ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.B.53.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЎЗБЕКИСТОН ФАНЛАР АКАДЕМИЯСИ ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

СОЛИЕВ АЪЗАМЖОН БАҲОДИРОВИЧ

ТУРЛИ БИОЛОГИК МАНБАЛАРДАН ОЛИНГАН ФАРМАКОЛОГИК ФАОЛ МОДДАЛАРНИНГ СТРУКТУРАВИЙ ФУНКЦИОНАЛ ТАДҚИҚОТЛАРИ ВА УЛАРНИ АНИҚЛАШНИНГ САМАРАДОР УСЛУБЛАРИНИ ЯРАТИШ

03.00.14 – Геномика, протеомика, биоинформатика (биология фанлари)

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент– 2020

УЎК:573:579.68.579.22:543.544.5.068.7.54.07

Фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)
Content of dissertation abstract of doctoral dissertation (DSc)

Солиев Аъзамжон Баҳодирович
Турли биологик манбалардан олинган фармакологик фаол моддаларнинг структуравий функционал тадқиқотлари ва уларни аниқлашнинг самарадор услубларини яратиш 3

Солиев Аъзамжон Баходирович
Структурно-функциональные исследования фармакологически активных веществ из различных биологических объектов и разработка эффективных методов их определения 25

Soliev Azamjon Bakhodirovich
Structural and functional investigations of pharmacologically active compounds from various biological objects and development of effective methods for their determination 46

Эълон қилинган мақолалар рўйҳати
Список опубликованных статьей
List of published papers 50

ГЕНЕТИКА ВА ЎСИМЛИКЛАР ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БИОЛОГИЯСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.B.53.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЎЗБЕКИСТОН ФАНЛАР АКАДЕМИЯСИ ГЕНОМИКА ВА БИОИНФОРМАТИКА МАРКАЗИ

СОЛИЕВ АЪЗАМЖОН БАҲОДИРОВИЧ

ТУРЛИ БИОЛОГИК МАНБАЛАРДАН ОЛИНГАН ФАРМАКОЛОГИК ФАОЛ МОДДАЛАРНИНГ СТРУКТУРАВИЙ ФУНКЦИОНАЛ ТАДҚИҚОТЛАРИ ВА УЛАРНИ АНИҚЛАШНИНГ САМАРАДОР УСЛУБЛАРИНИ ЯРАТИШ

03.00.14 – Геномика, протеомика, биоинформатика (биология фанлари)

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc) ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2020

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.2.DSc/B46 рақам билан рўйҳатга олинган.

Диссертация Геномика ва биоинформатика марказида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.genetika.uz) манзилига ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим порталининг www.ziyonet.uz манзилларига жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: **Адилова Азодахон Тешабоевна**
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар: **Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевна**
биология фанлари доктори

Мухамедов Рустам Султонович
биология фанлари доктори, профессор

Курбанбаев Илхам Джуманазарович
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот: **ЎзР ФА Биоорганик кимё институти**

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Фанлар академияси Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.B.53.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил « 8 » октябрь куни соат 10:00 даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, Юқори-юз п/б, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти мажлислар зали. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz, genetics@uzsci.net, gen@inst.gov.uz.

Докторлик диссертацияси билан Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____рақами билан рўйҳатга олинган). Манзил: 111226, Тошкент вилояти, Қибрай тумани, Юқори-юз п/б, Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30.

Диссертация автореферати 2020 йил «_____» _____ куни тарқатилди.

(2020 йил «_____»_____даги _____ рақамли реестр баённомаси).

А.А. Наримонов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, қ/х.ф.д. проф.

Б.Х. Аманов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш котиби, б.ф.д.

Ш. Юнусханов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш ҳузуридаги илмий семинар раиси б.ф.д., проф.

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда инсон саломатлигига хавф соладиган касаллик турларининг ортиб бориши янги фармакологик дори препаратларини яратишга бўлган эҳтиёжнинг ҳам йилдан-йилга кенгайишига олиб келмоқда. Айниқса, сўнгги йилларда мавжуд фармакологик препаратларнинг организмга таъсирини камайиши яратилаётган янги дори препаратларини ўз вақтида ва тезкор таҳлил қилиш чораларини излаб топишни талаб этмоқда. Бу ўринда, турли биологик манбалардан олинган фармакологик фаол моддаларнинг структуравий ва функционал хусусиятларини асослаш ҳамда уларни аниқлашнинг самарадор усулларини яратиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ҳозирги кунда жаҳон тиббиёт амалиётида *Ginseng* оиласига мансуб ўсимликлардан олинган доривор воситалари кенг қўлланилмоқда. Бу ўсимликлардан ажратиб олинган биологик фаол моддалар фармацевтика ва косметика саноатларида қувватни оширувчи, оғриқни қолдирувчи, қон босимини туширувчи, депрессияга қарши, шунингдек, гипотоник воситалар сифатида қўлланилади. Бундан ташқари, микроорганизмлар, хусусан, бактериялардан ажратиб олинган бир қатор бирикмалар, масалан, продигиосинлар, виоласеин, мариномицинлар рак (саратон) касалликларини даволашда самарадорлиги юқорилиги аниқланган. Клиник тадқиқотларда продигиосинларнинг олтмиш хилдан ортиқ саратон ҳужайраларига цитотоксик таъсир этиши исботланган. Бу борада дори воситаларининг ҳужайра ёки организмга таъсир этиш механизмлари ҳамда ҳужайра структураларидаги бирламчи нишонининг пайдо бўлишида бактериялардан табиий ҳолда бирикмаларни ажратиш; уларнинг сифат ва миқдорини янги усуллар ёрдамида баҳолаш; ажратиб олинган моддаларнинг фармакологик фаолликларини текшириш; танлаб олинган биофаол моддалар асосида янги дори воситаларини ишлаб чиқиш муҳим аҳамият касб этади.

Республикамизда фармацевтика саноатини замонавий дори воситалари билан таъминлаш, турли биологик манбаалардан фармацевтик фаол моддаларни аниқлаш ва ажратиб олишга катта эътибор қаратилди. Бу борада, жумладан, фарм зоналар асосида фармацевтика саноати хомашё базаси кенгайтирилди, маҳаллий ўсимлик хомашёлари асосида юқори унум ва сифатга эга бўлган бир қатор янги дори воситаларини яратиш, кимёвий синтез асосида янги таъсирга эга бўлган субстанциялар олиш технологияларини такомиллаштириш бўйича муҳим натижаларга эришилди. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида[1] «...фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳолини ва тиббиёт муассасаларини арзон, сифатли дори воситалари билан таъминлаш» вазифалари белгилаб берилган. Ушбу вазифалардан келиб чиққан ҳолда, жумладан, янги дори воситаларини яратиш, уларнинг биологик фаолликларини аниқлаш ҳамда фармакологик моддаларни аналитик усуллар

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

ёрдамида тезкор аниқлашнинг самарадорлигини ошириш муҳим илмий-амалий аҳамиятга эга.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 3 майдаги ПФ-5032-сон “Нукус-фарм”, “Зомин-фарм”, “Косонсой-фарм”, “Сирдарё-фарм”, “Бойсун-фарм”, “Бўстонлиқ-фарм” ва “Паркент-фарм” эркин иқтисодий зоналарини ташкил этиш тўғрисида”ги, 2017 йил 7 ноябрдаги ПФ-5229-сон «Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги Фармонлари, 2017 йил 20 апрелдаги ПҚ-2911-сон «Республика фармацевтика саноатини жадал ривожлантириш учун қулай шарт-шароитлар яратиш чора-тадбирлари тўғрисида»ги, 2018 йил 25 октябрдаги ПҚ-3983-сон «Ўзбекистон Республикасида кимё саноатини жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий хужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

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

Диссертация мавзуси бўйича ҳорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи[2]. Дори воситаларини таҳлил қилиш ва табиий биологик фаол моддаларни аниқлашга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, The Universityof Tokyo (Япония), University of Illinois at Chicago (UIC) (АҚШ), University of Ottawa (UO) (Канада), Kochi University of Technology (Япония), Toyohashi University of Technology (Япония), University of Kyoto (Япония), Pukyong National University (Жанубий Корея), College of Chemistry, Jilin University (Хитой), Shanghai Jiao Tong University (Хитой), Norwegian University of Science and Technology (Норвегия), The University of New South Wales (Австралия), The Institute of Life Sciences (Исроил), University of California at San Diego (АҚШ), Ўсимлик моддалари кимёси ва Биоорганик кимё институтлари (Ўзбекистон)да олиб борилмоқда.

Дори воситаларини таҳлил қилиш ва табиий биологик фаол моддаларни аниқлашга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: женьшен тутган табиий доривор препаратлар таркибини тезкор аниқлаш усуллари такомиллаштирилган (University of Illinois at Chicago, АҚШ); женьшен гинсенозидларининг биологик ва фармакологик фаолликлари исботланган (Jilin University, Хитой); денгиз ва океан сувларидан бактериялар ажратиб олиш усуллари ишлаб чиқилган ва бактериялар продуцирлайдиган биологик фаол моддаларни аниқлаш ҳамда уларнинг кимёвий структураларини ўрнатиш усуллари такомиллаштирилган (Kochi University of Technology,

[2]Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи www.elsever.com, www.springerlink.com, www.sciencedirect.com, www.ncbi.nlm.nih.gov, https://www.researchgate.net ва б. манбаалар асосида ишланган.

Япония); денгиз ва океан сувлари таркибидаги бактериялар иккиламчи метаболитларининг фармакологик фаолликлари аниқланган (Pukyong National University, Жанубий Корея).

Дунёда табиий биологик фаол моддаларни ажратиб олиш ва уларни фармацевтика соҳасида қўллаш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: хусусан, ноанъанавий организмларни биотехнологик усуллар ёрдамида манипуляция қилиш орқали улар синтез қиладиган ноёб биологик фаолликка эга моддаларининг фармакологик таъсир доирасининг ички механизмларини аниқлаш; иккиламчи фармакологик фаолликка эга метаболитларни тезкор аниқлайдиган янги инновацион усулларни яратиш; сурункали касалликларни даволашда қўлланиладиган янги авлод табиий дори воситалари ишлаб чиқаришни такомиллаштириш, генлар ассоциацияси орқали янги турдаги фармакологик фаол моддаларнинг синтезини амалга ошириш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳорижнинг етакчи илмий марказларида женьшен оиласига мансуб ўсимликлар гинсенозидларининг кимёвий тузилишлари ва биологик фаолликларини аниқлаш, шунингдек уларни аниқлашнинг тезкор ва самарадор усулларини яратиш бўйича етакчи олимлар шуғулланишган (K. Jinno, Toyohashi University of Technology, Japan). Денгиз ва океанлар сувларидан ажратиб олинган бактериялар иккиламчи метаболитларининг фармакологик фаолликларини тадқиқ этиш бўйича бир қатор изланишлар олиб борилган (U. Lindequist, Institute of Pharmacy, Германия). Шунингдек, женьшен препаратлари ва субстанцияларини стандартлаш бўйича тадқиқотлар олиб борилган (В.А. Куркин, А.С. Акушская, Самара давлат университети, Россия)

Мамлакатимизда турли хил биологик манбалардан ажратиб олинган биологик ҳамда фармакологик фаолликка эга бўлган препаратларни кенг қамровли тадқиқот ишлари Ўзбекистон Фанлар Академиясининг Ўсимлик моддалари кимёси ва биоорганик кимё институти олимлари (А.И.Исмоилов, Ш.С.Азимова, Н.З.Мамадалиева, А.Д.Матчанов, Д.Н.Далимов, М.Б.Ғофуров) ва бошқа бир қатор олимлар томонидан олиб борилган.

Шунга қарамай, янги фармакологик номзод препаратларни, айниқса, саратон касаллигига қарши фаолликка эга бўлган бирикмаларни излаш, аниқлаш ва уларнинг хоссаларини ўрганиш, шунингдек, дори воситаларини аниқлашнинг янги усулларини яратиш ҳамда мавжуд усулларни такомиллаштириш борасидаги илмий изланишлар етарлича амалга оширилмаганлиги боис бу йўналишдаги тадқиқотларни олиб бориш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга ҳисобланади.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот ва олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Геномика ва биоинформатика маркази илмий-тадқиқот ишлари режасининг Ф5-Т030 “Инновацион биотехнологияларни ривожлантириш учун устивор қишлоқ хўжалиги экинларининг геномларини тадқиқ қилиш”, АТЛ-10 «Ўзбекистонда

профессионал спортчиларда тақиқланган (допинг) бирикмаларнинг мониторинг тизимини яратиш» мавзусидаги фундаментал ва амалий лойиҳалари, шунингдек, 14-035 ва 14-051 Япония фан ва технологиялар қўмитасининг бошланғич технологик илмий-тадқиқот ишларини қўллаб-қувватлаш ҳамда Япония Халқаро Ҳамкорлик Марказининг инсон ресурсларини ривожлантириш фондлари томонидан ажратилган махсус грантлари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади бактериал штаммнинг 16S рибосомал РНК геномини ажратиб олиш, уни фенотипик, генотипик белгиларини ва турли биологик манбаалардан олинган фармакологик фаол моддаларнинг кимёвий структурасини асослаш, уларнинг биологик фаолликларини аниқлаш ҳамда ушбу моддаларни аниқлашнинг самарадор усулларини яратишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

қизил пигмент продуцирловчи 1020R бактерия штаммини ажратиш ва турини аниқлаш учун молекуляр-генетик таҳлилларини ўтказиш;

штаммнинг 16S рибосомал РНК геномини ажратиб олиш ва унинг нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш;

Pseudoalteromonas бактерия оиласига мансуб 1020R штамми ишлаб чиқарадиган қизил пигментларини хроматографик усулда индивидуал бирикмаларини ажратиб олиш;

қизил пигмент индивидуал бирикмалари кимёвий структурасини ўрнатиш;

қизил пигмент ва унинг индивидуал бирикмаларининг рак ҳужайралари пролиферацияси жараёнига таъсирини аниқлаш;

бактериал пигментлар ва уларнинг индивидуал метаболитларини *in vivo* ва *in vitro* тизимларида апоптоз жараёнида иштирок этувчи ҳужайра ички молекулаларига таъсирини аниқлаш;

юқори босимли юқори самарадор суюқлик хроматографиясини қўллаган ҳолда женьшен ўсимлиги иккиламчи метаболитларини тез ва самарали аниқлаш усулини яратиш ва такомиллаштириш;

Тадқиқотнинг объекти сифатида *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансуб 1020R ва 520P1 штаммлари танлаб олинган ҳамда *Panax ginseng* (женьшень) оиласига мансуб ўсимликлардан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг предмети *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансуб 1020R ва 520P1 штаммларининг филогенетик ва генотипик таҳлилларини ўтказиш, ушбу бактерия штаммлари ишлаб чиқарадиган рангли бирикмаларни ажратиб олиш, уларнинг кимёвий структуралари ҳамда биологик фаолликларини ўрганиш, шунингдек, *Panax ginseng* (женьшень) оиласига мансуб ўсимликлар таркибидаги асосий биологик фаол метаболитлар миқдорини баҳолаш, ушбу метаболитларни турли хил дори препаратлари таркибида самарали равишда аниқлаш усулини ишлаб чиқиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертацияда классик ва модификацияланган юқори самарадор суюқлик хроматографияси, юқори

самарадор масс-спектрометрия, ЯМР спектроскопия, ДНК таҳлилининг молекуляр-генетик усуллари, лаборатор шароитида бактерияларни кўпайтириш ва ажратишнинг микробиологик усуллари, тадқиқ этилаётган иккиламчи метаболитларнинг биологик фаолликларини аниқлашда *in vivo* ва *in vitro* тизимларида цитотоксик фаолликларини U932, HL-60, K562 лейкемия саратон ҳужайраларида ҳамда протеинкиназа ва протеинфосфатаза каби сигнал трансдукция ферментларига таъсиридан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор махсус тузилган праймерлар асосида қизил рангли пигмент продуцирловчи бактериянинг штаммини аниқлаш учун бактериал геном 16S рибосомал РНК худуди ажратиб олинган ва унинг нуклеотид кетма-кетлиги ўрнатилган;

илк бор 16S рибосомал РНК гомологик кетма-кетлиги GenBank маълумотлар базасида BLAST усулида текширилиб, бактериянинг *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансуб штамм эканлиги аниқланган;

илк бор юқори самарадор суюқлик хроматографияси усулида 1020R бактерия қизил рангли пигментининг таркиби 7 хил фармакологик фаолликка эга бирикмалардан иборат эканлиги аниқланган;

илк бора қизил рангли пигмент таркибидаги моддаларнинг кимёвий структуралари ЯМР ва масс-спектрометрик усулларни қўллаган ҳолда аниқланиб, улар 2-метил-3-пентилпродигининнинг гомологик ҳосилалари эканлиги исботланган;

Pseudoalteromonas 1020R ва 520P1 денгиз бактериялари рангли метаболитлари U937, HL60 ва K562 лейкоз ҳужайраларига қарши цитотоксик таъсирга эга эканликлари аниқланган;

пигментларнинг U937 лейкемия ҳужайраларидаги апоптотик маркёрларга кўрсатган цитотоксик таъсирини баҳолаш орқали уларни апоптотик жараёнларни индукциялаши исботланган;

in vitro тизимида *Pseudoalteromonas* 1020R ва 520P1 штаммлар пигментлари ҳужайра ички сигнал трансдукциясида иштирок этувчи бир қатор протеинкиназа ва протеинфосфатазалар фаоллигига ингибирловчи таъсир кўрсатиши асосланган;

Пигментларнинг апоптотик механизмлари уларнинг ҳужайра геном ДНК сини фрагментациялаши натижасида келиб чиқиши исботланган;

Пигментларнинг апоптотик механизмлари уларнинг протеолитик ферментлар ҳисобланган каспазалар фаолиятини фаоллаштириши ҳисобига ҳам содир бўлиши мумкинлиги аниқланган;

қизил пигмент индивидуал бирикмалари биологик фаолликлари улар структурасидаги ён алкил гуруҳи занжирининг узунлигига боғлиқлиги аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

денгиз суви таркибидан 85 турдаги бактериялар штаммлари ажратиб олинган ва 13 бактерия штаммлари сиёҳранг ва бир штамм қизил ранг пигмент продуцирлаши аниқланган;

қизил рангли пигмент продуцирловчи, 16S РНК рибосомал оперон регионини кодловчи сиквенс асосида *Pseudoalteromonas* 1020R деб номланган денгиз бактериал штамми ажратиб олинган;

Pseudoalteromonas бактерия оиласига мансуб 1020R ва 520P1 штаммлари продуцирловчи қизил ва сиёҳранг пигментларини фармакологик мақсадларда саратон касаллиги учун препаратлар ишлаб чиқариш бўйича тавсиялар ишлаб чиқилган;

