

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

АНДИЖОН ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

МУХАММЕДОВ ИҚБОЛ ИЛХОМ ЎҒЛИ

PENICILLIUM BREVICAULE ALBA-CC200 VA *ASPERGILLUS
EGYPTICUS-HT166S* ЭНДОФИТ ЗАМБУРУҒЛАРИДАН ОЛИНГАН
ОШҚОЗОН ОСТИ БЕЗИ α -АМИЛАЗА ФЕРМЕНТИ
ИНГИБИТОРЛАРИНИ ҚИЁСИЙ БАҲОЛАШ

03.00.12 – Биотехнология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Мухаммедов Иқбол Илхом ўғли

Penicillium brevicaule alba-CC200 ва *Aspergillus egypticus-HT166S*
 эндофит замбуруғларидан олинган ошқозон ости беги α -амилаза
 ферменти ингибиторларини қиёсий баҳолаш..... 3

Мухаммедов Иқбол Илхом ўғли

Сравнительная оценка ингибиторов фермента панкреатической α -
 амилазы, полученных из эндофитных грибов *Penicillium brevicaule*
alba-CC200 и *Aspergillus egypticus-HT166S*..... 21

Mukhammedov Iqbol Iham o'g'li

Comparative evaluation of pancreatic α -amylase enzyme inhibitors
 obtained from endophytic fungi *Penicillium brevicaule alba-CC200* and
Aspergillus egypticus-HT166S..... 39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
 List of published works 42

МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02/30.12.2019.В.38.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

АНДИЖОН ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

МУХАММЕДОВ ИҚБОЛ ИЛХОМ ЎҒЛИ

PENICILLIUM BREVICAULE ALBA-CC200 VA *ASPERGILLUS*
EGYPTICUS-HT166S ЭНДОФИТ ЗАМБУРУҒЛАРИДАН ОЛИНГАН
ОШҚОЗОН ОСТИ БЕЗИ α -АМИЛАЗА ФЕРМЕНТИ
ИНГИБИТОРЛАРИНИ ҚИЁСИЙ БАҲОЛАШ

03.00.12 – Биотехнология

БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2021.3.PhD/B417 рақам билан рўйхатга олинган

Диссертация Андижон давлат университетида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (Ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (info-microbio@academy.uz) ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали (www.ziyounet.uz) манзилларига жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:	Рузиева Дилором Муталибовна биология фанлари номзоди
Расмий оппонентлар:	Ташмухаммедова Шохиста Собировна биология фанлари доктори, профессор Махсумханов Аҳмаджон Азамхонович биология фанлари номзоди
Етакчи ташкилот:	Самарқанд давлат университети

Диссертация ҳимояси Микробиология институти DSc.02/30.12.2019.B.38.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2022 йил «17» февраль соат 10:00даги мажлисида бўлади (Манзил: 100128, Тошкент шаҳар, Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси, 7Б уй, Микробиология институти конференция залида). Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz.

Диссертация билан Микробиология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин. () рақамли билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100128, Тошкент шаҳар, Шайхонтоҳур тумани, А.Қодирий кўчаси, 7Б уй, Микробиология институти маъмурий биноси, 5-кават, кутубхона). Тел.: (+99871)241-92-28.

Диссертация автореферати 2022 йил « 4 » февральда тарқатилди.

(2022 йил « 4 » февраль № 2 рақамли реестр баённомаси)



Арипов Тахир Фатихович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси,
б.ф.д., профессор, академик

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

Гулямова Ташхан Гафуровна
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги
илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори(PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда қандли диабет касаллигига қарши курашиш соғлиқни сақлаш тизимининг устувор йўналишларидан бири ҳисобланади. Халқаро қандли диабет федерацияси маълумотларига кўра, дунёда 415 миллион киши диабет билан касалланганлиги аниқланган. Шунингдек, қандли диабет касаллигининг 90% 2-тоифа қандли диабет бўлиб, бу нефропатия, ретинопатия ва юрак-қон томир касалликлари каби жиддий асоратларга олиб келади. Сўнги йилларда 2-тоифа диабетни даволашда қанд миқдорини камайтирувчи дориларнинг клиник самарадорлиги исботланган. Таъкидлаш жоизки, ошқозон ости беzi α -амилазасининг тижорат ингибиторлари (Акарбоза, Миглитол) бир қатор жиддий ошқозон-ичак салбий таъсирига эга бўлиб, диабет касаллигини даволашни мураккаблаштиради. Шу сабабли, табиий манбалардан профилактик ва терапевтик мақсадларда гипогликемик препаратларни яратишга қаратилган тадқиқотлар муҳим аҳамиятга эга.

Жаҳонда антидиабетик ўсимликларнинг табиий иккиламчи метаболитлари ва уларнинг ингибитор фаолликка эга эндофитлари янги дори воситаларини ишлаб чиқариш манбалари сифатида фармацевтикада кенг қўлланилмоқда. Доривор ўсимликларнинг эндофит замбуруғлари симбиоз ўсимликлар билан бир хил моддаларни, жумладан, α -амилаза ингибиторларини синтез қилиш қобилияти туфайли минимал салбий таъсирга эга бўлган гипогликемик бирикмаларнинг муқобил ишлаб чиқарувчилари сифатида истиқболли объект ҳисобланади. Эндофитлар антиоксидант, антимиқроб, иммуномодулятор, антиканцероген ва бошқа хусусиятларга қўшимча равишда гипогликемик таъсирга эга бўлиб, улар алкалоидлар, хинонлар, флавоноидлар, терпеноидлар ва бошқаларни ўз ичига олган ноёб тузилишга эга бўлган иккиламчи метаболитларнинг тез ҳосил қилувчи ва осонлик билан қайта тикланадиган манбаидир. Шу боис, антидиабетик ўсимликларнинг эндофит замбуруғларини гипогликемик бирикмаларнинг истиқболли ишлаб чиқарувчилари сифатида аниқлаш ва улар асосида юқори терапевтик фаолликка эга бўлган янги ингибитор дори воситаларини яратишга қаратилган тадқиқотлар илмий қизиқиш уйғотади ва амалий аҳамиятга эга.

Ўзбекистонда аҳолини сифатли ва юқори самарали дори воситалари билан таъминлаш мақсадида, саноат учун муҳим бўлган маҳаллий штаммлардан табиий биологик фаол бирикмаларни ажратиб олиш ва амалиётга жорий қилишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Бу борада, фаол эндофит замбуруғларни танлаш ва уларнинг амалий аҳамиятини баҳолаш бўйича муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясининг тўртинчи устивор йўналишида¹ “...фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш, дори-дармонлар нархларининг

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

асоссиз ўсишига йўл қўймаслик бўйича чора-тадбирларни амалга ошириш, аҳоли ўртасида касалланиш кўрсаткичлари пасайишини ва умр узайишини таъминлаш.” вазифалари белгилаб берилган. Мазкур вазифаларни амалга оширишда доривор ўсимликларнинг эндофит замбуруғлари томонидан ишлаб чиқариладиган гипогликемик бирикмаларнинг табиатини аниқлаш ва ўрганиш, антидиабетик препаратларни олиш усулларини ишлаб чиқиш учун улардан муқобил манбалар сифатида фойдаланишни қиёсий баҳолаш бўйича тадқиқотларни олиб бориш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2018 йил 23 январдаги ПҚ-3489-сон “Дори воситалари ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқариш ҳамда олиб киришни янада тартибга солиш чора тадбирлари тўғрисида”ги қарори, Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 30 декабрдаги ПҚ-4554-сон “Ўзбекистон республикаси фармацевтика тармоғида ислохотларни чуқурлаштиришга доир қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида” ги қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъерий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда маълум даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. “Тиббиёт ва фармацевтика” устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Гипогликемик хусусиятларга эга эндофит замбуруғларни ўрганиш бўйича жаҳон адабиётининг мавжуд маълумотларига кўра, бир қатор муҳим натижалар қўлга киритилган, хусусан, *Penicillium pimiteouiense* SGS эндофит замбуруғи экстрактининг гипогликемик таъсири (Dinesh S. ва бошқ., 2017), *Fusarium equiseti* эндофит замбуруғининг α -амилазага ингибитор фаоллиги (Ranjan A. ва бошқ., 2019), *Penicillium sp.* нинг α -глюкозидазага ингибитор фаоллиги (Minh H. ва бошқ., 2019), *P. oxalicum* метанол экстрактларининг ингибитор фаоллигининг IC₅₀ қиймати 46,73 мг/мл (Bisht R. ва бошқ., 2019), *Aspergillus awamori* штаммининг α -амилазани 81% ингибиторлик таъсири (Singh B. ва бошқ., 2015), *Aspergillus sp.* эндофит замбуруғининг антидиабетик фаоллиги (Govindappa M. ва бошқ., 2015). Умуман олганда, мавжуд маълумотлар эндофит замбуруғларнинг ингибитор табиатига эга антидиабетик бирикмаларини юқори потенциалга эга ишончли янги манбалар сифатида кўрсатади.

Мамлакатимиз олимлари томонидан ҳам бир қанча ишлар олиб борилган. ЎЗР ФА Микробиология институти “Физиологик фаол моддалар биокимёси ва биотехнологияси” лабораториясида Ўзбекистон ҳудудида ўсадиган доривор ўсимликлар эндофит замбуруғларининг гипогликемик хусусиятларини ўрганилган. Скрининг натижасида, антидиабетик доривор ўсимликлардан *Celosia cristata* ва *Helianthus tuberosus* дан ажратиб олинган энг фаол *Penicillium brevicaulae alba-CC200* ва *Aspergillus egypticus-HT166S* штаммлари танланган.

Шуни таъкидлаш керакки, МДХ мамлакатларида, шу жумладан Ўзбекистон Республикасида 2-тоифа диабет касаллигини даволаш учун мўлжалланган препаратлар ишлаб чиқарилмайди, балки чет элдан олиб келинади (савдо номлари “Acarbose” Германия, “Miglitol” Ҳиндистон ва “Voglibose” Япония). Шу муносабат билан Республикамизда антидиабетик препаратларга бўлган талабнинг ортиши, гипогликемик таъсирга эга дори воситалари ишлаб чиқариш, α -амилаза ингибиторларини ишлаб чиқарувчи эндофит замбуруғларидан фойдаланиш ва уларни диабет касаллигини даволаш амалиётига киритиш муҳум илмий ва амалий аҳамиятга эга.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Микробиология институти илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-А6-Т109 “Ўзбекистон доривор ўсимликларидаги эндофит замбуруғларининг метаболитлари α -амилаза ингибиторлари сифатида” (2015-2017 йй.) ва ПЗ-20170914133 “Антидиабетик ўсимликларнинг эндофит замбуруғларидан α -амилаза ингибиторларини олиш” (2018-2020 йй.) мавзуларидаги фундаментал ва амалий лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади эндофит замбуруғларининг танланган фаол штаммларидан ошқозон ости бези α -амилаза ингибиторларини ажратиб олиш, уларнинг кимёвий табиатини аниқлаш ва гипогликемик препаратлар ишлаб чиқариш учун улардан фойдаланиш истиқболларини қиёсий баҳолашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

P. brevicaula alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* штаммларининг ингибитор фаоллигини ошишига олиб келувчи ферментация усулларини танлаш ва ўстириш шароитларини оптималлаштириш;

ўсимлик экстрактлари ва эпигенетик модификаторларнинг танланган эндофит культураларининг ўсиши ва биофаоллигига таъсирини аниқлаш;

юқори ингибитор фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитларни экстракциялаш ва фракциялаш усулларини танлаш;

алоҳида фаол фракцияларнинг кимёвий табиатини сифат анализи, хроматографик усуллар ва масс-спектрометрия ёрдамида аниқлаш;

фаол фракцияларининг тижорат α -амилаза ингибитори акарбозага нисбатан IC_{50} қийматлари, антиоксидант ва антимикроб хусусиятларини аниқлаш;

эндофит замбуруғларининг куруқ экстрактини диабетга қарши фаоллигининг экспериментал клиник олди синовларини ўтказиш;

α -амилаза ингибиторларининг фаол штамм-продуцентлари асосида янги гипогликемик препарат тайёрлаш бўйича лаборатория регламентини ишлаб чиқиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида Микробиология институти “Саноат учун муҳим микроорганизмлар коллекцияси” лабораториясида сақланиб келаётган *Celosia cristata* ва *Helianthus tuberosus* ўсимликларидан ажратиб олинган *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* маҳаллий штаммлари олинган.

Тадқиқотнинг предметини *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* иккиламчи метаболитлари томонидан ошқозон ости беzi α -амилазасини ингибиторлаш, улар асосида гипогликемик препарат яратиш ва унинг антибактериал, антиоксидант ва гипогликемик хусусиятларини аниқлашни ташкил этади.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотни ўтказишда умумий қабул қилинган микробиологик, биокимё, биотехнология ва хроматографиянинг классик ва замонавий усулларида фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор *C. cristata* ва *H. tuberosus* ўсимликларида яшовчи *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғлари ошқозон ости беzi α -амилазасига нисбатан юқори ингибитор фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитлар ҳосил қилиши аниқланган;

эндофит замбуруғларнинг тритерпен сапонинлар ва полиметоксилланган флавоноидлари α -амилаза ингибиторлари эканлиги асосланган;

P. brevicaule alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғлари юқори антиоксидант фаолликка эга эканлиги аниқланган;

илк бор барқарор ўсиши ва юқори фаол метаболитлар ишлаб чиқариш потенциалига эга бўлган *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофитларининг маҳаллий штаммлари α -амилаза ингибиторларини ҳақиқий ишлаб чиқарувчилари бўлиб хизмат қилиши, самарадорлиги бўйича тижорат акарбоза ингибитори билан солиштириш мумкинлиги асосланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

янги импорт ўрнини босувчи гипогликемик препаратларни яратиш учун α -амилаза ингибиторларини ҳосил қилувчи *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* танланган маҳаллий штаммларидан фойдаланилиши асосланган;

α -амилаза ингибиторларини ҳосил қилувчи фаол штаммларидан янги гипогликемик дори ишлаб чиқариш учун лаборатория ва технологик регламенти ишлаб чиқилган;

“MED STANDARD” МЧЖ илмий марказида “*Penicillium brevicaule alba Thom-CC200* эндофит замбуруғининг қуруқ экстракти” аллоксан кўзғатувчи қандли диабет билан оғриган тажриба ҳайвонларда клиникадан олдинги синовлари ўтказилганда препарат экспериментал диабет шароитида глюкоза, липидлар ва бир қатор ферментлар даражасини нормаллаштириши ва мос дори препаратларидан кам бўлмаган ишончли антидиабетик фаолликка эга эканлиги аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги экспериментал маълумотларни замонавий микробиологик ва биокимёвий усуллар ёрдамида олинганлиги, диссертация натижаларининг етакчи хорижий журналларда чоп этилганлиги, Стъюдент мезонлари ва Фишер дисперсион таҳлили (ANOVA) ёрдамида олинган натижаларни статистик қайта ишлаш, шунингдек, ваколатли давлат тузилмалари томонидан диссертация тадқиқотининг амалий натижаларини тасдиқлаш ва фойдали моделга патент олиш билан асосланган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* маҳаллий штаммлари α -амилазага қарши юқори ингибитор фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитлари антиоксидант, антимиқроб таъсирларга эга. *P. brevicaule alba-CC200* штаммининг гипогликемик фаоллиги тритерпен сапонинлар, *A. egypticus-HT166S* штамми полиметоксилланган флавоноидлар билан ўзаро боғлиқ, шунингдек, экстрактларнинг биологик ва фармакологик таъсирлари аниқланиши билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти танланган маҳаллий штаммларнинг ҳар бири янги антидиабетик препаратларни ишлаб чиқиш учун объект бўлиши мумкин, бу келажакда гипогликемик препаратлар рўйхатини кенгайтириш бўйича маҳаллий фармацевтик ишлаб чиқариш имкониятларини сезиларли даражада ошишига хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* маҳаллий эндофит замбуруғлар штаммларидан α -амилаза ингибиторларини олиш бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида:

