

**БОТАНИКА ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.В.39.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

МИРАЛИМОВА ШАХЛО МИРДЖАМОЛОНА

**ЛАКТОБАЦИЛЛАЛАРНИНГ ПРОБИОТИК ВА
БАКТЕРИОЦИНОГЕН ХУСУСИЯТЛАРИ, УЛАР АСОСИДА
ОШҚОЗОН ЯРАСИГА ҚАРШИ ВОСИТА ЯРАТИШ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАН ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

Фан доктори (DSc)
диссертация автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)
Contents of dissertation abstract of doctor of science (DSc)

| | |
|---|----|
| Миралимова Шахло Миржамоловна Лактобациллаларнинг пробиотик ва бактериоциноген хусусиятлари, улар асосида ошқозон ярасига қарши восита яратиш..... | 3 |
| Миралимова Шахло Миржамоловна Пробиотические и бактериоциногенные свойства лактобацилл, создание на их основе противоязвенного средства..... | 27 |
| Miralimova Shakhlo Mirdjamolovna Probiotic and bacteriocinogenic properties of lactobacilli, creation the antiulcer remedy on their base..... | 53 |
| Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works..... | 57 |

**БОТАНИКА ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
Dsc.27.06.2017.B.39.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДАГИ
БИР МАРТАЛИК ИЛМИЙ КЕНГАШ**

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ

МИРАЛИМОВА ШАХЛО МИРДЖАМОЛОНА

**ЛАКТОБАЦИЛЛАЛАРНИНГ ПРОБИОТИК ВА
БАКТЕРИОЦИНОГЕН ХУСУСИЯТЛАРИ, УЛАР АСОСИДА
ОШҚОЗОН ЯРАСИГА ҚАРШИ ВОСИТА ЯРАТИШ**

03.00.04 – Микробиология ва вирусология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАН ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссияси B2017.1.DSc/B10 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертацияси Микробиология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус ва инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.flora-fauna.uz) ҳамда «Ziyonet» ахборот-таълим порталида (www.ziyonet.uz) манзилларига жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:

Турдикулова Шахло Уткуровна
биология фанлари доктори

Расмий оппонентлар:

Гулямова Тошхон Гафуровна
биология фанлари доктори, профессор

Мухамедов Рустам Султанович
биология фанлари доктори, профессор

Нуралиев Неккадам Абдуллаевич
тиббиёт фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот:

Ўсимлик моддалари кимёси институти

Диссертация ҳимояси Ботаника институти, Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги Dsc.27.06.2017.B.39.01 рақамли илмий кенгаш асосидаги бир марталик Илмий кенгашнинг 2017 йил «25» декабр куни соат 10⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100128, Тошкент шаҳри, А.Қодирий кўчаси, 7Б-уй, Микробиология институти мажлислар зали. Тел.: (+998 71) 241-71-29; e-mail: microbio@academy.uz).

Диссертация билан Ботаника институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (24-рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100125, Тошкент шаҳри, Дўрмон йўли кўчаси, 32-уй, Тел.: (+99871) 262-37-95.

Диссертация автореферати 2017 йил «12» декабр куни тарқатилди.
(2017 йил «12» декабр даги 1- рақамли реестр баённомаси).

К.Ш. Тожибаев

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

Б.А. Адиллов

Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.н., катта илмий ходим

Қ.Давронов

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

КИРИШ (фан доктори (DSc) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда антибиотиклардан тиббиёт, ветеринария ва чорвачилик соҳаларида давомли ва айниқса, назоратсиз фойдаланиш инсон ва ҳайвонларда патогенлик қилувчи бактериялар орасида дори воситаларига нисбатан хилма-хил чидамлилиқнинг кенг тарқалишига олиб келмоқда. Айниқса, кўзгатувчиси *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Pseudomonaceae*, *Listeriaceae* каби оилаларига мансуб патоген бактериялар инфекция касалликларини даволашда антибиотиклар самарадорлигининг пасайиши ва кўп ҳолларда йўқолиши янги турдаги антимикроб таъсирга эга моддаларни ажратиш олиш ва амалий тиббиётга жорий этишнинг долзарблигини кўрсатади. Шу муносабат билан, янги бактериоциноген пробиотик микроорганизмларни қидириб топиш ва улар асосида препаратлар ишлаб чиқариш учун янги технологияларни ишлаб чиқиш микробиология, фармацевтика ва ветеринария соҳаларининг долзарб муаммоларидан бири ҳисобланади.

Жаҳонда самарадор препаратлар асосида инфекция касалликларини даволаш ва олдини олишда антибиотикларга альтернатив манба сифати бактериофаглар ва уларнинг ферментлари, эукариот ва прокариот ҳужайраларининг пептидларига алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу ўриндан табиий, одам ва ҳайвонлар учун физиологик фойдали бўлган микроорганизмлардан иборат пробиотиклар алоҳида жой олган бўлиб, пробиотик бактерияларнинг антимикроб потенциалга эга метаболитларини турли инфекция касалликларини олдини олиш ва даволашда кенг қўллаш муҳим аҳамиятга эга. Қуйи молекулали антимикроб пептидлар – бактериоцинлар бошқа сут ачитувчи бактериялар антимикроб метаболитларидан (сут, сирка кислотаси, водород пероксиди) антимикроб таъсирининг спецификлиги ва патоген микроорганизмларга қарши юқори бактерицид фаолликка эгаллиги билан ажралиб туради. Шунга кўра, бактериоцинларга ўхшаш моддаларнинг продуцентлари бўлган сут ачитувчи бактерияларини ажратиш, бактериоцин ҳосил бўлиш жараёнларини оптималлаштириш, юқори терапевтик фаолликка эга, ножўя таъсирлардан холи бўлган ва сезувчан микроорганизмларда резистентлик чақирмайдиган янги антимикроб воситаларни яратиш илмий-амалий аҳамиятга эга.

Республикамиз мустақилликка эришгач маҳаллий фармацевтика саноатини ривожлантириш борасида кенг кўламдаги ислохотлар олиб борилди. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида муайян натижаларга, жумладан, маҳаллий микроорганизмлар штаммлари асосида пробиотик препаратлар яратиш, улардан ошқозон-ичак йўли касалликлари, хусусан диареяни даволашда қўллаш усулларини ишлаб чиқиш бўйича ютуқларга эришилди. Шунингдек пробиотик штаммларини антимикроб пептид ҳосил қилишини аниқлашга етарлича эътибор қаратилмаган. Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирларида¹

¹ Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 ноябрдаги ПФ-5229-сон «Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» Фармони.

«дори воситалари ишлаб чиқариш жараёнига инновацион технологияларни янада жорий этиш учун илмий-тадқиқот ишлари ўтказилишини ташкил этиш ва дори воситаларини ишлаб чиқаришни маҳаллийлаштириш бўйича таклифлар ишлаб чиқиш» вазифалари белгилаб берилган. Ушбу вазифалардан келиб чиққан ҳолда, жумладан, мезофил ва термофил лактобациллаларнинг маҳаллий штамmlарини ажратиш, лактобациллаларнинг бактериоциноген хусусиятларини аниқлаш, ошқозон ярасига қарши лактобациллаларнинг бактериоциноген штамми асосида пробиотик препаратини ишлаб чиқишга қаратилган тадқиқот ишларини ташкил этиш муҳим илмий-амалий аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2006 йил 14 июлдаги ПҚ-416-сон «Маҳаллий дори-дармон ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқарувчиларни қўллаб-қувватлаш чора-тадбирлари тўғрисида»ги қарори, 2017 йил 7 ноябрдаги ПФ-5229-сон «Фармацевтика тармоғини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора-тадбирлари тўғрисида» Фармони ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ равишда бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи². Пробиотик штамmlар асосида дори препаратлари яратишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, University College Cork (Ирландия), North Carolina State University (АҚШ), Norwegian University of Life Sciences (Норвегия), Paris University (Франция), Institute for Microbiology, Toxicology and Histology (Германия), Institute of California Los-Angeles (АҚШ), Sao Paulo University (Бразилия), Korea Food Research Institute (Жанубий Корея), National Food Research Institute (Япония), Canadian Irradiation Centre (Канада), Амалий микробиология ва биотехнология давлат илмий маркази (Россия) ва Микробиология институтида (Ўзбекистон) олиб борилмоқда.

Бактериоциноген сут ачитувчи бактериялар (САБ) ва уларнинг бактериоцинларини ўрганишга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: сут ачитувчи бактериялар бактериоцинларининг замонавий таснифи ишлаб чиқилган (North Carolina State University, АҚШ); сут ачитувчи бактериялар культурал суюқлигидан бактериоцинлар тозалаб олинган ва тавсифланган (Norwegian University of Life Sciences, Норвегия); САБ ажратилган антимиқроб пептидларнинг кимёвий тузилиши ва биологик хоссалари аниқланган (Institute for Microbiology, Toxicology and Histology, Германия); бактериоцинлар экспериментал ҳайвонларда *Listeria monocytogenes*,

² Диссертациянинг мавзуси бўйича илмий тадқиқотлар шарҳи <http://www.works.doklad.ru>, <http://www.km.ru>, www.dissercat.com, [researchget.com](http://www.researchget.com), <http://www.fundamental-research.ru>, www.webofscience.com ва бошқа манбалар асосида ишлаб чиқилган.

Campylobacter jejuni ва бошқа энтеробактериялар каби сезувчан патогенлар ичакни колонизация қилишни камайтириш қобилияти аниқланган. (Canadian Irradiation Centre, Канада); сут ачитувчи бактерияларни озик-овқат саноати, тиббиёт ва ветеринария соҳаларида қўллаш хавфсизлиги асосланган (Амалий микробиология ва биотехнология давлат илмий маркази, Россия).

Дунёда антибиотикларга муқобил бўлган табиий моддалар ажратиш бўйича, қатор, жумладан, қуйидаги устивор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: турли ўсимлик ва микроорганизмлардан антимикроб хусусиятга эга пептидлар ажратиш олиш, антимикроб пептидларни ишлаб чиқаришга жавоб берувчи генларни трансформация қилиш йўли билан рекомбинант штаммлар яратиш ва улардан антимикроб моддалар ажратиш олиш, бактериоцинларни антиоксидант хусусиятларини асослаш ва уларни ўсма касалликларини даволашдаги аҳамиятини аниқлаш ва дори препаратлари ишлаб чиқиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Антимикроб пептид *Lactococcus lactis* томонидан синтезланадиган бактериоцин низинни ҳоссалари ҳорижлик олимлар Delves-Broughton et al. (1996); зайтун, мисо, тузланган қарам, маринадланган бодринг ва ундирилган мош каби ферментацияланган ва ферментацияланмаган сабзавотлар тайёрлашда бактериоциноген САБ лардан ҳимояловчи ва томизғи сифатида фойдаланишни тавсифи Settani ва Corsetti (2008) аниқлашган. САБ ва уларнинг бактериоцинлари қуйидаги олимлар томонидан одам ва ҳайвонлардаги клиник аҳамиятга эга патоген штаммларнинг ўсишига тўсқинлик қилиши аниқланган: шига-токсин ишлаб чиқарувчи *E. coli* (STEC), энтеротоксин *E. coli* (ETEC), метициллинга чидамли *S. aureus* (MRSA), *Agrobacterium* ва *Brenneria* авлодларига мансуб баъзи турлар, ошқозон яраси касаллигини кўзғатувчи *H. pylori* Grinter et.al. (2012), Cotter et.al. (2013); *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella* ва *Yersinia* Cursino et.al. (2006); *Listeria monocytogenes* Corr et.al. (2007); *Campylobacter jejuni* Stern et.al. (2006).

МДҲ мамлакатларида Л.Г. Стоянова (2008) томонидан хужайра инженерияси (протопластлаш, протопластларни қўшиш) ва индукцияланган мутагенез усулларида фойдаланган ҳолда бактериоциннинг фаол продуцентларини олиш методикаси ишлаб чиқилган; Э.А. Светоч ва бошқ. (2007, 2011) сичқонларга *Bacillus anthracis* М-71 юктириб чақирилган Сибирь яраси касаллигини даволашда бактериоцинлардан фойдаланган ва товуклардаги кампилобактериозни даволашда самарадор эканлиги аниқланган; Н.В. Карпов (2017) томонидан *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисининг низин ва педиоцин генини экспрессияловчи трансген штамми олинган.

Ўзбекистонда 1999 йилда сут ачитувчи бактериялар маҳаллий штаммларининг бактериоциноген хоссаларини ўрганиш бўйича тадқиқотлар бошланган. Хусусан, Д.К. Огай, Г.Д. Қутлиева (2001) томонидан *Lactobacillus casei* 925ak нинг культурал суюқлигидан олинган оқсил фракциялари таркибида бактериоцинга ўхшаш моддаларни тутиши

исботланган.

Бироқ бу тадқиқот ишлари лактобациллаларнинг пробиотик ва бактериоциноген хусусиятлари ва улар асосида ошқозон ярасига қарши самарадор восита яратиш бўйича тўлиқ маълумотларни ўзида акс эттирмайди. Шунга кўра, лактобациллаларнинг маҳаллий штамmlарини ажратиш, лактобациллаларнинг пробиотик ва бактериоциноген хусусиятларини аниқлаш, лактобацилла штамmlарини бактериоцинларни ҳосил қилишини ошишига имкон берувчи озуқа муҳитини оптималлаштириш, ошқозон ярасига қарши лактобациллалар бактериоциноген штамми асосида олинган пробиотик препаратни ишлаб чиқиш назарий-амалий аҳамиятга эга.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасаси илмий-тадқиқот ишлари режаси билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-Ф6-Т219 «*Lactobacillus casei* гурухига мансуб маҳаллий штамmlар ҳосил қиладиган бактериоцинга ўхшаш моддаларнинг одам ошқозони ва 12 бармоқли ичак яраси касаллигини кўзгатувчи *Helicobacter pylori* га таъсирини ўрганиш» (2012-2016), И6-ФА-0-15667 «Ярага қарши таъсирга эга «Лактопрополис» ва «Лактопропионикс» биологик фаол кўшимчаларини ишлаб чиқаришни ўзлаштириш ва ташкил этиш» (2014-2015), ФТҚФ-Т.6-16 «Бактериоцин ҳосил қилувчи микроорганизмларни излаш ва улардан озик-овқат саноатида фойдаланиш имкониятларини баҳолаш» (2016-2017) мавзуларидаги фундаментал ва инновация лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади янги пробиотик препаратлар ишлаб чиқиш учун бактериоцинларни самарали продуценти сифатида лактобациллалар имкониятини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

мезофил ва термофил лактобациллаларнинг маҳаллий штамmlарини ажратиш, уларни морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий ва генетик хоссалари асосида идентификация қилиш;

лактобациллаларнинг пробиотик, антимикроб, бактериоциноген ва бошқа биологик хусусиятларини ўрганиш;

ферментация шароитлари ва тадқиқ этилаётган лактобацилла штамmlари бактериоцинларни ҳосил қилишининг ошишига имкон берувчи озуқа муҳитининг таркибий қисmlарини оптимизация қилиш;

ҳайвон моделларида (стерил ва патогенсиз сичқонларда) бактериоциноген лактобациллаларнинг *Helicobacter pylori* эрадикациясидаги самарадорлигини ўрганиш;

ошқозон ярасига қарши лактобациллалар бактериоциноген штамми асосида олинган пробиотик препаратни ишлаб чиқиш ва унинг хавфсизлик мезонларини (ўткир ва сурункали токсиклиги, маҳаллий таъсирловчи таъсири, кумулятив хоссалари, аллергияловчи таъсири йўқлиги ва бошқ.) ўрганиш;

пробиотик препаратнинг терапевтик хоссалари ва специфик фаоллигини

in vivo тажрибаларда экспериментал ҳайвонларда ошқозон ярасини этанолли ва маргимушли моделларини индукциялаш орқали ўрганиш;

«ОРОМ-Биопрепарат» МЧЖ билан ҳамкорликда «Лактопрополис» БФҚ ишлаб чиқиш ва уни сериявий ишлаб чиқаришга доир меъерий-техник ҳужжатларни тасдиқлаш.

Тадқиқотнинг объекти турли табиий манбалар – сут маҳсулотлари, ферментацияланган ўсимлик маҳсулотлари ва соғлом чакалоқлар фекалийсидан ажратиб олинган сут ачитувчи бактериялари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети лактобациллаларнинг бактериоцинларга ўхшаш моддалари, антимиқроб пептид (бактериоцинлар) продуцентларининг биологик ва пробиотик хоссалари, антимиқроб фаоллиги, ярага қарши восита яратиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертацияда микробиологик, хроматография, спектрофотометрия, молекуляр биология, микробиологик назорат, клиникаолди тадқиқот усулларидадан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор сут маҳсулотлари ва ферментацияланган ўсимлик субстратларидан ажратилган *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* каби мезофил лактобациллалар, *L. helveticus*, *L. delbrueckii sp bulgaricus*, *L. amylovorus* каби термофил лактобациллалар маҳаллий штаммларининг бактериоциноген хоссалари исботланган;

лактобациллаларнинг мезофил ва термофил культуралари морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий ва генетик хоссалари асосида идентификацияланган;

илк бор сут ачитувчи бактериялар бактериоциноген фаоллигини ошириш учун озука муҳитининг оптимал таркиби ва ўстириш шароитлари аниқланган ва назоратга нисбатан бактериоцинни ҳосил бўлишини 2,6-4,0 марта ортиши асосланган;

бактериоциноген лактобациллалар пробиотик хоссаларига кўра МУК 4.2.2602-10 мезонларга – ўт ва симулирланган ошқозон ширасига, рН нинг кислотали муҳитига чидамлилиқ, юқори антимиқроб фаоллиқка, ичак ҳужайраларига адгезияланиш қобилиятига мос келиши аниқланган;

илк бор стерил ва патогенсиз сичқон моделларида *in vivo* шароитида *L. rhamnosus 925ak* бактериоцин синтезловчи штамми ва *H. pylori* патогенининг ўзаро таъсири очиқ берилган ва *L. rhamnosus 925ak* киритилганда инфекция юқтирилган сичқонлар ошқозонининг хеликобактер билан колонизацияланиши самарали пасайганлиги ва яллиғланиш даражасининг камайиши аниқланган;

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

прополис компонентлари қўшиш орқали лактобациллаларнинг бактериоциноген маҳаллий штамми, пропион кислота бактерияси асосида «Лактопрополис» биологик фаол озукавий қўшимчанинг илмий-асосланган таркиби ишлаб чиқилган;

«ОРОМ-Биопрепарат» МЧЖ билан ҳамкорликда «Лактопрополис» БФҚни олишнинг саноат технологияси ишлаб чиқилган ва уни серияли

ишлаб чиқаришга доир меъёрий-техник ҳужжатлар Ўзстандарт Агентлигида тасдиқланган;

илк бор *L. rhamnosus 925ak*, *Propionibacterium avidum 1* микроорганизмлари ассоциациясидан иборат, ярага қарши ва регенерацияловчи хоссаларга эга «Лактопрополис» препарати ишлаб чиқилган ва клиник самарадорлиги ҳайвон моделларида исботланган қилинган. Препарат ошқозон-ичак йўлининг яллиғланиши ва яра касалликларида БФҚ сифатида қўллашга тавсия қилинган.