женьшень ўсимлиги иккиламчи метаболитларини юқори босимли ультра юқори самарадор суюқлик хроматографиясида тез ва самарали усулда сифат ва миқдорий жиҳатдан аниқлашнинг янги усули яратилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги экспериментал маълумотларни замонавий микробиологик, биокимёвий, физикавий ва молекуляр биология усуллари орқали олинганлиги ва уларни назарий маълумотларга мос келиши, натижаларга Стьюдент мезонлари ва Фишер дисперсион таҳлили (ANOVA) ёрдамида статистик ишлов берилганлиги, диссертация натижаларини етакчи хорижий журналларда чоп этилганлиги ҳамда амалиётга жорий этилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти янги топилган бактерияларнинг генотипик ва фенотипик белгиларининг исботланганлиги, бактериялар продуцирлайдиган рангли пигментларнинг бактериялар ҳаётидаги ўрни ва уларнинг биологик ва фармакологик фаолликларининг асосланганлиги ва дори моддаларини аниқлашнинг самарадор усулларини яратилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти 1020R штамм бактериясининг Япониянинг биологик ресурслар марказида рўйҳатга олинганлиги, бактериялар продуцирлайдиган рангли пигментлар асосида фармакологик самарадор янги дори воситалари яратиш ҳамда юқори босимли самарадор суюқлик хроматографияси ёрдамида дори воситалари таркибини тезкор аниқлаш усулининг амалда муваффақиятли қўлланилганлиги билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Турли биологик манбалардан олинган фармакологик фаол моддаларнинг структуравий функционал тадқиқотлари ва уларни аниқлашнинг самарадор усулларини яратиш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ажратиб олинган 1020R бактериал штамми Япониянинг технология ва баҳолаш миллий институтининг биологик ресурслар маркази (http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00107707&lang=jp) электрон базасида рўйҳатга олинган (NBRC, №107707). Натижада дунё олимлари, тадқиқотчилар ва магистрантларга ушбу бактерия штаммидан илмий ишлар олиб боришда фойдаланиш имконини берган;

Pseudoalteromonas бактерия оиласига мансуб штаммлар иккиламчи метаболитлари бўйича натижалар дунё тадқиқотчилар томонидан олиб

борилаётган ишларда фойдаланилган бўлиб, жами 165 дан ортиқ ҳорижий импакт фактори юқори журналларда чоп этилган илмий ишларда бактериялардан ажратиб олинган бирламчи ва иккиламчи метаболитларни кимёвий ва миқдорий жиҳатдан тавсифлаш, шунингдек антиоксидант, цитотоксик, микроб ва замбуруғларга қарши антибиотик фаолликларини аниқлашда фойдаланилган (*Frontiers in Microbiology*, 2017; 8: 1113, PubMed, IF-4.076; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(9):3841-58, RG, IF-3.42; *Natural Product Reports* 31(2):160-258, PubMed, IF-11.014 ва ҳ). Натижада *Pseudoalteromonas* оиласи бактерияларининг кимёвий таркиби ва биологик фаолликлари тўғрисида маълумотлар олиш имконини берган;

женьшен иккиламчи метаболитлари – гинсенозидларни тадқиқ қилиш натижаларидан жами 69 дан ортиқ ҳорижий импакт фактори юқори журналларда чоп этилган илмий ишларда ҳамда диссертация ишида LC-MS ёрдамида гинсенозидларни идентификация қилишда фойдаланилган (*Natural Product Reports*, 2011, 28(3):467-97, RG, IF-11.014; *Analytica Chimica Acta*, 2011, 692(1-2):1-25, RG, IF-4.513; *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2010;3:129-50, PubMed, IF-8.833). Натижада *Ginseng* туркум ўсимликларининг гинсенозидлари таркиби ҳамда уларни тез ва самарадор усулда аниқлаш бўйича маълумотлар олиш имконини берган;

Ginseng оиласи турларидан метаболитларини ажратиш ва уларни тез ва самарадор таҳлил қилиш усули М/УЗБ-КНР 09/2016 “Глицирризин кислотаси ва унинг ҳосилаларининг супрамолекуляр комплекслари структуравий хусусиятларини ўрганиш” мавзусидаги амалий лойиҳасида глицирризин ва унинг ҳосилаларини кимёвий идентификациялашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2018 йил 12 октябрдаги 4/1255-2699-сон маълумотномаси). Натижада ширинмия ўсимлигидан олинадиган глицирризин ва унинг ҳосилаларини юқори босимли самарадор суюқлик хроматографияси ёрдамида аниқлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 6 та, жумладан, 4 та ҳалқаро ва 2 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамалардан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 28 та илмий ишлар чоп этилган бўлиб, шулардан, 1 та монография, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда 13 та мақола, жумладан, 9 таси республикада ва 4 таси ҳорижий журналларда нашр қилинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйҳати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 172 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган. Тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари

тавсифланган. Ўзбекистон Республикаси фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Табиий манбаалардан ажратиладиган биологик фаол моддаларнинг таҳлил усуллари»** деб номланган биринчи бобида биологик фаол моддаларни таҳлил қилишда ишлатиладиган турли хил хроматографик усуллар кенг ёритилган. Бунда юпқа қатлам хроматографияси, газ хроматографияси каби умум эътироф этилган усуллар билан бир қаторда асосий эътибор аналитик кимёда энг кўп ишлатиладиган ЮССХда қилинадиган таҳлилларга қаратилади. Адабиётлар шарҳида турли хил табиий манбаалардан олинган биологик фаол моддалар, шунингдек, ушбу усул ёрдамида аниқланган баъзи бир дори воситаларини таҳлил қилиш келтирилган. Шунингдек, юқори босимли юқори самарадор суюқлик хроматографияси усулида женьшень ўсимлиги стандарт метаболитлари намуналарини аниқлаш ва идентификация қилиш усулини яратиш ва оптималлаш, уларни сифат ва миқдорий жиҳатдан аниқлаш, ушбу метаболитлар тутган турли хил женьшень настойкалари ва дори препаратлари таркибини хроматографик усулда аниқлаш ва амалиётда қўлланилиши ҳақида атрофлича ёритилган.

Диссертациянинг «**Табиий манбаалардан биологик фаол моддаларни ажратиш ва ўрганиш**» деб номланган иккинчи бобида табиий манбаалардан биологик фаол моддаларни ажратиб олиш ва уларнинг биологик ҳамда фармакологик фаолликларини ўрганиш бўйича атрофлича маълумотлар келтирилган. Унда хусусан, океан ва денгизлар экосистемасидан ажратиб олинаётган биологик фаол моддалар ҳақида ҳам атрофлича фикрлар юритилган. Океан ва денгизларда яшовчи микроорганизмлар ва улар продуцирловчи иккиламчи метаболитлар, ушбу моддаларнинг биологик ҳамда фармакологик фаолликларини ўрганиш ва уларни инсон ҳаётининг турли соҳаларига жалб этиш ҳақида кенг ва батафсил маълумотлар берилган. Шунингдек, ушбу бобда женшень ўсимлиги метаболитлари, уларнинг тиббиёт ва косметика соҳасида ишлатилиниши борасида ҳам маълумотлар берилиши билан бир қаторда унинг асосида тайёрланадиган дори воситаларининг нечоғлик қалбакилаштирилиши ва унинг олдини олиш чора-тадбирлари бўйича дунё миқёсида қилинаётган ишларнинг шарҳи ҳам бериб ўтилган.

Диссертациянинг «**Тажриба қисми**» деб номланган учинчи бобида диссертация иши юзасидан олиб борилган барча тажрибалар ва уларда ишлатилинган кимёвий реагентлар, китлар, тажриба жараёнлари хусусида атрофлича ёритилган.

Диссертациянинг «**Тадқиқотларнинг натижалари ва уларнинг муҳокамаси**» деб номланган тўртинчи бобида диссертация иши юзасидан

олиб борилган барча тадқиқотлар атрофлича муҳокама этилиб, олинган натижалар юзасидан фикр-мулоҳазалар бериб ўтилган. Хусусан, ушбу бобнинг қизил пигмент продуцирловчи 1020R штамминнинг таксономик муносиблигини аниқлаш, штамм ажратадиган қизил пигментни ажратиб олиш усулларини оптималлаш, пигмент таркибидаги индивидуал кимёвий бирикмаларни ажратиб олиш ва уларнинг кимёвий структураларини ўрнатиш борасида қилинган ишлар кенг ва атрофлича ёритилган.

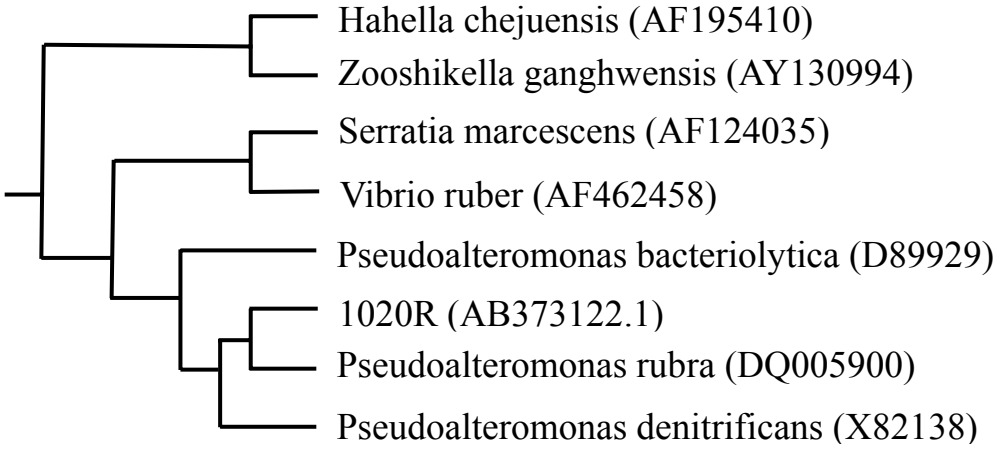
1020R штамминнинг морфологик ва биокимёвий таснифлари Techno Suraga Co., Ltd. (Шизуока, Япония) компанияси томонидан ўрганилди. Натижада 1020R штамми чўзинчоқ шаклли (0,7-0,8×1,5-2,0 мкм) грамм-негатив бактериялар оиласига мансублиги аниқланди.

Таблица 1

1020R бактериал штамминнинг таксономик муносиблигини аниқлаш учун ишлатилган праймерларнинг нуклеотид кетма-кетликлари ва Тэр ҳарорати.

Праймер номи	Кетма-кетлик	Тэр
RV03	5’-aaggaggtgatccagccgca-3’	72
r3L	5’-ttgcgctcgttgcgggact-3’	72
r1L	5’-gtattaccgcggctgctgg-3’	72
FW07	5’-agagtttgatcctggctcag-3’	68
f2L	5’-ccagcagccgcggtaatag-3’	72
f2.2L	5’-tgcgtagagatctgaaggaa-3’	66
f3L	5’-gtcccgcaacgagcgcaac-3’	74

Штаммнинг таксономик муносиблигини аниқлаш учун унинг 16S рРНКси QIAamp ДНК Mini Kit (QIAGEN) ёрдамида ажратиб олиниб, нуклеотидлар кетма-кетлиги ПЗР ёрдамида кўпайтирилди. ПЗР маҳсулотлари QIAquick (QIAGEN) кит ёрдамида экстракциялаб тозалаб олинди.



1-расм. 1020R штаммини бошқа денгиз бактериялари билан яқинлигини ифодаловчи филогенетик дарахт. Қавс ичидаги рақамлар бактериал штаммнинг GenBank маълумотлар базасидаги тартиб рақамини билдиради.

Кенг таксономик гуруҳларга мансуб микроорганизмларга тегишли 16S рРНК генларининг юқори даражада хилма-хиллигини эътиборга олиб,

тадқиқотларимизда бир неча хил праймерлар гуруҳи ишлатилди. Улар E. coli 16S рРНК генининг 8 дан 27 гача ва 1542 дан 1522 нуклеотидларигача мос келувчи форвард (FW07) ва реверс (RV03), Hiraishi (1992) томонидан таснифланган прокариотлар учун универсал ички f2L, f3L, r1L, r3L праймерлари ва f2L праймери асосида олинган маълумотларнинг етарли эмаслиги сабабидан ушбу тадқиқот учун махсус яратилган f2.2L праймеридан фойдаланилди (табл. 1).

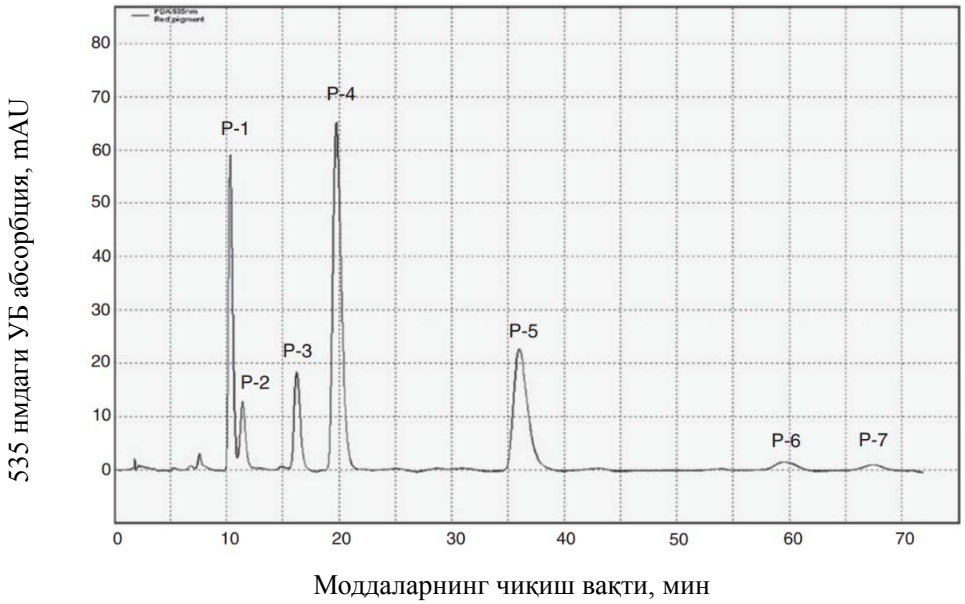
16S рРНКни кодловчи рибосомал оперон қисмини сиквенслаш натижалари, шунингдек, «neighbor-joining» алгоритми асосида олиб борилган филогенетик таҳлиллар 1020R штаммини *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансублигини кўрсатди (1-расм).

У Японияниг технология ва баҳолаш миллий институти (National Institute of Technology and Evaluation, NITE)нинг биологик ресурслар маркази (National Biological Resource Center, NBRC)да NBRC 107707 рақам билан рўйҳатга қўйилди.

Пигмент метаболитларини ажратиб олиш учун 1020R штаммини аввал 5 мл LB-SW муҳити бўлган пробиркада, сўнгра 30 мл LB-SW муҳитли 200 мл колбада шундан сўнг 200 мл LB-SW муҳити бўлган 500 мл колбада 28°С ҳароратда 7-8 кун давомида ўстирилди. Бактериялар ўсиши учун оптимал муҳит pH=7,0 эканлиги аниқланди.

1020R штаммидан ажратиладиган қизил пигментнинг миқдори 4,27 мг/л дан 14,58±0,45 мг/л гачани ташкил этиши аниқланди.

Олиб борилган тадқиқотлар 1020R штамми продуцирлайдиган қизил пигмент уни камида етти хил моддадан иборат бўлишлигини кўрсатди (2-расм).



2-расм. 1020R штаммидан ажратиб олинган қизил пигментнинг ЮССХ таҳлили. Хроматографик шароитлар: Shiseido Nanospace SI-2 хроматографи, колонка: ODS CapcellPak C-18 MGII (1,5 мм×150 мм); мобил фаза: CH_3OH/H_2O – 50/50 (о/о) + 0.2% CH_3COOH; колонка ҳарорати-40°С; оқим тезлиги 100 мкл/мин.

Структуравий тадқиқотлар учун экстракция қилиб олинган пигментларни стационар фазаси аввал силикагел, кейин эса октадецилсилан (ОДС) бўлган колонкали хроматография усулида фракцияларга ажратиб олинди. Бунинг учун тахминан 9 мг тозаланмаган қизил пигментни 5 мл $CHCl_3$ да эритилиб, аввал 2,5×52 см ўлчамдаги ичи Вакогель С200 ёки YMC-Gel Silica 12 нм S-150 μм билан тўлдирилган ва хлороформда мувозанатга келтирилган колонкада, сўнгра эса ОДС колонкали хроматография индивидуал фракцияларга ажратиб олинди. Структура тадқиқотлари учун Р-2, Р-4, Р-5 ҳамда Р-6 моддаларидан етарли миқдорда йиғишга эришилди. *Pseudoalteromonas* 520P1 денгиз бактериал штамми продуцирлайдиган виоласеин ҳам продигиосинлар каби бир хил усулда ажратиб олинди.

Индивидуал ҳолда ажратиб олинган бирикмаларнинг кимёвий структураларини масс-спектрометрия (ESI-FTMS) ва ЯМР спектроскопия, шу жумладан ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, DEPT, HMQC, HMBC, NOESY, COSY ва TOCSY каби физик-кимёвий усулларни қўллаш орқали аниқланди. ESI-FTMS таҳлиллари (3-расм) барча бирикмаларда 252 m/z масса зарядли фрагмент борлигини кўрсатди. Ушбу масса заряди барча бирикмаларда пирролипиррометен, яъни продигинин ядроси структураси мавжуд бўлиши мумкинлигини кўрсатди.

2, 4, 5 ва 6-пигментларнинг MS/MS спектрлари мос равишда квазимолекуляр ион $[M+H]^+$ пикларига тегишли бўлган *m/z* 295, 310, 338 ва 352 масс фрагментларининг мавжудлигини кўрсатди. Бундан ташқари, *m/z* 295, 309, 323 ва 337 масса фрагментлари мос равишда 2, 4, 5 ва 6-пигментлар метоксил гуруҳидан CH_3 фрагментининг чиқиб кетишидан ҳосил бўлган, деб тахмин қилинди (3-расм). Бу эса 2, 4, 5 ва 6-пигментлар бир хил структуравий скелетга ва турлича узунликдаги ён алкил занжирига эгалигидан далолат беради $(CH_2)_nCH_3$ (n = 3, 4, 5 ва 6).