фармацевтикада ишлатиш учун панкреатик α -амилазанинг ингибиторини ҳосил қилувчи *Penicillium brevicaule alba-8E* эндофит замбуруғ штамми учун Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги томонидан фойдали моделга патент олинган (№ FAR 01470, 2019.й). Натижада, α -амилаза ингибиторини ҳосил қилувчи штамм гипогликемик фаоллигига эга бўлаган метаболитларни ишлаб чиқариш имконини берган;

P. brevicaule alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* штаммларидан ажратиб олинган иккиламчи метаболитларидан №ПЗ-20170914133 “Антидиабетик ўсимликларнинг эндофит замбуруғларидан α -амилаза ингибиторларини олиш” фундаментал лойиҳасида α -амилаза ингибитори, антиоксидант, антимиқроб ва антикоагулянт сифатида фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2021 йил 23 апрелдаги 4/1255-1191-сон маълумотномаси). Натижада, *P. brevicaule alba-CC200* штаммининг иккиламчи метаболитлари диабетга қарши дорилардан кам бўлмаган ишончли антидиабетик фаолликка эга эканлигини аниқлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 4 та халқаро ва 5 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича 17 та илмий иш чоп этилган, шулардан 7 таси илмий мақола бўлиб, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда, жумладан, 5 таси республика нашрларида, 2 таси хорижий журналларда нашр этилган, 1 та фойдали моделга патент олинган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация кириш, учта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ҳамда иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 114 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида олиб борилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва асосий вазифалари тавсифланган, тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожлантириш устувор йўналишларига мослиги, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий этиш, чоп этилган илмий ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

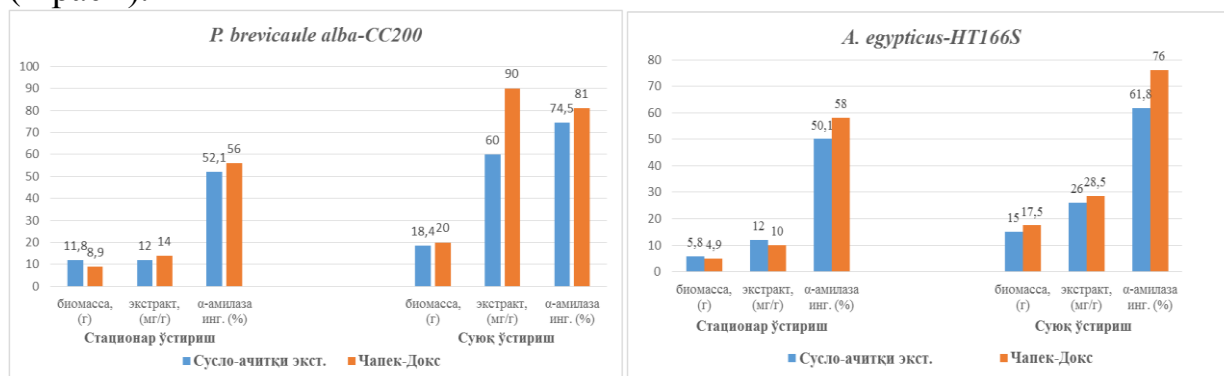
Диссертациянинг **“Эндофит замбуруғларининг умумий хусусиятлари”** деб номланган биринчи бобида антидиабетик препаратларни ишлаб чиқиш бўйича замонавий тадқиқотлар ҳолати, хусусан, 2-тоифа қандли диабет, эндофит замбуруғларни антидиабетик иккиламчи метаболитларининг ингибитор табиати, эндофитларни ферментацияси усуллари ва ўстиришни оптималлаштириш, полисахаридларни гидролиз ферментларини, хусусан, α -амилазани ингибитор қилувчи иккиламчи метаболитларининг кимёвий табиати ҳақида умумий маълумот берилган. Кўплаб чоп этилган мақолалар натижаларини танқидий таҳлил қилиш ушбу ишнинг мақсади ва асосий вазифаларини шакллантириш имконини берди.

Диссертациянинг **“Эндофит замбуруғлар иккиламчи метаболитларини ҳосил бўлишини оптималлаштириш ва улардан α -амилаза ферменти ингибиторларини тозалаш усуллари”** деб номланган иккинчи бобида тадқиқот объект, материал ва тадқиқот усуллари батафсил ёритилган. Тадқиқот усулларида *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* маҳаллий штаммларининг ўстириш шароитларини оптималлаштириш, ингибитор бирикмаларни экстракция усуллари, иккиламчи метаболитларни сифат ва миқдорий таркибини таҳлил қилиш, ЮҚХ усуллари, колонкали хроматография, ТИС-хроматография, масс-спектрометрия таҳлил усуллари, фаол фракцияларни антокидант ва антимиқроб фаолликларини аниқлаш усуллари ҳақида маълумот берилган.

Диссертациянинг **“ α -амилаза ингибиторларини ҳосил қилувчи *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штаммларининг ўстириш шароитларини оптималлаштириш ва иккиламчи метаболитлар хусусиятларини ўрганиш”** деб номланган учинчи бобида танлаб олинган эндофит замбуруғларининг α -амилазани ингибиторловчи иккиламчи метаболитлар фаоллигини ошириш учун ўстириш шароитларини оптималлаштириш, олинган иккиламчи метаболитларни кутбли ва кутбсиз эритувчилар ёрдамида дифференциал фракциялаш, юқори ингибитор фаолликка эга бўлган фракцияларнинг сифат ва миқдорий таҳлиллари, хроматографик усуллар ва масс-спектрометрия таҳлиллари ёрдамида идентификациялаш бўйича тадқиқот натижалари келтирилган.

Ўзбекистонда доривор ўсимликларнинг эндофит микробиотасини ўрганишда *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғлари акарбоза препаратига нисбатан анча паст IC₅₀ қийматига эга эканлиги аниқланган, бунинг натижасида улар кейинги тадқиқотлар учун истиқболли объектлар сифатида танлаб олинди. Аксеник ўстириш шароитида ингибитор моддаларнинг табиати ва уларни ишлаб чиқариш масаласи очик қолди. Ингибитор фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитларни ҳосил қилиш даражасини ошириш учун углевод манбалари (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза) ва азот манбалари (NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, казеин, пептон, ачитқи экстракти) озуқа муҳитлари скрининг қилинди ва оптималлаштирилди. Тажрибада “Материаллар ва тадқиқот усуллари” бобида келтирилган турли хил таркибдаги бешта озуқа муҳити ишлатилган.

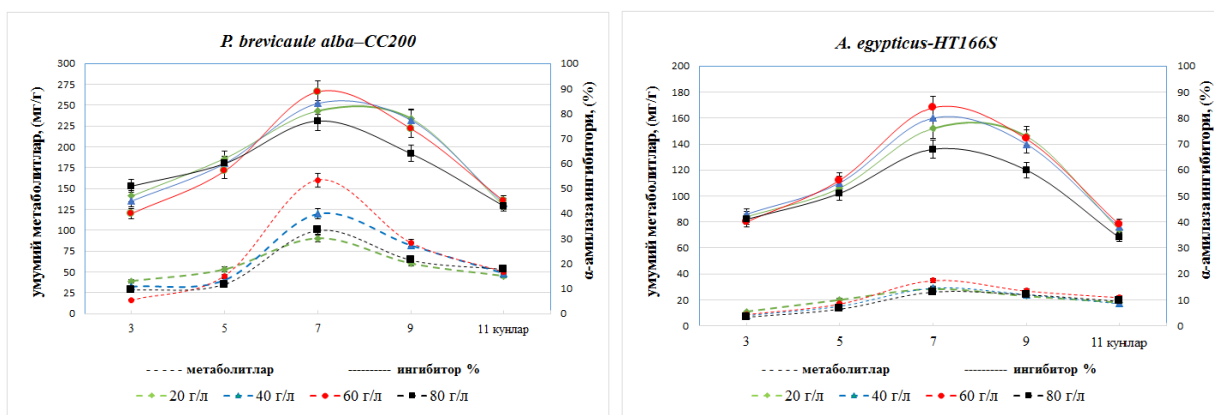
Олинган маълумотларга кўра, юқори ингибитор фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитларнинг энг юқори миқдорини иккита муҳит - Чапек-Докс ва Сусло-ачитқи экстрактини ўз ичига олган озуқа муҳити таъминлаган (1-расм).



1-расм. Ҳар хил озуқа муҳити ва ўстириш шароитларида ўстирилган эндофит замбуруғлар экстрактларининг ингибитор фаоллиги

Асосий муҳит сифатида Чапек-Докс озуқа муҳити ишлатилган, бу муҳитнинг ферментация пайтида *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамларининг ингибитор фаоллиги суяқ ўстириш шароитининг 7-кунда мос равшда $81 \pm 0,26\%$ ва $76 \pm 0,22\%$ ни ташкил этди. Эндофитларни тебраткич ва тинч шароит билан солиштирилганда, суяқ ўстиришда иккиламчи метаболитларнинг ҳосил бўлиш даражаси ва уларнинг ингибитор фаоллиги юқори эканлиги аниқланди. Тажриба учун олинган углевод манбаларидан сахароза муҳити лактоза, мальтоза ва глюкоза билан солиштирилганда юқори натижалар олинган. Шундай қилиб, *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамларининг α-амилазага максимал ингибиторлик даражасини сахароза таъминлади ва мос равишда $81 \pm 0,26\%$ ва $76 \pm 0,22\%$, глюкоза $72 \pm 0,29\%$ ва $58 \pm 0,25\%$, лактоза $63 \pm 0,32\%$ ва $63 \pm 0,26\%$, ва мальтозадан фойдаланилганда $66 \pm 0,30\%$ ва $61 \pm 0,25\%$ ни ташкил қилди. Ўсиш динамикасида Чапек муҳити таркибидаги сахарозанинг бошланғич концентрациясини танлаш 2%, 4%, 6% ва 8% оралиғида амалга оширилди. 60 г сахароза концентрациясидан фойдаланганда *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамлари учун α-амилаза ингибиторининг энг юқори

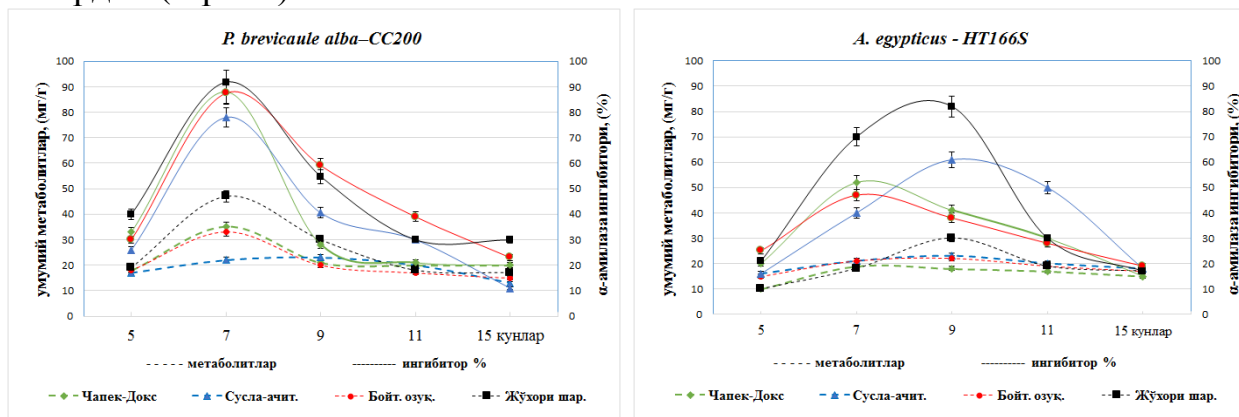
киймати $88,7 \pm 0,27\%$ ва $84 \pm 0,29\%$ куруқ экстракти миқдори $160 \pm 0,25$ мг/г ва $34 \pm 0,26$ мг/г ни ташкил қилди (2- расм).



2-расм. *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* ўстиришда иккиламчи метаболитларнинг ингибитор фаоллигига сахарозанинг бошланғич концентрациясига боғлиқлиги динамикаси

Азот манбаларининг ингибитор фаолликка эга иккиламчи метаболитлар даражасига таъсирини ўрганишда NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, казеин, пептон ва ачитқи экстракти билан Чапек муҳитида фойдаландик. Олинган маълумотлар ноорганик азотнинг оптимал манбаи NaNO_3 эканлигини кўрсатди. Органик азот манбалари орасида казеин ва ачитқи экстракти бўлган озуқа муҳити энг юқори таъсир кўрсатди, бу ерда *P. brevicaula alba-CC200* $94,3 \pm 0,27\%$ ва *A. egypticus-HT166S* $88 \pm 0,32\%$ ни ташкил этди. Натижада, биз юқори гипогликемик фаолликка эга бўлган иккиламчи метаболитларни оширишга ёрдам берадиган озуқа муҳитининг таркибини танладик.

Маълумки, суюқ ўстиришга муқобил бўлган турли арзон қаттиқ субстратлардан фойдаланиб камроқ энергия сарфлайдиган қаттиқ фазаги ферментация бўлиб, кўпинча ишлаб чиқариш чиқиндилари ҳисобланади. Шундай қилиб, биз *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* қаттиқ фазаги ферментациясини “Материаллар ва тадқиқот усуллари” бобида кўрсатилганидек, озуқа моддалар билан намланган буғдой кепагида амалга оширдик (3-расм).