пробиотик хоссаларга эга мезофил лактобациллаларнинг ажратиб олинган ва идентификацияланган штаммлари антимикроб пептид манбаи сифатида, шунингдек функционал овқатланиш маҳсулотлари ва пробиотик препаратлар яратиш учун стартер культура сифатида фойдаланишга тавсиялар ишлаб чиқилган;

стандарт МРС асосида модификацияланган озиқа мухити сут ачитувчи бактерияларни бактериоциноген фаоллигини кучайтириш учун ишлатилмоқда.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. 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 chop этилганлиги ҳамда амалиётга жорий этилганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти сут маҳсулотлари ва ўсимлик маҳсулотларидан бактериоцин синтезловчи сут ачитувчи бактериялар ажратиб олинганлиги, идентификация қилинганлиги ва уларнинг антимикроб хусусиятларини аниқланганлиги, сут ачитувчи бактерияларни бактериоциноген фаоллиги бўйича скрининглаш параметрлари оптималлаштирилганлиги, *L. rhamnosus 925ak* штаммининг антимикроб ва яллиғланишга қарши фаоллигини сичқонлар ошқозони *H. pylori* билан колонизация қилган шароитда асосланганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти лактобактериялар иштирокида ошқозон-ичак йўлининг яллиғланиши ва яра касалликларида регенерацияловчи хоссага эга замонавий янги биопрепаратлар яратиш, ишлаб чиқариш ва уларни қўллаш самарадорлигини оширишга хизмат қилиши билан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Лактобациллаларнинг пробиотик ва бактериоциноген хусусиятлари, улар асосида ошқозон ярасига қарши восита яратиш юзасидан олинган илмий натижалар асосида:

таркибида *L. rhamnosus 925ak*, *P. avidum1* микроорганизмларининг 3:1 нисбатдаги ассоциацияси ва 1% прополисининг қуруқ спиртли экстракти тутган «Лактопрополис» биологик фаол қўшимчасини ишлаб чиқаришга техник шарт «Ўзстандарт» агентлиги томонидан тасдиқланган (TSh

15011021-003:2016). Натижада сут ачитувчи бактериялар ва прополисининг мувофиқ комбинацияси ошқозон-ичак яралари касалликларини даволаш самарадорлигини ошириш ва иммунитетни модуляциялаш имконини берган;

лактобациллалар маҳаллий штаммлари ва прополис экстракти тутган «Лактопрополис» биологик фаол кўшимчасини серияли ишлаб чиқаришга мувофиқлик сертификати олинган (Uz.SMT.01.313.2063756). Натижада маҳаллий хомашёлар асосида ошқозон-ичак яра касалликларини даволаш хусусиятига эга дори препарати яратилиб, ушбу дори препарати ишлаб чиқаришда импорт ўрнини босиш имконини беради;

сут ачитувчи бактериялар шартли-патоген бактерияларга нисбатан антимикроб ва бактериоциноген хусусиятларини аниқлаш учун янги озуқа муҳит таркиби ВА-ФА-А10-006-рақамли “Лактобактериялар асосида одам ошқозон-ичак йўлининг яллиғланиш касалликларини кўзгатувчи микроорганизмларга қарши препарат ишлаб чиқиш» амалий лойиҳасида сут ачитувчи бактерияларни антагонизмининг аниқлашда фойдаланилган (Фанлар академиясининг 2017 йил 5 декабрдаги 4/1255-2571-сон маълумотномаси). Натижада янги озуқа муҳити кенг доирадаги патоген ва шартли-патоген микроорганизмларнинг сут ачитувчи бактериялар ва уларнинг бактериоцинларига сезгирлигини баҳолаш имконини берган;

табiiй манбалардан ажратилган сут ачитувчи маҳаллий бактерия *Lactobacillus rhamnosus* 925-2010 ва *Lactobacillus plantarum* 42 штаммлари республикада етакчи бўлган «Саноат учун муҳим микроорганизмларнинг туплами» ноёб объектига киритилган (Фанлар академиясининг 2017 йил 5 декабрдаги 4/1255-2572-сон маълумотномаси). Штаммлар микроорганизмлар коллекциясининг фондини бойитиш, сут ачитувчи бактериялар хилма-хилликлари бўйича электрон базаси ахборот-таҳлил тизимини шакллантириш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 8 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 25 та илмий иш чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этиш учун тавсия этилган илмий нашрларда 11 та мақола, жумладан, 8 таси республикада ва 3 таси хорижий журналларда нашр қилинган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, олти та боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 187 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида мавзунинг долзарблиги ҳамда зарурияти асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика 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 қилиниши, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Пробиотиклар ва уларни ошқозон-ичак касалликларини даволаш ҳамда олдини олишдаги аҳамияти**» деб номланган биринчи бобида бактериялар пробиотик штаммларининг қўлланилишига доир тадқиқотлар ҳозирги ҳолатининг таҳлили келтирилган, улардан ошқозон-ичак касалликларини даволаш ва олдини олиш, шу жумладан *H. pylori* ни эрадикациялашда қўллашнинг истикболлари кўриб чиқилган, шунингдек сут ачитувчи бактерияларнинг бактериоцинлари, уларнинг таснифи ва қўлланилиши ҳақидаги маълумотлар тақдим этилган.

Диссертациянинг «**Тадқиқотларнинг материал ва услублари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқотларнинг услублари тавсифланган, ишда фойдаланилган микроорганизмлар, асбоблар, ускуналар, таҳлилнинг биологик ва физик-кимёвий услублари келтирилган.

Диссертациянинг «**Бактериоциноген сут ачитувчи бактерияларнинг асосий биологик хусусиятларини аниқлаш ва идентификациялашнинг ўзига хослиги**» деб номланган учинчи боби бактериоцин синтезловчи сут ачитувчи бактерияларни ажратиб олиш, идентификациялаш ва пробиотик хоссаларини ўрганиш, уларнинг антагонистик фаоллик спектрини аниқлашга бағишланган.

Штаммларнинг пробиотик хоссалари NaCl (1-жадвал), ўтнинг турли концентрациялари, pH нинг турли қийматлари (2-жадвал) ва симуляцияланган ошқозон шираси таъсирида тирик қолишига кўра ўрганилган (1-расм). Барча ўрганилган изолятлар мухитдаги NaCl нинг 6.5% га чидамли бўлиб чиқди, бу ерда тирик ҳужайралар микдори 9×10^7 КХБ/млни ташкил этган.

1-жадвал

Лактобациллалар ҳаётчанлигига NaCl турли концентрацияларининг таъсири

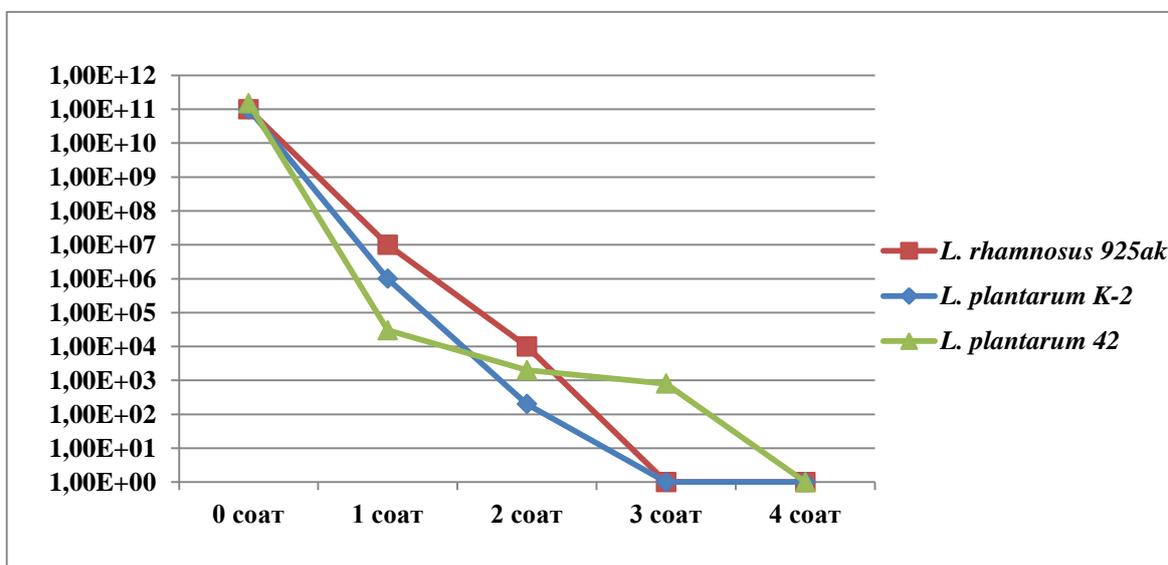
| № | Изолят | МРС-мухитидаги тузнинг концентрацияси | | | | |
|----|---|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 0% | 0.5% | 2% | 4% | 6.5% |
| 1 | <i>Lactobacillus plantarum 42</i> | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 8.3×10^8 | 3.3×10^8 |
| 2 | <i>Lactobacillus plantarum 44</i> | 1.2×10^9 | 1.3×10^9 | 1.2×10^9 | 1.0×10^9 | 7.1×10^8 |
| 3 | <i>Lactobacillus plantarum кан 4</i> | 1.3×10^9 | 1.3×10^9 | 1.2×10^9 | 9.4×10^8 | 9.0×10^7 |
| 4 | <i>Lactobacillus plantarum кан 10</i> | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 1.0×10^9 | 7.5×10^8 |
| 5 | <i>Lactobacillus paracasei 48</i> | 1.3×10^9 | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 8.1×10^8 | 2.4×10^8 |
| 6 | <i>Lactobacillus plantarum K-2</i> | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 1.1×10^9 | 9.6×10^8 | 7.7×10^8 |
| 7 | <i>Lactobacillus rhamnosus 925</i> | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 9.0×10^8 | 1.5×10^8 |
| 8 | <i>Lactobacillus helveticus ИС 1-3</i> | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 9.2×10^8 | 5.8×10^8 |
| 9 | <i>Lactobacillus delbrueckii ИС 1-2</i> | 1.2×10^9 | 1.2×10^9 | 1.1×10^9 | 9.5×10^8 | 8.6×10^8 |
| 10 | <i>Lactobacillus amylovorus ИС 2-7</i> | 1.1×10^9 | 1.1×10^9 | 9.8×10^8 | 9.3×10^8 | 8.3×10^8 |

Изолятлар рН нинг паст қийматларига, шунингдек ўстириш муҳитида ўт мавжудлига сезувчанлигига кўра фаркланди. *L. rhamnosus* 925 кислотали муҳитга энг чидамли деб топилди: рН=6.5 ва 4 да хужайралар ўсиши бир хил бўлди, яъни рН нинг 4 гача пасайиши хужайралар сонига таъсир кўрсатмади ва хужайралар титри 10^9 КХБ/млни ташкил этди. рН нинг 3 ва 2 гача пасайганда муҳитдаги хужайралар сони бир тартибга пасайди ва $5-6 \times 10^8$ КХБ/млни ташкил этди. Муҳитда ўт миқдори 0.2 ва 0.3% бўлиши культуралар ўсишига таъсир кўрсатмади, лекин муҳитда ўт миқдори 0.4% бўлиши хужайралар титрини назоратга нисбатан бир тартибга пасайтирди (2-жадвал).

2-жадвал

МРС-шўрваси рНнинг турли қийматларида ва турли концентрацияда ўт тутилганда лактобацилла хужайраларининг сони

| № | Изолят | хужайралар сони рН да (КХБ/мл) | | | | муҳитда ўт тутилганда хужайралар сони (КХБ/мл) | | | |
|---|------------------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|--|-------------------|-------------------|-----------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 6.5 | 0 | 0.2% | 0.3% | 0.4% |
| 1 | <i>L. rhamnosus</i> 925ak | 5×10^8 | 6×10^8 | 1×10^9 | 1×10^9 | 1×10^9 | 1×10^9 | 1×10^9 | 9×10^8 |
| 2 | <i>L. plantarum</i> 42 | 3×10^7 | 1.5×10^8 | 1×10^9 | 1×10^9 | 1×10^9 | 6×10^8 | 6×10^8 | 6×10^8 |
| 3 | <i>L. plantarum</i> K-2 | 2×10^7 | 4.5×10^8 | 1×10^9 | 1×10^9 | 1×10^9 | 8.5×10^8 | 9×10^8 | 9×10^8 |
| 4 | <i>L. helveticus</i> ИС 1-3 | 2×10^7 | 1×10^7 | 2×10^7 | 9×10^8 | 8.5×10^8 | 7.5×10^6 | 3×10^6 | 8×10^5 |
| 5 | <i>L. delbrueckii</i> ИС 1-2 | 4×10^7 | 1×10^7 | 8×10^7 | 9×10^8 | 9×10^8 | 3×10^6 | 4×10^6 | 6×10^5 |
| 6 | <i>L. amylovorus</i> ИС 2-7 | 4×10^7 | 1×10^7 | 7×10^7 | 9×10^8 | 9×10^8 | 3.5×10^5 | 7.5×10^4 | 3×10^3 |



1-расм. *L. rhamnosus* 925ak, *L. plantarum* K-2 ва *L. plantarum* 42 изолятларининг симуляцияланган ошқозон шираси таъсирида яшовчанлиги

Ўрганилган культуралар орасида *L. plantarum* 42 да симуляцияланган ошқозон ширасига энг юқори чидамлилик кузатилди, дастлабки концентрацияда 15×10^{10} КХБ/мл бўлганда ўт иштирокида ўстирилганда 3 соат давомида яшовчанлигини сақлаб қолди ва тирик хужайралар титри 8×10^2 КХБ/млни ташкил этди. *L. rhamnosus* 925ak да бир мунча пастрок яшовчанлик кузатилди ва ўт иштирокида ўстирилганда 2 соатдан ошмаган

вакт давомида яшовчанлик дастлабки 10×10^{10} концентрациядан 1×10^4 КХБ/мл гача пасайди. *L. plantarum* K-2 да симуляцияланган ошқозон шираси таъсирига энг паст яшовчанлик кузатилди, СОШ да 2 соат мобайнида дастлабки 3×10^{10} КХБ/мл концентрациядан 1×10^4 гача пасайди. 4соатдан кейин СОШ да ҳеч бир изолятнинг тирик хужайраси топилмаган (1-расм).

Култураларнинг антимикроб фаоллигини ўрганишга оид тадқиқотлар кўрсатишича, *L. plantarum* турига мансуб вакиллар энг фаол антагонистлар ҳисобланади – *L. plantarum* 42 *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus morgani*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* нинг ўсишини диаметри 25 ммдан ошиқ ўсиш мавжуд бўлмаган зона ҳосил қилиб фаол пасайтирган; *L. plantarum* 44 *Ps. aeruginosa*, *Pr.morgani*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, *E. coli*, *C. freundii* га қарши кучли антимикроб фаолликка эга бўлиб, ўсиш мавжуд бўлмаган зона диаметри 23 мм дан ортиқни ташкил этган, *L. plantarum* кап 4 *C. freundii*, *Ps. aeruginosa*, *Pr.morgani*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis* га қарши кучли антимикроб фаолликка эга бўлиб, ўсиш мавжуд бўлмаган зона диаметри 23 мм дан ортиқни ташкил этган (3-жадвал).

3-жадвал

Янги ажратилган изолятларнинг антагонистик фаоллиги

| Изолят | Индикатор штаммнинг ўсишини тўхтатиш зонаси диаметри, мм | | | | | | | | | | |
|---|--|----------------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------|
| | <i>C. freundii</i> , 002801/27 | <i>Ps. aeruginosa</i> 003841/114 | <i>Ser. marcescens</i> 367 | <i>Pr.morgani</i> 002810/599 | <i>List. monocytogenes</i> ATCC 1911 | <i>E. faecium</i> 364 | <i>E. coli</i> 002673/477 | <i>C. albicans</i> | <i>E. faecalis</i> OG1FR | <i>S. aureus</i> 003594/wood 46 | <i>H. pylori</i> SSI |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 42 | 35.0± 1.31 | 42.3± 1.99 | 30.0± ±1.99 | 32.7± 1.63 | 18.33± 0.85 | 27.5± 0.38 | 40.67± 1.51 | - | 25.0± 1.29 | 35.7± 1.63 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 44 | 25.33± 1.99 | 33.67 ±0.75 | 20.33 ±0.75 | 30.67± 1.5 | 0 | 26.7± 0.75 | 23.67 ±0.75 | - | 26.8± 0.59 | 18.3± 0.75 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> кап 4 | 33.7± 1.5 | 35.7± 1.57 | 20.6 ±0.23 | 30.0± 1.31 | 0 | 25.0± 0.95 | - | - | 25.7± 0.95 | 15.6± 0.38 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> кап 10 | 17.3± 0.75 | 0 | 12.75 ±0.34 | 25.7± 0.95 | 0 | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> 48 | 25.3± 1.5 | 25.3± 0.75 | 20.33 ±0.54 | 25.3± 0.95 | 0 | - | 15.33 ±0.05 | - | 25.5± 0.46 | 0 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> K-2 | 29.67± 1.5 | 35.67 ±0.99 | >30 | 20.3± 0.95 | 23.3± 0.75 | - | 27.5± 0.38 | 15.4± 0.31 | 25.75 ±0.4 | 15.8± 0.59 | - |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 925ak | 19.3± 0.75 | 15.67 ±0.75 | 10± 0.35 | 25.33± 0.75 | 0 | - | 11.25 ±0.33 | 0 | - | 13.0± 0.65 | 22.8 ±0.48 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> ИС 1-3 | 0 | 15.0± 0.75 | 15.75 ±0.14 | 0 | - | - | 0 | 16.43 ±0.2 | - | 0 | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ИС 1-2 | 0 | 19.0± 0.65 | 0 | 0 | - | - | 25.5± 1.32 | - | - | 30.7± 0.85 | - |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> ИС 2-7 | 0 | 15.5± 0.28 | 18.0± 0.75 | 0 | - | - | 17.3± 0.74 | - | 0 | - | - |

Бундан ташқари, *L. plantarum* K-2 *Ps. aeruginosa*, *Ser. marcescens*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *C. freundii*, *Ent. faecalis* га қарши юқори фаолликка эга бўлиб, ўсиш мавжуд бўлмаган зона диаметри 23 мм дан

ортиқни ташкил этган, *L. plantarum* кан 10 нинг антимикроб фаоллик спектри торроқ, шунга қарамай у *Pr.morganii* (d=25 мм)нинг ўсишини кучли пасайтирган. антимикроб фаоллигига кўра *L. plantarum* 42 *L. paracasei* 48 дан озгина кучсизроқ, кейинги *Ps. aeruginosa*, *Pr.morganii*, *C. freundii*, *Ent. faecalis* ларнинг ўсишини диаметри 23 мм дан ортиқ ўсиш мавжуд бўлмаган зона ҳосил қилиб кучли антагонизм намоён қилган. *L. rhamnosus* 925ак *Pr. morganii* ва *H. pylori* нинг ўсишини кучли пасайтирган, ўсиш мавжуд бўлмаган зона диаметри 25 ва 22 ммни ташкил этган. *L. delbrueckii* ИС 1-2 *E. coli* ва *S. aureus* нинг фаол антагонисти (d=25.5 ва 30 мм) ҳисобланади (3-жадвал).

Текширилган ўнта штамдан бактериоцин ҳосил бўлишига боглиқ антимикроб фаолликни 7 та штам намоён этган: *L. plantarum* 42 нинг антимикроб оксили *E. faecalis*, *E. faecium* ва *List. monocytogenes* га фаол; *L. plantarum* 44 – *Pr. morganii* га фаол; *L. plantarum* K-2 – *S. aureus* ва *List. monocytogenes* га фаол; *L. rhamnosus* 925ак ники – *H. pylori* га нисбатан фаол; *L. helveticus* ИС 1-3 ники – *Ps. aeruginosa*, *Ser. marcescens* га нисбатан фаол; *L. delbrueckii* ИС1-2 ники – *Ps. aeruginosa* га қарши фаол; *L. amylovorus* ИС 2-7 ники – *Ps. aeruginosa* ва *Ser. marcescens* га қарши фаоллиги аниқланди (4-жадвал).

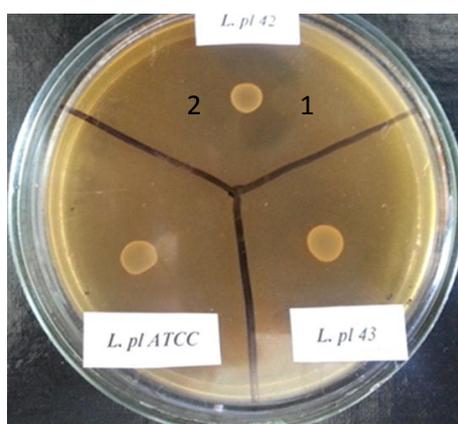
4-жадвал

Баъзи изолятларнинг антимикроб таъсир спектри

| № | Изолят | Бактериоцинга сезувчан микроорганизмлар |
|----|------------------------------|---|
| 1. | <i>L. plantarum</i> 42 | <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>List. monocytogenes</i> |
| 2. | <i>L. plantarum</i> 44 | <i>P. morganii</i> |
| 3. | <i>L. plantarum</i> K-2 | <i>P. morganii</i> , <i>St. aureus</i> , <i>List. monocytogenes</i> |
| 4. | <i>L. rhamnosus</i> 925 | <i>H. pylori</i> |
| 5. | <i>L. helveticus</i> ИС 1-3 | <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ser. marcescens</i> |
| 6. | <i>L. delbrueckii</i> ИС 1-2 | <i>Ps. aeruginosa</i> |
| 7. | <i>L. amylovorus</i> ИС 2-7 | <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ser. marcescens</i> |

Диссертациянинг «Бактериоцинлар синтезини ўрганишга оид» деб номланган тўртинчи бобида лактобактериялар томонидан бактериоцин ишлаб чиқариш жараёнлари бўйича маълумотлар келтирилган.

МРС-агар муҳити лактобациллалар учун селектив бўлганлиги баъзи культураларнинг иккинчи индикатор қаватда ўсишига имкон бермаслиги туфайли МРС озуқа муҳити таркиби биз томонимиздан модификацияланган ва бактериоцин ҳосил бўлишига ёрдам берадиган ва шу билан бирга тест-культуранинг ўсишига тўсқинлик қилмайдиган таркиб танлаб олинган. Бунинг учун стандарт МРС-агар таркибидан твин-80 ва натрий ацетати чиқариб ташланган. Танлаб олинган муҳитда *L. plantarum* 42 нинг *E. faecalis* га қарши антимикроб фаоллиги бактериоцин ҳосил бўлишига боглиқ эканлиги аниқланган, бу протеазалар таъсирида антимикроб фаолликнинг йўқолиши билан тасдиқланган (2-расм).



2-расм. *L. plantarum* 42 нинг *E. faecalis* га қарши антимиқроб фаоллиги:
1 – пепсиннинг таъсир зонаси; 2 – протеиназа-К нинг таъсир зонаси

L. plantarum 42 ва *L. plantarum* K-2 нинг бактериоцинлари максимал даражада тўпланиши учун ўстириш шароитлари танлаб олинган.

Олиб борилган тадқиқотларнинг натижалари шуни кўрсатганки, *L. plantarum* 42 да энг кўп бактериоцин продукцияси 48 соатдан сўнг кузатилган, вақт 60 ва 72 соатга чўзилишида бактериоцин ҳосил бўлиши пасайган. Ўстириш ҳароратига келсак, ферментация ҳароратининг 37°C дан 30°C гача пасайтирилиши бактериоцин ҳосил бўлишига сезиларли таъсир кўрсатмаган (5-жадвал).

