CASTANEA SATIVA O‘SIMLIGIDAN AJRATILGAN ENDOFIT ZAMBURUG‘LARNING ANTIKOAGULYANT FAOLLIGI VA EPIGENETIK MODIFIKATORLARNING TA’SIRI

Sheripbayeva Maftuna Muhammad qizi[1], Kuziyeva Nilufar Xusanboy qizi[2], Abdulmyanova Liliya Ilyasovna[3]

[1]Mirzo Ulug‘bek nomidagi O‘zbekiston Milliy Universiteti magistr talabasi;

[2]O‘zbekiston Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya Instituti PhD doktoranti;

[3]O‘zbekiston Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya Instituti b.f.d.

https://doi.org/10.5281/zenodo.17218758

Annotatsiya. *Ushbu tadqiqotda Castanea sativa (kashtan) o‘simligidan ajratilgan endofit zamburug‘larning antikoagulyant faolligi hamda epigenetik modifikatorlarning ularning o‘sishi va ikkilamchi metabolitlar sinteziga ta’siri o‘rganildi. CS4C izolyati plazma rekalsifikatsiya vaqti hamda boshqa koagulyatsiya ko‘rsatkichlarini (PT, APTT, TT, Fibrinogen) me’yoriy qiymatlarga nisbatan bir necha barobar uzaytirib, kuchli antikoagulyant faollik namoyon qildi. Nikotinamid va kvertsetin qo‘llanganda endofit biomassasi keskin oshdi, biroq ekstrakt miqdori va antikoagulyant faollik nazoratga nisbatan past bo‘ldi. Olingan natijalar endofit zamburug‘larining metabolit sintezi va antikoagulyant xususiyatlari biomassaning o‘zgarishiga to‘g‘ridan-to‘g‘ri bog‘liq emasligini ko‘rsatadi.*

Kalit so‘zlar: *Castanea sativa, endofit zamburug‘, antikoagulant faollik, epigenetik modifikator, rekalsiyfikatsiya vaqti(PRT), protrombin vaqti (PT), qisman faollashtirilgan tromboplastin vaqti (APTT), trombin vaqti (TT), fibrinogen, epigenetik modifikatorlar.*

Castanea sativa Fagaceae oilasiga mansub bo‘lib, xalq tabobatida qadimdan ishlatilib kelinadi Kashtan barg to‘kuvchi daraxt bo‘lib uning o‘rtacha umr ko‘rish davomiyligi 1000 yil bo‘lib,bo‘yi 35m kengligi esa 12m ni tashkil etadi[3]. Kashtan mevalari va barglari yurak-qon tomir faoliyatini qo‘llab-quvvatlash, qon aylanishini yaxshilash va tomir devorlarini mustahkamlashda ishlatiladi. Uning po‘stlog‘i diareya, ichak yallig‘lanishi va shamollash kasalliklarida foydali hisoblanadi [1]. Kashtan barglarining damlamasi tarkibidagi kadein moddasi yo‘talga qarshi, changchilari esa allergiyaga qarshi xalq tabobatida qo‘llaniladi[6]. Ilmiy izlanishlarga qaraganda, kashtan tarkibida flavonoidlar, saponinlar va taninlar mavjud bo‘lib, ular yallig‘lanishga qarshi, antikoagulyant, og‘riq qoldiruvchi, antimikrob, antioksidant va qon aylanishini yaxshilovchi xususiyatlarga ega [2].

Endofit zamburug‘lar biologic jihatdan qaraganda juda birikmalar manbai hisoblanadi. Ular o‘simliklarning hujayra ichida yoki hujayralararo hududlarda yashab, simbioz aloqalar orqali o‘simlik rivojlanishini qo‘llab-quvvatlaydi hamda turli xil ikkilamchi metabolitlarni sintez qila olishi aniqlangan [5]. Shu ma’lumotlarga asoslanib, ekma kashtan o‘simligidan ajratilgan endofit zamburug‘lar ham shunday xususiyatlarga ega bo‘lishi mumkin degan taxmin ilgari suriladi. Shu sababli, ularning antikoagulyant faolligi va modifikatorlik xususiyatlarini o‘rganish ilmiy jihatdan muhim sanaladi.