3-расм. Субстратни турли хил озуқа муҳитлари билан намланганда *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамmlарининг куруқ экстракт ва α -амилаза ингибиторларини тўпланиш динамикаси

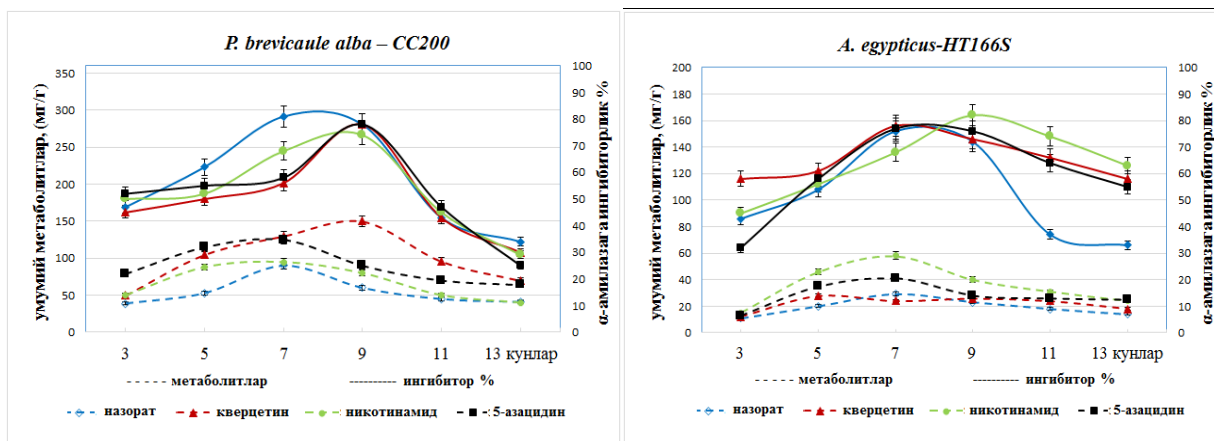
Қаттиқ фазали ферментация шароитида *P. brevicaule alba-CC200* α -амилаза ингибиторини ҳосил қилувчи умумий экстракт даражаси *A. egypticus-HT166S* га қараганда юқори бўлганлиги аниқланди. Экспериментал шароитида иккиламчи метаболитларнинг максимал ингибитор фаоллиги субстрат жўхори шарбати билан намланганда кузатилди ва *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* да мос равишда $91,8 \pm 0,31\%$ ҳамда $82 \pm 0,34\%$ ни ташкил қилди.

Шуни алоҳида таъкидлаш керакки, эндофит замбуруғлардан амалий фойдаланишнинг асосий муаммоларидан бири аксеник шароитда такрорий монокультурада иккиламчи метаболитлар ишлаб чиқаришнинг сезиларли даражада камайиши бўлиб, бу маълум метаболит йўлларининг симбиоз ўсимликларининг метаболитларига боғлиқлигини акс эттиради.

Уч йилдан ортиқ вақт давомида кўп марта монокультивация жараёнида биомасса ва иккиламчи метаболитларнинг кўпайишини кузатиш шуни кўрсатадики, *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғлари кўплаб эндофит микроорганизмлардан фарқли ўлароқ суяқ ва қаттиқ фазада мақсадли ўстирилганда ингибитор бирикмаларни ишлаб чиқаришда барқарор ўсишни таъминлаш хусусиятига эга.

Шунга қарамай, мақсадли маҳсулотларни ишлаб чиқариш даражасининг ўсимлик метаболитларига боғлиқлиги имкониятини ҳисобга олган ҳолда, биз қуйидаги схема бўйича симбиоз ўсимлик экстрактлари ва улар билан боғлиқ бўлмаган эндофитларга ўсимлик экстрактларининг таъсирини ўргандик: *H. tuberosus* - *A. egypticus-HT166S*, *C. cristata* - *P. brevicaule alba-CC200*, *H. tuberosus* - *P. brevicaule alba-CC200* ва *C. cristata* - *A. egypticus-HT166S*. Тажрибаларимиз натижасида биз симбиоз ўсимлик экстрактлари фақат ўз эндофитларига ижобий таъсир кўрсатишини аниқладик, бу эса ўз навбатида *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* да биомасса ва иккиламчи метаболитларининг ҳосил бўлишини мос равишда 1,4 ва 2,5 баробарга оширди.

Мақсадли иккиламчи метаболитлар ҳосил қилишини кучайтириш учун аксеник ўстириш шароитида эндофитни метаболит профилига таъсир қилувчи омиллардан бири ҳозирги вақтда ядро оксилларини постсинтетик модификациялашга ва хроматин ҳолатига таъсир қилувчи эпигенетик модификаторлардан гистон диацитилаз ва ДНК метилтрансфераза ингибиторлари ҳисобланади. Тажрибаларимизда никотинамид, 5-азацитидин ва кварцетинни *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* культурал муҳитига қўшдик. Олинган маълумотлар шуни кўрсатадики, барча ишлатилган модификаторлар иккала эндофитнинг иккиламчи метаболитлар ҳосил бўлишини оширди, аммо ишлаб чиқарилган иккиламчи метаболитларнинг ингибитор фаоллигини сезиларли даражада оширмади. Шундай қилиб, кварцетин, 5-азацитидин ва никотинамид иштирокида ўсишнинг 7-кунинида *P. brevicaule alba-CC200* иккиламчи метаболитлар ҳосил бўлиши $150 \pm 0,31$ мг/г, $120 \pm 0,29$ мг/г ва $80 \pm 0,30$ мг/г ни, *A. egypticus-HT166S* да $24 \pm 0,27$ мг/г, $41 \pm 0,30$ мг/г ва $58 \pm 0,29$ мг/г ва назорат билан солиштирилганда $90 \pm 0,23$ мг/г ва $28,5 \pm 0,24$ мг/г ни ташкил қилди (4-расм).



4-расм. Эпигенетик модификаторларнинг *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* иккиламчи метаболитларини ҳосил бўлиши ва α -амилаза ингибитори фаоллигига таъсири

Иккиламчи метаболитларни ажратиб олиш учун олинадиган бирикманинг табиатига қараб турли хил қутбلى ва қутбсиз эритувчиларидан фойдаланилади. Биз *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамлари суяқ ва стационар шароитда ўстирилган биомассалар 7 хил эритувчилар этилацетат, метанол, этанол, ацетонитрил, сув, гексан ва бутанол билан экстракция қилиб иккиламчи метаболитларнинг ингибитор фаоллигини аниқладик. Этилацетат билан экстракция қилинганда *P. brevicaula alba-CC200* иккиламчи метаболитлар $90 \pm 0,23$ мг/г ва ингибитор фаоллик $81 \pm 0,26\%$ ни, *A. egypticus-HT166S* штаммида иккиламчи метаболитлар $28,5 \pm 0,24$ мг/г ва ингибитор фаоллик $76 \pm 0,22\%$ ни ташкил қилди. Юқори ингибитор фаолликка эга метаболитларни ажратиб олиш учун *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* бошланғич этилацетат экстракти метанол, гексан, сув ва бутанол билан (1:1) аралашмаси кетма-кет экстракция қилинди. Тўртта фракция олинди: метанол, гексан, сув ва бутанол. Дифференциал фракциялаш натижасида экстракт миқдори ва ингибитор фаоллигининг асосий қисми метанол фракциясига ўтганлиги аниқланди. Бунда, *P. brevicaula alba-CC200* да $78 \pm 0,21$ мг ва $80,7 \pm 0,25\%$ ни, *A. egypticus-HT166S* да $19 \pm 0,26$ мг ва $75,4 \pm 0,27\%$ ни ташкил қилди.

Олинган метанол фраксияларининг сифат таҳлили шуни кўрсатдики, саккизта кимёвий синф бирикмаларидан (терпеноидлар, сапонинлар, феноллар, алкалоидлар, антрахинонлар, юрак гликозидлари ва флавоноидлар) *P. brevicaula alba-CC200* штаммининг метанол фракциясида учта бирикмалар синфи - терпеноидлар, сапонинлар ва юрак гликозидлари, *A. egypticus-HT166S* штаммининг метанол фракциясида терпеноидлар, антрахинонлар, флаваноидлар ва танинлар мавжудлиги аниқланди.

Шунингдек, *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракциялари юққа қатламли хроматография (ЮҚХ) усули билан таҳлил қилинди. Бензол: метанол (5: 1) элюент тизимидаги метанол фракциясининг хроматография натижалари *P. brevicaula alba-CC200* штаммида 6 та ва *A. egypticus-HT166S* штаммида 12 та Rf қийматларига эга бўлган моддалар ажралди. *P. brevicaula alba-CC200* штаммининг хроматографик пластинкадаги №5 ва №6 қийматларининг ингибитор фаолликлари

72,6±0,37% ва 60,5±0,38% эканлиги аниқланди. Rf қийматлари 0,86 ва 0,74 бўлган *A. egypticus-НТ166S* штаммининг ингибитор фаоллиги 72,9 ± 0,36% ва 41,8 ± 0,34% ни ташкил этди (1-жадвал).

1-жадвал

P. brevicaula alba-CC200 ва *A. egypticus-НТ166S* метанол фракцияларининг ЮҚХ тасвири

<i>P. brevicaula alba-CC200</i>				<i>A. egypticus-НТ166S</i>			
	№	Rf қиймати	α-амилаза ингибиторлиги, (%)		№	Rf қиймати	α-амилаза ингибиторлиги, (%)
	1	0,83	15,3±0,35		1	0,97	4,3±0,38
	2	0,74	29,3±0,41		2	0,86	72,9±0,36
	3	0,59	13±0,38		3	0,74	41,8±0,34
	4	0,57	37,6±0,36		4	0,60	21±0,41
	5	0,49	72,6±0,37		5	0,54	5,7±0,38
6	0,46	60,5±0,38	6		0,52	25,1±0,34	
			7		0,48	27,2±0,36	
			8		0,44	12,5±0,36	
			9		0,37	6,1±0,39	
			10		0,30	-	
			11		0,22	-	
			12	0,13	-		
Элюент тизими бензол:метанол (5:1) нисбатда. Фосфор-молибден кислотасининг 20% спиртдаги эритмаси билан ишлов берилган				Элюент тизими бензол:метанол (5:1) нисбатда. 254 нм ультрабинафша нур остидаги тасвири			

ЮҚХ томонидан ажратиб олинган юқори фаол ингибитор моддаларни сифат реакциялари ўтказилганда *P. brevicaula alba-CC200* да сапонинлар, *A. egypticus-НТ166S* да флавоноидларга хос тестлар ижобий натижаларни кўрсатди. Иккала штаммининг метанол фракциялари адсорбцион колонка хроматографияси усули билан тозаланди (2-жадвал).

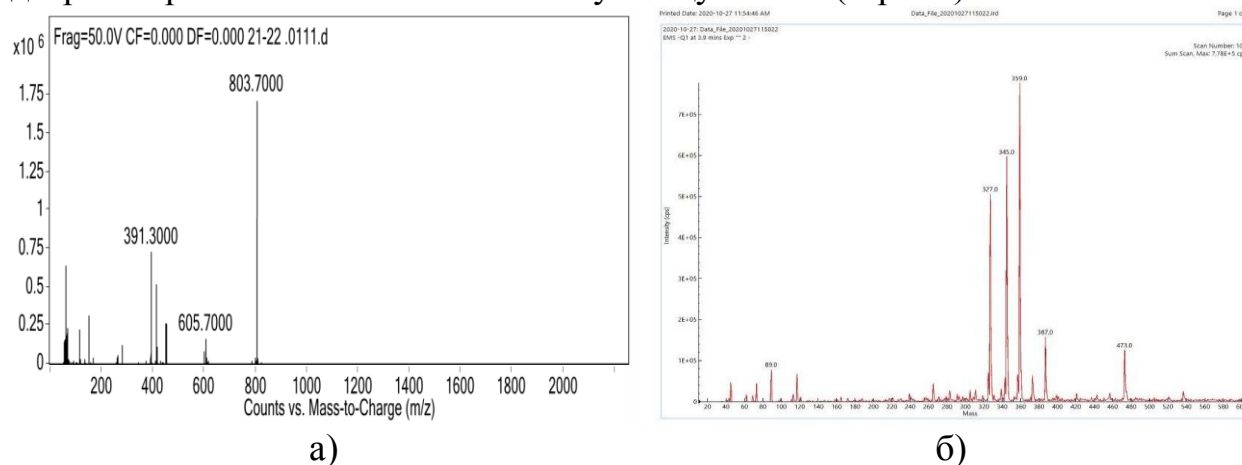
2-жадвал

P. brevicaula alba-CC200 ва *A. egypticus-НТ166S* метанол фракциясининг колонка хроматография усули билан тозиланган намуналарнинг қурук миқдори ва α-амилазага ингибитор фаоллиги

<i>P. brevicaula alba-CC200</i>				<i>A. egypticus-НТ166S</i>			
№	Намуна лар	Қурук оғирлиги, (мг)	α-амилаза ингибиторлиги, (%)	№	Намуна лар	Қурук оғирлиги, (мг)	α-амилаза ингибиторлиги, (%)
Қурук метанол фракцияси 500 мг			80,7±0,25	Қурук метанол фракцияси 500 мг			75,4±0,27
1	A-1	25±0,36	-	1	A-1	27±0,29	14,6±0,29
2	B-2	31±0,32	-	2	B-2	33±0,27	15,2±0,29
3	C-3	43±0,39	12,4±0,27	3	C-3	40±0,37	28,6±0,30
4	D-4	61±0,38	-	4	D-4	31±0,35	17,7±0,27
5	E-5	76±0,32	15,6±0,29	5	E-5	32±0,33	25±0,28
6	F-6	59±0,43	-	6	F-6	17±0,43	15±0,34
7	G-7	98±0,39	76,5±0,27	7	G-7	31±0,43	24,3±0,29
8	H-8	51±0,40	27,2±0,28	8	H-8	21±0,37	7±0,26
9	J-9	15±0,44	-	9	J-9	42±0,39	24±0,30
				10	K-10	71±0,40	76,2±0,29
				11	L-11	41±0,41	28,2±0,28
				12	M-12	38±0,38	19,6±0,30
				13	N-13	26±0,39	15,6±0,33
				14	O-14	15±0,37	18,8±0,31

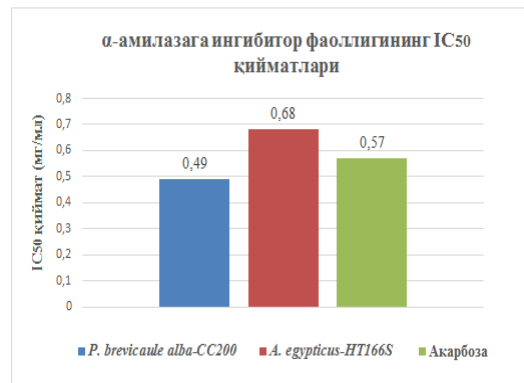
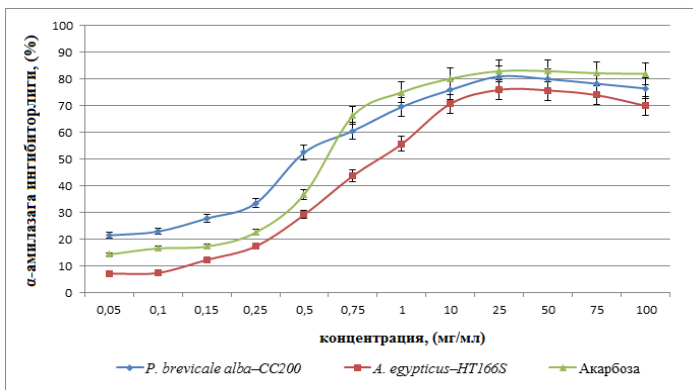
P. brevicaula alba-CC200 штамми G-7 фракциясининг ингибитор фаоллиги $76,5 \pm 0,27\%$ ва *A. egypticus-HT166S* штамми K-10 фракциясининг ингибитор фаоллиги $76,2 \pm 0,29\%$ ни ташкил қилди. Вакумли буғлатиш йўли билан фаол намуна куритилганда G-7 фракцияси оқ аморф кукун ҳосил қилиб унинг куруқ миқдори $98 \pm 0,39$ мг ни ташкил этди. K-10 фракцияси вакумли буғлатиш йўли билан куритилганда сариқ кукун ҳосил бўлди.

