

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ

Тошкент Фармацевтика Инститuti

Кўлёзма ҳукукида

Хаджиметова Севара Рауповна



**ҚОНДАГИ ГЛЮКОЗА МИҚДОРНИ ЎЗГАРТИРУВЧИ
ФЕРМЕНТ СИСТЕМАСИНИ ЎРГАНИШ**

Ихтисослик: 5A522902 Иммунобиологик ва микробиологик препаратлар
Технологияси мутахассислиги

Магистрлик даражасини олиш учун

ДИССЕРТАЦИЯ

Илмий раҳбар: фарм. ф.д., проф .Х.М.Комилов

Оппонент: тиб.ф.д., проф. Алиев Х.



ТОШКЕНТ-2012

“ТАСДИКЛАЙМАН”

Кафедра муdiri

“ 22 ” июль 2012 й

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАР

Тошкент Фармацевтика институти ректорининг 2012 й “ 19 ” февраль 22-сон буйруғи билан тасдиқланган

_____ кафедраси бўйича
_____ магистрлик диссертациясининг номи
_____ мавзудаги магистрлик диссертацияси

Илмий раҳбар _____ бошчилигида

(илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони)

_____ томонидан
(тингловчининг исми-фамилияси)

туғалланган ҳолда 2012 й “ 14 ” июль да

_____ кафедрасига дастлабки химоя учун тақдим этилади.

Таққиқот ишида _____
_____ ресурслари, асбоб-ускуналар;
_____ фойдаланилади

Фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси бўйича чоп этилган адабиётлардан, замонавий усул ва услублардан ва ҳ.к.)

Ишда _____
_____ берилиши кўзда тутилади

Ишда қуйидаги масалалар баён этилади:

1-боб _____
(номи)

2-боб _____
(номи)

3-боб _____
(номи)

(сана, ой, йил)

Илмий раҳбар _____
(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 2011 й “ 19 ” февралда топширикни қабул қилди.

Мундарижа.

Кириш.....	3
1-БОБ. Адабиётлар шархи.	
1.1.Ўзбекистон Республикасида рўйхатга олинган қандли диабетнинг асосий кўрсаткич таҳлили.....	6
1.2. Инсулин ва инсулиназалар	9
1.3. Қонда глюкоза даражасини бошқариш.....	15
1.4. Эритроцитлардаги инсулиназа ферментини ажратиб олиш ва хусусиятларини ўрганиш.....	16
2- БОБ. Тажриба қисми.	
2.1.Фермент миқдорини аниқлаш усуллари	38
2.2. Фермент миқдорини Лоури усулида аниқлаш.....	38
2.3.Инсулиназа ферментини ингибитори асосида биоспецифик сорбент тайёрлаш.....	39
2.4.Биоспецифик сорбентга инсулиназа ферментини сорбциялаш ва десорбциялаш.....	40
2.5.Ферментнинг протеолитик фаоллигини аниқлаш усуллари.....	41
2.6.Ферментнинг протеолитик фаоллигини Ансон усулида аниқлаш.....	42
2.7.Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили.....	43
2.8.Технологик жараён схемаси.....	51
Хулоса.....	54
Фойдаланилган адабиётлар руйхати.....	55

Кириш

Мавзунинг долзарблиги. Инсон организмидаги оксил табиатига эга бўлган гормонлар ичида инсулин алоҳида ўрнига эга. Бу гормон бир қатор метаболик жараёнларда қатнашади ва организмдаги асосий физиологик ҳолатларда иштирок этади. Инсулиннинг метоболизми ўрганиши турли хил патологик ҳолатларга сабабчи бўлади. Уларнинг ичида энг ўрганилгани ва кенг тарқалгани қандли диабетдир. Қандли диабет- бир умрлик касаллик, уни бутун хаёт давомида даволаш зарур. Мабодо бемор даволанмаса, организмда чуқур ўзгаришлар юз бериб, унинг асоратлар ривожланиб кетади.

Ҳозирги кунга келиб ҚД билан чалинган беморлар сони дунёда 350 млн дан ортиб кетган ва бу миқдор мутассил ортиб бориш билан бирга “ёшариб” бормокда. Яъни ҚД хасталиги борган сари кўплаб ёшларда учрамоқда.

Муаммонинг долзарблиги ҚД нинг катта иқтисодий-ижтимоий аҳамиятга эга эканлиги. Унинг бутун дунёда ва Ўзбекистонда жадал кўпайиши, шунингдек барвақт меҳнат қобилиятини йўқотишга ва эрта ўлим сонининг ортиб кетишига олиб боровчи томирли хасталикларнинг тарқалиши билан изоҳланади.

Маълумки протеолитик ферментлар инсулинни бошқа субстратлар қаторида ферментатив деградацияга учратади ва полипепти боғларин ўзгартиради. Лекин шу вақтгача инсулинга специфик таъсир қилувчи ферментлар сони ва жойлашиши аниқ эмас. Инсулин парчаловчи фермент инсулиназасининг қонда инсулиннинг глюкозани транспортида қатнашиш жараёнларига таъсир этиши маълум. Шу сабабли инсулиназани эритроцитлардан ажратиш ва инсулинга спецификлигини ўрганиш муҳим.

Диссертация ишини бажаришда қуйидаги вазифалар бажарилди:

- Экстракт (лизат) олиш;
- Сорбент тайёрлаш;
- Биоспецифик хроматография усулини ишлаб чиқиш;

Биринчи марта эритроцитлардан инсулин парчаловчи фермент ажратиб олинди.

Эритроцитлардаги инсулиназа ферментининг инсулинга спецификлигига асосланиб, қондаги инсулин миқдорини аниқлаш, яъни қандли диабет касаллигида ташхис қўйишда фойдаланиш мумкин.

1-БОБ. Адабиётлар шархи.

1.1 Ўзбекистон Республикасида рўйхатга олинган қандли диабетнинг асосий кўрсаткич таҳлили

Қандли диабетнинг пайдо бўлиши кўпроқ инсулинга боғлиқ экан бунга тўхталмай иложимиз йўқ. ҚД нинг пайдо бўлиши ва ривожланишда бошқа эндокрин факторларнинг иштироки ҳам маълум, улар гипофиз олд бўлаги, буйрак усти безининг пўст қавати, қалқонсимон без тироксин гормони. Лекин инсулин муҳим аҳамиятлисидир. Ҳозирги кунга келиб ҚД билан касалланган беморлар 250 млн кишига етди. Икки ўн йилликдан сўнг уларнинг сони 130 млн кишига кўпайиши тахмин қилинмоқда. Муаммонинг долзарблиги ҚДнинг катта услубий-ижтимоий аҳамиятга эга эканлиги, ҚДнинг бутун дунёда ва Ўзбекистонда жадал кўпайиши, шунингдек барвақт меҳнат қобилиятини йўқотишга ва эрта ўлим сонининг ошириб кетишига олиб келувчи томирли оғирлашувларнинг тарқалиши билан изоҳланади. Тошкент шаҳрида ўтказилган эпидимиологик маълумотларга кўра ИБСнинг тарқалиши 59,3% диабетик нефропатия-36,5%, диабетик ретинопатия-79,1, оёқларни кесиб ташлаш-7%, кўрлик-6,4%. Ўзбекистонда ҚД касалликларининг миллий рўйхати яратилиш бўйича тадқиқот олиб борилди. Рўйхат 86% ҚД касаллари камраб олди, аниқ касаллар сони 86562 ташкил этди. Улардан 9624 таси (11,1%) ҚД касаллигининг 1 тури бўлиб чиқди, 76672 таси (88,5%) ҚДнинг 2 тури. [1,2]

Вилоятлар бўйича, ҚД рўйхатига кирган касаллар сони қуйидагини ташкил этди:

Андижон вилояти-7262 та

Фарғона вилояти-10436 та

Самарқанд вилояти-9531 та

Жиззах вилояти-2187 та

Наманган вилояти-7469 та

Навоий вилояти-2648 та
Бухоро вилояти-6100 та
Хоразм вилояти-3014 та
Қашқадарё вилояти-4800 та
Сирдарё вилояти-2924 та
Тошкент вилояти-10084 та
Қорақалпоғистон Руспуб-2570 та
Сурхандарё вилояти-2303 та
Тошкент шаҳри-16356 та

ҚДнинг 2 тури кўрсаткичлари ёш ўтган сари ортиб боради. Олинган маълумотлар буни тасдиқлайди. Рўйхатнинг маълумотлари бўйича ҚДнинг тарқалиши ўзининг энг юқори чўққисига 50-59 ёшда боради, 12122 та эркак ва 11237 та аёл. 60-69 ёшда 8466 та аёл. Шу вақтнинг ўзида 30-39 ёшдаги гуруҳда 922 та эркак ва 5266 та аёл. Бундай маълумотлар Тошкент шаҳрида ва Республиканинг баъзи вилоятларида ўтказилган тадқиқотлар олинган. Бироқ Россия ва Европа давлатларида ўтказилган ҚДнинг 2 турининг максимал нуктаси 60-69 ва 70-79 ёшдаги инсонларда кузатилган. Ўзбекистонда ҚД 2-турининг юқори кўрсаткичининг ўзгариши ўртача яшаш муддатига боғлиқ (ўртача 66,5). Диабетик яллиғланишининг 2,29%-1,53% беморда кесиб ташланилиш аниқланган. Булардан: бармоқларни-0,86%, тиззагача-0,17%, тосгача-0,49%. [3,4]

ҚД беморларининг ўлиш даражаси бошқа касалликларга нисбатан юқори ҳисобланади ва 01.01.2008 йилга 1051 (1,2%) ташкил этди. ҚД беморларининг ўлиш сабаблар тизимини ўрганиш ва таҳлил қилиш регистр ишининг муҳим қисми ҳисобланади. Бу борада шуни таъкидлаш жоизки, қорасон, зотилжам, сил, жигар церрози ҚД беморларнинг ўлиш сабаби

сифатида, вилоятларда 0,56% дан 2,78% гача ташкил этади, шу вақтнинг ўзида Тошкентда бу ҳоллар кузатилади.[5]

ҚД – тиббиётнинг энг долзарб муаммолар сифатида, ўзининг кенг тарқалиши, клиник полиморфлиги, асоратлар оғирлиги, даволаниш қийинчилиги билан намоён бўлади. Тиббий ва ижтимоий ёрдам йўқлигида ҚД ваҳши ногиронликка, кўп ўлимга ва беморларнинг ҳаётини кескин қисқаришига олиб келади. ҚД беморлари сони бутун дунёда каби, Ўзбекистонда ҳам ўсиб бормоқда. Ҳозирги кунда дунё бўйлаб 175 млн ҚД беморлари рўйхатга олинган. Ўзбекистонда ушбу кўрсаткич 100000 ошган.[6,7]

Тошкент шаҳарда 1225 ҚД-1 беморлари рўйхатга олинган бу ҚД беморларининг умумий сонининг 7,5% ташкил этади. 1-тур ҚД беморларида: 813 тасида (66,4%) диабетическая ретинопия, 111 та (9,1%) беморда катаракта. Бир ёки икки кўзга кўрлик, ретинопия натижасида 21 та (1,7%), катаракта натижасида 9 та (0,7%) беморда аниқланган. Диабетик нефропатия 475 та (38,8%) беморда аниқланган. Сенсор невропатия 616 та (50,3%), автоном невропатия 244 та (19,9%) беморда аниқланган. Гипотензия 41 та (3,3%), жинсий заифлик 27 та (2,2%), диарея 52 та (4,2%).

ҚД беморларнинг хомиладор бўлишининг 14050 та беморда аниқланган. Улардан 13420 та бемор нормал равишда туғилган, бола ташлаш 536 та вақтидан олдин туғилган 58 та, перинотал ўлим 33 та, туғма хасталиклар 3 та.[8]

1.2 Инсулин ва инсулиназалар

Инсулин (лотинча *insula*-оролча)—пептид табиатли гормон. Лангерланс оролчасида β - хужайрасида ошқозон ости безида ҳосил бўлади. Ҳамма тўқималарда кўп моддалар алмашинувида иштирок этади. Инсулиннинг асосий вазифаларидан бири қонда глюкозанинг концентрациясини назорат қилишдир.[9,10]

Инсулин глюкоза учун плазматик мембраналарнинг ўтказувчанлигини оширади, гликолизда иштирок этувчи асосий ферментлар фаоллигига таъсир қилади, жигар ва мушакларда глюкозадан гликоген ҳосил бўлишига ижобий таъсир этади, ёғ ва оқсил синтезини оширади. Бундан ташқари гликоген ва ёғларни парчаловчи ферментларнинг фаоллигини пасайтиради, яъни анаболик таъсирдан ташқари инсулин антикатоболик таъсирга ҳам эга.

