталарни ўз ичига олган 43 та бир хил аминокислота). Бу структурадан PyMol v. 0.9.3. программаси ёрдамида *Nigella sativa* дефензинларининг учламчи структурасини моделлаштиришда аналог сифатида фойдаланилган эди. Натижалар унинг альфа спирал ва халқага ёпилган учта бета бурмалардан иборат эканини кўрсатди (5-расм).

III фракциянинг аффин хроматографиясида бўлинишидан кейин мос равишда III-a ва III-b деб номланган иккита фракция олинди.

III-a фракциянинг Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентида бўлинишидан Ns-N1 деб номланган молекуляр массаси 5696 Да бўлган индивидуал компонент олинди. Қайтарилган ва алкилланган пептид Ns-N1нинг молекуляр массаси натив ҳолатга солиштирилганда 850 Да га ошди, бу эса ушбу пептид молекуласида 8 та цистеин қолдиғи мавжуд эканлигини билдирди. Қайтарилган ва алкилланган пептиднинг N-охирги аминокислота кетма кетлиги аниқланди:

**Lys-Ile-Cys-Gln-Asp-Val-Lys-Gln-Ser-Leu-Ala-Pro-Cys-Leu-Pro-Tyr-Val-Thr-Gly-Arg-Ala-Pro-Lys-Pro-Ala-Pro-Glu-Cys-Cys-Asn-Glu-Ile**

BLAST программасидан фойдаланган ҳолда EMBL маълумотлар базасида аналогик аминокислота кетма кетлигини қидирув ишлари бу пептиднинг маълум пептидлар билан гомологияси аниқланмаганлигини кўрсатди, бу эса уни *Ranunculaceae* оиласининг янги пептидлари синфига қўшишга имкон беради.

III-b фракциянинг Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентида бўлинишидан Ns-G1 деб номланган молекуляр массаси 5696 Да бўлган III-b-1 асосий индивидуал компонент олинди. Ns-G1 пептид молекуласидаги цистеин қолдиқлари сонини аниқлаш учун қайтарилди ва алкилланди. Қайтарилиш ва алкиллашдан сўнг реакция маҳсулотлари хроматография йўли билан Luna C<sub>18</sub> колонкасида фракцияларга бўлинди. Олинган фракциялар масс-спектрометрик усулда анализ қилинди.

ОФ-ЮССХ сида бўлинишидан 8 та компонент олинди. Ажратилган бирикмаларнинг MALDI TOF масс-спектрометрия маълумотлари бўйича молекуляр массалари жадвалда келтирилган:

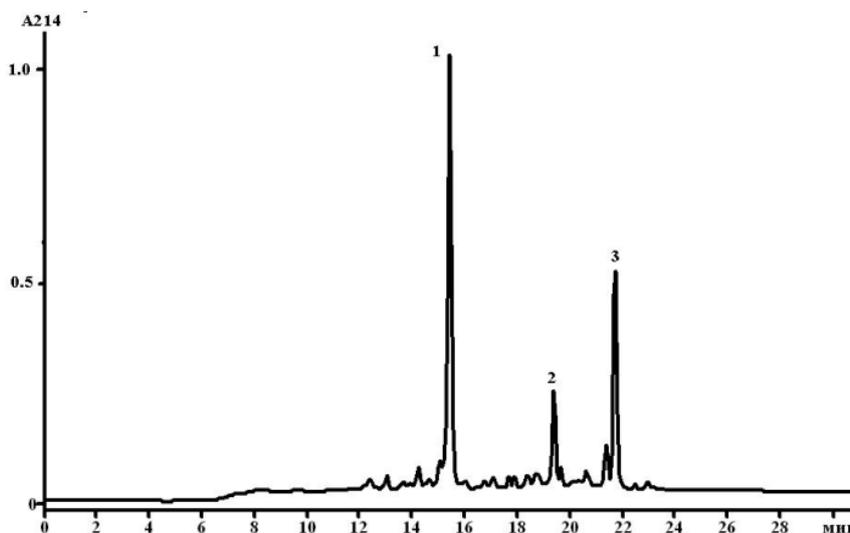
**2-жадвал**

**Қайтарилган ва алкилланган пептидларнинг масс-спектрометрия маълумотлари бўйича компонент таркиби**

Фракция рақами	1 (III-b-1)	2 (III-b-2)	3 (III-b-3)	4 (III-b-4)	5 (III-b-5)	6 (III-b-6)	7 (III-b-7)	8 (III-b-8)
Мол. Масса, Да	1540	1752	1539	1573 1647 1904	1527	1680	1468	1468

Чунки ҳар бир фракциянинг молекуляр массаси натив молекуланинг молекуляр массасидан сезиларли даражада паст, ажратилган пептид икки ва ундан ортиқ занжирдан иборат деб тахмин қилинди. Ажратилган пептиддаги занжирлар сонини аниқлаш учун дисульфид боғларни қайтарилиш реакцияси ўтказилди. Қайтарилишдан кейинги реакция маҳсулотлари ЮССХси йўли билан Luna C<sub>18</sub> колонкада фракцияларга ажратилди (6-расм). Олинган фракциялар масс-спектрометрик анализ қилинди (3 жадвал).

Шундай қилиб, ажратилган пептид молекуласи икки вариациядаги иккита занжирдан ташкил топганлиги аниқланди. III-b-1 фракция асосий занжир ҳисобланади. Иккинчи занжир III-b-2 фракция ёки III-b-3 фракция бўлиши мумкин.



6-расм. Қайтарилган пептид III-b-1 нинг Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% концентрацияли ацетонитрил градиентида 40 мин. давомида хроматографик бўлиниши. Элюция тезлиги 0,75 мл/мин.

3-жадвал

Қайтарилган пептиднинг масс-спектрометрия маълумотлари бўйича компонент таркиби

Фракция рақами	1(III-b-1)	2(III-b-2)	2(III-b-3)
Мол. Масса, Да	1436	1423	1364

Ҳар бир қайтарилган ва алкилланган звеноларнинг N–охирги аминокислота кетма кетлиги аниқланди.

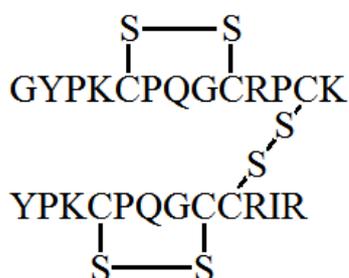
III-b-1-2 компонент 3 та цистеин тутган асосий занжир ҳисобланади (5 ва 9- ҳолатда занжирлараро дисульфид боғлар билан боғланган).

Иккинчи занжир ҳам 3 та цистеин тутган бўлиб, (ёки III-b-1-5 – компонент 10 Arg ҳолатда, ёки III-b-1-6 –компонент 10 Pro ҳолатда) 4 ва 8- ҳолатда занжирлараро дисульфид боғлар билан боғланган.

Қайтарилган ва алкилланган пептид фракцияларининг 500mM-7  
N-охирги аминокислота кетма кетлиги

Компонент	N-охирги аминокислота кетма кетлиги
III-b-1-1	GYPKC YPKCP
III-b-1-2	GYPKCPQGCRPCK
III-b-1-3	GYPKXPQGXRPKCK
III-b-1-5	YPKCPQGCCRIR
III-b-1-6	YPKCPQGCCPIR
III-b-1-7	GGGGG YPKCP
III-7-1-8	YPKXPQGXCRIR

Занжирлар ўзаро 1-12 ва 2-9 ҳолатларда занжирлараро дисульфид боғлар билан боғланган.



Бундай тузилишга эга бўлган, ички ва занжирлараро дисульфид боғлар билан боғланган иккита полипептид занжиридан иборат бўлган цистеинга бой пептидларнинг мавжудлиги адабиётларда келтирилмаган. Шунга асосланиб биз цистеинга бой пептидларнинг янги синфи очилганлигини тасдиқлашимиз мумкин.

IV фракциянинг аффин хроматографиясидан кейин Luna C<sub>18</sub> колонкада 10-50% ли ацетонитрил градиентда бўлинишидан 5 та компонент олинди, улардан иккинчи IV-a-2 ва IV-a-5 гомоген бўлиб молекуляр массаси 5144 Да ва 5068 Да га тенг. Ns- w1 ва Ns- w2 деб номланган ушбу пептид қайтарилиш ва алкиллашдан сўнг қисман аминокислота кетма кетлиги аниқланди:

Ns-w1: Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-**Met**-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-**Ser**-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

Ns-w2: Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-**Ile**-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-**Ala**-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

BLAST программаси ёрдамида ажратилган пептиднинг буғдой  $\gamma 1$  ва  $\gamma 2$  пуротионинлари билан гомологияси аниқланди.

Седана пептидлари Ns-w1 ва Ns-w2 нинг N-охирги аминокислота кетма кетлигини бошқа тур ўсимликлари пуротионинлари аминокислота кетма кетлиги билан солиштириш натижалари улар гомолог эканлигини кўрсатди,

бу эса ажратилган полипептидлар антимикроб пуротионинлар гуруҳига мансуб эканлигидан далолат беради. Аминокислота кетма кетлиги маълум бўлган молекуляр массаси 5 кДа донли ўсимликлар тионинлари аминокислота кетма кетликлари билан солиштирилганда Cys, Lys-1, Ser-2, Ala-27 консерватив қолдиқларидан ташқари (рақамлаш Ns-w1 бўйича келтирилмоқда) барча турлар солиштирилганда аминокислота қолдиқлари қатори кўпчилик турларда топилганлиги кўрилди (Thr-7, Asn-14).

Название	N-концевая аминокислотная последовательность	
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFMKKPRKTCSEGLCGCKIS <sup>35</sup> ...	<b>A</b>
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFIKKPRKTCAGLCCGCKIS <sup>35</sup> ...	
<i>H. vulgare</i>	<sup>1</sup> KSCCKDTLARNCYNTCRFAGGSRPVCAGACRCKII <sup>35</sup> ...	
<i>H. jubatum</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTTGRNCYNACRLPGTTPRPVCANLCCGCKII <sup>35</sup> ...	
<i>T. aestivum</i>	<sup>1</sup> KSCCRSTLGRNCYNLCR-ARGAOKLCAGVCRCKIS <sup>35</sup> ...	
<i>A. sativa</i>	<sup>1</sup> KSCCKSTTAINCYNVCRLAGAPRPVCAGPCGCKLL <sup>35</sup> ...	
<i>T. gesneriana</i>	<sup>1</sup> KSCCRNTTARNCYNVCRTPGTTPRPVCAATCDCKII <sup>35</sup> ...	
<i>V. album</i>	<sup>1</sup> KSCCRNTTGRNCYNACRVPGTTPRPVCASLCCDCKII <sup>35</sup> ...	
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFMKKPRKTCSEGLCGCKIS <sup>35</sup> ...	<b>B</b>
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFIKKPRKTCAGLCCGCKIS <sup>35</sup> ...	
<i>Viscotixin A1</i>	<sup>1</sup> KSCCPSTTGRNIYNTCRLTGSSRETCAKLSGCKII <sup>35</sup> ...	
<i>Viscotixin A2</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRFGGGSRQVCASLSGCKII <sup>35</sup> ...	
<i>Viscotixin A3</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNACRLTGAPRPPTCAKLSGCKII <sup>35</sup> ...	
<i>Viscotixin B</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRLGGGSRERCASLSGCKII <sup>35</sup> ...	
<i>Viscotixin C1</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRFAGGSRERCALSGCKII <sup>35</sup> ...	

7-расм. Ns-W1 нинг айрим ўсимликлар 5 кДа тионинлари N-охирги аминокислота кетма кетлигини солиштириш.

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> маълумотлар базаси бўйича.

### Седана *Nigella sativa* нишининг пептид таркиби солиштирма характеристикаси

Нишдан (интакт ва *Verticillium dahlia* билан зарарланган) антимикроб пептидларни ажратиш учун 0.05н сульфат кислотали экстракция усулидан фойдаланилди. Экстракт суммаси юкори молекуляр оқсиллар фракциясини чўктириш учун натрий гидроксид ёрдамида нейтралланди ва центрифугаланди. Седана уруғи ва ниши экстрактларининг масс-спектрометрик анализи солиштирилганда ниш экстракти уруғ экстракти таркибига қараганда сезиларли даражада камроқ пептид сақлаши маълум бўлди. Бундан ташқари, қайд этиш лозимки, зарарланган нишда дефензинларнинг пайдо бўлиши нишнинг патоген замбуруғлар спораси билан зарарланишига жавобан унда ҳимоя пептидлари биосинтезининг кучайиши билан боғлиқдир.

### Седана *Nigella sativa* нишидан антимикроб пептидларни ажратиш

Седана нишидан антимикроб пептидларни ажратиш уларни уруғдан ажратиш схемаси бўйича олиб борилди. Умумий экстрактни аффин хроматографияси ва гель-филтрация усуллари ёрдамида бўлинишидан молекуляр массалари АМП лар учун характерли диапазонда бўлган бирикмалар тутган иккита фракция олинди.

Биринчи фракциянинг юқори самарали суклик хроматографиясида бўлинишидан молекуляр массаси ва цистеин сони бўйича липид ташувчи оқсиллар синфига киритиш мумкин бўлган битта компонент олинди. Иккинчи фракциянинг бўлинишидан физик-кимёвий параметрлари бўйича дефензинлар синфига мансуб бўлган 10 та компонент олинди.

5-жадвал

Седана ниши фракцияларининг масс-спектрометрик маълумотлар бўйича компонент таркиби

Фракция рақами	Ns-LTP2	2									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Мол. Масса, Да	9086	5060	5072	5249	4922	4954	5021	4964	4959	4823	4862

Олинган маълумотлар ниш таркибидаги пептид спектрлари уруғникдан фарқ қилишини кўрсатди, бу уларнинг униш даврида эскиларини биодеградацияси ва янгиларини биосинтези рўй беришидан далолат беради.

Диссертациянинг “**Ажратилган пептидларнинг биологик фаоллиги**” деб номланган учинчи бобида кексаларни ажратилган пептидларнинг энг муҳим қишлоқ хўжалиги патогенлари ва инсонларда касаллик келтириб чиқарувчи патогенларга қарши биологик фаолликлари, липид ташувчи оқсил Ns-LTP1 нинг БЛМ билан ўзаро таъсир механизми муҳокама қилинади.

**Ns-LTP1 нинг замбуруғларга қарши фаоллиги.** Ns-LTP1 нинг споралар (*F.oxysporum* ва *H.sativum*), зооспоралар ва зооспорангийлар (*Ph.infestans* ва *P.debaryanum*) ўсишига таъсири ўрганилди.

6-жадвал

Ns-LTP1 нинг замбуруғ ва оомицетлардаги биологик синов натижалари

Замбуруғ/оомицет	<i>F.oxysporum</i>	<i>H.sativum</i>	<i>Ph.infestans</i>	<i>P.debaryanum</i>
IC <sub>min</sub> мкг/мл*	30	115	60	60
IC <sub>50</sub> мкг/мл	60	-	115	-
Морфологик ўзгаришлар	Йўқ	Йўқ	+**	Йўқ

\*Малҳамкур ўлчамни ингибирлаш учун минимал 10% ни ташкил қилди

\*\*зооспорангийларнинг қисман лизиси 8-12% даражада

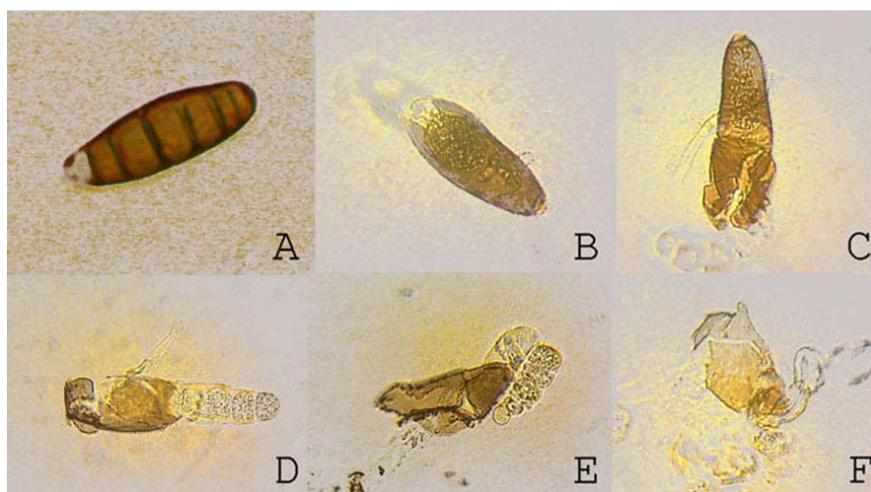
Ушбу оқсил синов ўтказилган барча микроорганизмларга нисбатан фаоллик намоён қилди (минимал ингибирлаш концентрацияси 30-115 мкг/мл оралиғида). Оқсил *F.oxysporum* га нисбатан минимал концентрацияда (50 мкг/мл ва IC<sub>50</sub> - 60 мкг/мл) максимал самара кўрсатди. *H.sativum* га нисбатан ушбу LTP жуда кучсиз фаоллик намоён қилди (IC<sub>min</sub> = 115 мкг/мл). Седана оқсили Ns-LTP1 нинг оомицетларга таъсири ўрганилганда оқсил минимал концентрацияда яъни 60 мкг/мл да *Ph.infestans* зооспорангийларининг 18% ининг ўсишини тўхтатганлиги аниқланди (зооспораларга самараси кузатилмади). Оқсилнинг шу концентрациясида (IC<sub>50</sub> >115 мкг/мл ни ташкил этди) *P.debaryanum* оомицет спорангийлари 24% ининг ўсишдан тўхташи кузатилди. 115 мкг/мл концентрацияда *Ph.infestans* зооспорангийлари

ўсишининг эллик фоизга ингибирлаши кузатилди. Морфологик ўзгаришлар Ns-LTP1 нинг 115 мкг/мл концентрацияда фитофтора зооспорангийлари қобиғининг 8-12% даражада қисман лизиси билан ифодаланди. Замбуруғларнинг тузилишида морфологик ўзгаришлар аниқланмади. Фитопатоген замбуруғлар мицелийси ўсишининг ингибирлаши ҳам кузатилмади.

**Ns-D1 ва Ns-D2 дефензинларининг антифунгал фаоллиги.** Юқори тозаликдаги седана уруғи пептидларининг бир қатор фитопатоген замбуруғларга нисбатан токсиклиги ўрганилди.

Ns-D1 ва Ns-D2 дефензинлари энг фаол антимикроб пептидлар эканлиги аниқланди. Улар 3,0 дан 27,4 мкг/мл ораликдаги концентрацияда бир қатор фитопатоген замбуруғларга қарши юқори фаоллик кўрсатди яъни спора ва конидиялар гифи ўсиш тезлигини тўхтатиши кузатилди. Бундан ташқари, айрим текширилаётган микроорганизмлар учун *A.niger* ва *B.sorokiniana* спора ва конидиялари тузилишида морфологик ўзгаришлар самараси кузатилди.

Конидияларнинг морфологик ўзгариш даражаси бўйича дефензинлар ўртасида фарқ кузатилди. Ns-D1 ва Ns-D2 *B.sorokiniana* конидиялари хужайра девори ва мембранаси яхлитлигини уларнинг умумий сонига нисбатан 15-17% га бузиши аниқланди, бунда дефензиннинг концентрацияси ортиши билан хужайранинг бузилиш даражаси ҳам ортиб борди. Пептидларнинг 3.4-110 мкг/мл диапазондаги концентрациясида солиштирма синов ўтказилди. Натижалардан Ns-D2 6,8 мкг/мл концентрациядаёқ *B.sorokiniana* конидия хужайраси девори ва плазматик мембранасини жиддий зарарлаганлигининг биринчи белгилари кўринди, хужайранинг тўлиқ бузилиши эса 55 мкг/мл концентрацияда рўй берди. Шу билан биргаликда хужайрадаги морфологик ўзгаришларнинг малҳамкур даражалари Ns-D1 таъсирида мос равишда 13.6 ва 110 мкг/мл концентрацияда кузатилди.



**8-расм. *B.sorokiniana* конидиялари хужайра девори ва мембранаси яхлитлигининг Ns-D2 дефензини иштирокида 48 соатдан кейинги морфологик ўзгаришлари.** А – назорат конидияси, В-Ф – турли концентрацияда Ns-D2 дефензини кўшилган конидия: (В) 6.9 мкг/мл, (С) 13.8 мкг/мл, (D) 7.5 мкг/мл, (E) 55 мкг/мл, (F) 110 мкг/мл.

*A.niger* конидияларининг морфологик ўзгаришлари улар шаклларининг деструкцияси кўринишида иккала дефензинни кўшилганда ҳам кузатилди, ушбу ҳолатда улар ўртасида концентрация самараси кўрсаткичи бўйича фарк бўлмади. Малҳамкур ўзгаришлар оксилнинг 27,5 мкг/мл концентрациясида *A.niger* конидиялари умумий сонига нисбатан фақат 5-7% ида содир бўлганлиги аниқланди.

7-жадвал

**D- қатори дефензинларининг солиштирма антифунгал хоссалари**

Замбуруғ конидиялари	Дефензин, IC <sub>50</sub> мкг/мл		
	Ns-D1	Ns-D2	Rs-AFP2*
<i>A.niger</i>	3,5	3,5	≥170
<i>B.sorokiniana</i>	3,0	1,8	≥170
<i>F.oxysporum</i>	9,5	5,3	≥170
<i>F.graminearum</i>	6,9	6,9	≥170
<i>F.culmorum</i>	6,9	6,9	2,1
<i>B. cinerea</i>	27,4	13,7	1,8

\* Rs-AFP2 – редиска дефензини *Radish sativus*

Бу алмашиниш дефензинларнинг *B. cinerea* ва *F. culmorum* га қарши жудаям юқори фаолликка эга редиска дефензинларига нисбатан пастроқ фаоллик намён қилишига жавобгар бўлиши мумкин. 38 ҳолатда Val/Lys алмашинувининг аҳамияти номаълум. Олинган натижалар Ns-D2 дефензини кўплаб замбуруғлар (*B. sorokiniana*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*) ўсишини тўхтатишда анча фаол эканлигини кўрсатди. Бундан ташқари ушбу дефензин *Ph. Infestans* нинг кучли ингибитори ҳисобланади.

8- жадвал

**Ns-D1 ва Ns-D2 дефензинларининг картошка тугунагида фитофтороза кўзгатувчиларининг ривожланишини тўхтатишидаги биологик фаоллиги**

Концентрация, мкг/мл	96 соат инкубирлашдан кейин	120 соат инкубирлашдан кейин	144 соат инкубирлашдан кейин
	Фаолликни баҳолаш	Фаолликни баҳолаш	Яқуний фаолликни баҳолаш
55,0	+++ / +++	++ / +++	+ / ++
27,5	+++ / +++	++ / ++	+ / +
13,6	+++ / +++	++ / ++	- / +
6,8	++ / +++	+ / +	- / -
3,4	++ / +++	+ / +	- / -

Диск юзасида фитофторозанинг ўсиш даражаси бўйича фаолликни баҳолаш 4 балли шкалада ҳисобланди: 4 балл – ривожланишнинг йўқлиги; 3 балл – ривожланиш даражаси <10%; 2 балл – ривожланиш 10-20% (IC<sub>50</sub>); 1 балл – ривожланиш 20-40%.

Ns-D2 дефензинининг юқори биологик фаоллигини Ns-D1 да 39-ҳолатидаги Pro қолдиғининг Leu га алмашиниши сабабли дея тахмин қилиш

мумкин, чунки бу иккала дефензинни бир-биридан фарқловчи ягона аминокислотадир ва антифунгал фаолликда бу қолдиқнинг роли муҳим эканлигининг исботидир.