ЎзР ФА Биоорганик кимё институти илмий ходимлари билан биргаликда тозаланган фракцияларни масс-спектрометрия таҳлили ёрдамида идентификация қилинди. Натижада *P. brevicaula alba-CC200* штаммининг юқори ингибитор фаоллигига эга G-7 фракцияда 803,7 m/z, 391,3 m/z ва 605,7 m/z малекуляр массаларга эга бўлган бирикмалар аниқланди. Илмий манбаларга кўра 803,7 m/z малекуляр массага эга моддалар пентациклик тритерпен сапонинларни ташкил қилади. Шу муносабат билан, 803,7 m/z малекуляр массасига кўра, тозаланган фракциянинг ингибитор фаоллиги пентациклик тритерпен сапонинлар билан боғлиқ. Шунингдек, *A. egypticus-HT166S* штаммининг K-10 фракцияси масс-спектрометрия ёрдамида таҳлил қилинганда 327,0 m/z, 345,0 m/z ва 359,0 m/z малекуляр массаларга эга бўлган бирикмалар аниқланди. Натижада 327,0 m/z, 345,0 m/z ва 359,0 m/z малекуляр массаларга эга бўлган бирикмалар полиметоксилланган флавоноидлар (ПМФ) эканлиги илмий манбалардан маълум бўлди. ПМФ – флавоноидларнинг кичик синфига мансуб бўлиб, унда гидроксилларни деярли барчаси метилланиш билан тўсиб қўйилган (5-расм).



5-расм. Тозаланган фаол намуналарнинг масс-спектрометрия анализи. а) *P. brevicaula alba-CC200* тозаланган фаол фракциясининг G-7 намунаси. б) *A. egypticus-HT166S* тозаланган фаол фракциясининг K-10 намунаси

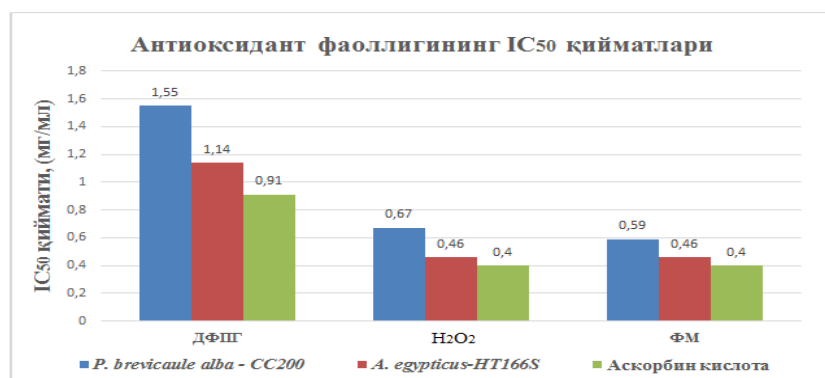
Тадқиқотларимизнинг кейинги босқичида *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг биологик фаолликлари ўрганилди. Танланган штаммлар экстрактларининг турли концентрациялари ингибитор фаоллиги ва IC_{50} қиймати бўйича акарбоза тижорат препарати билан таққосланди. IC_{50} биологик маҳсулот самарадорлигининг кўрсаткичи бўлиб, у 50% таъсир қилиш учун зарур бўлган модданинг миқдорини белгилайди, бу қиймат қанчалик паст бўлса модданинг таъсири шунчалик юқори бўлади (6-расм).



6-расм. *P. brevicaulis alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг ингибитор фаоллиги ва IC₅₀ қийматлари.

P. brevicaulis alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг 25 мг/мл концентрацияси α-амилаза ингибиторлигининг юқори фаоллигини таъминлади. Шунингдек, тижорат ингибитори аскарбозанинг IC₅₀ қиймати 0,57 мг/мл ни, *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияси IC₅₀ қиймати 0,68 мг/мл ва *P. brevicaulis alba-CC200* метанол фракциясининг IC₅₀ қиймати 0,49 мг/мл ни ташкил қилди. Бу эса *P. brevicaulis alba-CC200* метанол фракцияси тижорат ингибитори аскарбозага нисбатан паст концентрацияда ҳам юқори ингибитор фаолликка эга эканлигини кўрсатади.

Қандли диабетда гипергликемия туфайли фаол эркин радикалларнинг ортиқча шаклланиши кузатилади. Эркин радикалларнинг кўпайиши диабет ва унинг асоратларини тезлаштиради. Антиоксидант воситалари билан оксидловчи стрессни камайтириш, диабет билан боғлиқ асоратларни камайтиришнинг самарали стратегиясидир. Антиоксидант фаоллигини аниқлаш учун *P. brevicaulis alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғларининг метанол фракциялари олинди. *In vitro* шароитда антиоксидант фаоллигини аниқлаш учун 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ), водород пероксид (H₂O₂) ва фосфомолибден (ФМ) усулларидан олинган натижалар асосида IC₅₀ қийматлари ҳисобланди (7-расм).

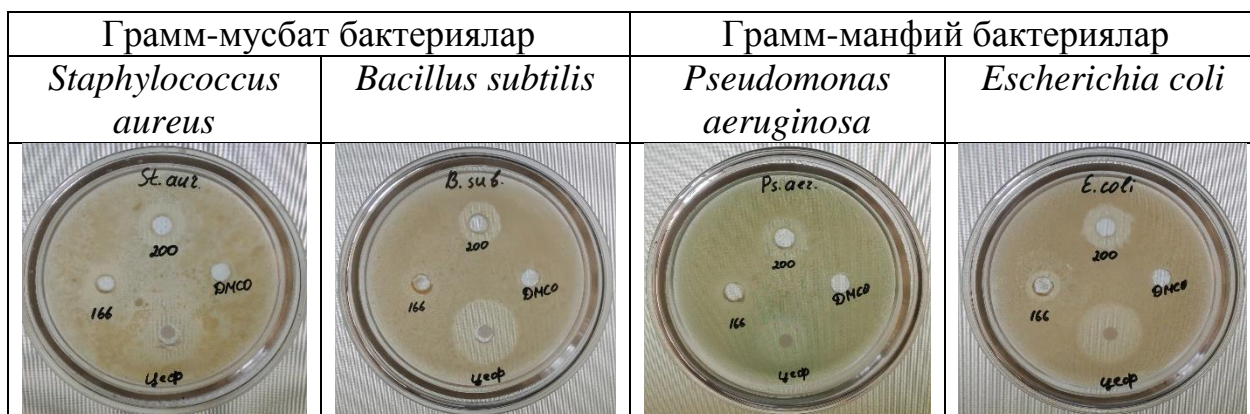


7-расм. *P. brevicaulis alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг антиоксидант фаолликларини аскарбин кислота фаоллигига нисбатан IC₅₀ қийматлари

Шу билан бирга, *P. brevicaulis alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штаммларининг ДФПГ учун IC₅₀ қийматлари 1,55 мг/мл ва 1,14 мг/мл ни,

аскорбин кислотатада 0,91 мг/мл ни, H₂O₂ учун IC₅₀ қийматлари мос равишда 0,67, 0,46 ва 0,40 мг/мл ни, шунингдек ФМ учун IC₅₀ қийматлари мос равишда 0,59, 0,46 ва 0,40 мг/мл ни ташкил қилди. Эндофит замбуруғларининг экстрактлари антиоксидант таъсирига эга бўлиб, 2-тоифа диабет касаллигини даволашда янада самарали ҳисобланади.

P. brevicaule alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* экстрактининг метанол фракциялари диффузия-чуқур усули ёрдамида қуйидаги шартли патоген бактерияга қарши фаоллиги аниқланди: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ва *Staphylococcus aureus* (8-расм ва 3-жадвал).



8-расм. *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг антибактериал фаоллиги
166 - *A. egypticus-HT166S*; 200 - *P. brevicaule alba-CC200*; ДМСО - диметил сулфоксид; Цев – Цефтриаксон

3-жадвал

P. brevicaule alba-CC200 ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракцияларининг патоген микроорганизмлар ўсишини ингибирлаш зоналари

№	Штамм	Антибактериал фаоллик (ўсишини ингибирлаш зоналари (мм))			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>P. brevicaule alba-CC200</i>	18±0,19	17±0,18	17±0,17	18±0,17
2	<i>A. egypticus-HT166S</i>	17±0,17	-	-	13±0,16
Антибиотик					
3	Цефтриаксон	23±0,01	27±0,01	21±0,02	26±0,01
4	ДМСО	-	-	-	-

Ҳар иккала штаммлар метанол фракцияларининг 10 мг/мл концентрациялари грамм-мусбат ва грамм-манфий шартли патоген бактерияларига антибактериал фаоллиги аниқланди. Шунингдек, *P. brevicaule alba-CC200* нинг метанол фракцияси сезиларли антибактериал фаолликка эга эканлиги аниқланди: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* ва *E. coli* шартли патоген бактерияларининг ўсишини ингибирлади.

Шундай қилиб, олинган маълумотларга кўра, *P. brevicaule alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* эндофит замбуруғининг метанол фракциялари ингибиторлик билан бирга антиоксидант, антибактериал намоён қилади, бу

эса уларнинг комплекс антидиабет воситалар сифатида салоҳиятини оширади.

2 хил синовдан ўтган усуллар сифатида Чапек озуқа муҳитида суяқ остириш йўли билан олинган ферментация субстратидан α -амилаза ингибиторини олишнинг энг самарали ва тежамкор усули деб белгиланди. Бу усул асосида α -амилаза ингибитори *P. brevicaula alba-CC200* эндофит замбуруғидан куруқ экстракт олишнинг лаборатория усули ишлаб чиқилди. Натижада, α -амилаза ингибиторини 10 вазн % (вазн/вазн; W/W) ҳосил қилиши билан олинади.

“MED STANDART” МЧЖ илмий маркази томонидан “*Penicillium brevicaula alba Thom-CC200* эндофит замбуруғининг куруқ экстракти” препаратининг аллоксан кўзғатувчи қандли диабет билан оғриган экспериментал ҳайвонларда ўтказилган клиникадан олдинги синовлари конда глюкоза, холестерин пасайганлигини, паст зичликдаги липопротеинлар (ПЗЛП) ва жуда паст зичликдаги липопротеинлар (ЖПЗЛП), юқори зичликдаги липопротеинлар (ЮЗЛП), триглицеридлар ва бир қатор ферментлар даражасининг ошиши кузатилди.

ХУЛОСА

1. Озуқа муҳитларини скрининг қилинганда Чапек-Докс муҳити асосий озуқ сифатида танланди, бунда иккиламчи метаболитларнинг энг юқори ҳосил бўлишини таъминлаган ҳолда, *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* штамmlарининг ингибитор фаоллиги суяқ ўстиришнинг 7-кунида 81% ва 76% ни ташкил этди. *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* Чапек-Докс муҳитида ўстирилганда озуқа муҳитининг асосий компонентлари (углерод ва азот манбалари)нинг оптимал нисбатлари танланди. Натижада, штамmlарнинг α -амилазага қарши ингибитор фаоллиги дастлабки 81% ва 76% дан 94,3% ва 88% га кўтарилганлиги қайд этилди.

2. Қаттиқ фазали ферментация шароитида буғдой кепаги жўхори шарбати билан намлантирилганда *P. brevicaula alba-CC200* штамми 91,8% гача, *A. egypticus-HT166S* 82% гача ингибитор фаоллигини оширади, бу ингибиторларни олишнинг муқобил усули сифатида ҚФФ самарадорлигини кўрсатади. Ўсимлик экстрактлари ва эпигенетик модификаторларнинг таъсирини ўрганишда уларнинг ўсиши ва иккиламчи метаболитларнинг тўпланишига ижобий таъсирини намоён қилди.

3. Дифференциал фракциялаш натижасида биоактив метаболитларнинг асосий қисми этилацетат экстрактдан метанол фракциясига ўтиши аниқланди. Бунда, *P. brevicaula alba-CC200* метанол фракцияси 78 мг ва 80,7%, *A. egypticus-HT166S* 19 мг ва 75,4% ни ташкил қилди.

4. *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол экстрактларини адсорбсион колонкали хроматография усулида тозалаш натижасида ингибитор фаоллиги 76,5% ва 76,2% бўлган энг фаол фракциялар аниқланди. LC-MS таҳлили натижасида *P. brevicaula alba-CC200* нинг

ингибитор фаоллиги тритерпен сапонинлар, *A. egypticus-HT166SC* нинг ингибитор фаоллиги полиметоксилланган флавоноидлар билан боғлиқлиги аниқланди.

5. *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* шартли патогенларига қарши ҳар иккала штаммларининг метанол фракциясининг антибактериал фаоллигини ўрганишда *P. brevicaula alba-CC200* нинг метанол фракцияси антибактериал таъсирга эга эканлиги аниқланди, бу эса бир вақтнинг ўзида 4 шартли патогенларга юқори ингибитор таъсир кўрсатади. *P. brevicaula alba-CC200* ва *A. egypticus-HT166S* метанол фракциялари шунингдек, антиоксидант фаолликка эга аскорбин кислотасининг антирадикал фаоллигини баҳолаш шуни кўрсатдики, штаммларнинг метанол фракциялари ДФПГ, водород пероксид ва фосфомолибден радикаллари боғлаш хусусиятига эга эканлигини кўрсатди, улар юқори антиоксидант фаолликка эга бўлган гуруҳга тегишли бўлиб, уларни кейинги тадқиқотлар учун истиқболли деб қайд этилди.

6. Лаборатория регламенти ишлаб чиқилди, унда α -амилаза ингибитори бўлган *P. brevicaula alba-CC200* эндофит замбуруғидан қуруқ экстракт олишнинг технологик схемаси таклиф қилинган ва қўлланилмоқда. Натижада, α -амилаза ингибиторини 10 вазндаги % (вазн/вазн; W/W) олинди.

7. “MED STANDART” МЧЖ илмий марказида “*Penicillium brevicaula alba Thom-CC200* эндофит замбуруғининг қуруқ экстракти” препаратининг *in vivo* жонли ҳайвон намуналарида диабетга қарши фаоллиги бўйича клиникадан олдинги тадқиқотлар ўтказилди. Натижада, ушбу препарат мос дори препаратлардан кам бўлмаган ишончли антидиабетик фаолликка эга эканлиги, экспериментал диабет шароитида глюкоза, липидлар ва бир қатор ферментларни нормаллаштириши аниқланди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.В.38.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ МИКРОБИОЛОГИИ
АНДИЖАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МУХАММЕДОВ ИҚБОЛ ИЛХОМ ЎҒЛИ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА
ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ α -АМИЛАЗЫ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ
ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ *PENICILLIUM BREVICAULE ALBA-CC200* И
*ASPERGILLUS EGYPTICUS-HT166S***

03.00.12 – Биотехнология

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

Ташкент – 2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2021.3.PhD/B417

Диссертация выполнена в Андижанском государственном университете
Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме) размещен на веб-странице Научного совета (info-microbio@academy.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet.uz).

Научный руководитель: Рузиева Дилором Муталибовна
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: Тошмухаммедова Шохиста Собировна
доктор биологических наук, профессор

Махсумхонов Ахмаджон Азамхонович
кандидат биологических наук

Ведущая организация: Самаркандский государственный университет


Защита диссертации состоится «17» февраль 2022 года в 10:00 часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.B.38.01 при Институте микробиологии (Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий, 7Б, конференц-зал Института микробиологии. Тел.: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, факс: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz).