В- хужайра деструкцияси натижасида инсулинни секрецияси бузилиши инсулиннинг абсолют етишмаслиги қандли диабет касаллигига сабаб бўлади ва патогенезнинг асосий омили ҳисобланади. Инсулиннинг тўқимадаги таъсирининг бузилиши- инсулиннинг нисбий етишмаслиги- қандли диабетнинг иккинчи типига олиб келади.[11,12]

1869-йилда Берлинда 22 ёшли медик талаба Поль Лангерланс микроскоп орқали ошқозон ости бези тузилишини ўрганиб, номаълум хужайраларга эътибор берди, улар гуруҳ ҳосил қилиб, бутун без бўйлаб бир хил тарқалган эди. Бу кичкина тур хужайра ҳозирча “Лангерланс оролчаси” деб ҳисобланади. Кейинчалик Эдуард Логус кўрсатишича, уларда зардоб йиғилиб, у овқат хазм бўлишида катта аҳамиятга эгаллиги маълум бўлган.[13,14]

1899-йилда немис физиологи Оскар Минковски ошқозон ости безининг овқат хазмидаги аҳамиятини аниқлаш учун соҳлом кучукда тажриба ўтказди. У безни олиб ташлади.Бир неча кундан сўнг Минковскининг шогирди хайвонларни кўздан кечириб юриб, тажрибадаги кучук пешоби устида учиб

кўрган кўплаб пашшаларни кўрди. Бу, қандли диабет ва ошқозон ости беши фаолиятининг боғлиқлиги тўғрисида биринчи кузатув эди. Бундан 1000 йил аввал Ибн Сино пешобда қанд ажралиб чиқаётгани аниқлаш учун бемор пешобини сапол идишда офтобага қўйиб, пешоб учиб кетгач пашшалар қайси сапол идишга кўп интилса, ўша бемор пешобида қанд ажралиб чиқади дейди. 1901- йилдаги Евген Оалининг тадқиқоти бу йўналишдаги катта ютуқ бўлиб, у қандли диабет ошқозон ости оролчаларининг бузилиши натижаси аниқ кўрсатди. Қандли диабет ва ошқон ости беши боғлиқлиги олдин ҳам маълум эди, лекин диабет хусусан оролчалар билан боғлиқлиги маълум эмас эди.[15,16]

Кейинги икки ўн йилликда оролчалар зардобидан дори воситаси олишга ҳаракат қилинди. 1906-йил Георг Лудвег Зуллер бир қанча тажрибалар ўтказиб, муваффақиятга эришди. Тажрибадаги кучукчаларда панкреатин экстракти орқали қонда глюкоза миқдорини камайтиришга эришилди, лекин ишни давом эттира ололмади. Э.Л. Скотт (1911-1912) Чикакодаги университет ошқозон ости безининг сувли экстрактдан фойдаланиб “бир мунча неча гликозурияга” эришди, лекин ўзининг раҳбарларини тажрибаларнинг муҳимлигига ишонтира олмади. Худди шундай натижага Рокфеллер университетиде Израэл Кляйнерни 1919-йилда эришади, лекин бу тажрибалар биринчи жаҳон уруши бошланиши туфайли тўхтатилган эди. Руминия тиббиёт мактабини физиология профессори Никола пацлеско Францияда олиб борган тадқиқотлари натижасида 1921-йилда юқоридаги ўхшаш ишни нашр қилади. Аксарият олимларнинг фикрича, у инсулиннинг кашфиётчиси ҳисобланади. Лекин аслида инсулинни ажратиб олиш Торонто университетининг бир гуруҳ олимларига тегишли. 1920-йилда Фредрик Бантнинг Минковски ишларини ўқиб, итларда ошқозон ости безидан овқат қизм шираси ишлаб чиқарилишига тўсқинлик қилинса, без хужайралари қалок бўлиши, аммо оролчалар тирик қолиши ва қандли диабет хайвонда ривожланмаслигини кўрди. Бу кизиқарли факт уни ушбу бездан қондаги қанд

миқдорини пасайтирувчи моддани ажратиш имконияти хақида ўйлашга мажбур қилди.[17,18]

Торонто Ф. Бантнинг Д.Маклауд билан учрашиб, унга ўз ғоясини амалга ошириш учун лаборатория ташкил этди. 1921-йилда Ф. Бантнинг 22 ёшли ёрдамчиси Чарльз Бест 10 та итга тажриба ўтказди. Уларнинг иши ошқозон ости безидан панкреатик шарбат чиқариш йўллариини боғлаш бўлиб, бир неча ҳафтадан сўнг, ташқи секрктор хужайралар ўлгандан сўнг минглаб оролчалар тирик қолганда, улардан оўсил ажрала бошланди. Ажратиб олинган оқсил ошқозон ости без олиб ташланган ит қонидаги қанд миқдорини сезиларли пасайтириши кузатилди. Моддани “айлетин” деб аталди. Европадан қайтгач Маклауд тажриба натижаларини кўриб чиқди ва ўзи иштирокида тажриба қайтарилишини талаб қилди. Бир неча ҳафта ўтгач, иккинчи тажриба ҳам муваффақиятли тугаганлиги тасдиқланди. Аммо “Айлетин”ни ошқозон ости безидан ажратиш ва тозалаш кўп меҳнат талаб қилди. Ф.Бантнинг ошқозон ости бези манбаи сифатида ҳали овқат хазм қилишда иштирок этадиган фермент ишлаб чиқармайдиган ёш бузоқчаларни қўллашни қарор қилади. Уларда овқат хазм қилиш ферменти бўлмасда, етарли миқдорда инсулин синтезланади. Бу ишни анча енгиллаштиради. Энди оқсилни тозалаш вазифаси турди. 1921-йил Р.Маклауд биохимик Джеймс Коллани ишга таклиф қилди ва у инсулинни тозалашнинг самарали усулини топди.[19,20,21]

1922-йил 14 ёшли қандли диабет билан касалланган Леонард Томпсонга биринчи марта тарихда инсулин инъекция қилинди. Биринчи тажриба кечобий натижа бермади (инсулин яхши тозаланмаганлиги учун аллергия чикиради). Шу сабабли экстрактни тозалаш йўлга қўйилди, энди натижа тўла муваффақиятли бўлиб, патологик жараён ривожланиши тўхтатилди. Катта миқдорда тоза инсулинга талаб бўлгани сабабли, саноат миқёсида уни ишлаб чиқариш йўлга қўйилгунга қадар катта ҳажмда тадқиқот ишлари олиб борилди. Бу ихтиро учун Д. Маклауд ва Ф.Бантинг 1923-йил медицина ва физиология бўйича Нобель мукофотига сазовор бўлишди. Инсулинга патент

Торонто университетига бир долларга сотилди ва у тез орада саноат шехёсида ишлаб чиқара бошланди. Инсулин молекуласи ҳосил қилувчи аминокислоталар тартибини (бирламчи структура) британиялик молекуляр биолог Ф. Сенгер ишлаб чиқди. Инсулиннинг бирламчи структураси аниқланган биринчи оксил бўлиб, ҳисобланади. 1985-йилу кимё соҳасида Нобел мукофотига сазовор бўлди. 40 йилдан кейин Дороти Кроуфорт Ходжкин рентген дефракцияси усули ёрдамида инсулин молекуласининг фазовий тузилишини аниқлайди. Бу ишлари учун у ҳам Нобель мукофотига сазовор бўлди.[22,23]

Инсулин молекуласи икки полипептид занжирли 51 аминокислоталар қолдигидан иборат: А- занжир 21 аминокислота қолдигидан ва В- занжир 30 аминокислоталар қолдигидан ташкил топган. Полипептид занжирлар икки дисульфид кўприкчалари орқали цистеинлар қолдиқлари орқали боғланган. Учинчи дисульфид боғ А – занжирда жойлашган. Хар хил биологик турларда инсулиннинг бирламчи структураси бир мунча тафовутга эга.Бу фарк узардаги углевод алмашинуви бошқарилишида ҳам кузатилади. Инсон инсулинига энг яқин чўчка инсулинидир. У бир дона аминокислота қолдиғи билан фаркланади: Чўчка инсулиннинг В – занжири 30 – ўринда аланин бўлса, инсон инсулинида треонин қолдиғи жойлашган. Бука инсулини одамникидан учта аминокислота қолдиғи билан фаркланади. Бошқа объектларда инсулинни кўп турлари топилган.[24,25]

Инсулиннинг синтези ва ажралиши мураккаб жараён бўлиб, у бир неча боскичлардан иборат. Олдин гормоннинг фаол бўлмаган дастлабки шакли – проинсулин ҳосил бўлади. Сўнг бир қанча кимёвий ўзгаришлар натижасида у фаол шаклга ўтади. Инсулиннинг дастлабки шакли структурасини боғловчи ген қисқа елкасида марказлашган, 11 хромосомани сақлайди. Эндоплазматик тизим рибосомаларида гормоннинг дастлабки шакли – проинсулин синтезланади. У 110 аминокислота қолдиқларидан тузилган полипептид занжиридан иборат бўлиб, таркибида кетма-кет жойлашган L-пептид, 3-пептид, C- пептид ва А- пептидларни сақлайди.[26]

Синтез тугандан кейин бу молекуладан 24 аминокислота кетма-кетлигидан иборат L- пептид синтезланган мембранасини гидрофоб липид қатлами орқали ўтиши учун зарур. Ҳосил бўлган проинсулин Голджи комплексига ўтади. Сўнг Гольджи комплекси цистерналарида инсулин ҳосил бўлади. Бу босқич инсулин ҳосил бўлишида энг давомли босқич ҳисобланади. Проинсулин молекуласи ўсиш жараёнида унинг молекуласидан махсус эндопептидаза орқали 31 аминокислотали фрагмент – C – пептид B – ва A – занжирларига бўлинади. Яъни проинсулин молекуласи инсулин ва биологик инерт пептид қолдиқларига ажралади. [27,28]

Лангерланс оролчаларининг β - хужайралари орқали қондаги глюкоза ўзгаришига жуда сезгир бўлиб, глюкоза концентрацияси ортишига жавоб тариқасида инсулин ажралиш механизм куйидагича:

Глюкоза β – хужайраларга махсус оқсил ўтказувчи Cl_4T_2 орқали эркин ўтказилади. Хужайрада глюкоза гликолизга учрайди ва сўнгра нафас олиш циклида АТФга оксидланади. АТФ синтези даражаси қондаги глюкозанинг миқдорига боғлиқ. АТФ калийли ион каналларини назорат қилади ва мембраналарнинг кутбланишига барҳам беради, у ўз навбатида кальцийнинг хужайраларига оқимини таъминлайди. Хужайрада Ca^+ миқдори ортиши фосфолипаза C ни фаоллаштиради. Мембрана фосфолипидларидан фосфатидилинозитол -4,5 – бифосфатни – инозитол 1,4,5 трифосфат ва диациллицитрат парчалайди. Инозитиолтрифосфат ўз рецептори билан боғланади. Бу хужайра ичидаги боғланган калцийни эркин ҳолга ўтказиши ва натижада калций концентрациясининг кескин ортиши кузатилади.[29,30]

Бу олдинроқ синтезланган ва махсус сақланаётган инсулиннинг эркин ҳолга ўтишига олиб келади.

Инсулин ажралиши экзоцитоз йўли орқали амалга ошади. Бунда етилган секретор гранула плазматик мембранага яқинлашиб унга бирлашади, грануладаги модда хужайрадан сиқиб чиқарилади. Мухит физик хоссасининг ўзгариши рухнинг ажралишига ва натижада фаол бўлмаган кристалл ҳолдаги

инсулиннинг алоҳида молекулаларга парчаланишига олиб келади. Фаол бўлмаган кристал инсулиннинг бўлаклари маълум биологик фаолликка эга.

Маълумки инсулин ажралишининг энг асосий сабаби қондаги глюкоза миқдорининг ортишидир. Инсулиннинг кўшимча синтези овқат истеъмоли билан боғлиқ бўлиб, унда истеъмол фақат глюкоза ёки углевод бўлиши шарт эмас. Инсулин секрециясини аминокислоталар, айниқса лейцин ва аргинин, баъзи гастроэнтеропанкреатик системанинг гормонлари: холицистокинин, ГИП, ГПП – 1, ҳамда глюкагон гормони, АКТГ, СТГ, эстерогенлар ва бошқалар сульфонилмочевина препаратлари. Инсулиннинг секрециясини калций, қон плазмасидаги калций миқдорининг ортиши кучайтиради. Соматостатин таъсирида инсулин секрецияси пасаяди, инсулин секрецияси автоном асаб тизими таъсирида бўлади: Парасимпатик бўлим инсулин ажралишига ижобий таъсир қилса, симпатик бўлим ($\alpha 2$ – адренорецептор фаоллашуви) инсулин чиқишини пасайтиради. Инсулин синтези глюкоза ва холинергик асаб тизими орқали такроран тикланади.[31]

Умуман инсулин бутун организмдаги барча модда алмашинувига таъсир қилади. Аммо у биринчи навбатда углевод алмашинувига таъсир қилади. Углевод алмашилишида инсулиннинг асосий таъсири глюкозанинг хужайра мембранаси орқали транспортини таъминлашидадир.

Глюкозанинг икки типдаги тўқимадан: мушак тўқималари (моцит) ва ёғ тўқималари (адипоцит) транспорти инсулинга юқори даражада боғлиқлиги аниқланган. Улар инсулинга боғлиқ тўқималар ҳисобланади. Инсон хужайра массасининг деярли 2/3 қисмини ташкил қилувчи бу тўқималар, организмда ҳаракат, нафас олиш, қон алмашилиши, овқатдан қувват захира қилиш каби ўта муҳим функцияларни бажаради.[32]

Инсулин энг муҳим моддалар алмашинувини бошқарадиган молекулалар қаторига киради: углеводлар алмашинуви, липидлар миқдорини ва уларнинг турларини, оксиллар ва аминокислоталар ва нуклеотидлар ўзгаришида иштирок этади. Инсулин ёрдамида РНК биосинтези ва оксиллар синтези кучаяди. Бу гормон таъсирида глюкозани концентрацияси пасаяди,

Бу туфайли глюкозани бошқа хужайраларга диффузияси кўпаяди, глюкоза атмашуви юқори интенсивлик билан ўтади. Глюкоза қатнашадиган метаболик циклларда жараённинг кучайиши сабабли гликоген ва ёғ кислоталар кўпаяди. Ёғ тутивчи тўқималарда липогенез кучаяди ва липолиз сусаяди, бунда триглицеридлар ва фосфолипидлар синтезланади. Инсулинни кўп функциялари хозирча ўрганилмаган, лекин буларни бажаришда иккинчи менежер – инсулин рецептори қатнашиши аниқ бўлган.

Инсулиннинг барча таъсирлари унинг махсус гликопротеин рецепторлар билан боғланишидан бошланди. Бу гормоннинг турли эффектлари бир неча секундда ёки минутда (транспорт, оксил фосфорланиши, ферментларнинг фаоллашуви, РНК синтези) ёки бир неча соатда (оксил синтези ва ДНК ва хужайра ўсишида) намоён бўлиши мумкин. Бундай тезликларни таъминалаш специфик ферментларга боғлиқдир.[33,34]

Гормонлар иштирокига асосланган коммуникация тизимларнинг ёритиш тадқиқотчилар учун энг катта муаммолардан бири ҳисобланган. Хужайра ташқи суюқлигида гормонлар концентрацияси ниҳоятда паст бўлади 10^{-15} – 10^{-19} моль/л. Бу бошқа структураси ўхшаш бирикмалар (метаболитлар, аминкислоталар, пептидлар, оксиллар ва бошқа моддаларнинг) қондаги концентрациясига қараганда анча паст кўрсаткич. Шунинг учун хужайра – нишон бу гормонни нафақат бошқа гормонлардан, бошқа бирикмалардан бемалол ажратади. Бундай юқори танланишни хужайрага махсус рецепторлар таъминлайди. Гормонларнинг биологик эффекти уларнинг махсус рецепторлар билан боғланишидан бошланди ва одатда гормон ва рецепторнинг диссоциацияси билан тугайди.

1.3. Қонда глюкоза даражасини бошқариш.

Қондаги глюкоза миқдорини оптимал концентрацияда ушлаб туриш – бу кўплаб омиллар таъсири, организмнинг барча тизимларининг умумлашган фаолияти. Бироқ бу борада гормонал бошқарув тизими биринчилардандир.

Ўрта ҳисобда соғлом инсонда глюкоза миқдори 2,7-8,3 ммоль/л оралиғида бўлади, лекин овқатланишдан сўнг бу кўрсаткич маълум вақтга ошади.