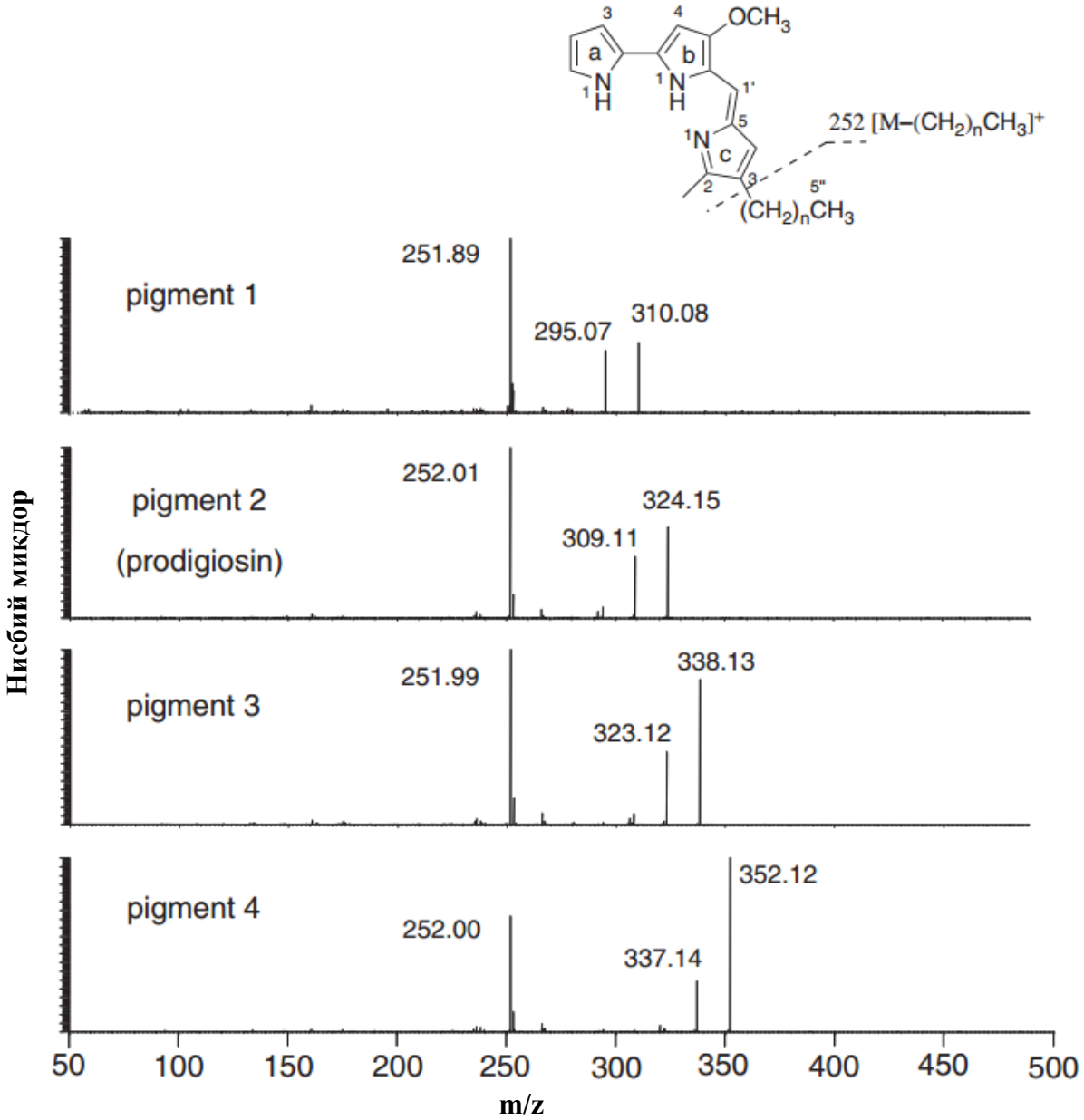
2, 4, 5 ва 6-пигментларнинг ^{1}H-ЯМР спектрида кучли магнит майдонида NH гуруҳ, олти пирроль алкалоидлари H сигналлари, битта метоксигуруҳ ва бешта алкил занжирлари гуруҳи протонлари кузатилди. Ушбу маълумотлар пирролипиррометен структураси мавжудлигига етарлича асос бўлди.

^{13}C-ЯМР таҳлили ҳам С-ҳалқадаги ва алкил занжирдаги метил гуруҳлари сигналларидан фарқли равишда метоксигуруҳ мавжудлигини кўрсатди. Охирги узил-кесил маълумот метокси ва метил гуруҳлари мавжудлигини тасдиқлаган, шунингдек, С-3 ҳолатида 2D ўлчамда сигналларни қоплаш орқали алкил занжири узунлигини турли углеводородлар радикали гуруҳига тенглигини исботлаган TOCSY таҳлили орқали олинди. ЯМР тадқиқотларда 2, 4, 5 ва 6-пигментлар учун қуйидаги сигналлар олинди. Р-2, яъни 2-метил-3-бутилпродигинин бирикмаси учун:

^{1}**H-ЯМР** ($CDCl_3$, 400MHz) δ0.93 (3H, t, H-c4’’), 1.35 (2H, m, H-c3’’), 1.52 (2H, m, H-c2’’), 2.41 (2H, t, H-c1’’), 2.54 (3H, s, CH_3), 4.01 (3H, s, H-OCH_3), 6.09 (1H, d, H-b4), 6.36 (1H, m, H-a4), 6.69 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.96 (1H, d, H-1’), 7.20 (1H, m, H-a5), 12.72 (brs, H-NH-a), 12.56 (brs, H-NH-b);

^{13}**C-ЯМР** ($CDCl_3$, 101MHz) δ12.5 (c-CH_3), 14.1 (c4’’), 25.1 (c1’’), 32.2 (c2’’), 22.3 (c3’’), 58.7 (OCH_3), 92.8 (b4), 111.7 (a4), 116.0 (1’), 117.0 (a3), 121.0

(b2), 123.3 (a2), 125.2 (c5), 127.0 (a5), 128.4 (c4), 128.5 (c3), 147.1 (c2), 147.7 (b5), 165.8 (b3).



3-расм. Қизил пигмент индивидуал бирикмаларининг ESI-FTMS таҳлили.

Р-4, яъни 2-метил-3-пентилпродигинин (продигиосин) бирикмаси учун:

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 0.93 (3H, t, H-c5’’), 1.25 (4H, m, H-c3’’, H-c4’’), 1.58 (2H, m, H-c2’’), 2.40 (2H, t, H-c1’’), 2.55 (3H, s, H-c-CH_3), 4.00 (3H, s, H-OCH_3), 6.08 (1H, d, H-b4), 6.34 (1H, m, H-a4), 6.68 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.95 (1H, d, H-1’), 7.27 (1H, m, H-a5), 12.49 (brs, H-NH-a), 12.64 (brs, H-NH-b),

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100MHz) 12.34 (c-CH_3), 13.97 (c5’’), 22.43 (c4’’), 25.25 (c1’’), 29.72 (c2’’), 31.36 (c3’’), 58.72 (OCH_3), 92.84 (b4), 111.66 (a4), 115.90 (1’), 117.04 (a3), 120.64 (b2), 122.17 (a2), 125.07 (c5), 126.80 (a5), 128.30 (c4), 128.37 (c3), 146.77 (c2), 147.64 (b5), 165.71 (b3).

Р-5, яъни 2-метил-3-гексилпродигинин бирикмаси учун:

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 0.89 (3H, t, H-c6’’), 1.30 (6H, m, H-c3’’, H-c4’’, H-c5’’), 1.61 (2H, m, H-c2’’), 2.38 (2H, t, H-c1’’), 2.54 (3H, s, H-c-CH_3), 4.00 (3H, s, H-OCH_3), 6.08 (1H, d, H-b4), 6.33 (1H, m, H-a4), 6.67 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.94 (1H, d, H-1’), 7.27 (1H, m, H-a5), 12.51 (brs, H-NH-a), 12.67 (brs, H-NH-b),

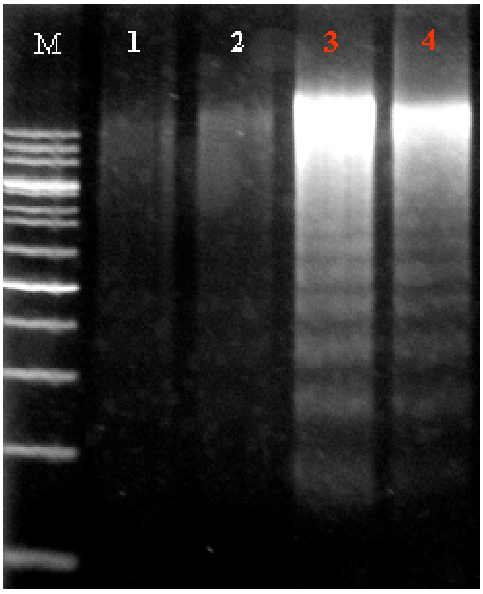
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100MHz) 12.41 (c-CH3), 14.02 (c6’’), 22.85 (c5’’), 25.61 (c1’’), 29.16 (c2’’), 30.32 (c3’’), 31.90 (c4’’), 60.08 (OCH_3), 93.05 (b4), 111.70 (a4), 115.95 (1’), 117.16 (a3), 120.67 (b2), 122.17 (a2), 125.10 (c5), 126.95 (a5), 128.36 (c4), 128.47 (c3), 146.89 (c2), 147.66 (b5), 165.73 (b3).

Р-6, яъни 2-метил-3-гептилпродигинин бирикмаси учун:

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 6.08 (1H, d, H-b4), 6.35 (1H, m, H-a4), 6.67 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.94 (1H, d, H-1’), 7.23 (1H, m, H-a5), 12.50 (brs, H-NH-a), 12.70 (brs, H-NH-b).

Шуни алоҳида қайд этиб ўтиш жоизки, бу бирикмалар бир микроорганизмдан ажратиб олиниб, ЯМР спектроскопик тажрибалар асосида структуравий жиҳатдан таҳлил қилинган биринчи ишдир.

Аввалги тадқиқотларимизда *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансуб 1020R ва 520P1 штаммларидан ажратиб олинган қизил ва сиёҳранг пигментлар ва уларнинг индивидуал бирикмаларининг U937, K562 ва HL60 оқ қон (лейкемия) касаллиги ҳужайраларига таъсири ҳамда уларнинг цитотоксик ҳоссаси молекуляр механизмларини протеинкиназа ҳамда протеинфосфатаза ферментларида ўрганилган эди.

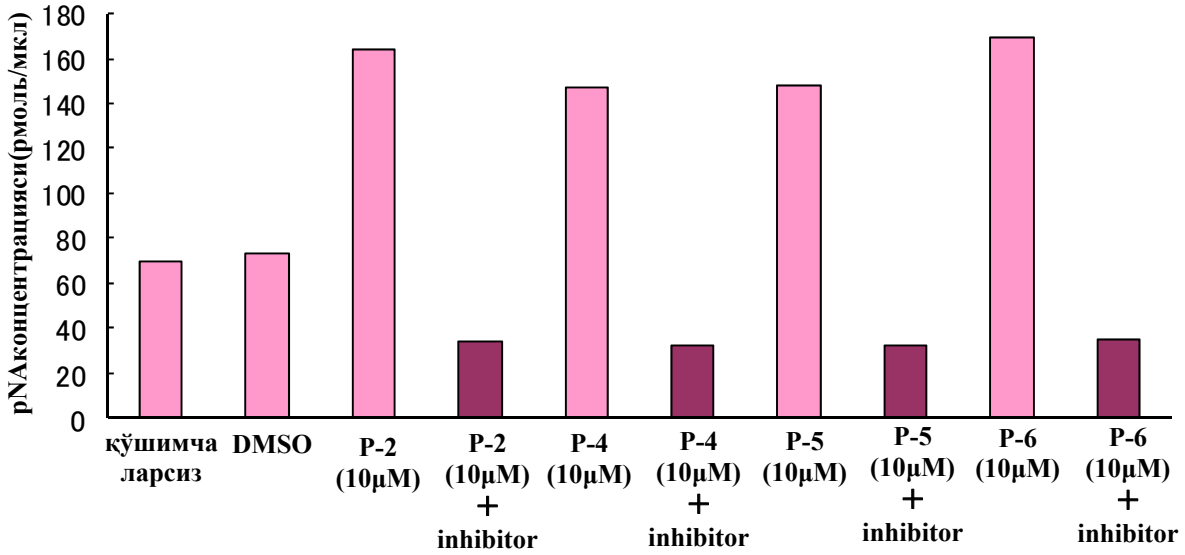


4-расм. Продигиосин таъсирида U937 лейкемия ҳужайраларида ДНК молекуласининг фрагментациясини кўрсатувчи электрофореграмма. М – 200 жуфт асослардан ташкил топган ДНК-маркер; 1 – ишлов берилмаган U937 ҳужайра ДНКси; 2 – ДМСО; 3 ва 4 – продигиосин (Р-4) 10 мкМ ва 5 мкМ.

Тадқиқотларимизнинг давомида ўрганилаётган моддаларнинг қўшимча цитотоксик механизмларини тадқиқ этиш учун ушбу моддаларнинг ҳужайра геном ДНКсига таъсирини ўргандик. Тадқиқотларимизда U937 лейкемия ҳужайраларини продигиосин билан инкубация қилиниб, уларнинг ДНКси ажратилиб, агароза гели электрофореграммасида текширилганда унда ДНК молекуласининг «апоптоз нарвони» кўринди (4-расм). Бу эса пигментларнинг саратон ҳужайраларига цитотоксик таъсири остида айнан апоптотик жараён ётишлигини билдиради. Сабаби, айнан апоптоз жараёнида ДНК молекуласи, яъни нуклеосомалар орасининг парчаланиши юз беради. Бу эса ўз навбатида гелда турли хил ҳаракатланишга сабаб бўлган «нарвон» кўринишидаги ДНК

фрагментлари тўпламининг ҳосил бўлишини кўрсатади. Назоратдаги оддий ҳужайралар ДНКси массасининг юқорилиги боис бошланғич нуқтада қолади.

Худди шундай ҳолат виоласеин моддаси билан ҳам кузатилди. Фақатгина виоласеин 1 мкМ концентрацияда қизил пигментларга нисбатан янада кучлироқ ДНК фрагментациясини юзага келтирди.Апоптоз жараёнининг юзага келиш сабабларидан яна бири бу каспаза (цистеин-аспартат-протеиназа) протеиназа ферментлари фаолликларининг ошиши ҳисобланади. Фаоллашган ферментларни миқдорий жиҳатдан каспаза специфик субстратларининг парчаланишини ҳисоблаш орқали аниқлаш мумкин. Каспазалар ҳужайра ядросидаги бошқарув марказини издан чиқариши натижасида ДНКнинг репликация ва репарация жараёнлари тўҳтаб, унинг фрагментацияси бошланади, деб ҳисобланади. Бунда пептид боғларини узувчи аспартатдан кейин кўплаб маълум юқори ихтисослашган цистеин протеиназалар қаторида каспаза-3 фақатгина апоптозга учраган ҳужайралардагина фаоллашган ҳолатда бўлади.



5-расм. U937 лейкемиа ҳужайраларидаги каспаза-3 ферментларининг қизил пигмент индивидуал бирикмалари (P-2, P-4, P-5 ва P-6) таъсирида фаоллашиши тестлари. Ac-DEVD-pNA каспаза-3 субстрати, Z-VAD-FMK эса унинг ингибитори сифатида ишлатилди.

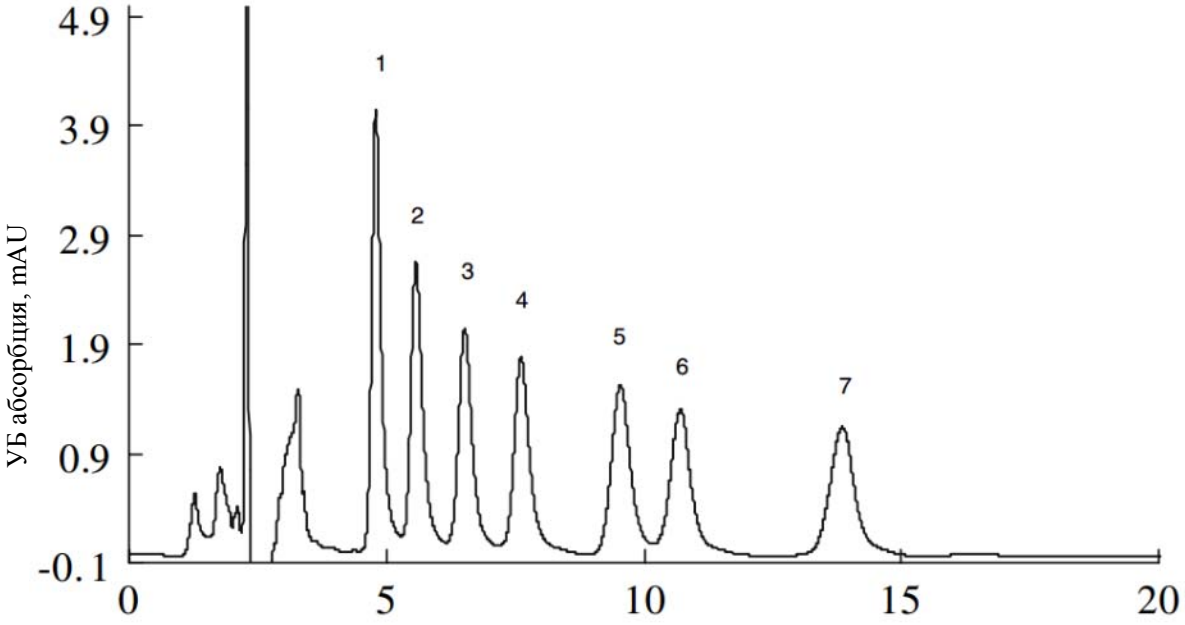
Продигининларнинг каспаза-3 фаоллигига таъсири тажрибалари U937 лейкемиа ҳужайраларига ушбу моддаларни 24 соат давомида таъсир эттириш орқали ўрганилди. Олинган натижалар шуни кўрсатдики, барча қизил пигмент индивидуал бирикмалари каспаза-3 индуктори сифатида таъсир кўрсатди. Бу эса ўз навбатида апоптоз жараёни ушбу ферментларнинг фаоллашиши натижасида ҳам содир бўлиши мумкинлигини исботлайди. Қизил пигмент намуналарига махсус каспаза-3 ингибитори бўлган Z-VAD-FMK қўшилганида, ушбу ферментнинг фаоллашиши кузатилмади (5-расм).

Диссертациянинг **“Гинсенозидларни аниқлашнинг тезкор усулини яратиш”** деб номланган бўлимида женьшен метаболитлари бўлган гинсенозидларни сифат ва миқдорий жиҳатдан таҳлил қилишнинг янги усули

тўлиқ ёритилган. Унда мазкур тезкор усулни яратиш учун икки хил типдаги хроматографик колонкалардан фойдаланилди. Булар стационар фазаси поливинилспирт (ПВС) ва октадецилсилан (ОДС) билан модификация қилинган колонкалардир. Бу икки типдаги колонкаларнинг бир-биридан фарқи шундаки, ПВС гидрофиль, ОДС (С18) эса унга тескари – гидрофоб табиатга эга. Мос равишда, бу икки хил типдаги колонкаларда ажратилаётган аналитлар турлича боғланиш омилларига эга бўлади.

Усулни яратишда асосий эътибор гинсенозидларни хроматографик жиҳатдан ажралишига таъсир этувчи омилларга қаратилди. Бундай омиллар қаторига гинсенозидларнинг самарали ажралишини таъминлашга ўз таъсирини ўтказувчи мобил фаза таркиби ва унинг нисбати, колонка ҳарорати ҳамда оқим тезлиги кириши тажрибалар давомида ўз исботини топди.