**Антибактериал фаоллиги.** Биологик синов учун: а) граммусбат- *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis*; б) грамманфий - *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli* бактерия культураларидан фойдаландик.

9-жадвал

**Ns-D1/Ns-D2 дефензинларнинг антибактериал хоссалари**

Дефензин концентрацияси (мкг/50 мкл)	Бактерия ўсиши сустлашган зона, см (чўқурча ўлчами ҳисобида)*				
	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Escherichia coli</i> .
11	1,3/1,3**	0,9/1,3	1,2/1,4	1,4/1,5	0,7/0,7
5.5	1,2/1,3	0,6/1,2	1,2/1,3	1,2/1,2	0,6/0,7
2.25	1,0/1,1	0,6/0,8	1,0/1,0	0,9/1,0	0,6/0,6

\*чўқурча диаметри – 0.5 см \*\* Ns-D1/Ns-D2 дефензинларда камайган зона

Дефензинларнинг антибактериал фаоллиги 48 соат инкубирлашдан кейин бактерия ўсиши камайган зона ўлчами бўйича радиал диффузия усули ёрдамида аниқланди. Синов дефензинларнинг таъсир қилувчи концентрациясида 27,5 - 220 мкг/мл диапазонда ўтказилди.

Синов давомида граммусбат бактерияларга (*C. michiganensis* ва *B. subtilis*) самараси аниқланди. Грамманфий бактерияларга нисбатан самара эса текширилаётган бактериянинг турига боғлиқ бўлди. *E. coli* нинг таъсири камроқ, *P. syringae* ники эса таъсири кўпроқ бўлди. Шу билан бирга, синалаётган дефензинлар билан гомолог бўлган юқори фаолликка эга редиска дефензинлари 200 мкг/мл дан паст концентрацияда бактериялар (*B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. Aureus* ва *Strep. Faecalis*) ўсишини тўхтатишга таъсир кўрсатмайди. *Nigella sativa* дефензинларининг бактерияларга самарали таъсири Ns-D1 ва Ns-D2 да Val-39 нинг редискадаги Lys га алмашинганлиги билан боғлиқ деб тахмин қилинди.

**Ns-W1 ва Ns-W2 тионинларининг антифунгал фаоллиги**

Ажратиб олинган Ns-W1 ва Ns-W2 тионинларининг антифунгал фаоллиги хитин тутган модел фитопатогенларда радиал диффузия усулида 48 соат инкубирлашдан кейин бактериялар ўсиши тўхтаган зонанинг ўлчами бўйича аниқланди.

Ns-W1 ва Ns-W2 конидиялар мембранаси ва хужайра девори яхлитлиги бузилишини келтириб чиқарди. Дефензинлар фаоллигидаги ҳолат каби Ns-W1 биологик фаоллигининг Ns-W2 га нисбатан юқорилиги 19 ҳолатда Met қолдиғининг Pe га ва 25 ҳолатда Ser қолдиғининг Ala га алмашиниши сабабли деб тахмин қилиш мумкин, чунки олинган тионинлар ушбу аминокислоталар билан фарқланади, бу эса антифунгал фаолликда ушбу қолдиқнинг роли муҳим эканлигининг исботидир.

## Ns-W1 ва Ns-W2 тионинларининг антифунгал фаоллиги

Пептид/замбуруғ	Ns-W1		Ns-W2		Морфологик тузилиш ўзгаришлари**
	ИК <sub>50</sub> , мкМ	МИК*, мкМ	ИК <sub>50</sub> , мкМ	МИК*, мкМ	
<i>Fusarium solani</i>	2,3	3,8	1,8	3,0	+++***
<i>Alternaria alternata</i>	2,7	5,0	2,1	3,0	++
<i>Botrytis cinerea</i>	1,9	3,8	1,1	3,0	+++
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	2,9	3,8	2,7	3,0	++

\*максимал самара берадиган минимал ингибирловчи концентрация; \*\* МИКдаги маълумотлар; \*\*\*«++++» - цитолитик самара 100%; «+++» - цитолитик самара 50% дан ортик; «++» - цитолитик самара 50% га тенг; «+» - цитолитик самара 50% дан кам.

**Ажратилган пептидларнинг антимиқроб фаоллиги (тадқиқотлар Тошкент Тиббиёт академияси микробиология кафедрасида бажарилди).** Ажратилган пептидларнинг одам организми учун патоген бактериялар: *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Trichoderma viride* га қарши антимиқроб фаоллиги ўрганилди.

Эталон вариант сифатида кенг таъсир спектрига эга антибиотик – канамициндан 5/2 мкг/мл концентрацияда фойдаланилди.

Олинган натижалар седана дефензинлари бактериялар ўсишини секинлаштиришини, *Trichoderma viride* қўлланилган ҳолатда эса дефензинлар ўз фаоллиги бўйича канамицин антибиотигидан устун туришини кўрсатди.

## Ns-D1/Ns-D2 дефензинларининг одам организми учун патоген бактерияларга қарши антимиқроб фаоллиги

Дефензин концентрацияси (мкг в 50 мкл)	Бактерия ўсиши сустлашган зона, см (чуқурча ўлчами ҳисобида)*					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<b>10</b>	1.9/1.7	2.6/2.4**	2.8/2.7	2.6/2.6	2.6/2.3	1.4/1.1
<b>5</b>	1.7/1.5	2.3/2.2	2.6/2.7	2.4/2.3	2.6/2.2	1.3/1.2
<b>2</b>	1.7/1.4	2.1/2.0	2.5/2.4	2.2/2.1	2.6/2.0	1.2/1.0
<b>Канамицин</b>	1.2/1.2	1.4/1.3	2.0/2.0	1.7/1.5	1.5/1.4	1.8/1.7

\*Чуқурча диаметри – 0.5 см \*\* Ns-D1/Ns-D2 дефензинларда камайган зона

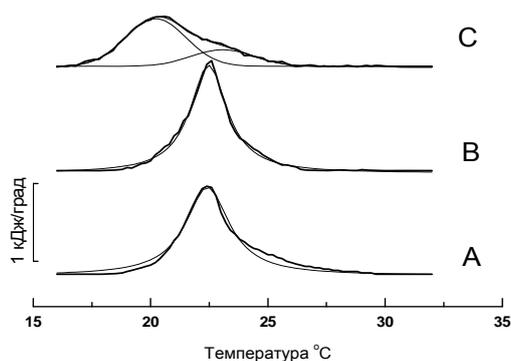
Седана дефензинлари билан редиска дефензинларининг антимиқроб ва антибактериал фаолликларини солиштириш натижасида аниқландики, редиска дефензинлари текширилаётган бактериялар ўсишини фақатгина юқори концентрацияларда > 200 мкг/мл секинлаштиряпти. *Nigella sativa* дефензинларининг бактерияларга қарши таъсир самараси даги редискадаги Val-39 нинг Ns-D1 ва Ns-D2 даги Lys билан алмашилиши билан боғлиқ бўлиши мумкин.

**Ns-LTP1нинг тули хил липид тизими моделлари билан ўзаро таъсирини ўрганиш (профессор Б.А.Салахутдинов раҳбарлигида ФКТУ лабораторияси билан ҳамкорликда бажарилди).**

Дифференциал сканирловчи колориметрия усули ва ясси бислой фосфолипид мембранаси потенциал фиксацияси ёрдамида Ns-LTP1нинг фосфолипид бислой системада фазавий ўтишлар термодинамик параметрларига ва мембрананинг ўтказувчанлигига таъсири ўрганилди.

ДМФХ+5%ДГ дисперсиясига липидга нисбатан оксил концентрацияси 1:50 (М/М) бўлган Ns-LTP1 қўшилганда ушбу бислой системанинг фазавий ўтишлар параметрида ўзгариш кузатилади – умумий суюқланиш  $\Delta H_{tot}$  энтальпияси, ярим кенглик  $\Delta T_p$  ва асосий фазавий ўтишлар ҳарорати  $T_p$  камаяди.

Эгри суюқланишда асосий пикдан ташқари юқори ҳароратли пикнинг пайдо бўлиши кузатилади (9С-расм). Юқори ҳароратли елка термограммада катта эҳтимолликда ДГ молекуласи билан Ns-LTP1 ассоциатига тегишли бўлади.



**9-расм. Мультиламелляр дисперсиянинг суюқланиш термограммаси:  
А – ДМФХ+5%ДГ; В – ДМФХ+5%ДГ+Ns-LTP1 (50:1); С – ДМФХ+5%ДГ+ Ns-LTP1 (25:1)**

Кўриниб турибдики, Ns-LTP1 бислой липид мембраналари билан улар таркибида диацилглицерол, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин каби фосфолипидлар мавжудлиги учун ўзаро таъсирлашади. Ns-LTP1 фосфолипид бислойининг лабализациясини келтириб чиқариши, уларнинг  $K^+$  ионлари ўтказувчанлигини ўзгаришишига олиб келувчи физик-кимёвий параметрларни ўзгартириши аниқланди.

Уруғдан олинган Ns-LTP1 ва нишдан олинган Ns-LTP2 нинг липид мембраналаридан ўтказувчанлиги ўрганилди. Натижалар ANTS флуоресцент зондининг тоза ҳолдаги ФХ ёки ФХ нинг ДМФС билан аралашмасидан иборат липосома ички ҳажмидан чиқиши уларга Ns-LTP1 ва Ns-LTP2 қўшилишида  $C_{LTP}/C_{лип}$  ўлчимига боғлиқ, яъни самара дозага боғлиқ эканлигини кўрсатди. Бунда Ns-LTP1 Ns-LTP2 га солиштирилганда, ФХ липосомалари ички ҳажмидан ANTS флуоресцент зонди чиқишини кўпроқ индуцирловчи таъсирга эга. Айниқса 90%ФХ+10% ДМФС нисбатида ҳосил

бўладиган манфий зарядланган липосомаларда бу ҳолат янада яққол намоён бўлади ва адабиётларда келтирилган маълумотларга мос келади.

Бу модель ва биологик мембраналар таркибида анион липидларнинг мавжудлиги уларда кичик органик молекулалар ва ноорганик ионлар ўтиши мумкин бўлган тешик ёки нуқсонлар ҳосил бўлиш эҳтимоллигини ошириши мумкин деган хулосани тасдиқлайди.

Диссертациянинг «**Куйишга қарши «Седанил» фармацевтик композицияси**» деб номланган тўртинчи бобида кексаларни ажратилган пептидларнинг биологик фаоллигига оид олинган маълумотлар асосида ишлаб чиқарилган ярани ботирувчи ва тўқималарни қайта тикловчи хусусиятга эга бўлган фармацевтик композициянинг рецептураси, фармакологик клиник олди синов натижалари ва Нигедаза липолитик ферментини олиш учун оптимал шароитлар мажмуаси келтирилган.

Ишлаб чиқарилган композиция ёрдамида йирингли-яллиғланиш касалликларини даволашда максимал терапевтик самарага эришиш мақсадида таъсир этувчи модданинг оптимал концентрациясини танлаб олиш керак эди. Бунинг учун фаол таъсир этувчи модда сифатида полипептидлар суммаси ва уруғ ёғи тутган композициянинг 6 вариацияси тайёрланди.

Фармацевтик малҳамъ композициясининг самарадорлигини ўрганишга оид тажрибалар зотсиз эркак оқ каламушлар термик куйишлари ва механик жароҳатлари моделларида ўтказилди.

12-жадвал

**Ишлаб чиқарилган композициядаги оксиллар ва ёғнинг оптимал концентрациялари мажмуи**

Фойдаланилган препарат	Пўстлоқ битмаслигининг бошланиши	Пўстлоқ битмаслигининг тугаши
назорат	27-кун (5 дан 1)	30-кун (5 дан 5)
асос	13-кун (5 дан 1)	16-кун (5 дан 5)
Асос+100 мкг полипептидлар суммаси	8-кун (5 дан 1)	11-кун (5 дан 5)
<b>Асос+200 мкг полипептидлар суммаси</b>	<b>6-кун (5 дан 1)</b>	<b>9-кун (5 дан 5)</b>
Асос+500 мкг полипептидлар суммаси	7-кун (5 дан 1)	10-кун (5 дан 5)
Асос+ 1 мл ёғ	8-кун (5 дан 1)	11-кун (5 дан 5)
<b>Асос+2 мл ёғ</b>	<b>7-кун (5 дан 1)</b>	<b>9-кун (5 дан 5)</b>
Асос+ 5 мл ёғ	7-кун (5 дан 1)	10-кун (5 дан 5)
Левомеколь	17-кун (5 дан 1)	20-кун (5 дан 5)
Актовегин	18-кун (5 дан 1)	20-кун (5 дан 5)

Ўтказилган тажрибалар ишлаб чиқарилган композициянинг энг юқори терапевтик самарага эришилган оптимал концентрацияси, яъни 20 мкг - полипептидлар суммаси ва 2 мл –ёғни танлаб олиш имконини берди. Олинган маълумотлар натижасига кўра 20 мкг седана *Nigella sativa* уруғи полипептидлари ва совуқ пресслаш орқали олинган 2 мл седана уруғи ёғидан иборат композиция яратилди.

Композиция таркибидаги компонентлар қуйидаги нисбатларда, масс. %:

Цетил спирти – 33  
 Эмульгатор Т1 – 3  
 Полипептидлар суммаси – 0,0002  
 Седана уруғи ёғи – 0, 2  
 А ва Е Витаминлари  
 Сув 100 гача

«Седанил» фармацевтик малҳами композицияси самарадорлигини ўрганиш учун юкорида баён этилган схемалар бўйича тажрибалар ўтказилди. Назорат сифатида солиштирма препаратлар Актовегин ва Левомеколдан фойдаланилди.

13-жадвал.

Композициянинг ярали пўстлоқнинг битмаслиги тезлигига таъсири.

Фойдаланилган препарат	Пўстлоқ битмаслигининг бошланиши	Пўстлоқ битмаслигининг тугаши
назорат	27-кун (5 дан 1)	30-кун (5 дан 5)
асос	13-кун (5дан 1)	16-кун (5 дан 5)
<b>Асос+20 мкг полипептидлар суммаси + 200 мкл ёғ</b>	<b>5-кун (5 дан 2)</b>	<b>8-кун (5 дан 5)</b>
Левомеколь	17-кун (5 дан 1)	20-кун (5 дан 5)
Актовегин	18-кун (5дан 1)	20-кун (5 дан 5)

Асосга пептидлар ва ёғнинг биргаликда кўшилиши синергетик самара намоён қилиши ва яратилган композиция жароҳат туби эпителизациясининг жадаллиги бўйича Левомеколь ва Актовегин малҳамларидан устун келганлиги аниқланди. Назорат гуруҳи ҳайвонлари жароҳатлари узок вақтгача қалин қорақўтир билан қопланган ҳолда қолди ва жароҳатлар тажриба гуруҳига жароҳатларига нисбатан кечроқ битди. Тажриба ҳайвонларининг куйишдан қолган жароҳатлари юмшоқ чандиқ билан битди, ортиқча чандиқлар кузатилмади.

«Седанил» фармацевтик композициясининг клиник олди тадқиқотлари композиция токсик бўлмаган моддаларга тегишлилиги ва у кумулятив хоссалар намоён қилмайди деган хулосага келишга имкон берди. Экспериментал моделлар карагеннин шишларида яллиғланишга қарши ўртача таъсир кўрсатади, аллергия хоссалар намоён қилмайди, эмбриотоксиклик, терратогенликка ва иммун тизимига заҳарли таъсир кўрсатмайди.

Олинган натижалар асосида «Полипептидлар комплекси» ва «Фармацевтик композиция» га ВФМ лойиҳалари тузилди.

Диссертациянинг «**Материаллар, антимикроб пептидлар тадқиқотининг замонавий усуллари ва шароитлари, биологик фаоллиги ва фармакотоксикологияси келтирилган**» деб номланган бешинчи бобида кексаларни ажратиш методикаси, тузилиш ва биологик тадқиқот усуллари келтирилган.

## ХУЛОСАЛАР

1. Седана *Nigella sativa* уруғи ва нишидан кислотали экстракция ва комплекс хроматографик усуллар – аффин, эксклюзион, юқори самарали суюқлик хроматографияси усулларини ўз ичига қамраган индивидуал антимиқроб пептидларни ажратиб олиш усули ишлаб чиқилди.

2. Седана уруғидан молекуляр массаси 9602 Да бўлган, таркибида 8 та цистеин қолдиғи тутган янги липид ташувчи оқсил Ns-LTP1 ажратиб олинди, унинг липид ташувчи оқсиллар синфига мансублиги асосида бирламчи тузилиши аниқланди. Ns-LTP1 p86527 идентификация рақами билан EMBL маълумотлар базасида қайд этилди. Турли гуруҳ фитопатогенларига нисбатан биологик фаоллиги аниқланди; Ns-LTP1 оқсилнинг мембрана ўтказувчанлигига таъсири ясси бислой фосфолипид мембраналари билан фиксация потенциали усули ёрдамида ўрганилди. Олинган натижалар асосида LTP нинг фунгитоксиклик механизмларидан бири аниқланди.

3. Иккита гомологик пептидлар Ns-D1 ва Ns-D2 ажратилди, уларнинг тўлиқ аминокислота анализи ўрганилди дефензинлар синфига мансублиги исботланди, *Brassicaceae* оиласи пептидлари билан гомолог эканлиги кўрилди. Дефензин Ns-D2 энг юқори антифунгал ва антимиқроб фаоллик намоеън қилди. Дефензин Ns-D2 3.4 мкг/мл концентрацияда *B.sorokiniana* замбуруғ конидияси плазматик мембранасини бузади.

4. Молекуляр массаси 5696 Да га тенг бўлган, таркибида 8 та цистеин тутган янги пептид Ns-N1 ажратиб олинди. Қисман N-охирги аминокислота кетма кетлигини аниқлаш асосида ушбу пептиднинг маълум пептидлар билан гомологи мавжуд эмаслиги аниқланди. EMBL маълумотлар базасига ушбу пептидни *Ranunculaceae* оиласи гомологик қаторига қайд қилиш учун талабнома берилди.

5. Молекуляр массаси 5070 Да га тенг бўлган бошоқли ўсимликлар γ-пуротионинлар янги пептид Ns-W1 ажратилди. Қисман N-охирги аминокислота кетма кетлиги аниқланди ва EMBL маълумотлар базасига қайд этиш учун талабнома берилди.

6. Илк бор седана уруғидан таркибида 6 та цистеин тутган ва ички ва занжирлараро дисульфид боғлар билан боғланган иккита полипептид занжиридан тузилган пептид Ns-G1 ажратиб олинди. Пептид кам учрайдиган тузилишга эга ва маълум катион пептидлар орасида аналогли мавжуд эмас.

7. Седана нишидан 9086 Да молекуляр массага эга бўлган липид ташувчи оқсил Ns-LTP2 ва B-тип дефензинларига мансуб 10 та пептид ажратилди, уларнинг молекуляр массалари ва молекуладаги цистеин сони аниқланди.

8. Седана уруғи ёғи ва пептидлар суммаси асосида «СЕДАНИЛ» малҳами рецептураси ишлаб чиқилди. Ўтказилган фармакологик синовлар натижасида ушбу малҳам яраларни битиришда юқори фаолликка эга эканлиги аниқланди.

9. «Седана *Nigella sativa* уруғи», «Полипептидлар комплекси» ва «Фармацевтик композиция»га вақтинчалик фармакологик мақола лойиҳалари тайёрланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 ПРИ ИНСТИТУТЕ  
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НАЦИОНАЛЬНОМ  
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ  
СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК**

---

**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**ОЩЕПКОВА ЮЛИЯ ИГОРЕВНА**

**СТРУКТУРА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *NIGELLA SATIVA* И СОЗДАНИЕ  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ**

**02.00.10 - Биоорганическая химия  
(химические науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ**

**Ташкент - 2016**

**Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за 30.09.2014/В2014.3-4.К49**

Докторская диссертация выполнена в Институте биорганической химии имени акад.А.С.Садыкова.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещен на веб-странице Научного совета по адресу (<http://ss.biochem.uz>) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу ([www.ziyoNet.uz](http://www.ziyoNet.uz)).

**Научный  
консультант:**

**Вешкурова Ольга Николаевна**  
доктор химических наук

**Официальные  
оппоненты:**

**Ташмухамедов Мирожиддин Салахович**  
доктор химических наук, профессор

**Салимов Баходир Тахирович**  
Доктор химических наук, профессор

**Азизов Умурхан Мухтарович**  
доктор химических наук, профессор

**Ведущая организация: Ташкентский фармацевтический институт**

Защита диссертации «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_ часов на заседании научного совета 16.07.2013./К/В/Т.13.01 при Институте биорганической химии и Национальном Университете РУз (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биорганической химии. Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: [asrarov54@mail.ru](mailto:asrarov54@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.  
(реестр протокола рассылки № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ 2016 года)

**А.С.Тураев**

Председатель Научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук, д.х.н., профессор

**М.И.Асраров**

Ученый секретарь Научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук, д.б.н., профессор

**А.А.Ахунов**

Председатель Научного семинара при Научном совете  
по присуждению ученой степени доктора наук,  
д.б.н., профессор

## ВВЕДЕНИЕ (Анотация докторской диссертации)

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Основным направлением при разработке лекарственных препаратов является создание новых фармацевтических препаратов на основе биологически активных веществ, полученных из местного растительного сырья.

Богатый животный и растительный мир Узбекистана служит потенциальным источником ценных биологически активных веществ, перспективных для использования в медицине и сельском хозяйстве. Среди широкого спектра эндемичных растений используемых на протяжении многих веков в народной медицине, особое внимание привлекает чернушка посевная — *Nigella sativa* L., относящаяся к семейству лютиковых — *Ranunculaceae*.

Семена чернушки *Nigella sativa* имеют множество областей применения: как высокоэффективное мочегонное, желчегонное, мягкое слабительное и иммуностимулирующее средство. К тому же некоторые из компонентов дают великолепные результаты в лечении различных дерматологических заболеваний, связанных с нейрогуморальными и гистаминными нарушениями в организме. В дерматологии применяются при атопическом дерматите, идеосинক্রазии, восстанавливают кожный иммунитет, оказывают мощное антиоксидантное действие, устраняют застойные процессы кожи.

Исследование природных соединений, проявляющих антимикробную активность, имеет большое практическое значение в медицине в качестве компонентов лекарственных средств при терапии инфекционных и грибковых заболеваний. Важнейшее применение антимикробные белки и пептиды могут найти в медицине, как альтернатива традиционно-используемым антибиотикам и антимикотикам. Известно, что в результате широкого применения антибиотиков в медицинской практике в последние десятилетия, у микроорганизмов выработались механизмы устойчивости. В результате возникли штаммы, устойчивые к большинству используемых в настоящее время антибиотикам. Антимикробные белки и пептиды в этом плане чрезвычайно перспективны, т.к. они обладают широким спектром действия, действуют быстро и эффективно, не вызывают негативных последствий.

Химический состав семян чернушки изучен достаточно хорошо. Выделены и охарактеризованы липиды, углеводы, фенольные соединения, однако пептиды, содержащиеся в семенах, не изучены, поэтому новые высокоактивные антимикробные белки и пептиды из чернушки посевной и их всестороннее изучение являются перспективным направлением, проблема поиска и выделения новых подобных соединений в биоорганической химии и медицине очень актуальна.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Постановлением Кабинета Министров Республики Узбекистан от 14 июля 2006 г. № ПП-416 «О мерах по

поддержке отечественных производителей лекарственных средств и изделий медицинского назначения», а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

**Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики.** Данное исследование выполнено в соответствии приоритетного направления развития науки и технологий республики VI. «Медицина и фармакология».

**Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации.** Научные исследования, направленные на поиск, выделение, изучение структуры, биологических свойств и молекулярных механизмов действия антимикробных пептидов у разных видов живых организмов осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе Uppsala University (Швеция), The State University of New Jersey (США), Massey University (Новая Зеландия), Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова при Российской академии наук, University of Calgary (Канада), Centre for Infection and Immunity Amsterdam, University of Amsterdam (Нидерланды), Национальный университет Узбекистана.

В результате исследований, проведенных в мире по поиску, выделению, изучению структуры, биологических свойств и молекулярных механизмов действия антимикробных пептидов, получен ряд научных результатов; в том числе: для создания новых лекарственных препаратов выделены и охарактеризованы пролин/аргинин-богатые пептиды (Massey University); из целомотцов морского кольчатого червя *Arenicola marina* были выделены новые пептиды-ареницины, обладающие ярко выраженной антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (University of Calgary). Определена полная первичная структура зрелых ареницинов и генов их предшественников, позволившая сделать вывод о выявлении пептидов нового семейства (Uppsala University); проведено сравнительное изучение особенностей токсического действия структурно отличных антимикробных пептидов с целью установления молекулярных механизмов (Институт Цитологии, Россия).

В мире по антимикробным пептидам по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: поиск потенциальных соединений для создания новых лекарственных препаратов в медицине; в сельском хозяйстве для создания трансгенных растений, устойчивых к определенным патогенам; изучение взаимосвязи установленной структуры и механизма действия выделенных антимикробных пептидов.

**Степень изученности проблемы.** В настоящее время известно более 4000 белков и пептидов растительного происхождения, обладающих широким спектром антимикробной активности. Отличительной чертой этих белков и пептидов является неспецифическое взаимодействие с цитоплазматической мембраной, приводящее к разрушению липидного слоя и лизису атакуемой клетки.

Зарубежными учеными H.A. Scheraga, M. Khalili, A. Liwo, Y. Zhang, R.F. Murray, H.W. Harper, D.K. Granner, P.A. Mayes проведен поиск, выделение, изучение структуры, биологических свойств и молекулярных механизмов действия антимикробных пептидов из объектов растительного и животного происхождения, планктонов, микроорганизмов. Выявлены новые классы антимикробных пептидов (F. R.Terras, H. M.Schoofs, K.A.T.Silverstein). Значительные успехи были достигнуты в изучении роли белков в ходе матричного синтеза биополимеров, понимания механизмов их действия в различных процессах жизнедеятельности организмов, установления связи между их структурой и функцией (M.Montal, P.Mueller). Огромное значение при этом имело совершенствование методов исследования, появление новых способов для разделения белков и пептидов. В 2012 году Банк данных о белках (Protein Data Bank) содержал около 87 000 структур белков.

В странах СНГ, исследования, посвященные изучению антимикробных пептидов, физико-химической характеристике и механизму действия, наблюдаются в научных произведениях Е.В.Гришина, Ц.А.Егорова, В.Х.Хавинсона, П.Л.Привалова, В.Б.Белобородова.

В Узбекистане первые исследования по выделению белков и пептидов, изучению их биологической активности проведены под руководством академиков А.С.Садыкова и Ш.И.Салихова. В Институте биоорганической химии и Институте химии растительных веществ на протяжении ряда лет проводится поиск и изучение лекарственного растительного сырья с целью выявления сырьевых источников для создания лекарственных препаратов (Н.Д.Абдуллаев, У.М.Азизов)

В Ташкентском фармацевтическом институте проведено углубленное фармакогностическое изучение и химический состав семян чернушки посевной (И.К.Азизов, Ш.А.Темурова). Полученные результаты рекомендованы в качестве нового эффективного лекарственного средства противовоспалительного действия. Однако, до настоящего времени до сих пор не было создано лекарственных препаратов на основе соединений белково-пептидной природы.

**Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами высшего образовательного учреждения, где выполнена работа.** Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских проектов Института биоорганической химии М-11 «Исследование биологически активных пептидов из некоторых дикорастущих видов растений и ядовитых животных Центральной Азии» проект Узбекистан-Россия (2005-2006 гг.), МР-38-2008 «Поиск новых биологически активных соединений из эндемичных растений Узбекистана» проект Узбекистан-Россия (2007-2008 гг.), ФА-ФЗ-Т-140 «Идентификация дефенинов и терпеноидов хлопчатника, других представителей семейства *Malvaceae* и исследование молекулярных механизмов антимикробной, инсектицидной и канцеролитической активностей» (2007-2011 гг.), Ф6-Т018 «Структурно-функциональные исследования пептидов растительного

происхождения, обладающих антибиотической активностью» (2012-2016 гг.), А11-Т017 «Разработка фармацевтической композиции на основе биологически активных компонентов из семян седаны» (2012-2014 гг.) и ФА-А-11-Т073 «Получение антимикробных рекомбинантных пептидов семян *NIGELLA SATIVA*, утверждение научно-технической документации на ранозаживляющую субстанцию и липолитический фермент «Нигедаза» (2015-2017 гг.).

**Целью исследования** является разработка методов выделения индивидуальных цистеинсодержащих пептидов из семян чернушки посевной *Nigella sativa*, установление возможности их применения в медицине и создание фармацевтических композиций на их основе.

**Задачи исследования:**

анализ современного состояния исследований в области антимикробных пептидов и обоснование целесообразности изучения белково-пептидных компонентов чернушки посевной *Nigella sativa*, как сырьевого источника;

выделение в индивидуальном виде пептидов катионной природы и изучение их физико-химических параметров;

определение частичной или полной аминокислотной последовательности и количества цистеиновых остатков в структуре молекул с целью отнесения их к известным типам антимикробных пептидов по базе данных EMBL;

установление антимикробной и антигрибной активности выделенных пептидов по отношению к различным группам патогенов сельхозкультур и человека;

исследование возможности практического применения выделенных пептидов и разработка фармацевтической композиции на их основе;

проведение фармако-токсикологических исследований и изучение специфической активности разработанной композиции.

**Объектом исследования** являются семена и проростки эндемичного растения чернушки посевной *Nigella sativa* семейства *Ranunculaceae*, произрастающей в Узбекистане.

**Предмет исследования** составляет изучение структуры и биологической активности выделенных антимикробных пептидов.

**Методы исследования.** В диссертации для выделения и очистки индивидуальных антимикробных пептидов применены методы экстракции, аффинной, эксклюзионной и высокоэффективной жидкостной хроматографии; для установления химической структуры новых соединений применены физико-химические методы исследований (электрофорез, УФ- и MALDI масс-спектрометрия, секвенирование); для исследования фунгицидной и антимикробной активности – турбиметрия, спектрофотометрия, метод газона грибов, а для мембранотропной активности веществ – дифференциальная сканирующая калориметрия, световая микроскопия.

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

впервые выделены и охарактеризованы катионные пептиды в семенах и проростках чернушки посевной *Nigella sativa*;

из семян чернушки выделен новый липидпереносящий белок Ns-LTP1 с молекулярным весом 9602 Да, содержащий 8 цистеиновых остатков, для которого установлена первичная структура и полученные данные зарегистрированы в банке данных BLAST;

выделено и детально охарактеризовано 6 новых пептидов (Ns-D1, Ns-D2, Ns-W1, Ns-W2, Ns-N1 и Ns-G1);

определено, что два новых гомологичных пептида Ns-D1 и Ns-D2 с молекулярными массами 5485 Да и 5498 Да, обладают высокой ингибирующей активностью по отношению к фитопатогенным грибам;

доказано, что пептиды Ns-W1 и Ns-W2 с молекулярными массами 5143 Да и 5070 Да содержат 8 цистеиновых остатков и гомологичны  $\gamma$ -пуротионинам злаковых;

определено, что пептид Ns-N1 с молекулярной массой 5696 Да, содержит в своем составе 8 цистеиновых остатков, не имеет аналогов по установленной N-концевой аминокислотной последовательности;

определено, что пептид Ns-G1 с молекулярной массой 2794 Да, содержит в своем составе 6 цистеинов и относится к новому классу цистеинбогатых пептидов, не имеющему аналогов по молекулярной массе и числу цистеиновых остатков среди известных антимикробных пептидов;

проведен сравнительный анализ спектра пептидов в семенах и проростках и доказано, что в проростках чернушки содержатся липидпереносящий белок Ns-LTP2 с молекулярным весом 9086 Да и 10 пептидов, относящихся к дефензинам В-типа, отсутствующих в семенах.

**Практические результаты исследования.** Создана фармацевтическая ранозаживляющая композиция «Седанил» на основе комплекса полипептидов из семян чернушки посевной. Проведены доклинические фармако-токсикологические исследования и показано, что композиция относится к нетоксичным веществам, не обладает кумулятивными свойствами. Обладает умеренным противовоспалительным действием на модели карагеннинового отека, не обладает аллергическими свойствами, не оказывает токсического действия на эмбриотоксичность и терратогенность, и иммунную систему.

**Достоверность результатов исследования** подтверждается тем, что они получены с применением современных физико-химических методов исследований. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала средних значений. Подтверждением полученных результатов служат и экспертные оценки специалистов, и практическая реализация результатов исследований, обсуждение результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, а также публикация результатов исследований в рецензируемых научных изданиях и получение патентов.

### **Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследования заключается в том, что выделен и исследован ряд новых антимикробных пептидов из семян и проростков чернушки посевной *Nigella sativa*. Полученные данные по липид-переносящему белку зарегистрированы в базе данных EMBL p86527. Полученные данные по тионинам зарегистрированы в базе данных EMBL p86545. Разработанная схема выделения антимикробных пептидов, их идентификация и установление структуры физико-химическими методами могут служить пособием при проведении новых изысканий в практической работе химиков, работающих в области химии белков и пептидов и в учебном процессе кафедры Химия природных соединений химического факультета Национального Университета Узбекистана.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе антимикробных пептидов из семян чернушки создана фармацевтическая композиция «Седанил», обладающая ранозаживляющими свойствами в случае гнойно-септических осложнений. Разработан лабораторный регламент и проекты ВФС на «Семена чернушки посевной *Nigella sativa*», «Комплекс полипептидов» и «Ранозаживляющая фармацевтическая композиция».

### **Внедрение результатов исследования.**

На основании полученных данных по выделению, физико-химическому исследованию и биологической активности антимикробных пептидов:

получен дефензин, обладающий антимикробной активностью и получен патент на изобретения Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, который применен в биотехнологии для создания устойчивых к патогенам форм сельскохозяйственных культур и в медицине (30.11.2012, № IAP 04614). В результате исследования полученные дефенины использованы как биологически активные компоненты для создания лекарственных препаратов в качестве альтернативы антибиотикам;

создана композиция, обладающая тканерегенерирующей и антибактериальной активностью и получен патент на изобретения Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан, которая использована при лечении различной этиологии (16.03.2016, № IAP 20130250). В результате исследования разработанная композиция применена для лечения механических ран и термических ожогов в случае гнойно-септических осложнений.

**Апробация результатов исследования.** Результаты исследования изложены в виде лекции и прошли апробацию на 2 республиканских и 12 международных конференциях, в т.ч.: Конф. Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимесининг ривожига келажак (Ташкент, 2007); 7<sup>th</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Ташкент, 2007); 1 Международный симпозиум по ресурсам съедобных растений и их биоактивным ингредиентам (Китай, Урумчи, 2008); Табиий фанларнинг долзарб муаммолари» Республика еш олимлар илмий-амалий анжумани (Самарканд, 2008); XXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные

направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Россия, Москва, 2009); IV Всероссийская конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Россия, Барнаул, 2009); Международная научно-практическая конференция «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства» (Казахстан, Чимкент, 2009); Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Крым, Украина, 2009); X Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2010); Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2010); Симбиоз Россия 2011 (Воронеж, 2011); 3<sup>rd</sup> International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients (Urumchi, China, 2012); Международная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2013); X Международный симпозиум по химии природных соединений (Ташкент-Бухара, 2013).

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано всего 30 научных работ. Из них 11 научных статей, в том числе 3 в республиканских и 8 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, получено 2 патента на изобретение.

**Структура и объем диссертации.** Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 193 страницы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснованы актуальность и востребованность темы диссертации, сформулированы цель и задачи, а также объект и предмет исследования, приведено соответствие исследований приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, изложены научная новизна и практические результаты исследований, обоснованы достоверность полученных результатов, раскрыта теоретическая и практическая значимость полученных результатов, приведен список внедрений в практику результатов исследований, даны сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Антимикробные пептиды: современное состояние, механизмы действия и практическое применение**» осуществлен подробный обзор научных исследований по теме диссертации и степени изученности проблемы, посвященный классификации, механизму действия и применению антимикробных пептидов растительного происхождения. Описаны фармакологические свойства компонентов семян и масла чернушки посевной *Nigella sativa*. На основе обзора сделан вывод о выборе объекта для данной работы.

Во второй главе диссертации «**Выделение и физико-химическая характеристика антимикробных пептидов из семян и проростков чернушки посевной *Nigella sativa***» описаны методы выделения индивидуальных пептидов и изучение их физико-химических параметров и структурных характеристик.

При выделении антимикробных пептидов из семян чернушки проведено сравнительное изучение эффективности экстракции 0.05н серной кислотой и 10% уксусной кислотой в присутствии ингибиторов протеаз для подавления активности эндогенных протеаз с последующим осаждением фракции белков.

Мажорные фракции, полученные при аналитическом разделении белково-пептидных экстрактов методом ВЭЖХ, были проанализированы методом времяпролетной MALDI масс-спектрометрии, показавшим, что уксуснокислый экстракт содержит большее количество белков и пептидов. При экстракции серной кислотой основная масса пептидов и белков денатурируется, поэтому для дальнейшего разделения был использован уксуснокислый экстракт.

### **Выделение антимикробных пептидов из семян чернушки посевной *Nigella sativa***

Для выделения индивидуальных АМП из семян чернушки посевной разработана схема, включающая комплекс хроматографических методов.

- 1) кислотная экстракция пептидно-белковой фракции;
- 2) аффинная хроматография;
- 3) обессоливание полученных фракций с использованием ВЭЖХ;

4) эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация) обессоленных фракций;

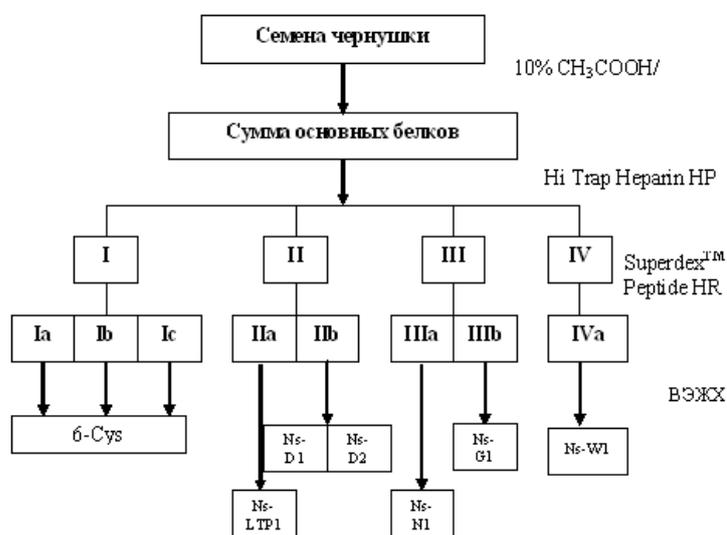
5) обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ) белково-пептидной фракции, полученной при гель-фильтрации

Суммарный экстракт хроматографировали в ступенчатом градиенте концентрации NaCl на колонке Hi Trap Heparin HP на четыре фракции. Каждая фракция была разделена методом эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрация) на колонке Superdex™ Peptide HR.

Фракции, содержащие соединения, молекулярная масса которых находилась в диапазоне, характерном для АМП, подвергали дальнейшему разделению на индивидуальные компоненты методом ОФ ВЭЖХ.

Схема 1

**Выделение антимикробных соединений из семян чернушки посевной**



При разделении первой фракции после аффинной хроматографии методами гель-фильтрации и ОФ ВЭЖХ было получено пять основных компонентов, молекулярные массы которых находятся в диапазоне, характерном для АМП.

Таблица 1

**Компонентный состав I фракции по данным масс-спектрометрии**

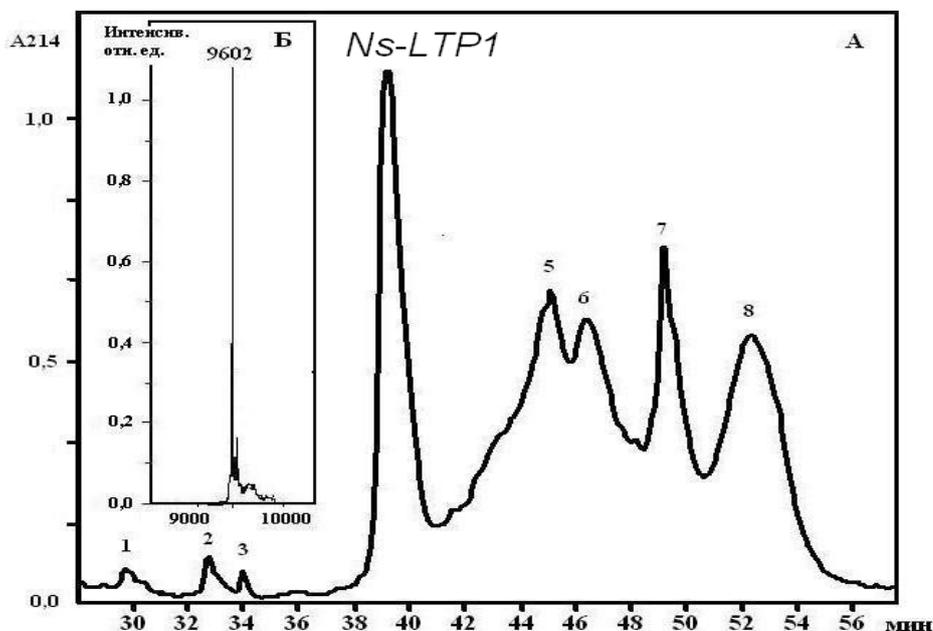
Номер фракции	1 (I-a-1)	2 (I-a-3)	3 (I-b-5)	4 (I-c-8)	5 (I-c-9)
Мол. Массы, Да	3371	3530	4219	4082	4067

Для характеристики выделенных пептидов определяли число остатков цистеина в молекуле. С этой целью пептиды восстанавливали и алкилировали. Молекулярная масса восстановленных и алкилированных пептидов первой фракции увеличилась на 638 Да по сравнению с нативными, что означало наличие 6 остатков цистеина в молекулах этих пептидов. При сравнении физико-химических свойств выделенных пептидов с известными

антимикробными пептидами обнаружено, что данные пептиды не имеют аналогов по молекулярной массе и числу цистеиновых остатков.

При разделении II фракции методом гель-фильтрации было получено две фракции, названные соответственно II-a и II-b.

При разделении фракции II-a методом ОФ ВЭЖХ на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% было получено 8 компонентов (рис.1а), один из которых является гомогенным с молекулярной массой 9602 Да, названный Ns-LTP1 (рис.1б).



**Рис.1. Выделение Ns-LTP1 из семян чернушки:**

**А) ОФ ВЭЖХ II фракции, полученной в результате аффинной хроматографии;**  
**Б) Масс-спектр нативного Ns-LTP1.**

Для отнесения выделенного белка Ns-LTP1 к определенному классу цистеинбогатых белков было проведено его N-концевое секвенирование (рис.2), определение аминокислотного состава и числа остатков цистеина в молекуле. Число остатков цистеина в молекуле Ns-LTP1 определяли по разности масс восстановленного и алкилированного (10440 Да) и нативного (невосстановленного) белка (9602 Да).

Обнаружено, что в молекуле Ns-LTP1 имелось 8 остатков цистеина; при алкилировании невосстановленного белка молекулярная масса LTP не изменилась, что означает, что в белке нет свободных SH-групп, а все 8 сульфгидрильных групп участвуют в образовании внутримолекулярных дисульфидных связей. На основании этих данных выделенный белок отнесен к группе LTP-белков.

Определен аминокислотный состав выделенного белка и установлено, что в белке семян чернушки не обнаружен Met, что характерно для LTP, основные аминокислоты (Lys, Arg, His) составляют 13% от общего числа аминокислотных остатков.

Сравнение N-концевой последовательности LTP чернушки с аминокислотными последовательностями LTP других видов растений показало высокий уровень гомологии, что подтверждает отнесение выделенного полипептида к группе липид-переносящих АМП.

Вид растения	N-концевая аминокислотная последовательность	Номер*
<i>Nigella sativa</i>	-ISCQDVKQSLAPCLPYVTGRAPKPA	P86527
<i>Oryza sativa</i>	-LSCGQVDSKLAPCVAYVTGRASAI	AAA70046
<i>Capsicum annuum</i>	-LSCSQVTSGLAPCLPYLQGRGPLGG	AAF23459
<i>Beta vulgaris</i>	-PSCDVISNTAPCLPYISRTPAPS	BAF02666
<i>Nicotiana tabacum</i>	LSCGQVQSGLAPCLPYLQGRGPLGS	Q03461
<i>Brassica oleracea</i>	ALSCGTVSGYVAPCIGYLAGNAPAPT	AAA73948
<i>Brassica rapa</i>	-LSCGTVSGNLAACIGYLTGNGPLPR	AAT40130
<i>Cicer arietinum</i>	AITCGRVDTALAPCLGYLQGGPGPSA	CAA05771
<i>Spinacea oleracea</i>	-ITCGMVSSKLAPCIGYLGKGGPLGGG	S00060
<i>Daucus carota</i>	-LTCGQVTGALAPCLGYLRSQVNVFV	P27631
<i>Hordeum vulgare</i>	AISCQGVSSALSPCISYARGNGAKPP	CAA91436
<i>Triticum aestivum</i>	--SCGQVSSALSPCISYARGNGASPS	ABB90546
<i>Prunus persica</i>	-ITCGQVSSNLAPCIPYVRVGGAVPP	AAM22768
<i>Fragaria ananassa</i>	-ITCGQVASNISPCCLTYVKSGGAVPA	AAAY83342

**Рис.2. Сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей Ns-LTP1 с 9 кДа LTP некоторых растений.**

\*по базе данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

\*\*жирным шрифтом отмечены идентичные аминокислотные остатки, серым цветом – сходные остатки.

При сравнении с известными аминокислотными последовательностями растительных 9-кДа LTP видно, что, помимо консервативных остатков Cys, Val-6, Tyr-16 (нумерация приводится по Ns-LTP1), присутствующих у всех сравниваемых видов, ряд аминокислотных остатков обнаруживается у большинства видов (Leu-10, Ala-11, Pro-12).

Однако имеются замены на Gln-4 и Gln-8, тогда как у большинства сравниваемых последовательностей имеется высокая степень консервативности в данных положениях (Gly-4 и Ser-8, соответственно).

При разделении фракции II-b на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% было получено 2 компонента II-b-2 и II-b-4, с молекулярными массами 5485 и 5498 Да. Для характеристики выделенных пептидов II-b-2 и II-b-4 определяли число остатков цистеина в молекуле. Молекулярная масса восстановленного и алкилированного пептида II-b-2 и II-b-4 увеличилась на 850 Да, соответственно, по сравнению с нативными, что означало наличие 8 остатков цистеина в молекулах пептидов. Алкилирование нативных пептидов без восстановления показало отсутствие свободных сульфгидрильных групп. Это доказывает, что все 8 остатков цистеина в данных пептидах включены в 4 межмолекулярные связи. Затем восстановленные и алкилированные пептиды были подвергнуты автоматическому секвенированию по Эдману для определения N-концевой аминокислотной последовательности пептидов II-b-2 и II-b-4.