Гормонларнинг иккита гуруҳи қондаги глюкоза концентрацияси турлича таъсир ўтказди.

- инсулин-ягона гипогликемик гормон.
- Гипергликемик гормонлар (глюкагон, ўсмир гормони, адреналин) қондаги глюкоза миқдорини оширади.

Глюкоза миқдори нормал физиологик аҳамиятидан пасайганда, инсулиннинг β -хужайраларидан чиқиш секинлашади. Агар глюкоза даражаси кавфли миқдоргача тушиб кетса, унда контринсуляр гормонлар ажралиб чиқади ва қоннинг хужайралари захираларидан глюкозани чиқаришди. Адреналин ва бошқа стресс гормонлари инсулин чиқишини каттиқ кучайтиради.

Ушбу мураккаб жараённинг аниқ ва самарали ишлаши соғлиқ, бутун организмнинг нормал фаолиятига шароит яратади. Қондаги глюкозанинг кўп вақт давомида мавжудлигини (гипергликемия) қандли диабетнинг асосий симптоми бўлади. Гипогликемия-қондаги глюкозанинг камайиши унданда салбий таъсир кўрсатиш мумкин. Глюкоза даражасининг фавқулотда пасайиб кетиши гипогликемик кома ёки ўлим билан яқунланади.

Гипергликемия – қонда қанд миқдорининг ошиши. [35,36,37]

Гипергликемия вақтида жигар периферик тўқималарга глюкоза келиши ошади. Глюкоза миқдори ошиб кетса, ошқозон ости бези инсулин ишлаб чиқаради.

Гипогликемия – патологик ҳолат, периферик қоннинг глюкоза миқдори нормал ҳолатдан (3,3 ммоль/л) пасайиб кетиши. Қанд миқдорини туширувчи воситаларни кўп ишлатиш, организмда инсулин секрецияси ошиш натижасида ривожланади.

1.4.Эритроцитлардаги инсулиназа ферментини ажратиб олиш ва хусусиятларини ўрганиш

Инсулиндеградацияловчи ферментларнинг характеристикаси ва функцияси.Инсулин деградацияси жараёнлари гормонга унинг утилизациясига хужайра жавобининг пасайишини тақозо этади.Бунда инсулиннинг биологик функциясини амалга ошишида асосий ролни инсулин специфик протеазалар-инсулиназалар ёки цитозол металлоэндопептидазалар ўйнайди.С.М.Лейтес (1959) таъкидлашича, тўкималарнинг инсулиназали фаоллиги инсулин томонидан таърифлаб берилган. Инсулиназа ферментининг ўзи 1949-йилда I.A.Mirsky ва R.H.Broth-Kahn томонидан ажратилади ва тозалаб олинди,бирок тозалаш ўша пайтида муваффақиятсиз бўлди.Улар томонидан ажратиб олинган инсулин деградирловчи фермент (ИДФ) турли хил протеазалар аралашмаси бўлиб, улар ҳозирги даврда идентификацияланган инсулин протеазаси, инсулин специфик протеаза, инсулизин ва инсулиназа. Масалан, R.A.Roth лабораториясида деградациясига йўналган бўлиб, 1929-йилдаёқ А.А.Шмидт ва Р.Л.Саатчиан инсулиназанинг комплементар ДНКси олинди ва ИДФ инсулинли протеиназа ёки инсулиназага ўхшашлиги аниқланади, улар кўплаб хужайравий функцияларни бажаради.Жумладан: стероид ва протеасомли рецепторлар фаоллигини бошқаради, инлинни функционал таъсирини ва ўсишнинг эпидермал факторини бошқаради, амилин клиренцида катта аҳамиятга эга, хужайравий ўсиш ва ривожланиш билан боғлиқ бўлган муайян функцияларни бажаради.[38,39]

ИДФ асосан хужайра цитоплазмасида жойлашган бирок у плазматик мембраналарида ҳам топилган.Масалан, S.Ansorge ва муаллифлар (1984) нинг таъкидлашича, жигарда инсулиндеградирловчи ферментлар фақатгина паренхимат ферментоз органларда жойлашган. Бунда инсулиннинг хоссаларида сезиларли даражада турга доир фарклар аниқланган.W.C.Dukvorth ва ҳамкасб муаллифларнинг кўрсатишича

гипофилида инсулин ферментларнинг гомологи ҳисобланган инсулинга ўхшаш гормонлар мавжудлигини кўрсатди. M.P.Stoppi (1988) инсулин деградацияси специфик ноллизосомал инсулиназа билан иницирланишини аниқлади. Хужайралар дефференциасининг маълум бир босқичларида инсулиназа фаоллиги баланд, кейин эса бу жараёнларнинг тугалланиши билан пасаяди. R.C.Werlen ва ҳамкасб муаллифлар (1994) чўчка скелет мускулатурасини инсулиназасини ўргана туриб, мазкур инсулин молекуласини деградацияга учратишни таъкидлаб ўтишган. Сал олдинроқ W.C.Dukworth (1989)нинг изланишларида инсулин деградациясининг хоссалари ва маҳсулотларнинг ўхшашлиги кўрсатиб ўтилган. Унинг фикрича, олинган маҳсулотлари инсулиназани унинг хужайравий функцияларини амалга ошириш учун эволюцион сақланиш гипотезасини исботлади. Y.E.Cheng ва D.Zipser (1979), A.A.Pierotti билан ҳаммуаллифлар ва V.Chesneau билан ҳаммуаллифлар (1994) каламушнинг мия ва тестостинал тўқимасидан металлоэндопептидазалар оиласига мансуб икки асосли конвертазани аниқлашган ва мазкур фермент 35% га *Escherichia coli* (EC 3.4.99.44) нинг протеиназа III билан 48% га каламуш ва одам инсулиназаси билан ўхшашлиги маълум бўлди. A.V.Becker ва R.A.Ronh (1995) инсулизин (EC 3.4.22. 11,инсулиназа) ва пиприлизин-сут эмизувчи ва бактерияларнинг инсулиндеградирловчи ферментини тадқиқ қилишди ва юқоридаги эффектларни ўхшашлигини аниқлашди. Аниқландики, кўпчилик тўқималарнинг лизосомал инсулиназасининг молекуляр массаси 110 kDa ва цинк боғлиқ металлопротеиназа эканлиги аниқланди.[40,41]

K.Shii билан ҳаммуаллифлар мушак,жигар,буйрак, мия тўқималари ва эритроцитларнинг цитозол экстрактлари юксак инсулиназа фаоллигига эга эканлигини кўрсатишди.Кейинчалик R.A.Mc Kenzil, G.A.Burgher (1984) ва Л.И. Солопуб ва бошқ. (1989) каламуш жигар ва эритроцитларининг плазматик мембранасидан 110 kDa ва рН 7.6 да оптимум активликка эга инсулиндеградирловчи нейтрал протеиназани тоза ҳолда ажратиб олишди.

V.Chesneau (2000) Mr 110 kDa га инсулиназани металлоэндопептиза деб ҳисоблашди негаки мазкур фермент эндоген ва синтетик α -пептидларни молекулани муайян участкаларида деградирлаш қобилиятига эга. 1980-йилда H.J.Kolb ва Estandi протеазани одам эритроцитларидан тозалаб олишди. Мазкур фермент гомоген бўлган ва Mr 110 кДа ли инсулиназани ажратиб олишди. Ажратиб олинган ферментнинг оптимуми рН 7.0 га тўғри келиб у инсулинни гормоннинг β -занжирига нисбатан тезроқ деградация қилган. I.R.Crossley ва R.B.Elliott (1975) фракциялаш йўли билан инсулинсимон модда ажратиб олишди ва уни инсулинспецифик инсулиназага сезгирлигини текширишди ва мазкур фермент инсулиназа таъсирига сезгир эканлиги аниқланди. [42,43]

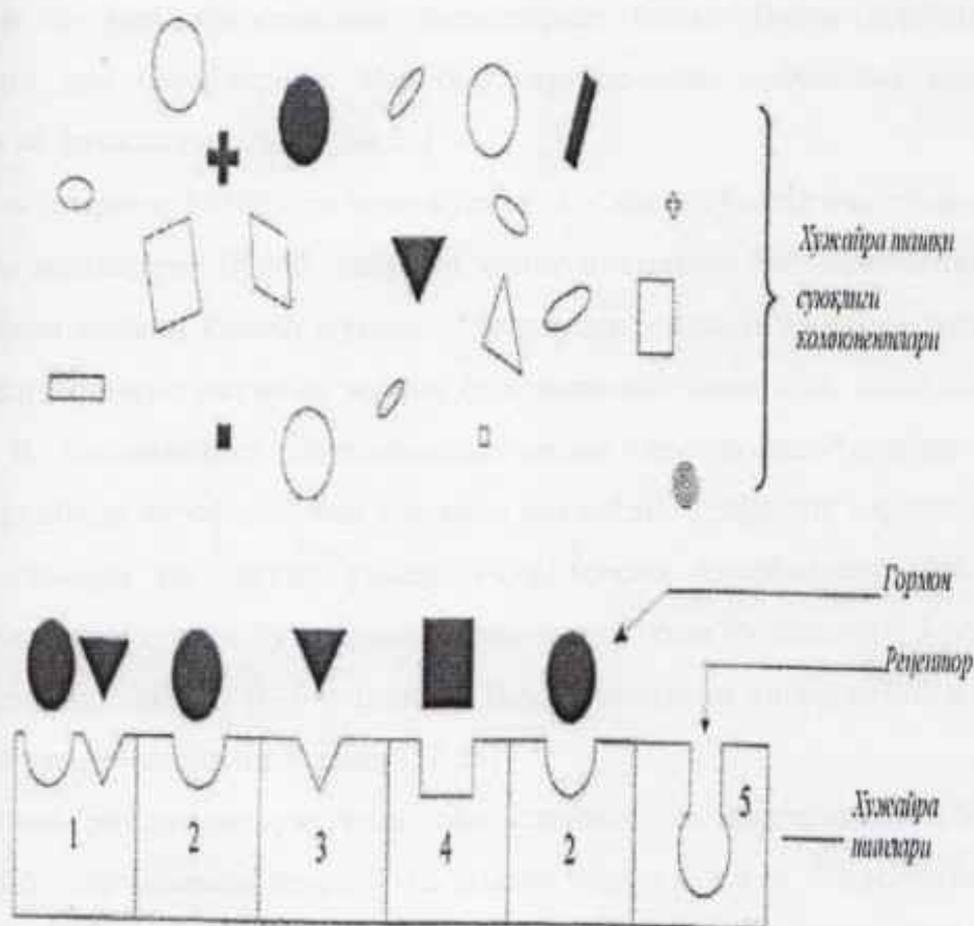
1986-йилда В.А.Матулавичюс биринчи марта одам эритроцитлари тўлик инсулиндеградацияловчи комплексга эга эканлигини кўрсатиб беришди. У Mr 100 кДа ли инсулиназа, ингибитор ва активатордан ташкил топган. Бу кейинчалик бошқа тадқиқотларда ўз исботини топди. [44]

G.Bellomo билан хаммуалифлар (1981) қайтарилган глутатионни эритроцитлар мембранасининг инсулиназа фаоллигига таъсирини баҳолашди ва деградациясининг юқори эритроцитларининг мембранасида инсулин деградациясининг ферментатив глутатион-боғлиқ тизими мавжуддир. Айнан шу муаллифлар эритроцитлар гемолизатининг инсулиназа фаоллиги ўзининг кўрсаткичлари бўйича эритроцитлар мембранаси учун юқори эканлигини аниқлашди. Бунда эритроцитлар гемолизати инсулиназасининг инсулиндеградацияловчи хоссалари рН 9.0 да сезиларли пасайса рН 9.5-10.0 да ошади ва ўз хоссалари билан юксак тозаланган эритроцитлар инсулиназаси билан фарқ қилади. [45,46]

В.А.Матулавичюс эритроцитлар гемолизатидан инсулиназа фаоллигига эга Mr тахминан 100 кДа ва Mr тахминан 300 кДа олигомерни ажратиб олишди. Иккинчи инсулиназани субстрати натив инсулин эмас, балки гормоннинг ажралган α -ва β - занжирлари ҳисобланади. Биринчи марта одам қони инсулиназа фаоллигини оригинал радиоферментсубстрат методи

Ўрдамида Б.С.Йонушас ва хаммуалифлар (1986) томонидан соғлом одамларда мазкур кўрсаткичнинг нормал тебранишларини аниқлашди. Қон инсулиназа фаоллигининг ошиши инсулинга боғлиқ бўлмаган ҚД характерли хусусияти ҳисобланади. Бир қатор потологик ҳолатларда (қандли диабет, гипертония, ўткир ярали инфекция) инсулин гормонал самарасининг пасайиши кузатилади. К.К. Gambhir ва S.G.Nerurkar (1988) одам эритроцитлари гемлизатини инсулиназасини аммонийсульфат фракциялаш ва гель устун хроматографияси каби анъанавий методлар ёрдамида тозалашни амалга оширишди ва унинг фаоллигини ТХУ кислотасини чўктириш методи билан баҳолашди ва бунда Mg 160 кДа ли фермент инсулин учун тор специфик ҳисобланади ва рН оптимирли 7,4-7,8 диапозонида бўлади. Сут эмизувчилар эритроцитларининг инсулиназа фаоллиги 3 та гомологик суббирликка эга Mg Mg 300 кДа бўлган ферментга боғлиқдир. Шундай қилиб, инсулиназа физиологик шароитларда димер ёки тример кўринишида мавжуд бўлади ва инсулинни α - ва β – занжирларда парчалайди. A.Safavi ва хаммуалифлари (1996) ва V.Chesneau ва M.R.Rosner (2000) инсулиназа турли даражадаги мураккабликка эга мультимкрлар ҳосил қилиши мумкин. Унинг максимал фаоллиги рН 8,6 да қайд қилинган. J.A.Aftholter билан хаммуалиф (1988) инсулиназа ДНК сини ажратиб олиб у 13 та пептид иборатлигини кўрсатиб беришган. 1991-йилда R.Espinosa билан хаммуалифлари соматид хужайраларни гибрид анализи методи ёрдамида инсулиназа цитозоль протеиназа эканлигини ав унинг синтези одам хромасомасининг 10-жуфти билан кодланишни аниқлашди. Ҳозирги пайтда учта инсулин деградирловчи тизимлар мавжуд тиолпротеиндисульфидоксиредуктоза, нейтрал инсулин-деградирловчи протеиназа ва лизосомал протеазалар. Тиолпротеиндесульфидоксиредуктаза жигарни 90% га гомогенланган пайтда микросомалар фракциясида жойлашади. Нейтрал инсулиндеградирловчи протеиназа жигарнинг эрувчан фракциясида жойлашади. Унинг фаоллиги бошка барча нейтрал протеазалар фаоллигидан бир неча марта юқоридир.[47,48]

R.G.Bennett билан ҳаммуаллиф (1994) таркибида инсулиназа ва мультикаталитик протеиназа (МКП) мавжуд бўлган цитозолли оксил шартловчи комплексни ажратиб олинди. Ҳозирги пайтда инсулиназани нишонланган гормон ва ТХУ кислота билан деградация маҳсулотларини ажратиришдан фойдаланиш билан инсулиназани тозалаш ва ажратишнинг турли усуллари яратилган. W.L.Kuo билан ҳаммуаллиф (1991) ортиқча миқдордаги нишонланмаган инсулин киритилганда инсулиназа фаоллигининг ошиши ва инсулин деградацияси жараёнининг фаолланиши хужайрани гормон билан ортиқча боғланишни олдини олиш учун рўй беради. Улар инсулиназа хужайра чегарасида фаоллашишини кўрсатиб беришган. F.Authier билан ҳаммуаллиф (1994) инсулинни инсулиназага эмас, балки кислотали тиолметаллопротеазага боғлиқ эндосомал протеолизини тадқиқ қилишди.