5-жадвал

***E. faecalis* индикатор культураси ўсишига *L. plantarum* 42 штаммининг ферментация муддати ва ҳароратининг таъсири**

| Ҳарорат | Ўстириш муддати, соат | | | | |
|---------|-----------------------|--------|---------------|--------|--------|
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 |
| 30°C | 12±0.3 | 15±0.5 | 20±0.5 | 19±0.3 | 18±0.2 |
| 37°C | 13±0.3 | 16±0.6 | 19±0.3 | 19±0.5 | 18±0.5 |

Бактериоцин синтезига турли рН қийматларининг таъсирини ўрганиш шуни кўрсатганки, 6 га тенг бўлган бошланғич муҳит рН и энг оптимал бўлган, бунда индикатор культуранинг ўсишини тўхтатиш зонаси диаметри 19.6 ни ташкил этган, рН 5.0 ва 7.0 да бактериоцин синтези бирмунча камайган ва индикатор культуранинг ўсишини тўхтатиш зонаси диаметри тегишлича 17.6 ва 17.8 ммни ташкил этган. 5 дан паст рН да бактериоцин ҳосил бўлиши кузатилмаган, рН8 да бактериоцин синтези сезиларли камайган ва тест- культуранинг ўсишини тўхтатиш зонаси диаметри 12.2 ммни ташкил этган (6-жадвал).

6-жадвал

***L. plantarum* 42 штаммининг бактериоцин ҳосил қилишига муҳит рН нинг таъсири**

| МРС озуқа муҳити рН | Ўсиш мавжуд бўлмаган зона диаметри, мм |
|---------------------|--|
| 4.0 | - |
| 5.0 | 17.6±0.52 |
| 6.0 | 19.6±0.31 |
| 7.0 | 17.8±0.48 |
| 8.0 | 12.2±0.26 |

Бактериоцин ҳосил бўлишига ҳарорат ва рН дан ташқари озуқа муҳити таркиби катта таъсир кўрсатади [Todorov S. D., Dicks L. M. T., 2005]. Биз томонимиздан *L. plantarum* K-2 ва *L. plantarum* 42 культураларининг бактериоцин ҳосил қилиш фаоллиги биз модификациялаган МРС-муҳитларида ўрганилган (7-жадвал).

L. plantarum K-2 культурасининг бактериоцин ҳосил қилиш фаоллиги озуқа муҳити таркибида твин-80 тутилганда твин-80 бўлмаган муҳитга нисбатан 30% га ошган. Азотнинг ягона манбаси сифатида триптон (20 г/л) кўшилиши бактериоциннинг фаоллигини 800 АУ гача оширган, бу фаолликни стандарт МРС-муҳитга нисбатан 2.6 мартага оширган. Ягона углевод манбаи сифатида манноза *L. plantarum* 42 нинг супернатантида концентрламасдан туриб бактериоциннинг ҳосил бўлиши топилишига имкон яратган. Стандарт МРС-шўрвасида глюкозани маннозага алмаштирмай туриб бактериоцин фаоллигини топиш учун супернатантни 4 мартагача концентрлаш зарурлигини ҳисобга олганда, маннозали МРС-шўрваси бактериоцин ҳосил бўлишини 4 мартагача орттирган.

7-жадвал

***L. plantarum* K-2 ва *L. plantarum* 42 бактериоцинининг фаоллигига органик азот, углеводлар ва калийнинг таъсири**

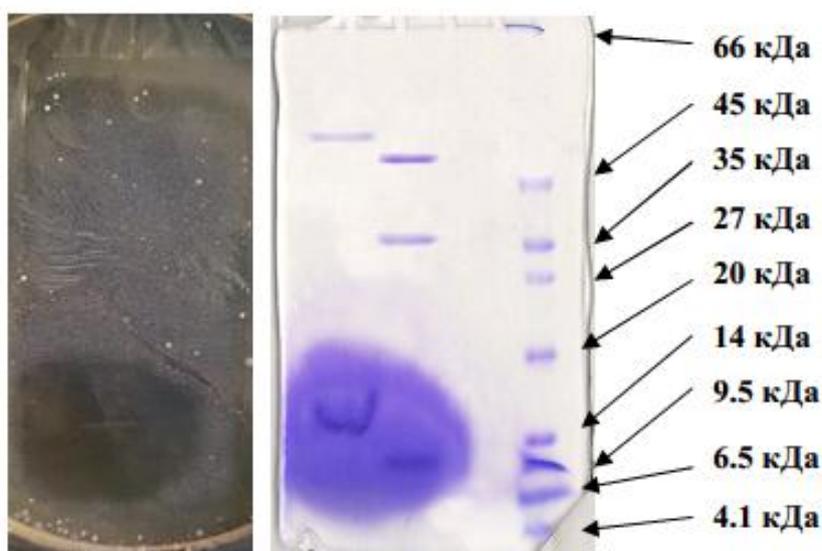
| № | Компонент | Концентрация (г/л) | Фаоллик (АУ/мл) | |
|-----|---|--------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | <i>L. plantarum</i> K-2 | <i>L. plantarum</i> 42 |
| 1. | Стандарт МРС | | 300 | - |
| 2. | Твинсиз МРС | | 200 | - |
| 3. | Триптон | 20.0 | 800 | - |
| 4. | Триптон + гўшт экстракти | 12.5 + 7.5 | 150 | - |
| 5. | Триптон + ачитқи экстракти | 12.5 + 7.5 | 100 | - |
| 6. | Триптон + гўшт экстракти + ачитқи экстракти | 10.0 + 5.0 + 5.0 | 400 | - |
| 7. | Мальтоза | 20.0 | 100 | - |
| 8. | Манноза | 40.0 | 300 | 100 |
| 9. | K ₂ HPO ₄ | 2.0 | 150 | - |
| 9. | KH ₂ PO ₄ | 2.0 | 150 | - |
| 10. | KH ₂ PO ₄ | 40.0 | - | - |

Бактериоциннинг молекуляр массасини 15% полиакриламид гелида оксилларни ажратиш йўли билан ўрганилган. Оксилларни ажратиш бир вақтнинг ўзида иккита аналогик гельда олиб борилган, улардан бири Кумасси бўйича бўялган, иккинчисига эса *List. monocytogenes* индикатор культураси қавати қуйилган. Қопланган гельда *L. plantarum* K-2 даги 9.5 кДа ва *L. plantarum* 42 даги 15 кДа молекуляр массага мос участкаларда индикатор культуранинг ўсиши йўқ зоналари кузатилган (3-расм).

Диссертациянинг «*L. rhamnosus* 925ak нинг *H. pylori*нинг колонизациясига ва ошқозон шиллиқ қавати яллиғланишига таъсири» деб номланган бешинчи бобда *H. pylori* билан касалланган сичқонларда *L. rhamnosus* ларнинг даволашдаги аҳамияти бўйича маълумотлар келтирилган.

Стерил сичқонларда олиб борилган тажрибаларга 3 гуруҳга бўлинган 36 та сичқон жалб этилган (8-жадвал).

Тажриба бошлаганидан 1 ва 2 ой ўтганидан сўнг *H. pylori* нинг колонизациясини баҳолаш микдорий ПЦР-таҳлилидан фойдаланган ҳолда ва тажриба ҳайвонларининг шиллиқ қаватини гистопатологик баҳолаш давомида олиб борилган.



3-расм. *L. plantarum* K-2 ва *L. plantarum* 42 бактериоцинларининг Tricine-SDS PAGE:

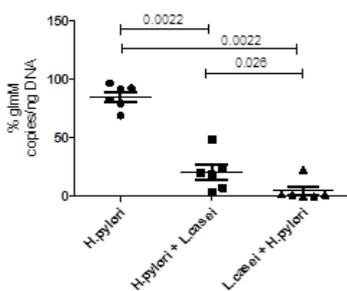
а – *L. plantarum* 42 йиғинди оксиллари куруқ экстракти пептидларининг *L. monocytogenes* ATCC нинг ўсишини тўхтатиш бактерицид зонаси; б – *L. plantarum* K-2 штамми супернатанти пептидларининг *L. monocytogenes* ATCC нинг ўсишини тўхтатиш бактерицид зонаси; с – *L. plantarum* 42 йиғинди оксиллари куруқ экстрактининг Кумасси бўйича бўялган пептидлари; д – *L. plantarum* K-2 штамми супернатантининг Кумасси бўйича бўялган пептидлари; е – молекуляр масса маркери.

Стерил сичқонларнинг тажриба гуруҳлари

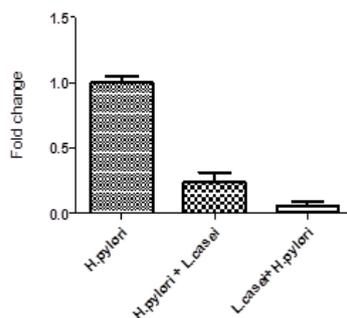
| Гуруҳ № | Тавсифи | Сичқонлар сони |
|---------|---|----------------|
| 1-гуруҳ | <i>H. pylori</i> юктирилган ва даволанмай қолдирилган | 12 сичқон |
| 2-гуруҳ | <i>H. pylori</i> юктирилган ва кейинчалик <i>L.rhamnosus 925ak</i> билан даволанган | 12 сичқон |
| 3-гуруҳ | олдиндан бир марта <i>L.rhamnosus 925ak</i> қабул қилган | 12 сичқон |

H. pylori юктирилган сичқонлар (назорат гуруҳи) ошқозонида бактерияларнинг умумий сони 1 ойдан кейин энг кам бўлган (ўртача 3.8 нусха 16S rRNA/1 нг ДНК), ва энг кўп миқдор бутун тажриба давомида *L. rhamnosus 925ak* нинг сувдаги суспензияси билан даволанган гуруҳда топилган (2-гуруҳи) (45 нусха 16S rRNA/нг ДНК). *H. pylori* юктиришдан олдин бир марта *L. rhamnosus 925ak* қабул қилган гуруҳда (3-гуруҳ) бактерияларнинг умумий миқдори ўртача 16S rRNA/нг ДНК нинг 15.2 нусхасига тенг бўлган (4-расм).

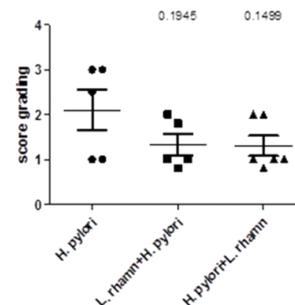
GF сичқонлар ошқозонидаги
H. pylori миқдори



H. pylori миқдорининг бактериялар
умумий сонига нисбатан пасайиши

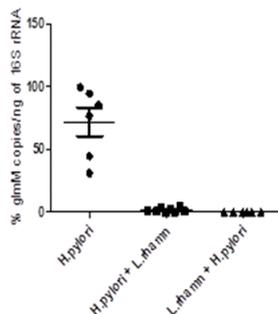


GF сичқонлар ошқозонидаги
яллиғланиш даражаси

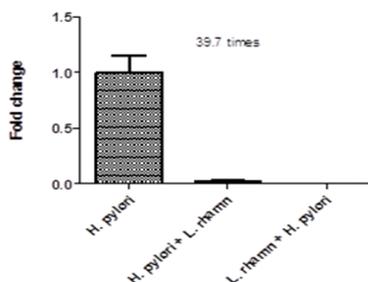


юқтиргандан 1 ой кейин

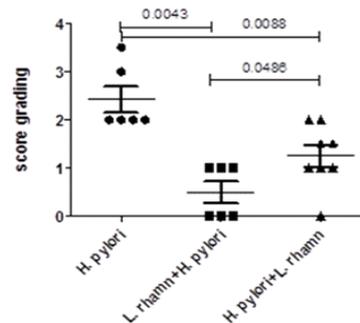
GF сичқонлар ошқозонидаги
H. pylori миқдори



H. pylori миқдорининг бактериялар
умумий сонига нисбатан пасайиши



GF сичқонлар ошқозонидаги
яллиғланиш даражаси



юқтиргандан 2 ой кейин

4-расм. Инфекция юқтиргандан 1 ва 2 ойдан кейин стерил сичқонлар ошқозони шиллиқ қаватининг бактериал колонизацияси ва яллиғланиш даражаси

Назорат гуруҳида шиллиқ қаватида *H. pylori* нинг фоиз миқдори 85%, 2-гуруҳда – 20% ва учинчи гуруҳда 4.4% бўлган. Шундай қилиб, тажриба бошланганидан 1 ойдан кейин ошқозон шиллиқ қаватида *H. pylori* нинг фоиз миқдори *L. rhamnosus 925ak* билан даволанган сичқонлар гуруҳида назоратга нисбатан 4.2 марта, *L. rhamnosus 925ak* инфекциядан олдин берилган гуруҳда – 20 мартагача камайган.

Тажриба бошланганидан 2 ойдан кейин ҳар иккала тажриба гуруҳларида ДНК миқдори назоратга нисбатан паст бўлган (тегишлича назорат, биринчи ва иккинчи гуруҳларда 72.2%, 1.8% ва 0.03%). *H. pylori* нинг фоиз миқдори 85%, 2-гуруҳда – 20% ва учинчи гуруҳда 4.4% бўлган. *H. pylori* нинг фоиз миқдори 2- гуруҳда назоратга нисбатан 39.7 марта, 3-гуруҳда *H. pylori* ДНК си 6 тадан 2 та ҳайвондагина топилган ва фоиз миқдори назоратга нисбатан 6983 марта паст бўлган. Ушбу вақт интервалида ошқозон шиллиқ қаватида *L. rhamnosus 925ak* нинг фоиз миқдори иккинчи гуруҳда 3-гуруҳга нисбатан юқори бўлган ва тегишлича 90.5% ва 74.2% ни ташкил этган.

Шундай қилиб, стерил сичқонларда *H. pylori* эрадикацияси лактобациллалар киритилганида даволаш бошланганидан 2 ой кейин, лактобациллаларни олдиндан киритганда эрадикация ва инфекция ножўя таъсирларини бартараф этиш тезроқ амалга ошиши кузатилиши кўрсатиб берилган.

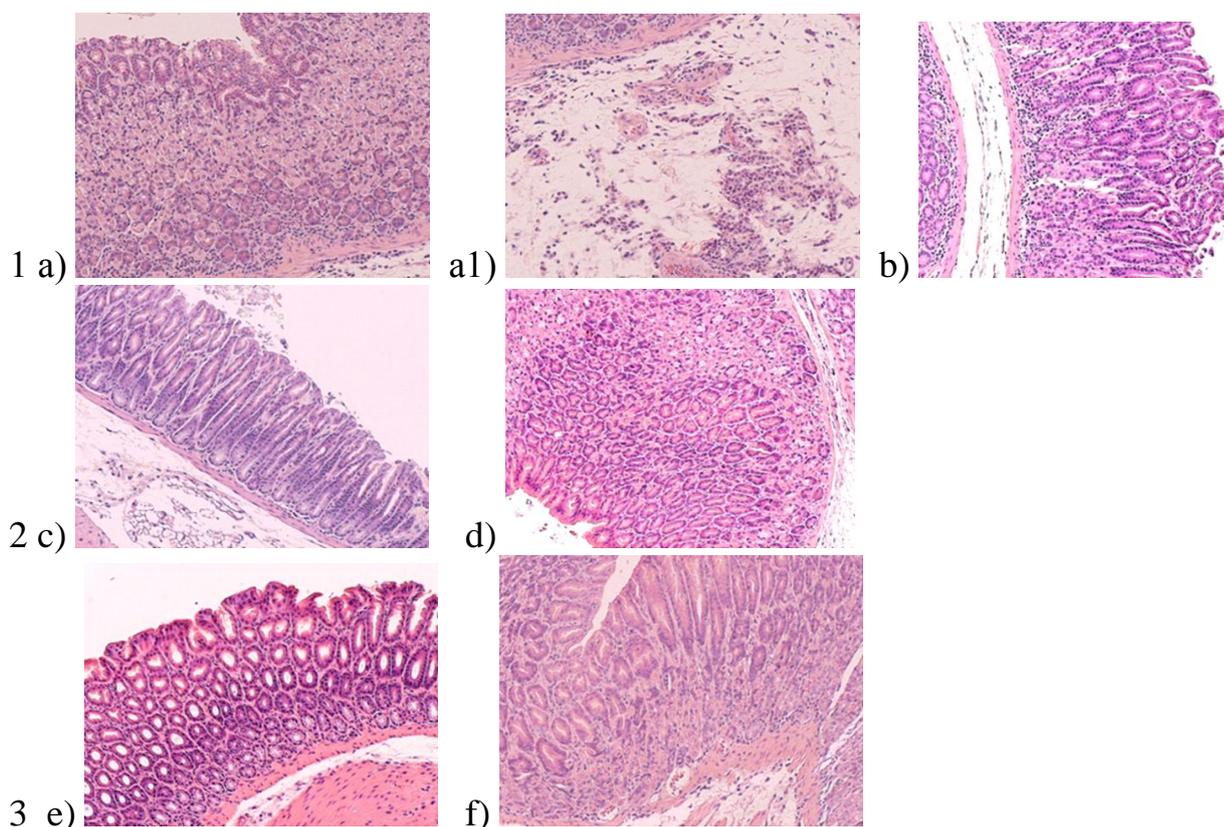
Сичқонлар ошқозони шиллиқ қаватини гистопатологик баҳолаш шуни кўрсатдики, тажриба бошланганидан 1 ойдан кейин *H. pylori* юктирилган ва даволанмаган ҳайвонлар ошқозонининг яллиғланиш даражаси Сидней тизимида кўра 2.1 ни ташкил этган ва бошқа иккита экспериментал гуруҳларда яллиғланиш даражаси анча паст бўлган, ишончли фарқсиз – иккинчи ва учинчи гуруҳларда тегишлича – 1.3 ва 1.32 бўлган. Юктириш ўтказилганидан 2 ой ўтиб назорат гуруҳида яллиғланиш даражаси 2.4 гача кўтарилган ва *L. rhamnosus 925ak* *H. pylori* ни юктиришдан олдин ва *H. pylori* юктирилганидан кейин киритилган тажриба гуруҳларида яллиғланиш анча паст бўлган ва тегишлича 0.5 ва 0.25 ни ташкил этган (5-расм).

Маҳсус патогенсиз сичқонлар устидаги тажриба 5 гуруҳга бўлинган 66 та сичқонда ўтказилган (9-жадвал).

9-жадвал

Патогенсиз сичқонларнинг тажриба гуруҳлари

| Гуруҳ № | Тавсифи | Сичқонлар сони |
|---------|---|----------------|
| 1-гуруҳ | <i>H. pylori</i> юктирилган ва даволанмай қолдирилган | 18 сичқон |
| 2-гуруҳ | <i>H. pylori</i> юктириб, кейинчалик <i>L. rhamnosus 925ak</i> билан даволанган | 18 сичқон |
| 3-гуруҳ | <i>H. pylori</i> ни юктиришдан олдин бир марта ва юктиргандан кейин бутун тажриба давомида <i>L. rhamnosus 925ak</i> киритилган | 6 сичқон |
| 4-гуруҳ | <i>L. rhamnosus 925ak</i> суспензияси бутун тажриба мобайнида киритилган | 6 сичқон |
| 5-гуруҳ | <i>H. pylori</i> ни юктиргандан сўнг ичимлик сувига бактериоцин синтез қилмайдиган <i>L. rhamnosus 2010</i> штамми қўшилган | 18 сичқон |



5-расм. Инфекциядан 1 ва 2 ой ўтгандан кейин сичқонлар ошқозони шиллик қаватининг гистологик кўриниши:

1. *H. pylori* юктирилган ва даволанмаган стерил сичқонлар ошқозони шиллик қавати (назорат гуруҳи): а) тажриба бошланганидан 1 ой кейин – шиллик қават ва шиллик ости қавати моно- ва полинуклеар ҳужайралари билан шиддатли инфилтрланиши (a1); б) тажриба бошланганидан 2 ой кейин – шиддатли инфилтрация, шиш, шиллик эпителий атрофияси; 2. *H. pylori* юктирилган ва *L.rhamnosus* 925ak билан даволанган сичқонлар ошқозонининг шиллик қавати: с) тажриба бошланганидан 1 ой кейин – кучсиз яллиғланиш ҳужайра инфилтрацияси ва шиш, баъзи жойларда шиллик қават бузилиши; б) тажриба бошланганидан 2 ой кейин - деярли меъёрдаги шиллик қават, яллиғланиш йўқ; 3. *L.rhamnosus* 925ak олдиндан киритиб кейин *H. pylori* юктирилган сичқонлар ошқозонининг шиллик қавати: е) тажриба бошланганидан 1 ой кейин – меъёрдаги шиллик қават; ф) тажриба бошланганидан 2 ой кейин - меъёрдаги шиллик қават (гематоксилин-эозин билан бўялган, ёруғлик микроскопи, х200).

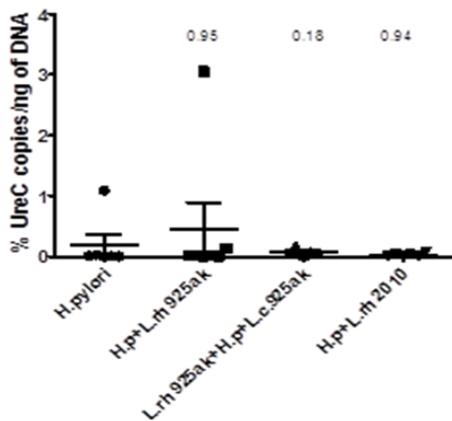
H. pylori миқдорини реал вақт ПЦР услуби ва ошқозоннинг гомогенизация қилинган намуналарини косачага серияли суюлтириш усули билан экиш тажриба ва назорат гуруҳлари ўртасида ишончли фарқ йўқлигини кўрсатган. Шундай қилиб, *H. pylori glmM* генининг ДНК 1 нг сидаги фоиз таркиби назорат гуруҳида 0.190, инфекциядан кейин *L. rhamnosus* 925ak билан даволанган, *L. rhamnosus* 925ak билан инфекциядан олдин ва кейин даволанган ва *L. rhamnosus* 2010 билан даволаган гуруҳларда тегишлича 0.459, 0.070 ва 0.026 ташкил этган (6-расм).