Ҳусусан, муқобил ҳарорат чегараларини аниқлаш тадқиқотлари шуни кўрсатдики, гинсенозидлар ПВС билан модификация қилинган хроматографик колонкада атроф муҳит ҳароратидан паст бўлган ҳароратда яхши бўлиниши кузатилди. Бунда энг муқобил ҳарорат кўрсаткичи 9°С ни ташкил этиб, айнан шу ҳароратда етти хил гинсенозидлар стандартлари самарали равишда ажралиши юз берди (6-расм).

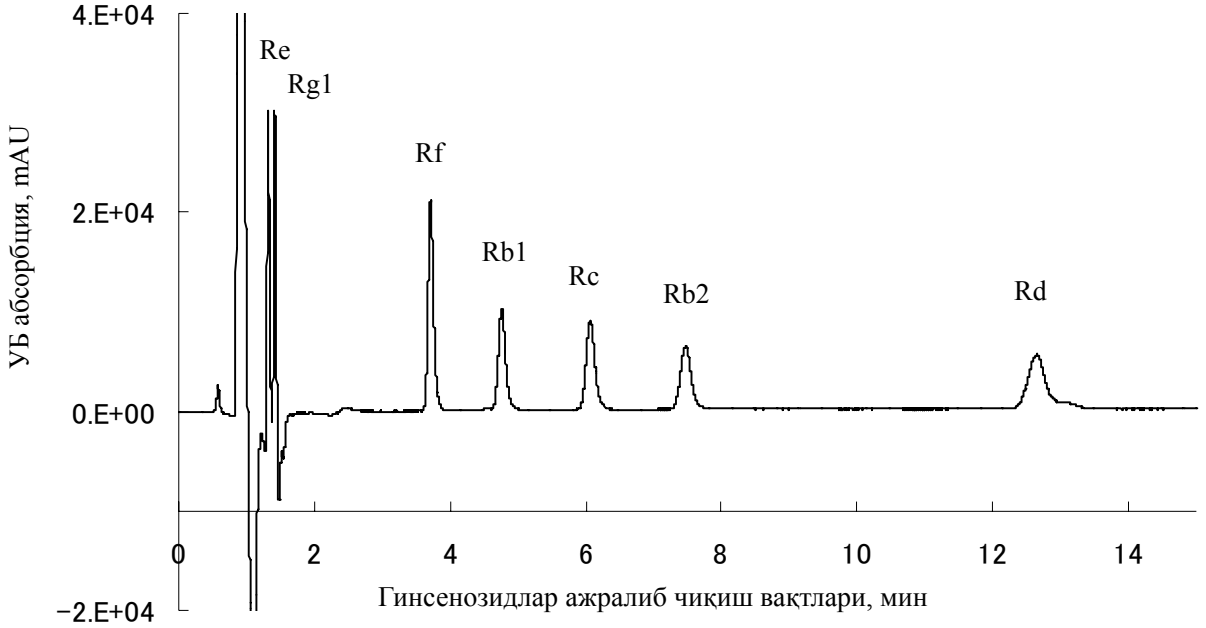


6-расм. Етти хил гинсенозидлар стандартлари ажралишини кўрсатувчи типик хроматограмма. Хроматография шароитлари: колонка-YMC-Pack PVA-Sil (поливинил спирти билан боғланган кремний (IV) оксиди, 5 мкм, 250 мм × 2,1 мм и.д.); мобил фаза, ацетонитрил/сув (82,5:17,5) аралашмасида изократик элюирланиш; оқим тезлиги 298 мкл/мин. Колонка ҳарорати 9°С; намуна концентрацияси 200 мкг/мл; колонкага юборилган намуна ҳажми 5,0 мкл. Пиклар 1 = Rf; 2 = Rg1; 3 = Rd; 4 = Re; 5 = Rc; 6 = Rb2; и 7 = Rb1.

Мобил фаза эритувчилари орасида эса гарчи МеОН ёки ТГФлар ҳам

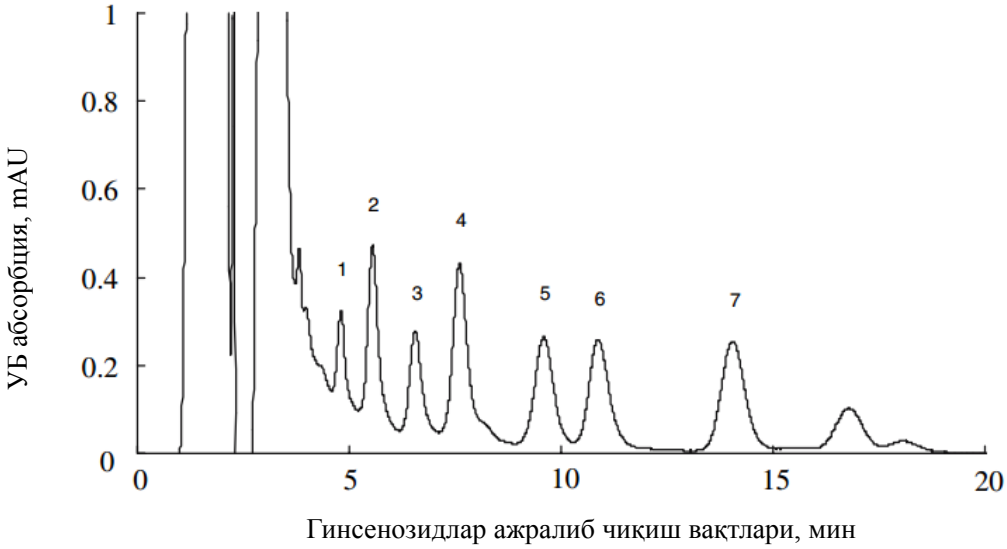
хроматографик тадқиқотлар учун кўп ишлатилсада, MeCN энг муқобил вариант эканлиги аниқланди. Органик модификатор сифатида айнан ушбу эритувчи қўшилганда ПВС ва С18 модификацияланган колонкаларда гинсенозидларнинг энг самарали ажралиши кузатилди. Фақатгина икки хил колонкалар учун MeCN нинг концентрациялари турлича нисбатларда бўлишлиги мақсадга мувофиқлиги аниқланди. Хусусан, ПВС модификацияланган колонка учун MeCN нинг концентрацияси 82,5% ни ташкил этган бўлса (6-расм), С18 модификацияланган колонка учун ушбу эритувчи концентрацияси 35% ни ташкил этди (7-расм).

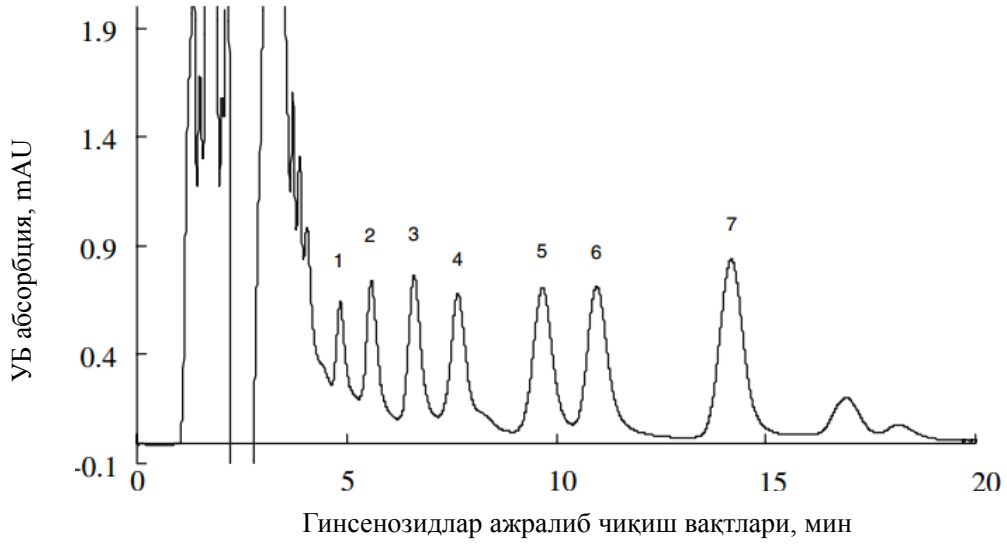
ПВС модификация қилинган колонкадан фарқли ўлароқ, С18 модификация қилинган колонкада етти хил гинсенозидлар стандартлари анча юқори ҳароратда самарали равишда бўлиниши кузатилди. Бунда энг муқобил ҳарорат 60°С эканлиги тажрибалар асосида аниқланди (7-расм).



7-расм. Етти хил гинсенозидлар стандартлари ажралишини кўрсатувчи типик хроматограмма. Хроматография шароитлари: X-PressPak C18S 2,0 мкм, 2,1мм×50 мм и ODS C18, 1,8 мкм, 2,1 мм×50 мм; мобил фаза, ацетонитрил/сув (35:65) аралашмасида изократик элюирланиш; оқим тезлиги 200 мкл/мин. Колонка ҳарорати 60°С; детекция 205 нм; намуна концентрацияси 200 мкг/мл; колонкага юборилган намуна ҳажми 1,0 мкл. Пиклар 1 = Re; 2 = Rg1; 3 = Rf; 4 = Rb1; 5 = Rc; 6 = Rb2; и 7 = Rd.

Мобил фазанинг оқим тезлиги ҳам гинсенозидларнинг самарали тарзда ажралишига таъсир кўрсатувчи яна бир омилларидан бири эканлиги аниқланди. Агар ПВС модификацияланган колонка учун оқим тезлиги 298 мкл/мин ни ташкил этган бўлса, С18 колонка учун бу тезлик 200 мкл/мин ни ташкил этди (6- ҳамда 7- расмлар). Айнан оқим тезликларининг шу кўрсаткичларида колонкаларда гинсенозидлар стандартларининг энг самарали тарзда ажралиши кузатилди.

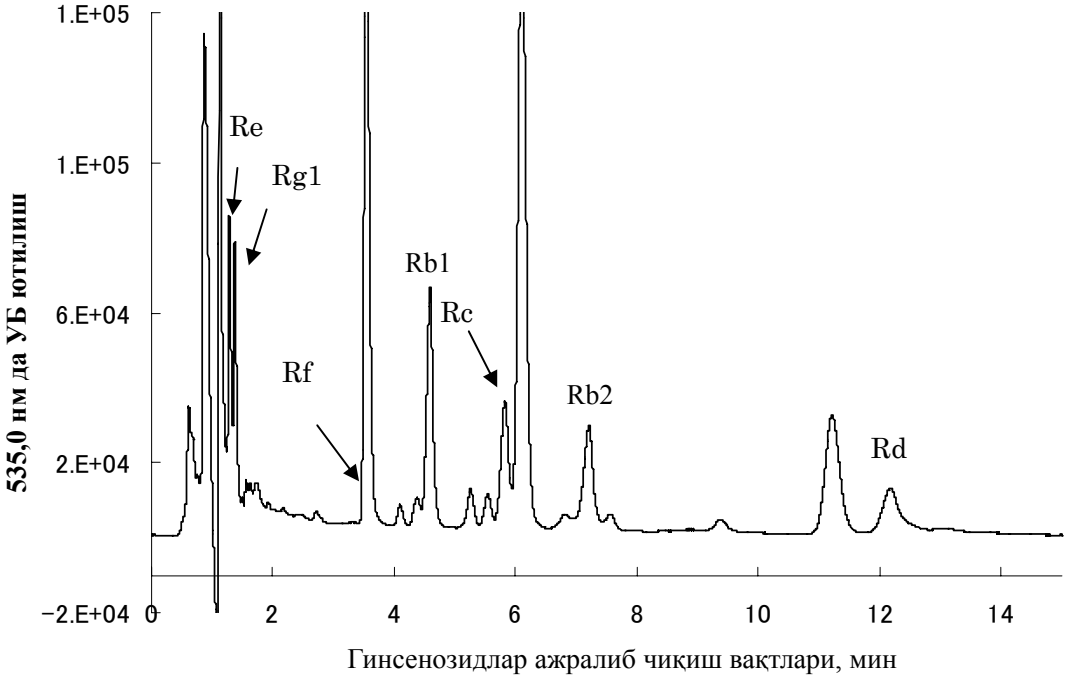




8-расм. Женьшен асосида тайёрланган тижорий маҳсулотларнинг таҳлил хроматограммаси. Хроматографик шароитлар 6-расмдаги каби.

Аввал гинсенозидларнинг стандарт намуналаридан фойдаланиб яратилган усулнинг барча шароитлари топилгач, усулни амалда женьшеннинг турли хил тижорий препаратлари таркибидаги табиий метаболитларини аниқлашда амалий йўлга қўйилди (8- ва 9-расмлар).

Барча хроматографик ажралишлар юқорида тажрибалар асосида топилган муқобил шароитларда, яъни ацетонитрил/сув аралашмасидан иборат бинар мобил фазасидан фойдаланган ҳолда изократик режимда тегишли ҳароратларда амалга оширилди. Гинсенозидлар ажралишини таъминлайдиган ва барча шароитлари муқобиллаштирилган яратилган янги усул кейинчалик женьшен асосида тайёрланган турли хил тижорий маҳсулотлар таркибидаги гинсенозидларни сифат ва миқдорий жиҳатдан таҳлил қилишда амалда муваффақиятли қўлланилди.



9-расм. Женьшен асосида тайёрланган тижорий маҳсулотнинг таҳлил хроматограммаси. Хроматографик шароитлар 7-расмдаги каби.

ХУЛОСАЛАР

1. Ажратиб олинган, қизил пигмент продуцирловчи денгиз бактерияси 1020R штамм деб номланиб, унинг махсус 16S рРНК генига кўра филогенетик тадқиқотлари уни *Pseudoalteromonas* бактерия оиласига мансублигини кўрсатади;

2. Қизил пигментнинг фракцион таркиби юқори самарадор суюқлик хроматографияси усулида ўрганилиб, унинг таркиби камида етти хил кимёвий моддалар мавжудлиги билан изоҳланади;

3. Қизил пигмент таркибидаги Р-2 моддаси индивидуал ҳолда ажратиб олиниб, унинг кимёвий структураси HR-MS ва ЯМР спектроскопия усулларида 2-метил-3-бутилпродигинин эканлиги исботланди;

4. Қизил пигмент таркибидаги Р-4 моддаси индивидуал ҳолда ажратиб олиниб, унинг кимёвий структураси HR-MS ва ЯМР спектроскопия усулларида 2-метил-3-пентилпродигинин (продигиосин) эканлиги исботланди;

5. Қизил пигмент таркибидаги Р-5 моддаси индивидуал ҳолда ажратиб олиниб, унинг кимёвий структураси HR-MS ва ЯМР спектроскопия усулларида 2-метил-3-гексилпродигинин эканлиги исботланди;

6. Қизил пигмент таркибидаги Р-6 моддаси индивидуал ҳолда ажратиб олиниб, унинг кимёвий структураси HR-MS ва ЯМР спектроскопия усулларида 2-метил-3-гептилпродигинин эканлиги исботланди;

7. *Pseudoalteromonas* 1020R ва 520P1 денгиз бактериал штаммлари продуцирлайдиган пигментлар *in vivo* тизими таҳлилларида инсон U937, HL60 ва K562 лейкемия ҳужайраларига цитотоксик таъсир кўрсатиши билан изоҳланади;

8. Апоптотик маркерларни баҳолаш натижалари пигментларнинг U937 лейкемия ҳужайраларига цитотоксик таъсири асосида апоптоз механизми ётишлиги билан исботланади;

9. *in vitro* тизимида *Pseudoalteromonas* 1020R и 520P1 бактериал штаммлари метаболитлари лейкемия ҳужайраларида апоптозни индукцияловчи сабаблар дея эътироф этилган бир қатор сигнал ўтказувчан молекулалар ҳисобланган протеинкиназа ва протеинфосфатаза ферментларига, шунингдек, ДНК фрагментациясини ҳамда каспаза ферментларини фаоллаштириши аниқланди;

10. Юқори самарадор суюқлик хроматографияси усулида женьшен метаболитларини тез ва самарали равишда аниқлаш ва уларни миқдорий жиҳатдан ҳисоблаш имконини берадиган барча шароитлари оптималлаштирилган янги усул яратилиб тавсия этилди. Яратилган янги усул амалда женьшеннинг турли хил тижорий препаратлари таркибидаги табиий метаболитларни аниқлашда амалда қўллаш учун тавсия этилди.

11. Яратилган усулни ишлаб чиқиш учун органик модификаторлар сифатида асетонитрил, метанол, изопропил спирти ва тетрагидрофуран ишлатинилиб, улар орасида асетонитрил поливинил спирт ва октадесилсилан билан модификация қилинган колонкаларда гинсенозидларни ажратиш учун

энг мос эканлигини исботланди.

12. Яратилган усулларда колонка ҳарорати ажралаётган моддаларни колонкаларда ажралишига кучли таъсир кўрсатиши исботланди: поливинил спирти билан модификацияланган колонкада моддалар ажралиши учун 9°С энг муқобил ҳарорат бўлган бўлса, октадесилсилан колонкаси учун бу ҳарорат 60°С ташкил этди.

13. Яратилган янги усулда мобил фаза оқими тезлиги ҳам муҳим омил эканлиги аниқланди: агар поливинил спирти билан модификацияланган колонкада энг муқобил оқим тезлиги 298 мкл/мин ни ташкил этган бўлса, октадесилсиланли колонкада бу тезлик 200 мкл/мин ни ташкил етди.

14. Яратилган янги усуллар ўзининг истеъмол сарфи, соддалиги ва айниқса таҳлил вақтининг қисқалиги бўйича гинсенозидларни классик ажратишнинг мавжуд усулларидан анча устун эканлиги исботланди.

НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК DSc.02/30.12.2019.B.53.01 при ИНСТИТУТЕ ГЕНЕТИКИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

ЦЕНТР ГЕНОМИКИ И БИОИНФОРМАТИКИ АКАДЕМИИ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

СОЛИЕВ АЪЗАМЖОН БАХОДИРОВИЧ

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ И РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

03.00.14 – Геномика, протеомика, биоинформатика
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК (DSc)

Ташкент – 2020

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за №B2017.2.DSc/B46

Диссертационная работа выполнена в Центре геномики и биоинформатики академии наук Республики Узбекистан.

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице Научного совета (www.genetika.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный консультант: **Адылова Азодахон Тешабаевна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Убайдуллаева Хуршида Абдуллаевна**
доктор биологических наук

Мухамедов Рустам Султонович
доктор биологических наук, профессор

Курбанбаев Илхам Джуманазарович
доктор биологических наук

Ведущая организация: **Институт Биоорганической химии АН РУз**

Защита диссертации состоится « 8 » октября 2020 года в 10:00 часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.B.53.01 при Институте генетики и экспериментальной биологии растений (Адрес: 111226, Ташкентская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Актовый зал Института генетики и экспериментальной биологии растений. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz, genetics@uzsci.net, gen@inst.gov.uz.