С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института микробиологии (зарегистрировано за №___). Адрес: 100128, г.Ташкент, Шайхонтохурский район, ул. А.Кадырий, 7Б, административное здание Института микробиологии, 5-й этаж, библиотека. Тел.: (+99871) 241-92-28.


Автореферат разослан: « 4 » февраль 2022 г.

(реестр протокола рассылки № 2 от « 4 » февраль 2022 г.).




Арипов Тахир Фатихович
Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор, академик


Жураева Рохилия Назаровна
Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, к.б.н. старший научный сотрудник


Гулямова Ташхан Гафуровна
Председатель Научного семинара при Научном
совете по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация к диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире борьба с заболеванием сахарного диабета является одной из актуальных и устойчивых направлений системы здравоохранения. По данным Международной диабетической федерации в мире порядка 415 миллионов людей больны диабетом. Из них 90% случаев диабета составляет сахарный диабет 2 типа, который приводит к серьезным осложнениям, таким как нефропатия, ретинопатия и сердечно-сосудистые заболевания. В последние годы доказана клиническая эффективность сахароснижающих препаратов при лечении диабета 2 типа. Следует отметить, что коммерческие ингибиторы панкреатической α -амилазы (Акарбоза, Миглитол) обладают рядом серьезных побочных гастроинтестинальных явлений, осложняющих лечение диабета. В этой связи, исследования направлены на создание натуральных гипогликемических препаратов профилактического и терапевтического назначения из природных источников являются актуальными.

Во всем мире естественные вторичные метаболиты противодиабетических растений и их эндофиты, обладающие ингибирующей активностью, широко используются в фармацевтике в качестве источников для получения новых лекарственных препаратов. Эндофитные грибы лекарственных растений за счет способности синтезировать те же самые вещества, что и растение-хозяин, в том числе и ингибиторы α -амилазы, являются весьма перспективным объектом как альтернативные продуценты гипогликемических соединений с минимальными побочными эффектами. Эндофиты являются быстро растущим и легко воспроизводимым источником вторичных метаболитов с уникальной структурой, включая алкалоиды, хиноны, флавоноиды, терпеноиды и др., которые помимо антиоксидантных, антимикробных, иммуномодуляторных, антиканцерогенных и других свойств обладают гипогликемическим действием. В этой связи исследования, направленные на изучение эндофитных грибов антидиабетических растений - перспективных продуцентов гипогликемических соединений, с целью создание на их основе новых ингибиторных препаратов с высокой терапевтической активностью представляют научный интерес и имеют практическое значение.

В целях обеспечения населения Узбекистана качественными и высокоэффективными лекарственными препаратами уделяется большое внимание выделению и внедрению в практику биологических активных веществ выделенных из местных промышленно-важных штаммов грибов. В этой связи, получены определённые результаты по отбору активных эндофитных грибов и оценке их практического значения. В четвёртом перспективном направлении Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены задачи «дальнейшее развитие фармацевтической промышленности и улучшение обеспечения населения и медицинских учреждений доступными, качественными лекарственными средствами и изделиями медицинского назначения, реализация мер по

недопущению необоснованного роста цен на них, обеспечение снижения показателей заболеваемости и повышения продолжительности жизни населения»¹. В целях реализации поставленных задач, исследования по выявлению и изучению природы гипогликемических соединений, продуцируемых эндофитными грибами лекарственных растений, проведение исследований по сравнительной оценке их использования в качестве альтернативных источников для разработки методов получения препаратов противодиабетического назначения являются актуальными и своевременными.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Указом Президента Республики Узбекистан УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан в 2017-2021 гг.» от 7 февраля 2017 года, Постановлением Президента Республики Узбекистан ПП-3489 «О мерах по дальнейшему упорядочению производства и ввоза лекарственных средств и изделий медицинского назначения» от 23 января 2018 года, Постановлением Президента Республики Узбекистан ПП-4554 «О дополнительных мерах по углублению реформ в фармацевтической отрасли Республики Узбекистан» от 30 декабря 2019 года, 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 приоритетными направлениями развития науки и технологий республики VI «Медицина и фармацевтика».

Степень изученности проблемы. Согласно существующим данным мировой литературы по исследованию эндофитных грибов с гипогликемическими свойствами получен ряд важных результатов, в частности, проведены исследования гипогликемического действия экстракта эндофитного гриба *Penicillium pimateouiense* SGS (Dinesh S. и др., 2017), ингибиторной активности α -амилазы эндофитного гриба *Fusarium equiseti* (Ranjan A. и др., 2019), ингибиторной активности α -глюкозидазы (*Penicillium* sp. Minh H. и др., 2019), значения IC₅₀ ингибиторной активности метанольного экстракта *P.oxalicum* (Bisht R. и др., 2019), ингибиторное действие штамма *Aspergillus awamori* против α -амилазы (Singh B. и др., 2015), антидиабетическая активность эндофитного гриба *Aspergillus* sp. (Govindappa M. и др., 2015). В целом, имеющиеся данные убедительно свидетельствуют о высоком потенциале эндофитных грибов как новых источников антидиабетических соединений ингибиторной природы.

Научные исследования были проведены учеными нашей республики. В лаборатории «Биохимии и биотехнологии физиологически активных соединений» Института Микробиологии АН РУз проводились исследования гипогликемических свойств эндофитных грибов лекарственных растений, произрастающих на территории Узбекистана. В результате скрининга были отобраны наиболее активные штаммы *Penicillium brevicaula alba-CC200* и

¹Указ Президента Республики Узбекистан № ПУ-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии дальнейших действий по развитию Республики Узбекистан»

Aspergillus egypticus-HT166S, выделенные из антидиабетических лекарственных растений *Celosia cristata* и *Helianthus tuberosus*.

Следует отметить, что в странах СНГ, в том числе и Республике Узбекистан, препараты, предназначенные для лечения сахарного диабета 2 типа не производятся, а ввозятся из-за границы (торговые названия («Acarbose» Германия, «Miglitol» Индия и «Voglibose» Япония). В этой связи производство препаратов с гипогликемическим действием для возрастающего спроса на противодиабетические препараты в Республике, использование эндофитных грибов - продуцентов ингибиторов α -амилазы и внедрение их в практику лечения диабета имеет важное научно-практическое значение.

Связь темы диссертационного исследования с планами научно-исследовательских работ научно-исследовательского учреждения, где выполнена работа. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ фундаментальных и прикладных проектов Института микробиологии: ФА-А6-Т109 «Метаболиты эндофитных грибов лекарственных растений Узбекистана как ингибиторы α -амилазы» (2015-2017) и № ПЗ-20170914133 «Получение ингибиторов α -амилазы из эндофитов антидиабетических растений» (2018-2020).

Целью исследования является извлечение и изучение ингибиторов панкреатической α -амилазы из отобранных активных штаммов эндофитных грибов, определение их химической природы и сравнительная оценка перспектив их использования для производства средств гипогликемического назначения.

Задачи исследования:

подбор методов ферментации и оптимизации условий культивирования, приводящих к увеличению продукции и ингибиторной активности штаммов *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*;

определение влияния растительных экстрактов и эпигенетических модификаторов на рост и биоактивность отобранных эндофитных культур;

подбор методов экстракции и фракционирование вторичных метаболитов с высокой ингибиторной активностью;

определение химической природы индивидуальных активных фракций с использованием качественного анализа, хроматографических методов и масс-спектрометрии;

определение антиоксидантных и антимикробных свойств, значение IC_{50} активных фракций по отношению к коммерческому ингибитору акарбозы;

проведение экспериментальных доклинических исследований сухого экстракта эндофитного гриба по показателю антидиабетической активности;

разработка лабораторного регламента изготовления нового гипогликемического препарата на основе активных штаммов-продуцентов ингибиторов α -амилазы.

Объектом исследования были местные штаммы *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, выделенные ранее из растений *Celosia cristata* и *Helianthus tuberosus*, сохраняемые в лаборатории «Коллекции промышленно-важных микроорганизмов» Института микробиологии АН РУз.

Предметом исследования является ингибирование панкреатической α -амилазы вторичными метаболитами *P. brevicaule alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, создание на их основе гипогликемического препарата и изучение его антимикробных, антиоксидантных и гипогликемических свойств.

Методы исследования. В диссертации использованы классические и современные методы микробиологии, биохимии, биотехнологии и хроматографии.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые показано, что эндофитные грибы *P. brevicaule alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, обитающие в растениях *H. tuberosus* и *C. cristata*, продуцируют вторичные метаболиты, обладающие высокой ингибиторной активностью к панкреатической α -амилазе;

основано на том, что тритерпеновые сапонины и полиметоксилированные флавоноиды эндофитных грибов являются ингибиторами к α -амилазы.

установлено, что эндофитные грибы *P. brevicaule alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* обладают высокой антиоксидантной активностью;

впервые показано, что местные штаммы эндофитов *P. brevicaule alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, обладающие способностью к устойчивому росту и продукции высокоактивных целевых метаболитов, могут служить реальными продуцентами ингибиторов α -амилазы, сравнимых по эффективности с коммерческим ингибитором акарбоза.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

обосновано использование отобранных местных штаммов *P. brevicaule alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, продуцирующих ингибиторы α -амилазы для создания новых, импортозамещающих препаратов гипогликемического назначения;

разработан лабораторно-технологический регламент получения нового гипогликемического препарата на основе активного штамма-продуцента ингибитора α -амилазы;

при проведении доклинических испытаний в ООО НЦ «MED STANDART» препарата «Сухой экстракт эндофитного гриба *Penicillium brevicaule alba Thom-CC200*» на экспериментальных животных с аллоксан-индуцированным диабетом доказано, что испытуемый препарат нормализует уровень глюкозы, липидов и ряда ферментов в условиях экспериментального диабета, и имеет достоверную противодиабетическую активность, не уступающую эталонному препарату.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных микробиологических и биохимических методов, опубликованностью результатов диссертации в ведущих зарубежных журналах, статистической обработкой результатов произведенных при помощи критерия Стьюдента и дисперсионного анализа Фишера (ANOVA), а также обосновывается подтверждением практических результатов диссертационного исследования уполномоченными государственными структурами и получением патента на полезную модель.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научное значение результатов проведенных исследований заключается в том, что природные штаммы *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* с высокой ингибиторной активностью против α -амилазы, обладают способностью продуцировать вторичные метаболиты антиоксидантного и антимикробного действия. Гипогликемическая активность штамма *P. brevicaula alba-CC200* обусловлена тритерпеновыми сапонинами, штамма *A. egypticus-HT166S* с полиметоксилированными флавоноидами, а также объясняется выявлением биологических и фармакологических действий экстрактов.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что каждый из отобранных местных штаммов может быть объектом для разработки новых антидиабетических препаратов, что в перспективе может существенно увеличить возможности местного фармацевтического производства по расширению перечня гипогликемических препаратов.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных результатов по получению ингибиторов α -амилазы из местных штаммов эндофитных грибов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*:

получен патент на изобретение со стороны Агентства Интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на полезную модель (№ FAR 01470), на штамм эндофитного гриба *Penicillium brevicaula alba-8E*, являющегося ингибитором панкреатической α -амилазы. В результате штамм, продуцирующий ингибитор α -амилазы, обеспечивает продукцию метаболитов с гипогликемической активностью;

полученные данные по гипогликемической, антиоксидантной, антимикробной активностей вторичных метаболитов эндофитных грибов стали основанием для прикладного проекта № ПЗ-20170914133 «Получение ингибиторов α -амилазы из эндофитных грибов антидиабетических растений» (справка Академии Наук Республики Узбекистан № 4/1255-1191 от 23 апреля 2021 года). В результате, это дало возможность установить, что вторичные метаболиты штамма *P. brevicaula alba-CC200* обладают достоверной антидиабетической активностью не уступающим препаратам противодиабетического назначения.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 4 международных и 5 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 17 научных работ, из них 7 научных статей, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, в том числе 5 в республиканских и 2 в зарубежных журналах, а также получен 1 патент на полезную модель.

Объем и структура диссертации. Структура диссертации состоит из введения, 3 глав, выводов, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 114 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснованы актуальность и востребованность проведенных исследований, охарактеризованы цель и задачи, объект и предмет исследований, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологии республики, изложены научная новизна и практические результаты, раскрыты научная и практическая значимость полученных результатов, приведены данные по внедрению в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Общая характеристика эндофитных грибов**» представлен обзор современного состояния исследований по разработке лекарственных препаратов антидиабетического назначения, в частности, при диабете 2 типа, о перспективах использования эндофитных грибов для получения антидиабетических вторичных метаболитов ингибиторной природы, методам ферментации эндофитов и оптимизации культивирования, химической природе вторичных метаболитов, ингибирующих ферменты гидролиза полисахаридов, в частности, α -амилазу. Критический анализ результатов многих опубликованных статей дал возможность сформировать цель и основные задачи данной работы.

Во второй главе диссертации «**Методы оптимизации образования вторичных метаболитов эндофитных грибов и очистки ингибиторов фермента α -амилазы**» подробно описаны объект, материалы и методы исследования. Представлены сведения о методах оптимизации условий культивирования местных штаммов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, экстракции вторичных метаболитов, анализ качественного и количественного состава вторичных метаболитов методами ТСХ, колоночной хроматографии, ТСХ-хроматографии ингибиторов α -амилазы, методах масс-спектрометрического анализа, методах определения α -амилазной, антиоксидантной и антимикробной активностей очищенных фракций.

В третьей главе диссертации «**Оптимизация условий выращивания штаммов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, продуцирующих ингибиторы α -амилазы, и изучение свойств вторичных метаболитов**» представлены результаты исследования по оптимизации условий культивирования отобранных эндофитных грибов для повышения активности вторичных метаболитов - ингибиторов α -амилазы, дифференциального фракционирования полученных вторичных метаболитов с помощью полярных и неполярных растворителей, качественного и количественного анализа фракций с высокой ингибиторной активностью, идентификации с помощью хроматографических методов и масс-спектрометрического анализа.

Ранее при изучении эндофитной микробиоты лекарственных растений Узбекистана было установлено, что эндофитные грибы *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* имеют значительно более низкое значение IC_{50} , чем лекарственный препарат акарбоза, вследствие чего они были отобраны

как перспективные объекты для дальнейших исследований. Остался открытым вопрос о природе ингибирующих веществ и характера их продукции в условиях аксенического культивирования. С целью увеличения уровня вторичных метаболитов с ингибиторной активностью, нами проведен скрининг питательных сред и их оптимизация по источникам углеродного (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза) и азотного питания – (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гидролизат казеина, пептон, дрожжевой экстракт). В эксперименте было использовано пять питательных сред различного состава, как представлено в главе «Материалы и методы».

Согласно полученным данным, наибольший выход вторичных метаболитов с высокой ингибиторной активностью обеспечивали две среды - среда Чапека-Докса и сусло-содержащая с дрожжевым экстрактом (рис. 1).