Маҳсус патогенсиз сичқонлар ошқозонини гистопатологик баҳолаш шуни кўрсатдики, тажриба бошланганидан 1 ойдан кейин яллиғланишнинг ўртача даражаси назорат гуруҳида 1.6 ва *L. rhamnosus* 925ak ва *L. rhamnosus* 2010 билан даволанган гуруҳларда тегишлича – 1.24 ва 1.33 ни ташкил этган. Тажриба бошланганидан 2 ой ўтгач яллиғланиш даражаси даволанмаган

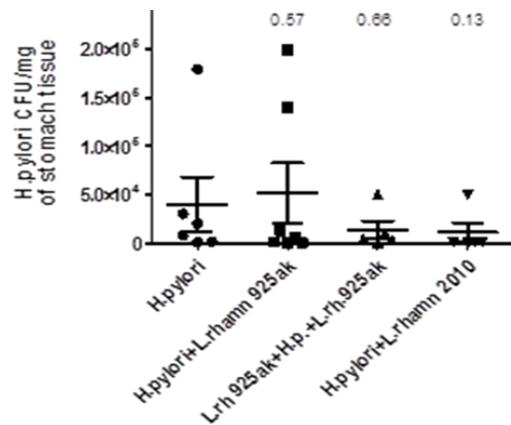
гурухда 2.1 гача ошган ва қолган иккита гурухда 1.2 ни ташкил этган. *H. pylori* колонизациясидан 3 ой кейин инфекция юқтирилган сичқонлар ошқозонида даволанмаган гурухда яллиғланиш даражаси 2.8 гача ортганлиги кузатилган, *L. rhamnosus 925ak* инфекциядан кейин киритилган, *L. rhamnosus 925ak* инфекциядан ҳам олдин ҳам кейин киритилган ва сичқонлар *L. rhamnosus 2010* билан даволанган гурухларда яллиғланиш даражаси тегишлича 1.25, 1.5 ва 1.1 ни ташкил қилган (6-7-расмлар).

Шундай қилиб, патогенсиз сичқонлар ошқозонидаги яллиғланиш 2-3 ойдан кейин лактобациллалар билан даволаш бошлангач барча гурухларда назоратга нисбатан ишончли пасайган.

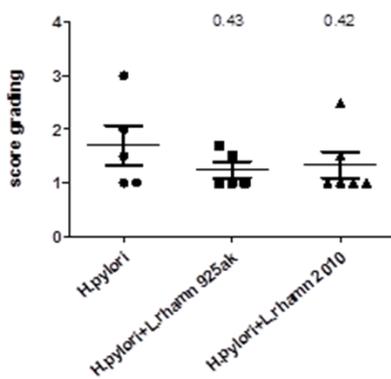
3 ойдан кейин МПС ошқозони шиллик қаватидаги *H. pylori* нинг нисбий миқдори



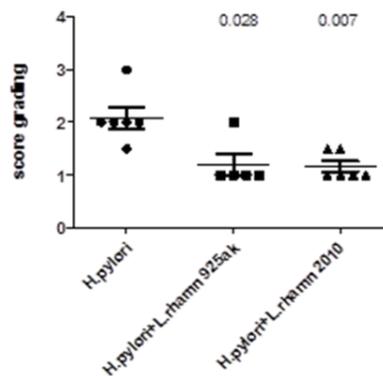
3 ойдан кейин МПС ошқозони шиллик қаватидаги *H. pylori* нинг абсолют миқдори



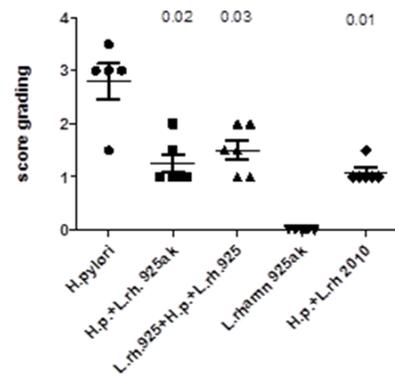
ШҚ яллиғланиши, инфекциядан 1 ой кейин



ШҚ яллиғланиши, инфекциядан 2 ой кейин



ШҚ яллиғланиши, инфекциядан 3 ой кейин

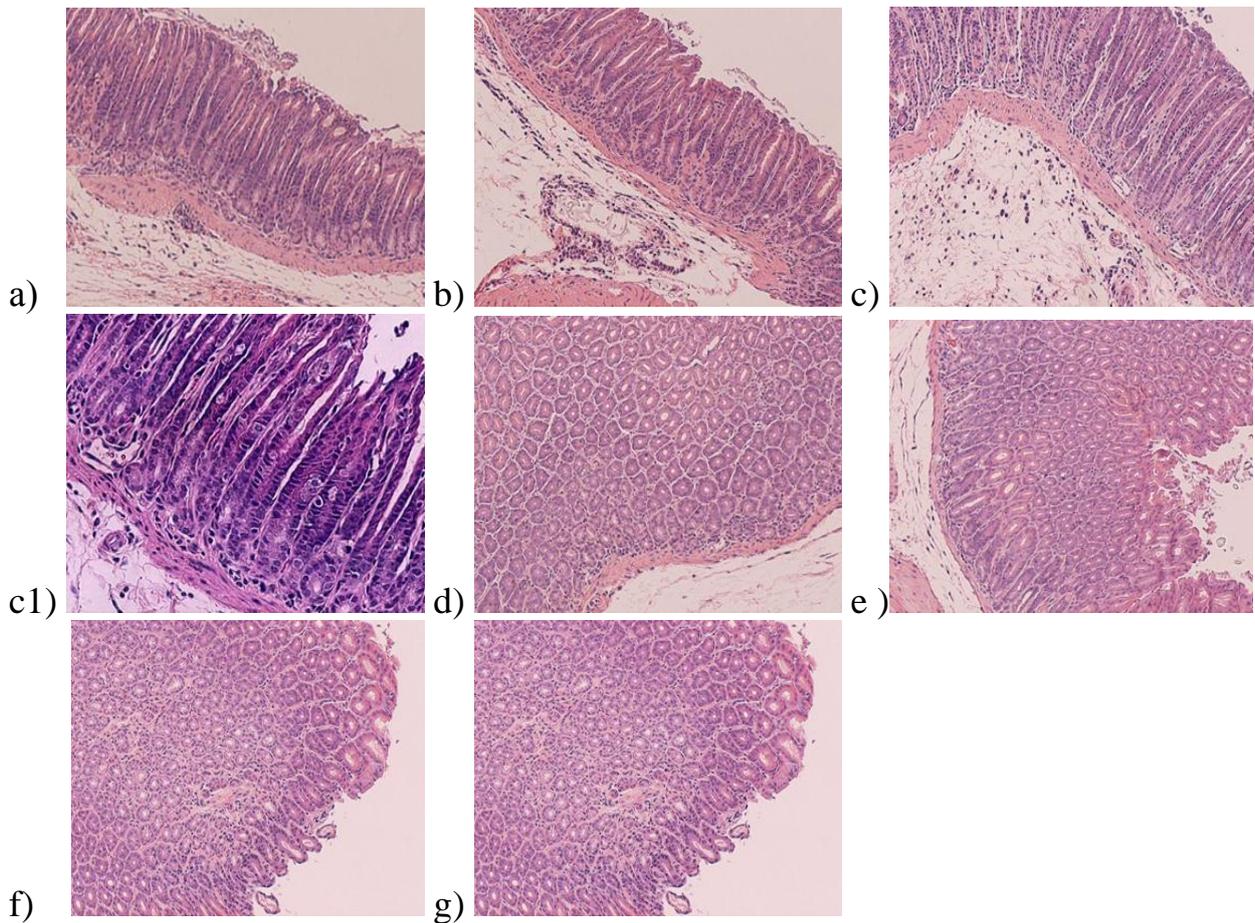


6-расм. Махсус патогенсиз сичқонлар ошқозонининг бактериал колонизацияси ва яллиғланиш даражаси

Диссертациянинг «*Lactobacillus rhamnosus 925ak* бактериоциноген штамми асосидаги «Лактопрополис» биологик фаол қўшимчанинги фаоллигини ўрганиш» деб номланган олтинчи бобида «Лактопрополис» БФҚ нинг микробиологик, санитар-гигиеник, физик-кимёвий кўрсаткичлари, шунингдек, унинг антимиқроб хоссалари «Лактопропионикс» ва прополис эритмасига нисбатан ўрганилганлиги бўйича маълумотлар келтирилган.

Ўтказилган фармакологик текширувларшуни қуйидагиларни кўрсатган:

Лактопрополис иммуноген фаолликка эга – у талокда АОК сонини, суяк кўмиги хужайралари сонини, лимфа тугунларидаги хужайралар сонини, қонда лейкоцитлар сонини ишончли орттиради. Бундан ташқари талок умумий хужайралар сони (ЯСКС), тимус хужайралари сонини ва қон эритроцитлари сонини ишончсиз даражада орттиради; ўткир токсикликка эга эмас –ЛД₅₀ аниқланмади; маҳаллий кўзгатувчи таъсирга эга эмас; кумулятив хоссаларга эга эмас; аллергияловчи таъсирга эга эмас; ҳайвонлар терисидаги юзаки яраларга нисбатан битказувчи таъсирга эга.

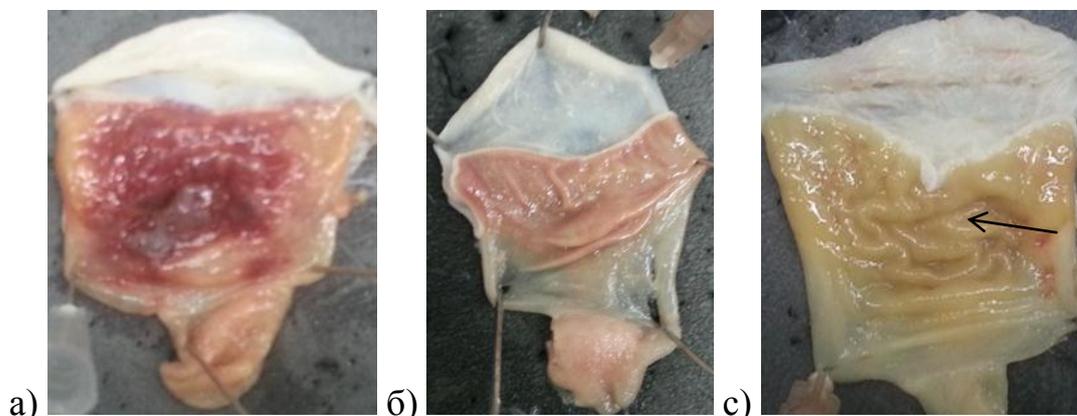


7-расм. Маҳсус патогенсиз C57BL/6 сичқонлар ошқозони шиллик қаватининг гистологик кўриниши:

H. pylori юқтириб даволанмаган гуруҳдаги ҳайвонлар ошқозонининг шиллик қавати: а) юқтиришдан 1 ой кейин – шиллик қават остида ўчоқли хужайра инфильтрацияси билан кечган ўрта даражадаги яллиғланиш, юзасида эрозив участкалар; б) инфекция юқтирилгандан 2 кейин – шиллиқости қаватида ҳаддан ортиқ хужайра инфильтрацияси, шиллик қават бутунлиги бузилган кичик участкалар; с) инфекциядан 3 ой ўтгач - шиллик қават шиллиқости қаватда – тақоқ хужайра инфильтрацияси, шишганлик ва некротик хужайралар мавжудлиги (С1, йўналишли белгилар билан кўрсатилган, катталаштириш х400); d) *H. pylori* юқтирилган ва *L. rhamnosus* 925ak билан даволанган гуруҳ ШҚ – шиллик қаватда шиллиқости қаватига ўтмаган кучсиз тарқоқ хужайра инфильтрацияси; e) *H. pylori* юқтирилган ва *L. rhamnosus* 2010 билан даволанган гуруҳнинг ШҚ инфекциядан 3 ой кейин – кучсиз моноклеар хужайра инфильтрацияси; f) олдиндан *L. rhamnosus* 925ak киритиб *H. pylori* юқтирилган гуруҳ ШҚ – фақат кучсиз хужайра инфильтрацияси; g) ичимлик суви билан *L. rhamnosus* 925ak истеъмол қилган, *H. pylori* юқтирилмаган назорат гуруҳи ҳайвонларининг ШҚ – меъёрдаги шиллик қават, эрозияларсиз (гематоксилин-эозин билан бўялган, ёруғлик микроскопи, х200).

Лактопрополисининг махсус фаоллиги каламушларда превентив киритиш ва маргимуш ангидрид ва этанол билан экспериментал яра чақирилгандан сўнг даволаш орқали ўрганилган. Даволаш бошланганидан 2 ҳафта ўтгач, каламушлар декапитация йўли билан ўлдирилган ва ошқозон шиллик қаватининг макро- ва микроскопик текширувлари ўтказилган. Турли концентрацияли прополис тутувчи Лактопрополисининг ярага қарши махсус фаоллигини баҳолаш Лактопропионикс ва ҳозирда кенг ишлатиладиган ва импорт қилиб олиб келинадиган Де-нол ярага қарши препаратига солиштириб ўрганилган.

Макроскопик текширувларда даволанмаган ҳайвонлардан иборат назорат гуруҳида ошқозон шиллик қаватининг некротик ўзгаришлари, Де-нол билан даволанган ҳайвонлар ошқозон шиллик қаватида кам сонли нуқтали яралар борлиги ва Лактопрополис билан даволанган ҳайвонлар гуруҳида соғлом шиллик қават кузатилган (8-расм).



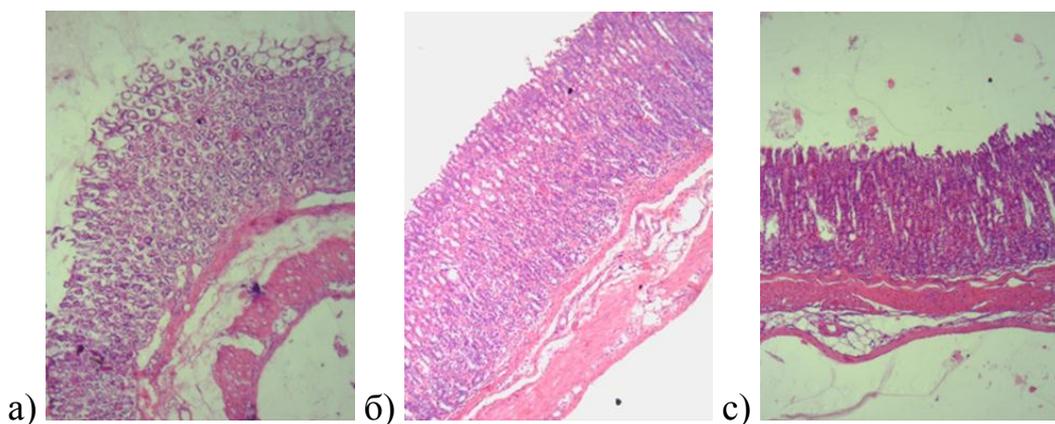
8-расм. Ошқозон шиллик қаватининг макроскопик кўриниши
а) назорат гуруҳи (экспериментал яралар, даволанмаган), б) Лактопрополис билан даволанган ҳайвонлар гуруҳи, с) Де-нол билан даволанган гуруҳ.

Ошқозон шиллик қаватини гистопатологик баҳолаш шуни кўрсатганки, назорат гуруҳидаги (даволанмаган) кўпчилик ошқозонлар шиллик қавати юзасида парчаланган ҳужайралар кузатилади. Пастки қаватдаги ҳужайралар ядроси буришган, шиллик ажралиши кучайган, қон томирлари кенгайган (9-расм).

Лактопрополис қабул қилган иккинчи гуруҳдаги кўпчилик ҳайвонларда шиллик қават нормал тузилишга эга, кучсиз инфилтрация кузатилган.

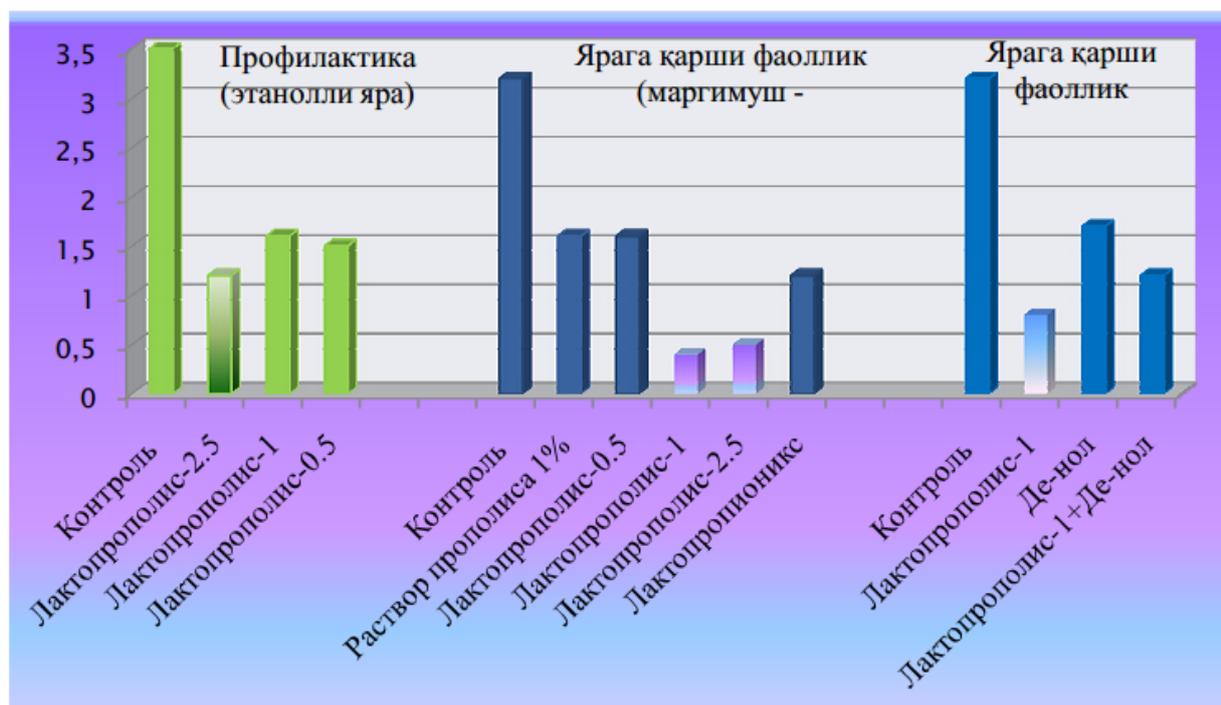
Де-нол билан даволанган учинчи гуруҳ ҳайвонларда шиллик қаватда шиллик тўхтаб қолишига ўхшаш қолдиқ яллиғланишли ҳодисалар кузатилган, шиллик қаватдан ажралиб тушган ўлик ҳужайралар кўриниб турган.

Ҳар бир гуруҳ ҳайвонларига тегишли энг ёрқин намоён бўлган ўзгаришларга эга ошқозонлар шиллик қаватининг гистологик кўриниши: а) назорат гуруҳи (экспериментал яралар, даволанмаган), б) Лактопрополис билан даволанган ҳайвонлар гуруҳи, с) Де-нол билан даволанган гуруҳ.



9-расм. Ошқозон шиллик қаватининг гистологик кўриниши

Лактопрополис-2.5 нинг превентив қўлланилиши яра ҳосил бўлишини энг самарали даражада камайтириши кўрсатиб берилган, Лактопропионикс билан солиштириб олиб борилган тажрибада яранинг битиши Лактопрополис-1 ва Лактопрополис-2.5 билан даволаганда самаралироқ бўлган. Таъсир Де-нол билан солиштириб ўрганилганда, Лактопрополис-1 Де-нолга нисбатан қисқа муддат ичида ярани битказиши маълум бўлган (10-расм).



10-расм. Маргимушли ва этанолли яранинг олдини олиш ва даволашда Лактопрополиснинг ярага қарши фаоллигини солиштирма ўрганиш

Шундай қилиб, чандикланиш самарадорлиги Лактопрополис-1 ва Лактопрополис-2.5 билан даволаганда энг юқори, шу сабабли ишлаб чиқаришга 1% прополиснинг спиртли экстрактини сақловчи Лактопрополис танлаб олинган.

ХУЛОСАЛАР

«Лактобациллаларнинг пробиотик ва бактериоциноген хусусиятлари, улар асосида ошқозон ярасига қарши восита яратиш» мавзусидаги докторлик диссертация иши бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Илк бор маҳаллий табиий манбалардан ажратиб олинган лактобацилла штамлари бактериоциноген хоссаларига кўра скрининг килинган. Бактериоцин синтезловчи 6 та штамм – *Lactobacillus plantarum* (3 та штамм), *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ва *L. amylovorus* ларнинг антимикроб спектри *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus morganii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* ва *Helicobacter pylori* ларни ўз ичига олади.

2. Лактобациллаларнинг пробиотик штаммлар мезонларига кўра *L. rhamnosus 925ak* ва *L. plantarum 42* лар пробиотик штамм сифатида фойдаланиш истиқболига эга.

3. Лактобациллаларнинг антимикроб ва бактериоциноген фаоллигини агардаги доғ усули билан скрининглаш учун таркибидан твин-80 ва натрий ацетат чиқариб ташлаш орқали модификацияланган озуқа мухити тавсия этилади.

4. Озиқа мухити таркибида *L. plantarum 42* учун углевод манбаи сифатида манноза ва *L. plantarum K-2* учун азот манбаи сифатида триптонни ишлатиш мақсадга мувофиқ. Бу озиқа мухити бактериоцинлар синтезини 2,6-4,0 мартагача орттиришга имкон беради.