Расм-2. Гормон рецепторининг спецификлиги ва таъсирчанлиги.

Хужайра ташқи суюқлигида хар ҳил бирикмалар сақланади. Лекин рецепторлар уларнинг баъзиларигина танийди. Бундан ташқари рецепторлар кўп молекулалар ичидан аниқ биттасини таниши керак. Расмда хар бир хужайра битта ёки бир неча рецепторга эга бўлиши мумкинлиги кўрсатилган.

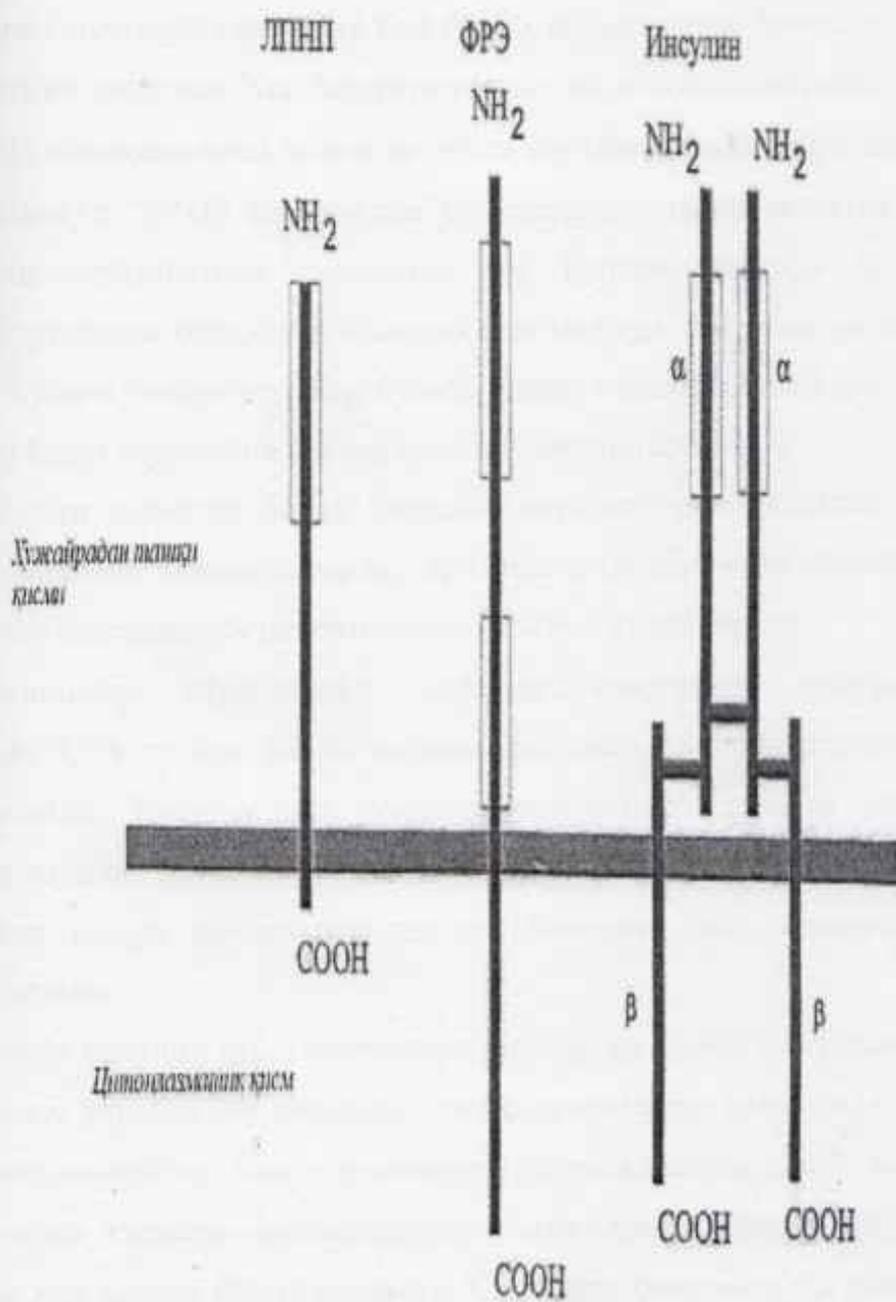
Инсулин рецептори биокимёвий усуллар ва ДНК рекомбинант технология усуллари ёрдамида батафсил ўрганилган. У гетеродимердан иборат бўлиб, иккита бирлик (α ва β) $\alpha_2 - \beta_2$ конфигурация дисульфид боғлар

амида ҳосил бўлган. Хар иккала бўлак кўп миқдорда гликозид шидикларини сақлайди. Ундан Сиал кислота ва галактозани ажратиш инсулинни боғлаш қобилиятини пасайтириш билан бирга гормоннинг фаоллигини ҳам пасайтиради. Хар бир гликопротеин суббирлик алоҳида структура ва функцияга эга.[49,50,51]

Моль оғирлик 185000 га тенг бўлган α - қисм тўлалигича тўқимадан ташқарида жойлашган бўлиб, инсулин унинг цистеинга бой домени орқали боғланишини тахмин қилиш мумкин. Молекуляр массаси 95000 га тенг β - қисм рецепторининг иккинчи муҳим функциясини бажаради, яъни сигнал ўтказади. В- бирикманинг цитоплазматик қисми тирозикиназ фаолликка эга бўлиб, таркибида аутофолірлаш қисмини сақлайди. Уларнинг хар иккаласи инсулин таъсири ва сигнал ўтиши учун муҳим ҳисобланади. Уч хил функциясини бажарувчи бу уч рецепторнинг ниҳоятда ўхшашлиги 3-расмда келтирилди. Дарҳақиқат β - бирликнинг баъзи қисмлари кетма-кетлиги ФРЭ рецептори кетма-кетлигига ўхшаш.[52,53]

Инсулин рецептори узлуксиз синтезланади ва парчаланади. Унинг ўртача ярим парчаланиш даври 7-12 соатни ташкил этади. Эндоплазматик ретикуламда рецептор бир занжирли пептид кўринишида синтезланади ва тезда Голджи аппаратида гликолизланади. Инсон инсулини рецепторининг бирламчи шакли 1382 аминокислотадан иборат бўлиб, унинг моль массаси 190000 ни ташкил этади. У парчаланганда α - ва β - суббирликларни ҳосил қилади. Инсонда инсулин рецептори гени 19 хромасомада жойлашган. Содда хайвонларда инсулин рецепторлари кўпчилик хужайраларнинг устки қисмида аниқланган. Улар концентрацияси битта хужайрада 20000 гача бўлиши мумкин. Шу билан бирга улар инсулин нишонга алоқаси бўлмаган хужайраларда ҳам учрайди. Инсулиннинг метоболит эффектлари яхши маълум. Аммо инсулин шу билан бирга ўсиш ва хужайра репликацияси жараёнларида органогенез, яра битишида ва тўқима регенерацияларида ҳам иштирок этади.[54]

Инсулин рецепторининг тузилиши, хар хил инсулинларнинг рецепторлар билан боғланиш қобилияти ва биологик реакция чақириши амалий жихатдан деярли хамма турдаги хужайраларда ўхшаш. Масалан чўчка инсулини хар доим чўчка олдиинсулинида 10-20 марта самаралироқ. У ўз навбатида денгиз чўчкаси инсулинидан 10-20 марта самаралироқ. Инсулин рецептори консерватив структурага эга бўлиб, у хатто инсулин структурасидан хам кўпроқ консерватив структурага эга. Инсулиннинг рецептор билан боғланишида куйидагича жараёнлар ҳосил бўлади:



3-расм. Инсулин, эпидермис ўсиш фактори (ЭУФ) ва паст зичликли липопро테인лар (ЛЗЛП) рецепторларининг тузилиш схемаси.

Рецепторларнинг барчасида амин гурухлари молекуланинг хужайрадан ташқаридаги қисмида жойлашган. Бу қисмдаги тўрт бурчакчалар билан белгиланган қисмлари цистеинга бой бўлиб, лигантларни боғлашда иштирок этиши тахмин қилинди. Хар бир рецепторда плазматик мембранадан ўтувчи киска (~ 25 аминокислота) домен ва турли узунликдаги хужайра ички қисми домени мавжуд. ЭУОР ва инсулин рецепторлари цитоплазматик доменда жойлашган тирозинкиназ фаолликка эга. Бундан ташқари бу доменда аутофосфориллаш борадиган қисмлар ҳам мавжуд. Инсулин рецепторлари тузилиш бўйича гетеротетрамер бўлиб, унинг алоҳида бўлаклари (вертикал қизиклар) ўзаро дисульфид боғлар орқали уланган.[55]

Инсулин рецептор билан бириктиш параметрлари аллоксан ёрдамида олинган моделда (каламушларда) эритроцитлар ва генатокцитлар билан инсулин боғланганида бу рецепторларни сонини кўпайтиради.

Изданишлар кўрсатадики нормада инсулинни эритроцитларга боғланиши 7,7% га тенг ва соғ одамда инсулинни концентрацияси бундан кўп бўлмайди. Инсулиннинг концентрациясининг плазмада оширишида эритроцитларнинг максимал даражада инсулинга боғланиши намоён бўлади. Ундан ҳам юқори концентрацияда эса боғловчи рецепторларнинг сони камайиб кетади.

Ортиқча инсулин рН, температура, ионлар ва бошқа факторларга қараб деградацияга учрайди. Бу реакцияда қатор протеазалар қатнашади, уларнинг ичида инсулиназалар ҳам гормоннинг парчаланишига олиб келади. Бу ферментларни турлари, номенклатураси, миқдори ва асосий хусусиятлари ҳозиргача ҳам ноаниқ бўлиб қолаётти. Специфик боғланиш 4,9 дан 12,7 гача тенг.[56]

Инсулин – рецепторлар билан ўзаро боғланишида қуйидаги жараёнлар ўтиш мумкин:

- 1.Рецептор конформацияси ўзгаради.
- 2.Рецепторлар бир-бири билан боғланади, микроагрегатлар (patches) ҳосил қилади.

Тирозинни фосфориллаш сүт эмизүвчялар хужайралари үчүн типик эмас. Фосфотирозин фосфоаминокислоталарни факат 0,3% ташкил этади. ФФЭ, ТФР, ЦФР – 1 рецепторларда триозинкиназ фаоллиги мавжудлиги эмас. Кайтар вирүсли анкогенлар махсулотлари таябрида

α - ва β - субъединицалар рецепторни бирламчя структурата эта бўлан
 пропепторлардан хосил бўлади. Шунда N - кисмда α - субъединица
 экраниб чикади ва цистеинга бой бўлади, β - субъединица
 тирозинпротеникиназа фаоллиги эта бўлиб, ундан ташкари АТФ -
 боловчя кисмита эта ва бир неча аутофосфориллаш гурухларита эта. Бу
 реакциялар жуда мухим, чунки кўп хужайралардиги оксилларин

Инсулин рецептори юкори молекуляр массага эта бўлан
 тирозин рецептори юкори молекуляр массага эта. Асосий функцияси
 - гормонал сигнални мембрнадан ўтказиш. Бу трансмембран сигнални
 эмас килишда турта субъединица: иккита α - молекуляр массаи 125-135
 кДа ва яна иккита β-90-95 кДа тенг. α - субъединицалар таркибда махсус
 инсулин боловчя структуралар бор ва улар плазматик мембрананинг ичкари
 кисмда жойлашган. Инсулин рецепторларини β - субъединицасини фермент
 актив фаолликин кўрсатади: бири - серинкиназа, иккинчиси тирозинга
 турчя протеникиназалар - у мембранани ичкари бу ферментлар рецепторга
 аутофосфориллашни таяминлаб беришати. Бу процесс инсулин - рецептор
 комплексини хосил килиши керак.[57,58]

Рецепторнинг интернализацията учрайди.
 1. Номальум сигнал хосил бўлади.
 2. Рецептор интернализацията учрайди.
 3. Рецепторнинг интернализацията учрайди.
 4. Номальум сигнал хосил бўлади.

триозинкиназ фаоллик муҳим деган тахминлар мавжуд. Бу компонентларнинг структураларини ўрганиш натижасида зарарли ва нормал хужайра ўсишда бир хил хоссага эгаллиги аниқланган. Бу структурани ўрганиш юқори рецепторлар ва анкогенлар орасидаги юқори даражадаги ўхшашлик аниқланади. Масалан, ФРЭ – рецептор ва erb -B, ТФР – рецептор ва v - sis ва инсулин билан v - ras лар орасида. Инсулин – рецептор сигналининг ўзгаришида триозинкиназа иштироки исботланмаган, лекин у махсус оксилнинг фосфориллашида бўлиши мумкин. Бу эса ўз навбатида инсулиннинг фосфориллаш – дефосфориллаш жараёнини бошлаб юборишига, ёки хужайра мембранасининг баъзи хоссаларининг ўзгариши ёки мембрана билан боғланган бирор модданинг, масалан, фосфолипид ҳосил бўлишига сабаб бўлиши мумкин.[59]

Инсулиннинг кўпчилик метоболик эффеқтлари, айниқса тез пайдо бўлувчилиги унинг оксилнинг фосфолираниш – дефосфолираниши реакцияларига таъсири билан боғланади. Ўз навбатида бу оксилнинг ферментатив фаоллигига таъсир қилади. Биринчи жадвалда фаолиққи шу йўсинда бошқариладиган ферментлар рўйхати берилган. Баъзи ҳолларда инсулин хужайра ичидаги сАМР ни пасайтиради. Бу эса ўз навбатида сАМР га боғлиқ протеинкиназанинг фаоллигини пасайтиради. Бундай эффеқтлар гликогенсинтетаза ва фосфорилазаларга характерлидир. Бошқа шароитда инсулин таъсири с АМР га боғлиқ эмас ва бошқа протеинкиназалари фаоллаштиришдан (масалан,инсулин рецепторининг триозинкиназа) учинчи протеинкиназа ингибирлаш ёки кўпчилик ҳолларда фосфатаза фосфопроteinларни стимуляциясига олиб келади. Дефосфориллаш бир қанча муҳим ферментлар фаоллигини оширади. Бундай модификациялаш ферментларнинг фаоллигини зудлик билан ўзгаришини таъминлайди.