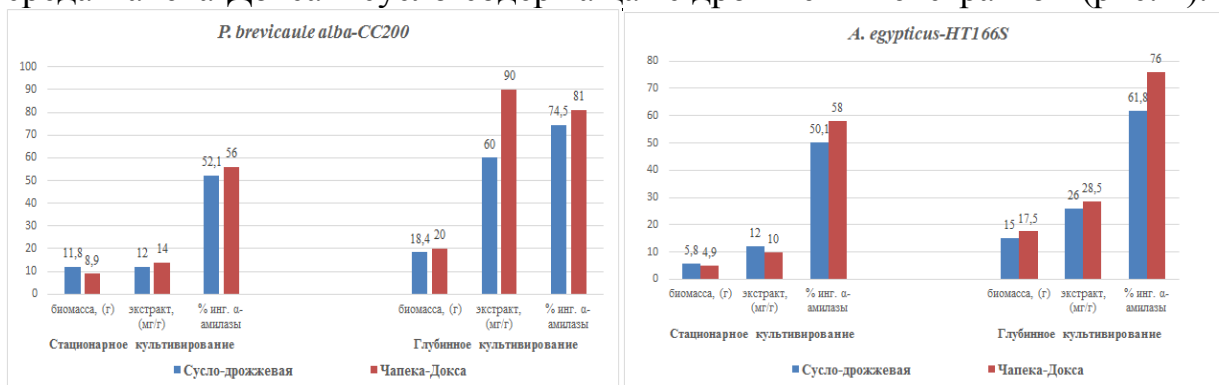


Рисунок 1. Ингибиторная активность экстрактов эндофитных грибов, при ферментации на различных средах и режимах выращивания

В качестве базовой среды была использована среда Чапека-Докса, при ферментации на этой среде ингибиторная активность метаболитов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* составила $81 \pm 0,26\%$ и $76 \pm 0,22\%$ на 7 сутки глубинного культивирования, соответственно. При сравнении культивирования эндофитов на качалке и в состоянии покоя было установлено, что при поверхностном культивировании уровень продукции вторичных метаболитов и их ингибиторная активность выше. Из испытанных источников углеродного питания наиболее высокие данные были получены на среде с сахарозой, по сравнению с лактозой, мальтозой и глюкозой. Так, максимальная степень ингибирования у штаммов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* при использовании сахарозы составила $81 \pm 0,26\%$ и $76 \pm 0,22\%$, глюкозы $72 \pm 0,29\%$ и $58 \pm 0,25\%$, лактозы - $63 \pm 0,26\%$ в обоих штаммах, мальтозы - $66 \pm 0,30\%$ и $61 \pm 0,25\%$, соответственно. Выбор оптимальной начальной концентрации сахарозы в составе среды Чапека в динамике роста производили в пределах 2%, 4%, 6% и 8%. Наибольшее ингибирование α-амилазы для *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, составляющее $88,7 \pm 0,27\%$ и $84 \pm 0,29\%$, а количество сухого экстракта 160 мг/г и 34 мг/г, соответственно, наблюдалось при концентрации 60 г сахарозы на литр среды (рис.2).

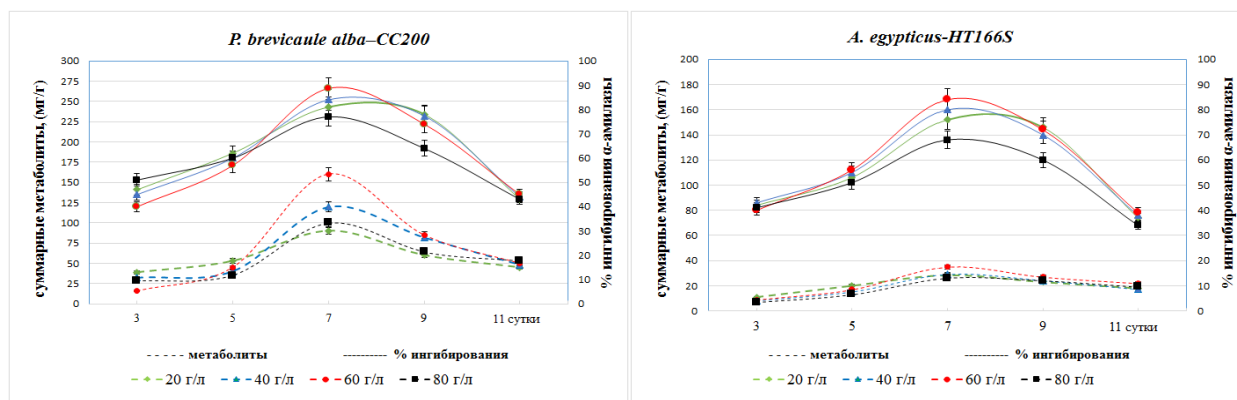


Рисунок 2. Динамика зависимости ингибиторной активности вторичных метаболитов от исходных концентраций сахарозы при культивировании *P. brevicale alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*

При изучении влияния источников азота на уровень вторичных метаболитов с ингибирующей активностью использовали среду Чапека с NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а также казеина, пептона и дрожжевого экстракта. Полученные данные показали, что оптимальным источником неорганического азота, является NaNO_3 . Из источников органического азота наибольший эффект показала среда с казеином и дрожжевым экстрактом, где уровень ингибиторной активности в *P. brevicale alba-CC200* составил $94,3 \pm 0,27\%$, а в *A. egypticus-HT166S* - $88 \pm 0,32\%$. В результате нами был подобран состав питательной среды, способствующей увеличению выхода вторичных метаболитов с высокой гипогликемической активностью.

Как известно, альтернативой глубинному культивированию является менее энергозатратная твердофазная ферментация на различных дешевых твердых субстратах, зачастую представляющая собой отходы производства. Так, твердофазную ферментацию *P. brevicale alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* мы проводили на пшеничной шелухе, увлажненной различными питательными средами, как указано в гл. «Материалы и методы исследования» (рис. 3).

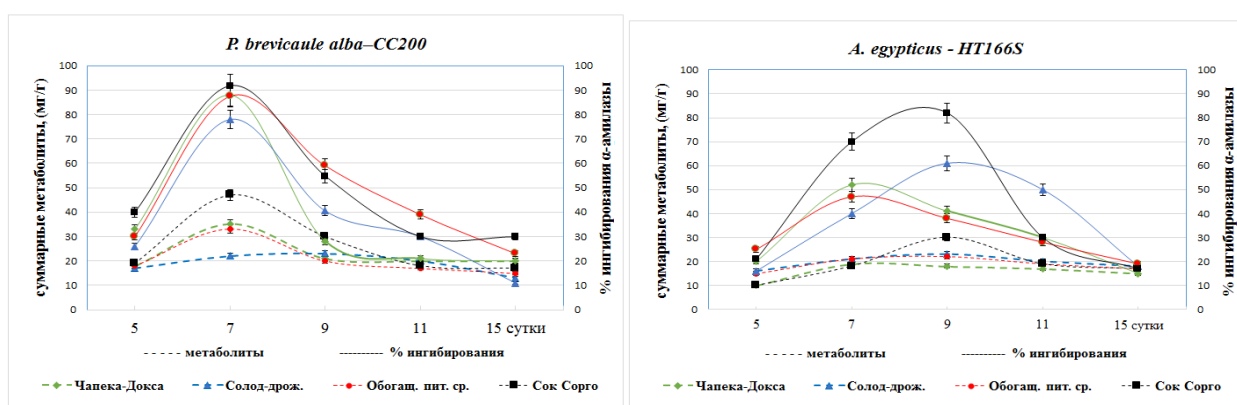


Рисунок 3. Динамика накопления сухого экстракта и ингибиторов α -амилазы штаммами *P. brevicale alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* при увлажнении субстрата различными питательными средами

Как было установлено, в условиях твёрдофазной ферментации уровень продукции ингибиторов α -амилазы в целом в экстракте *P. brevicale alba-*

CC200 был выше, чем в *A. egypticus*–HT166S. Максимальная ингибиторная активность вторичных метаболитов в условиях эксперимента наблюдалась при увлажнении субстрата соком сорго, и составила $91,8 \pm 0,31\%$ и $82 \pm 0,34\%$ в *P. brevicale alba*–CC200 и *A. egypticus*–HT166S, соответственно.

Следует особо отметить, что одной из ключевых проблем в практическом использовании эндофитных грибов является значительное снижение продукции вторичных метаболитов при повторяющемся монокультивировании в аксенических условиях, что отражает зависимость отдельных метаболических путей от метаболитов растений-хозяев.

Наблюдение за приростом биомассы и вторичных метаболитов в процессе множественного монокультивирования в течение более чем трех лет свидетельствуют о том, что эндофитные грибы *P. brevicale alba*–CC200 и *A. egypticus*–HT166S, в отличие от многих эндофитных микроорганизмов, обладают способностью сохранять устойчивый рост и продукцию целевых ингибиторных соединений как в условиях глубинного, так и твердофазного культивирования.

Тем не менее, учитывая возможность зависимости уровня продукции целевых продуктов от растительных метаболитов, нами было изучено влияние экстрактов растений-хозяев на ассоциированный и неассоциированный с ними эндофиты по следующей схеме: *H. tuberosus* - *A. egypticus*–HT166S, *C. cristata* - *P. brevicale alba*–CC200, *H. tuberosus* - *P. brevicale alba*–CC200, и *C. cristata* - *A. egypticus*–HT166S. В результате проведенных экспериментов нами было установлено, что экстракты растений-хозяев положительно влияют только на собственные эндофиты, повышая выход биомассы и вторичные метаболиты у *P. brevicale alba*–CC200 и *A. egypticus*–HT166S в 1,4 и 2,5 раза, соответственно.

Одним из факторов влияния на метаболический профиль эндофитов в условиях аксенического культивирования для усиления выработки целевого вторичного метаболита в настоящее время рассматриваются эпигенетические модификаторы, влияющие на постсинтетическую модификацию ядерных белков и состояние хроматина и представляющие собой ингибиторы деацетилирования гистонов и метилирования ДНК. В экспериментах нами были использованы никотинамид, 5-азациитидин и кверцетин, добавленные в среду культивирования *A. egypticus*–HT166S и *P. brevicale alba*–CC200. Полученные данные показали, что все использованные модификаторы способствуют увеличению выхода вторичных метаболитов обоих эндофитов, но не вызывают значительного повышения ингибиторной активности продуцируемых вторичных метаболитов. Так, на 7-е сутки роста в присутствии кверцетина, азациитидина и никотинамида выход вторичных метаболитов у *P. brevicale alba*–CC200 составил $150 \pm 0,31$ мг/г, $120 \pm 0,29$ мг/г и $80 \pm 0,30$ мг/г а у *A. egypticus*–HT166S составлял $24 \pm 0,27$ мг/г, $41 \pm 0,30$ мг/г и $58 \pm 0,29$ мг/г соответственно, по сравнению с контролем, где выход составил $90 \pm 0,23$ мг/г и $28,5 \pm 0,24$ мг/г (рисунок 4).

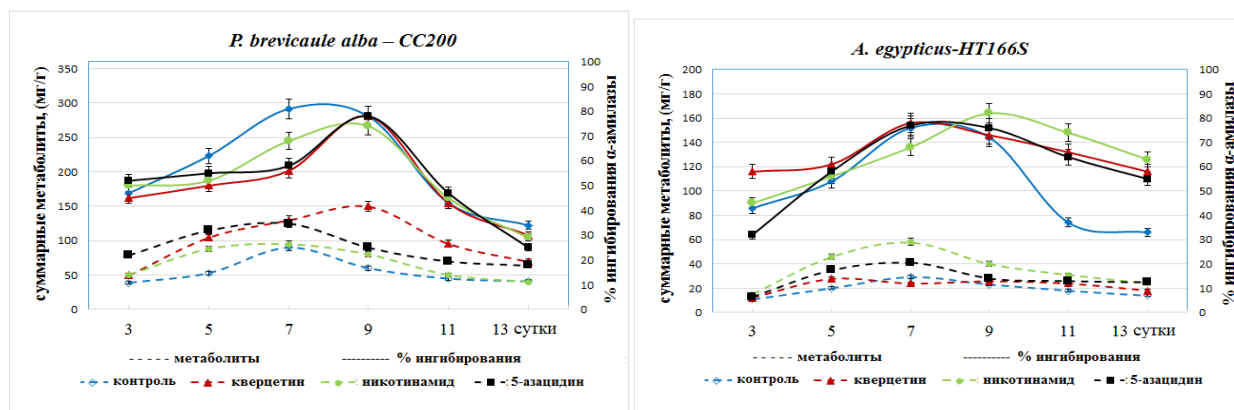


Рисунок 4. Влияние эпигенетических модификаторов на образование вторичных метаболитов и ингибирующую α -амилазу активность штаммов *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*

Для разделения вторичных метаболитов используются различные полярные и неполярные растворители в зависимости от природы экстрагируемого соединения. Мы определяли степень извлечения и ингибиторную активность вторичных метаболитов, экстрагируя биомассу штаммов *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* при глубинном и поверхностном культивировании одним из 7-х растворителей – этилацетатом, метанолом, этанолом, ацетонитрилом, водой, гексаном и бутанолом. Установлено, что самый высокий суммарный выход вторичных метаболитов *P. brevicaulis alba-CC200* 90 мг/г с активностью 81% и у штамма *A. egypticus-HT166S* $28,5 \pm 0,24$ мг/г с активностью $76 \pm 0,22\%$ наблюдается при экстракции этилацетатом. Для извлечения метаболитов с наибольшей ингибиторной активностью, мы провели последовательную экстракцию исходных этилацетатных экстрактов *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* водой, смесью метанола с гексаном (1:1) и бутанолом. Было получено четыре фракции: водная, бутанольная, метанольная и гексановая. В результате дифференциального фракционирования основная часть биоактивных метаболитов фракционируется из этилацетатного экстракта метанолом. При этом, показатели метанольной фракции штамма *P. brevicaulis alba-CC200* составила $78 \pm 0,21$ мг и $80,7 \pm 0,25\%$, а у штамма *A. egypticus-HT166S* - $19 \pm 0,26$ мг и $75,4 \pm 0,27\%$.

Качественный анализ полученных метанольных фракций показал, что из восьми определяемых химических классов соединений (терпеноиды, сапонины, фенолы, алкалоиды, антрахиноны, сердечные гликозиды и флавоноиды) в метанольную фракцию штамма *P. brevicaulis alba-CC200* экстрагируются три класса соединений - терпеноиды, сапонины и сердечные гликозиды, а в метанольной фракции штамма *A. egypticus-HT166S* присутствуют терпеноиды, антрахиноны, флавоноиды и танины.

В связи с этим, для определения природы наиболее активного метаболита нами был проведен анализ метанольных фракций *P. brevicaulis alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Результаты хроматографирования в системе бензол: метанол (5:1) показали четкое разделение метанольной фракции на 6 полос с различными значениями Rf у штамма *P. brevicaulis alba-CC200* и 12 полос у штамма *A. egypticus-HT166S*. При исследовании антиамилазной активности каждой из вырезанных полос штамма *P. brevicaulis alba-CC200* установлено, что

компоненты двух полос хроматограммы - №5 и №6 имеют наиболее высокие значения ингибиторной активности - $72,6 \pm 0,37\%$ и $60,5 \pm 0,38\%$ соответственно. В образцах штамма *A. egypticus-HT166S* с Rf значением 0,86 и 0,74 ингибиторная активность составила $72,9 \pm 0,36\%$ и $41,8 \pm 0,34\%$ (табл.1).