II-b-2: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

II-b-4: Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

Установленная N-концевая аминокислотная последовательность 35 аминокислот в обоих пептидах оказалась идентичной. Поиск гомологий по базе данных UniProt показал, что оба пептида принадлежат к семейству дефензинов.

В положении 4 и 28 находилась глутаминовая кислота. Для установления полной последовательности пептидов по этому положению и решено было расщепить восстановленные и алкилированные пептиды протеазой V8, которая проявляет специфичность в основном к C-концевой пептидной связи глутаминовой кислоты типа –Glu-X-, где в качестве X может быть любой аминокислотный остаток, кроме пролина и глутаминовой кислоты. После гидролиза продукты реакции разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Были измерены молекулярные массы образовавшихся пептидов методом MALDI TOF масс-спектрометрии. В результате было предположено, что C-концевой фрагмент пептидов находится во фракции 2 и имеет молекулярную массу 2495.8 Да и 2510.4 Да, а N-концевой – во фракции 1 и имеет молекулярную массу 2999.1 Да и 2999.3 Да, для дефензинов Ns-D1 и Ns-D2 соответственно.

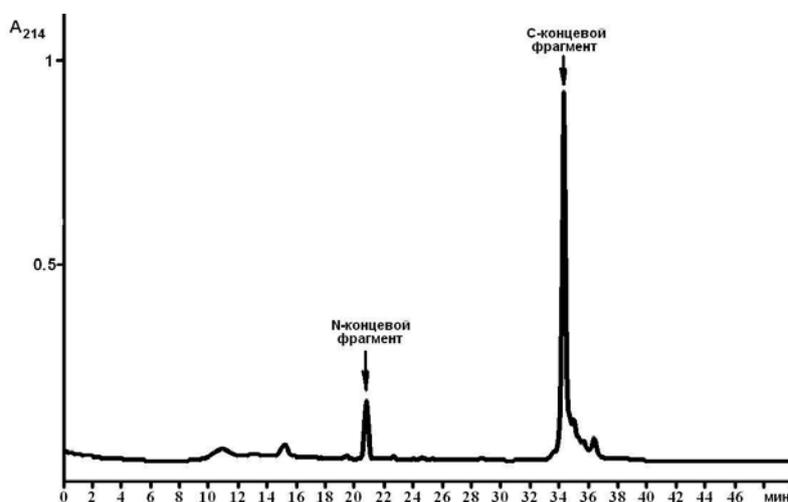


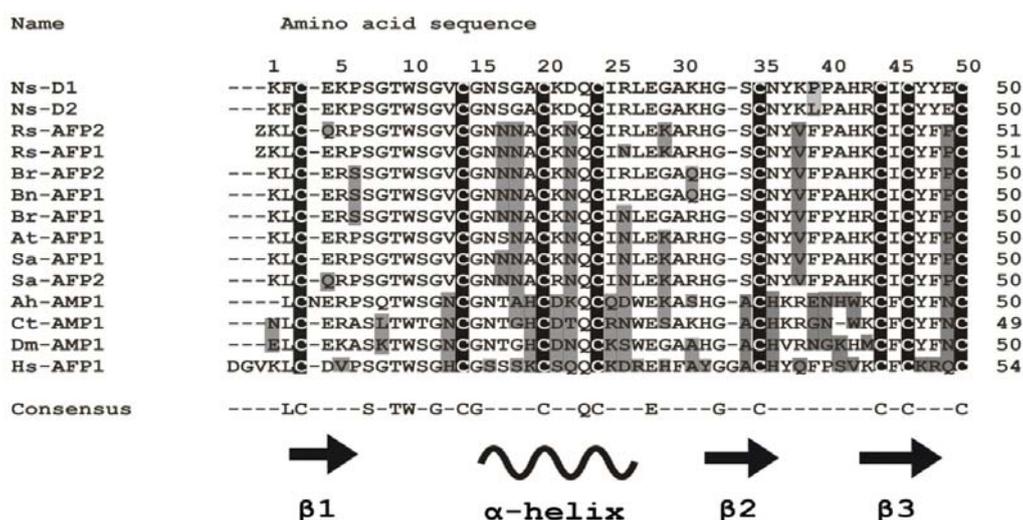
Рис.3. Хроматографическое разделение продуктов реакции расщепления протеазой V8 дефензинов на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% за 40 мин. Скорость элюции 0,75 мл/мин.

При секвенировании фракции 2 в обоих дефензинах была установлена последовательность C-концевого фрагмента молекулы. Сопоставление полученных N-концевой и C-концевой последовательностей позволило установить полную аминокислотную последовательность пептидов:

**Ns-D1:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Pro**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

**Ns-D2:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Leu**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

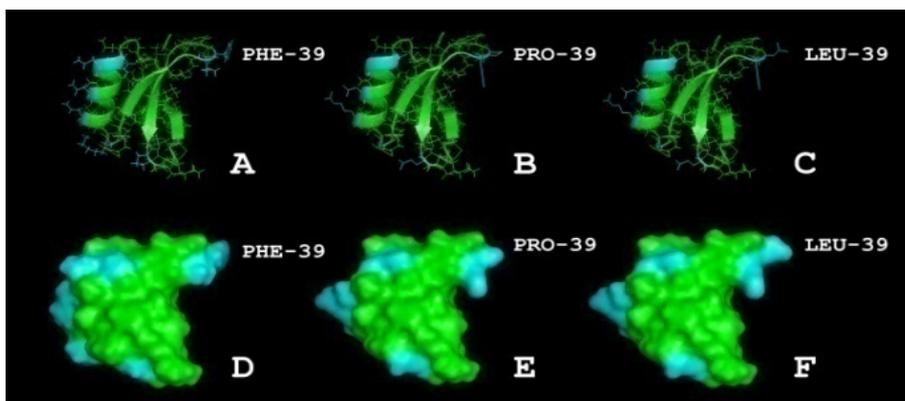
Показано, что оба полипептида состоят из 50 аминокислотных остатков, различающихся одной заменой остатка Pro на Leu в 39 положении полипептидной цепи. Кроме того, было установлено, что выделенные АМП гомологичны ранее обнаруженным в семенах семейств *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* дефензинам, которые проявляют высокую антимикробную активность в тестах *in vitro*.



**Рис.4.** Сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей Ns-D1 и Ns-D2 с 5 кДа дефензинами некоторых растений.

Сравнение аминокислотной последовательности полученных дефензинов с другими дефензинами, показало высокую степень гомологии с дефензинами из семян редиса *Raphanus sativus* (43 идентичных аминокислоты, включая консервативные), для которых была установлена трехмерная структура.

Эта структура была использована как аналог при моделировании трехмерной структуры дефензинов *Nigella sativa* с использованием программы PyMol v. 0.9.3. и установлено, что она состоит из альфа-спирали и трех бета-складок, замкнутых в петлю.



**Рис.5.** Трехмерная модель дефензинов из *Nigella sativa*. Для сравнения приводится 3D структура дефензина Rs-AFP1 из редиса. A и D, Rs-AFP1 (регистрационный номер в PDB - 1AYJ); B и E, Ns-D1, C и F, Ns-D2. Изменяющиеся остатки между дефензинами Ns-D1, Ns-D2 и Rs-AFP1 показаны голубым цветом.

При разделении фракции III после аффинной хроматографии было получено две фракции, названные соответственно III-a и III-b.

При разделении фракции III-a на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% был получен индивидуальный компонент с молекулярной массой 5696 Да, названный Ns-N1. Молекулярная масса восстановленного и алкилированного пептида Ns-N1 увеличилась на 850 Да по сравнению с нативным, что означало наличие 8 остатков цистеина в молекуле этого пептида. В восстановленном и алкилированном пептиде была определена N-концевая аминокислотная последовательность:

**Lys-Ile-Cys-Gln-Asp-Val-Lys-Gln-Ser-Leu-Ala-Pro-Cys-Leu-Pro-Tyr-Val-Thr-Gly-Arg-Ala-Pro-Lys-Pro-Ala-Pro-Glu-Cys-Cys-Asn-Glu-Ile**

Поиск аналогичной аминокислотной последовательности по базе данных EMBL с использованием программы BLAST не выявил гомологий с известными белками, что позволило отнести его к новому классу пептидов семейства *Ranunculaceae*.

При разделении фракции III-b на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% был получен основной компонент III-b-1 с молекулярной массой 2794 Да, названный Ns-G1. Пептид Ns-G1 восстанавливали и алкилировали для определения числа остатков цистеина в молекуле. После восстановления и алкилирования продукты реакции разделяли путем обращено-фазовой хроматографии на колонке Luna C<sub>18</sub>. Полученные фракции анализировали масс-спектрометрически.

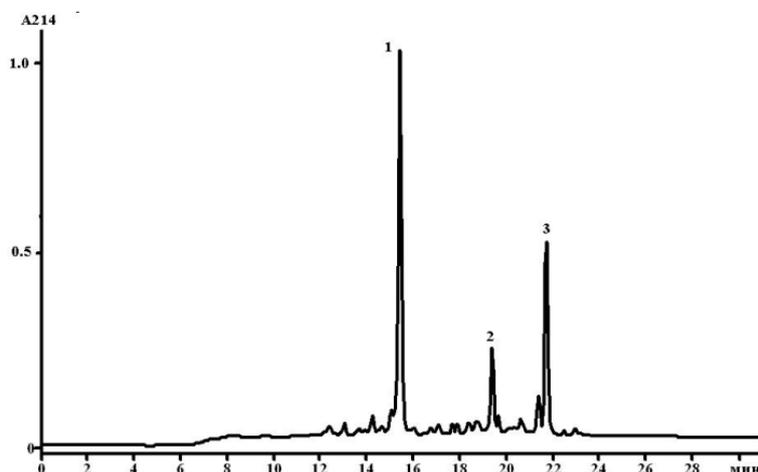
При разделении ОФ-ВЭЖХ после восстановления и алкилирования было получено 8 компонентов. Молекулярные массы выделенных соединений по данным MALDI TOF масс-спектрометрии приведены в таблице:

Таблица 3

**Компонентный состав восстановленного и алкилированного пептида по данным масс-спектрометрии**

Номер фракции	1 (III-b-1)	2 (III-b-2)	3 (III-b-3)	4 (III-b-4)	5 (III-b-5)	6 (III-b-6)	7 (III-b-7)	8 (III-b-8)
Мол. Массы, Да	1540	1752	1539	1573 1647 1904	1527	1680	1468	1468

Так как молекулярная масса каждой фракции значительно ниже молекулярной массы нативной молекулы, было предположено, что выделенный пептид состоит из двух и более цепей. Для установления количества цепей в выделенном пептиде было проведено восстановление дисульфидных связей. После восстановления продукт реакции был разделен путем ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C<sub>18</sub> (рис.6). Полученные фракции анализировали масс-спектрометрически (табл.4).



**Рис.6. Хроматографическое разделение восстановленного пептида III-b-1, на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% за 40 мин. Скорость элюции 0,75 мл/мин.**

Таблица 4

**Компонентный состав восстановленного пептида по данным масс-спектрометрии**

Номер фракции	1(III-b-1)	2(III-b-2)	2(III-b-3)
Мол. Массы, Да	1436	1423	1364

Таким образом, было установлено, что выделенная молекула состоит из двух цепей в двух вариациях. Фракция III-b-1 является основной цепью. Второй цепью может быть как фракция III-b-2, так и фракция III-b-3.

В каждом восстановленном и алкилированном звене была определена N-концевая аминокислотная последовательность.

Компонент III-b-1-2 является основной цепью, содержащей 3 цистеина (в положении 5 и 9 соединены внутрицепочечной дисульфидной связью).

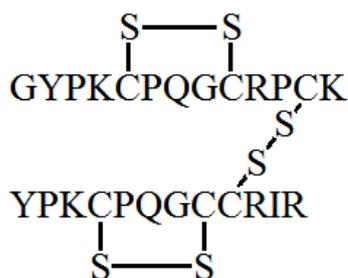
Вторая цепь, также содержащая 3 цистеина (либо компонент III-b-1-5 – в положении 10 Arg, либо компонент III-b-1-6 – в положении 10 Pro) – в положении 4 и 8 соединены внутрицепочечной дисульфидной связью.

Таблица 5

**N-концевые аминокислотные последовательности восстановленных и алкилированных пептидов фракции 500mM-7**

Компонент	N-концевая аминокислотная последовательность
III-b-1-1	GYPKC YPKCP
III-b-1-2	GYPKCPQGCRPCK
III-b-1-3	GYPKXPQGXRPCK
III-b-1-5	YPKCPQGCCRIR
III-b-1-6	YPKCPQGCCPIR
III-b-1-7	GGGGG YPKCP
III-7-1-8	YPKXPQGXCRIR

Между собой цепи соединены межцепочечной дисульфидной связью в положении 1-12 и 2-9.



В литературе отсутствуют сведения о существовании цистеинбогатых пептидов с подобной структурой, состоящей из двух полипептидных цепей, соединенных внутри и межцепочечными дисульфидными связями. На этом основании можно утверждать об открытии нового класса цистеинбогатых пептидов.

При разделении фракции IV, полученной после аффинной хроматографии, на колонке Luna C<sub>18</sub> в градиенте концентрации ацетонитрила 10-50% было получено 5 компонентов, два из которых IV-a-2 и IV-a-5, с молекулярными массами 5144 Да и 5068 Да являются гомогенными. В данных пептидах, названных Ns-W1 и Ns-W2, после восстановления и алкилирования, была определена частичная аминокислотная последовательность:

Ns-w1 : Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-Met-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-Ser-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

Ns-w2: Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-Ile-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

С использованием программы BLAST была выявлена гомология выделенного пептида с  $\gamma 1$  и  $\gamma 2$  пурутионинами пшеницы.

Сравнение N-концевой последовательности Ns-w1 и Ns-w2 чернушки с аминокислотными последовательностями пурутионинов других видов растений показало, что они гомологичны, что свидетельствует о том, что выделенные полипептиды относятся к группе антимикробных пурутионинов. При сравнении с известными аминокислотными последовательностями зерновых 5-кДа тионинов видно, что, помимо консервативных остатков Cys, Lys-1, Ser-2, Ala-27 (нумерация приводится по Ns-w1), присутствующих у всех сравниваемых видов, ряд аминокислотных остатков обнаруживается у большинства видов (Thr-7, Asn-14).

Название	N-концевая аминокислотная последовательность		
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFMKKPRKTCGSLCGCKIS <sup>35</sup> ...	<b>A</b>	
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFIKKPRKTCAGLGGCKIS <sup>35</sup> ...		
<i>H. vulgare</i>	<sup>1</sup> KSCCKDITLARNCYNTCRFAGGSRPVCAGACRCKII <sup>35</sup> ...		
<i>H. jubatum</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTTGRNCYNACRLPGTTPRVCANLGGCKII <sup>35</sup> ...		
<i>T. aestivum</i>	<sup>1</sup> KSCCRSTLGRNCYNLCR-ARGAQLCAGVCRCKIS <sup>35</sup> ...		
<i>A. sativa</i>	<sup>1</sup> KSCCKSTTAINCYNVORLAGAPRVCAGPCCGCKLL <sup>35</sup> ...		
<i>T. gesneriana</i>	<sup>1</sup> KSCCORNTTARNCYNVORLPGTTPRVCATCDCKII <sup>35</sup> ...		
<i>V. album</i>	<sup>1</sup> KSCCORNTTGRNCYNACRVPGTTPRVCASLDCCKII <sup>35</sup> ...		
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFMKKPRKTCGSLCGCKIS <sup>35</sup> ...		<b>B</b>
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> KSCCKNTLGRNCYNTCRFIKKPRKTCAGLGGCKIS <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A1</i>	<sup>1</sup> KSCCPSTTGRNIYNTCRLTGSSRETCAKLSGCKII <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A2</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRFGGSRQVCASLSGCKII <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A3</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNAORLTGAPRPTCAKLSGCKII <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin B</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRLGGSRERCASLSGCKII <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin C1</i>	<sup>1</sup> KSCCPNTTGRNIYNTCRFAGGSRERCALSGCKII <sup>35</sup> ...		

Рис.7. Сравнение N-концевых аминокислотных последовательностей Ns-W1 и Ns-W2 с 5 кДа тионинами некоторых растений.

\*по базе данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

\*\*жирным шрифтом отмечены идентичные аминокислотные остатки, серым цветом – сходные остатки.

### Сравнительная характеристика пептидного состава проростков чернушки посевной *Nigella sativa*

Для выделения антимикробных пептидов из проростков (интактных и зараженных *Verticillium dahliae*) использовался метод экстракции их 0.05н серной кислотой с последующей нейтрализацией суммарного экстракта гидроксидом натрия для осаждения фракции высокомолекулярных белков, которые отделялись центрифугированием. Из сравнения данных масс-спектрометрического анализа экстрактов семян и проростков видно, что экстракты проростков содержат значительно меньшее количество пептидов в сравнении с экстрактом семян. Кроме того, следует отметить, что появление дефензинов в зараженных проростках, по всей видимости, связано с тем, что

в ответ на инфицирование спорами патогенного гриба в проростках усиливается биосинтез защитных пептидов.

### Выделение антимикробных пептидов из проростков чернушки посевной *Nigella sativa*

Выделение антимикробных пептидов из проростков чернушки посевной проводили по схеме, аналогичной выделению из семян. После разделения тотального экстракта методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации было получено две фракции, содержащие в своем составе соединения, молекулярная масса которых находилась в диапазоне, характерном АМП.

При разделении первой фракции методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии получен компонент, который по молекулярной массе и количеству цистеинов может быть отнесен к классу липидпереносящих белков.

При разделении второй фракции получено 10 компонентов, которые по своим физико-химическим параметрам относятся к классу дефензинов.

Таблица 6

Компонентный состав фракций из проростков чернушки посевной по данным масс-спектрометрии

Номер фракции	Ns-LTP2	2									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Мол. Массы, Да	9086	5060	5072	5249	4922	4954	5021	4964	4959	4823	4862

Полученные данные показывают, что спектр пептидов, присутствующих в проростках, отличен от состава семян, что является доказательством того, что в процессе их прорастания происходит биодеградация старых и биосинтез новых.

В третьей главе диссертации «**Биологическая активность выделенных пептидов**» обсуждается биологическая активность выделенных пептидов по отношению к важнейшим патогенам сельхозкультур и патогенам, вызывающим заболевания человека, механизмы взаимодействия липидпереносящего белка Ns-LTP1 с БЛМ.

**Антигрибная активность Ns-LTP1.** Исследовано действие Ns-LTP1 на прорастание спор (*F.oxysporum* и *H.sativum*), зооспор и зооспорангиев (*Ph.infestans* и *P.debaryanum*).

Таблица 7.

Результаты биологических испытаний Ns-LTP1 на грибах и оомицетах

Гриб/оомицет	<i>F.oxysporum</i>	<i>H.sativum</i>	<i>Ph.infestans</i>	<i>P.debaryanum</i>
IC <sub>min</sub> МКГ/мл*	30	115	60	60
IC <sub>50</sub> МКГ/мл	60	-	115	-
Морфологические изменения	нет	Нет	+**	Нет

\*Минимальный процент ингибирования для данной величины составлял 10%;

\*\*Частичный лизис зооспорангиев на уровне 8-12%.

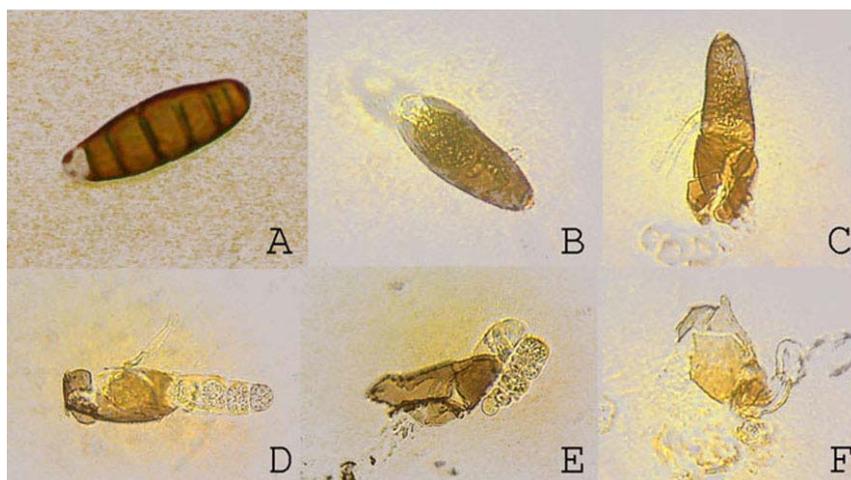
На все тестируемые микроорганизмы данный белок проявил активность (минимальная ингибирующая концентрация в диапазоне 30-115 мкг/мл). Максимальный эффект белок оказывал на *F.oxysporum* при минимальной концентрации 50 мкг/мл и  $IC_{50}$  - 60 мкг/мл. По отношению к *H.sativum* данный ЛТР проявил очень слабую активность ( $IC_{min} = 115$  мкг/мл). При исследовании действия Ns-LTP1 чернушки на оомицеты обнаружено подавление прорастания 18% зооспорангиев *Ph.infestans* при минимальной концентрации белка 60 мкг/мл (на выход зооспор эффекта не было). Подавление прорастания 24% спорангиев оомицета *P.debaryanum* отмечалось при той же концентрации белка ( $IC_{50}$  составила  $>115$  мкг/мл). Пятидесятипроцентное ингибирование прорастания зооспорангиев *Ph.infestans* наблюдалось при концентрации 115 мкг/мл. Морфологические изменения выражались в частичном лизисе оболочек зооспорангиев фитофторы на уровне 8-12% при концентрации Ns-LTP1 115 мкг/мл. Морфологических изменений структур гриба не выявлено. Ингибирование роста мицелия фитопатогенных грибов также не выявлено.

**Антифунгальная активность дефензинов Ns-D1 и Ns-D2.** Проведено изучение токсичности высокоочищенных пептидов из семян чернушки по отношению к ряду фитопатогенных грибов.

Установлено, что наиболее активными антимикробными пептидами являются дефензины Ns-D1 и Ns-D2, показавшие высокую антигрибную активность против ряда фитопатогенных грибов в диапазоне концентраций от 3,0 до 27,4 мкг/мл, которая выражалась в задержке скорости роста гиф из проросших спор и конидий. Помимо этого, для некоторых тестируемых микроорганизмов был отмечен эффект морфологических изменений структур спор и конидий *A.niger* и *B.sorokiniana*.

Было отмечено, что по степени выраженности морфологических изменений конидий между дефензинами наблюдались различия. Ns-D1 и Ns-D2 вызывали нарушение целостности клеточной стенки и мембраны конидий *B.sorokiniana* на уровне 15-17% от их общего числа, причем степень разрушения клеток была прямо пропорциональна увеличению действующей концентрации дефензина. Сравнительное тестирование проводилось в диапазоне концентраций пептидов 3.4-110 мкг/мл. Показано, что первые признаки серьезного нарушения структур клеточной стенки и плазматической мембраны конидий *B.sorokiniana* наблюдаются уже при концентрации Ns-D2 6,8 мкг/мл, а полное разрушение клетки происходит при 55 мкг/мл. В то же время при действии Ns-D1 данные стадии морфологических изменений клетки наблюдались, соответственно, только при 13,6 и 110 мкг/мл.

Морфологические изменения конидий *A.niger* в виде деструкции их формы были отмечены при добавлении обоих дефензинов, причем в данном случае между ними не было различий по показателю эффект-концентрация. Данные нарушения были отмечены только у 5-7% от общего числа конидий *A.niger* при концентрации пептида 27,5 мкг/мл.