**1 жадвал. Фосфориллаш даражаси ва фаоллигини инсулин
бошқарадиган ферментлар**

Фермент	Фаоллигини ўзгариши	Тахминий механизм
Метаболизм сАМР Фосфодиэстераза паст КМ	ортади	Фосфолирлаш
Протеинкиназа (сАМР – боғлиқ)	пасаяди	»
Метаболизм гликерген	ортади	дефосфолирлаш
Гликогенсинтетаза		
Киназа, фосфорилаза	пасаяди	»
Гликолиз ва глюконеогенез Пируватдегидрогеназа	ортади	»
Пируваткиназа	»	»
6 – фосфофруктоза – 2 киназа	»	»
Фруктоза 2,6 - бифосфотаза	пасаяди	»
Липидлар алмашинуви ацетил – СоА - карбоксилаза	ортади	Фосфолирлаш
ГМГ – СоА-редуктаза (гидросиметилглутарил – СоА-редуктаза)	»	дефосфолирлаш
триацилглицероллипаза	пасаяди	»
Бошқа жараёнлар тирозинкиназа (инсулин рецептори)		Фосфолирлаш

Инсулин модда ва энергия алмашинишига мураккаб ва кўп қиррали таъсирга эга. Инсулиннинг кўпчилик таъсири унинг бир қатор ферментлар фаоллигига таъсири орқали амалга ошади.

Инсулиннинг қондаги қанд миқдорини камайтирадиган ягона гармон ҳисобланиб, унинг бу таъсири:

- Глюкоза ва бошқа моддаларни ҳужайраларнинг ютишини кучайтириш;
- Гликолизнинг асосий ферментларини фаоллаштириш;
- Гликоген синтезини ошириш – инсулин жигар ва мушак тўқималарида глюкозани гликогенга полимерлаш орқали захирасини орттиришни тезлаштиради.
- Гликонеогенез интенсивлигини пасайтириш – жигарда турли моддалардан глюкоза ҳосил бўлишини камайтириш орқали намоён бўлади.

Эркин инсулиннинг ингибирланиши унинг фаоллигининг йўқолишига олиб келади. Бунинг натижасида инсулин етишмаслиги келиб чиқиши мумкин. Бунга жавоб тариқасида қондаги инсулин фаоллигини чеклашга бўналтирилган механизмлар ишга тушади. Маълумки, ошқозон ости безидан сакладиган қон жигарга боради. Жигар тўқималарида эса инсулиназа ферменти мавжуд. Бу фермент ошқозон ости безидан келаётган инсулиннинг бир қисmini парчалайди.[60]

Тажрибалар кўрсатишича катта ёшларда инсулиназанинг фаоллиги кескин, деярли икки марта пасаяди. Ёш каламушларда – $(84,7 \pm 4,8)\%$ ва қари каламушларда – $(48,3 \pm 8,9)\%$. Бу ўз навбатида катта миқдордаги инсулинни сақлаб қолади ва унинг қондаги концентрациясини ортишига олиб келади.

Инсулин ошқозон ости безининг β – тўқималарида синтезланади. Безда инсулин синтези ва унинг чиқиши жараёнларини бошқаришнинг иккита асосий мавжуд: глюкоза ва асаб холинергик таъсири.

Ошқозон ости бези ҳужайралари ўзига хос тизимга эга бўлиб, у глюкозага сезгир рецепторлардир.

Глюкозанинг рецепторга таъсири мембрананинг ички қисмига ўтказилади ва бу ерда адеилаткиназа ферменти фаоллашади. Бу фермент АТФ дан ҳужайра ичидаги циклик 3,5 – АМФ медиатори ҳосил бўлишини каталитизлайди. Бу бирикма ҳужайрада гормон синтезига маъсул махсус

жараёнларни фаоллайди. Қари организмда ошқозон ости безининг β – тўқималарининг потенциал имкониятлари сезиларли даражада пасайган бўлади. Бундан ташқари қариликда ошқозон ости безининг асабий бошқарилиши сустлашади, медиаторли ўтказишда қатнашувчи ферментлар фаоллиги пасаяди. Яъни организм қариганда мураккаб ва хавфли шароит ҳосил бўлади. Бу шароит организмда яширин инсулин етишмасликни келтириб чиқаради. Натижада организм имкониятлари чекланиб, диабет ривожланади. Ёш ўтган сари ошқозон ости безида деструктив ўзгаришлар пайдо бўлади, унинг бир қисми нобуд бўлади. Инсулиннинг қондаги фаоллигининг пасайиши, ошқозон ости безининг янада фаолланишига мажбур қилиб, β – тўқималарининг нобуд бўлишига олиб келади. Демак, қариликда диабет юзага чиқиши учун қатор панкреатик ва нопанкреатик омиллар мажмуаси ҳосил бўлади. Инсулиннинг анаболик эффектлари хужайраларнинг аминокислоталари, айниқса лейцин ва валинни ютишни кучайтиради. Хужайрада калий ионлари ҳамда магний ва фосфатнинг транспортини кучайтиради. ДНК репликацияси ва оқсил биосинтези кучаяди. Ёғ кислота синтези ва унинг кейинчалик этерификацияси кучаяди. Ёғ тўқимасида жигарда инсулин глюкозани триглицеридга айлантиради, инсулин етишмаганида эса тесқари жараён, яъни ёғларнинг мобилизацияси кузатилади.[61]

Инсулиннинг антикатоболик эффектлари оқсил гидролизини тўхтатади, яъни оқсил дегидрадацияси камаяди. Липолиз тезлиги пасайиши туфайли ёғ кислоталарнинг қонга ўтиши сусаяди.

Қонда глюкоза концентрациясининг оптимал қийматини сақлаши бу кўплаб омиллар таъсири натижаси бўлиб, бунда деярли организмнинг барча системалари биргаликдаги фаолияти натижаси кўринади. Аммо глюкоза ҳосил бўлиши ва истеъмоли орасидаги динамик мувозанатда асосий роль гормонал бошқарувдадир. Соғлом одам қонда глюкоза миқдори 2,7 дан 8,3 ммоль/л га бўлади. Икки гуруҳ гормонлар қондаги глюкоза концентрациясига қарама-қарши таъсир қилади:

Ягона гипогликемик гормон – инсулин ва гипергликемик гормонлар (глюкагон, ўсиш гормони, адреналин ва бошқалар) қонда глюкоза миқдорини мувозанатини таъминлайди. Глюкоза миқдори нормал физиологик меъёрдан заътга тушиб кетса, β – хужайрадан инсулин ажралишикамаяди (лекин нормада ҳеч қачон тўхтамайди). Агар глюкоза миқдори хавфли даражада камайиб кетса, контринсуляр гормонлар ажралиб чиқади. Бу гормонлардан энг муҳими глюкагон панкреатик оролчадаги α - хужайраларда синтезланади. Бу мураккаб механизмнинг аниқ ва самарали ишлаши бутун организмнинг нормал фаолияти ва соғлиғи гаровидир.

Инсулин энг керакли гормонлардан бири ҳисобланади. У оксил табиатли бўлиб, нафақат глюкоза транспортида, хаёт учун зарур бўлган метаболик жараёнларда иштирок этади. Организмда инсулин протеолитик ферментлар учун субстрат вазифасини бажаради ва бир қатор ферментлар таъсирида энзиматик деградацияга хамиша учраб туради. Бу ферментларнинг бир қисми ҳар хил оксилга таъсир қилсада, бир нечтаси инсулин учунгина махсус. Иккинчи жадвалда инсулин деградацияси хусусиятига эга ферментларнинг маълум бўлганлари келтирилган.

Инсулинга таъсир қилувчи ферментлардан энг кам ўрганилгани глутатион – инсулин транс гидрогеназадир. У жигардан бошқа инсулинни қисман деградация қиладиган ферментлар, яъни глутатион дисульфидизомераза, инсулин глюкогон протеиназа потенцион Д, дисульфидоксидаза теол оксил ва бошқа ферментлар билан бир қаторда қатор ферментлар иммунобиологик ўхшашлиги хақида ахборотлар бор. Хўкиз жигаридан олинган фермент (глутатион инсулин трансгидрогеназанинг) ҳам энзимологик хоссалари ўрганилган.

Лекин, адабиётларда келтирилган маълумотлар таҳлили инсулинга таъсир қилувчи ферментларнинг сони ва уларнинг номи (номенклатура бўйича) хозиргача ҳам номаълум бўлиб қолади.

Аммо охирги йиллардаги изланишлар асосида инсулинга махсус таъсир қилувчи ферментларнинг бир нечалари аниқланди. Уларни иккита гуруҳга

Бўлиш мумкин: 1) инсулинни плазматик мембраналар билан боғлашида қатнашувчи ферментлар ва 2) инсулинни деградациясида (парчаланишида) иштирок этувчи ферментлар инсулинни 90% дан ортиғи организмнинг хужайрасида парчаланadi. Шу вақтгача, инсулинни протеолизм гормонни эдресли хужайраларда деб ҳисобларди. Лекин боғланиш жараёни билан протеолитик парчаланиш жараёни орасида корреляция йўқлиғи аниқланди. Бошқача сўз билан айтганда инсулинни рецепторлар билан боғланиш ва унинг цитоплазмада парчаланиши бу ҳар хил реакциялар билан боғлиқлиғи аниқланди. Инсулинни оксил сифатида гидролизланиши инсулинни гормон сифатида рецепторлар билан боғланиши ва интернационализацияланиш орасида ҳеч қандай умумийлик йўқ. Плазматик мембраналарнинг протеазалари инсулиннинг гидролизида фақат рецепторлар билан боғланишни энг бош босқичларида қатнашади. Асосий гидролиз хужайралар цитоплазмасидаги ферментлар ёрдамида ўтади, лекин бу ферментларнинг хусусияти ва табиати хилма хил бўлиш мумкин. Хозирги маълумотларга асослансак, учта тип ферментлар бу жараёнда иштирок этишади: 1) инсулин – глутатион – трансгидролаза, 2) инсулиназа (инсулин протеазаси) ва 3) инсулин – деградациясини бошқарадиган фермент. Кўп адабиётлар бу ферментларнинг ҳаммаси инсулиназа номи билан аталган. Инсулиннинг парчаланиши ҳам ҳар хил механизм орқали бўлиши мумкин. Биринчи механизм натив инсулинни α - ва β - занжирларга бўлиш – бунда занжирларни бир – бирига улаб турган S – S боғлар узилади. Қайтарилиш реакцияси протеинсульфидредуктаза ёрдамида (КФ 1.8.4.1 – инсулин – глутатион дегидраза) катализланади. Кейинги босқичда айрим α - ва β - қисмлар ўз навбатида бошқа протеазалар иштирокида гидролизланади. Иккинчи механизм бўйича α - ва β – занжирлар ўз ҳолатини сақлаб қолади, лекин молекулада пептид боғлари тиолпротеазалар билан парчаланadi (инсулиназа).[62]

Биринчи инсулиназа номини J. Mirsky ва Broh – Khan беришган. Адабиётларда келтирилишича бу ферментни жигар, буйрак, скелет

тўқималарида, эритроцитлар таркибида, жаррохланган аъзолар атрофидаги эритроцитларда ва бошқа организмларни тўқималарида топилган. Лекин бу ферментларни таҳлил қилинганда бир фикрга келиш қийин. Инсулиназа, асосан кенг тарқалган ва эволюция жараёнида сақланиб қолган оксиллар комплекси. Инсулиназадан ташқари бу комплекс таркибига мультикаталитик протеазалар киради ва бир неча охиригача ўрганилмаган ферментлар киради. Уларнинг сони 20-25 оксилдан иборат бўлган деб ҳисобланса бўлади. Ферментларнинг аминокислоталар таркибига асосланиб, бир неча инсулиназаларни алоҳида гуруҳга ажратишни таклиф қилган. Булар одам инсулиназаси, дрозифил инсулиназаси, протеаза III ичак таёқчасидан, *Saccharomyc* ва *Neurospora* микроорганизмлар митохондриясидаги металлоэндопептидазалар. Масалан дрозифиллави ферментини аминокислоталар кетма-кетлиги одамни аминокислоталарига 46% га ўхшаш. Уларнинг инсулинни парчаланиш тезлиги ўхшаш ва ҳосил бўлган пептидлар бир-бирига ўхшаш. Бошқа инсулиназалар шунинг ичида одам организмидаги айрим металлопротеазаларни ва сут эмизувчи хайвонлардаги инсулиназаларни – инсулин деградация учратадиган фермент деб аташни таклиф қилишган. Лекин бу ферментларни бундай гуруҳларга бўлиш вақтинча деб тушуниш керак, чунки инсулинни сут эмизувчиларда ферментатив деградациясига учраш механизми ҳозиргача номаълум қоляпти ва қўшимча изланишлар керак.[63]

Инсулин ферментатив парчаланишга учраганда, хилма-хил пептидлар ҳосил бўлади. Лекин уларнинг тўғрисидаги ахборот чоп этилган ишларда шунча эмас. Парчаланишнинг дастлабки жараёнида бир модданинг концентрацияси ошади (15 мин.гача). Кейин бу модданинг миқдори камайишидан янги пептидлар ҳосил бўлади. Бу модда инсулинни α ва β – занжирлари ажрашиш даврида ҳосил бўлади (S-S боғларни парчаланиши). Қўшимча тўртта компонентлар 15 мин дан 60 мин гача ҳосил бўлишади. Ундан кейин пептидларни сони саккизтагача етади. Уларнинг тўрттаси инсулинга нисбатан олинган антителолар билан реакция беради, қолганлари