5. *E.coli* нинг трансформацияланган мақсадли генга эга рекомбинант штамларини амплификациялашда қурилган стандарт эгри чизикқа нисбатан намунадаги *glmM* гени миқдорини аниқлашга асосланган, ҳайвонлар ошқозонидаги *H. pylori* ни миқдорий ҳисоблаш схемаси ишлаб чиқилган.

6. *L. rhamnosus 925ak* гнотобиотик сичконлар модели ошқозонида инфекциядан олдин бир марта киритилганда *H. pylori SS1* ни эрадикацияси қайд этилади.

7. *L. rhamnosus 925ak* нинг *H. pylori SS1* ошқозонда яллиғланиш жараёнларини бартараф этиш қобилятига эга. Лактобациллаларни олдиндан киритиш инфекциядан кейин киритишга нисбатан самарадор бўлиб, бунда *H. pylori SS1* колонизациясини қисқа муддат мобайнида камайтиради.

8. Ошқозон яраларини даволашда сут ачитувчи бактерияларни прополис экстракти билан комбинацияда қўллаш юқори самарадорликка эга. 1% прополисининг қуруқ спиртли экстракти қўшилган *L.rhamnosus 925ak*, *P. avidum1* микроорганизмларининг 3:1 нисбатдаги ассоциациясидан иборат янги «Лактопрополис» препарати ишлаб чиқаришга тавсия этилади.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ НА ОСНОВЕ НАУЧНОГО СОВЕТА
DSc.27.06.2017.В.39.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЁНЫХ СТЕПЕНЕЙ
ПРИ ИНСТИТУТЕ БОТАНИКИ И НАЦИОНАЛЬНОМ
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА**

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

МИРАЛИМОВА ШАХЛО МИРДЖАМОЛОНА

**ПРОБИОТИЧЕСКИЕ И БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА
ЛАКТОБАЦИЛЛ, СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ
ПРОТИВОЯЗВЕННОГО СРЕДСТВА**

03.00.04 – Микробиология и вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ (DSc) ДИССЕРТАЦИИ
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент – 2017

Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1.DSc/B10.

Диссертация выполнена в Институте микробиологии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета по адресу (www.flora-fauna.uz) и на информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный консультант:

Турдикулова Шахло Уткуровна
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Гулямова Тошхон Гафуровна
доктор биологических наук, профессор

Мухамедов Рустам Султанович
доктор биологических наук, профессор

Нуралиев Неккадам Абдуллаевич
доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация:

Институт химии растительных веществ

Защита состоится «25» декабря 2017 г. в 10⁰⁰ часов на заседании разового Научного совета на основе научного совета DSc.27.06.2017.B.39.01 по присуждению учёных степеней при Институте ботаники и Национальном Университете Узбекистана по адресу: 100128, г. Ташкент, ул. А.Кадирий, 7Б. Актовый зал Института микробиологии. Тел.: (+998 71) 241-71-29; e-mail: microbio@academy.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института Ботаники (зарегистрирована за №24). Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Дурмон йули, 32. Тел: (+99871) 262-79-38.

Автореферат диссертации разослан «12» декабря 2017 года (протокол рассылки №1 от 12 декабря 2017 года).

К.Ш. Тожибоев
председатель научного совета по
присуждению ученых
степеней, д.б.н.,
профессор

Б.А. Адилов
ученый секретарь научного совета по
присуждению ученых степеней,
к.б.н., с.н.с.

К. Давранов
председатель научного семинара при
научном совете по присуждению
ученых степеней, д.б.н.,
профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук (DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. Длительное и часто бесконтрольное применение антибиотиков в медицине, ветеринарии и животноводстве привело к широкому распространению множественной лекарственной резистентности среди бактериальных патогенов человека и животных во всем мире. Снижение и зачастую отсутствие эффективности антибиотиков при терапии инфекционных заболеваний, возбудителями которых наиболее часто являются патогенные бактерии семейств *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Pseudomonaceae*, *Listeriaceae* привело к необходимости поиска и внедрения в медицинскую практику новых антимикробных соединений. В связи с этим, одной из актуальных задач фармацевтики и ветеринарии является поиск бактериоциногенных микроорганизмов и разработка новых технологий производства препаратов на их основе.

В качестве альтернативы антибиотикам в настоящее время во всем мире исследователи рассматривают такие агенты как бактериофаги и их ферменты, пептиды эукариотических и прокариотических клеток и др. В этом же ряду находятся и пробиотики, состоящие только из естественных, физиологичных для человека и животных полезных микроорганизмов. Низкомолекулярные антимикробные пептиды – бактериоцины, отличаются от других (молочная, уксусная кислоты, перекись водорода) метаболитов специфичностью антимикробного действия и высокой бактерицидной активностью к патогенным микроорганизмам. Поэтому исследования, касающиеся выделения молочнокислых бактерий – продуцентов бактериоциноподобных веществ, изучение и оптимизация процессов образования бактериоцинов будет способствовать созданию новых антимикробных средств, отличающихся высокой терапевтической активностью, не обладающих побочными действиями и не вызывающих резистентность чувствительных микроорганизмов.

Со времени приобретения независимости нашей республики в целях развития фармацевтической промышленности проведены широкомасштабные реформы. В результате проведенных программных мероприятий в данном направлении достигнуты определенные результаты, в том числе было создано новое научно-практическое направление – создание пробиотических препаратов на основе местных штаммов микроорганизмов, разработка способов их применения в клинической практике для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, особенно диарейных. Однако, не было уделено достаточно внимания исследованиям, направленным на изучение бактериоциногенных пробиотических штаммов микроорганизмов. В мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью¹ обозначены задачи по «организации проведения научно-исследовательских работ для дальнейшего внедрения инновационных технологий

¹ Указ Президента Республики Узбекистан УП15229 от 7 ноября 2017 года «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью»;

в процессы производства лекарственных средств и выработке предложений по насыщению внутреннего рынка и локализации производства лекарственных средств». Исходя из поставленных задач, исследования, направленные на выделение новых местных штаммов мезофильных и термофильных лактобацилл, изучение их бактериоциногенных свойств, разработку противоязвенного пробиотического препарата на основе бактериоциногенных штаммов лактобацилл имеют важное научно-практическое значение.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных ПП416 от 14 июля 2006 года Президента Республики Узбекистан «О мерах по поддержке отечественных производителей лекарственных средств и изделий медицинского назначения», УП5229 от 7 ноября 2017 года «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью», а также другими нормативно-правовыми документами, принятыми в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий VI «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации². Научные исследования, направленные на создание лекарственных препаратов на основе пробиотических штаммов, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в University College Cork (Ирландия), North Carolina State University (США), Norwegian University of Life Sciences (Норвегия), Paris University (Франция), Institute for Microbiology, Toxicology and Histology (Германия), Institute of California Los-Angeles (США), Sao Paulo University (Бразилия), Korea Food Research Institute (Южная Корея), National Food Research Institute (Япония), Canadian Irradiation Centre (Канада), Государственный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (Россия) и Институте Микробиологии (Узбекистан).

В результате проведенных исследований в области изучения бактериоциногенных молочнокислых бактерий (МКБ) и их бактериоцинов получен ряд важных научных результатов, в том числе: разработана современная классификация бактериоцинов МКБ (North Carolina State University, США); очищены и охарактеризованы бактериоцины из культуральной жидкости МКБ (Norwegian University of Life Sciences, Норвегия); установлена химическая структура и биологические свойства антимикробных пептидов МКБ (Institute for Microbiology, Toxicology and Histology, Германия); определена способность бактериоцинов снижать колонизацию чувствительными патогенами *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* и другими энтеробактериями у экспериментальных животных (Canadian Irradiation Centre, Canada); обоснована безопасность

² Обзор научных исследований по теме диссертации приведены на основе данных источников <http://www.works.doklad.ru>, <http://www.km.ru>, www.dissercat.com, researchget.com, <http://www.fundamental-research.ru>, www.webofscience.com и др.

бактериоцинов для применения в пищевой промышленности, медицине и ветеринарии (Государственный Научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия).

В мире по выделению и получению альтернативных антибиотикам природных соединений по ряду приоритетных направлений проводится большое количество исследований, в том числе: выделение антимикробных пептидов из различных видов растений и микроорганизмов, создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов путем трансформации генов, кодирующих продукцию антимикробных пептидов и получение с их помощью антимикробных веществ, изучение антиоксидантных свойств бактериоцинов и других антимикробных пептидов, определение их роли в лечении опухолевых заболеваний и разработка лекарственных препаратов на их основе.

Степень изученности проблемы. Первым и наиболее подробно изученным антимикробным пептидом, описанным у МКБ, является бактериоцин низин, синтезируемый *Lactococcus lactis* (Delves-Broughton et al. 1996). Низин и педиоцин PA1 используются в производстве коммерческих продуктов питания в качестве биоконсервантов. Settani и Corsetti (2008) описывали применение бактериоциногенных МКБ в качестве защитных или стартерных культур при приготовлении ферментированных и неферментированных овощей, таких как оливки, мисо, квашеная капуста, маринованные огурцы и пророщенный маш. Обнаружено, что МКБ и их бактериоцины могут подавлять клинически значимые патогены животных и человека, такие как *E. coli*, продуцирующие шига-токсин (*STEC*), энтеротоксигенные *E. coli* (*ETEC*), метициллин-устойчивые *S. aureus* (*MRSA*), некоторые виды родов *Agrobacterium* и *Brenneria*, возбудителя язвенной болезни желудка *H. pylori* (Grinter et.al., 2012; Cotter et.al., 2013); *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella* и *Yersinia* (Cursino et.al. 2006); *Listeria monocytogenes* (Corr et.al., 2007); *Campylobacter jejuni* (Stern et.al. 2006).

В странах СНГ Стояновой Л.Г. (2008) разработана методика получения активных продуцентов бактериоцинов с использованием методов клеточной инженерии (протопластирования, слияния протопластов) и индуцированного мутагенеза; показана эффективность бактериоцинов при лечении сибиреязвенной болезни мышей, вызванной *Bacillus anthracis M-71* (Светоч Э.А. и сотр., 2011); при лечении кампилобактериоза у кур (Светоч Э.А. и сотр., 2007); получен трансгенный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессирующий гены низина и педиоцина (Карпов Н.В., 2017).

В Узбекистане в 1999 г. были начаты исследования по изучению бактериоциногенных свойств местных штаммов молочнокислых бактерий. Было установлено, что белковые фракции культуральной жидкости *Lactobacillus casei 925ak* содержат бактериоциноподобные вещества (Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., 2001).

Эти результаты показывают, что как продуценты бактериоцинов, так и сами бактериоцины, могут служить эффективными средствами в медицине и

ветеринарии. Поэтому поиск новых продуцентов бактериоцинов из местных природных источников и изучение их свойств, подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление антимикробного агента, дает возможность подобрать более эффективные пробиотические культуры и расширить области их применения в медицине и фармацевтике. Большое теоретическое и практическое значение имеет создание пробиотических препаратов, в том числе с противоязвенным действием, на основе продуцентов бактериоцинов.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ научно-исследовательских учреждений, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ по фундаментальным и инновационному проектам ФА-Ф6-Т129 «Изучение влияния бактериоциноподобных веществ, продуцируемых местными штаммами *Lactobacillus casei* group на *Helicobacter pylori* – возбудителя язвенных заболеваний желудка и 12-перстной кишки человека» (2012-2016), И6-ФА-0-15667 «Организация и освоение производства биологически активных добавок с противоязвенным действием «Лактопрополис» и «Лактопропионикс» (2014-2015), ФПФИ «Поиск микроорганизмов – продуцентов бактериоцинов и оценка возможности их использования в пищевой промышленности» (2016-2017).

Целью исследования является выявление потенциала лактобацилл как эффективных продуцентов бактериоцинов для разработки новых пробиотических препаратов.

Задачи исследования:

выделение местных штаммов мезофильных и термофильных лактобацилл, их идентификация на основании данных по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим и генетическим свойствам;

изучение пробиотических, антимикробных, бактериоциногенных и других биологических свойств лактобацилл;

оптимизация условий ферментации и компонентов питательных сред, способствующих увеличению образования бактериоцинов исследуемыми штаммами лактобацилл;

изучение способности бактериоциногенных лактобацилл к эрадикации желудочного патогена *Helicobacter pylori* в экспериментах на животных моделях (гнотобиотических и беспатогенных мышах);

разработка и изучение критериев безопасности пробиотического противоязвенного препарата, полученного на основе бактериоциногенных штаммов лактобацилл (отсутствие острой и хронической токсичности, местно-раздражающего действия, кумулятивных свойств, аллергизирующего действия и др.);

изучение терапевтических свойств и специфической активности пробиотического препарата в опытах *in vivo* на экспериментальных животных после индукции этанольной и мышьяковистой моделей язвы желудка);

разработка и утверждение нормативно-технической документации по

серийному производству БАД «Лактопрополис» совместно с ООО «OROM-Biopreparat».

Объектом исследования являются молочнокислые бактерии, выделенные из различных природных источников – молочных продуктов, растительных ферментированных продуктов и фекалий здоровых грудных детей.

Предметом исследования являются бактериоциноподобные вещества лактобацилл, продуценты антимикробных пептидов (бактериоцинов), биологические и пробиотические свойства, антимикробная активность, создание противоязвенного средства.

Методы исследования. В работе были использованы следующие методы: микробиологические, хроматографические, методы молекулярной биологии, методы доклинического исследования лекарственных препаратов.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые доказаны бактериоциногенные свойства местных штаммов мезофильных лактобацилл *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* и термофильных – *L. helveticus*, *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *L. amylovorus*, выделенных из молочных продуктов и ферментированных растительных субстратов;

идентифицированы мезофильные и термофильные лактобациллы по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим и генетическим признакам;

впервые определен оптимальный состав питательных сред и условия выращивания для увеличения бактериоциногенной активности молочнокислых бактерий и достигнуто повышение образования бактериоцинов более чем в 2.6 - 4 раза по сравнению с контролем;

установлено соответствие бактериоциногенных лактобацилл критериям, указанным в методической рекомендации МУК 4.2.2602-10 по пробиотическим свойствам: устойчивость к желчи и симулированному желудочному соку, кислым значениям рН, высокая антимикробная активность, адгезивность к клеткам кишечника;

впервые раскрыто *in vivo* взаимодействие бактериоцинов синтезирующего штамма *Lactobacillus rhamnosus 925ak* с чувствительным патогеном *Helicobacter pylori* на моделях стерильных и беспатогенных мышей и определено эффективное снижение колонизации хеликобактером желудка инфицированных мышей и снижение уровня воспаления при введении *Lactobacillus rhamnosus 925ak*.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

впервые разработан научно обоснованный состав биологически активной добавки к пище «Лактопрополис» на основе ассоциации местных штаммов – бактериоциногенного штамма *Lactobacillus rhamnosus 925ak* и *Propionibacterium avidum 1* с добавлением компонентов прополиса, обладающий противоязвенными и регенерирующими свойствами и доказана его клиническая эффективность на моделях животных. Препарат рекомендован к применению в качестве БАД при воспалительных и язвенных

заболеваниях желудочно-кишечного тракта;

совместно с ООО «Ором-Биопрепарат» разработана промышленная технология производства БАДа «Лактопрополис» и утверждена в Агентстве Узстандарт нормативно-техническая документация на серийный выпуск препарата;

выделенные и идентифицированные бактериоцинообразующие штаммы мезофильных лактобацилл, обладающие пробиотическими свойствами, рекомендованы к использованию в качестве источников антимикробных пептидов, а также – как стартерные культуры для создания продуктов функционального питания и пробиотических препаратов;

модифицированная питательная среда на основе стандартной МРС среды используется для повышения бактериоциногенной активности молочнокислых бактерий.

Достоверность результатов исследований подтверждается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных микробиологических, химических, физических методов и методов молекулярной биологии, статистическую обработку результатов производили при помощи критерия Стьюдента и дисперсионного анализа Фишера (ANOVA), а также опубликованностью результатов диссертации в ведущих зарубежных журналах и практическим внедрением результатов.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Теоретическая значимость результатов исследования определяется тем, что из молочных и растительных продуктов выделены бактериоциногенные молочнокислые бактерии, идентифицированы и определены их антимикробные свойства, оптимизированы параметры скрининга молочнокислых бактерий по их бактериоциногенной активности, показана антимикробная и противовоспалительная активность штамма *Lactobacillus rhamnosus 925ak* в желудке мышей при колонизации *Helicobacter pylori*.

Практическая значимость результатов исследования определяется созданием на основе микроорганизмов и внедрением в производство средства, обладающего противовоспалительными и противоязвенными свойствами, рекомендованного для применения при язвенных заболеваниях желудка и 12-перстной кишки.

Внедрение результатов исследования. На основе результатов изучения пробиотических и бактериоциногенных свойств лактобацилл и создания противоязвенного средства:

технические условия на производство биологически активной добавки «Лактопрополис», состоящей из ассоциации клеток *L. rhamnosus 925ak* и *P. avidum 1* в соотношении 3:1 и 1% сухого спиртового экстракта прополиса утверждены в Агентстве Узстандарт (TSh15011021-003:2016). В результате БАД принята к внедрению на предприятии «ОРОМ-Биопрепарат», производство которой дает возможность повысить эффективность лечения язвенных заболеваний желудочно-кишечного тракта;

получен сертификат соответствия для серийного производства

биологически активной добавки «Лактопрополис», состоящей из местных штаммов микроорганизмов и экстракта прополиса (Uz.SMT.01.313.2063756). Производство этого противоязвенного средства на основе местного сырья дает возможность импортозамещения ввозимых противоязвенных препаратов;

состав новой питательной среды для определения антимикробной и бактериоциногенной активности лактобацилл используется для определения антагонизма молочнокислых бактерий в прикладном проекте ВА-ФА-А10-006- «Разработка препарата на основе лактобактерий против возбудителей воспалительных заболеваний кишечника» (справка Академии Наук №4/1255-2571 от 5 декабря 2017 года). Новая питательная среда используется для оценки чувствительности широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к метаболитам молочнокислых бактерий;

выделенные из природных источников молочнокислые бактерии *Lactobacillus rhamnosus* 925-2010 и *Lactobacillus plantarum* 42 депонированы в «Коллекции просышленно-важных микроорганизмов» (справка Академии Наук №4/1255-2572 от 5 декабря 2017 года). Штаммы расширили разнообразие молочнокислых бактерий и обогатили фонд коллекции.

Апробация результатов исследования.

Результаты данного исследования были обсуждены на 8 международных и 5 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 25 научных работ. Из них 11 научных статей, в том числе 8 в республиканских и 3 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 187 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенных исследований, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования как приоритетным мировым направлениям, так и направлениям развития науки и технологий Узбекистана. Излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения об опубликованных работах и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Пробиотики и их роль в лечении и профилактике желудочно-кишечных заболеваний**» приведен анализ современного состояния исследований в области применения пробиотических штаммов бактерий, рассматриваются перспективы их использования для лечения и профилактики желудочно-кишечных

заболеваний, в том числе для эрадикации *H. pylori*, а также представлены сведения о бактериоцинах молочнокислых бактерий, их классификации и применении.

Во второй главе диссертации «Дизайн, материалы и методы исследований» описаны методы исследований, приведены использованные в работе микроорганизмы, приборы, оборудование, биологические и физико-химические методы анализа.

Третья глава диссертации «Особенности идентификации и определения основных биологических свойств бактериоциногенных молочнокислых бактерий» посвящена выделению, идентификации и изучению пробиотических свойств бактериоцин-синтезирующих молочнокислых бактерий, определению спектра их антагонистической активности.

Пробиотические свойства штаммов оценивали по выживаемости в присутствии разных концентраций NaCl (табл. 1), желчи, при разном значении pH (табл. 2) и в симулированном желудочном соке (рис.1).