**Рис.8. Морфологические изменения целостности клеточной стенки и мембраны конидий *B.sorokiniana* через 48 часов в присутствии дефензина Ns-D2** А – контрольная конидия, В-F – конидия с добавлением концентраций дефензина Ns-D2: 6.9 мкг/мл (В), 13.8 мкг/мл (С), 7.5 мкг/мл (D), 55 мкг/мл (E), 110 мкг/мл (F)

**Таблица 8**

**Сравнительные антифунгальные свойства дефензинов D-ряда**

Конидии грибов	Дефензин, IC <sub>50</sub> мкг/мл		
	Ns-D1	Ns-D2	Rs-AFP2*
<i>A.niger</i>	3,5	3,5	≥170
<i>B.sorokiniana</i>	3,0	1,8	≥170
<i>F.oxysporum</i>	9,5	5,3	≥170
<i>F.graminearum</i>	6,9	6,9	≥170
<i>F.culmorum</i>	6,9	6,9	2,1
<i>B. cinerea</i>	27,4	13,7	1,8

\* Rs-AFP2 – дефензин из редиса *Radish sativus*

Сайт-направленный мутагенез в последовательности дефензина Rs-AFP2 показал, что замена Phe-40, расположенного в петле, соединяющей складки beta2 и beta3, приводит к значительному снижению антифунгальной активности пептидов. Эта замена является наиболее вероятно ответственной за более низкую антифунгальную активность дефензинов против *B. cinerea* и *F. culmorum* по сравнению с исключительно высокой активностью дефензинов редиса. Значение замены Val/Lys в положении 38 неясно. Полученные результаты показывают, что Ns-D2 является более активным дефензином для подавления роста множества грибов (*B. sorokiniana*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*). Кроме того, этот дефензин является более мощным ингибитором *Ph. Infestans*.

Оценка активности по степени развития фитофтороза на поверхности дисков учитывалась по 4-бальной шкале: 4 балла – отсутствие развития; 3 балла – уровень развития <10%; 2 балла – развитие 10-20% (IC<sub>50</sub>); 1 балл – развитие 20-40%.

Таблица 9.

**Биологическая активность дефензинов Ns-D1 и Ns-D2 на подавление развития возбудителя фитофтороза на клубнях картофеля**

Концентрация, мкг/мл	После 96 ч инкубирования	После 120 ч инкубирования	После 144 ч инкубирования
	Оценка активности	Оценка активности	Итоговая оценка активности
55,0	+++ / +++	++ / +++	+ / ++
27,5	+++ / +++	++ / ++	+ / +
13,6	+++ / +++	++ / ++	- / +
6,8	++ / +++	+ / +	- / -
3,4	++ / +++	+ / +	- / -

Наиболее вероятным предположением высокой биологической активности Ns-D2 является замена остатка Pro на Leu в положении 39 в отношении Ns-D1, так как это единственная аминокислота, которая различает два дефензина, что и является очевидным доказательством роли этого остатка в антифунгальной активности.

**Антибактериальная активность.** Для биологических испытаний использовались бактериальные культуры: а) грамположительные - *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis*; б) грамотрицательные - *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*.

Антибактериальная активность дефензинов была определена методом радиальной диффузии по размеру зоны подавления роста бактерий через 48 часов инкубирования. Тестирование проводилось в диапазоне действующих концентраций дефензинов 27,5 - 220 мкг/мл.

В ходе испытаний, был выявлен эффект на грамположительные бактерии (*C. michiganensis* и *B. subtilis*). Эффект в отношении грамотрицательных бактерий, зависел от разновидности испытуемых бактерий. *E. coli* является наименее чувствительной бактерией, *P. syringae*, наиболее чувствительной.

Таблица 10

**Антибактериальные свойства дефензинов Ns-D1/Ns-D2**

Концентрация дефензинов (мкг/50 мкл)	Зона подавления роста бактерий, см (с учетом размера лунки)*				
	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>11</b>	1,3/1,3**	0,9/1,3	1,2/1,4	1,4/1,5	0,7/0,7
<b>5.5</b>	1,2/1,3	0,6/1,2	1,2/1,3	1,2/1,2	0,6/0,7
<b>2.25</b>	1,0/1,1	0,6/0,8	1,0/1,0	0,9/1,0	0,6/0,6

\*диаметр лунки – 0.5 см \*\*зона подавления в дефензинах Ns-D1/Ns-D2

В то же время, высоко активные дефензины редиса, являющиеся гомологами испытываемых дефензинов, не оказывают эффекта на подавление роста бактерий (*B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. Aureus* и *Strep. Faecalis*) при концентрациях ниже 200 мкг/мл. Было сделано предположение, что эффект действия дефензинов *Nigella sativa* на бактерии может быть связан с заменой Val-39 в редисе на Lys в Ns-D1 и Ns-D2.

**Антифунгальная активность тионинов Ns-W1 и Ns-W2.**

Исследована антифунгальная активность выделенных тионинов Ns-W1 и Ns-W2 на модельные хитин-содержащие фитопатогены методом радиальной диффузии по размеру зоны подавления роста бактерий через 48 часов инкубирования.

Таблица 11.

**Антифунгальная активность тионинов Ns-W1 и Ns-W2.**

Пептид/гриб	Ns-W1		Ns-W2		Морфологические изменения структур**
	ИК <sub>50</sub> , мкМ	МИК*, мкМ	ИК <sub>50</sub> , мкМ	МИК*, мкМ	
<i>Fusarium solani</i>	2,3	3,8	1,8	3,0	++++**
<i>Alternaria alternata</i>	2,7	5,0	2,1	3,0	++
<i>Botrytis cinerea</i>	1,9	3,8	1,1	3,0	+++
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	2,9	3,8	2,7	3,0	++

\*минимальная ингибирующая концентрация, вызывающая максимальный эффект; \*\*данные при МИК; \*\*\*«++++» - цитолитический эффект 100%; «+++» - цитолитический эффект более 50%; «++» - цитолитический эффект на уровне 50%; «+» - цитолитический эффект менее 50%.

Ns-W1 и Ns-W2 вызывали нарушение целостности клеточной стенки и мембраны конидий. Показано, что как и в случае активности дефензинов, наиболее вероятным предположением высокой биологической активности Ns-W1 является замена остатка Met на Ile в положении 19 и Ser на Ala в положении 25 в отношении Ns-W2, так как по этим аминокислотам различаются полученные тионины, что и является очевидным доказательством роли этого остатка в антифунгальной активности.

**Антимикробная активность выделенных пептидов (исследования выполнены в Ташкентской Медицинской Академии, на кафедре микробиологии).** Исследована антимикробная активность выделенных пептидов против бактерий, патогенных для человеческого организма: *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Trichoderma viride*. В качестве эталонного варианта использовался антибиотик широкого спектра действия – канамицин в концентрации 5/2 мкг/мл. Как следует из полученных результатов, дефензины чернушки выражено подавляют рост бактерий, а в случае *Trichoderma viride* превосходят антибиотик канамицин по своей активности.

Таблица 12

**Антимикробная активность дефензинов Ns-D1/Ns-D2 против микроорганизмов, патогенных для человека**

Концентрация дефензинов (мкг в 50 мкл)	Зона подавления роста бактерий, см (с учетом размера лунки)*					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<b>10</b>	1.9/1.7	2.6/2.4**	2.8/2.7	2.6/2.6	2.6/2.3	1.4/1.1
<b>5</b>	1.7/1.5	2.3/2.2	2.6/2.7	2.4/2.3	2.6/2.2	1.3/1.2
<b>2</b>	1.7/1.4	2.1/2.0	2.5/2.4	2.2/2.1	2.6/2.0	1.2/1.0
<b>Канамицин</b>	1.2/1.2	1.4/1.3	2.0/2.0	1.7/1.5	1.5/1.4	1.8/1.7

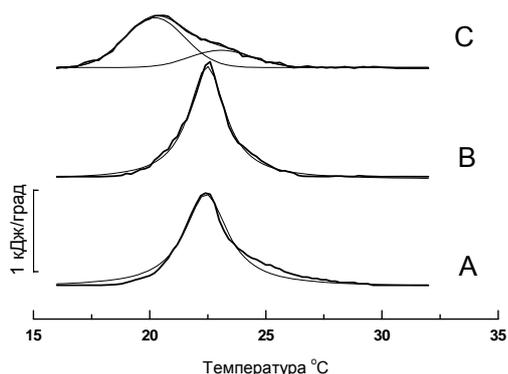
\*Диаметр лунки-0.5 см \*\* - зона подавления в дефензинах Ns-D1 / Ns-D2

Сравнивая антимикробную и антибактериальную активности дефензинов чернушки с дефензинами из редиса, обнаружено, что в отношении испытываемых бактерий дефензины редиса подавляют рост

бактерий только в высоких концентрациях > 200 мкг/мл. Эффект действия дефензинов *Nigella sativa* на бактерии может быть связан с заменой Val-39 в редисе на Lys в Ns-D1 и Ns-D2.

**Изучение взаимодействия Ns-LTP1 с различными модельными липидными системами (выполнены совместно с лабораторией ФХМИ под руководством профессора Б.А.Салахутдинова).** Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и фиксации потенциала с плоскими бислойными фосфолипидными мембранами изучено влияние Ns-LTP1 на термодинамические параметры фазового перехода фосфолипидных бислойных систем и проводимость мембран.

При добавлении Ns-LTP1 к дисперсиям ДМФХ+5%ДГ при соотношении концентрации белка к липиду 1:50 (М/М) наблюдаются изменения параметров фазового перехода данной бислойной системы – уменьшается общая энтальпия плавления  $\Delta H_{tot}$ , полуширина  $\Delta T_p$  и температура основного фазового перехода  $T_p$ . На кривой плавления помимо основного пика наблюдается появление высокотемпературного пика (рис.9). Высокотемпературное плечо на термограмме с большой вероятностью относится к ассоциатам Ns-LTP1 с молекулами ДГ.



**Рис.9 Термограммы плавления мультислойных дисперсий:**  
А – ДМФХ+5%ДГ; В – ДМФХ+5%ДГ+Ns-LTP1 (50:1); С – ДМФХ+5%ДГ+ Ns-LTP1 (25:1)

Показано, что Ns-LTP1 взаимодействует с бислойными липидными мембранами при наличии в своем составе таких фосфолипидов, как диацилглицерол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин. Однозначно установлено, Ns-LTP1 вызывает лабильзацию фосфолипидных бислоев, изменяет их физико-химические параметры, что приводит к изменению их проводимости по отношению к ионам  $K^+$ . Исследовано влияние Ns-LTP1 из семян и Ns-LTP2 из проростков на проницаемость липидных мембран. Показано, что выход флуоресцентного зонда ANTS из внутреннего объема липосом, сформированных из чистого ФХ или из смеси ФХ с ДМФС, при добавлении к ним Ns-LTP1 и Ns-LTP2 зависит от величины  $C_{LTP}/C_{лип}$ , т.е. эффект дозозависимый. При этом Ns-LTP1 по сравнению с Ns-LTP2, обладает более выраженным свойством индуцировать выход флуоресцентного зонда ANTS из внутреннего объема ФХ липосом, и в особенности из отрицательно

заряженных липосом, сформированных из 90%ФХ+10%ДМФС, что согласуется с литературными данными. Это подтверждает вывод, что наличие анионных липидов в составе модельных и биологических мембранах увеличивает вероятность образования пор или дефектов, через которые могут вытекать небольшие органические молекулы и неорганические ионы.

В четвертой главе диссертации «**Фармацевтическая противоожоговая композиция «Седанил»** приводится рецептура и результаты фармакологических доклинических испытаний разработанной фармацевтической композиции, созданной на основе полученных данных по биологической активности выделенных пептидов, обладающей ранозаживляющей и тканерегенерирующей активностями.

С целью достижения максимального терапевтического эффекта лечений гнойно-воспалительных заболеваний разработанной композицией было необходимо подобрать оптимальные концентрации действующих веществ. Для этого было подготовлено 6 вариаций композиций, содержащих в качестве активного действующего вещества сумму полипептидов и масло семян.

Экспериментальное изучение эффективности фармацевтических мазевых композиций проводили на беспородных белых крысах-самцах на моделях термического ожога и механических ран.

Таблица 13

**Подбор оптимальной концентрации пептидов и масла  
в разработанной композиции**

Использованный препарат	Начало отторжения корок	Окончание отторжения корок
контроль	27-й день (1 из 5)	30-й день (5 из 5)
основа	13-й день (1 из 5)	16-й день (5 из 5)
Основа+сумма полипептидов 100 мкг	8-й день (1 из 5)	11-й день (5 из 5)
<b>Основа+сумма полипептидов 200 мкг</b>	<b>6-й день (1 из 5)</b>	<b>9-й день (5 из 5)</b>
Основа+сумма полипептидов 500 мкг	7-й день (1 из 5)	10-й день (5 из 5)
Основа+масло 1 мл	8-й день (1 из 5)	11-й день (5 из 5)
<b>Основа+масло 2 мл</b>	<b>7-й день (1 из 5)</b>	<b>9-й день (5 из 5)</b>
Основа+масло 5 мл	7-й день (1 из 5)	10-й день (5 из 5)
Левомеколь	17-й день (1 из 5)	20-й день (5 из 5)
Актовегин	18-й день (1 из 5)	20-й день (5 из 5)

Проведенные эксперименты позволили подобрать оптимальные концентрации суммы полипептидов - 20 мкг и масла - 2 мл, при которых достигается наибольший терапевтический эффект разработанной композиции. По итогам полученных данных была создана композиция, содержащая в качестве активного начала 20 мкг полипептидов из семян чернушки *Nigella sativa* и 200 мкл масла семян чернушки, полученного холодным прессованием.

Состав композиции в следующем соотношении компонентов, масс. %:

Цетиловый спирт – 33

Эмульгатор Т1 – 3  
 Сумма полипептидов – 0,0002  
 Масло семян чернушки – 0,2  
 Витамины А и Е  
 Вода до 100

Было проведено экспериментальное изучение эффективности фармацевтической малхамевой композиции «Седанил» по описанной выше схеме. В качестве контроля использовались препараты сравнения Актовегин и Левомеколь.

Таблица 14.

**Влияние композиции на скорость отторжения раневой корки**

Использованный препарат	Начало отторжения корок	Окончание отторжения корок
контроль	27-й день (1 из 5)	30-й день (5 из 5)
основа	13-й день (1 из 5)	16-й день (5 из 5)
<b>Основа+сумма полипептидов 20 мкг+масло 200 мкл</b>	<b>5-й день (2 из 5)</b>	<b>8-й день (5 из 5)</b>
Левомеколь	17-й день (1 из 5)	20-й день (5 из 5)
Актовегин	18-й день (1 из 5)	20-й день (5 из 5)

Установлено, что при совместном добавлении в основу пептидов и масла проявляется синергетический эффект и по интенсивности эпителизации дна раны разработанная композиция превосходит мази Левомеколь и Актовегин. В контрольной группе животных раны длительное время оставались покрытыми плотным струпом, и заживление наступало значительно позднее, чем в опытных группах. Ожоговые раны опытных животных заживали мягким рубцом, избыточного рубцевания не наблюдалось.

Проведенные доклинические исследования фармацевтической композиции «Седанил» позволили заключить, что композиция относится к нетоксичным веществам, не обладает кумулятивными свойствами. Обладает умеренным противовоспалительным действием на экспериментальной модели карагеннинового отека, не обладает аллергическими свойствами, не оказывает токсического действия на эмбриотоксичность и тератогенность, и иммунную систему.

На основании полученных результатов составлены проекты ВФС на «Комплекс полипептидов» и «Фармацевтическая композиция».

В пятой главе диссертации «**Материалы, условия и современные методы исследования антимикробных пептидов, биологической активности и фармакотоксикологии**» приводятся методики выделения, методы структурных и биологических исследований.

**ВЫВОДЫ**

1. Разработан метод выделения индивидуальных антимикробных пептидов из семян и проростков чернушки посевной *Nigella sativa*,

включающий кислотную экстракцию и комплекс хроматографических методов – аффинная, эксклюзионная, высокоэффективная жидкостная хроматографии.

2. Из семян чернушки выделен новый липидпереносящий белок Ns-LTP1 с молекулярным весом 9602 Да, содержащий 8 цистеиновых остатков, установлена первичная структура, на основе которой выявлена принадлежность его к классу липидпереносящих белков. Ns-LTP1 зарегистрирован в базе данных EMBL с идентификационным номером p86527. Определена биологическая активность по отношению к разным группам фитопатогенов; изучено влияние Ns-LTP1 на проводимость мембран методом фиксации потенциала с плоскими бислойными фосфолипидными мембранами. На основании полученных данных предложен один из вероятных механизмов фунгитоксичности LTP.

3. Выделены два гомологичных пептида Ns-D1 и Ns-D2, установлена их полная аминокислотная последовательность и принадлежность к классу дефензинов, показана гомология с пептидами семейства *Brassicaceae*. Дефензин Ns-D2 проявил наиболее высокую антигрибную и антимикробную активность. В концентрации 3.4 мкг/мл дефензин Ns-D2 разрушает плазматическую мембрану конидии *B.sorokiniana*.

4. Выделен новый пептид Ns-N1 с молекулярным весом 5696 Да, содержащий 8 цистеиновых остатков. На основании определения частичной N-концевой аминокислотной последовательности установлено, что пептид не имеет гомологии с известными пептидами. Подана заявка в базу данных EMBL на регистрацию нового гомологического ряда семейства *Ranunculaceae*, содержащего этот пептид.

5. Выделены пептиды Ns-W1 и Ns-W2 с молекулярными массами 5168 Да и 5070 Да, гомологичные  $\gamma$ -пуротионинам злаковых. Установлена частичная N-концевая аминокислотная последовательность и подана заявка для регистрации в базе данных EMBL.

6. Впервые из семян чернушки выделен пептид Ns-G1, содержащий в своем составе 6 цистеинов и состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных внутри- и межцепочечными дисульфидными связями. Пептид уникален по своей структуре и не имеет структурных аналогов среди известных катионных пептидов.

7. Из проростков чернушки выделены липидпереносящий белок Ns-LTP2 с молекулярным весом 9086 Да и десять пептидов, относящиеся к дефензинам В-типа, для которых определена молекулярная масса и количество цистеинов.

8. Разработана рецептура мази «СЕДАНИЛ» на основе масла из семян чернушки и суммарных пептидов. Проведенные фармакологические доклинические испытания показали высокую ранозаживляющую активность предлагаемой мази.

9. Подготовлены проекты временных фармакопейных статей на «Семена чернушки посевной *Nigella sativa*», «Комплекс полипептидов» и «Фармацевтическая композиция».

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREE OF  
DOCTOR OF SCIENCES 16.07.2013.K/B/T.13.01 AT INSTITUTE OF  
BIOORGANIC CHEMISTRY AND THE NATIONAL UNIVERSITY OF  
UZBEKISTAN**

---

**INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY**

**OSHCHEPKOVA YUILIA IGOREVNA**

**STRUCTURE, BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL  
PEPTIDES OF *NIGELLA SATIVA* AND CREATION OF  
PHARMACEUTICAL COMPOSITION ON THEIR BASIS**

**02.00.10 – Bioorganic chemistry  
(chemical sciences)**

**ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION**

**Tashkent - 2016**

**The theme of the doctoral dissertation is registered at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under number 30.09.2014/B2014.3-4.K49.**

The doctoral dissertation has been prepared at the Institute of Bioorganic Chemistry named academician A.S.Sadykov Uzbek Academy of Sciences.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English) languages on the website of the Scientific Council (<http://ss.biochem.uz>) and on the website of "ZiyoNet" information and educational portal ([www.ziyoNet.uz](http://www.ziyoNet.uz)).

**Scientific consultant:**

**Veshkurova Olga Nikolaevna**  
doctor of science in chemistry

**Official opponents:**

**Tashmuchamedov Mirogiddin Salachovich**  
doctor of sciences in chemistry, professor

**Salimov Bachodir Tachirovich**  
doctor of sciences in chemistry, professor

**Azizov Umurchan Muchtarovich**  
doctor of sciences in chemistry, professor

**Leading organization:**

**Tashkent Pharmaceuticl Institute**

The defence of the dissertation will be held at \_\_\_ on "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2016 at the meeting of the Scientific Council 16.07.2013./K/B/T.13.01 at the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan. (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63).

The doctoral 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, Fa[ : (99871) 262 70 63)., e-mail: [asrarov54@mail.ru](mailto:asrarov54@mail.ru)).

The abstract of the dissertation is distributed on«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016.  
Protocol at the register No \_\_\_\_\_ dated \_\_\_ 2016.

**A.S.Turaev**

Chairman of scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.Ch.S., professor

**M.I.Asrarov**

Scientific secretary of scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, k.x.h.

**A.A.Akhunov**

Chairman of scientific seminar under scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, D.B.S., professor

## INTRODUCTION (abstract of doctoral dissertation)

**The urgency and relevance of the theme of dissertation.** The main focus in the development of medicinal products is to create drugs based on biologically active substances derived from local herbs.

The biological variety of flora of Uzbekistan serves as the potential source of valuable bioactive substances perspective for the use in medicine and agriculture. Among the wide spectrum of endemic plants the special attention is attracted by garden fennel flower - *Nigella sativa* L., related to family of buttercup - Ranunculaceae.

Seeds of garden fennel flower *Nigella sativa* have a variety of applications: as a highly effective diuretic, choleric, mild laxative and immunostimulatory agent. In addition, some of the components provide excellent results in the treatment of various dermatological diseases associated with histamine neurohumoral and irregularities in the body. In dermatology used in atopic dermatitis, idiosyncrasies, restore skin immunity, have a powerful antioxidant effect, eliminates stagnant processes of the skin.

Research of natural connections showing antimicrobial activity has both a theoretical value - for the study of molecular components and mechanisms of resistance of plants to pathogens and large practical value in agriculture and medicine. Major application antimicrobial proteins and peptides can find in medicine, as an alternative to the traditionally used antibiotics and antimicrobics. It is known that as a result of wide use of antibiotics in medical practice in the last decades, for microorganisms the mechanisms of stability were produced. As a result there were strains steady to majority used presently to the antibiotics. Antimicrobial proteins and peptides in this plan are extraordinarily perspective, as they possess the wide spectrum of action, operate quickly and effectively, does not cause negative consequences.

Chemical composition of seed of garden fennel flower is studied well enough. Isolated and characterized lipids, carbohydrates, phenolic compounds, however the peptides contained in seed have not been studied, therefore the search of new high active antimicrobial proteins and peptides from garden fennel flower sowing and their all-round study is perspective direction and the problem of search and selection of new similar connections is very actual.

This dissertation research to some extent serves to carry out the tasks provided in the Resolution of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan №404 «On measures to support domestic manufacturers of drugs and medical products» of July 14, 2006, as well as in other legal documents adopted in this area.

**Relevant research priority areas of science and developing technology of the republic.** This work was performed in accordance with the priority areas of science and technology of the Republic of Uzbekistan and VI «Medicine and pharmacology».

**A review of international research on the topic of dissertation.** Research aimed at the search, selection, study of the structure, biological properties and

molecular mechanisms of action of antimicrobial peptides in different species of living organisms are carried in the leading research centers and higher educational institutions of the world, including Uppsala University (Sweden), The State University of New Jersey (USA), Massey University (New Zealand), the Institute of Bioorganic chemistry named of acad. Shemyakin-Ovchinnikov of the Russian Academy of Sciences, University of Calgary (Canada), Centre for Infection and Immunity Amsterdam, University of Amsterdam (Netherlands), National University of Uzbekistan.