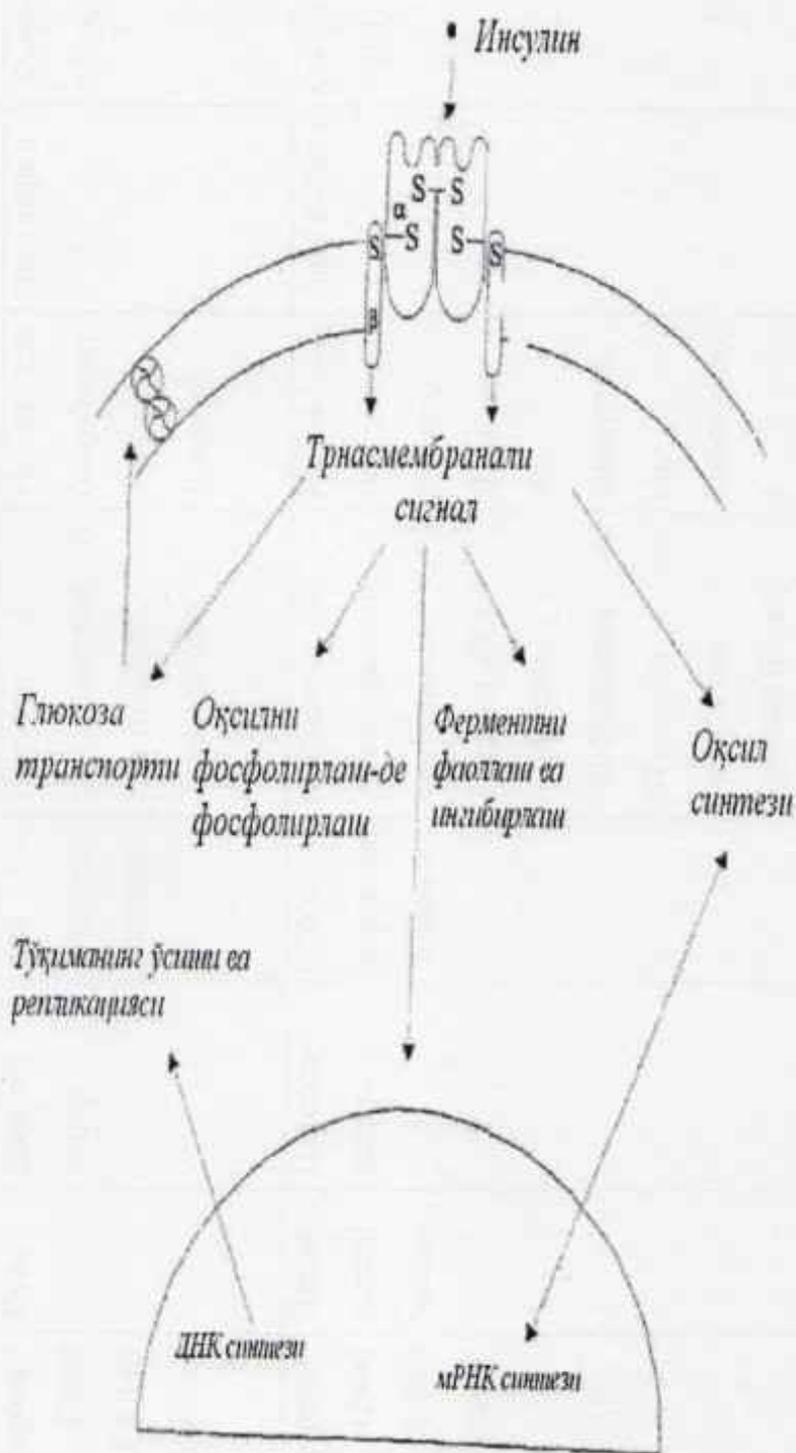
инсулин хусусиятларига эга эмас.β – занжир парчаланишга барқарордир, лекин α - занжир ҳам 10 – 11, 16 – 17, 25 – 26 пептид боғлардан парчланади. Бу маълумотлар ҳамма инсулиназалар учун текширилганда аниқ хулоса қилиш учун янги тажрибалар кераклиги аниқланди. Мембраналар билан боғланган инсулиназанинг хусусиятлари ва унинг инсулинга таъсирида ҳосил бўлган моддалар ҳам ноаниқ қоляпти.[64]

Адабиётдаги маълумотлар ҳозирча бизгача инсулинни деградациясида ҳосил бўлган моддалар структураси тўғрисида ва реакциялар механизмлар тўғрисида етарли эмас. Бир фактни аниқ деб билиш мумкин – инсулинни деградациясига учратадиган фермент бу металлопротеазадир. Бир неча чоп этилган мақолаларда ҳар хил объектлардан олинган инсулиназаларни қиёсий ўрганилган. Масалан, каламушнинг скелет мушагидан олинган инсулиназани ва одам эритроцитларидаги ферментнинг хусусиятларини солиштирилган. Ферментлар ўхшаш хусусиятларига эгадир (рН оптимум, Т-оптимум, молекуляр массаси). Ундан ташқари иккала фермент антигенлар билан бирикиши ўхшаш. Лекин металлар ва хеллатловчи агентлар таъсири фарк қиларди. Шунга қарамасдан авторлар бу иккита ферментни ягона инсулин деградация қилувчи фермент деб аташган. Жарроҳларда учрайдиган ферментни ҳам инсулинни деградациясига учратадиган фермент деб аталган, лекин унинг хусусиятлари тўғрисида тўла маълумотлар келтирилмаган.

Яна бир мақолада жигардаги инсулиназанинг хусусиятлари келтирилган ва унинг эритроцитдаги инсулиназаси билан ўхшашлиги тўғрисидаги фактлар келтирилган.

Шундай қилиб, организмдаги инсулиннинг ўзгариши билан боғлиқ бўлган жараёнларни тўғри ва яхшироқ тушунишда инсулиназанинг моҳияти ва таъсир механизмини ўрганиш ниҳоятда муҳим.

Иккинчидан, унинг фаоллигини турли ингибиторлар ёрдамида бошқариш ва ниҳоят эритроцитларда фермент мавжудлиги инсулин танқислиги учун янги ташхис усуллари яратиш имконини беради.[65,66]



Расм -1 Инсулиннинг реңеттори ва унинг пийъсирн орасидаги боғлиқлик.

№	Ферменттөң номун	Объект	Ферменттин локалланиш и	Урдуңун даражаси	Фермент субстратин	Түдүрүлүшүн имаган субстрат	Кимийин бог мушукка. Ферментта таъсири	Ферментта ингибитор	Адабиет
1.	Тиолтрансфераза Mv 12400 оптимум рН 8,0 (S - сульфоцистеин ва GHS)	Куён	Цитозол жигар	650 - марталик тозалаш	Инсулин S - сульфоцистеин. A химотрипсин. Трипсин. БСА	Иг ва сон (ингибитор Курица) Лизоцим	Дисульфид	Хлорамфнеко л HgCl ₂	1
2.	Тиолтрансфераза Mv 12400 оптимум рН 8,0 (S - сульфоцистеин ва GHS)	Йирик шошли хайвон	Цитозол жигар	37000 - марталик тозалаш	Инсулин. S - сульфоцистеин. A химотрипсин. Трипсин. БСА L-цистеин, Рибонуклеаза A, ИГ ва сон (ингибитор Баумана Бирка)	Иг ва сон (ингибитор Курица) Лизоцим, A- химотрипс ин, Рибонуклеаз а	Дисульфид	CuCl ₂ HgCl ₂	2
3.	Глутатион -	Йирик	Микросома	Маълумо	Инсулин	-	Дисульфид		3.4

инсулин	шоҳли	жигар	т йўқ	Рибонуклеаза			
трансгидрогеназа (E.C. 1.8.4.2) Mв 38 000	хайвон						
4. Протеин дисульфид изомераза (E.C 5.3.4.1) Mв 57 000 оптимум рН 7.5 (рибонуклеаза)			Маълумо т йўқ	Рибонуклеаза инсулин	-		Йодацетат 4
5. Тиол: протеин дисульфид оксидоредуктаза оптимум рН 7.5 (инсулин ва GHS)	Йирик шоҳли хайвон	Жигар мембранаси	Маълумо т йўқ	Инсулин.БСА. Лизоцим, Рибонуклеаза,	-		HgCl ₂ CuCl ₂ натрий диоксихолат 5
6. Тиол: протеин дисульфид оксидоредуктаза	Йирик шоҳли хайвон	Мембрана жигар фракцияси		Инсулин	-		Йодацетат 6

2- БОБ. Таҷриби қисми

2.1. Фермент миқдорини аниқлаш усуллари

Оқсил миқдорини аниқлашнинг бир неча усуллари мавжуд:

1.Мерион Бредфорд усули.

0,5 мл намуна ва 0,5 мл реагент аралаштирилади. 30 минутдан ФЭКда D_{545} зичликда 1 мл ли кюветада оптик зичлик аниқланади ва калибровкадан фермент концентрацияси топилади.

Реагент (Бредфорд, 1мл): 100 мг Куммаси G – 250 50 мл спиртда эритилади ва 100 мл ортофосфат кислота қўшиб, 1 л га сув билан етказилади.

2. Биурет усули.

Фермент ишқорий шароитда мис атомлари билан реакцияга киришиб кўк – бинафша ранг ҳосил қилади. Бу рангнинг интенсивлиги эритмадаги фермент миқдорига қараб ўзгаради. Бу усул фақат фермент миқдори юқори бўлган материалларни текширишда қўлланилади.

Реактивлар: альбумин ферментнинг стандарт эритмаси, бу эритманинг 1 мл да 10 мг альбумин бор. Биурет реактиви – 0,15 гр ли $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ва 0 .6 гр сегнет тузидан олиб, 50 мл сувда эритилади.Шу эритмага 30 мл ли 10% ли натрий ишқор эритмасидан солиб аралаштирилади ва эритмада қайтар реакция кетмаслиги учун 0,1 гр KI тузидан қўшиб эритма ҳажми сув қўшиб 100 мл га етказилади.

Калибрланган график тузиш учун альбуминнинг стандарт эритмасидан фойдаланилади. Намуналар тайёрланади. Хар бир пробиркага 8 мл дан биурет реактиви қўшилади ва хона хароратида қолдирилади. 30 минутдан сўнг спектрофотометрда 540 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Олдинги натижалар калибрланган график тузишда ишлатилади. Фермент миқдори мг% да ҳисобланади.

2.2. Фермент микдорини Лоури усулида аниқлаш.

Фермент микдорини аниқлашда бу усул жуда кенг қўлланилади. Лоури усули бир вақтнинг ўзида икки хил, яъни биурет реакцияси ҳамда тирозин ва цистеинларга хос Фолин реактиви билан берадиган рангли реакцияга асосланган. Лоури усули суюлтирилган эритмаларда, ион алмашинув хроматографияси ва молекуляр элакларда ферментларни фракциялашда фермент микдорини аниқлаш имконини беради. Бунинг учун қуйидаги реагентлар тайёрлаб олинди:

Реактив "А"- $2\% \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,1 \text{ н NaOH}$.

Реактив "В"- $\text{CuSO}_4 + \text{Na}$ цитрат тузи.

Реактив "С" – 50 мл реактив "А" ва 1 мл реактив "В" аралашмаси.

Реактив "Е" – 1,5 литрли колбага 100 гр натрий вольфрамат ва 25 гр натрий молибдат, 750 мл дистилланган сув, 50 мл 85% ли фосфат кислота ва 100 мл хлорид кислота солинади. Кейинги аралашма солинган колба қайтарувчи совутгичга уланиб, 10 соат давомида қайнатилади. Қайнатиб бўлгач 150 гр литий сульфат, 50 мл дистилланган сув ва бир неча томчи бромли сув қўшилади. Ортиқча бромни чиқариб юбориш учун 15 минут совутгичсиз қайнатилади. Аралашма хона хароратигача совутилади, филтрланади ва хажми бир литрга етказилади. Бу реактив Фолин реактиви дейилади ва у қоронғи идишга солиб сақланади.

Аниқлаш усули: Ишни бошлашдан олдин альбуминнинг стандарт эритмаси ва "С" реактив тайёрлаб олинади. Пробиркаларга альбуминнинг стандарт эритмасидан 0,4 мл дан солинади ва унга "С" реактивдан 2 мл қўшилади, 0,1 мл дис. Сув қўшилади. 10 дақиқадан сўнг аралашмага тезлик билан 0,1 мл Фолин реактиви солинади. 30 дақиқадан сўнг фотоэлектроколориметр ёки спектрофотометрда 750 нм да оптик зичлик аниқланади. Олинган натижалар калибрланган график тузишда ишлатилади. Фермент микдори мкг/мл да ҳисобланади.

2.3. Инсулиназа ферменти ингибитори асосида биоспецифик сорбент тайёрлаш

Реактивлар:

1. Полиамид доначалари – 69мг дан.
2. 2 Н ли HCl- 6 мл.
3. 25% ли 0,03 мл глутар альдегид.
4. 0,1 М борат буфери рН-9,0 – 500 мл.
5. 100 мг (2мл) ингибитор.
6. 0,02М рН 7,4 фосфат буфери – 30 мл.
7. Дис сув.

Керакли асбоблар:

1. Шиша стакан 100 мл дан 2-3 дона.
2. Ўлчов цилиндрлари 100 мл.
3. Пипеткалар.
4. Сув ҳаммоми LW -1.

Ишнинг бориши:

1. **Сорбентни фаоллаштириш.** Полиамид доначалари массаси аниқланади. 1:14 нисбатда 2 Н ли HCl кислота солиниб 45°C ҳароратли сув ҳаммомида 2 соат қолдирилади ва вақти-вақти билан аралаштирилиб турилади. Сўнгра дистилланган сув ва 0,1 М рН 9,0 борат буферида бир неча марта кислота қолмагунча ювилди. Шу асосида фаол гуруҳлар ҳосил қилинади.
2. **Сорбентни модификациялаш.** Фаоллаштирилган полиамид 0,03 мл 25% ли глутар альдигидининг сувли эритмаси бўлган рН- 9,0 0,1 М ли борат буферида 24 соатга хона ҳароратида қолдирилди, вақти-вақти билан аралаштирилди. Сўнгра сорбентдан глутар альдегиди хиди йўқолгунча дистилланган сув ва рН-9,0 0,1 М ли борат буферида ювилди.
3. **Модификацияланган полиамидга ингибиторни ковалент боғлаш.** Модификацияланган полиамидга 100 мг (2мл) ингибитор солинди. 24 соатга

4°C да инкубация қилинди. Сўнгра сорбент 30 мл 0,02 М рН 7,4 фосфат буферида ювилди.

2.4. Биоспецифик сорбентга инсулиназа ферментини сорбциялаш ва десорбциялаш

Инсулиназа ферментининг эндоген ингибитори лиганд сифатида ковалент боғланган биоспецифик сорбентга инсулиназа ферментини сорбция қилиш ва ундан ферментни десорбция қилиб олиш учун қуйидаги ишлар бажарилди:

1. Эритроцитдан ажратиб олиш.