Tadqiqotda O‘zbekiston Fanlar akademiyasi Mikrobiologiya instituti Fizologik faol birikmalar biokimyosi va biotexnologiyasi laboratoriyasida saqlanayotgan antikoagulyantlik xususiyatiga ega o‘simlikdan ajratilgan 3 ta shtammni umumiy ekstraktlarining ikkilamchi metobolitlari rekalsiyfikatsiya usuli bo‘yicha tekshirildi

Endofit zamburug‘larning biomassasidan ikkilamchi metabolitlarni ajratib olishda Hazalin va boshqalar uslubidan biroz modifikatsiya bilan foydalanildi [4]. Bunda -40° C da muzlatilgan 1g biomassa maydalangan kvarts bilan chinni xovonchada yaxshilab ezilib gomogentizat holiga kelgandan so‘ng sirka kislotaning etil efiri (etilatsetat)dan 5 ml solindi va kolbaga o‘tkazilib, xona temperaturasida 24 soatga tebratgichda qoldirildi. Keyin massa filtr (Vattman№1) qog‘ozdan filtrlab o‘tkazildi va suvli qatlamni yo‘qotish maqsadida 40 mkg/ml natriy sulfat solindi. Shundan keyin aralashmalarni rotorli bug‘latgichda bug‘latildi. Quruq ikkilamchi metabolitlari 1,0 ml etil spirtida qayta suspenziya qilindi va +4° C da saqlandi.

Ekstraksiyalar plazma rekalsiyfikatsiya vaqti (PRT) testiga quyidagi metod orqali tekshirildi. Venoz qon 3,8% natriy sitratini o‘z ichiga olgan probirkalarga olindi. Ushbu probirkalar qonning antikoagulyantga nisbatini 9:1 darajasida ushlab turdi. Qonni qayta kalsiyfikatsiya qilish vaqti odatda namuna olinganidan keyin yarim soat ichida o‘lchandi. 0,2 ml sitratlangan qon namunasi 12 x 75 mm idishga o‘tkazildi. Shisha probirka va suv hammomda 37 ° C da 2 daqiqa davomida inkubatsiya qilindi. Bunga 0,2 ml 0,025 M kalsiy xlorid qo‘shildi va bir vaqtning o‘zida taymerni (sekundomer) yoqildi. Ingredientlar aralashtirildi va trubka fibrin iplarining ko‘rinishini kuzatish uchun taxminan 20 soniya oralig‘ida yengil aylanish harakati bilan oldinga va orqaga sekin egildi. Kalsiy xlorid qo‘shilishi va eng birinchi kuzatilgan fibrin iplari hosil bo‘lishi o‘rtasidagi vaqt qonni qayta kalsiyfikatsiya qilish vaqti sifatida qayd etildi[7].

Tayyor ekstraktarda koagulatsiya testlari - protrombin vaqti (PT), qisman faollashtirilgan tromboplastin vaqti (aPTT), trombin vaqti (TT), Fibrinogen testi Huma Clot Junior(Human GmbH, Wiesbaden,Germaniya) apparatida o‘tkazildi. Buning uchun tekshiriluvchidan 3 ml qon olib, 3.8 % natriy sitratli probirka solinadi. Probirka sentrifugada 3000ay/min 3 minut aylantirilib, plazma ajratib olindi.Bu testlarni tekshirish uchun plazma va ekstraktlar 1:5 nisbatda aralashtirilib, toza kyuvetaga o‘z reagentlari (Human GmbH, Wiesbaden,Germaniya) solinib, 15 sekund inkubatsiya qilinadi hamda 37˚ C da apparatda tekshiriladi[5].

Eng faol izolyatlga epigenetik modifikatorning ta'sirini o‘rganish maqsadida 3 xil kimyoviy epigenetik modifikatorlardan 100 µM/100ml kontsentratsiyada suyuq Kartoshka-dekstrozali ozuqa muhitiga qo‘shildi. Tebratgichda 180 ayl/min, 28°C haroratda 7,14 kun davomida o‘stirildi. Izolyat biomassalari sentrifugada 6000 ayl/min da ajratib olindi va +4C da saqlandi.

Castanea sativa o‘simligidan 3 ta endofit zamburug‘lar izolyatlar ajratib olindi. Ajratib olingan izolyatlarning ekstraktlari plazmarekalsifikatsiyavaqti (PRT)testi o‘tkazildi(1-jadval).

1-jadval

Castanae sativa o‘simlikdan ajratib olingan izolyatlar PRT ko‘rsatkichlari.