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института генетики и экспериментальной биологии растений (зарегистрирован за №_____). Адрес: 111226, Ташкентская область, Кибрайский район, п/о Юкори-юз. Актовый зал Института генетики и экспериментальной биологии растений. Тел.: (99871) 264-23-90, факс: (99871) 264-22-30.

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2020 года.

(протокол рассылки №_____ от «_____»_____ 2020 года).

А.А. Нариманов
Председатель Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.с/х.н., проф.

Б.Х. Аманов
Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н.

Ш. Юнусханов
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н., проф.

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. Рост числа заболеваний, угрожающих здоровью людей в мире, привел к росту потребности в новых фармакологических препаратах. В частности, в последние годы снижение влияния существующих фармакологических препаратов на организмы требует поиска своевременного и быстрого анализа новых лекарств. В этом случае обоснование структурной и функциональной способности фармакологически активных веществ, полученных из разных биологических источников, и создание эффективных методов их идентификации имеют важное научно-практическое значение.

В настоящее время в мировой медицинской практике широко используются лекарственные препараты из растений, принадлежащих к семейству женьшеня *Ginseng*. Биологически активные вещества, извлеченные из этих растений, используются в фармацевтической и косметической промышленности в качестве обезболивающих и гипотонических препаратов, а также препаратов для снятия симптомов депрессии. Кроме того, было обнаружено, что микроорганизмы, в частности ряд соединений, выделенных из бактерий, такие как продигиосины, виоласеин и мариномицин, эффективны при лечении рака. В клинических испытаниях были доказаны цитотоксические эффекты продигиосина на более чем шестьдесят раковых клетках. В связи с этим, выделение из бактерий природных соединений, являющихся активным веществом лекарственных препаратов, установление их первичной мишени в механизмах действия на клетки или организм и клеточные структуры; оценка их качества и количества с использованием новых методов; проверка фармакологической активности вещества; разработка новых лекарств на основе отдельных биоактивных веществ имеет первостепенное значение.

В настоящее время в нашей Республике большое внимание уделяется поставке современных лекарственных препаратов в фармацевтическую отрасль, обнаружению и выделению фармацевтически активных веществ из различных биологических источников. В связи с этим, на основе фарм зон, была расширена сырьевая база фармацевтической промышленности, был создан ряд новых препаратов на основе местного растительного сырья, улучшена технология производства новых веществ на основе химического синтеза. В стратегии дальнейшего развития Республики Узбекистан[1] определены задачи «... дальнейшего развития фармацевтической промышленности, предоставления дешевых и высококачественных лекарств населению и медицинским учреждениям». Исходя из этих задач, важно создать новые лекарственные средства, идентифицировать их биологическую активность и повысить эффективность методов быстрого обнаружения фармакологических агентов с помощью аналитических методов.

[1]Указ Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 г. «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан»

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в указах Президента Республики Узбекистан от 3 мая 2017 года УП-5032 о создании свободных экономических зон «Нукус-фарм», «Замин-фарм», «Касансай-фарм», «Сырдарья-фарм», «Байсун-фарм», «Бостанлык-фарм» и «Паркент-фарм», от 7 ноября 2017 года УП-5229 «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью» а также постановлениях Президента от 20 апреля 2017 года ПП-2911 «О мерах по созданию благоприятных условий для ускоренного развития фармацевтической промышленности республики» и от 25 октября 2018 года ПП-3983 «О мерах по ускоренному развитию химической промышленности Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

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

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации[2]. Научные исследования, направленные на поиск, определение и изучение лекарственных средств и природных биологически активных веществ, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, в The University of Tokyo (Япония), University of Illinois at Chicago (UIC) (США), University of Ottawa (UO) (Канада), Kochi University of Technology (Япония), Toyohashi University of Technology (Япония), University of Kyoto (Япония), Pukyong National University (Южная Корея), College of Chemistry, Jilin University (Китай), Shanghai Jiao Tong University (Хитой), Norwegian University of Science and Technology (Норвегия), The University of New South Wales (Австралия), The Institute of Life Sciences (Израиль), University of California at San Diego (США), Институте химии растительных веществ и Институте биоорганической химии (Узбекистан).

В результате исследований в мире по анализу лекарственных средств и идентификации природных биологически активных веществ был получен ряд научных результатов, в том числе: усовершенствованы экспресс методы идентификации естественных метаболитов женьшеня (University of Illinois at Chicago, АҚШ; University of Ottawa, Канада); обоснованы биологические и фармакологические активности гинсенозидов растения женьшень (Jilin University, Китай; Pukyong National University, Южная Корея); проводились исследования по выделению бактерий из морей и океанов, а также по исследованию продуцируемых бактериями биологически активных веществ и установлению их химических структур (Kochi University of Technology,

[2] Комментарий зарубежных научных исследований по теме диссертационной работы основан на данных изwww.elsevier.com, www.springerlink.com, www.sciencedirect.com, www.ncbi.nlm.nih.gov, а также других источников.

Япония); определены фармакологические активности вторичных метаболитов, выделенных из морских бактерий (Pukyong National University, Южная Корея).

В мире по выделению природных биологически активных веществ и применению их в фармацевтической отрасли по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: выявление механизмов внутреннего действия фармакологически активных веществ, синтезирующихся биотехнологическими методами путем манипуляции над микроорганизмами; создание новых инновационных методов быстрого обнаружения вторичных фармакологически активных метаболитов; совершенствование производства натуральных лекарственных средств нового поколения, используемых при лечении хронических заболеваний, и синтез новых фармакологически активных веществ путем генной ассоциации.

Степень изученности проблемы. Ведущие ученые в ведущих зарубежных научных центрах занимались выявлением химического состава и биологической активности гинсенозидов из семейства растений женьшень, а также созданием быстрых и эффективных методов их обнаружения (K. Jinno, Toyohashi University of Technology, Japan). Ряд исследований был проведен по изучению фармакологической активности вторичных метаболитов бактерий, выделенных из океанов и морей (U. Lindequist, Institute of Pharmacy, Германия). Также проводятся исследования по стандартизации лекарственных веществ и субстанций из женьшеня (В.К. Куркин, А.С. Акушская, Самарский государственный университет, Россия)

Многомасштабные исследования по выделению и исследованию фармакологической активности препаратов, выделенных из различных природных биологических объектов, ведутся и в Узбекистане, учеными из институтов ИХРВ и ИБОХ АНРУз (А.И. Исмоилов, Ш.С. Азимова, Н.З. Мамадалиева, А.Д. Матчанов, Д.Н. Далимов, М.Б. Гафуров).

Несмотря на это, в связи с недостаточностью научно-исследовательских работ, проводимых в этой области, поиск, выделение, идентификация и изучение свойств новых кандидатов-фармакологических препаратов с противоопухолевой активностью, а также разработка и усовершенствование новых методов определения лекарственных средств продолжает оставаться актуальной проблемой здравоохранения.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментальных и прикладных проектов Ф5-Т030 «Исследование генома приоритетных сельхозкультур для создания инновационной биотехнологии» Центра геномики и биоинформатики и ППИ-10 «Создание в Узбекистане системы мониторинга допинговых соединений у профессиональных спортсменов», а также проектов 14-035 и 14-051, финансированных Японским Агентством по Науке и Технологиям для

поощрения исследований начальных технологических проектов и Японским фондом по развитию людских ресурсов Японского Международного Центра Сотрудничества.

Целью исследования является выделение 16S гена рибосомальной РНК бактериального штамма, обоснование его фенотипических, генотипических признаков и химической структуры фармакологически активных веществ, полученных из различных биологических источников, определение их биологической активности и создание эффективных методов обнаружения этих веществ.

Задачами исследования являлись:

выделение и молекулярно-генетическая идентификация родовой принадлежности бактериального штамма 1020R, продуцирующего красный пигмент;

выделение 16S гена рибосомальной РНК и определение его нуклеотидной последовательности;

выделение индивидуальных соединений красного пигмента, продуцируемого штаммом 1020R бактерии рода *Pseudoalteromonas,* с помощью жидкостной хроматографии;

структурный анализ индивидуальных компонентов красного пигмента;

исследование действия красного пигмента и его индивидуальных компонентов на процесс пролиферации раковых клеток;

исследование эффекта бактериальных пигментов и их индивидуальных метаболитов в системе *in vivo* и *in vitro* на внутриклеточные молекулы, вовлеченные в апоптоз;

разработка и оптимизация быстрого и эффективного метода определения вторичных метаболитов женьшеня при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления.

Объектами исследования являлись бактериальные штаммы 1020R и 520P1 из рода *Pseudoalteromonas*, а также растения семейства *Panax ginseng* (женьшень).

Предметом исследования являлось проведение филогенетических и генотипических анализов штаммов 1020R и 520R1, принадлежащих к бактериальному семейству *Pseudoalteromonas*, выделение окрашенных метаболитов из бактериальных штаммов, изучить химический состав и биологическую активность выделенных метаболитов, а также оценка содержания основных биологически активных метаболитов растений семейства *Panax ginseng*, разработка эффективных методов выявления этих метаболитов в составе различных препаратов.

Методы исследования. В диссертации использованы классические и модифицированные нами молекулярно-генетические методы анализа ДНК, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектроскопии высокого разрешения и ЯМР спектроскопии, микробиологические методы выделения и размножения бактерий в лабораторных условиях, цитологические, а также определение биологической активности вторичных метаболитов в лейкозных клетках U932, HL-60, K562 и ферментах

сигнальной трансдукции, таких как протеинкиназа и протеинфосфатаза, в условиях *in vivo* и *in vitro* системах.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые для определения штаммов бактерий, продуцирующих красный пигмент, при помощи специально сконструированных праймеров выделен ген 16S рибосомальной РНК и установлена его нуклеотидная последовательность;

впервые исследована гомологичная последовательность гена 16S рибосомальной РНК методом BLAST и показана принадлежность бактериального штамма к семейству *Pseudoalteromonas* в базе данных GenBank;

впервые проведено определение фракционного состава красного пигмента с использованием усовершенствованной нами ВЭЖХ, в результате которого выявлено, что данный метаболит состоит из 7 индивидуальных компонентов;

впервые с помощью методов масс-спектроскопии высокого разрешения (HR-MS) и ЯМР спектроскопии установлены химические структуры компонентов красного пигмента, который представляют гомологичные производные 2-метил-3-пентилпродигинина;

выявлено, что окрашенные метаболиты морских бактерий *Pseudoalteromonas* 1020R и 520P1 обладают цитотоксическим эффектом по отношению к клеткам лейкоза U937, HL60 и K562;

установлено по результатам оценки апоптотических маркеров, что в основе цитотоксического эффекта окрашенных пигментов на лейкозные клетки U937 лежит индукция апоптоза;

обоснован избирательный и селективный ингибирующий эффект окрашенных метаболитов *Pseudoalteromonas* 1020R и 520P1 на ряд протеинкиназ и протеинфосфатаз, участвующих в сигнальной трансдукции в системах *in vitro*;

установлено, что следствием апоптотических механизмов пигментов являются фрагментация геномной ДНК клеток;

выявлено, что следствием апоптотических механизмов пигментов являются активация каспаз, являющиеся протеолитическими ферментами;

определено зависимость биологической активности индивидуальных соединений красного пигмента от длины их боковой алкильной цепи;

разработан и рекомендован быстрый и эффективный метод обнаружения и расчета количественного содержания вторичных метаболитов женьшеня, а также оптимизированы все условия для качественного и количественного разделения гинсенозидов на высокоэффективном жидкостном хроматографе;

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

в общей сложности, восемьдесят пять бактериальных штаммов были выделены и установлено, что тринадцать выделенных бактериальных штаммов продуцируют фиолетовые пигменты, и только один штамм продуцирует красный пигмент;

на основании сиквенса региона, кодирующего 16S рибосомальную РНК,

был выделен бактериальный штамм рода *Pseudoalteromonas*, продуцирующий красный пигмент;

разработаны рекомендации по использованию для фармакологических целей окрашенных пигментов, полученных из штаммов 1020R и 520R1 при раковых заболеваниях;

разработан быстрый и эффективный метод обнаружения и расчета количественного содержания вторичных метаболитов женьшеня на ультра-высокоэффективном жидкостном хроматографе.

Достоверность результатов исследования. Достоверность исследования может быть подтверждена полученными результатами с использованием современных микробиологических, биохимических, физических и молекулярно-биологических методов исследования и соответствием их с теоретическими данными, использованием критериев Стьюдента и дисперсионного анализа Фишера (ANOVA) для статистической обработки, публикацией полученных результатов в международных научно-практических изданиях и внедрением полученных результатов в практику и получением по ним соответствующих заключений.

Научная и практическая значимость полученных результатов. Научная значимость полученных результатов объясняется установлением генотипических и фенотипических признаков бактерии *Pseudoalteromonas*, установлением химических структур бактериальных метаболитов, обоснованием роли ее вторичных метаболитов в жизнедеятельности бактерий и фармакологических свойств, а также разработкой быстрого и эффективного метода обнаружения лекарственных средств;

Практическая значимость полученных результатов объясняется регистрацией 1020R штамма в центре биологических ресурсов Японии, возможностью разработки новых высокоэффективных фармакологических средств на основе окрашенных метаболитов, продуцируемых бактериями, а также практическим применением разработанного хроматографического метода в анализе лекарственных средств.

Внедрение результатов исследований. На основе научных результатов по структурно-функциональным исследованиям фармакологически активных веществ из различных биологических объектов и разработки эффективных методов их определения:

- штамм 1020R был депонирован в Центре биологических ресурсов Национального института технологии и оценки (National Institute of Technology and Evaluation, NITE, Япония) (http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00107707&lang=jp)(NBRC№107707). В результате ученые, исследователи и магистранты со всего мира получили возможность использовать этот бактериальный штамм в своих научных работах;

- результаты исследований бактерий семейства *Pseudoalteromonas* цитированы в более чем 165 научных работах, опубликованных в зарубежных журналах с высоким импакт фактором (*Frontiers in Microbiology*, 2017; 8:

1113, PubMed, IF-4.076; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(9):3841-58, RG, IF- 3.42; *Natural Product Reports* 31(2):160-258, PubMed, IF-11.014 т.д.), которые использованы для химических и количественных характеристик первичных и вторичных метаболитов, а также их антиоксидантной, цитотоксической, противомикробной и противогрибковой активности. Это дало возможность ученым и специалистам получить информацию о химическом составе и биологической активности бактерий семейства *Pseudoalteromonas*;

- результаты исследования гинсенозидов – вторичных метаболитов *Ginseng*, цитированы в более чем 69 научных работах, опубликованных в зарубежных журналах с высоким импакт фактором и PhD диссертации (*Natural Product Reports*, 2011, 28(3):467-97, RG, IF-11.014; *Analytica Chimica Acta*, 2011, 692(1-2):1-25, RG, IF-4.513; *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2010;3:129-50, PubMed, IF-8.833 и т.д.), которые использованы для идентификации гинсенозидов с помощью метода LC-MS и определении биологических свойств компонентов растений в условиях *in vitro*. Это дало возможность получить информацию о составе гинсенозидов, а также их экспресс определения в растениях рода *Ginseng*, используя хроматографические методы;

- результаты исследования метаболитов растений семейства женшень и их экспресс определение методом ВЭЖХ использованы в прикладном проекте М/УЗБ-КНР 09/2016 «Исследование структурных особенностей супрамолекулярных комплексов глицирризиновой кислоты и её производных» для идентификации и определения глицирризиновых соединений и их производных (справка Академии наук РУз 4/1255-2699 от 12 октября 2018 года). Данные научные результаты дали возможность определить и идентифицировать компоненты глицирризиновых соединений и их производных из растений рода лакрицы (солодки);

Апробация результатов исследования. Результаты этих исследований обсуждались на 6, в том числе, 4 международных конференциях и 2 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликованы всего 28 научных работ. Из них 1 монография, 13 научных статей, в том числе 9 в республиканских и 4 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 172 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются

объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

Первая глава диссертации «**Методы анализа биологически активных веществ, выделяемых из природных источников**» посвящена различным хроматографическим методам, используемым при анализе биологически активных веществ. Представлен теоретический материал по отдельным разделам газовой, высокоэффективной жидкостной, планарной хроматографии и другим методам хроматографии. Приведены характеристики современных приборов, созданных на основе или с соединением ВЭЖХ с так называемыми инструментальными методами, такими, как масс-спектрометрия, которые становится рутинными и наиболее широко используемыми приборами современных аналитических лабораторий. Приводятся примеры успешного применения высокоэффективной жидкостной хроматографии для выделения, качественного и количественного анализа биологически активных веществ из различных растений и микроорганизмов, характеристика, свойства, фармакологический потенциал этих соединений и возможные механизмы их действия.

Во-второй главе диссертации **«Выделение и изучение биологически активных веществ из натуральных источников»** представлена подробная информация о выделении и биологической и фармакологической активности биологически активных веществ из природных источников. В ней также представлен обширный обзор и мнения о биологически активных веществах, выделенных из океанических и морских экосистем. Приведена обширная и подробная информация о микроорганизмах, обитающих в океанах и морях, и их вторичных метаболитах, об изучении биологической и фармакологической активности этих веществ и их участии в различных сферах жизни человека. В этой главе также содержится информация о метаболитах растений женьшеня, их использовании в медицине и косметике, а также обзор всемирной работы по контрафактным лекарствам, получаемых на их основе, и мерам их профилактики.

В третьей главе диссертации, озаглавленной «Экспериментальная часть», подробно описаны условия выполнения эксперимента диссертации, химические реагенты, киты и экспериментальные процессы, использованные в диссертации.

В четвертой главе диссертации «Результаты исследований и дискуссий» все исследования диссертации были подробно обсуждены и прокомментированы результаты. В частности, в этой главе подробно описывается таксономическая принадлежность штамма 1020R, продуцирующий красный пигмент, оптимизация метода выделения красного пигмента из штамма, разделения индивидуальных химических соединений пигмента и установление их химической структуры.

Морфологические и биохимические характеристики штамма 1020R были изучены компанией Techno Suraga Co., Ltd. (Шизуока, Япония). Штамм

1020R оказался грамотрицательной бактерией со стержневой морфологией (0,7-0,8×1,5-2,0 мкм).

Для определения бактериальной принадлежности штамма ДНК бактериальной массы экстрагировали с помощью набора QIAamp ДНК Mini Kit (QIAGEN) и далее использовали в реакциях амплификации с использованием различных праймеров. ПЦР-продукты экстрагировали и очищали, используя ПЦР набор для очистки QIAquick (QIAGEN).