Таблица 1

Влияние разных концентраций NaCl на выживаемость лактобацилл

| № | Изолят | Концентрация соли в среде МРС | | | | |
|----|---|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0% | 0.5% | 2% | 4% | 6.5% |
| 1 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 42 | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 8.3x10 ⁸ | 3.3x10 ⁸ |
| 2 | <i>Lactobacillus plantarum</i> 44 | 1.2x10 ⁹ | 1.3x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.0x10 ⁹ | 7.1x10 ⁸ |
| 3 | <i>Lactobacillus plantarum</i> кан 4 | 1.3x10 ⁹ | 1.3x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 9.4x10 ⁸ | 9.0x10 ⁷ |
| 4 | <i>Lactobacillus plantarum</i> кан 10 | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 1.0x10 ⁹ | 7.5x10 ⁸ |
| 5 | <i>Lactobacillus paracasei</i> 48 | 1.3x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 8.1x10 ⁸ | 2.4x10 ⁸ |
| 6 | <i>Lactobacillus plantarum</i> К-2 | 1.2x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 9.6x10 ⁸ | 7.7x10 ⁸ |
| 7 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 925 | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 9.0x10 ⁸ | 1.5x10 ⁸ |
| 8 | <i>Lactobacillus helveticus</i> ИС 1-3 | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 9.2x10 ⁸ | 5.8x10 ⁸ |
| 9 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ИС 1-2 | 1.2x10 ⁹ | 1.2x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 9.5x10 ⁸ | 8.6x10 ⁸ |
| 10 | <i>Lactobacillus amylovorus</i> ИС 2-7 | 1.1x10 ⁹ | 1.1x10 ⁹ | 9.8x10 ⁸ | 9.3x10 ⁸ | 8.3x10 ⁸ |

Таблица 2

Количество клеток лактобацилл в МРС бульоне при разном значении pH и в присутствии разных концентраций желчи

| № | Изолят | Количество клеток при pH (КОЕ/мл) | | | | Количество клеток при наличии в среде желчи (КОЕ/мл) | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--|---------------------|---------------------|-------------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 6.5 | 0 | 0.2% | 0.3% | 0.4% |
| 1 | <i>L. rhamnosus</i> 925ak | 5x10 ⁸ | 6x10 ⁸ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 9x10 ⁸ |
| 2 | <i>L. plantarum</i> 42 | 3x10 ⁷ | 1.5x10 ⁸ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 6x10 ⁸ | 6x10 ⁸ | 6x10 ⁸ |
| 3 | <i>L. plantarum</i> К-2 | 2x10 ⁷ | 4.5x10 ⁸ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 1x10 ⁹ | 8.5x10 ⁸ | 9x10 ⁸ | 9x10 ⁸ |
| 4 | <i>L. helveticus</i> ИС 1-3 | 2x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 2x10 ⁷ | 9x10 ⁸ | 8.5x10 ⁸ | 7.5x10 ⁶ | 3x10 ⁶ | 8x10 ⁵ |
| 5 | <i>L. delbrueckii</i> ИС 1-2 | 4x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 8x10 ⁷ | 9x10 ⁸ | 9x10 ⁸ | 3x10 ⁶ | 4x10 ⁶ | 6x10 ⁵ |
| 6 | <i>L. amylovorus</i> ИС 2-7 | 4x10 ⁷ | 1x10 ⁷ | 7x10 ⁷ | 9x10 ⁸ | 9x10 ⁸ | 3.5x10 ⁵ | 7.5x10 ⁴ | 3x10 ³ |

Все изученные изоляты оказались устойчивыми к содержанию 6.5% NaCl в среде, где количество жизнеспособных клеток составляло не менее 9x10⁷ КОЕ/мл. Изоляты варьировали по чувствительности как к низким

значениям pH, так и к присутствию желчи в среде культивирования. Так, *L. rhamnosus* 925 оказался наиболее устойчивым к кислой среде: при pH=6.5 и 4 рост клеток был одинаковым, то есть снижение pH до 4 не влияло на количество клеток, которое составляло 10^9 КОЕ/мл. При снижении pH до 3 и 2 количество клеток в среде снижалось на один порядок и составляло $5-6 \times 10^8$. Присутствие желчи в количестве 0.2 и 0.3% не повлияло на рост культуры, однако 0.4% желчи в среде снизило титр клеток на один порядок по сравнению с контролем (табл.2).

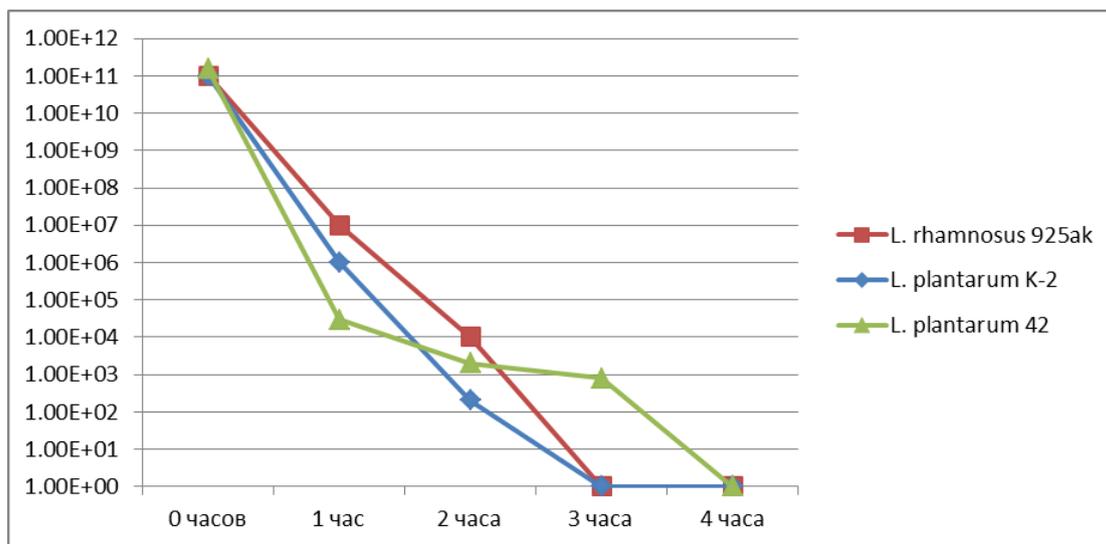


Рисунок 1. Выживаемость изолятов *L. rhamnosus* 925ak, *L. plantarum* K-2 и *L. plantarum* 42 в симулированном желудочном соке

Среди изученных культур наиболее высокая устойчивость к симулированному желудочному соку наблюдалась у *L. plantarum* 42, где клетки остаются жизнеспособными в течение 3 часов совместного культивирования, титр живых клеток составлял 8×10^2 КОЕ/мл при начальной концентрации 15×10^{10} КОЕ/мл. Несколько меньшая выживаемость наблюдалась у *L. rhamnosus* 925ak, где живые клетки обнаруживались не более чем через 2 часа совместного культивирования в количестве 1×10^4 КОЕ/мл при начальной концентрации 10×10^{10} КОЕ/мл. Наименьшей устойчивостью к симулированному желудочному соку обладает *L. plantarum* K-2, который выживает в СЖС 2 часа в количестве 2×10^2 КОЕ/мл при начальной концентрации 3×10^{10} . Через 4 часа в СЖС не обнаруживалось жизнеспособных клеток какого-либо из изолятов (рис 1).

Исследования по изучению антимикробной активности показали, что наиболее активными антагонистами являются представители вида *L. plantarum* – *L. plantarum* 42 активно подавляет рост *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus morganii*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* с диаметром зоны отсутствия роста более 25 мм; *L. plantarum* 44 обладает сильной антимикробной активностью против *Ps. aeruginosa*, *Pr. morganii*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, *E. coli*, *C. freundii*, диаметр зоны подавления роста

составляет более 23 мм; *L. plantarum* кан 4 проявляет сильную антимикробную активность против *C. freundii*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. morgani*, *Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, зона подавления роста этих культур составляет 23 мм и более; *L. plantarum* K-2 высокоактивен против *Ps. aeruginosa*, *Ser. marcescens*, *List. monocytogenes*, *E. coli*, *C. freundii*, *Ent. faecalis*, диаметр зоны подавления роста этих штаммов превышает 23 мм. Спектр антимикробной активности у *L. plantarum* кан 10 уже, тем не менее он сильно подавляет рост *Pr. morgani* (d=25 мм) (табл. 3).

Таблица 3

Антагонистическая активность свежeweделенных изолятов

| Изолят | Диаметр зоны подавления роста индикаторного штамма, мм | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---|-----------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | <i>C. freundii</i> , 002801/27 | <i>Ps. aeruginosa</i> 003841/114 | <i>Ser. marcescens</i> 367 | <i>Pr. morgani</i> 002810/599 | <i>List.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 1911 | <i>E. faecium</i> 364 | <i>E. coli</i> 002673/477 | <i>C. albicans</i> | <i>E. faecalis</i> OG1FR | <i>S. aureus</i> 003594/wood 46 | <i>H. pylori</i> SSI |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 42 | 35.0± 1.31 | 42.3± 1.99 | 30.0± ±1.99 | 32.7± 1.63 | 18.33 ±0.85 | 27.5± 0.38 | 40.67 ±1.51 | - | | 35.7± 1.63 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 44 | 25.33± 1.99 | 33.67 ±0.75 | 20.33± 0.75 | 30.67 ±1.5 | 0 | 26.7± 0.75 | 23.67 ±0.75 | - | 26.8± 0.59 | 18.3± 0.75 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> кан 4 | 33.7± 1.5 | 35.7± 1.57 | 20.6 ±0.23 | 30.0± 1.31 | 0 | 25.0± 0.95 | - | - | 25.7± 0.95 | 15.6± 0.38 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> кан 10 | 17.3± 0.75 | 0 | 12.75± 0.34 | 25.7± 0.95 | 0 | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> 48 | 25.3± 1.5 | 25.3± 0.75 | 20.33 ±0.54 | 25.3± 0.95 | 0 | - | 15.33 ±0.05 | - | 25.5± 0.46 | 0 | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> K-2 | 29.67 ±1.5 | 35.67 ±0.99 | >30 | 20.3± 0.95 | 23.3± 0.75 | - | 27.5 ±0.38 | 15.4± 0.31 | 25.75 ±0.4 | 15.8± 0.59 | - |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 925ak | 19.3± 0.75 | 15.67 ±0.75 | 10± 0.35 | 25.33 ±0.75 | 0 | - | 11.25± 0.33 | 0 | - | 13.0± 0.65 | 22.8± 0.48 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> ИС 1-3 | 0 | 15.0± 0.75 | 15.75± 0.14 | 0 | - | - | 0 | 16.43 ±0.2 | - | 0 | - |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ИС 1-2 | 0 | 19.0± 0.65 | 0 | 0 | - | - | 25.5± 1.32 | - | - | 30.7± 0.85 | - |
| <i>Lactobacillus amylovorus</i> ИС 2-7 | 0 | 15.5± 0.28 | 18.0± 0.75 | 0 | - | - | 17.3± 0.74 | - | 0 | | - |

По антимикробной активности штаммам *L. plantarum* 42 немного уступает *L. paracasei* 48, у которого сильный антагонизм с диаметром зоны подавления роста 25 мм проявляется к культурам *Ps. aeruginosa*, *Pr. morgani*, *C. freundii*, *Ent. faecalis*. *L. rhamnosus* 925ak сильно подавляет рост *Pr. morgani* и *H. pylori*, диаметр зоны подавления роста составляет 25 и 22 мм соответственно. *L. delbrueckii* ИС 1-2 является активным антагонистом *E. coli* и *S. aureus* (d=25.5 и 30 мм соответственно) (табл. 3).

Из десяти испытанных изолятов антимикробную активность, обусловленную бактериоцинами, проявили 7 штаммов: антимикробный белок *L. plantarum* 42 активен против *E. faecalis*, *E. faecium* и *List. monocytogenes*; у *L. plantarum* 44 – против *Pr. morgani*; у *L. plantarum* K-2 –

против *S. aureus* и *List. monocytogenes*; у *L. rhamnosus* 925ak – против *H. pylori*; у *L. helveticus* ИС 1-3 – против *Ps. aeruginosa*, *Ser. marcescens*; у *L. delbrueckii* ИС 1-2 – против *Ps. aeruginosa*; у *L. amylovorus* ИС 2-7 – против *Ps. aeruginosa* и *Ser. marcescens* (табл. 4).

Таблица 4

Спектр антимикробного действия бактериоцинов некоторых изолятов

| № | Изолят | Чувствительные к бактериоцину микроорганизмы |
|---|------------------------------|---|
| 1 | <i>L. plantarum</i> 42 | <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>List. monocytogenes</i> |
| 2 | <i>L. plantarum</i> 44 | <i>P. morganii</i> |
| 3 | <i>L. plantarum</i> K-2 | <i>P. morganii</i> , <i>St. aureus</i> , <i>List. monocytogenes</i> |
| 4 | <i>L. rhamnosus</i> 925 | <i>H. pylori</i> |
| 5 | <i>L. helveticus</i> ИС 1-3 | <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ser. marcescens</i> |
| 6 | <i>L. delbrueckii</i> ИС 1-2 | <i>Ps. aeruginosa</i> |
| 7 | <i>L. amylovorus</i> ИС 2-7 | <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ser. marcescens</i> |

В четвертой главе диссертации описаны результаты по **изучению синтеза бактериоцина.**

В связи с тем, что МРС агар, будучи селективной средой для лактобацилл, не позволяет расти некоторым культурам на втором, индикаторном слое в чашке, нами была модифицирована питательная среда МРС и подобран состав, который способствует продукции бактериоцина и вместе с тем не угнетает роста тест-культур. Для этого из состава стандартного МРС агара были удалены твин-80 и ацетат натрия. На подобранной среде было определено, что антимикробная активность *L. plantarum* 42 к *E. faecalis* обусловлена продукцией бактериоцина, что подтверждено угнетением антимикробной активности при действии протеаз (рис. 2).

Подобраны условия культивирования для максимального накопления бактериоцинов *L. plantarum* 42 и *L. plantarum* K-2.

Результаты проведенных исследований показали, что наибольшая продукция бактериоцина *L. plantarum* 42 наблюдается через 48 часов ферментации, при увеличении времени до 60 и 72 часов, бактериоцинообразование снижается. Что касается влияния температуры выращивания, то установлено, что снижение температуры ферментации с 37°C до 30°C не оказывает значительного влияния на бактериоцинообразование (табл. 5).

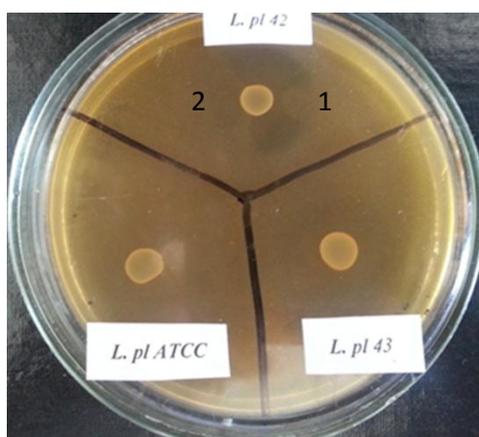


Рисунок 2. Бактериоциногенная активность *L. plantarum* 42 к *E. faecalis*:
1 – зона действия пепсина; 2 – зона действия протеиназы К

Таблица 5

Влияние времени и температуры ферментации штамма *L. plantarum* 42 на рост индикаторной культуры *E. faecalis*

| Температура | Время культивирования, ч | | | | |
|-------------|--------------------------|--------|---------------|--------|--------|
| | 24 | 36 | 48 | 60 | 72 |
| 30°C | 12±0.3 | 15±0.5 | 20±0.5 | 19±0.3 | 18±0.2 |
| 37°C | 13±0.3 | 16±0.6 | 19±0.3 | 19±0.5 | 18±0.5 |

Изучение влияния различных значений pH среды на синтез бактериоцина показало, что наиболее оптимальным является начальное значение pH среды, равное 6, при этом диаметр зоны подавления роста индикаторной культуры составляет 19.6 мм, при pH 5.0 и 7.0 синтез бактериоцина несколько снижается и диаметр зоны подавления роста индикаторной культуры составляет 17.6 и 17.8 мм соответственно. При pH ниже 5 бактериоцинообразования не наблюдается, а при pH 8 синтез бактериоцинов заметно снижается и диаметр зоны подавления роста тест-культуры составляет 12.2 мм (табл. 6).

Таблица 6

Влияние pH среды на образование бактериоцина штаммом *L. plantarum* 42

| pH питательной среды MRS | Диаметр зоны отсутствия роста, мм |
|--------------------------|-----------------------------------|
| 4.0 | - |
| 5.0 | 17.6±0.52 |
| 6.0 | 19.6±0.31 |
| 7.0 | 17.8±0.48 |
| 8.0 | 12.2±0.26 |

Кроме температуры и pH среды, на синтез бактериоцинов большое влияние оказывает состав питательной среды (Todorov S. D., Dicks L. M. T., 2005). Нами изучена активность бактериоцинообразования культур *L.*

plantarum K-2 и *L. plantarum* 42 в модифицированных нами МРС средах (табл.7).

Таблица 7

Влияние органического азота, углеводов и калия на активность бактериоцина *L. plantarum* K-2 и *L. plantarum* 42

| № | Компонент | Концентрация (г/л) | Активность (АУ/мл) | |
|----|--|--------------------|-------------------------|------------------------|
| | | | <i>L. plantarum</i> K-2 | <i>L. plantarum</i> 42 |
| 1 | МРС стандартный | | 300 | - |
| 2 | МРС без твина | | 200 | - |
| 3 | Триптон | 20.0 | 800 | - |
| 4 | Триптон + мясной экстракт | 12.5 + 7.5 | 150 | - |
| 5 | Триптон + дрожжевой экстракт | 12.5 + 7.5 | 100 | - |
| 6 | Триптон + мясной экстракт + дрожжевой экстракт | 10.0 + 5.0 + 5.0 | 400 | - |
| 7 | Мальтоза | 20.0 | 100 | - |
| 8 | Манноза | 40.0 | 300 | 100 |
| 9 | K ₂ HPO ₄ | 2.0 | 150 | - |
| 9 | KH ₂ PO ₄ | 2.0 | 150 | - |
| 10 | KH ₂ PO ₄ | 40.0 | - | - |

Образование бактериоцина культурой *L. plantarum* K-2 увеличивалось при наличии в питательной среде твина-80 на 30% по сравнению со средой, не содержащей твин-80. Добавление триптона (20 г/л) в качестве единственного источника азота повысило активность бактериоцина до 800 АУ/мл, что в 2.6 раза превышает активность в стандартной МРС среде. Манноза как единственный источник углевода способствовала образованию бактериоцина, обнаруживаемом в супернатанте *L. plantarum* 42 без концентрирования. Учитывая, что без замены глюкозы на маннозу в стандартном МРС бульоне для обнаружения активности бактериоцина супернатант концентрировали не менее, чем в 4 раза, МРС бульон с маннозой обеспечивает увеличение продукции бактериоцина в 4 раза.

Молекулярную массу бактериоцина определяли при разделении белков на 15% полиакриламидном геле. Разделение проводили одновременно на двух аналогичных гелях, один из которых окрашивали по Кумасси, а второй заливали слоем индикаторной культуры *List. monocytogenes*. На залитом геле наблюдали зону отсутствия роста индикаторной культуры на участках, которые соответствуют молекулярной массе 9.5 кДа у культуры *L. plantarum* K-2 и 15 кДа – у культуры *L. plantarum* 42 (рис. 3).

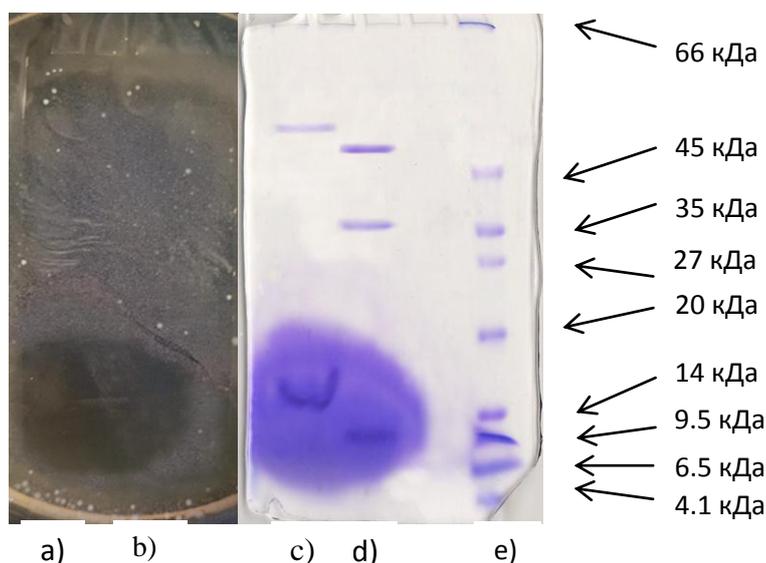


Рисунок 3. Tricine-SDS PAGE бактериоцинов *L. plantarum* K-2 и *L. plantarum* 42:

a – бактерицидная зона подавления *L. monocytogenes* ATCC пептидов суммарного сырого экстракта белков *L. plantarum* 42; b – бактерицидная зона подавления *L. monocytogenes* ATCC пептидов супернатанта штамма *L. plantarum* K-2; c – окрашенные по Кумасси пептиды сырого экстракта штамма *L. plantarum* 42; d – окрашенные по Кумасси пептиды супернатанта штамма *L. plantarum* K-2; e – маркер молекулярной массы

Пятая глава работы посвящена изучению влияния *L. rhamnosus* 925ak на колонизацию *H. pylori* и воспаление слизистой оболочки желудка на моделях мышей. Эксперименты проводили на гнотобиотических и специальных беспатогенных мышах.

В эксперимент на гнотобиотических мышах были вовлечены 36 мышей, поделенные на 3 группы как указано в таблице 8.

Оценку колонизации *H. pylori* проводили с использованием количественного ПЦР анализа и при гистопатологической оценке слизистой оболочки экспериментальных животных через 1 и 2 месяца после начала эксперимента.

Таблица 8

Экспериментальные группы гнотобиотических мышей

| № группы | Описание | Количество мышей |
|----------|--|------------------|
| 1 группа | Инфицирована <i>H. pylori</i> и оставлена нелеченой | 12 мышей |
| 2 группа | Инфицирована <i>H. pylori</i> с последующим лечением <i>L. rhamnosus</i> 925ak | 12 мышей |
| 3 группа | Превентивное однократное введение <i>L. rhamnosus</i> 925ak | 12 мышей |

Через 1 месяц общее количество бактерий в желудке инфицированных *H. pylori* мышей (контрольная группа) было самым меньшим (в среднем 3.8 копий 16S rRNA на 1 нг ДНК), и наибольшее количество было насчитано в группе, леченой суспендированной в питьевой воде *L. rhamnosus* 925ak на

протяжении всего эксперимента (2 группа) (45 копий 16S rRNA/нг ДНК). В группе, где *L. rhamnosus 925ak* инокулировали однократно до инфекции *H. pylori* (3 группа) общее количество бактерий в среднем было 15.2 копии 16S rRNA/нг ДНК (рис. 4).

Процентное содержание *H. pylori* в слизистой оболочке желудка в контрольной группе было 85%, во второй группе – 20% и в третьей группе – 4.4%. Таким образом, через 1 месяц после начала эксперимента в группе мышей, леченых *L. rhamnosus 925ak*, процентное содержание *H. pylori* в слизистой оболочке желудка снизилось в 4.2 раза в сравнении с контрольной группой и в группе, где *L. rhamnosus 925ak* вводили до инфекции – в 20 раз.