Ekma kashtan *(Castanea sativa)*	
CS1L	2.51±0.01
CS3C	7.20±0.07
CS4C	>120.0±1.20

Jadvaldagi natijalarga qaraganda Ekma kashtanajratilgan *CS4C* izolyati PRT ko‘rsatkichining faolligi >120,0 dan yuqori. Yuqori PRT namoyon etgan izolyatning umumiy ekstraktlari koagulatsiya jarayonini baholash uchun protrombin vaqti (PT), qisman faollashtirilgan tromboplastin vaqti (APTT), trombin vaqti (TT) hamda fibrinogen miqdori orqali tekshirildi. Jismoniy jihatdan sog‘lom insonlarda plazma rekalsifikatsiya vaqti (PRT) 60–120

soniyani tashkil etadi. Koagulogramma me’yoriy ko‘rsatkichlari esa quyidagicha: protrombin vaqti (PT) – 9,0–15,0 soniya, protrombin indeksi (PTI) – 78–142%, xalqaro normallashgan nisbat (INR) – 0,85–1,15, qisman faollashtirilgan tromboplastin vaqti (APTT) – 25,4–35,0 soniya, trombin vaqti (TT) – 10,3–16,6 soniya, fibrinogen esa 2–4 g/l ni tashkil etadi (2-jadval).

2-jadval

CS4C ning koagulatsion ko‘rsatkichlari

Shtamm	PT			APTT		TT		FIB
	Vaqti (sek)	PTI(%)	INR	Vaqti (sek	Нисбати	Vaqti (sek)	Nisbati	g/l
Norma	12,4± 0,19	131± 0,07	0,85± 0,02	27,9± 0,42	0,83± 0,01	20,4± 0,01	1,25± 0,02	3,4±0, 07
Geparin (+)	+	+	+	+	+	+	+	>0.70
Etanol (-)	10,8± 0,22	166± 2,49	0,73± 0,02	36,8± 0,74	1,24± 0,02	19,8± 0,29	1,21± 0,02	2,35± 0,03
	96 % lik C_2H_5OH dagi ekstrakti							
CS4C	88,6± 1,32	6±0, 12	6,69± 0,1	236,4 ±4,73	7,88± 0,12	168,7 ±2,53	10,3± 0,01	1,4±0, 02

Tadqiqotlarga ko‘ra, *CS4C* izolyati ekstrakti barcha asosiy koagulyatsiya testlarida (PT, APTT, TT)ni normaga ham, etanol nazoratiga ham nisbatan 6–9 barobar uzaytirib, kuchli antikoagulyant faollik namoyon qildi. PTI keskin pasaydi va INR sezilarli oshdi, bu esa ekstraktning ivish tizimiga jiddiy ta’sirini ko‘rsatadi. Fibrinogen miqdori taxminan 2–2,5 baravar kamayib, gemostazda buzilish yuzaga kelganini bildiradi. Umuman olganda, *CS4C* izolyati ekstrakti geparinga o‘xshash yoki undan kuchli antikoagulyant xususiyatlarga ega bo‘lishi mumkin.

Endofit mikroorganizmlardan foydalanish tadqiqotlarda uzluksiz davom ettirilmoqda, ammo ularni sun’iy sharoitda uzoq avlodlar davomida yetishtirish jarayonida faollikning susayishi yoki yo‘qolishi jiddiy muammo sifatida namoyon bo‘lmoqda. Bunday holatlarda epigenetik modifikatorlardan foydalanish endofitlarning o‘sishini va faol ikkilamchi metabolitlar sintezini kuchaytirishga xizmat qiladi. Shunga asosan *CS4C* izolyatining antikoagulyant xususatlarini oshirish maqsadida 3 xil epigenitik modifikatorlar ozuqa muhitga qo‘shib o‘stirildi hamda ularning PRT ko‘rsatkichlari tekshirildi(3-jadval).