As a result of research carried out in the world for search, selection, study of the structure, biological properties and molecular mechanisms of action of antimicrobial peptides, produced a number of research results, including isolated and characterized proline/arginine-rich peptides (Massey University); from coelomocytes sea annelids *Arenicola marina* were identified novel peptides that have a pronounced antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (University of Calgary); as well as yeast and named arenitsins. Some complete primary structure of mature arenitsins genes and their precursors has allowed to draw a conclusion on the identification of a new family of peptides (Uppsala University); do not belong to any of the previously known group of antimicrobial peptides (Institute of Cytology, Russia).

In a world on the antimicrobial peptides in a number of priority areas conducted the study, including the search for potential compounds for the development of new drugs in medicine and in agriculture for the creation of transgenic plants resistant to certain pathogens and study of the relationship established structure and mechanism of action identified antimicrobial peptides.

**The degree of study of the problem.** More than 4000 proteins and peptides of plant origin, possessing the wide spectrum of antimicrobial activity, are presently known. The distinguishing feature of these proteins and peptides is the heterospecific co-operating with a cytoplasmic membrane, resulting in destruction of lipid layer and lysis of the attacked cage.

Foreign scientists H.A. Scheraga, M. Khalili, A. Liwo, Y. Zhang, R.F. Murray, H.W. Harper, D.K. Granner, P.A. Mayes searched, selection, study of the structure, biological properties and molecular mechanisms of action of antimicrobial peptides of the objects of plant and animal origin, plankton and microorganisms. Revealed new classes of antimicrobial peptides (F. R.Terras, H. M.Schoofs, K.A.T.Silverstein). Significant progress has been made in the study of the role of proteins in the matrix synthesis of biopolymers, understanding the mechanisms of their action in the various processes of the body of life, establishing a link between their structure and function (M.Montal, P.Mueller). Of great importance in this case was the improvement of research methods, new methods for the separation of proteins and peptides. In 2012, the Bank of these proteins (Protein Data Bank) contains approximately 87 000 protein structures.

In the UIS countries the research devoted to the study of antimicrobial peptides, physical and chemical characterization and mechanism of action, there are scientific works E.V.Grishin, Ts.A.Egorov, V.H.Havinson, P.L.Privalov, V.B.Beloborodov.

In Uzbekistan, the first studies on the release of proteins and peptides, study of their biological activity carried out under the supervision of academics A.S.Sadykov and Sh.I.Salihov. The Institute of bioorganic chemistry and the Institute of Plant Chemistry for several years carried out the search and study of medicinal plants in order to identify sources of raw materials for drug development (N.D.Abdullaev, U.M.Azizov).

In the Tashkent pharmaceutical institute an in-depth study of pharmakognostik and chemical composition of black cumin seeds sown (I.K.Azizov, Sh.A.Temurova). The results are recommended as a novel drug effective anti-inflammatory action. However, so far it has not yet been established pharmaceuticals based on compounds of protein and peptide.

**Communication of the theme of dissertation with the scientific-research works of higher educational institution, which is the dissertation conducted in:**

This thesis is done under the state of scientific projects: M-11 «Investigation of bioactive peptides from certain wild species of plants and poisonous animals of Central Asia» (2005-2006 years), MR-38-2008 «Search new biologically active compounds of the endemic plants of Uzbekistan» (2007-2008 years.), FA-FL-T-140 «Identification of defensins and terpenoids cotton, other members of the family *Malvaceae* and study the molecular mechanisms of antimicrobial, insecticidal and kantserolitic activities» (2007-2011 years.), F6-T018 «Structural and functional studies of peptides vegetable origin, having antibiotic activity» (2012-2016 years.), A11-T017 «Development of pharmaceutical composition on the basis of bioactive components from seed of fennel flower» (2012-2014 years).

**The aim of research works** is to develop methods for the isolation of individual cysteine-containing peptides from black cumin seeds, the establishment of their application in medicine and to pharmaceutical compositions on their basis.

**The tasks of research work:**

to analyze the current state of research in the field of antimicrobial peptides and the rationale for the study of the seed of fennel flower garden *Nigella sativa*, as a raw material source;

isolation of an individual nature of a cationic peptides and the study of their physico - chemical parameters

determination of the partial N-terminal amino acid sequence and the number of cysteine residues in the molecular structure, and their attribution to known types of antimicrobial peptides on the database EMBL;

establishing antimicrobial and antifungal activity against selected peptides to different groups of crops and human pathogens;

study the possibility of practical use of selected peptides and the development of the pharmaceutical compositions based on them;

conducting pharmaco - toxicological studies and the study of the specific activity of the developed compositions.

**The objects of the research work** are the seeds and seedlings of endemic plants of fennel flower garden *Nigella sativa* family Ranunculaceae, growing in Uzbekistan.

**The subject of the research work** is the study of the structure and biological activity of selected antimicrobial peptides.

**Methods of research work.** For isolation and purification of individual antimicrobial peptides employed extraction methods, affinity, and size exclusion high performance liquid chromatography; to establish the chemical structure of the novel compounds are applied physicochemical methods (electrophoresis, and UV-MALDI mass spectrometry); for the study of fungal and anti-microbial activity - turbimetry, spektrofotometriya method lawn mushrooms, and for membranotropic active substances - differential scanning calorimetry, light microscopy.

**Scientific novelty of the research work is as follows:**

for the first time a systematic study of cationic peptides in seeds and seedlings of fennel flower garden *Nigella sativa*;

from the seeds of fennel flower garden recovered new lipid transfer protein Ns-LTP1 with a molecular weight of 9602 Da containing 8 cysteine residues, to which the primary structure is installed and the data registered in the database BLAST;

isolated and characterized in detail 6 new peptides (Ns-D1, Ns-D2, Ns-W1, Ns-W2, Ns-N1 and Ns-G1).

it is shown that two new peptide homologous Ns-D1 and Ns-D2 with molecular weights of 5485 and 5498 Da, possess a strong inhibitory activity against phytopathogenic fungi;

defined that peptides Ns-W1 and Ns-W2 with molecular weights of 5143 and 5070 Da contain 8 cysteine residues and homologous  $\gamma$ -purotionins cereals;

determined that Ns-N1 peptide with a molecular weight of 5696 Da in its composition contains 8 cysteine residues, is unique in the established N-terminal amino acid sequence;

defined peptide Ns-G1 with a molecular weight of 2794 , contains six cysteines in its structure and refers to a new class cysteinrich peptides, which have no analogues in molecular weight and the number of cysteine residues among the known antimicrobial peptides;

a comparative analysis of the spectrum of peptides in seeds and seedlings and found that seedlings blackie contains lipid transfer protein Ns-LTP2 with a molecular weight of 9086 Da, and 10 peptides related to defensins B-type, absent in the seeds.

**Practical results of the work.** Created wound healing pharmaceutical composition «Sedanil» on the basis of the polypeptides of the complex of black cumin seeds sown. Conducted preclinical pharmacological and toxicological studies and shows that the composition relates to non-toxic substances, it has no cumulative properties. It has a mild anti-inflammatory effect on the model karageenin edema, has no allergic properties, does not have a toxic effect on embryotoxicity and the immune system.

**The reliabilioty of the results** is confirmed by the fact that they are derived from the application of modern physical and chemical methods of research. Statistical processing was performed using Student's t test with the calculation of

the boundary values of the confidence interval averages. Confirmation of these results are the experts and expertise and practical implementation of research results, discussion of the results of research at national and international conferences and the publication of research results in peer-reviewed scientific publications and patents.

**Theoretical and practical significance of the study.** The scientific significance of the results of the study lies in the fact that the isolated and studied a number of new antimicrobial peptides from black cumin seeds and sprouts *Nigella sativa*. The data on lipid-transfer protein registered in the EMBL p86527 data Obtained by thionine data registered in the EMBL p86545. The scheme selection of antimicrobial peptides and their identification and the establishment of physical and chemical methods of structure can serve as a guide in conducting new research into the practical work of chemists working in the chemistry of proteins and peptides in the educational process of the Department Chemistry of Natural Compounds of the National University of Uzbekistan.

The practical significance of the work lies in the fact that, based on antimicrob peptides from black cumin seeds established pharmaceutical composition «Sedanil», having wound healing properties in case of septic complications. A laboratory regulations and projects on the TFA «Seeds of black cumin *Nigella sativa*», «Complex polypeptides» and «Wound-healing pharmaceutical composition».

**Implementation of the research results.** Based on the data obtained in separation, physico-chemical studies and biological activity of antimicrobial peptides:

received defensin having antimicrobial activity and obtained a patent for the invention of Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan (30.11.2012, № IAP 04614) can be used in biotechnology to create resistance to pathogenic forms of crops and in medicine. The study derived defensins used as bioactive components for drug development as an alternative to antibiotics;

created composition having wound-healing and regenerating tissue and antibacterial activity and obtained a positive decision to grant a patent on the invention of the Republic of Uzbekistan on Intellectual Property Agency (16.03.2016, № IAP 20130250), which can be used in the treatment of various etiologies. The study developed a composition is proposed as a medicament for the treatment of mechanical injuries and thermal burns in the case of septic complications.

**Approbation of the research results.** The main content of the dissertation was discussed in the following two national and 12 international scientific and practical conferences: Conf. Ўzbekistonda tabiy birikmalar kimesining rivozhi kelajagi Island (Tashkent, 2007); 7th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Tashkent, 2007); 1 International Symposium on edible plant resources and their bioactive ingredients (China, Urumqi, 2008); Tabiy fanlarning dolzarb muammolari 'em Republic olimlar ilmy Amalie anzhumani (Samarkand, 2008); XXI Winter Youth Scientific School «Perspective directions of Physico-Chemical Biology and Biotechnology» (Russia, Moscow, 2009); IV All-Russian

Conference «New advances in chemistry and chemical engineering plant raw material» (Russia, Barnaul, 2009); International scientific-practical conference «Pharmacy Kazakhstan: integration of science, education and industry» (Kazakhstan, Shymkent, 2009); Scientific and practical conference «biologically active substances: basic and applied questions of production and application» (Crimea, Ukraine, 2009); X Youth Conference «Biotechnology in crop production, animal husbandry and veterinary medicine» (Moscow, 2010); International scientific conference «Actual problems of Bioorganic Chemistry» (Tashkent, 2010); Symbiosis Russia 2011 (Voronezh, 2011); 3rd International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients (Urumchi, China, 2012); International conference «Actual problems of Bioorganic Chemistry» (Tashkent, 2013); X International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Tashkent, Bukhara, 2013).

**Publication of the research results.** According to the thesis topic published 2 patents, recommended scientific editions for publication of basic scientific results of doctoral dissertations by Supreme attestation commission of the Republic of Uzbekistan 11 scientific articles and 8 international journals. A total of 30 scientific papers.

**The structure and volume of the thesis.** The dissertation consist of an introduction, five chapters, a conclusions, references and appendices. The size of the research is 193 pages.

## THE MAIN CONTENT OF THE RESEARCH PAPER

**In the introduction** the urgency and relevance of the dissertation topic, formulated the goal and objectives, as well as a subject of study, research shows which priority areas of Science and Technology of the Republic of Uzbekistan, presented scientific novelty and practical research results proved the validity of the results revealed theoretical and practical significance of the results, a list of implementation of the results of research, provides information on published works and the structure of the dissertation.

In the first chapter of the dissertation titled «**Antimicrobial peptides: current status, mechanisms of action and practical application**» carried out a detailed review of research on the topic of the dissertation and the extent of the problem, focusing on classification, mechanism of action and the use of antimicrobial peptides of plant origin. Describes the pharmacological properties of the components of seeds and seed oils of fennel flower garden *Nigella sativa*, on the basis of the review concluded that an object is selected for the job.

The second chapter «**Isolation and physico - chemical characterization of antimicrobial peptides from black cumin seeds and seedlings sown *Nigella sativa***» is devoted to methods of isolation of individual peptides and the study of their physical and chemical properties and structural characteristics.

When allocating antimicrobial peptides from seeds fennel flower garden comparative study extraction efficiency 0.05n sulfuric acid and 10% acetic acid in the presence of protease inhibitors to suppress the activity of endogenous proteases, followed by precipitation of protein fractions.

Major fractions were obtained by analytical separation of protein-peptides HPLC extracts were analyzed by MALDI TOF mass spectrometry showed that the acetic acid extract contains a larger number of proteins and peptides. When sulfuric acid extraction bulk denatured proteins and peptides, so for further separation acetate extract was used.

### **Isolation of antimicrobial peptides from the seeds of fennel flower garden *Nigella sativa***

To isolate individual AMP from seeds fennel flower garden a scheme involving complex chromatographic methods.

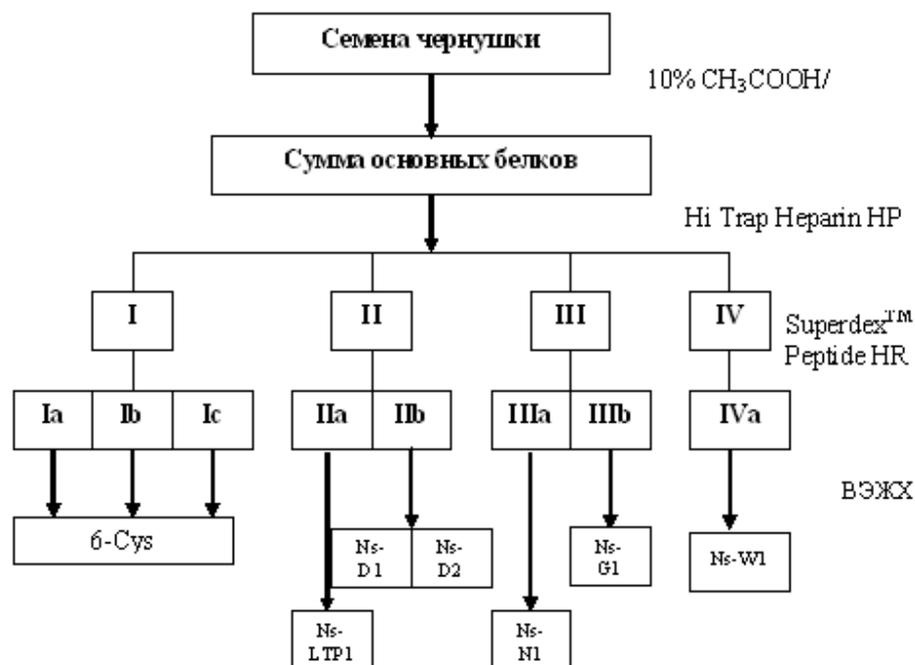
- 1) acid extraction of the peptide-protein fraction;
  - 2) affinity chromatography;
  - 3) desalting the fractions obtained by HPLC;
  - 4) size-exclusion chromatography (gel filtration) desalted fractions;
  - 5) Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)
- Protein-peptide fraction obtained by gel filtration.

Summary extract is chromatographed in a step gradient of NaCl concentration on a column Hi Trap Heparin HP into four fractions. Each fraction

was separated by size exclusion chromatography (gel filtration) column Superdex™ Peptide HR.

### Scheme 1

#### Isolation of antimicrobial compounds from the seeds of fennel flower garden



Fractions containing compound having a molecular weight is in the range characteristic of the AMP was further separated into individual components by RP HPLC.

In the separation of the first fraction after affinity chromatography by gel filtration and reversed-phase HPLC was obtained five major components having a molecular weight in the range characteristic of the AMP.

Table 1

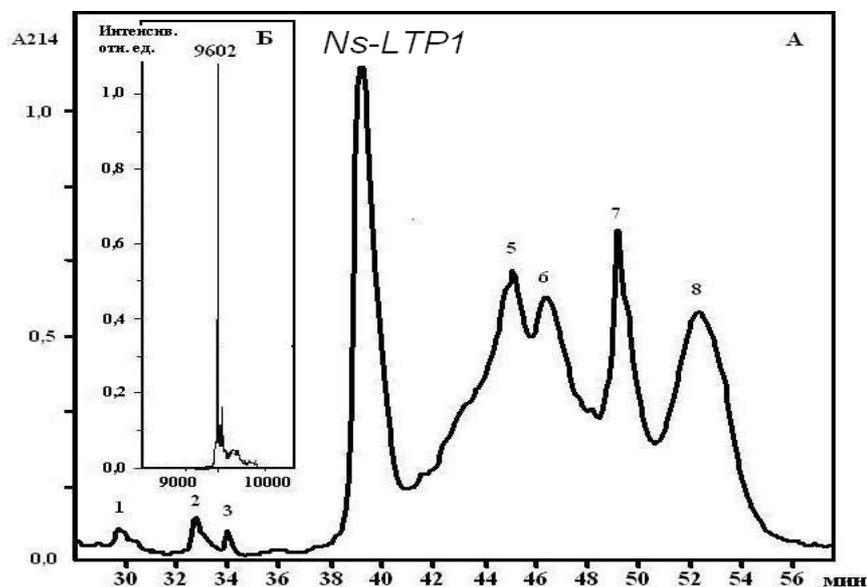
Component composition I fractions by mass spectrometry

The number fraction	1 (I-a-1)	2 (I-a-3)	3 (I-b-5)	4 (I-c-8)	5 (I-c-9)
Mol. weights, Da	3371	3530	4219	4082	4067

To characterize selected peptides was determined by the number of cysteine residues in the molecule. To this end, reduced and alkylated peptides. The molecular weight reduced and alkylated peptide fraction first increased by 638 Da compared with the native, which meant the presence of 6 cysteine residues in the molecules of these peptides. When comparing the physic-chemical properties of the isolated peptides with known antimicrobial peptides found that these peptides are unique molecular mass and number of cysteine residues.

In the separation II fraction by gel filtration fractions was obtained by two, respectively called II-a and II-b.

In the separation II-a fractions by RP HPLC on a C<sub>18</sub> Luna column gradient 10-50% acetonitrile concentration was obtained 8 Component (fig.1a), one of which is homogeneous, with a molecular weight of 9602 Da called Ns-LTP1 (fig.1b).



**Fig.1. Isolation Ns-LTP1 from seeds of fennel flower garden:A) RP-HPLC fraction II, obtained as a result of affinity chromatography; B) Mass spectrum of native Ns-LTP1.**

For classification of the isolated protein Ns-LTP1 to a class of proteins was carried cysteinrich its N-terminal sequencing (Figure 2), and determination of amino acid composition of the cysteine residues in the molecule. The number of cysteine residues in the molecule Ns-LTP1 was determined by the mass difference between the reduced and alkylated (10440 Da) and native (unreduced) protein (9602 daltons).

It was found that the molecule Ns-LTP1 were 8 cysteine residues; alkylation unreduced LTP protein molecular weight has not changed, which means that the protein no free SH-groups, while all 8 of sulphydryl groups involved in the formation of intramolecular disulfide bonds. Based on these data, a protein related to the selected group of LTP-proteins.

The amino acid composition of the isolated protein and found that the protein is not detected black cumin seed Met, which is typical for LTP, basic amino acids (Lys, Arg, His) represents 13% of the total number of amino acid residues.

Comparison of the N-terminal sequence of fennel flower garden LTP with amino acid sequences of other species showed high homology, confirming the assignment of the selected polypeptide to a lipid group carrying AMP.

When compared with known amino acid sequences of plant LTP 9 kDa is seen that, besides the conserved residues Cys, Val-6, Tyr-16 (numbering given by Ns-LTP1), present in all the species examined, a number of amino acid residues found in most species (Leu-10, Ala-11, Pro-12).

Plant species	N-terminal amino acid Sequence	Number*
<i>Nigella sativa</i>	-ISCQDVKQSLAP <b>CLPY</b> VTGRAPKPA	P86527
<i>Oryza sativa</i>	-LSCGQVDSK <b>LAPCVAY</b> VTGRASAI <b>S</b>	AAA70046
<i>Capsicum annuum</i>	-LSCSQVTSGLAP <b>CLPY</b> LQGRG <b>PLGG</b>	AAF23459
<i>Beta vulgaris</i>	-PSC <b>TDVIS</b> NTAP <b>CLPY</b> ISRTSPAPS	BAF02666
<i>Nicotiana tabacum</i>	LSCGQVQSG <b>LAPCLPY</b> LQGRG <b>PLGS</b>	Q03461
<i>Brassica oleracea</i>	ALS <b>CGTV</b> SGYVAP <b>CI</b> GYLAGNAP <b>APT</b>	AAA73948
<i>Brassica rapa</i>	-LSCGTVSGN <b>LAACI</b> GYLTGNG <b>PLPR</b>	AAT40130
<i>Cicer arietinum</i>	AIT <b>CGR</b> VD <b>TALAPCL</b> GYLQGGPG <b>PSA</b>	CAA05771
<i>Spinacea oleracea</i>	-IT <b>CGM</b> VSS <b>KLAPCI</b> GYLKG <b>GPLGGG</b>	S00060
<i>Daucus carota</i>	-LT <b>CGQ</b> VTG <b>ALAPCL</b> GYLRSQVN <b>VPV</b>	P27631
<i>Hordeum vulgare</i>	AIS <b>CGQ</b> VSSAL <b>SPCI</b> SYARGNGAK <b>PP</b>	CAA91436
<i>Triticum aestivum</i>	--S <b>CGQ</b> VSSAL <b>SPCI</b> SYARGNGAS <b>PS</b>	ABB90546
<i>Prunus persica</i>	-IT <b>CGQ</b> VSSNL <b>APCI</b> PYVRVGGAV <b>PP</b>	AAM22768
<i>Fragaria ananassa</i>	-IT <b>CGQ</b> VASNI <b>SPCL</b> TYVKSGGAV <b>PA</b>	AAV83342

**Fig.2. Comparison of N-terminal amino acid sequences of Ns-LTP1 from 9 kDa LTP some plants.**

\* Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

\*\* bold marked identical amino acid residues in gray - similar residues.

However, there are substituted for Gln-4 and Gln - 8, while the majority of the sequences being compared has a high degree of conservation in these positions (Gly-Ser-4, and 8, respectively).

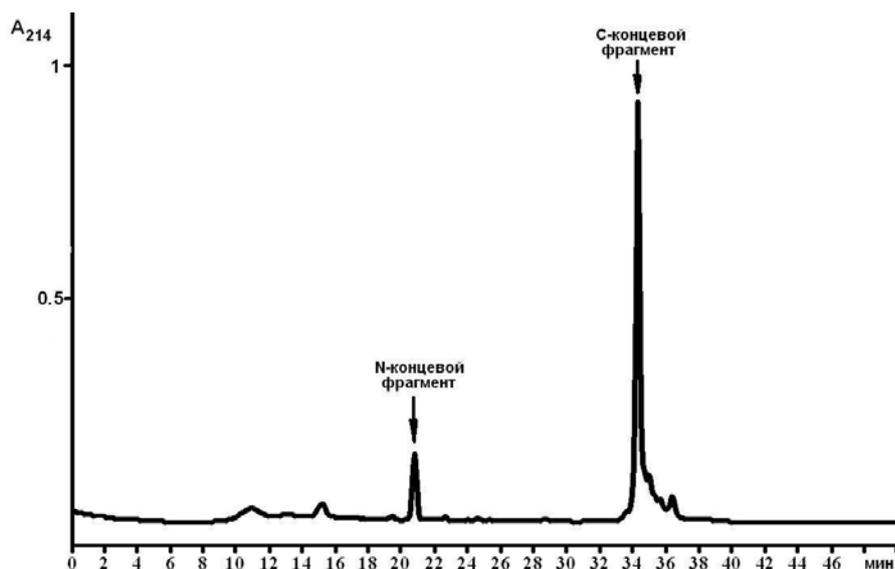
In the separation of fraction II-b Luna C<sub>18</sub> column gradient 10-50% acetonitrile concentration was obtained 2 component II-b-2 and II-b-4, with molecular weights 5485 and 5498 Da. To characterize the isolated peptides II-b-2 and II-b-4 was determined by the number of cysteine residues in the molecule. The molecular weight of the reduced and alkylated peptide II-b-2 and II-b-4 850 Da increased respectively, compared with native, i.e, containing eight cysteine residues in the peptide molecule. Alkylation of native peptides without recovery showed no free sulfhydryl groups. This proves that all eight cysteine residues in these peptides included 4 intermolecular bonds. And then reduced and alkylated peptides were subjected to automated Edman sequencing to determine the N-terminal amino acid sequences of the peptides II-b-2 and II-b-4.