Эритроцитдан ажратиб олиш учун қон музлатилиб, дефрастация қилинди. Гомогенизаторда гомогенизация қилинди. Олинган гомогенат филтрланди. Филтрат 7000 айл/мин (2000г.) да 1 соат давомида центрифуга қилинди. Супернатант яна 14000 айл/мин. 30 минут давомида центрифуга қилинди.

2. Биоспецифик сорбентга инсулиназани сорбциялаш.

Биоспецифик сорбент, яъни полиамид ташувчига олинган жигар экстрактидан 15 мл солинди ва 12 соат инкубацияга 4°C да қолдирилди.

3. Биоспецифик сорбентдан инсулиназани десорбциялаш.

Назарий жихатдан адабиётларда келтирилган маълумотларга кўра десорбция жараёни рН 11,0 да 0,02 М фосфат буфери ёрдамида амалга оширилди. Тезлик билан муҳит нейтрал холига, яъни рН 7,4 га конц. HCl ёрдамида олиб келинди.

Десорбция жараёнидан сўнг эритма таркибидаги фермент миқдори Лоури усулида аниқланди ва протеолитик фаоллиги Ансон усулида ҳисоблаб топилди.

2.5. Ферментнинг протеолитик фаоллигини аниқлаш усуллари.

Ферментларнинг протеолитик фаоллигини аниқлашнинг бир неча усуллари мавжуд.

1.Модификацион усул.

Бу усул козеин субстратини қўллаган ҳолда таҳлил учун олинган материалдаги текширилаётган протеолитик ферментларнинг субстратини гидролизга учратишдаги ферментатив реакциянинг тезлигини аниқлашга асосланган. Реакция тезлиги реакция натижасида ҳосил бўлган тирозин ва триптофан аминокислоталарининг Фолин реактиви билан колориметрик реакцияси орқали аниқланади.

2.Мур ва Штейн усули.

Усул аминокислоталарнинг α - аминогурухининг нингидрин билан рангли реакциясига асосланган. Бунда дикетогидрин – дилидендикетогидриндамин, альдегид аминокислоталар ва кислота ҳосил бўлади.

3.А.П.Алексеевнинг микроусули.

Бу микроусулда оқсил табиатли субстратларни гидролизи натижасида ҳосил бўладиган пептидлардаги аргининнинг борлигига асосланган. Аргининнинг борлиги Сакагучи реакцияси орқали аниқланади.

Ферментнинг протеолитик фаоллигини Ансон усулида аниқлаш

Протеолитик фаолликни Ансон усулида аниқлаш қуйидагича амалга оширилади:

Керакли реактивлар:

1. Субстрат эритмаси.
2. Фермент эритмаси.
3. 0,3 М трихлор уксус кислота.
4. 0,5 М натрий карбонат тузининг эритмаси.
5. Фолин реактиви.

Аниқлаш усули: 1 мл субстрат ва 1 мл фермент эритмаси 1 соатга инкубацияга қўйилади.Сўнгра аралашмага реакцияни тўхтатиш учун 0,3

М ли трихлоруксус кислотаси ёки этил спиртидан қўшилади. 20 дақиқадан сўнг аралашма филтрланади. Олинган филтратдан 0,2 мл дан пробиркага олиб, унга 0,5 М ли натрий карбонат эритмасидан қўшилади. 30 дақиқадан сўнг ФЭК да оптик зичлик аниқланади ва ўйидаги формула орқали протеолитик фаоллик ҳисоблаб топилади.

$$A=(D \cdot 0,8)/(1,72 \cdot 60 \cdot m)$$

Бу ерда:

A- протеолитик фаоллик;

D-фотозлектроколориметрда ўлчанган оптик зичлик;

0.8- трихлоруксус (ТХУ) кислотаси қўшгандан кейин фермент эритмаси ва реакцион аралашмаларнинг ҳажмий муносабати;

1,72- даражаларга бўлган қийишиқ чизик бўйича аниқланадиган тирозинли коэффицент;

60- субстрат гидролизининг вақти, минут;

m-протеолизга олинган фермент препаратининг миқдори (1 мл фермент эритмасига мг да) ёки мг ларда олинган иммобилланган фермент миқдори.

2.7. Олинган натижалар ва уларнинг тахлили.

Инсулиназа ферментининг эндоген ингибиторини ажратиб олиш

учун инсон қонидан фойдаланилади. Бунинг учун қон музлатилди ва дефрастация қилинди. Сўнг қон центрифугаланди ва лизат тайёрланди. Колонкага тайёрланган сорбент жойлаштирилди. Устига лизат қуйилди, сўнгра рН ўзгартирилди, натижада колонкадан инсулиназа ажралиб чиқди. Сўнгра инсулиназани хусусиятлари ўрганилди.

1-жадвал.

№	1-тажриба	2-тажриба
Жигар, гр	46,0	50,0
Фосфат буфери, мл	184	200
Фильтрат, мл	186	196
Гепатоцит қолдиклари, гр	40,4	44,5
Супенатант (7000айл/мин.), мл	150	172
Супернатант (14000 айл/мин.), мл	124	156
Чўкмалар миқдори, гр	5	7,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ , гр	38,936	48,984
Ингибитори чўкма миқдори, мг	24,5	26,8
Фосфат буфери, мл	50	50

Ингибиторли эритма таркибидаги оксил миқдори Лоури усулида аниқланди.

2-жадвал.

№		0	1	2	3	4
		солиштира				
		0	25	50	100	200
Суюлтириш	Фермент, мл	0	0,5	2	2	1

	Фермент миқдори, мг/мл	0		25,5		
	Сув,мл	0,5	12	2	2	1
Д ₇₅₀			0,15	0,09	0,05	0,03

Ингибитори эритма (102мг/2мл) ва модификацияланган полиамид (69мг) инкубациясидан сўнг эритмадаги ва ювиндилардаги фермент миқдори Лоури усулида аниқланди.

3-жадвал.

	Суяқлик,мл	Фермент миқдори,мг
Ингибитор	1,6мл	78,4 мг
1-ювиш	10 мл	8,6 мг
2-ювиш	10 мл	2,3 мг
3-ювиш	10 мл	1,75 мг
Жами	31.6 мл	91,05 мг

69 мг модификацияланган полиамид юзасига 10,95 мг ингибитор боғланган, яъни 0,15 мг ингибитор 1 мг полиамидга уланди

4-жадвал.

Ингибитор параметрлари.

Ҳарорат, °С	T=80°C
Вақт, минут	t=15мин.
Мухит, рН	pH=10.5-11.0
Молекуляр масса, кД, (сефадекс G-100)	Mm=11кД

Қорамол жигари 1:4 нисбатда 0,02М рН 7.4 фосфат буферида гомогенизация қилинди ва филтрланди. Филтрат 7000 айл/мин. 1 соат центрифуга қилинди. Олинган супернатант яна 14000 айл/мин. 30 минут центрифуга қилинди. Олинган жигар экстракти таркибидаги фермент миқдори Лоури усулида аниқланди.

5-жадвал

№		0	1	2	3
		солишгирма			
		0	10	50	100
Суюлтириш	Фермент, мл	0	0,1	0.5	0.5
	Фермент	0		6250	

	миқдори, мг/мл				
	Сув,мл	0,5	0,9	2	0,5
Д ₇₅₀			0,50	0,130	0,075

Ингибитор лиганд сифатида ковалент боғланган полиамидга жигар экстракти (14 мл= 5530 мг) сорбция учун инкубация қилинди. Сўнгра экстрактдаги ва ювиндилардаги фермент миқдори Лоури усулида аниқланди

6-жадвал

	Суюқлик,мл	Фермент миқдори,мг
Жигар экстракти	13,6 мл	4500мг
1-ювиш	10мл	36,3мг
2-ювиш	10мл	11,5мг
3-ювиш	10мл	4,3мг
Жами	43,6 мл	4552,1 мг

Десорбция жараёни 30 мл рН 11.0 да 0.02 М фосфат буфери билан полиамидни ювиш орқали амалга оширилди.

	Десорбция
Буфер миқдори, мл	30 мл
Фермент миқдори, мг	0.6 мг
D_{750}	0.0175

Фермент фаоллиги

Протеолитик ферментлар фаоллигини аниқлашнинг Ансон усулидан фойдаланиб фермент фаоллиги ҳисоблаб топилди. Бунинг учун 0.3 мл инсулин ва 0.1 мл фермент 1 соатга инкубацияга қўйилади. 0.4 мл 0.3 М литрихлоруксус кислотаси ёки этил спиртидан қўшилди. 20 дақиқадан сўнг аралашма филтрланди.

Олинган филтратдан 0.2 мл дан пробиркага олиб, 0.5 М натрий карбонат эритмасидан 1 мл қўшилди. Тезда аралашмага Фолин реактивидан 0.2 мл қўшилди. 30 дақиқадан сўнг ФЭК да оптик зичлик аниқланди. Сўнгра қуйидаги формуладан ферментнинг протеолитик фаоллигини ҳисоблаб топилди:

$$A = (D \cdot 0.8) / (1.72 \cdot 60 \cdot m)$$

8-жадвал.Фаолликни аниқлаш.

	Микдори, мл	Инкубация, минут	Фаоллиги, б.к./мг
Инсулин	0.3 мл	60 минут	-
Фермент	0.1 мл		-
ТХУ ёки этил спирти	0.4 мл	20 минут	-
Na ₂ CO ₃	1.0 мл	5 минут	-
Фолин реактиви	0.2 мл	30 минут	-
Фермент фаоллиги	-	-	5.3 б.к./мг

9-жадвал.Инсулин ферменти хусусиятлари

Мухит, рН	рН=7.4- 8.0
Молекуляр масса, кД, (сефадекс G-100)	рН=7.4-8.0
Фермент фаоллиги, б.к./мг	5.3 б.к./мг

10-жадвал.Инсулиназа металл ионларига таъсирчанлиги.

Ионлар	солиштира	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Mn ⁺²	Zn ⁺²	Cu ⁺	Fe ⁺²	Cd ⁺²
Концентрация, мм	-	50	50	50	100	100	100	100
Фаолликни изгариши, марта	1,0	2,4	0,2	1,9	1,0	0,1	0,5	1,4

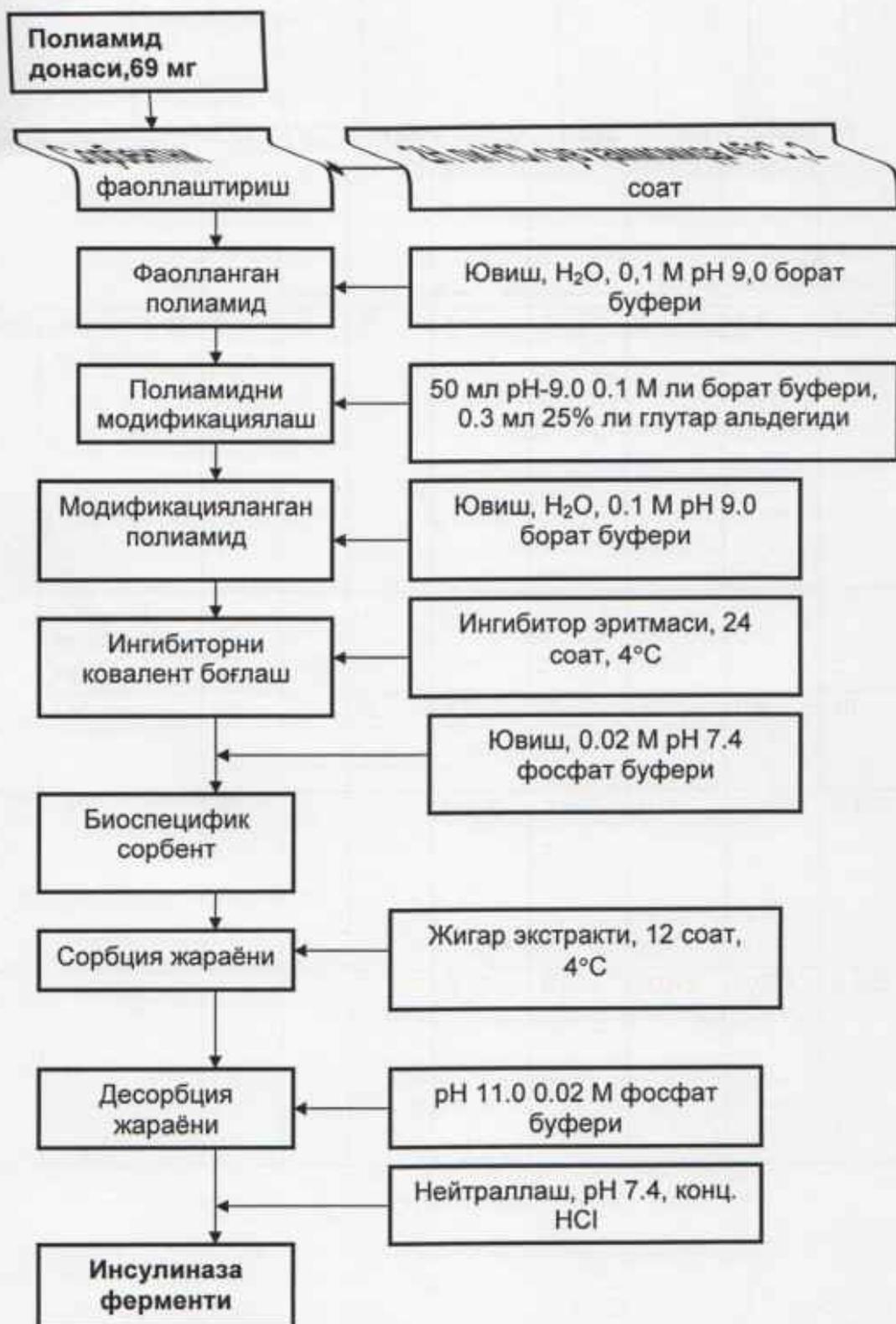
Бу жадвалдан кўришиб турибдики, кальций ионлари фермент фаоллигига ижобий таъсир кўрсатди.Бундан ташқари Mn⁺² ва Cd⁺² ионлари ҳам фермент Фаоллигини оширади.Zn⁺² ионлари ҳеч қандай таъсирга эга эмас, Mg⁺²,Cu⁺ ва Fe⁺² ферментни ингибирлайди.

11-жадвал.Инсулиназа ва унинг ингибиторининг чиқими, фаоллиги ва тозалик даражаси.