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность и Тпл праймеров, использованных для таксономической идентификации бактериального штамма 1020R

Название праймера	Последовательность	Тпл
RV03	5’-aaggaggtgatccagccgca-3’	72
r3L	5’-ttgcgctcgttgcgggact-3’	72
r1L	5’-gtattaccgcggctgctgg-3’	72
FW07	5’-agagtttgatcctggctcag-3’	68
f2L	5’-ccagcagccgcggtaatag-3’	72
f2.2L	5’-tgcgtagagatctgaaggaa-3’	66
f3L	5’-gtcccgcaacgagcgcaac-3’	74

Принимая во внимание исключительно высокое разнообразие типов гена 16S рРНК, принадлежащих микроорганизмам из широкого спектра таксономических категорий, нами в работе было использовано несколько праймерных групп: форвард (FW07) и реверс (RV03), соответствующие позициям с 8 по 27 и с 1542 по 1522 нуклеотида, соответственно, гена 16S рРНК *E. coli*, внутренние, описанные Hiraishi (1992), универсальные для прокариот праймеры – f2L, f3L, r1L, r3L, а также праймер f2.2L, специально разработанный для данного исследования в связи с отсутствием однозначной информации, полученной на основании праймера f2L (табл.1).

По результатам секвенирования региона рибосомального оперона, кодирующего 16S РНК, а также филогенетического анализа с использованием алгоритма «neighbor-joining» установлена принадлежность бактериального штамма 1020R к роду *Pseudoalteromonas* (рис. 1). Он депонирован в Центре биологических ресурсов (National Biological Resource Center (NBRC)) Национального института технологии и оценки (National Institute of Technology and Evaluation, NITE) (Япония), и ему присвоен номер доступа NBRC 107707.

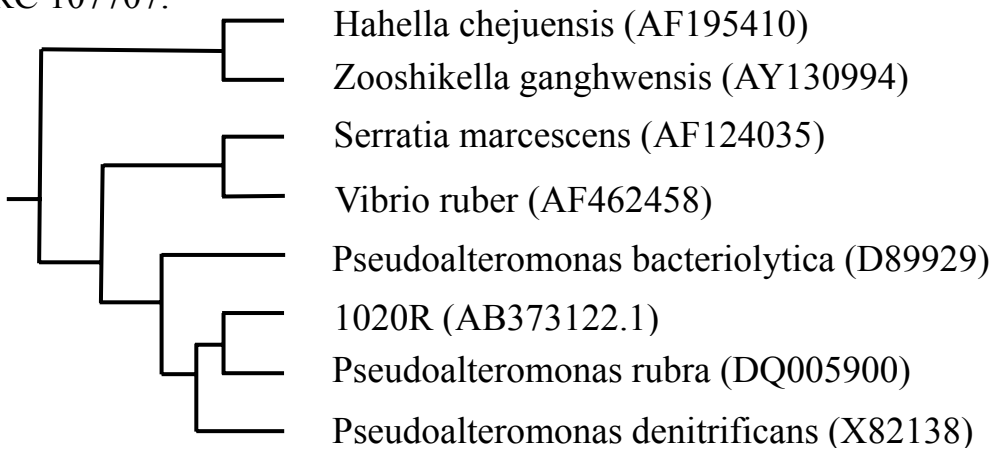


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отражающее степень родства штамма 1020R с другими морскими бактериями. Числа в скобках рядом с названием бактерий указывают на номера доступа в базе данных GenBank.

Для выделения пигментных метаболитов культивирование штамма 1020R проводили сначала в пробирке, содержащий 5 мл LB-SW среды, а затем в 200 мл колбу с LB-SW средой последующим переносом в 500 мл колбу, содержащую 200 мл LB-SW среды для продуцирования красного пигмента. Для получения максимального количества красного пигмента бактерии инкубировали в темноте в течение 7-8 суток при температуре 28°С и pH среды равной 7,0, по истечении которого осуществляли выделение пигмента, причем как из культуральной жидкости, так и самой бактериальной биомассы. Общее количество красного пигмента, выделенного из штамма 1020R, составляло от 4,27 до 14,58±0,45 мг/л.

Проведенные исследования показали, что красный пигмент, продуцируемый штаммом 1020R, содержит, по меньшей мере, семь различных веществ (рис. 2).

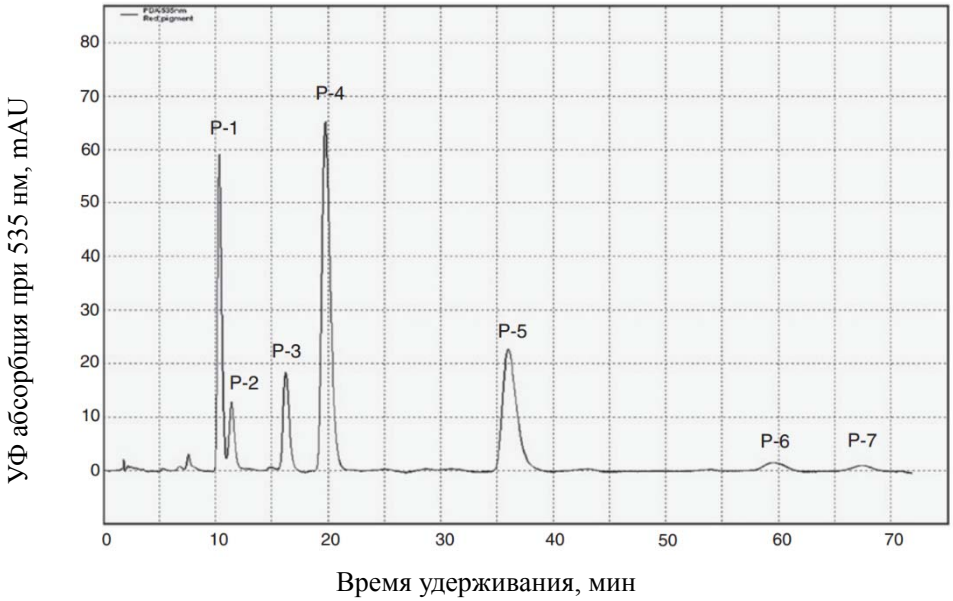


Рис. 2. ВЭЖХ анализ красного пигмента, выделенного из штамма 1020 R. ВЭЖХ система: Shiseido NanospaceSI-2. Хроматографические условия: колонка: ODS CapcellPak C-18 MGII (1,5 мм X 150 мм); мобильная фаза: CH_3OH/H_2O – 50/50 (о/о) + 0.2% CH_3COOH; температура колонки 40°С; скорость потока 100 мкл/мин.

Для структурного исследования экстрагированные пигменты были подвергнуты колоночному разделению сначала с использованием силикагеля, а затем ODS – в качестве стационарной фазы. Для этого, приблизительно 9 мг неочищенного красного пигмента в этаноле сушили на роторном испарителе, растворяли в 5 мл $CHCl_3$ и вводили сначала в колонку (2,5×52 см), заполненную частицами силикагеля (Вакогель С200 или YMC-Gel Silica 12 нм S-150μм), уравновешенного в хлороформе, а затем колоночной хроматографией ODS разделяли на отдельные фракции. Разделение

осуществляли самотеком при скорости потока 5-10 мл/мин. Таким способом добились сбора адекватных количеств пигментов R-2, R-4, R-5 и R-6 для структурных исследований. Виоласеин из морского штамма *Pseudoalteromonas* 520P1 выделили аналогичным путём, как и продигиосины.

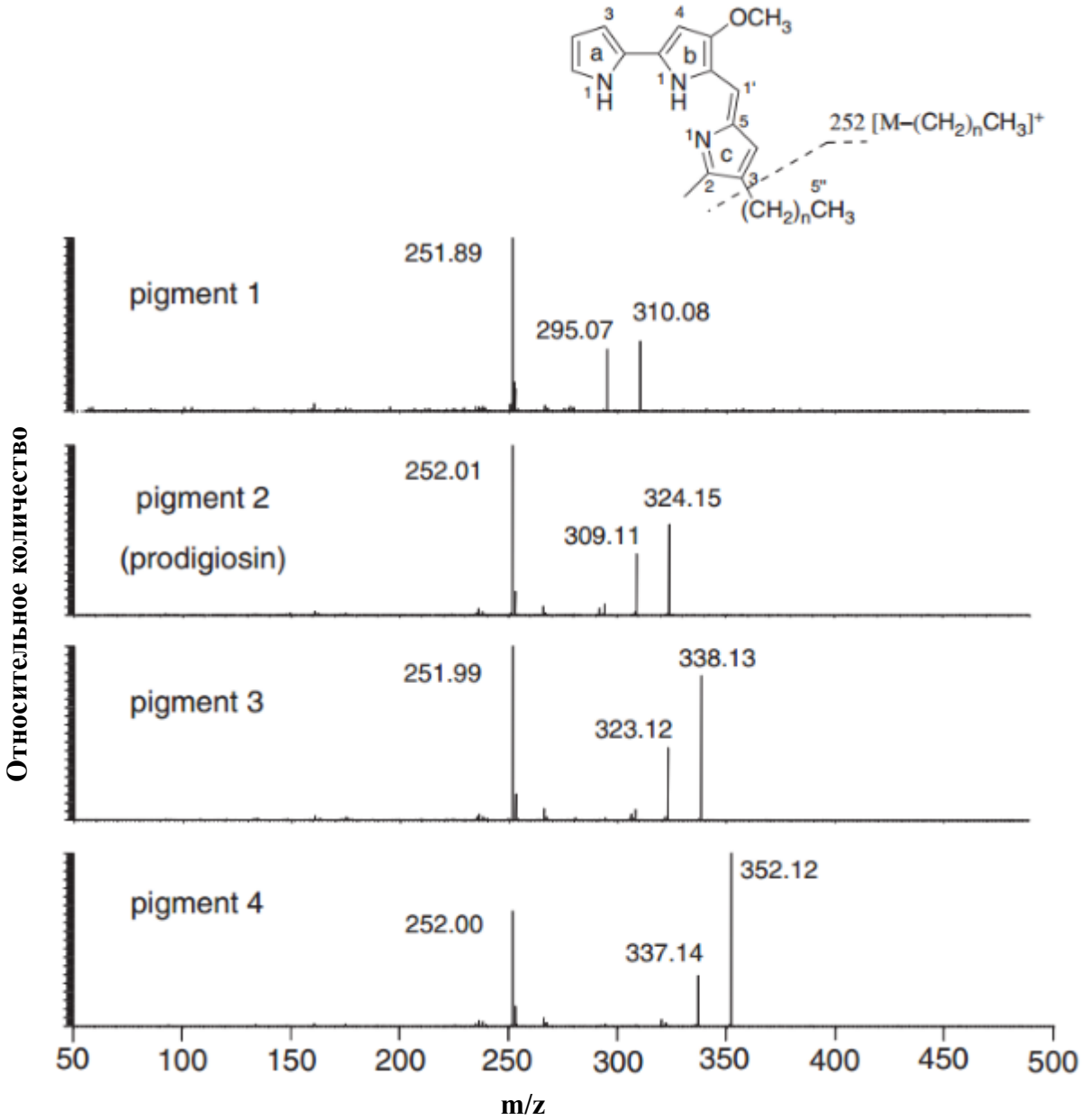


Рис. 3 ESI-FTMS анализ индивидуальных соединений красного пигмента.

Химические структуры выделенных индивидуальных соединений определяли, используя масс-спектрометрический (ESI-FTMS) и ЯМР-спектроскопические методы, включая физические и химические методы, такие как ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, DEPT, HMQC, HMBC, NOESY, COSY и TOCSY. Анализ ESI-FTMS (рис. 3) показал, что все соединения содержали массовый заряд 252 m/z. Этот заряд массы показал, что все соединения могут содержать структуру пирролипиррометена, то есть структуру ядра продигинина.

MS/MS спектры пигментов 2, 4, 5 и 6 соответствуют квазимолекулярным

ионным пикам $[M+H]^+$ фрагментов при *m/z* 295, 310, 338 и 352, соответственно. Ионный фрагмент *m/z* 252, полученный из структуры ядра продигинина, наблюдался во всех пигментах. Кроме того, предполагается, что фрагменты с *m/z* 295, 309, 323 и 337 были получены путем удаления фрагмента CH_3 из метоксильной группы самих пигментов 2, 4, 5 и 6, соответственно (рис. 3). А это свидетельствует о том, что пигменты 2, 4, 5 и 6 имели одинаковый структурный скелет и разные алкильные боковые цепи $(CH_2)_nCH_3$ (n = 3, 4, 5 и 6).

В ^{1}H-ЯМР спектре пигментов 2, 4, 5 и 6 в сильном магнитном поле наблюдалось NH группа, H сигналы шести пиррольных алкалоидов, одной метоксигруппы и протоны пяти групп алкильных цепей.

^{13}C-ЯМР анализы также детектировали присутствие метоксигруппы, которые отличалась от сигналов метильных групп на C-кольце и в алкильной цепи. Окончательный вывод определен из анализа TOCSY, который подтвердил существование метокси и метильных групп, а также протяженность различных алкильных цепей, в C-3 положении, перекрыванием сигналов в 2D-измерении. В ЯМР исследованиях получены следующие сигналы для пигментов 2, 4, 5 и 6. Для пигмента P-2, то есть 2-метил-3-бутилпродигинина: Самые последние данные были получены с помощью анализа TOCSY, который подтвердил наличие метокси и метильных групп и подтвердил, что длина алкильной цепи была равна длине различных углеводородных радикалов путем покрытия 2D-сигналов в состоянии S-3. В исследованиях ЯМР получены следующие сигналы для пигментов 2, 4, 5 и 6. Для комбинации R-2, то есть 2-метил-3-бутилпроджиини:

^{1}**H-ЯМР** (CDCl3, 400 MHz) δ0.93 (3H, t, c4’’), 1.35 (2H, m, H-c3’’), 1.52 (2H, m, H-c2’’), 2.41 (2H, t, H-c1’’), 2.54 (3H, s, CH3), 4.01 (3H, s, H-OCH3), 6.09 (1H, d, H-b4), 6.36 (1H, m, H-a4), 6.69 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.96 (1H, d, H-1’), 7.20 (1H, m, H-a5), 12.72 (brs, H-NH-a), 12.56 (brs, H-NH-b);

^{13}**C-ЯМР** (CDCl3, 101 MHz) δ12.5 (c-CH3), 14.1 (c4’’), 25.1 (c1’’), 32.2 (c2’’), 22.3 (c3’’), 58.7 (OCH3), 92.8 (b4), 111.7 (a4), 116.0 (1’), 117.0 (a3), 121.0 (b2), 123.3 (a2), 125.2(c5), 127.0 (a5), 128.4 (c4), 128.5 (c3), 147.1 (c2), 147.7 (b5), 165.8 (b3).

Для P-4, то есть для 2-метил-3-пентилпродигинина (продигиосина)

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 0.93 (3H, t, H-c5’’), 1.25 (4H, m, H-c3’’, H-c4’’), 1.58 (2H, m, H-c2’’), 2.40 (2H, t, H-c1’’), 2.55 (3H, s, H-c-CH_3), 4.00 (3H, s, H-OCH_3), 6.08 (1H, d, H-b4), 6.34 (1H, m, H-a4), 6.68 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.95 (1H, d, H-1’), 7.27 (1H, m, H-a5), 12.49 (brs, H-NH-a), 12.64 (brs, H-NH-b),

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100MHz) 12.34 (c-CH_3), 13.97 (c5’’), 22.43 (c4’’), 25.25 (c1’’), 29.72 (c2’’), 31.36 (c3’’), 58.72 (OCH_3), 92.84 (b4), 111.66 (a4), 115.90 (1’), 117.04 (a3), 120.64 (b2), 122.17 (a2), 125.07 (c5), 126.80 (a5), 128.30 (c4), 128.37 (c3), 146.77 (c2), 147.64 (b5), 165.71 (b3).

Для P-5, то есть для соединения 2-метил-3-гексилпродигинина:

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 0.89 (3H, t, H-c6”), 1.30 (6H, m, H-c3”, H-c4”, H-c5”), 1.61 (2H, m, H-c2”), 2.38 (2H, t, H-c1”), 2.54 (3H, s, H-c-CH_3), 4.00 (3H, s, H-OCH_3), 6.08 (1H, d, H-b4), 6.33 (1H, m, H-a4), 6.67 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.94 (1H, d, H-1’), 7.27 (1H, m, H-a5), 12.51 (brs, H-NH-a), 12.67 (brs, H-NH-b),

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100MHz) 12.41 (c-CH3), 14.02 (c6”), 22.85 (c5”), 25.61 (c1”), 29.16 (c2”), 30.32 (c3”), 31.90 (c4”), 60.08 (OCH_3), 93.05 (b4), 111.70 (a4), 115.95 (1’), 117.16 (a3), 120.67 (b2), 122.17 (a2), 125.10 (c5), 126.95 (a5), 128.36 (c4), 128.47 (c3), 146.89 (c2), 147.66 (b5), 165.73 (b3).

Для Р-6, то есть для соединения 2-метил-3-гептилпродигинина:

^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$, 300MHz) 6.08 (1H, d, H-b4), 6.35 (1H, m, H-a4), 6.67 (1H, d, H-c4), 6.92 (1H, m, H-a3), 6.94 (1H, d, H-1’), 7.23 (1H, m, H-a5), 12.50 (brs, H-NH-a), 12.70 (brs, H-NH-b).

Стоит особо отметить, что это первая работа по выделению этих соединений из одного микроорганизма и структурному анализу на основе спектроскопического ЯМР.

В наших предыдущих исследованиях были изучены молекулярные механизмы цитотоксического эффекта красных и фиолетовых пигментов, выделенных из штаммов 1020R и 520R1 бактериального семейства *Pseudoalteromonas* и их отдельных соединений, в протеинкиназных и протеинфосфатазных ферментах лейкозных клеточных линий U937, K562 и HL60.

В ходе наших исследований для изучения дополнительных цитотоксических механизмов исследуемых веществ было изучено влияние этих веществ на фрагментацию ДНК (геном клетки).

В наших исследованиях, клетки лейкемии U937 инкубировали с продигиозином, выделяли их ДНК, и исследовали с помощью электрофорезом в агарозном геле, была обнаружена «лестница апоптоза» молекулы ДНК (рис.4). Это означает, что в основе цитотоксического действия пигментов на раковые клетки лежит именно апоптотический процесс. Это связано с тем, что в процессе апоптоза происходит расщепление молекулы ДНК, то есть нуклеосомы. Это в свою очередь показывает формирование набора фрагментов ДНК в виде «лестницы» (рис .4).

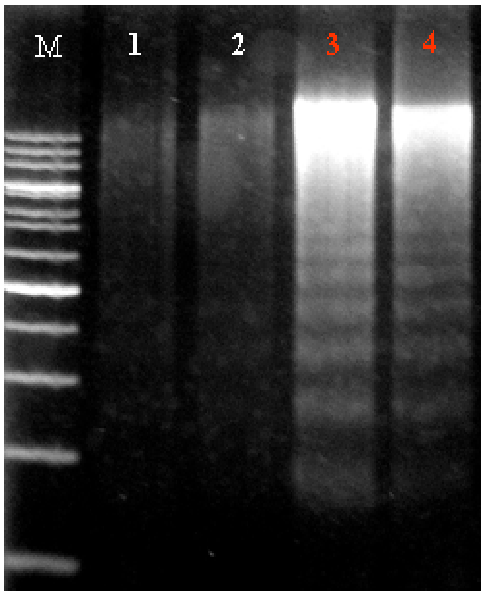


Рис. 4. Пример электрофореграммы, демонстрирующей фрагментацию ДНК в лейкозных клетках U937 под действием продигиосина. М – ДНК-маркер, с шагом по 200 п.о.; 1 – ДНК из необработанных клеток U937; 2 – ДМСО; 3 и 4 – продигиосин (Р-4) при 10 мкМ и 5 мкМ, соответственно.