**II-b-2:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

**II-b-4:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys

Installed N-terminal amino acid sequence of 35 amino acids of both peptides was identical. Homology search UniProt database showed that both the peptide defensins belong to the family.

In the 4 and 28-position was glutamic acid. To determine the complete sequence of the peptides of this situation and it was decided to split the reduced and alkylated peptides with protease V8, which mainly manifests specificity for C-terminal peptide bond of the glutamic acid type -Glu-X-, where X may be as any amino acid residue except proline and glutamic acid. After hydrolysis, the reaction products were separated by RP-HPLC.



**Fig. 3.** Chromatographic separation of the reaction products V8 protease cleavage defensins Luna C18 column gradient 10-50% acetonitrile concentration over 40 min. Flow was 0.75 ml / min.

Were measured molecular weights of peptides formed by MALDI TOF mass spectrometry. As a result, it was suggested that the C-terminal peptide fragment in fraction 2 is located and has a molecular weight of 2495.8 and 2510.4 Da and N-terminal - in fractions 1 and has a molecular weight of 2999.1 and 2999.3 Da, defensins Ns-D1 and Ns -D2 respectively.

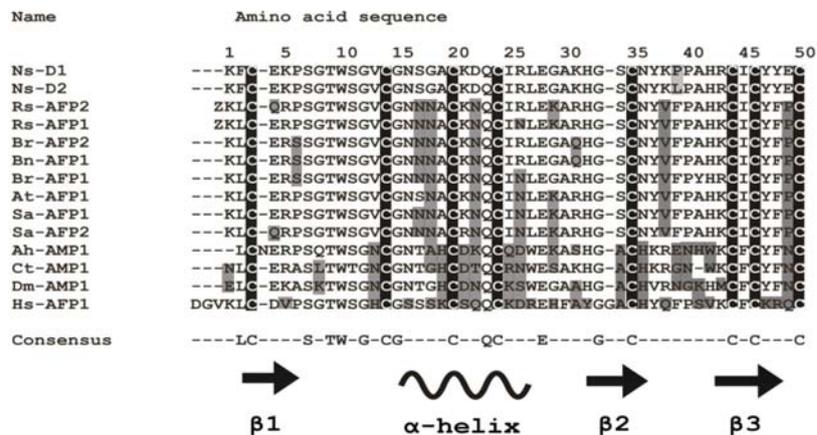
Sequencing of both fractions defensin 2 was sequenced C-terminal fragment of the molecule. Comparison of the N-terminal and C-terminal sequences has allowed to establish the complete amino acid sequence of peptides:

**Ns-D1:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Pro**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

**Ns-D2:** Lys-Phe-Cys-Glu-Lys-Pro-Thr-Gly-Thr-Trp-Ser-Gly-Val-Cys-Gly-Asn-Ser-Gly-Ala-Cys-Lys-Asp-Gln-Cys-Ile-Arg-Lys-Glu-Gly-Ala-Lys-His-Gly-Ser-Cys-Asn-Tyr-Lys-**Leu**-Pro-Ala-His-Arg-Cys-Ile-Cys-Tyr-Tyr-Glu-Cys

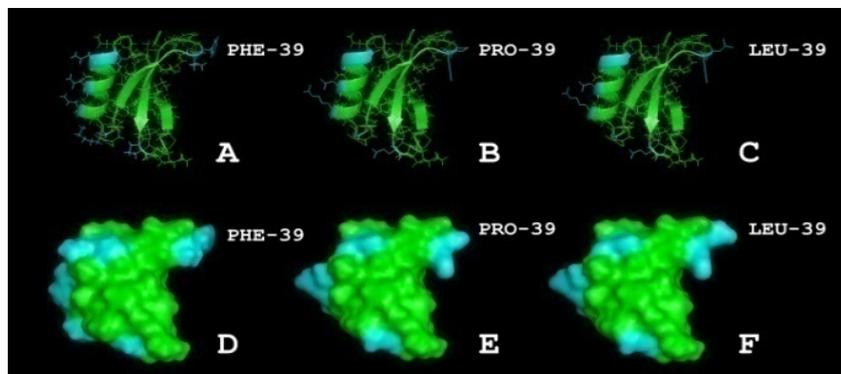
It was shown that both the polypeptide consists of 50 amino acid residues that differ one replacement Leu Pro residue at position 39 in the polypeptide chain.

Furthermore, it was found that the isolated homologous AMP previously detected in seed families *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Hippocastanaceae* defensins, which exhibit high antimicrobial activity in tests *in vitro*.



**Fig. 4. Comparison of N-terminal amino acid sequences of Ns-D1 and Ns-D2 with 5 kDa some plant defensins.**

Comparison of amino acid sequences derived from other defensins showed a high degree of homology to defensins seeds of radish *Raphanus sativus* (43 identical amino acids, including a conservative), to which the three-dimensional structure has been installed. This structure was used as an analog for modeling the three dimensional structure of defensins *Nigella sativa* using program PyMol v. 0.9.3. and found to be composed of alpha-helices and beta-three folds in closed loop.



**Fig. 5. Three-dimensional model of defensins from *Nigella sativa*. For comparison, the 3D structure of defensin Rs-AFP1 radish. A and D, Rs-AFP1 (registration number in the PDB - 1AYJ); B and E, Ns-D1, C and F, Ns-D2. Changing residues between defensins Ns-D1, Ns-D2 and Rs-AFP1 shown in blue.**

In the separation of fraction III by affinity chromatography after two fractions were obtained, respectively named III-a and III-b.

In the separation of fraction III-a Luna  $C_{18}$  column with a gradient of acetonitrile concentration of 10-50% was obtained individual component with a molecular weight 5696 Da, named Ns-N1. The molecular weight of the reduced and alkylated peptide Ns-N1 850 Da increased compared with native meant that the presence of 8 cysteine residues in the peptide molecule. In the reduced and alkylated peptide was determined by N-terminal amino acid sequence:

**Lys-Ile-Cys-Gln-Asp-Val-Lys-Gln-Ser-Leu-Ala-Pro-Cys-Leu-Pro-Tyr-Val-Thr-Gly-Arg-Ala-Pro-Lys-Pro-Ala-Pro-Glu-Cys-Cys-Asn-Glu-Ile**

Search for similar amino acid sequences from the EMBL database using the BLAST program revealed no homology with known proteins, which allowed carrying it to a new class of peptides of the family *Ranunculaceae*.

In the separation of fraction III-b Luna C<sub>18</sub> column gradient 10-50% acetonitrile concentration was obtained main component III-b-1 with a molecular weight of 2794 Da called Ns-G1. Peptide Ns-G1 reduced and alkylated to determine the number of cysteine residues in the molecule. After reduction and alkylation reaction products were separated by reversed-phase chromatography on a C<sub>18</sub> Luna column. The obtained fractions were analyzed by mass spectrometry.

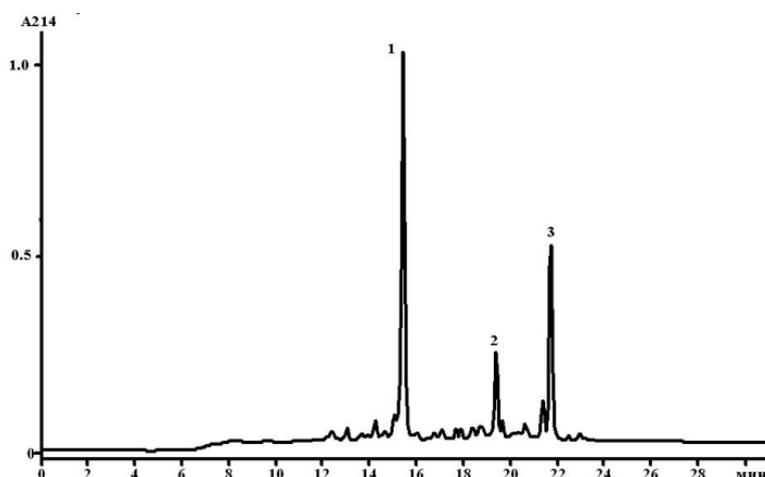
In the separation by RP-HPLC after reduction and alkylation were obtained 8 components. Molecular weights of the isolated compounds according MALDI TOF mass spectrometry are shown in the table below:

**Table 3**

**The component composition of the reduced and alkylated peptide by mass spectrometry**

number of fractions	1 (III-b-1)	2 (III-b-2)	3 (III-b-3)	4 (III-b-4)	5 (III-b-5)	6 (III-b-6)	7 (III-b-7)	8 (III-b-8)
Mol. weights, Da	1540	1752	1539	1573 1647 1904	1527	1680	1468	1468

Since the molecular weight of each fraction was significantly lower molecular weight native molecules, it has been proposed that the isolated peptide consists of two or more circuits. To establish the number of circuits in the selected peptide was carried out by reducing the disulfide bonds. After recovering the reaction product was separated by RP-HPLC on a Luna C<sub>18</sub> (Figure 6). The obtained fractions were analyzed by mass spectrometry (Table 4).



**Fig. 6. Chromatographic separation of the reduced peptide III-b-1, Luna C<sub>18</sub> column gradient 10-50% acetonitrile concentration over 40 min. Flow was 0.75 ml / min.**

**Table 4****The component composition of the reduced peptide by mass spectrometry**

number of fractions	1(III-b-1)	2(III-b-2)	2(III-b-3)
Mol. weights, Da	1436	1423	1364

Thus, it was found that the isolated molecule consists of two chains in two variations. Fraction III-b-1 is the main chain. The second circuit may be a fraction III-b-2 and fraction III-b-3.

Each reduced and alkylated link was determined N-terminal amino acid sequence.

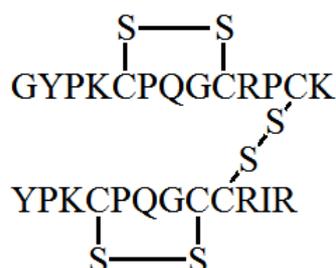
**Table 5****N-terminal amino acid sequence of reduced and alkylated peptide fraction 500mM-7**

Component	N-terminal amino acid sequence
III-b-1-1	GYPKC YPKCP
III-b-1-2	GYPKCPQGCRPCK
III-b-1-3	GYPKXPQGXRPCK
III-b-1-5	YPKCPQGCCRIR
III-b-1-6	YPKCPQGCCPIR
III-b-1-7	GGGGG YPKCP
III-7-1-8	YPKXPQGXCRIR

Component III-b-1-2 is a main chain containing three cysteines (at positions 5 and 9 are connected intrachain disulfide bond).

The second circuit also comprising a cysteine three (or component III-b-1-5 - at the 10-position Arg, or component III-b-1-6 - in position 10 Pro) - at position 4 and 8 are connected intrachain disulfide bond.

Between a circuit connected to the interchain disulfide bond in position 1-12 and 2-9.



In the literature, there is no information about the existence of cystein-rich peptides with similar structure consisting of two polypeptide chains joined in and interchain disulfide bonds. On this basis, it can be argued about the opening of a new class of peptides cystein-rich.

In the separation of fraction IV, obtained from affinity chromatography on a Luna C<sub>18</sub> column gradient 10-50% acetonitrile concentration was obtained five components, two of which IV-a-2 and IV-a-5, with molecular weights of 5144 and

5068 Da are homogeneous. In these peptides, called Ns-W1 and Ns-W2, after reduction and alkylation was determined partial amino acid sequence:

Ns-w1: Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-**Met**-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-**Ser**-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

Ns-w2: Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Asn-Cys-Tyr-Asn-Thr-Cys-Arg-Phe-**Ile**-Lys-Lys-Pro-Arg-Lys-Thr-Cys-**Ala**-Gly-Leu-Cys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser

Using the BLAST program revealed homology was isolated peptide with  $\gamma 1$  and  $\gamma 2$  purotionins wheat.

Comparison of the N-terminal sequence of Ns-w1 and Ns-w2 of fennel flower garden purotionins the amino acid sequences of other plant species has shown that they are homologous, suggesting that the isolated polypeptides belong to the group of antimicrobial purotionins. When compared with known amino acid sequences of 5 kDa cereal thionin seen that, besides the conserved residues Cys, Lys-1, Ser-2, Ala-27 (numbering given by Ns-w1), present in all the species examined, a number of amino acid residues found In most species (Thr-7, Asn-14).

Название	N-концевая аминокислотная последовательность		
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>N</b> T <b>L</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> M <b>K</b> K <b>P</b> R <b>K</b> T <b>C</b> S <b>G</b> L <b>C</b> G <b>C</b> K <b>I</b> S <sup>35</sup> ...	<b>A</b>	
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>N</b> T <b>L</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> I <b>K</b> K <b>P</b> R <b>K</b> T <b>C</b> A <b>G</b> L <b>C</b> G <b>C</b> K <b>I</b> S <sup>35</sup> ...		
<i>H. vulgare</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>D</b> T <b>L</b> A <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> A <b>G</b> G <b>S</b> R <b>P</b> V <b>C</b> A <b>G</b> A <b>C</b> R <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>H. jubatum</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> A <b>C</b> R <b>L</b> P <b>G</b> T <b>P</b> R <b>P</b> V <b>C</b> A <b>N</b> L <b>C</b> G <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>T. aestivum</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> R <b>S</b> T <b>L</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> L <b>C</b> R <b>-</b> A <b>R</b> G <b>A</b> Q <b>K</b> L <b>C</b> A <b>G</b> V <b>C</b> R <b>C</b> K <b>I</b> S <sup>35</sup> ...		
<i>A. sativa</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>S</b> T <b>T</b> A <b>I</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> V <b>C</b> R <b>L</b> A <b>G</b> A <b>P</b> R <b>P</b> V <b>C</b> A <b>G</b> F <b>C</b> G <b>C</b> K <b>L</b> L <sup>35</sup> ...		
<i>T. gesneriana</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> R <b>N</b> T <b>T</b> A <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> V <b>C</b> R <b>L</b> P <b>G</b> T <b>P</b> R <b>P</b> V <b>C</b> A <b>A</b> T <b>C</b> D <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>V. album</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> R <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> A <b>C</b> R <b>V</b> P <b>G</b> T <b>P</b> R <b>P</b> V <b>C</b> A <b>S</b> L <b>C</b> D <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>N. sativa 1</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>N</b> T <b>L</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> M <b>K</b> K <b>P</b> R <b>K</b> T <b>C</b> S <b>G</b> L <b>C</b> G <b>C</b> K <b>I</b> S <sup>35</sup> ...		<b>B</b>
<i>N. sativa 2</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> K <b>N</b> T <b>L</b> G <b>R</b> N <b>C</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> I <b>K</b> K <b>P</b> R <b>K</b> T <b>C</b> A <b>G</b> L <b>C</b> G <b>C</b> K <b>I</b> S <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A1</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> P <b>S</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>I</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>L</b> T <b>G</b> S <b>S</b> R <b>E</b> T <b>C</b> A <b>K</b> L <b>S</b> G <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A2</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> P <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>I</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> G <b>G</b> S <b>R</b> Q <b>V</b> C <b>A</b> S <b>L</b> S <b>G</b> C <b>K</b> I <b>I</b> <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin A3</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> P <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>I</b> Y <b>N</b> A <b>C</b> R <b>L</b> T <b>G</b> A <b>P</b> R <b>P</b> T <b>C</b> A <b>K</b> L <b>S</b> G <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin B</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> P <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>I</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>L</b> G <b>G</b> S <b>R</b> R <b>E</b> R <b>C</b> A <b>S</b> L <b>S</b> G <b>C</b> K <b>I</b> I <sup>35</sup> ...		
<i>Viscotixin C1</i>	<sup>1</sup> K <b>S</b> C <b>C</b> P <b>N</b> T <b>T</b> G <b>R</b> N <b>I</b> Y <b>N</b> T <b>C</b> R <b>F</b> A <b>G</b> G <b>S</b> R <b>R</b> E <b>R</b> C <b>A</b> K <b>L</b> S <b>G</b> C <b>K</b> I <b>I</b> <sup>35</sup> ...		

Fig. 7. Comparison of N-terminal amino acid sequences of Ns-W1 and Ns-W2 with 5 kDa thionine some plants.

\* Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. \*\* bold marked identical amino acid residues in gray - similar residues.

### Comparative characteristics of the peptide composition of fennel flower garden seedlings *Nigella sativa*

To isolate the antimicrobial peptide from seedlings (infected intact and *Verticillium dahliae*) the method of extraction 0.05n sulfuric acid followed by neutralization with sodium hydroxide to extract the total deposition fraction of high molecular weight proteins which were separated by centrifugation. From a comparison of the data of mass spectrometry analysis of extracts of seeds and seedlings can be seen that the extracts of sprouts contain significantly fewer peptides in comparison with seed extract. Furthermore, it should be noted that the appearance of defensins in infected seedlings, apparently due to the fact that in response to infection with spores of the pathogenic fungus plantlets enhanced biosynthesis protective peptides.

## Isolation of antimicrobial peptides from fennel flower garden seedlings *Nigella sativa*

Isolation of antimicrobial peptides from fennel flower garden sprouts were performed on a scheme similar to the allocation of seeds. After separation of the total extract by affinity chromatography and gel filtration was obtained two fractions containing compounds in its composition, molecular weight is in the range characteristic of AMP.

When separating the first fraction by reverse-phase high performance liquid chromatography to obtain the components that the molecular weight and the number of cysteines may be assigned to a class of proteins lipid transfer.

In the separation of the second fraction obtained 10 components, which by its physical and chemical parameters belong to the class of defensins.

**Table 6**

**Component composition of the fractions of fennel flower garden sprouts by mass spectrometry**

number of fractions	Ns-LTP2	2									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mol. weights, Da	9086	5060	5072	5249	4922	4954	5021	4964	4959	4823	4862

These data show that the spectrum of peptides present in sprouts, seeds is different from the composition that is proof that occurs during germination biodegradation old and new biosynthesis.

The third chapter «**The biological activity of the isolated peptides**» discusses the biological activity of the isolated peptides in relation to the most important pathogens of crops and pathogens causing human diseases, mechanisms of interaction of the lipid-transporting protein Ns-LTP1 with BLM.

**Antifungal activity Ns-LTP1.** The effect of Ns-LTP1 on spore germination (*F.oxysporum* and *H.sativum*), zoospores and zoosporangia (*Ph.infestans* and *P.debaryanum*).

**Table 7.**

**The results of biological tests Ns-LTP1 on fungi and oomycetes**

Mushroom / oomycete	<i>F.oxysporum</i>	<i>H.sativum</i>	<i>Ph.infestans</i>	<i>P.debaryanum</i>
IC <sub>min</sub> µg/ml *	30	115	60	60
IC <sub>50</sub> µg/ml	60	-	115	-
morphological changes	have not	have not	+**	have not

\* Minimum percentage inhibition of this value was 10%;

\*\* Partial lysis zoosporangia at 8-12%.

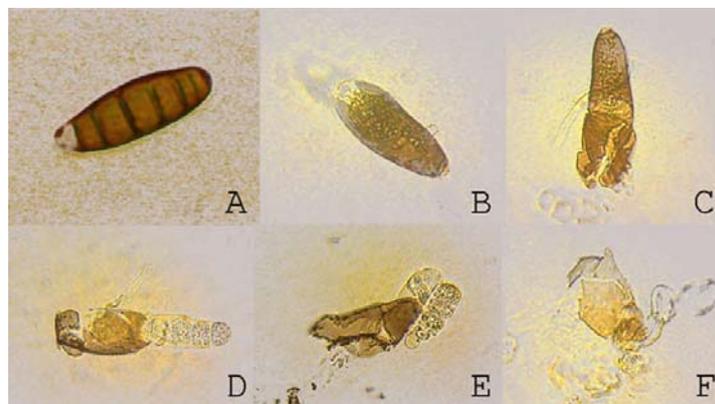
For all organisms tested the protein showed activity (minimum inhibitory concentration in the range of 30-115 µg/ml). The maximum effect is exerted on the

protein *F.oxysporum* a minimum concentration of 50 µg/ml, and IC50 - 60 µg/ml. With respect to the LTP active *H.sativum* showed very low activity (ICmin = 115 µg/ml). When studying the effect of Ns-LTP1 blackie on oomycetes found suppression of germination of 18% zoosporangia *Ph.infestans* with minimal protein concentration of 60 µg/ml (output zoospores effect was not). Suppression of germination 24% sporangia oomycete *P.debaryanum* noted at the same protein concentration (IC50 was > 115 µg/ml) fifty percent inhibition of germination zoosporangia *Ph.infestans* observed at a concentration of 115 µg/ml. Morphological changes were expressed as the partial shells zoosporangia of *Phytophthora* lysis at a concentration of 8-12% at 115 Ns-LTP1 µg/ml. Morphological changes in the structures of the fungus were found. Inhibition of mycelial growth of pathogenic fungi also not revealed.

**Antifungal activity of defensins Ns-D1 and Ns-D2.** The study of the toxicity of highly pure peptides fennel flower garden seeds against a number of pathogenic fungi.

It was established that the most active peptides are antimicrobial defensins Ns-D1 and Ns-D2, which showed high antifungal activity against several phytopathogenic fungi at concentrations ranging from 3.0 to 27.4 µg/ml, which was expressed in the delay of the growth rate of hyphae of spores germinated and conidia. In addition, for some of the test organisms was observed effect of morphological changes in the structures of spores and conidia *A.niger* and *B.sorokiniana*.

It was noted that the severity of conidia morphological changes observed differences between defensins. Ns-D1 and Ns-D2 cause violation of the integrity of the cell wall and membrane conidia *B.sorokiniana* at the level of 15-17% of the total, and the degree of cell disruption was directly proportional to the increase in operating defensin concentration. Comparative tests were carried out in a range of concentrations of the peptides 3.4-110 µg/ml. It is shown that the first signs of a serious breach of the structures of the cell wall and plasma membrane conidia *B.sorokiniana* observed at a concentration Ns-D2 6,8 µg/ml, and the complete destruction of cells occurs at 55 µg/ml. At the same time, the action data Ns-D1 stage cell morphological changes were observed, respectively, with only 13.6 and 110 µg/ml.



**Fig. 8. Morphological changes and cell wall integrity conidia *B.sorokiniana* membrane after 48 hours in the presence of defensin Ns-D2 A - control conidia, B - F -**

adding conidia defensin concentrations Ns-D2: 6.9 µg/ml (B), 13.8 µg/ml (C), 7.5 µg/ml (D), 55 µg/ml (E), 110 µg/ml (F)

Morphological changes in the form of conidia *A.niger* their shape degradation were noted when adding both defensins, and in this case between them there was no difference in terms of the concentration effect. These violations were noted in only 5-7% of the total number of conidia *A.niger* at a peptide concentration of 27.5 µg/ml.