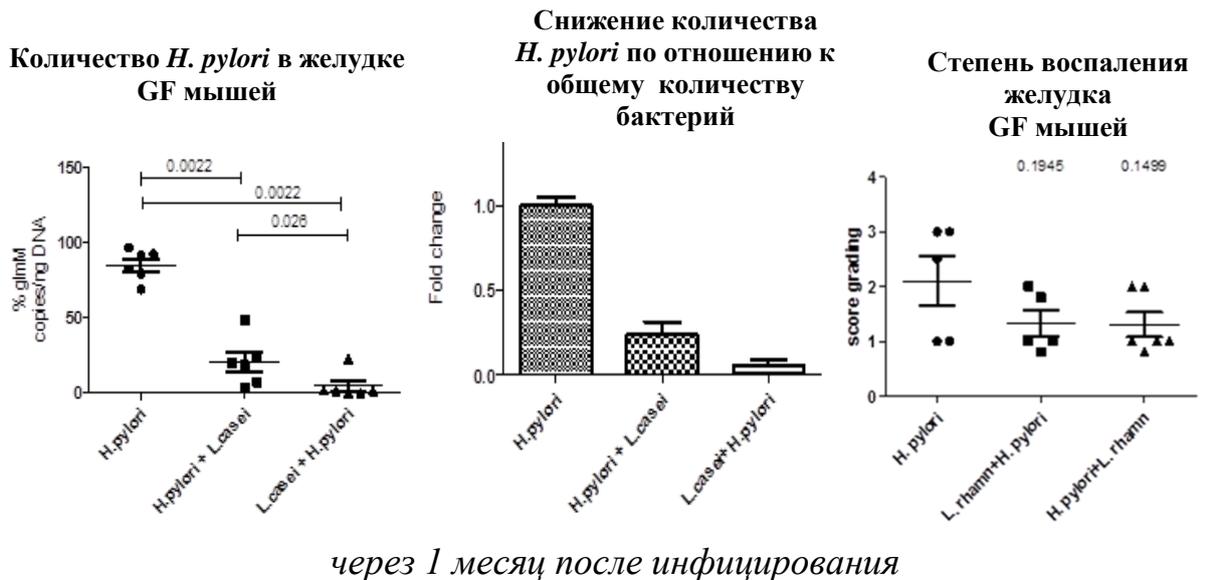


Рисунок 4. Бактериальная колонизация и степень воспаления слизистой оболочки желудка гнотобиотических мышей через 1 месяц после инфицирования

Через 2 месяца после начала эксперимента количество ДНК в обеих экспериментальных группах было значительно ниже, чем в контрольной группе (72.2%, 1.8% и 0.03% в контрольной, первой и второй группах соответственно). Во второй группе процентное содержание *H. pylori*

снизилось в 39.7 раз и в третьей группе ДНК *H. pylori* было обнаружено у 2 животных из 6 и процентное содержание было в 6983 раза ниже, чем в контрольной группе. Процентное содержание *L. rhamnosus 925ak* в слизистой оболочке желудка в этот временной интервал во второй группе животных был значительно выше, чем в третьей группе и составляло 90.5% и 74.2% соответственно.

Таким образом, показано, что у гнотобиотических мышей эрадикация *H. pylori* при введении лактобацилл наблюдается через 2 месяца после начала лечения, при превентивном введении как эрадикация, так и устранение последствий инфекции происходит быстрее.

Гистопатологическая оценка слизистой оболочки желудка показала, что через 1 месяц после начала эксперимента уровень воспаления желудка у нелеченых инфицированных *H. pylori* животных составляла 2.1 согласно Сиднейской системе и в двух других экспериментальных группах уровень воспаления был гораздо ниже, без достоверных отличий – 1.3 и 1.32 во второй и третьей группах соответственно. Через 2 месяца после начала инфекции уровень воспаления в контрольной группе поднялся до 2.4 и в опытных группах, где *L. rhamnosus 925ak* вводили до инфицирования *H. pylori* и после инфицирования *H. pylori* воспаление было значительно ниже и уровень был соответственно 0.5 и 0.25 (рис. 5).

В эксперимент на специальных беспатогенных мышах было вовлечено 66 мышей, поделенных на 5 групп, как указано в таблице 9.

Таблица 9

Экспериментальные группы беспатогенных мышей

| № группы | Описание | Количество мышей |
|-----------------|---|-------------------------|
| 1 группа | инфицирована <i>H. pylori</i> и оставлена без лечения | 18 мышей |
| 2 группа | инфицирована <i>H. pylori</i> с последующим лечением <i>L. rhamnosus 925ak</i> | 18 мышей |
| 3 группа | <i>L. rhamnosus 925ak</i> вводили однократно до инфицирования <i>H. pylori</i> после инфекции на протяжении всего эксперимента | 6 мышей |
| 4 группа | вводили суспензию <i>L. rhamnosus 925ak</i> на протяжении всего эксперимента | 6 мышей |
| 5 группа | после инфицирования <i>H. pylori</i> в питьевую воду добавляли штамм <i>L. rhamnosus 2010</i> , который не синтезирует бактериоцины | 18 мышей |

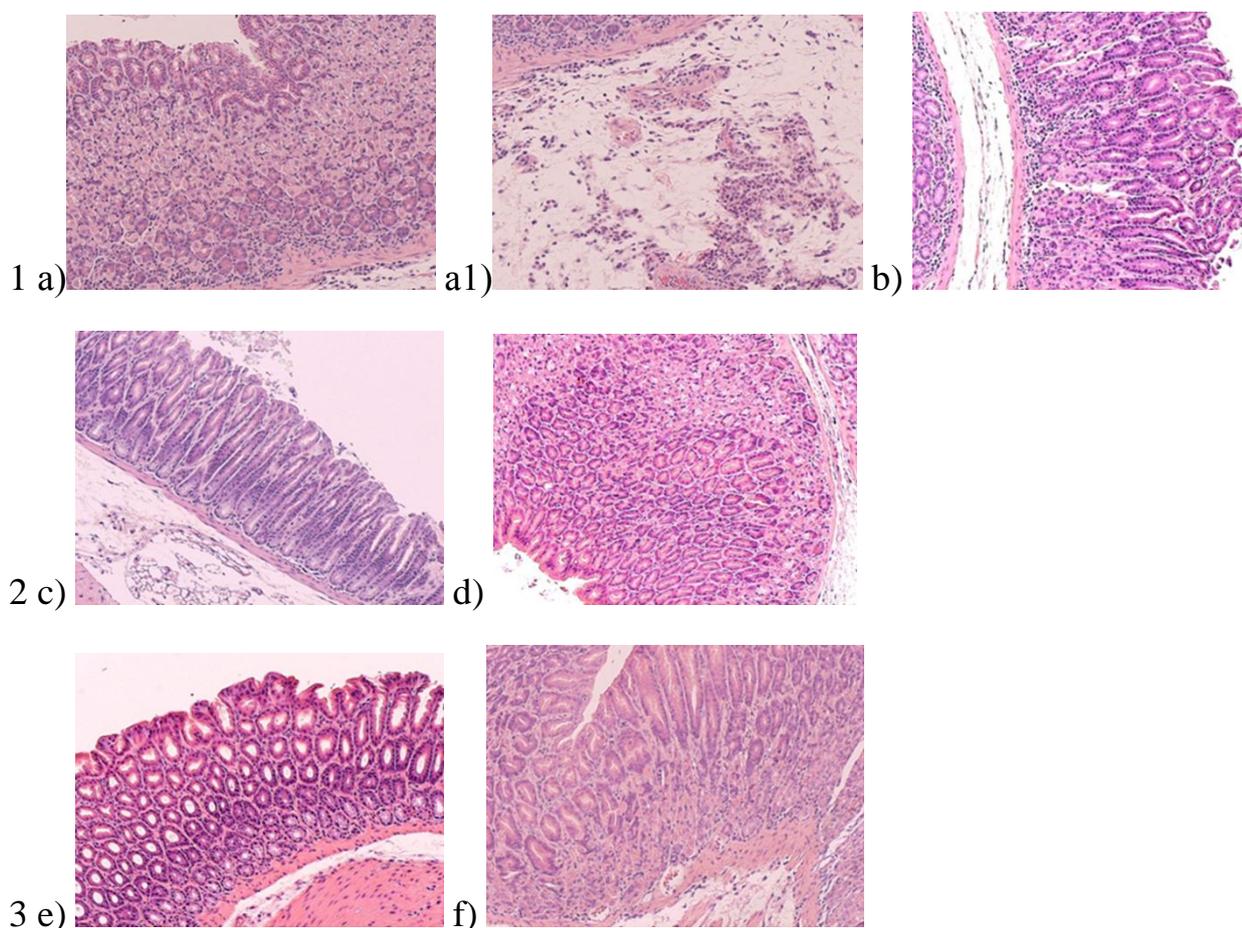


Рисунок 5. Гистологическая картина слизистой оболочки желудка у гнотобиотических мышей через 1 и 2 месяца после начала инфекции:

1. Слизистая оболочка желудка мышей, инфицированных *H. pylori* и нелеченых (контрольная группа): а) через 1 месяц после начала эксперимента – интенсивная инфильтрация моно- и полинуклеарными клетками в слизистой и подслизистой оболочке (a1); б) через 2 месяца после начала эксперимента – интенсивная клеточная инфильтрация, отек, атрофия слизистого эпителия; 2. Слизистая оболочка желудка мышей, инфицированных *H. pylori* и леченых *L. rhamnosus 925ak*: с) через 1 месяц после начала эксперимента – слабая воспалительная клеточная инфильтрация и отечность, в некоторых местах разрушение слизистой; д) через 2 месяца после начала эксперимента – почти нормальная слизистая, без воспалений; 3. Слизистая оболочка желудка мышей, инфицированных *H. pylori* с превентивным введением *L. rhamnosus 925ak*: е) через 1 месяц после начала эксперимента – нормальная слизистая оболочка; ф) через 2 месяца после начала эксперимента – нормальная слизистая оболочка; окраска гематоксилин-эозином, световой микроскоп, x200.

Подсчет количества *H. pylori* методом ПЦР в реальном времени и путем посева на чашку серийных разведений гомогенизированных образцов желудка показал, что между экспериментальной и контрольной группами нет достоверной разницы. Так, среднее процентное содержание копий *glmM* гена *H. pylori* в 1 нг ДНК составляет 0.190 в контрольной группе, 0.459, 0.070 и 0.026 в группах, леченой *L. rhamnosus 925ak* после инфекции, леченой *L. rhamnosus 925ak* до и после инфекции и леченой *L. rhamnosus 2010* соответственно (рис.6).

Гистопатологическое изучение желудка специальных беспатогенных мышей показало, что через 1 месяц после начала эксперимента средняя степень воспаления в контрольной группе составляла 1.6 и в группах, леченых *L. rhamnosus 925ak* и *L. rhamnosus 2010* – 1.24 и 1.33 соответственно. Через 2 месяца после начала эксперимента степень воспаления у нелеченой группы увеличилась до 2.1 и у двух опытных групп составляла 1.2. После трех месяцев колонизации *H. pylori* в желудке инфицированных мышей наблюдалось повышение степени воспаления у нелеченой группы до 2.8, в то время как у групп, леченых *L. rhamnosus 925ak* после инфекции, *L. rhamnosus 925ak* вводили до и после инфекции и в группе, где мышей лечили *L. rhamnosus 2010* степень воспаления была 1.25, 1.5 и 1.1 соответственно (рис. 6, 7).

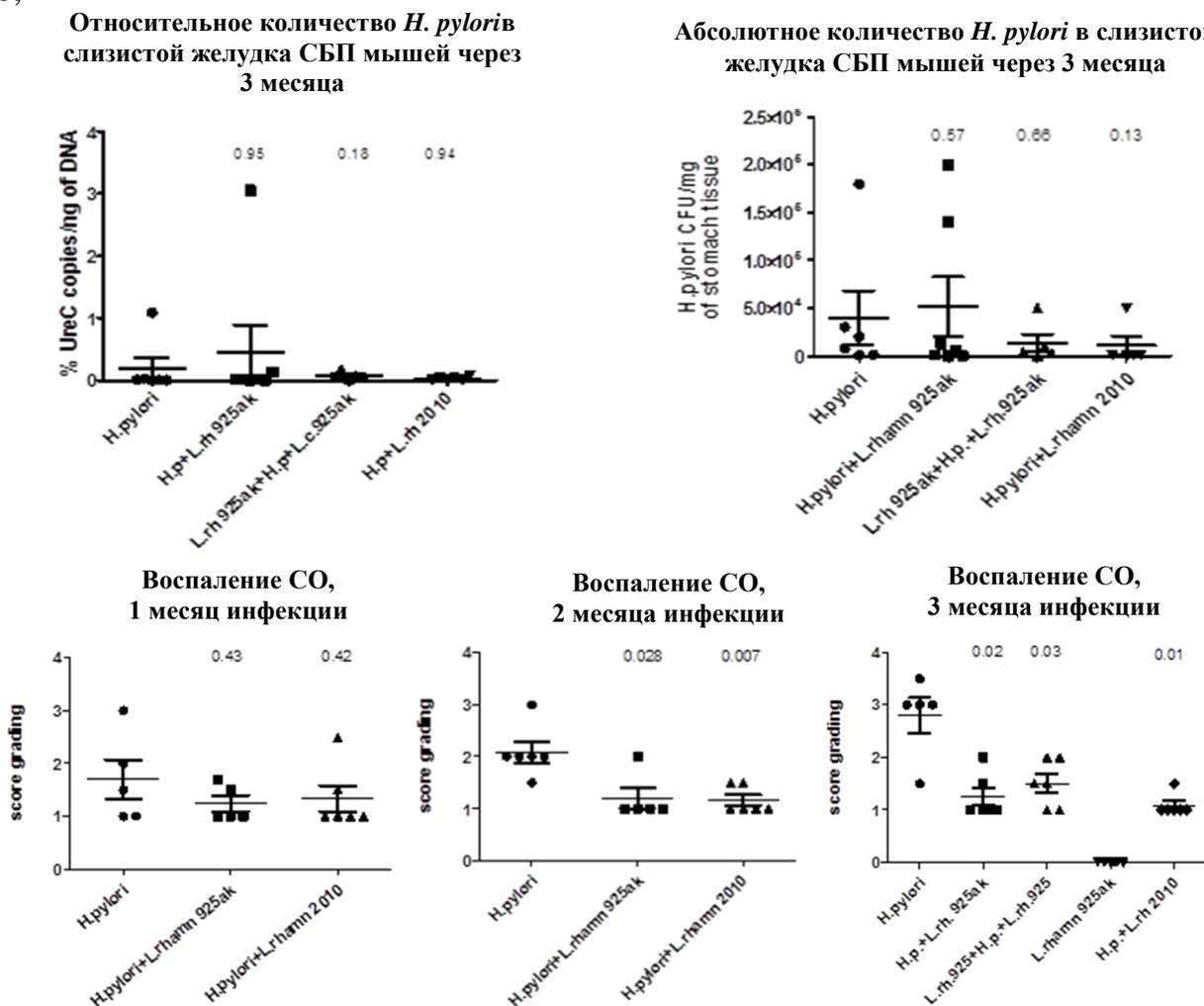


Рисунок 6. Бактериальная колонизация и степень воспаления желудка специальных беспатогенных мышей

Таким образом, воспаление в желудке беспатогенных мышей достоверно снижается по отношению к контролю через 2 и 3 месяца после начала лечения во всех группах, леченых лактобациллами.

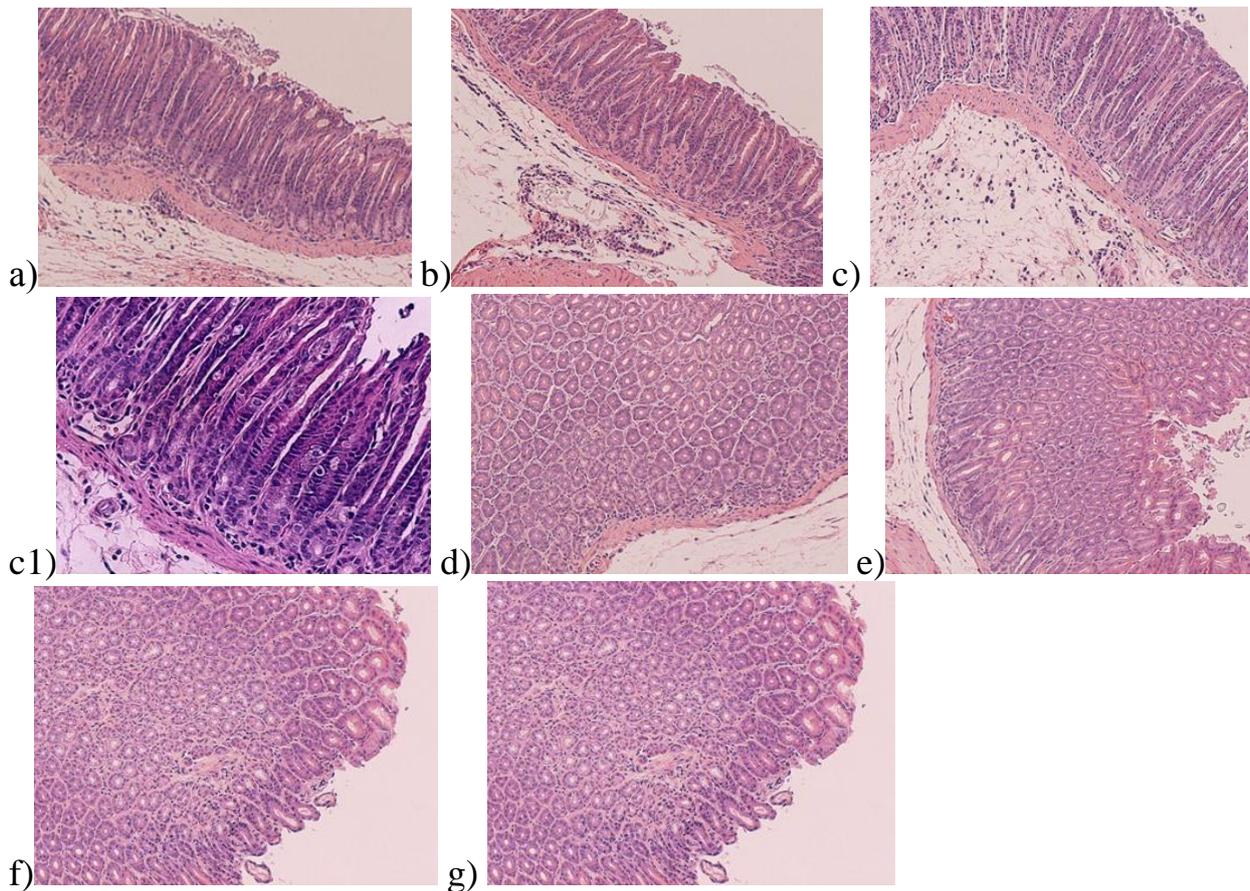


Рисунок 7. Гистологическая картина слизистой желудка у специальных беспатогенных C57BL/6 мышей:

слизистая оболочка (СО) инфицированной *H. pylori* группы без лечения: а) через 1 месяц после инфицирования – средней степени воспаление в слизистом слое с очаговой клеточной инфильтрацией в подслизистой, эрозивные участки на поверхности; б) через 2 месяца после инфицирования – чрезмерная клеточная инфильтрация в подслизистой, небольшие участки нарушения целостности слизистой; в) через 3 месяца после инфицирования – диффузная клеточная инфильтрация в слизистой и подслизистой, отекаемости и присутствие некротических клеток (С1, указаны стрелками, увеличение x400); д) СО инфицированной *H. pylori* группы, леченой *L. rhamnosus* 925ak - слабая диффузная клеточная инфильтрация в слизистом слое без проникновения в подслизистую; е) СО инфицированной *H. pylori* группа, леченой *L. rhamnosus* 2010 через 3 месяца после инфицирования – слабая мононуклеарная клеточная инфильтрация; ф) СО инфицированной *H. pylori* группы, леченой *L. rhamnosus* 925ak при превентивном введении – только слабая клеточная инфильтрация; г) СО контрольной группы животных, употреблявших в питьевой воде *L. rhamnosus* 925ak, не инфицированной *H. pylori* – нормальная слизистая, без эрозий; окраска гематоксилин-эозином, световой микроскоп, x200.

В шестой, заключительной главе описывается изучение **активности биологически активной добавки Лактопрополис на основе бактериоциногенного штамма *Lactobacillus rhamnosus* 925ak.**

Изучены микробиологические, санитарно-гигиенические, физико-химические показатели БАДа Лактопрополис, а также его антимикробные свойства по сравнению с Лактопропиониксом и раствором прополиса.

Проведенные фармакологические испытания показали, что: «Лактопрополис» обладает иммуногенной активностью – он достоверно повышает число АОК в селезенке, число клеток в костном мозге, число клеток в лимфатических узлах, число лейкоцитов крови. Кроме того, повышает недостоверно общее число клеток селезенки (ЯСКС), число клеток в тимусе и количество эритроцитов в крови; не обладает острой токсичностью – не удалось определить ЛД₅₀; не обладает местнораздражающим действием; не обладает кумулятивными свойствами; не обладает аллергизирующим действием; обладает ранозаживляющим действием на поверхностную рану кожи животных.

Специфическую активность Лактопрополиса изучали на крысах при превентивном введении и лечении после вызывания экспериментальной язвы мышьяковистым ангидридом и этанолом. Через 2 недели после начала лечения крыс забивали декапитированием и проводили макро- и микроскопическое обследование слизистой оболочки желудка. Проведена оценка специфической противоязвенной активности Лактопрополиса с разным содержанием прополиса в сравнении с Лактопропиониксом и широко применяемым в настоящее время импортируемым противоязвенным препаратом Де-нол.