Возникающая картина связана с тем, что при апоптозе ДНК расщепляется упорядоченно, т.е. между нуклеосомами. Это ведет к накоплению наборов фрагментов ДНК, которые имеют разную подвижность в геле и формируют «лестницу». ДНК нормальных клеток в связи со своей большой массой остается в исходной точке. Виоласеин также вызывает ДНК фрагментацию в U937 лейкозных клеточных линиях. В отличие от продигиосина виоласеин был намного сильнее, вызывая ДНК фрагментацию в концентрации 1 мкМ.

Еще одним важным признаком апоптоза и способом регистрации его является активация каспаз (cysteine-aspartate-proteinase), которая может быть определена количественно при расщеплении специфического субстрата каспаз.

Считается, что каспазы участвуют в разрушении командного центра клетки – ядра: прекращается репликация и репарация ДНК, начинается ее фрагментация. При этом, из дюжины известных высокоспециализированных цистеиновых протеиназ, расщепляющих пептидную связь вслед за аспартатом, каспаза-3 активна только в апоптозных клетках.

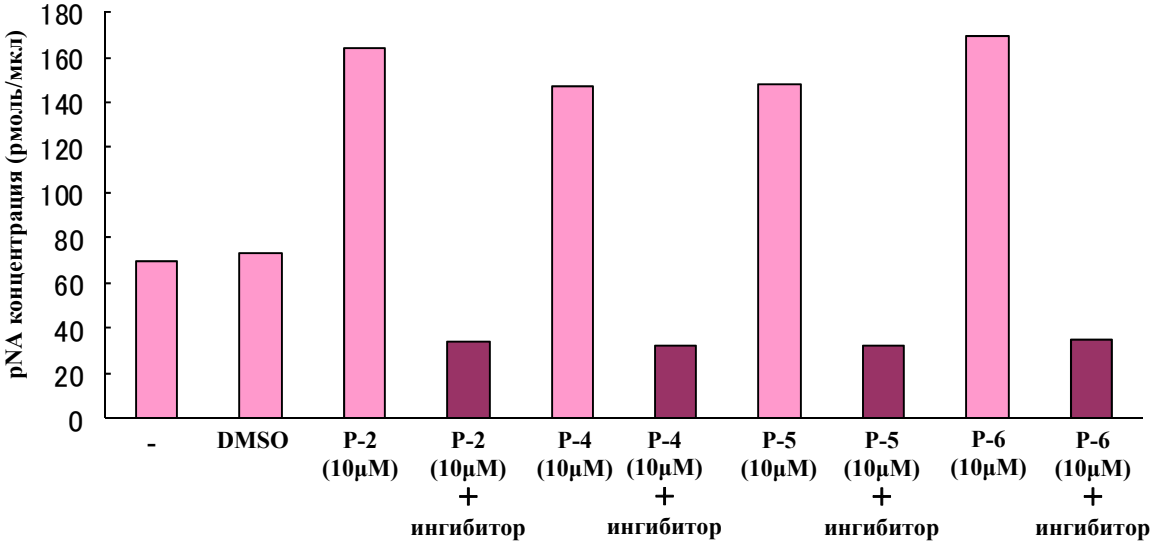


Рис. 5. Влияние индивидуальных соединений красного пигмента (P-2, P-4, P-5 и P-6) на активность каспазы-3 в лейкозных клеточных линиях U937. Ac-DEVD-pNA использовалась в качестве субстрата и Z-VAD-FMK в качестве ингибитора каспазы-3.

Влияние продигининов на активность каспазы-3 мы тестировали на культуре лейкозных клеток U937, которые были инкубированы в течение 24 часов с 10 мкМ каждого из компонента красного пигмента в отсутствии и присутствии (50 мкМ) специфического ингибитора каспазы (рис. 5). Как видно из представленных данных, все индивидуальные соединения красного пигмента обладают способностью повышать активность каспазы-3, которая специфически подавляется при введении в среду культивирования ингибитора каспазы 3.

В разделе диссертации озаглавленной как «**Создание быстрого метода**

обнаружения гинзенозидов», описан разработанный новый метод качественнго и количественного анализа гинзенозидов, являющийся метаболитами женьшеня. В нем для данного ускоренного метода определения гинсенозидов воспользовались двумя типами хроматографических колонок. Это модифицированные колонки для стационарной фазы на основе поливинилспиртом (ПВС) и октадецилсиланом (ОДС). Разница этих двух колонок в том, что ПВС является гидрофильной, тогда как ОДС (С18), наоборот, гидрофобной природы. Соответственно, аналиты разделяемые на этих колонках имеют разные удерживающие факторы.

Основной упор в данном методе был сделан на факторы, которые влияют на хроматографическое разделение гинзенозидов. Экспериментально показано, что такими факторов является состав подвижной фазы и ее соотношение, температура колонки и скорость потока, способствующие эффективному разделению гинсенозидов.

В частности, исследования по определению альтернативных пределов температуры показали, что гинзенозиды хорошо распределялись в хроматографической колонке, модифицированной PVS, при температурах значительно ниже температуры окружающей среды. При этой температуре самая высокая температура составляла 9°С, и при той же температуре было эффективно разделено семь различных стандартов гинзенозидов (рис. 6).

В частности, исследование оптимальных температурных пределов показало, что гинсенозиды хорошо разделяются на колонке с ПВС модифицированной поверхностью при температурных режимах ниже окружающей среды. Самой оптимальной температурой оказалась 9°С, при которой наблюдалось эффективное разделение семи стандартов гинсенозидов (рис. 6).

Хотя MeOH или ТГФ растворителей подвижной фазы широко и используются для хроматографических исследований, было выявлено, что MeCN является наиболее приемлемым вариантом. При применении на ПВС и С18 модифицированных колонках именно MeCN в качестве органического модификатора, гинсенозиды разделяются намного эффективнее. Только концентрация MeCN должны быть разными в различных колонках. Так, если на ПВС модифицированной колонке оптимальной концентрацией MeCN была 82,5% (рис. 6), то для С18 колонки эта концентрация составила 35% (рис. 7).

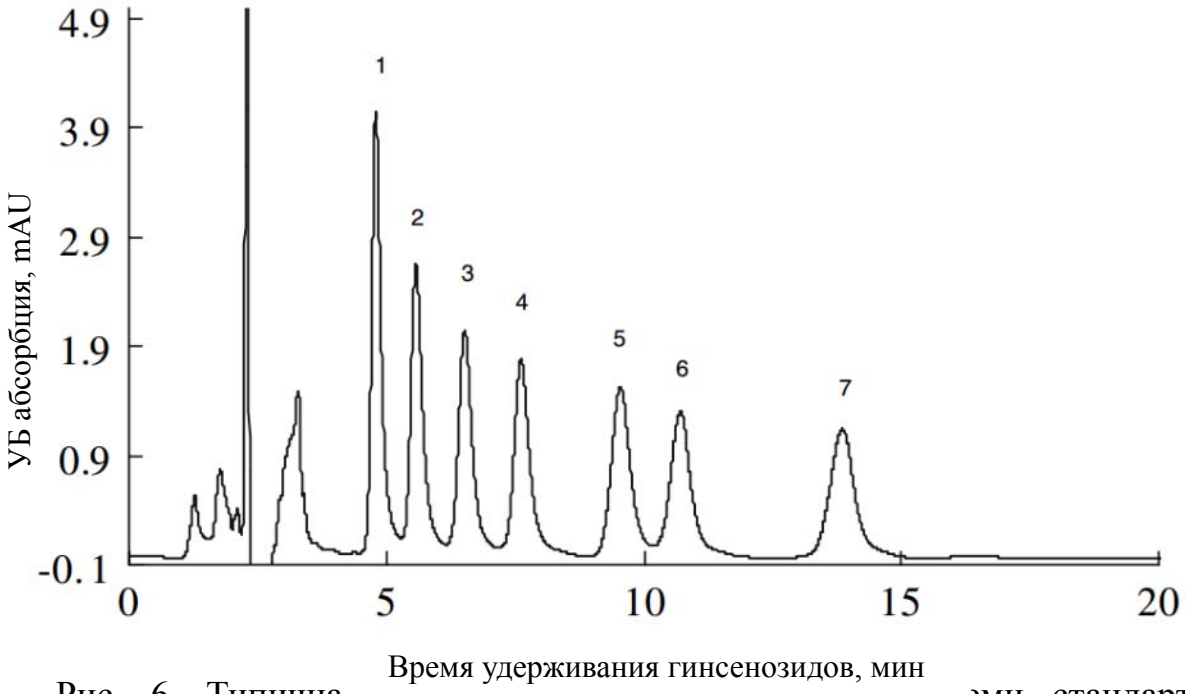


Рис. 6. Типичная хроматограмма для разделения семи стандартов гинсенозидов. Условия хроматографии: колонка-YMC-Pack PVA-Sil (диоксид кремния, связанный поливиниловым спиртом, 5 мкм, 250 мм × 2,1 мм в.д.); Подвижная фаза, изократное элюирование смесью ацетонитрил/вода (82,5:17,5); Скорость потока 298 мкл/мин. Температура колонки 9°C; Концентрация образца 200 мкг/мл; объем вводимого образца 5,0 мкл. Пики 1 = Rf; 2 = Rg1; 3 = Rd; 4 = Re; 5 = Rc; 6 = Rb2; и 7 = Rb1.

В отличие от колонки, модифицированной ПВС, было обнаружено, что семь различных стандартов гинсенозидов более эффективно разделялись в S18 модифицированной колонке. Экспериментально определено, что самой оптимальной температурой оказалась 60°C (рис. 7).

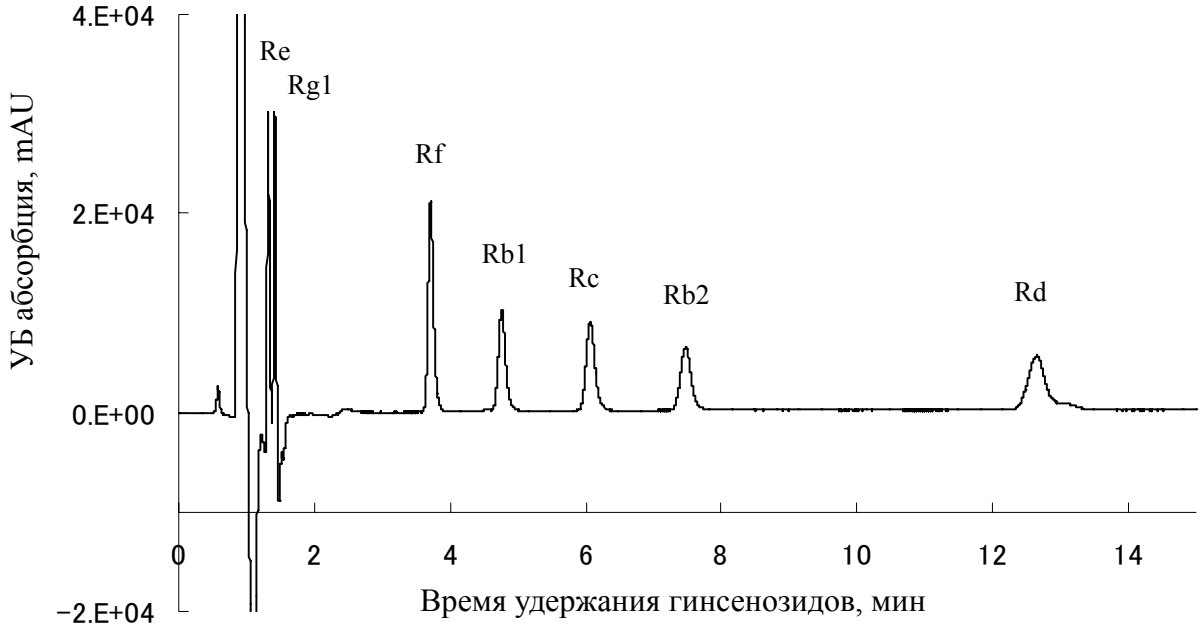
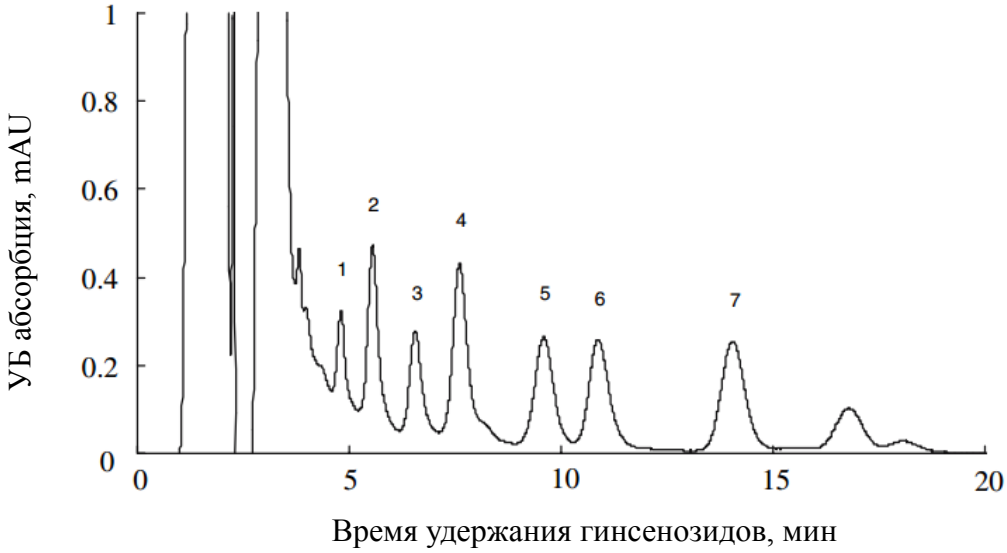


Рис. 7. Типичная хроматограмма для разделения семи стандартов гинсенозидов на С18 модифицированной колонке. Хроматографические условия: колонки- X-PressPak C18S 2,0 мкм, 2,1мм×50 мм и ODS C18, 1,8 мкм, 2,1 мм×50 мм. Мобильная фаза: ацетонитрил/вода – 35:65 (о/о); детекция при 205 нм; температура колонки 60°С; концентрация образца 100 мкг/мл; объем вводимого образца 1,0 мкл; скорость потока – 200 мкл/мин.

Скорость потока мобильной фазы также являлось одним из факторов, влияющих на эффективное разделение гинсенозидов. Если для ПВС модифицированной колонки, который протекает по гидрофильному течению, оптимальной скоростью являлось 298 мкл/мин, то для С18 колонки эта скорость составляло 200 мкл/мин (рис. 6 и 7).



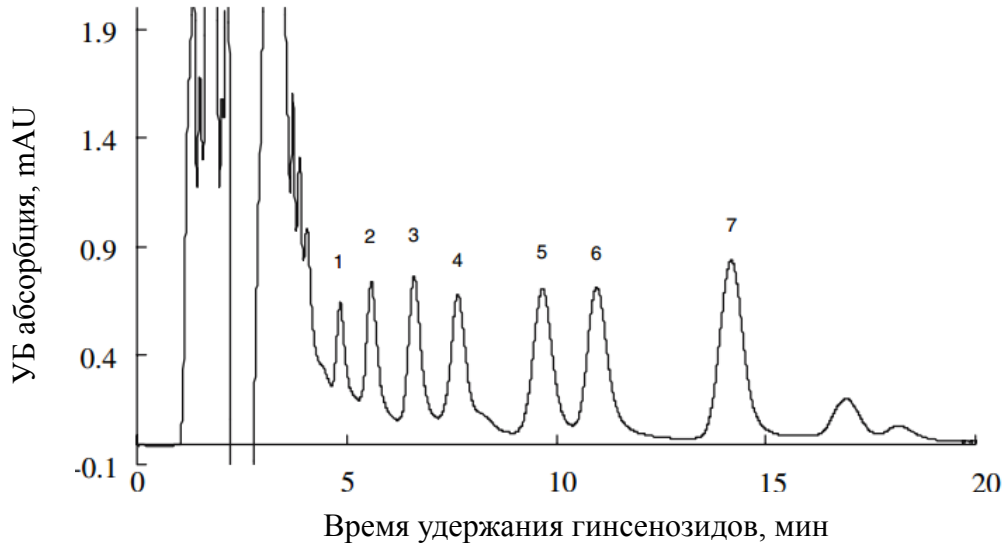


Рис. 8. Хроматографический анализ коммерческого продукта на основе женьшеня. Хроматографические условия, как на рисунке 6.

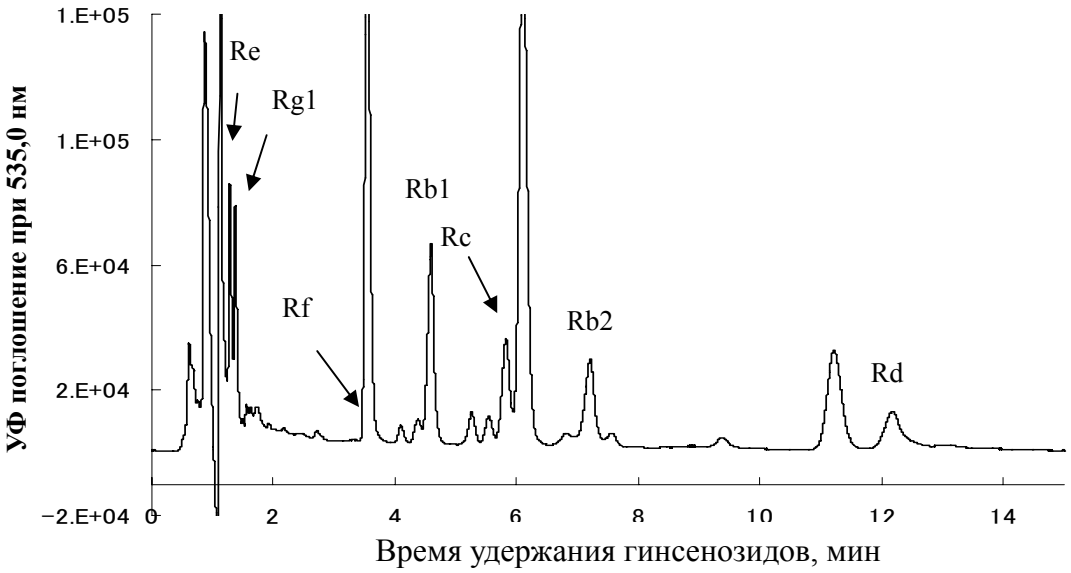


Рис. 9. Хроматографический анализ коммерческого продукта на основе женьшеня. Хроматографические условия, как на рисунке 7.