**Table 8**

**Comparative antifungal properties of defensins D-series**

Conidia of the fungus	Defensins, IC <sub>50</sub> µg/ml		
	Ns-D1	Ns-D2	Rs-AFP2*
<i>A.niger</i>	3,5	3,5	≥170
<i>B.sorokiniana</i>	3,0	1,8	≥170
<i>F.oxysporum</i>	9,5	5,3	≥170
<i>F.graminearum</i>	6,9	6,9	≥170
<i>F.culmorum</i>	6,9	6,9	2,1
<i>B. cinerea</i>	27,4	13,7	1,8

\* Rs-AFP2 - defensin from radish *Radish sativus*

Site-directed mutagenesis of the sequence defensin Rs-AFP2 showed that replacement of Phe-40, located in the loop connecting folds beta2 and beta3, leads to a significant reduction in antifungal activity of peptides. This replacement is most likely responsible for the antifungal activity of a lower defensins against *B. cinerea* and *F. sulmorum* compared with exceptionally high activity of defensins radish. Replacement Value Val / Lys at position 38 uncertain. The results show that Ns-D2 is more active in suppressing the growth of defensins plurality fungi (*B. sorokiniana*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*). Furthermore, the defensin is a more potent inhibitor of *Ph. Infestans*.

**Table 9.**

**The biological activity of defensins Ns-D1 and Ns-D2 on the suppression of *Phytophthora infestans* on potato tubers**

Concentration, µg/ml	after 96 h incubation	after 120 h incubation	after 144 h incubation
	Evaluation activity	Evaluation activity	Final evaluation activity
55,0	+++ / +++	++ / +++	+ / ++
27,5	+++ / +++	++ / ++	+ / +
13,6	+++ / +++	++ / ++	- / +
6,8	++ / +++	+ / +	- / -
3,4	++ / +++	+ / +	- / -

Evaluation of the activity on the degree of development of late blight on the disc surface was taken into account on a 4-point scale: 4 points - the lack of development; 3 points - the level of <10%; 2 points - the development of 10-20% (IC50); 1 point - the development of 20-40%.

The most likely hypothesis of high biological activity Ns-D2 is the substitution of Pro for Leu at position 39 with respect Ns-D1, since the only amino

acid which distinguishes the two defensin, which is clear evidence of the role of this residue in antifungal activity.

**Antibacterial activity.** For biological tests the bacterial cultures were used: a) the gram - *Bacillus subtilis*, *Clavibacter michiganensis*; b) Gram - *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*. Antibacterial activity was determined by defensins radial diffusion zone size inhibit bacterial growth after 48 hours incubation. Testing was conducted in a range of existing concentrations of defensins 27.5 - 220 µg/ml.

**Table 10**

**Antibacterial properties of defensins Ns-D1 / Ns-D2**

The concentration of defensins (µg/50 µl)	Zone of growth inhibition of bacteria, cm (with the size of holes) *				
	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>11</b>	1,3/1,3**	0,9/1,3	1,2/1,4	1,4/1,5	0,7/0,7
<b>5.5</b>	1,2/1,3	0,6/1,2	1,2/1,3	1,2/1,2	0,6/0,7
<b>2.25</b>	1,0/1,1	0,6/0,8	1,0/1,0	0,9/1,0	0,6/0,6

\* diameter wells - 0.5 cm \*\* suppression zone in defensin Ns-D1 / Ns-D2

During the tests, the effect was detected on gram-positive bacteria (*C. michiganensis* and *B. subtilis*). Effect against gram-negative bacteria, dependent on the species of bacteria tested. *E. coli* is the least sensitive bacteria, *P. syringae*, the most sensitive. At the same time, highly active defensins radish defensin homologues tested, no effect on inhibition of growth of bacteria (*B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. Aureus* and *Strep. Faecalis*) at concentrations below 200 µg/ml. It has been suggested that the effect of *Nigella sativa* defensins bacteria may be associated with the replacement of Val-39 to Lys at radish Ns-D1 and Ns-D2.

**Antifungal activity of thionins Ns-W1 and Ns-W2.** Investigated the antifungal activity of the isolated thionins Ns-W1 and Ns-W2 model on chitin-containing phytopathogens by radial diffusion on the size of the inhibition of bacterial growth after 48 hours of incubation. Ns-W1 and Ns-W2 cause violation of the integrity of the cell wall and membrane of conidia. It is shown that, as in the case of defensin activity, most likely hypothesis of high biological activity Ns- W1 is Met substitution at residue Ile at position 19 to Ala and Ser at position 25 with respect Ns-W2, since under these amino acids differ obtained thionine, which is clear evidence of this role in the balance of antifungal activity.

**Table 11.**

**Antifungal activity of thionins Ns-W1 and Ns-W2.**

Peptide/ mushroom	Ns-W1		Ns-W2		Morphological changes of structures **
	IC <sub>50</sub> , µM	MIC*, µM	IC <sub>50</sub> , µM	MIC*, µM	
<i>Fusarium solani</i>	2,3	3,8	1,8	3,0	++++*
<i>Alternaria alternata</i>	2,7	5,0	2,1	3,0	++
<i>Botrytis cinerea</i>	1,9	3,8	1,1	3,0	+++
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	2,9	3,8	2,7	3,0	++

**Antimicrobial activity of isolated peptides (research carried out at the Medical Academy of the Republic of Uzbekistan, at the Department of Microbiology).** Investigated the antimicrobial activity of isolated peptides against bacteria, pathogenic for the human body: *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Trichoderma viride*.

In the embodiment used as the reference a broad spectrum antibiotic - kanamycin at a concentration of 2.5 µg/ml.

As follows from the results obtained, expressed defensins of fennel flower garden inhibit bacterial growth, and in the case of *Trichoderma viride* superior antibiotic activity by their kanamycin.

Comparing the antimicrobial and antibacterial activity of defensins fennel flower garden with radish defensins found that in respect of the test radish defensins bacteria inhibit the growth of bacteria only in high concentrations of > 200 µg/ml. The effect of the defensins *Nigella sativa* bacteria may be associated with the replacement of Val-39 to Lys at radish Ns-D1 and Ns-D2.

**Table 12**

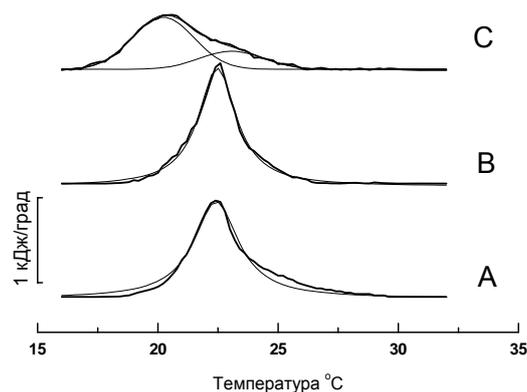
**Antimicrobial activity of defensins Ns-D1 / Ns-D2 against microorganisms pathogenic to humans**

The concentration of defensins (µg/50 µl)	Zone of growth inhibition of bacteria, cm (with the size of holes) *					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<b>10</b>	1.9/1.7	2.6/2.4**	2.8/2.7	2.6/2.6	2.6/2.3	1.4/1.1
<b>5</b>	1.7/1.5	2.3/2.2	2.6/2.7	2.4/2.3	2.6/2.2	1.3/1.2
<b>2</b>	1.7/1.4	2.1/2.0	2.5/2.4	2.2/2.1	2.6/2.0	1.2/1.0
<b>Canamicin</b>	1.2/1.2	1.4/1.3	2.0/2.0	1.7/1.5	1.5/1.4	1.8/1.7

\* diameter wells - 0.5 cm \*\* suppression zone in defensin Ns-D1 / Ns-D2

**The study of the interaction of Ns-LTP1 with different model lipid systems (made in conjunction with the laboratory headed by Professor FHMI B.A.Salahutdinov).** By differential scanning calorimetry and fixing potential with planar bilayer phospholipid membranes studied the effect of Ns-LTP1 on the thermodynamic parameters of the phase transition of phospholipid bilayer systems and membrane conductance.

When adding Ns-LTP1 to dispersions DMPC + 5% DW at a ratio of protein to lipid concentration of 1:50 (w / w) observed changes in the parameters of the phase transition of the bilayer system - reduces the overall melting enthalpy  $\Delta H_{tot}$ , half-width and  $\Delta T_p$  main phase transition temperature  $T_p$ . The melting curve in addition to the main peak observed the emergence of high-temperature peak (Figure 9). High-temperature shoulder on the thermogram with a high probability relates to associates of Ns-LTP1 molecules DW.



**Fig.9 Melting thermograms of multilamellar dispersions:**  
**A - DMPC + 5% DW; B - 5% DMPC + DW + Ns-LTP1 (50: 1); C - 5% DMPC + DW + Ns-LTP1 (25: 1)**

It is shown that the Ns-LTP1 lipids bilayer interacts with membranes in the presence in its structure of phospholipids such as diacylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine. Clearly established, Ns-LTP1 is labilization phospholipid bilayers change their physico-chemical parameters, which leads to a change in the conductivity with respect to the ions  $K^+$ .

The influence of the Ns-LTP1 from seeds and Ns-LTP2 of seedlings on the permeability of lipid membranes. It was shown that the yield of the fluorescent probe ANTS internal volume of liposomes formed from pure or a mixture FH with DMFS, adding there to Ns-LTP1 and Ns-LTP2 depends on the magnitude CLTP / Slip, i.e. dose-dependent effect. Wherein Ns-LTP1 compared with Ns-LTP2, has the property of inducing a more pronounced output of ANTS fluorescence probe FH liposome internal volume, in particular of the negatively charged liposomes formed from 90% PC + 10% DMFS, which agrees with literature data. This confirms the conclusion that the presence of anionic lipid in the composition model and biological membranes, increases the probability of formation of pores or defects, which may arise through the small organic molecules and inorganic ions.

**Chapter four** provides pharmaceutical formulation and the results of preclinical studies developed by the pharmaceutical composition, created on the basis of the data on the biological activity of isolated peptides, has wound-healing and regenerating tissue activities.

In order to achieve maximum therapeutic effect of the treatment of inflammatory diseases of the developed composition was necessary to find the optimal concentration of active ingredients. For this variation 6 was prepared compositions containing as active principle an amount of polypeptides and seed oil. Experimental study of the efficacy of pharmaceutical ointment compositions were performed on mongrel white male rats models of mechanical and thermal burn injuries.

The experiments for the best concentration of the amount of polypeptides - 20 mg and oil - 2 ml, for which the therapeutic effect is achieved most developed composition. According to the results of the data was created composition

comprising as active ingredient 20 mg of polypeptides from *Nigella sativa* seeds and 2 ml of seed oil obtained by cold pressing.

**Table 13**

**Selection of the optimal concentration of peptide and oils developed in the composition**

use of the drug	Home rejection crusts	End rejection crusts
control	27 day (1 from 5)	30 day (5 from 5)
basis	13 day (1 from 5)	16 day (5 from 5)
basis+ sum of polypeptides 100 mkg	8 day (1 from 5)	11 day (5 from 5)
<b>basis+sum of polypeptides 200 mkg</b>	<b>6 day (1 from 5)</b>	<b>9 day (5 from 5)</b>
basis+sum of polypeptides 500 mkg	7 day (1 from 5)	10 day (5 from 5)
basis+oil 100 mkl	8 day (1 from 5)	11 day (5 from 5)
<b>basis+oil 200 mkl</b>	<b>7 day (1 from 5)</b>	<b>9 day (5 from 5)</b>
basis+ oil 500 mkl	7 day (1 from 5)	10 day (5 from 5)
Levomekol	17 day (1 from 5)	20 day (5 from 5)
Actovegin	18 day (1 from 5)	20 day (5 from 5)

The composition in the following ratio, wt.%:

Cetyl alcohol - 33

Emulsifier T1 - 3

The amount of polypeptides - 0.0002

Black cumin seed oil - 0,002

Vitamins A and E

Water up to 100

It was an experimental study of the effectiveness of a pharmaceutical ointment composition "Sedanil" by the above procedure. As control comparators Aktovegin and Levomekol.

**Table 14.**

**Effect of composition on the rate of rejection of the wound crust**

use of the drug	Home rejection crusts	End rejection crusts
control	27 day (1 from 5)	30 day (5 from 5)
basis	13 day (1 from 5)	16 day (5 from 5)
<b>basis+sum of polypeptides 20 mkg+oil 200 mkl</b>	<b>5 day (2 from 5)</b>	<b>8 day (5 from 5)</b>
Levomekol	17 day (1 from 5)	20 day (5 from 5)
Actovegin	18 day (1 from 5)	20 day (5 from 5)

Found that when added together, and peptides based oil and a synergistic effect is manifested in intensity developed wound epithelialization bottom composition and superior Levomekol and Aktovegin ointment. In the control group of animals for a long time wounds were covered with a dense crust, and healing occurs much later than in the experimental groups. Burn wounds experimental animals healed scar soft, excessive scarring was observed.

Preclinical research pharmaceutical composition "Sedanil" led to the conclusion that the composition relates to non-toxic, has no cumulative properties. Has a mild anti-inflammatory effect in an experimental model karagenninovogo edema, has no allergic properties, has no toxic effect on embryotoxicity and terratogennost, and the immune system.

Based on these results drafted TFA to "Complex polypeptides" and "Charmaceutical composition" and decorated in accordance with the requirements.

In the fifth chapter "**Materials, conditions and modern methods of research of antimicrobial peptides, biological activity and farmakotoksikologi**" presents the methodology selection, methods of structural and biological studies.

## CONCLUSION

1. A method for isolation of individual AMP from black cumin seed and seedling seed *Nigella sativa*, including acid extraction and complex chromatographic methods - affinity, size exclusion, high performance liquid chromatography.

2. From the seeds of black cumin isolated a new lipid transfer protein Ns-LTP1 with a molecular weight of 9602 Da, containing 8 cysteine residues, set the primary structure on which revealed that it belongs to a class of proteins lipid transfer. Ns-LTP1 registered in the EMBL database with the identification number r86527. Determined biological activity against phytopathogen different groups; The effect of Ns-LTP1 on the conductivity of the membrane clamp technique with planar bilayer phospholipid membranes. Based on these data suggested one of the possible mechanisms fungitoxicity LTP.

3. Select two homologous peptide Ns-D1 and Ns-D2, set their complete amino acid sequence and belonging to the class of defensins, shows homology to the peptides of the family *Brassicaceae*. Defensin Ns-D2 showed the highest anti-fungal and anti-microbial activity. At a concentration of 3.4 µg/ml defensin Ns-D2 destroying plasma membrane conidia *B.sorokiniana*.

4. Highlight the new peptide Ns-N1 with a molecular weight of 5696 Da, containing 8 cysteine residues. Based on the determination of the partial N-terminal amino acid sequence determined that the peptide has no homology to known peptides. Pending the EMBL database for the registration of a new homologous series family *Ranunculaceae*, containing this peptide.

5. Highlight peptides Ns-W1 and Ns-W2 with molecular weights of 5168 and 5070 Da homologous  $\gamma$ -purotionins cereal. Installed partial N-terminal amino acid sequence.

6. First of black cumin seeds isolated peptide Ns-G1, containing 6 cysteines its composition and consisting of two polypeptide chains joined by intra- and interchain disulfide bonds. The peptide is unique in its structure and has no structural analogues among known cationic peptides.

7. From seedling fennel flower garden allocated lipid transfer protein Ns-LTP2 with molecular weight 9086 Da and ten peptides related to defensins B-type, which is defined molecular weight and the number of cysteines.

8. The compounding ointment "Sedanil" based on black cumin seed oil and total peptides. Conducted preclinical pharmacological tests have shown high activity of wound-healing ointment proposed.

9. Projects of TFA to "Black cumin seed *Nigella sativa*", "Complex polypeptides" and "Pharmaceutical composition" and executed in accordance with the requirements.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И. Сравнительный анализ тотальных экстрактов семян и проростков чернушки *Nigella sativa* // Химия природных соединений. -2009. - №2. -С.247-248 (02.00.00. №1.).

2. Ощепкова Ю.И., Тукфатуллина И.И., Мерзляк П.Г, Салахутдинов Б.А., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И., Арипов Т.Ф. Взаимодействие липидпереносящих белков из семян седаны *Nigella sativa* с мембранами// Узбекский биологический журнал. -2009 -№2. –С.7-11 (03.00.00. №1)

3. Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Рогожин Е.А., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Одинцова Т.И., Егоров Ц.А., Гришин Ц.А., Салихов Ш.И. Выделение липид-переносящего белка Ns-LTP1 из семян чернушки посевной (*Nigella sativa*) // Биоорганическая химия. - 2009 -№3. -С.344-349 (№40. ResearchGate, IF – 0.473).

4. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Выделение цистеинбогатых пептидов из проростков *Nigella sativa* // Химия природных соединений. -2009. -№5. - С.580-581 (02.00.00. №1.).

5. Орловская Т.В., Султанова Э.М., Ощепкова Ю.И., Арзанова И.А., Кузнецова Н.Н., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Исследования биоактивных пептидов из некоторых видов растений// Химия природных соединений. - 2010. -№2. -С.276-277 (02.00.00. №1.).

6. Ощепкова Ю.И., Сонькина С., Салахутдинов Б.А., Вешкурова О.Н., Рогожин Е.А., Егоров Ц.А., Арипов Т.Ф., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Взаимодействие липидпереносящих белков из семян седаны *Nigella sativa* с липидными мембранами// Химия природных соединений. -2010. -№ 4 – С.505-507 (02.00.00. №1.).

7. Rogozhin E.A., Oshepkova Y.I., Odintsova T.I., Khadeeva N.V., Veshkurova O.N., Egorov Ts.A., Grishin E.V., Salikhov Sh.I. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds // Plant Physiology and Biochemistry. – 2011. - v.49. PP.131-137 (№40. ResearchGate, IF – 2.838).

8. Орипова М.Ж., Ощепкова Ю.И., Султанова Э.М., Узбеков В.В., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Инсекто- и фунгитоксичные пептиды из *Malva sylvestris* // Узбекский химический журнал. – 2011. - № 6. - С. 3-5 (02.00.00. №6).

9. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Султанова Э.М., Орипова М.Ж., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И. Катионные пептиды и белки из семян растений семейства *Malvaceae* // Химия природных соединений. – 2012. - № 2. - С. 257-259 (02.00.00. №1.).

10. Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И., Зайцев Д.В., Смирнов А.Н., Егоров Ц.А., Рогожин Е.А. Сравнительный анализ экстрактов семян чернушки посевной (*NIGELLA SATIVA*), обладающих антифунгальной активностью против оомицета *PHYTOPHTHORA INFESTANS* // Химия природных соединений. – 2013. - № 5. - С. 841-843 (02.00.00. №1.).

11. Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Антимикробная активность катионных и циклических пептидов из семян чернушки посевной *Nigella sativa*.// Доклады АН РУз. – 2015. - № 1. - С. 64-69. (02.00.00. №8).

12. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Дефензины, обладающие антимикробной активностью – Патент на изобретение № IAP 04614 от 30.11.2012

13. Ощепкова Ю.И., Казанцева Д.С., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Фармацевтическая ранозаживляющая композиция. Положительное решение о выдаче патента № IAP 20130250 от 16.03.2016

## II бўлим (II часть; Part II)

14. Ощепкова Ю.И., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Липид-переносащий белок из семян чернушки посевной *Nigella sativa*, обладающий тканерегенерирующей активностью. Заявка на Патент Республики Узбекистан №IAP 20150302 от 28.07.2015

15. Ощепкова Ю.И., Султанова Э.М., Арзанова И.А., Узбеков В.В., Кузнецова Н.Н., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Выделение пептидов из семян *Nigella sativa*// Конф. Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривожига ва келажиги. – Ташкент. -2007. -С.28.

16. Oshepkova Yu.I., Arzanova I.A., Sultanova E.M., Veshkurova O.N., Salikhov Sh.I. Biological active peptides from seeds of Uzbekistan food plants// 7<sup>th</sup> International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. –Tashkent. - 2007. -P.227.

17. Oshepkova Yu.I., Veshkurova O.N., Arzanova I.A., Sultanova E.M., Salikhov Sh.I.. Antimicrobial peptides isolated from seeds of spicy plants traditional for Uzbekistan// IМеждународный симпозиум по ресурсам съедобных растений и их биоактивным ингредиентам. Китай, Урумчи -2008.

18. Ощепкова Ю.И., Арзанова И.А., Кузнецова Н.Н., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Физиологически активные пептиды из проростков седаны *Nigella sativa L*// «Табиий фанларнинг долзарб муаммолари» Республика ёш олимлар илимий-амалий анжумани – Самарқанд.-2008. -С.96.

19. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Егоров Ц.А., Гришин Е.В., Салихов Ш.И. Антимикробные пептиды семян чернушки посевной (*Nigella sativa L*) // XXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Россия, Москва- 2009. -С.41.

20. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Кузнецова Н.Н., Вешкурова О.Н., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И. Выделение из семян седаны *Nigella sativa* пептидов, обладающих антимикробной и противоопухолевой активностью//

Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства. -2009, том 1. -С.261-264.

21. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Смирнов А.Н., Мусолямов А.Х., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Выделение и характеристика антимикробных пептидов из семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) – эндемичного растения Республики Узбекистан// IV Всероссийская конференция «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Россия, Барнаул -2009. -С.37-38.

22. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Вешкурова О.Н., Салахутдинов Б.А., Егоров Ц.А., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Выделение и характеристика липидпереносящего пептида из семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) // «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Украина, Крым- 2009. -С.139.

23. Рогожин Е.А., Ощепкова Ю.И., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. Структурно-функциональное исследование новых дефензинов семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) – эндемичного растения Республики Узбекистан// X молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» Россия, Москва-2010 - С.35-37.

24. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Егоров Ц.А., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Выделение и характеристика нового пуротионина из семян чернушки посевной *Nigella sativa* // Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» Ташкент, сентябрь 2010. - С.85.

25. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Егоров Ц.А., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Выделение нового липидпереносящего белка и дефензинов из проростков чернушки посевной *Nigella sativa* // Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» Ташкент, сентябрь 2010. - С.29.

26. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Биологическая активность экстрактов чернушки посевной *Nigella sativa* // Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» Ташкент, сентябрь 2010 - С.84.

27. Ощепкова Ю.И., Рогожин Е.А., Смирнов А.Н., Салихов Ш.И., Гришин Е.В. Структурно-функциональный анализ новых дефензинов чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) - эндемичного растения республики Узбекистан // Симбиоз Россия 2011, Воронеж, 23-27 мая 2011. - С.35-38.

28. Oshepkova Yu.I., Veshkurova O.N., Salikhov Sh.I. Antimicrobial activity of defensins from seeds of the black cumine (*Nigella sativa*) 3rd International Symposium on Edible Plant Resources and the Bioactive Ingredients, Urumchi, China, July 28-August 1, 2012. - PP.93-94.

29. Ощепкова Ю.И., Ишимов У.Ж., Зиявитдинов Ж.Ф., Вешкурова О.Н., Салихов Ш.И. Выделение низкомолекулярных макроциклических пептидов из семян *Nigella sativa* // Международная конференция

«Актуальные проблемы развития биоорганической химии» 15-16 ноября 2013 года, Ташкент. - С.4.

30. Oshepkova Yu.I., Veshkurova O.N., Salikhov Sh.I. Variety of antimicrobial peptides in seeds of the garden fennel flower *Nigella sativa* // X Международный симпозиум по химии природных соединений, 21-23 ноября 2013 года, Ташкент-Бухара. - С.69.

Автореферат «Ўзбекистон врачлар ассоциацияси» бюллетени таҳририятида  
таҳрирдан ўтказилди (13.06.2016 йил).

Босишга рухсат этилди: 15.06.2016 йил  
Бичими 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>, «Times New Roman»  
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.  
Шартли босма табағи 5. Адади: 70. Буюртма: № \_\_\_\_\_.

Ўзбекистон Республикаси ИИВ Академияси,  
100197, Тошкент, Интизор кўчаси, 68

«АКАДЕМИЯ НОШИРЛИК МАРКАЗИ» ДУК