При макроскопическом обследовании наблюдали некротические изменения слизистой оболочки желудка в контрольной, не леченой группе животных, наличие небольшого количества точечных язв в слизистой оболочке желудка животных, леченых Де-нолом и практически здоровую слизистую оболочку в группе животных, леченых Лактопрополисом (рис. 8). Гистопатологическая оценка слизистой оболочки желудка показала, что в слизистой оболочке большинства желудков контрольной группы (не леченой) на поверхности наблюдаются разрушенные клетки. Ядра клеток в нижней части сморщены, усилена секреция слизи, расширены кровеносные сосуды (рис. 9).

У большинства животных второй группы, принимавших Лактопрополис, слизистая оболочка желудка имеет нормальное строение, наблюдается слабая инфильтрация. В третьей группе животных, где лечение проводили Де-нолом, в слизистой оболочке наблюдаются остаточные явления воспаления, такие как застой слизи, видны отслоившиеся от слизистой оболочки отмершие клетки.

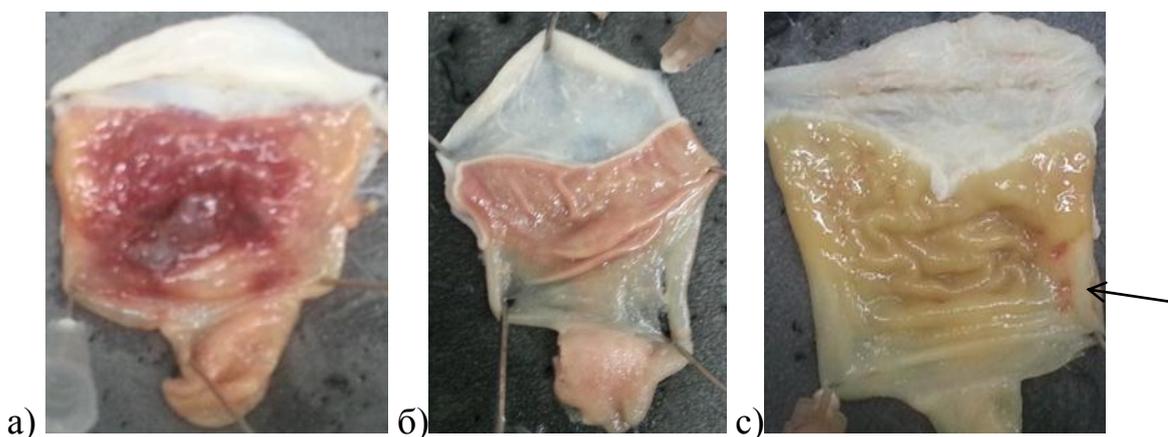


Рисунок 8. Макроскопическая картина слизистой оболочки желудка
 а) контрольная группа (с экспериментальной язвой, нелеченая), б) группа животных, леченая Лактопрополисом, с) группа, леченая Де-нолом.

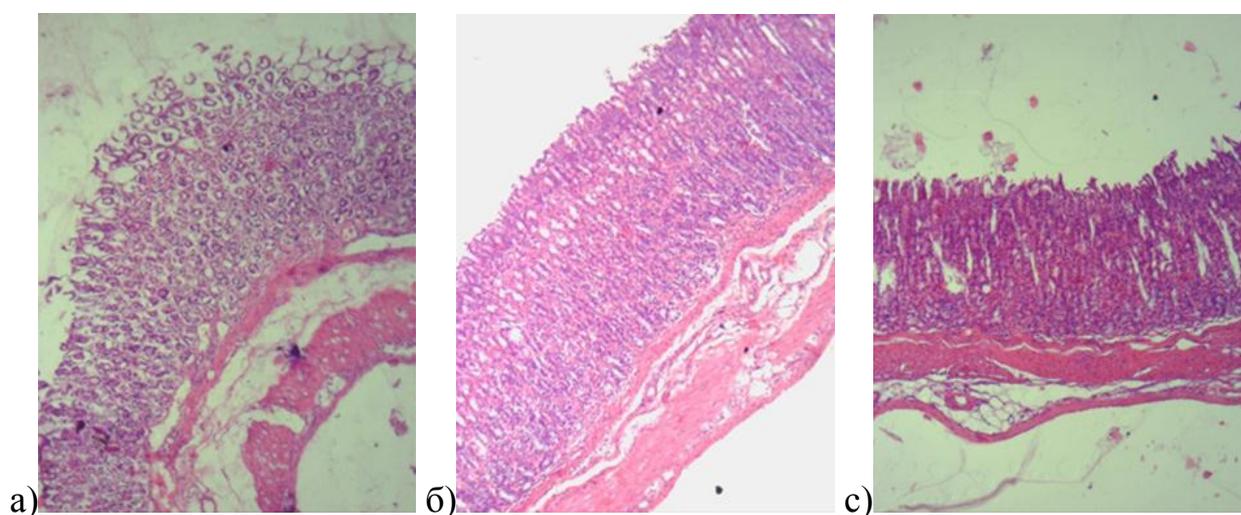


Рисунок 9. Гистологическая картина слизистой оболочки желудка:
 гистологическая картина слизистой оболочки наиболее представительных желудков животных каждой группы: а) контрольная группа (с экспериментальной язвой, нелеченая), б) группа животных, леченая Лактопрополисом, с) группа, леченая Де-нолом.

Показано, что при превентивном применении наиболее эффективно снижает язвообразование Лактопрополис-2.5, в эксперименте при лечении в сравнении с Лактопропиониксом ранозаживление происходит эффективнее при лечении с Лактопрополисом-1 и Лактопрополисом-2.5. В эксперименте при сравнении действия с Де-нолом показано, что Лактопрополис-1 заживляет язву в более короткие сроки, чем Де-нол (рис. 10).



Рисунок 10. Сравнительная противоязвенная активность “Лактопрополиса” при профилактике и лечении мышьяковистой и этанольной язв

Таким образом, эффективность рубцевания язвы наиболее высокая при лечении Лактопрополисом-1 и Лактопрополисом-2.5, в связи с чем для производства выбран Лактопрополис с содержанием 1% спиртового экстракта прополиса.

ВЫВОДЫ

В результате исследований, проведенных в рамках докторской диссертационной работы «Пробиотические и бактериоциногенные свойства лактобацилл, создание на их основе противоязвенного средства» представлены следующие выводы:

1. Впервые проведен скрининг бактериоциногенных свойств штаммов лактобацилл, выделенных из местных природных источников и идентифицированы 6 штаммов – *L. plantarum* (3 штамма), *L. helveticus*, *L. delbrueckii* и *L. amylovorus*, синтезирующих бактериоцины, спектр антимикробной активности которых включает *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *List. monocytogenes*, *Pr. morgani*, *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Ser. marcescens* и *H. pylori*.

2. Изучение соответствия штаммов лактобацилл критериям пробиотических культур выявило перспективные для использования в качестве пробиотиков новые штаммы *L. rhamnosus* 925ak и *L. plantarum* 42.

3. Подобран состав новой модифицированной питательной МРС среды на основе МРС с исключением из состава твина-80 и ацетата натрия, рекомендуемой для скрининга антимикробной и бактериоциногенной активности лактобацилл методом пятен на агаре.

4. При использовании различных вариаций источников азота и углеводов подобраны питательные среды, где единственным источником углевода для *L. plantarum* 42 является манноза и для *L. plantarum* K-2 в качестве источника азота используется триптон, позволяющие увеличить синтез бактериоцинов в 2.6 – 4 раза.

5. Отработана схема количественного определения *H. pylori* в желудке животных, которая заключается в подсчете количества *glmM* гена в образце по отношению к стандартной кривой, построенной при амплификации рекомбинантных штаммов *E. coli* с трансформированным целевым геном.

6. Впервые показана способность *L. rhamnosus* 925ak к эрадикации *H. pylori* SS1 в желудке на гнотобиотических моделях мышей при превентивном однократном введении.

7. Показано, что как бактериоциногенные, так и небактериоциногенные *L. rhamnosus* способны устранять воспалительные процессы в слизистой оболочке желудка инфицированных хеликобактером специальных беспатогенных мышей. Установлено, что превентивное введение лактобацилл мышам эффективнее и в более короткие сроки снижает колонизацию *H. pylori* SS1 по сравнению с постинфекционным введением.

8. Сравнительное изучение эффективности использования молочнокислых бактерий в комбинации с экстрактом прополиса для лечения

экспериментальных язв позволило подобрать состав нового препарата, который состоит из ассоциации микроорганизмов *Lactobacillus rhamnosus* 925ak, *Propionibacterium avidum*1 в соотношении 3:1 с добавлением 1% сухого спиртового экстракта прополиса.

**ONE-TIME SCIENTIFIC COUNCIL ON THE BASE OF
DSc.27.06.2017.B.39.01 SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING THE
SCIENTIFIC DEGREES AT THE INSTITUTE BOTANY AND THE
NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

MIRALIMOVA SHAKHLO MIRDJAMOLOVNA

**PROBIOTIC AND BACTERIOCINOGENIC PROPERTIES OF LACTOBACILLI,
CREATION THE ANTIULCER REMEDY ON THEIR BASE**

03.00.04 – Microbiology and virology

ABSTRACT OF THE DOCTOR OF SCIENCE (DSc) DISSERTATION

Tashkent – 2017

The title of the doctor of science dissertation (DSc) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2017.1.DSc/B10.

The dissertation has been carried out at the Institute of Microbiology.

The abstract of the dissertation is posted in three languages (Uzbek, Russian, English (resume)) on the webpage of the Scientific Council (www.flora_fauna.uz) and on the website of "ZiyoNET" Information-educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific consultant:

Turdikulova Shahlo Utkurovna

Doctor of biological sciences

Official opponents:

Gulyamova Toshkhon Gafurovna

Doctor of biological sciences, professor

Mukhamedov Rustam Sultanovich

Doctor of biological sciences, professor

Nuraliyev Nekkadam Abdullayevich

Doctor of medical sciences, professor

Leading organization:

Institute of chemistry of plant compounds

The defense of the dissertation will take place on «25» of December, 2017 at «10⁰⁰» at the meeting of one-time Scientific council on the base of DSc.27.06.2017.B.39.01 Scientific council for awarding the scientific degrees at the Institute Botany and the National university of Uzbekistan (Address: 100053, Tashkent, A.Kodiriy, 7B. Conference hall of the Institute of Microbiology. Tel.: (99871) 241-71-29; E-mail: microbio@academy.uz).

The dissertation has been registered at the Informational Resource Centre of Institute of the Botany under №24 (Address: Tashkent, Durmon yuli, 32. Tel.: (+99871) 262-37-95).

The abstract of the dissertation has been distributed on «12» of December, 2017. Protocol at the register № 1 dated by «12» of December, 2017.

K.Sh. Tojibaev

Chair of the Scientific Council for awarding the scientific degrees, Doctor of Biological Sciences, Professor

B.A. Adilov

Scientific Secretary of the Scientific Council for awarding the scientific degrees, Doctor of Philosophy on biology

K. Davronov

Chair of the Scientific Seminar under Scientific Council for awarding the scientific degrees, Doctor of Biological Sciences, Professor

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

The aim of the research work is determining the potential of lactobacilli as an effective producer of bacteriocin for developing new probiotic product.

The object of the research work is lactic acid bacteria, isolated from different natural sources – dairy product, fermented plant products, a faeces of healthy infants.

Scientific novelty of the research is in the following:

for the first time the bacteriocinogenic properties of local strains of mesophilic – *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and thermophilic – *L. helveticus*, *L. delbrueckii sp. bulgaricus*, *L. amylovorus* lactobacilli, isolated from dairy products and fermented vegetable products have been proved;

the identification of mesophilic and thermophilic lactobacilli through morphologic-cultural, physiologic-biochemical and genetic characteristics is completed;

for the first time the content of culture media and cultivation conditions for increase of bacteriocinogenic activity of lactic acid bacteria has been determined. The increase of bacteriocin production for 2.6 – 4 times as compared with control is achieved;

bacteriocinogenic lactobacilli comply with probiotic criteria identified in guideline MUK 4.2.2602-10: resistance to bile and simulated gastric juice, acid pH value, have high antimicrobial activity, adhesive to intestinal cells *in vivo* in experimental mice and as in *in vitro* on *CaCo-2* cell line;

for the first time the *in vivo* interaction of bacteriocin producing strain *Lactobacillus rhamnosus* 925 and *Helicobacter pylori* pathogen on gnotobiotic and special pathogen free mice has been investigated and the effective reduction of stomach by *Helicobacter* colonization, and reduction of inflammation level after injection of *Lactobacillus rhamnosus* 925 has been determined.

Implementation of research results. On the base of the results of investigation of probiotic and bacteriocinogen properties of lactobacilli and creation on their basis the antiulcer agent:

biologically active supplement «Lactopropolis», consisting of association of *L. rhamnosus* 925ak and *P. avidum* 1 cells in proportion of 3:1 and 1% dry alcohol extract of propolis is registered by UzStandart agency (TSh 15011021–003:2016). As a result BAS is accepted for production in «OPOM-Biopreparat» company, which gave possibility to increase the effectiveness of curing of the digestive tract ulcer diseases;

the certificate of conformity for mass production of “Lactopropolis” biological active supplement, consisting of local strains of microorganisms and propolis extract, is obtained (Uz.SMT.01.313.2063756). Production of this antiulcer agent on the base of local materials, allowed the substitution of imported antiulcer agents;

composition of the new culture media for determining the antimicrobial and bacteriocinogenic activity of lactobacilli, is used to determine of antagonism of lactic acid bacteria in applied project VA-FA-A10-006 - “Elaboration of the

preparation on the base of lactobacteria against inflammation bowel diseases agents” (reference letter of the Academy of science №4/1255-2571 from 5 December 2017). New culture media has been used for evaluation of the sensitivity of the wide range pathogenic and conditionally pathogenic bacteria to lactic acid bacteria metabolites;

Lactobacillus rhamnosus 925-2010 and *Lactobacillus plantarum* 42 isolated from natural sources are deposited in the “Collection of industrially important microorganisms” (reference letter of the Academy of science №4/1255-2572 from 5 December 2017). Strains have expanded the variety of lactic acid bacteria and enriched the collection fund.

Scope and structure of the dissertation. The dissertation consists of introduction, six chapters, conclusion, list of references and appendices. The volume of the dissertation is 187 pages.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST of PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Миралимова Ш.М., Кутлиева Г.Д., Еникеева З.М., Фузаилова Т.М., Гильдиева М.С.Изучение антиканцерогенной активности убитых клеток *Propionibacterium avidum* I на мышах BALB/C с перевивным опухолевым штаммом аденокарциномы толстой кишки (АКАТОЛ) // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2010. Спец. Вып. – С.27-31. (03.00.00; №5).

2. Миралимова Ш.М. Выделение бактериоцина с антихеликобактерной активностью из культуральной жидкости *Lactobacillus rhamnosus* 925 ak // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2012. Спец. вып. – С.40-43. (03.00.00; №5).

3. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Элова Н.А., Расулова А.А. Разработка новой селективной среды для дифференциации *Lactobacillus casei*, *paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus* // Инфекция, иммунитет и фармакология. – Ташкент, 2014. – №4. – С.90-93. (03.00.00; №7).

4. Миралимова Ш.М. Роль пробиотиков в лечении некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта // Инфекция, иммунитет и фармакология. – Ташкент, 2014. – №5. – С.93-100. (03.00.00; №7).

5. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Сохибназарова Х.А., Кутлиева Г.Д. Выделение и селекция молочнокислых бактерий – антагонистов энтерококков // Gulustan-Black Sea Scientific Journal of Academic Research, 2015. Vol 25, Issue 07. – P. 31-34.(№5 Global Impact Factor, IF 0791).

6. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Элова Н.А., Сохибназарова Х.А., Кутлиева Г.Д. Пробиотические свойства бактериоциногенного штамма *Lactobacillus plantarum* // Фармацевтический журнал. – Ташкент, 2016. – №2. – С.111-116. (03.00.00; №2).

7. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Ибрагимова А., Кутлиева Г.Д., Сохибназарова Х.А. Синтез бактериоциноподобного вещества штаммом *Lactobacillus plantarum* 42, выделенным из квашеной капусты // Research Result. Medicine and Pharmacy Series, 2016. – №3 (2). – С. 56-63. (№5 Global Impact factor, IF 0,676).

8. Миралимова Ш.М., Элова Н.А., Сохибназарова Х.А. Антимикробные и бактериоциногенные свойства местных штаммов молочнокислых бактерий // Вестник КарГУ. – Карши, 2016. – №3. – С. 30-37. (03.00.00; №11).

9. Миралимова Ш.М. Бактериоцины молочнокислых бактерий // Инфекция, иммунитет и фармакология. – Ташкент, 2016. – №6. – С. 100-108. (03.00.00; №7).

10. Миралимова Ш.М., Элова Н.А., Сохибназарова Х.А. Подбор питательной среды для изучения антагонистической активности лактобацилл // Доклады АН РУз. – Ташкент, 2016. – №5. – С. 82-84. (03.00.00; №6).

11. Miralimova Sh.M., Ogay D.K., Ibragimova A.A., Sokhibnazarova H.A., Kutlieva G.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 42 strain // European science review, 2016. – №9-10. – С.17-20. (03.00.00; №6).

II бўлим (II часть; Part II)

12. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Элова Н.А., Кутлиева Г.Д. Выделение и антимикробные свойства местных штаммов лактобацилл // Научный вестник СамГУ. – Самарканд, 2014. – №3В. – С. 17-21. (02.00.00; №9).

13. Miralimova Sh.M., Ogay D.K., Kutlieva G.D., Lim A.L., Pak V.A high antimicrobial activity of bacteriocin-like compounds produced by a local strain of *Lactobacillus casei* against *Helicobacter pylori* // International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics. – Kosice, 2010. – P. 49-50.

14. Miralimova Sh.M., Ogay D.K., Kutlieva G.D., Elova N.A., Whitehead K., Sartor R.B. Antimicrobial activity of Lactic acid bacteria isolated from cheese produced in Uzbekistan // FASEB Summer Research Conference. – Carefree, 2011.

15. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Элова Н.А., Кутлиева Г.Д. Антимикробная, бактериоциногенная активность штаммов *Lactobacillus* «группы casei» перспективных для использования в медицине и молочной промышленности // Микробные биотехнологии: актуальность и будущее: Сборник статей Международной научно-практической конференции. – Киев, 2012. – С. 218-219.

16. Miralimova Sh.M., Liu Bo, Sadriddinov A.F., Sartor R.B. *In vivo* антихеликобактерная активность *L.rhamnosus* 925ak // Материалы V конгресса микробиологов Узбекистана. – Ташкент, 2012. – С.121-122.

17. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Элова Н.А., Кутлиева Г.Д. Антимикробная и бактериоциногенная активность местных пробиотических штаммов лактобацилл // Материалы V конгресса микробиологов Узбекистана. – Ташкент, 2012. – С.131.

18. Miralimova Sh.M., Ogay D.K., Elova N.A., Kutlieva G.D. Particularities of probiotic properties of the local strains of lactic acid bacteria, creating the consortiums with therapeutic and prophylactic properties // State of the art and prospects of development: VII Moscow international congress. – Moscow, 2013. – №2. – P.61.

19. Миралимова Ш.М., Тулаганов Б.С., Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., Элова Н.А., Саидов С.А., Алиев Х.У. Противовозвращное действие препарата из пробиотических штаммов и сухого экстракта прополиса // Интеграция образования, науки и производства в фармации: Материалы Республиканской научно-практической конференции. – Ташкент, 2014. – С. 301-302.

20. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., Сохибназарова Х.А. Антимикробная, бактериоциногенная активность местных штаммов *Lactobacillus* к энтерококкам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* //

Конференция по науке и технологиям СНГ. –Корея-Ташкент, 2015. – С 45-50.

21. Miralimova Sh.M., Ogay D., Kutliyeva G., Sokhibnazarova Kh. Bacteriocin – producing lactobacillus strains isolated from different local sources // 8th International Conference “Probiotics, prebiotics and new food” for microbiota and human health. – Rome, 2015. – P. 104.

22. Miralimova Sh., Ogay D., Kutliyeva G., Elova N., Tulyaganov B., Aliev H. Antiulcer activity of new probiotic preparation consisting of lactic acid bacteria and propolis // 4th International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and baby foods. – Valencia, 2015. – P. 39.

23. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., Элова Н.А., Тулаганов Б., Алиев Х.У. Противоязвенная активность нового комбинированного препарата из молочнокислых бактерий и прополиса на экспериментальных моделях язвы // Микроорганизмы и биосфера: Материалы международного симпозиума. – Ташкент, 2015. – С 191.

24. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., Сохибназарова Х.А. Антимикробная, бактериоциногенная активность лактобацилл к энтерококкам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* // Микроорганизмы и биосфера: Материалы международного симпозиума. –Ташкент, 2015. – С. 203.

25. Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кутлиева Г.Д., Сохибназарова Х.А., Элова Н.А. Антимикробная активность бактериоцинов молочнокислых бактерий, выделенных из местных источников // Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству: Материалы международной научно-практической конференции. – Алматы, 2016. – С.204.

Бичими 60x84¹/₁₆. Ризограф босма усули. Times гарнитураси.

Шартли босма табағи:6т. Адади 100. Буюртма № 22.

«ЎзР Фанлар Академияси Асосий кутубхонаси» босмахонасида чоп этилган.

Босмахона манзили: 100170, Тошкент ш., Зиёлилар кўчаси, 13-уй.