Описанный новый метод выделения, идентификации, а также качественного и количественного определения метаболитов женьшеня, который, сначала, был апробирован на стандартных образцах гинсенозидов, а затем разработанный метод был внедрен для определения естественных метаболитов женьшеня в различных коммерческих препаратах (рис. 8 и 9).

Все разделения гинсенозидов, выполнены в ранее экспериментально подобранных условиях, то есть проводились с бинарной подвижной фазой, состоящей из смеси ацетонитрил/вода в изократическом режиме элюирования в соответствующих температурных режимах. Новоразработанный метод разделения гинсенозидов и оптимизированные условия были успешно применены для разделения и количественного определения гинсенозидов в различных продуктах женьшеня.

ВЫВОДЫ

1. Выделен штамм морской бактерии, продуцирующий красный пигмент, который на основании филогенетического дерева, построенного по гену 16S рРНК, идентифицирован как *Pseudoalteromonas* 1020R;

2. Проведено определение фракционного состава красного пигмента с использованием усовершенствованной нами ВЭЖХ, в результате которого выявлено, что данный пигмент состоит из 7 индивидуальных метаболитов;

3. Впервые был выделен Р-2 компонент красного пигмента, и с помощью методов масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-MS) и ЯМР спектроскопии идентифицировано, что его химическая структура, представляет собой 2-метил-3-бутилпродигинин;

4. Впервые был выделен Р-4 компонент красного пигмента, и с помощью методов масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-MS) и ЯМР спектроскопии идентифицировано, что его химическая структура,

представляет собой 2-метил-3-пентилпродигинин (продигиосин);

5. Впервые был выделен P-5 компонент красного пигмента, и с помощью методов масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-MS) и ЯМР спектроскопии идентифицировано, что его химическая структура, представляет собой 2-метил-3-гексилпродигинин;

6. Впервые был выделен P-6 компонент красного пигмента, и с помощью методов масс-спектрометрии высокого разрешения (HR-MS) и ЯМР спектроскопии идентифицировано, что его химическая структура, представляет собой 2-метил-3-гептилпродигинин;

7. Выявлено, что окрашенные метаболиты морских бактерий *Pseudoalteromonas* 1020R и 520P1 обладают цитотоксическим эффектом по отношению к клеткам лейкоза U937, HL60 и K562;

8. По результатам оценки апоптотических маркеров доказано, что в основе цитотоксического эффекта окрашенных пигментов на лейкозные клетки U937 лежит индукция апоптоза;

9. В условиях *in vitro* было обнаружено, что метаболиты бактериальных штаммов *Pseudoalteromonas* 1020R и 520R1 активируют протеинкиназные и протеинфосфатазные ферменты, а также ферменты фрагментации ДНК и каспазы, которые представляют собой ряд сигнальных молекул, которые, как известно, вызывают апоптоз в клетках лейкемии;

10. Разработан и рекомендован быстрый и эффективный метод обнаружения и расчета количественного содержания вторичных метаболитов женьшеня, а также оптимизированы все условия для качественного и количественного разделения гинсенозидов на высокоэффективном жидкостном хроматографе. Разработанный метод рекомендован для использования при анализе коммерческих лекарственных препаратов на основе женьшеня.

11. Для разработки метода в качестве органических модификаторов использовали ацетонитрил, метанол, изопропиловый спирт и тетрагидрофуран, среди которых ацетонитрил оказался наиболее подходящим для разделения гинсенозидов как на колонке модифицированного поливинилспиртом так и октадецилсиланом.

12. Было доказано, что температура колонки сильно влияет на разрешение разделяемых веществ: если на колонке модифицированного поливинилспиртом наиболее подходящей температурой оказалась 9°C, то на колонке с октадецилсиланом такой температурой оказалась 60°C.

13. Было также установлено, что скорость потока мобильной фазы является важным фактором при разработке метода. Если на колонке модифицированного поливинилспиртом наиболее подходящей скоростью потока является 298 мкл/мин, то на колонке с октадецилсиланом такой скоростью оказалась 200 мкл/мин.

14. Установлено, что разработанные методы намного превосходит существующие методы классического разделения гинсенозидов с точки зрения потребления расходов, простаты, и в особенности времени анализа.

SCIENTIFIC COUNCIL DSc.02/30.12.2019.B.53.01 ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREES AT THE INSTITUTE OF GENETICS AND PLANT EXPERIMENTAL BIOLOGY

CENTER OF GENOMICS AND BIOINFORMATICS ACADEMY OF SCIENCES OF UZBEKISTAN

SOLIEV AZAMJON BAKHODIROVICH

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATIONS OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM VARIOUS BIOLOGICAL OBJECTS AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE METHODS FOR THEIR DETERMINATION

03.00.14 – Genomics, Proteomics, Bioinformatics
(Biological sciences)

DISSERTATION ABSTRACT
OF THE DOCTOR OF BIOLOGICAL SCIENCES (DSc)

Tashkent – 2020

The title of the doctoral dissertation has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration number of B2017.2.DSc/B46

The doctoral dissertation has been carried out at the Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of Uzbekistan.

The abstract of doctoral dissertation has been written in three languages (Uzbek, Russian and English) (resume) and available online at www.genetika.uz of Scientific Council and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific consultant:	**Adylova Azodakhon Teshabaevna** Doctor of Biological Sciences
Official opponents:	**Ubaydullaeva Khurshida Abdullaevna** Doctor of Biological Sciences
	Mukhamedov Rustam Sultanovich Doctor of Biological Sciences, professor
	Kurbanbaev Ilkham Djumanazarovich Doctor of Biological Sciences
Leading organization:	**Institute of Bioorganic Chemistry Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan**

The defense of the dissertation will take place on « 8 » October 2020 at 10:00 at the meeting of Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.53.01 at the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology. Address: 111226, Tashkent Region, Kibray District, Yukori-yuz, Conference Hall of the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology. Tel.: (+99871) 264-23-90, Fax: (+99871) 264-22-30. E-mail: igebr@academy.uz, genetics@uzsci.net, gen@inst.gov.uz.

The doctoral dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology (with registration No_____ (Address: 111226, Tashkent Region, Kibray District, Yukori-yuz, Conference Hall of the Institute of Genetics and Plant Experimental Biology. Tel.: (+99871) 264-23-90.

Abstract of the dissertation is distributed on «_____»_____ 2020.

Mailing report N_____dated «_____»_____ 2020.

A.A. Narimonov
Chairman of Scientific Council for awarding the scientific degree of Doctor of Sciences; Doctor of Agricultural Sciences, prof.

B.Kh. Amanov
Scientific Secretary of Scientific Council for awarding the scientific degree of Doctor of Sciences, Doctor of Biological Sciences

Sh. Yunuskhanov
Chairman of Scientific Seminar under Scientific Council for awarding the scientific degree of Doctor of Sciences, Doctor of Biological Sciences, prof.

}

INTRODUCTION (abstract of doctor of science (DSc) dissertation)

The aim of the research work was to isolate the 16S gene of the ribosomal RNA of a bacterial strain, substantiate its phenotypic, genotypic characteristics and chemical structure of pharmacologically active substances obtained from various biological sources, determine their biological activity and develop effective methods for detecting these substances.

The object of the research are bacterial strains 1020R and 520P1 from the genus *Pseudoalteromonas*, as well as plants of the *Panax ginseng* family (ginseng).

Scientific novelty of the research is as follows:

for the first time, to identify strains of bacteria producing red pigment, the 16S gene of ribosomal RNA was isolated and its nucleotide sequence was determined using specially designed primers;

for the first time, the homologous sequence of the 16S gene of ribosomal RNA was examined by the BLAST method in the GenBank database and the strain was shown to belong to the *Pseudoalteromonas* family of bacteria;

for the first time, the fractional composition of the red pigment was determined using the developed HPLC method, which revealed that this metabolite consists of 7 individual components;

for the first time, the chemical structure of the red pigment metabolites P-2, P-4, P-5 and P-6 were identified as 2-methyl-3-butylprodiginine, 2-methyl-3-pentylprodiginine, 2-methyl-3-hexylprodiginine and 2-methyl-3-heptylprodiginine using high resolution mass spectroscopy (HR-MS) and NMR spectroscopy methods;

it was found that the pigmented metabolites of the *Pseudoalteromonas* ssp. 1020R and 520P1 strains possess a cytotoxic effect against the human U937, HL60 and K562 leukemia cells;

based on the evaluation of apoptotic markers, it was established that the cytotoxic effect of the pigments on the U937 leukemia cells is due to the induction of apoptosis;

in *in vitro* systems, it was demonstrated that a selective inhibitory effect of the pigmented metabolites of *Pseudoalteromonas* 1020R and 520P1 involve the signal transduction pathway molecules such as protein kinases and protein phosphatases, as well as DNA fragmentation and caspases activation, which cause induction of apoptosis in leukemia cell lines;

the dependence of the biological activity of individual compounds of the red pigment on the length of their side alkyl chain has been established;

Implementation of the research results. On the basis of scientific results on structural and functional studies of pharmacologically active substances from various biological objects and the development of effective methods for their determination:

The strain 1020R was deposited at the National Biological Resource Center (NBRC) of the National Institute of Technology and Evaluation (NITE, Japan)(http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00107707&lang=jp)(accession number NBRC 107707). As a result,

scientists, researchers and graduate students from around the world got access to use this bacterial strain in their scientific work;

The results of studies of bacteria of the *Pseudoalteromonas* family are cited in more than 165 scientific papers published in foreign journals with high impact factor (Frontiers in Microbiology, 2017; 8: 1113, PubMed, IF-4.076; Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98 (9): 3841-58, RG, IF-3.42; Natural Product Reports 31 (2): 160-258, PubMed, IF-11.014 etc.), which are used for the chemical and quantitative characteristics of the primary and secondary metabolites, as well as their antioxidant, cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. This provided an opportunity for scientists and specialists to obtain information about the chemical composition and biological activity of bacteria of the Pseudoalteromonas family;

The results of the study of ginsenosides, secondary metabolites of Ginseng, are cited in more than 69 scientific papers published in foreign journals with high impact factor and PhD thesis (Natural Product Reports, 2011, 28 (3): 467-97, RG, IF-11.014; Analytica Chimica Acta, 2011, 692 (1-2): 1-25, RG, IF-4.513; *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2010;3:129-50, PubMed, IF-8.833, etc.), which are used to identify ginsenosides using LC-MS and to determine the biological properties of plant components *in vitro*. This made it possible to obtain information on the composition of ginsenosides, as well as their rapid determination in plants of the genus Ginseng, using chromatographic methods;

the results of the study of metabolites from the *Ginseng* family plants and their rapid determination by UHPLC were used in the project M/UZB-PRC 09/2016 “Investigation of the structural features of the supramolecular complexes of glycyrrhizic acid and its derivatives” to identify and determine glycyrrhizic compounds and their derivatives (certificate from the Academy of Sciences of Uzbekistan 4/1255-2699 dated October 12, 2018). These scientific results made it possible to determine and identify components of glycyrrhizic compounds and their derivatives from licorice plants.

The structure and volume of the thesis. The structure of the dissertation consists of an introduction, four chapters, conclusions, list of references and appendices. The volume of the thesis is 172 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙҲАТИ

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть, I part)

1. Azamjon B. Soliev, Kakushi Hosokawa, and Keiichi Enomoto, “Bioactive pigments from marine bacteria: Applications and physiological roles,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 670349, 2011. doi:10.1155/2011/670349 (Research Gate (RG), IF – 2.81).

2. Wang, Y., A. Nakajima, K. Hosokawa,A. B.Soliev, I. Osaka, R. Arakawa, and K. Enomoto. Cytotoxic prodigiosin and its analogues from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R isolated from the pacific coast of Japan. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 76 (6), pp. 1229-1232 (2012) (Research Gate (RG), IF – 1.25).

3. Azamjon B. Soliev and Keiichi Enomoto. Antitumor pigments from marine bacteria. In the book “Marine Biomaterials: Isolation, Characterization and Applications,” Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2013, pp. 149-172 (Monography).

4. Azamjon B. Soliev, Kakushi Hosokawa and Keiichi Enomoto. Effects of prodigiosin compounds on the activities of protein phosphatases and protein kinases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015;30(4):533-8. doi: 10.3109/14756366.2014.951347. Epub 2014 Nov 6) (Research Gate (RG), IF 2.50).

5. A.B. Soliev, Y. Saito, K. Jinno, A.T. Adylova, I.Y. Abdurakhmonov. Quantitative determination of ginsenosides in ginseng products by ultra-high performance liquid chromatography. *O’zbekiston biologiya jurnali (Journal of Biology of Uzbekistan)*. Special issue, pp. 75-79 (2016) (03.00.14 Special issue).

6. Hosokawa, K., Soliev, A. B., Kajihara, A., & Enomoto, K. Effects of a microbial pigment violacein on the activities of protein kinases. Cogent Biology (2016), 2: 1259863 (Part of the Taylor & Francis|Routledge Group).

7. Н.К. Олимов, А.А. Мухитдинов, С.Н. Аминов, А.Б. Солиев, А.Д. Матчанов. Идентификация пиридитола в масляном экстракте чеснока методом высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии. *Фармацевтический журнал*, №1, 2018, с. 23-26.

8. Солиев А.Б., Хосокава К., Эномото К., Адылова А.Т. Фракционирование красного пигмента, выделенного из бактериального штамма *Pseudoalteromonas* 1020R. *Узбекский биологический журнал*. №6, 2018, с. 56-62.

9. Солиев А.Б., Хосокава К., Эномото К., Адылова А.Т. Определение родовой принадлежности штамма 1020R, продуцирующего красный пигмент, на основе гена 16S РНК. *Узбекский биологический журнал*, №6, 2018, с. 62-68.

10. Солиев А.Б., Адылова А.Т., Абдурахманов И.Ю., Нормахаматов Н.С. Влияние семейства продигиосиновых соединений из штамма 1020R бактерии рода *Pseudoalteromonas ssp*. на активности протеинфосфатазных и

протеинкиназных ферментов. *Фармацевтический журнал*, №2, 2019, с. 51-57.

11. Солиев А.Б. Разработка ВЭЖХ метода разделения гинсенозидов с использованием поливинил спирт связанной стационарной фазы. *НамДУ илмий ахборотномаси – Научный вестник НамГУ*. №7, 2019, с. 97-104.

12. Солиев А.Б. Разработка и применение новых ВЭЖХ методов определения гинсенозидов с использованием различных хроматографических колонок. *Фармацевтический журнал*, №3, 2019, с. 56-65.

13. Soliev A.B., Adylova A.T., Abdurakhmonov I.Yu., Artikova G.N. Application of HPLC separation method of Ginsenosides on a polyvinylalcohol-bonded stationary phase. *Science and Education in Karakalpakstan*. №4, 2019, p. 19-24.

14. Солиев А.Б., Quiming N., Матчанов А.Д. Выделение гинсенозидов на неподвижной фазе, связанной с поливиниловым спиртом, в хроматографии гидрофильного взаимодействия. *Инфекция, иммунитет и фармакология*. №1, 2020, с.75-88.

II бўлим (II часть, II part)

15. Солиев А.Б., Адылова А.Т., Хосокава К., Эномото К. Влияние бактериального пигмента виоласеина на активность некоторых протеинкиназ. Вестник Туринского политехнического университета в городе Ташкенте (Acta of Turin Polytechnic University in Tashkent), №2, 2018, с. 11-17.

16. Azamjon Soliev, Yoshihiro Saito and Kiyokatsu Jinno. Development of Ginsenosides Separation Using Ultra High Pressure Liquid Chromatography, 68th Annual Conference of The Japan Society for Analytical Chemistry, Utsunomia, Japan, May 18-19, 2007.

17. Kakushi Hosokawa, Azamjon B. Soliev, Aki Kajihara and Keiichi Enomoto. Inhibition of protein kinases by an anti-tumor pigment violacein. The 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Kobe, Japan, December 8-10, 2010.

18. Azamjon B. Soliev and Keiichi Enomoto. Molecular mechanisms of cytotoxicity by prodigiosin and violacein pigments from marine bacteria. The 84th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Kyoto, Japan, September 21-24, 2011.

19. Azamjon B. Soliev and Keiichi Enomoto. Inhibition of protein phosphatases by prodigiosin compounds as a basis for their mechanisms of cytotoxicity. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC). Kochi, Japan, July 13-16, 2012.

20. Солиев А.Б., Адылова А.Т., Абдурахмонов И.Ю. Влияние продигининов на активность каспазы-3. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2016 года, стр. 42-43.

21. Солиев А.Б., Адылова А.Т., Абдурахмонов И.Ю. Ингибирование протеин-фосфатазных ферментов противоопухолевым пигментом виоласеином. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2016 года,

стр. 43-44.

22. Солиев А.Б., Адылова А.Т., Абдурахмонов И.Ю. Ингибирование протеинфосфатазы продигиосин-подобными соединениями в качестве основы для их механизмов цитотоксичности. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2016 года, стр. 45-46.

23. Адылова А.Т., Солиев А.Б., Эномото К. Влияние бактериального пигмента виоласеина на активность некоторых протеинкиназ. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2018 года, стр. 29-30.

24. Солиев А.Б., Эномото К., Адылова А.Т. Выделение индивидуальных метаболитов, продуцируемых бактериальным штаммом *Pseudoalteromonas* 1020R. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2018 года, стр. 158-159.

25. Солиев А.Б., Эномото К., Адылова А.Т. Определение родовой принадлежности бактериального штамма 1020R, на основе гена 16S РНК. Республиканская научная конференция «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии», Ташкент, 18 мая 2018 года, стр. 160-161.

26. Солиев А.Б. Структурные исследования метаболитов красного пигмента, выделенных из морской бактерии *Pseudoalteromonas*. Материалы международной конференции молодых ученых «Наука и инновации». Ташкент, 1 ноября 2019 года, стр. 99-100.

27. Солиев А.Б. Изучение механизма цитотоксичности раковых клеток продигиосиновыми соединениями: анализ активации каспаз. Материалы международной конференции молодых ученых «Наука и инновации». Ташкент, 18 октября 2019 года, стр. 100-102.

28. Солиев А.Б. Изучение механизма цитотоксичности раковых клеток продигиосиновыми соединениями: анализ ДНК фрагментации. Материалы международной конференции молодых ученых «Наука и инновации». Ташкент, 18 октября 2019 года, стр. 102.

Автореферат «Ўзбекистон биология журнали» таҳририятидан ўтказилди ва ўзбек, рус ва инглиз тилларидаги матнларини мослиги текширилди (17.09.2020 кунги №1/9 маълумотнома).

Бичими: 60x84 $^{1}/_{16}$. «Times New Roman» гарнитура, рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табоғи: 9. Адади 70. Буюртма №10.

«Dilorom Biznes» МЧЖ босмахонасида чоп этилди.
Тошкент,Навоий кўчаси, 30а уй.
Тел: +998 97 7610888