3-jadval

Modifikatorlarning biomassa, quruq ekstrakt va PRT ko‘rsatkichlariga ta’siri

	Kunlar		*CS4C*
Nazorat	biomassa g/1000ml	7	2,12±0,04
		14	2,72±0,03
	Ekstrakt mg/ml	7	141±2,12
		14	112±2,24
	PRT vaqt/s	7	7200±144
		14	7200±108
Azatsitidin	biomassa g/1000ml	7	5,48±0,11
		14	7,08±0,04
	Ekstrakt mg/ml	7	185±3,70
		14	108±1,08
	PRT vaqt/s	7	148±1,48
		14	179±3,58
Nikotinamid	biomassa g/1000ml	7	28,33±0,28
		14	25,82±0,52
	Ekstrakt mg/ml	7	238±4,76
		14	28±0,42
	PRT vaqt/s	7	150±3,0
		14	175±1,75
Kvertsetin	biomassa g/1000ml	7	39,60±0,40
		14	31,20±0,31
	Ekstrakt mg/ml	7	46±0,46
		14	52±0,52
	PRT vaqt/s	7	164±0,82
		14	182±1,82

Epigenetik modifikatorlar endofitning biomassasini sezilarli darajada oshiradi, ayniqsa nikotinamid va kvertsetin qo‘llanganda eng yuqori ko‘rsatkichlar kuzatildi. Ekstrakt miqdori dastlab oshib, keyinchalik kamayishga moyillik ko‘rsatadi (bu jarayonda nikotinamid eng keskin pasayishni namoyon qildi). PRT (antikoagulyant faollik) bo‘yicha nazorat guruhi *CS4C* izolyati ekstrakti eng yuqori ta’sirga ega bo‘lib, modifikatorlar bilan olingan ekstraktlarda bu ko‘rsatkich ancha past darajada qayd etildi. Ushbu natijalar endofitning metabolit sintezi va antikoagulyant faolligi biomassaning o‘zgarishiga to‘g‘ridan-to‘g‘ri proporsional emasligini ko‘rsatadi.

O‘tkazilgan tadqiqotlar Castanea sativa o‘simligidan ajratilgan endofit zamburug‘larning antikoagulyant faolligi yuqori ekanligini ko‘rsatdi. Ulardan *CS4C* izolyati plazma rekalsifikatsiya vaqti hamda boshqa koagulyatsiya testlari (PT, APTT, TT)ni normaga nisbatan bir necha barobar uzaytirib, geparinga o‘xshash yoki undan kuchli antikoagulyant xususiyat namoyon qildi. Epigenetik modifikatorlar qo‘llanganda endofitning biomassasi keskin oshdi, ayniqsa nikotinamid va kvertsetin bilan eng yuqori natijalar qayd etildi. Biroq ekstrakt miqdori vaqt o‘tishi bilan kamayib bordi va antikoagulyant faollik nazorat (*CS4C*)ga nisbatan pastroq darajada qayd qilindi. Ushbu natijalar endofit zamburug‘larda metabolit sintezi va antikoagulyant faollik biomassaning o‘zgarishiga to‘g‘ridan-to‘g‘ri proporsional emasligini tasdiqlaydi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. A.Basil[1], S. Sorbo[1], S. Giordano[1], L. Ricciardi[2], S. Ferrara[1], D. Montesano[3], R. Castaldo Cobianchi[1], M.L. Vuotto[2], L. Ferrara[3] Antibacterial and Allelopathic Activity of Leaf Extract from Castanea sativa
2. A.Basile, S. Sorbo, S. Giordano, L. Ricciardi, S. Ferrara, D. Montesano, R. Castaldo Cobianchi, M.L. Vuotto, L. Ferrara Antibacterial and allelopathic activity of extract from Castanea sativa leaves Fitoterapia, 2000, Vol. 71 (Suppl. 1), pp. S110–S116.
3. Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., Caudullo, G., 2016. Castanea sativa in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), European Atlas of Forest Tree Species. Publ. Off. EU, Luxembourg, pp. e0125e0
4. Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M., Wahab I.A., Cole A.Lj, Majeed A.A. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and alternative medicine. 2009, 9:46. 49
5. Kuziyeva N.X., Abdulmyanova L.I.,Sheripbayeva M.M. CASTANAE SATIVADAN AJRATIB OLINGAN ENDOFIT CS4Cizolyatining BIOFAOLLIGI.// Infeksiya, immunitet va farmakologiya jurnali №4/2025,176-185.
6. M. Casasoli, D. Pot, C. Plomion, M. C. Monteverdi, T. Barreneche, M. Lauteri, F. Villani Identification of QTLs affecting adaptive traits in Castanea sativa Mill. Identification of QTLs affecting adaptive traits in Castanea sativa Mill.
7. Кузиева Н.Х., Абдульмянова Л.И., Гулямова Т.Г. Скрининг антикоагулянтных свойств этанольных экстрактов эндофитных грибов. // Universum: химия и биология Выпуск: 9(123),Сентябрь 2024, ст. 15-23.