Таблица 1

Изображение ТСХ метанольных фракций *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*

<i>P. brevicaula alba-CC200</i>				<i>A. egypticus-HT166S</i>				
	№	Значение Rf	Ингибирование α-амилазы, (%)		№	Значение Rf	Ингибирование α-амилазы, (%)	
	1	0,83	$15,3 \pm 0,35$		1	0,97	$4,3 \pm 0,38$	
	2	0,74	$29,3 \pm 0,41$		2	0,86	$72,9 \pm 0,36$	
	3	0,59	$13 \pm 0,38$		3	0,74	$41,8 \pm 0,34$	
	4	0,57	$37,6 \pm 0,36$		4	0,6	$21 \pm 0,41$	
	5	0,49	$72,6 \pm 0,37$		5	0,54	$5,7 \pm 0,38$	
	6	0,46	$60,5 \pm 0,38$		6	0,52	$25,1 \pm 0,34$	
Элюентная система бензол: метанол (5: 1). Обработано 20% спиртовым раствором фосфорно-молибденовой кислоты.					Элюентная система бензол: метанол (5: 1). Изображение под ультрафиолетовой свете 254 нм			

При проведении качественных реакций высокоактивных ингибиторных веществ, выделенных при ТСХ, соответствующие сапонидам *P. brevicaula alba-CC200* и флавоноидам *A. egypticus-HT166S* тесты показали хорошие результаты. Методом адсорбционной колоночной хроматографии провели очистку метанольных фракций обоих штаммов (табл.2).

Таблица 2

Сухой вес и ингибиторная активность α-амилазы метанольных фракций *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*, очищенных методом колоночной хроматографии

<i>P. brevicaula alba-CC200</i>				<i>A. egypticus-HT166S</i>			
№	Образцы	Сухая масса, (мг)	Ингибирование α-амилазы, (%)	№	Образцы	Сухая масса, (мг)	Ингибирование α-амилазы, (%)
Сухая фракция метанола 500 мг				Сухая фракция метанола 500 мг			
1	A-1	$25 \pm 0,36$	-	1	A-1	$27 \pm 0,29$	$14,6 \pm 0,29$
2	B-2	$31 \pm 0,32$	-	2	B-2	$33 \pm 0,27$	$15,2 \pm 0,29$
3	C-3	$43 \pm 0,39$	$12,4 \pm 0,27$	3	C-3	$40 \pm 0,37$	$28,6 \pm 0,30$
4	D-4	$61 \pm 0,38$	-	4	D-4	$31 \pm 0,35$	$17,7 \pm 0,27$
5	E-5	$76 \pm 0,32$	$15,6 \pm 0,29$	5	E-5	$32 \pm 0,33$	$25 \pm 0,28$
6	F-6	$59 \pm 0,43$	-	6	F-6	$17 \pm 0,43$	$15 \pm 0,34$
7	G-7	$98 \pm 0,39$	$76,5 \pm 0,27$	7	G-7	$31 \pm 0,43$	$24,3 \pm 0,29$
8	H-8	$51 \pm 0,40$	$27,2 \pm 0,28$	8	H-8	$21 \pm 0,37$	$7 \pm 0,26$
9	J-9	$15 \pm 0,44$	-	9	J-9	$42 \pm 0,39$	$24 \pm 0,30$
				10	K-10	$71 \pm 0,40$	$76,2 \pm 0,29$
				11	L-11	$41 \pm 0,41$	$28,2 \pm 0,28$
				12	M-12	$38 \pm 0,38$	$19,6 \pm 0,30$
				13	N-13	$26 \pm 0,39$	$15,6 \pm 0,33$
				14	O-14	$15 \pm 0,37$	$18,8 \pm 0,31$

Ингибиторная активность фракций G-7 штамма *P. brevicaula alba-CC200* составила $76,5 \pm 0,27\%$ и K-10 штамма *A. egypticus-HT166S* $76,2 \pm 0,29\%$. При сушке образца G-7 методом вакуумного испарения образовался белый аморфный порошок, его сухая масса составила $98 \pm 0,39$ мг. При сушке фракции K-10 образовался жёлтый порошок с массой $71 \pm 0,40$ мг.

Вместе с научными сотрудниками Института Биоорганической химии АН РУз, очищенные фракции были идентифицированы с помощью масс-спектрофотометрического анализа. В результате, во фракции G-7 штамма *P. brevicaula alba-CC200* выявлены соединения с молекулярной массой 803,7 m/z, 391,3 m/z и 605,7 m/z. Согласно научным источникам, вещества с молекулярной массой 803,7 m/z являются пентациклическими тритерпеновыми сапонинами. Поэтому, по своей молекулярной массе, ингибиторная активность очищенных фракций взаимосвязана с пентациклическими тритерпеновыми сапонинами. А также, при масс-спектрометрическом анализе фракции K-10 штамма *A. egypticus-HT166S*, выявлены соединения с молекулярной массой 327,0 m/z, 345,0 m/z и 359,0 m/z. В результате, из научных источников выявлено, что соединения с молекулярной массой 327,0 m/z, 345,0 m/z и 359,0 m/z являются полиметоксилированными флаваноидами (ПМФ). ПМФ относятся к малому классу флаваноидов, и в нём почти все гидроксильные группы закрыты метилированием (рисунок 5).

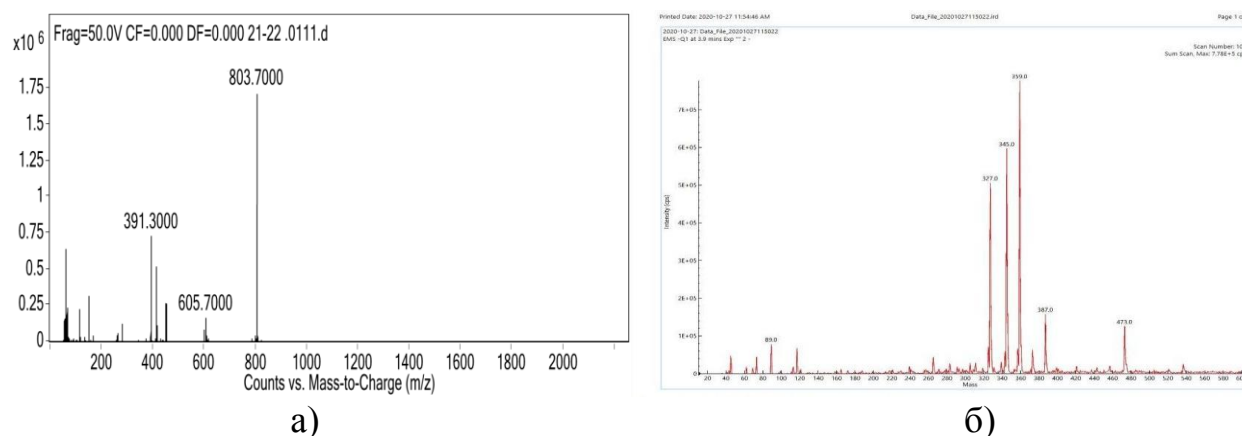


Рисунок 5. Масс-спектральный анализ очищенных активных образцов. а) Образец G-7 очищенной активной фракции *P. brevicaula alba-CC200*. б) Образец K-10 очищенной активной фракции *A. egypticus-HT166S*

В последующем этапе наших исследований были изучены биологические активности метанольных фракций штаммов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*. Различные концентрации экстрактов отобранных штаммов были сравнены с коммерческим препаратом акарбозой по ингибиторной активности и значению IC_{50} (рисунок 5). IC_{50} является индикатором эффективности биологического продукта, определяет количество вещества, необходимое для проявления 50% эффекта, чем ниже это значение, тем выше эффект вещества.

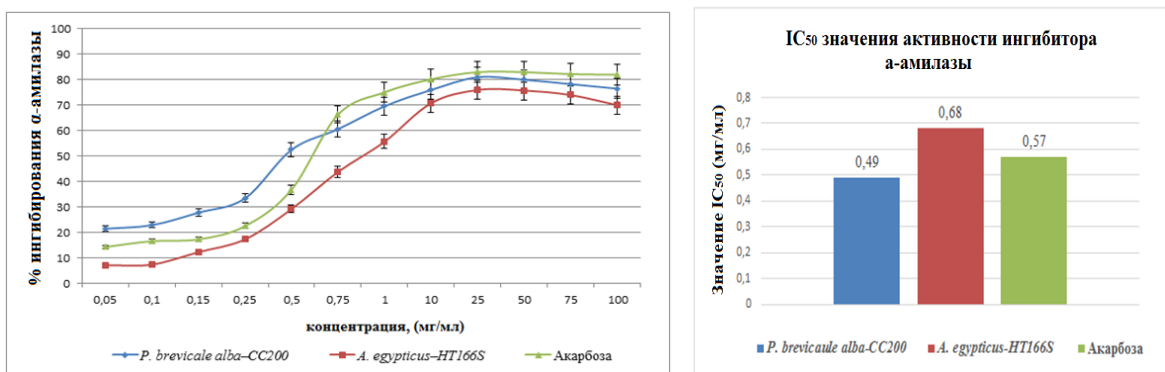


Рисунок 6. Ингибиторная активность и значения IC₅₀ метанольной фракции *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*

Метанольные фракции *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* при концентрации 25 мг/мл обеспечили самую высокую ингибирующую α-амилазу активность. Значение IC₅₀ коммерческого ингибитора α-амилазы акарбозы составляет 0,57 мг/мл, значение IC₅₀ метанольных фракций *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* составляет 0,49 мг/мл и 0,68 мг/мл. Это значит, что даже при низких концентрациях метанольная фракция *P. brevicaula alba-CC200* проявляет высокую ингибирующую активность по сравнению с коммерческим ингибитором акарбозой.

При сахарном диабете из-за гипергликемии наблюдается излишнее формирование активных свободных радикалов. Увеличение числа свободных радикалов ускоряет диабет и его осложнения. Снижение окисляемого стресса антиоксидантными средствами является эффективной стратегией снижения осложнений связанных с диабетом. Для определения антиоксидантной активности были взяты метанольные фракции эндофитных грибов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*. В условиях *in vitro*, на основе результатов полученных с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ), водород пероксид (H₂O₂) и фосфолибденовыми (ФМ) методами, были вычислены значения IC₅₀ (рисунок 7).

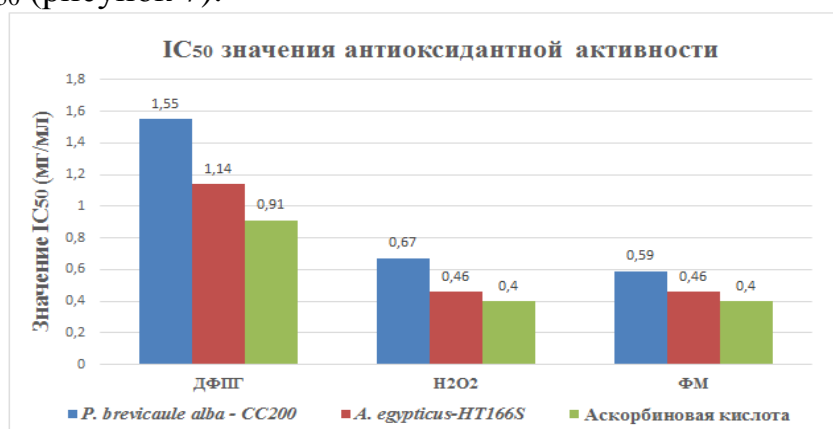


Рисунок 7. Значения IC₅₀ антиоксидантной активности метанольных фракций *P. brevicaula alba-CC200*, *A. egypticus-HT166S* и аскорбиновой кислоты

При этом, значение IC₅₀ для ДФПГ у штаммов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* составило 1,55 мг/мл и 1,14 мг/мл, у аскорбиновой кислоты - 0,91 мг/мл; значения IC₅₀ для пероксида водорода составили 0,67,

0,46 и 0,40 мг/мл; а значения IC₅₀ для ФМ - 0,59, 0,46 и 0,40 мг/мл, соответственно. Экстракты обоих эндофитных грибов обладали антиоксидантным действием и могут быть эффективными при лечении сахарного диабета 2-типа.

Определения антибактериальной активности метанольных фракций экстрактов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* проводили диффузионно-луночным методом против условных патогенов: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* (рисунок 8 и таблица 3).

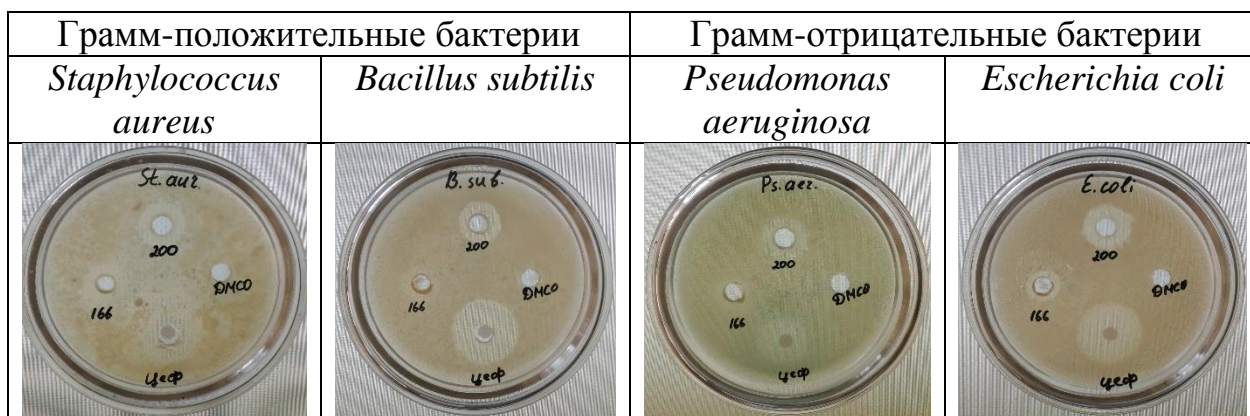


Рисунок 8. Антибактериальная активность метанольных фракций экстрактов эндофитов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*.

166 - *A. egypticus-HT166S*; 200 - *P. brevicaula alba-CC200*; ДМСО - диметил сульфоксид; Цев – Цефтриаксон

Таблица 3

Зоны подавления роста патогенных микроорганизмов метанольной фракцией *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S*

№	Штамм	Антибактериальная активность (зона подавления в мм)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>P. brevicaula alba-CC200</i>	18±0,19	17±0,18	17±0,17	18±0,17
2	<i>A. egypticus-HT166S</i>	17±0,17	-	-	13±0,16
Антибиотик					
3	Цефтриаксон	23±0,01	27±0,01	21±0,02	26±0,01
4	ДМСО	-	-	-	-

Метанольные фракции обоих штаммов при концентрации 10 мг/мл проявили антибактериальную активность против грамм-положительных и грамм-отрицательных условно-патогенных бактерий. Также выявлено, что значимой антибактериальной активностью обладает метанольная фракция *P. brevicaula alba-CC200*, она ингибировала рост 4 условных патогенов: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* и *E. coli*.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что метанольные фракции эндофитных грибов *P. brevicaula alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* наряду с ингибиторной, проявляют также

антиоксидантную, антимикробную активности, что увеличивает их потенциал как комплексных антидиабетических средств.

Из 2-х методов апробированных методов предпочтение было отдано одному наиболее эффективному и экономически выгодному способу получения ингибитора α -амилазы из ферментационного субстрата, полученного методом глубинного культивирования на среде Чапека. На основании этого метода разработан лабораторный регламент получения сухого экстракта из эндофитного гриба *Penicillium brevicaulle alba-CC200* – ингибитора α -амилазы. В результате получен ингибитор α -амилазы с выходом 10 весовых % (вес/вес; W/W).

Доклинические испытания, проведенные совместно ООО НЦ «MED STANDART» препарата «Сухой экстракт эндофитного гриба *Penicillium brevicaulle alba Thom-CC200*» на экспериментальных животных с аллоксан-индуцированным диабетом достоверно показали снижение уровней глюкозы в крови, холестерина, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), увеличение уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов и ряда ферментов.

ВЫВОДЫ

1. При скрининге сред в качестве базовой среды отобрана среда Чапека-Докса, обеспечивающая наиболее высокий выход вторичных метаболитов, ингибиторная активность штаммов *P. brevicaulle alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* составила 81% и 76% на 7 сутки глубинного культивирования. Подобраны оптимальные соотношения основных компонентов питательных сред (источников углеродного и азотного питания), при культивировании *P. brevicaulle alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* на среде Чапека-Докса. В результате, выявлено, что ингибиторная активность против α -амилазы штаммов увеличилась с начальных показателей 81% и 76% до 94,3% и 88%.

2. Установлено, что при культивировании методом твёрдофазной ферментации на пшеничной шелухе при увлажнении субстрата соком сорго наблюдается максимальный ингибирующий эффект α -амилазы у штамма *P. brevicaulle alba-CC200* - 91,8%, и 82% у *A. egypticus-HT166S*, что даёт возможность альтернативы глубинной ферментации. При исследовании влияния растительных экстрактов и эпигенетических модификаторов установлено положительное влияние их на характер роста и накопление вторичных метаболитов.

3. Установлено, что в результате дифференциального фракционирования основная часть биоактивных метаболитов фракционируется из этилацетатного экстракта метанолом. При этом, эти показатели метанольной фракции у штамма *P. brevicaulle alba-CC200* составили 78 мг и 80,7%, а у штамма *A. egypticus-HT166S* - 19 мг и 75,4%.

4. В результате очистки метанольного экстракта *P. brevicaulle alba-CC200* и *A. egypticus-HT166S* адсорбционной колоночной хроматографией

отобраны наиболее активные фракции с ингибиторной активностью 76,5% и 76,2%. Методами LC-MS анализа установлено, что ингибиторная активность *P. brevicaule alba-CC200* связана с тритерпеновыми сапонинами, а ингибиторная активность *A. egypticus-HT166SC* с полиметоксилированными флаваноидами.

5. При исследовании антибактериальной активности метанольной фракции обоих штаммов к условным патогенам: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* установлено, что значимой антибактериальной активностью обладает метанольная фракция *P. brevicaule alba-CC200*, которая проявляла высокую ингибиторную активность к 4 условным патогенам одновременно. Оценка антирадикальной активности метанольных фракций *A. egypticus-HT166S* и *P. brevicaule alba-CC200*, а также известного антиоксиданта аскорбиновой кислоты показало, что метанольные фракции штаммов обладают достаточно высокой способностью связывать радикалДФПГ, водород пероксида и фосфомолибдена, их можно отнести к группе с высокой антиоксидантной активностью, что делает их перспективными для дальнейших исследований.

6. Разработан лабораторный регламент, в котором предложена и применена технологическая схема получения сухого экстракта из эндофитного гриба *P. brevicaule alba-CC200* - ингибитора α -амилазы. В результате получен ингибитор α -амилазы с выходом 10 весовых % (вес/вес; W/W).

7. Проведены доклинические исследования в ООО НЦ «MED STANDART» препарата «Сухой экстракт эндофитного гриба *Penicillium brevicaule alba Thom-CC200*», по показателю противодиабетической активности *in vivo* на моделях животных. В результате было установлено, что испытуемый препарат имеет достоверную противодиабетическую активность не уступающей эталонному препарату, установлена нормализация глюкозы, липидов и ряда ферментов в условиях экспериментального диабета.

**SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC DEGREE
DSc.02/30.12.2019.B.38.01 AT INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

ANDIJAN STATE UNIVERSITY

MUKHAMMEDOV IQBOL ILHAM O'G'LI

**COMPARATIVE EVALUATION OF PANCREATIC α -AMYLASE
ENZYME INHIBITORS OBTAINED FROM ENDOPHYTIC FUNGI
PENICILLIUM BREVICAULE ALBA-CC200 AND *ASPERGILLUS
EGYPTICUS-HT166S***

03.00.12 – Biotechnology

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

Tashkent – 2022

The dissertation of doctor of philosophy (PhD) has been registered with the number B2021.3.PhD/B417 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan

The dissertation has been prepared at the Andijan State University

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (info-microbio@academy.uz) and on the website of «Ziyonet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor: Ruzieva Dilorom Mutalibovna
candidate of biological sciences

Official opponents: Toshmuxeimedova Shoxista Sobirovna
Doctor of biological sciences, Professor

Maxsumxanov Axmadjon Azamxonovich
candidate of biological sciences

Leading organization: Samarkand State University

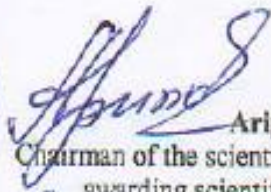
The defense of the dissertation will take place on «17» February 2022 year 10:00 at the meeting of the Scientific Council DSc.02/30.12.2019.B.38.01 of the Institute of Microbiology ASRUz at the following address: 100128, Tashkent, 7B A. Kadyri str., conference hall of the Institute of Microbiology. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz.

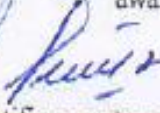
The dissertation has been registered at the Information Resource Centre at the Institute of Microbiology under №__ (Address: 100128, Tashkent, 7B A. Kadyri str., administration building of the Institute of Microbiology, floor 5, library. Phone: (+99871) 241-92-28, (+99871) 241-71-98, Fax: (+99871) 241-92-71, e-mail: info-microbio@academy.uz)


The abstract of the dissertation is distributed on « 4 » February 2022 year.

(Protocol at the register № 2 on « 4 » February 2022 year).




Aripov Takhir
Chairman of the scientific council
awarding scientific degrees,
D.B.Sc., academician


Juraeva Rohila
Scientific secretary of the scientific council
awarding scientific degrees, PhD, senior researcher


Gulyamova Tashhan
Chairman of academic seminar under scientific council
on award of scientific degrees, D.B.Sc., Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of the dissertation is a study on pancreatic α -amylase inhibitors from selected strains of endophytic fungi, determination of their chemical nature and a comparative assessment of the prospects for their use for the production of hypoglycemic agents.

The objects of the study were local strains of endophytes *P. brevicaule alba-CC200* and *A. egypticus-HT166S*, previously isolated from *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke) and *Celosia cristata* (cockscomb), maintaining at laboratory "Collection of Industrially important microorganisms" of the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan.

The scientific novelty of the study is as follows:

it was shown for the first time that endophytic fungi associated with *H. tuberosus* and *C. cristata* plants produce secondary metabolites with high inhibitory activity to pancreatic α -amylase;

it was established that triterpene saponins and poly-methoxylated flavonoids of endophytic fungi have inhibitory activity to pancreatic α -amylase;

antioxidant activities of endophytic fungi *P. brevicaule alba-CC200* and *A. egypticus-HT166S* were detected;

it has been shown for the first time that local endophytes *P. brevicaule alba-CC200* and *A. egypticus-HT166S* capable of sustained growth and production of highly active target metabolites, and can serve as real producers of α -amylase inhibitors comparable in efficiency to a commercial antidiabetic drug acarbose;

Implementation of the research results. As a result of the studies of pancreatic α -amylase inhibitors from the endophytes *P. brevicaule alba-CC200* and *A. egypticus-HT166S*:

a patent for an invention was obtained from the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan for a utility model (No. FAR 01470) on a strain of the endophytic fungus *Penicillium brevicaule alba-8E*, which is an inhibitor of pancreatic α -amylase

the obtained data became the basis for the development of an applied project No. PZ-20170914133 "Preparation of α -amylase inhibitors from endophytic fungi of antidiabetic plants" (certificate of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan No. 4/1255-1191 dated April 23, 2021).

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I-бўлим (I часть; I-part)

1. Гулямова Т.Г., Рузиева Д.М., Абдульмянова Л.И., Расулова Г.А., Мухаммедов И.И. Влияние эпигенетических модификаторов на продукцию и ингибиторную активность вторичных метаболитов эндофитных грибов из антидиабетических растений // Ж.Теоретической и клинической медицины, 2019, №1. С. 43-48 (03.00.00, № 4).
2. Рузиева Д.М., Расулова Г.А., Мухаммедов И.И., Шухратова М.Л., Саттарова Г.Б., Махкамova М.П. Влияние различных растворителей на уровень извлечения из *Penicillium brevicaulis alba-CC200*, вторичных метаболитов ингибирующих панкреатическую α -амилазу // Доклады Академии Наук Республики Узбекистана. 2019, № 2, С. 71-75 (03.00.00, № 6).
3. Насметова С.М., Рузиева Д.М., Саттарова Г.Б., Мухаммедов И.И., Гулямова Т.Г. Продукция ингибиторов α -амилазы эндофитными грибами в условиях твердофазной ферментации // Ўзбекистон биология журналы №3, 2019. Б. 24-28. (03.00.00, № 5).
4. T. G. Gulyamova, D. M. Ruzieva, S. M. Nasmetova, I. I. Muhammedov, G. A. Rasulova and R.S. Sattarova. Effects of Fermentation Conditions on the Production of Secondary Metabolites of *Penicillium brevicaulis alba-CC200* and *Aspergillus egypticus-HT166* Inhibiting Pancreatic α -Amylase // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci ISSN: 2319-7706 Volume 9 Number 2 (2020) P.1196-1204 (№40 ResearchGate IF-0,16).
5. Ruzieva D.M., Gulyamova T.G., Nasmetova S.M., Abdulmyanova L.I., Mukhammedov I.I. Identification of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus egypticus-HT166S* inhibiting the activity of pancreatic α -amylase // Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 21(51&52): 2020 P. 101-108 (№ 3 Scopus IF-0,2).
6. Расулова Г.А., Мухаммедов И.И., Абдульмянова Л.И., Рузиева Д.М., Гулямова Т.Г. Влияние этанольных экстрактов *Helianthus Tuberosus* и *Celosia Cristata* на ингибиторную активность эндофитных грибов *Aspergillus egypticus-HT166S* и *Penicillium brevicaulis alba-CC200* // Доклады Академии Наук Республики Узбекистана № 4, 2020 С. 76-82 (03.00.00, № 6).
7. Мухаммедов И.И., Рузиева Д.М., Насметова С.М. Антидиабетик фаолликка эга бўлган *Penicillium brevicaulis alba-CC200* эндофит замбуруғининг иккиламчи метаболитларининг хроматография усуллари ёрдамида тозалаш ва α -амилаза ферментига ингибиторлик таъсирини ўрганиш // Андижон Илмий хабарнома. Серия: Биологик тадқиқотлар. 2020/8 (52). Б. 83-94 (03.00.00, № 15).

II-бўлим (II часть; II-part)

8. Gulyamova T.G., Nasmetova S.M., Ruzieva D.M., Mukhammedov I.I., Kadyrova G.Kh., Karimova F.A. Phytochemical analysis of α -amylase-inhibiting secondary metabolites of endophyte *Penicillium brevicaula alba Thom* // European Journal of Molecular & Clinical Medicine ISSN 2515-8260 Volume 7, Issue 2, 2020 P. 829-836 (№ 3 Scopus IF- 0,333).

9. Nasmetova S.M., Gulyamova T.G., Ruzieva D.M., Mukhammedov I.I., Makhkamova M.P. Isolation of α -amylase inhibitors from methanol fraction of the endophytic fungus *Penicillium brevicaula alba Thom* // European Journal of Molecular & Clinical Medicine ISSN 2515-8260 Volume 7, Issue 2, 2020, P. 2174-2181 (№ 3 Scopus IF- 0,333).

10. Мухаммедов И.И., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Расулова Г.А., Гулямова Т.Г. Влияния источников углерода на уровень ингибирования α -амилазы эндофитными микромицетами лекарственных растений Узбекистана // Включен в сборник тезисов конференции в г. Казань, 27 июня 2019 г. С. 65-66.

11. Muhammedov I.I., Nasmetova S.M., Ruzieva D.M., Rsulava G.A., Sattarova G.B. Synthesis of α -amylase inhibitors by endophytic fungi under solid-phase fermentation conditions // 4 th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants. June 10-14, 2019 Ekaterinburg, Russia. P. 379

12. I.I. Muhammedov, D.M. Ruzieva, S.M. Nasmetova, F.A. Karimova, T.G. Gulyamova. Secondary metabolites of the endophytic fungus *Penicillium brevicaula alba* - CC200 – pancreatic α -amylase inhibitors // XIII International symposium on the chemistry of natural compounds. October 16-19, 2019, Shanghai. P. 148.

13. Мухаммедов И.И., Рузиева Д.М., Саттарова Г.Б., Насметова С.М. Качественная идентификация ингибиторов панкреатической α -амилазы эндофита *Penicillium brevicaula alba* CC-200 методом ТСХ // Состояние и перспективы развития микробиологии и микробной биотехнологии в Узбекистане. 24 октября 2019 г. С. 81.

14. Юсупов У.К., Абдульмянова Л.И., Мухаммедов И.И., Каримова Ф.А. Влияние этанола на биоактивность эндофитов Узбекистана // Состояние и перспективы развития микробиологии и микробной биотехнологии в Узбекистане. 24 октября 2019 г. С. 47.

15. Рузиева Д.М., Мухаммедов И.И., Абдульмянова Л.И. Эндофитные грибы *Helianthus Tuberosus* и *Celosia Cristata* – потенциальные продуценты антиоксидантных соединений // Scientific ideas of young scientists. International scientific and practical conferences. June, 2020 Warsaw, Poland P. P. 24.

16. Мухаммедов И.И., Рузиева Д.М., Насметова С.М., Йўлдошева М.М. *Aspergillus egypticus-HT166S* эндофит замбуруғининг меъда ости беги α -амилаза ингибиторларини ЮҚХ ёрдамида идентификация қилиш // “Наука и инновации” халқаро конференция материаллар тўплами. Тошент, 26 ноябр 2020. Б. 177-178.

17. Мухаммедов И.И., Абдульмянова Л.И., Каримова Ф.А., Рузиева Д.М., Гулямова Т.Г. Влияние этанольных экстрактов *Helianthus tuberosus* и *Celosia cristata* на ингибиторную активность эндофитных грибов *A. egypticus-NT166S* и *P. brevicaule alba-CC200* // Современная Микология в России. 2020. Том 8. С. 284.

Автореферат “Ўзбекистон кимё журнали” таҳририятида таҳрирдан
ўтказилди.

Босишга рухсат этилди: 05.02.2022 йил.
Бичими 60x84 ¹/₁₆, «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табоғи: 2.8. Адади 100. Буюртма № 26.
Тел (99) 832 99 79; (97) 815 44 54.
Гувоҳнома reestr № 10-3279
“IMPRESS MEDIA” МЧЖ босмаҳонасида чоп этилган.
100031, Тошкент ш., Яккасарой тумани, Қушбеги кўчаси, 6-уй