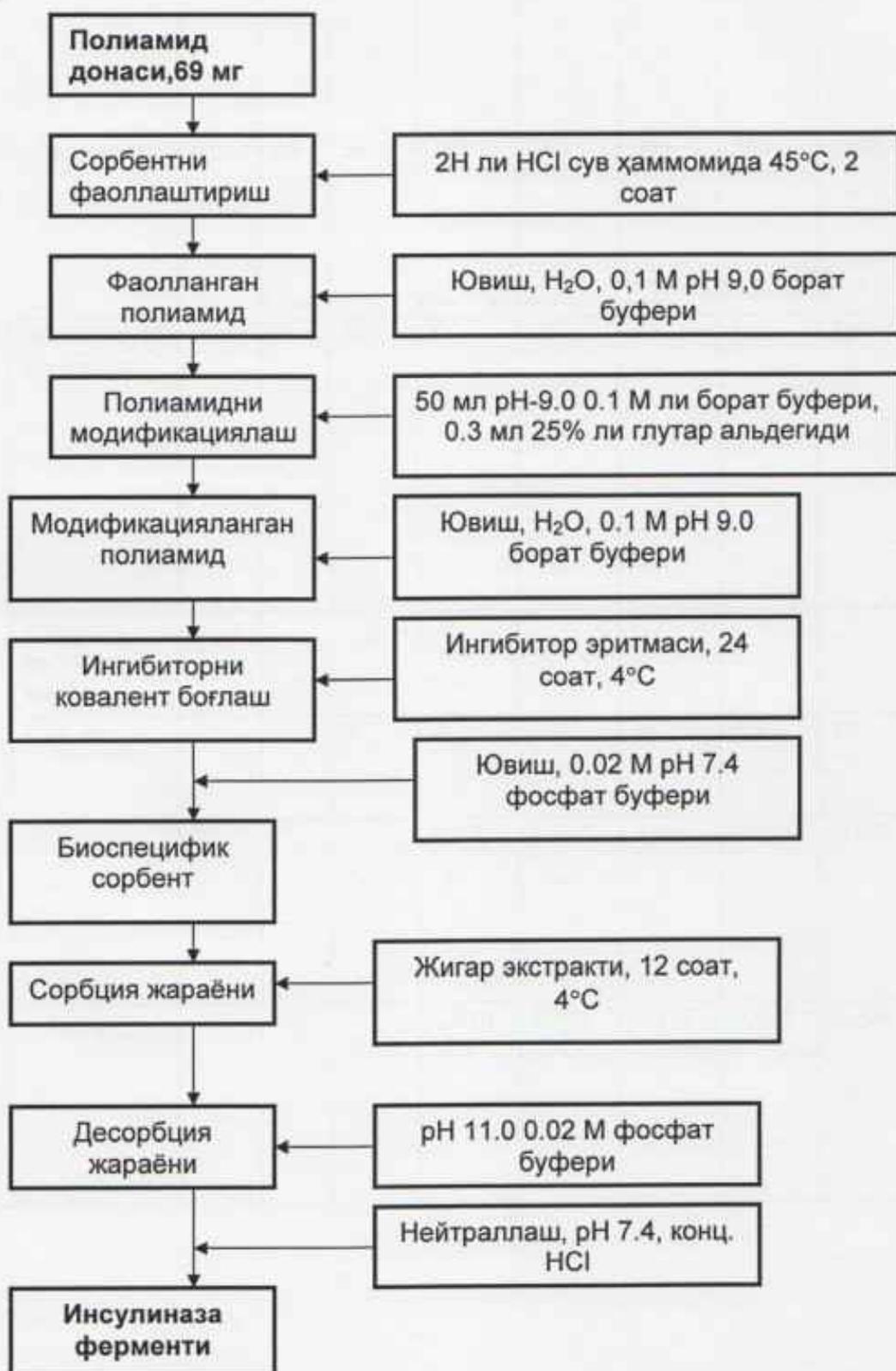
Ингибитор чиқими,%	20%
Фермент чиқими,%	19%
Ингибитор фаоллиги,%	100%
Фермент фаоллиги,б.к./мг	5.3 б.к./мг
Ингибиторнинг даражаси, марта	тозалик 20 000
Ферментнинг даражаси, марта	тозалик 15 000

Кутилганидек инсулин – деградирловчи ферментнинг специфик субстрати инсулин эканлиги аниқ бўлди. Бошқа ферментлар ҳам парчаланadi, лекин жуда паст тезликда.

2.3. Жигардан биоспецифик хроматография усулида инсулиназа ферментини тозалаш.



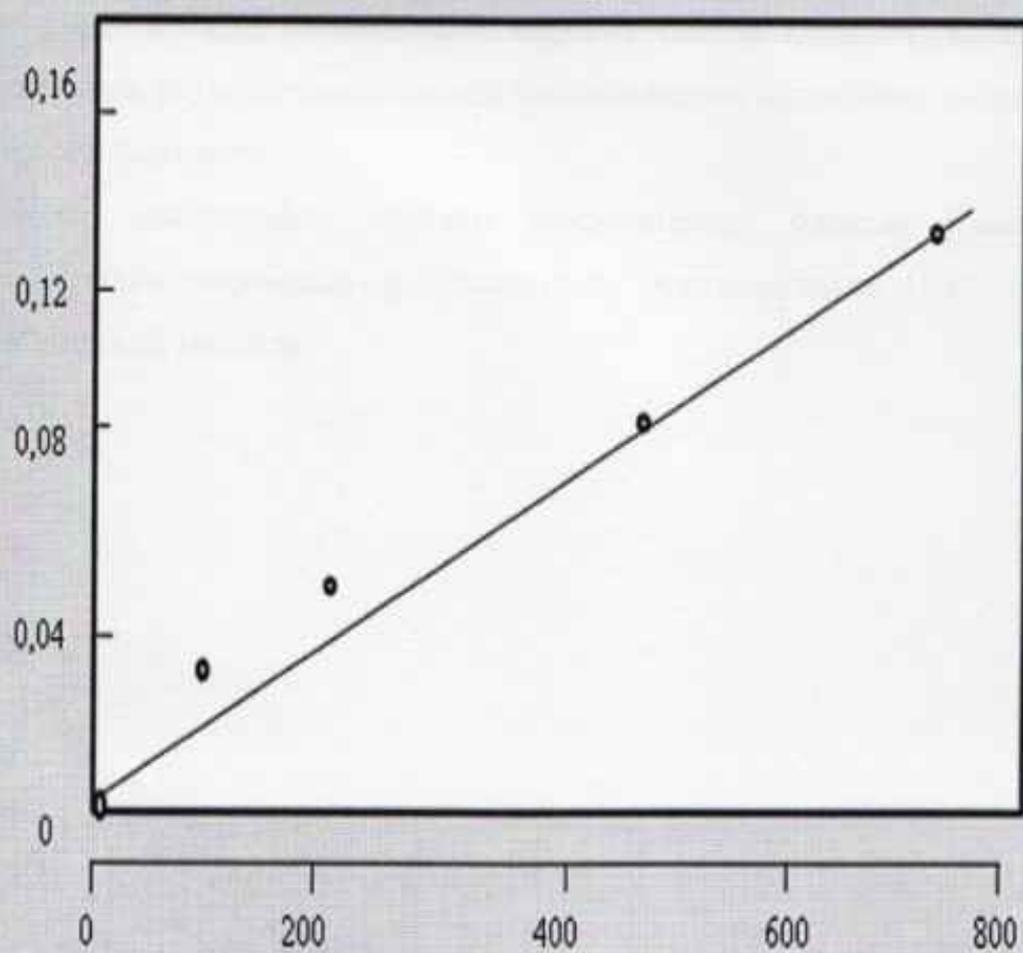
2.8. Жигардан биоспецифик хроматография усулида инсулиназа ферментини тозалаш.



12-жадвал

№		0	1	2	3	4	5	6	7
Фермент миқдори, мкг/мл		0	25	50	100	250	500	750	1000
			←		←	←	←	←	←
Суюлтириш	Фермент, (1 мг/мл)мл	0	2	2	1	2	3	1,5	10
	Фермент миқдори, мкг/мл	0							
	Сув, мл	0,5	2	2	4	2	3	0,5	10
D ₇₅₀		0			0,030	0,040	0,060	0,095	0,100
D ₇₅₀					0,030	0,035	0,075	0,095	0,100

Лоури усули бўйича калибровка чизиғи



Фермент, мкг

Фермент, мкг

Хулоса.

- 1.Полиамид асосида биоспецифик сорбент синтез қилинди. Биоспецифик сорбент олиш учун лиганд сифатида ген инженерия йўли билан олинган одам инсулини ишлатилди.
- 2.Олинган биоспецифик сорбент инсулиназани олишда биоспецифик хроматография жараёнида фойдаланилди. Эритроцитдаги ИДФ ни олиш схемаси ишлаб чиқилди.

Адабиётлар рўйхати

- 1.Hatakeyama M., Lee Ch., Chon Ch., Yayashi M., Mizoguchi T. Purification and Some Properties Rabbit Liver Cytosol Thioltransferase.J.Biochem.(1985). 97.893-897.
- 2.Hatakeyama M., Tanimoto Y., and Mizoguchi T. Purification and Some Properties of Bovine Liver Cytosol Thioltransferase.J.Biochem.(1984) 95.1811-1818.
- 3.Hillson D.A.,and Freedman R.B.Bovine liver thiol – protein disulphide oxidoreductases. Biochem J. (1980) 191.389-393.
4. Hillson D.A.,and Freedman R.B.Resolution of protein disulphide – isomerase's and glutathione – insulin transhydrogenase activities by covalent chromatography.Biochem J. (1980) 191,373 – 388.
- 5.Morin J.E. Carmichael D.F. and Dixon J.E. Characterization, kinetics and comparative properties of thiol: protein disulfide oxidoreductase. Arch.Biochem. and Biophys. (1978)189.2.354 -363.
- 6.Carmichael D.F.,Morin J.E., and Dixon J.E. Purification and characterization of a thiol: protein disulfide oxidoreductase from bovine liver. J. Biol.Chem. (1977) 252.20.7193 – 7167.
- 7.Hawkins H.C., and Freedman R.B. Thiol – protein disulphide oxidoreductases. Biochem. J. (1976) 159, 385 – 393.
- 8.Ibbenson A.L., and Freedman R.B. Thiol – protein disulphide oxidoreductases. Biochem. J. (1976) 159,377 – 384
- 9.Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Langer J., and Wiederanders B. The insulin and glucagons degrading protein's of rat liver. Separation of the proteins from the thiol – protein – disulfide oxidoreductases. Biomed Biochim Acta. (1984) 43.1.29 -38
- 10.Ansorge S.,Bohley P.,Kirschke H.,Langer J.,and Wiederanders B.The insulin and glucagons degrading protein's of rat liver: a metal – dependent enzyme.Biomed Biochim Acta. (1984) 43.1.39-46.

11. Shroyer L.A., and Varandani P.T. Purification and characterization of a rat liver cytosol neutral thiol peptidase that degrades glucagons, insulin, and isolated insulin A and B chains. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985) 236.1.205-219.
12. Goldfine J.D. Does insulin need a second messenger? *Diabetes*, 1197 26 (2)p. 148-155.
13. Vienna R., Rastogi A.K., Insuline binding parameters in erythrocytes of alloxan induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 1985.23. p 169.
14. Aftholter J.A., Cascieri M.A., Bayne M.L., Brange J., Casaretto M., Roth R.A. Identification of residues in the insuline molecule important for binding. *Biochemistry* 1990, 29N33, p 7727 – 7733.
15. Adames N., Blundell K., Ashby M.N., Boone C. Role of yeast insuline degradating enzyme homologes in propheromone processing and bud site selection *Science*, 1995 270 (5235), p 464 – 467.
16. Auletta M., Antoniello S., Abresda N. Insulin – degradating activity in experimental liver cuthosis of the rat. *Enzyme protein*. 1994, 48 (4) p 197-201.
17. Authier F., Posner B.J., Bergeron J.J. Insulin – degradet enzyme. *Clin. Investing. Med.*, 1996, 19(3) p 149-160.
18. Autier F., Cameron P.H., Taupin V. Association of insulin – degrading enzyme with a 70 kDa cyosolic protein in hepatoma cells. *Biochem J.* 1996, 319 (1) p 149-158.
19. Carpenter J.L., Hamer J., Gilbert A., Paccand J.P. Molecular and cellular meckanizm governing the ligand – specific and non – steps of insuline – receptor internalization. *Z Gasterent* 1996, 34 (1) p 73-75
20. Cambhir K.K. Red blood cell insulin receptor in health and *Biochem Med Metabol. Biol.* 1991, 45 (r) p 133-153.
21. Kurothka J.V., Goto S. Alzgehmers β - amiloud peptide specially interocts with and is degraded by insuline degradating enzyme. *FEBS Letter* 1994, 345 (1) p 33-37

22. Lucja S., Franciszek B., Mieczyslaw W., Jerry G. Binding and degradation of 125 insulin of erythrocyte receptor-effect of physical exertion. *Endocrinol Pol.* 1983.44(r)p 137
23. Takeuchi F., Sera K.A., Omura S., Ruth R.A. Insulin degrading by kidney cells expressing the insulin receptor. *Diabet Res Clin. Pruct* 1997,37 (r) p 81-90.
24. Hatakeyama M., Lee Ch., Chon Ch., Yayashi M., Mizoguchi T. Purification and Some Properties Rabbit Liver Cytosol Thioltransferase. *J. Biochem.* (1985). 97.893-897
25. Hatakeyama M., Tanimoto Y., and Mizoguchi T. Purification and Some Properties of Bovine Liver Cytosol Thioltransferase. *J. Biochem.* (1984) 95. 1811-1818.
26. Hillson D.A., and Freedman R.B. Bovine liver thiol - protein disulphide oxidoreductases. *Biochem J.* (1980) 191.389-393.
27. Hillson D.A., and Freedman R.B. Resolution of protein Disulphide - isomerase's and glutathione-insulin transhydrogenase activities by covalent chromatography. *Biochem J.* (1980) 191,373-388.
28. Morin J.E., Carmichael D.F. and Dixon J.E. Characterization, kinetics and comparative properties of thiol:protein disulfide oxidoreductase. *Arch. Biochem. and Biophys.* (1978) 189.2.354-363.
29. Carmichael D.F., Morin J.E., and Dixon J.E. Purification and characterization of a thiol:protein disulfide oxidoreductase from bovine liver. *J. Biol. Chem.* (1977) 252.20.7193-7167.
30. Hawkins H.C., and Freedman R.B. Thiol - protein disulphide oxidoreductases. *Biochem. J.* (1976) 159,385-393.
31. Ibbenson A.L., and Freedman R.B. Thiol - protein disulphide oxidoreductases. *Biochem. J.* (1976) 159, 377-384
32. Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Langner J., and Wiederanders B. The insulin and glucagons degrading protein's of rat liver. Separation of the proteins from the thiol - protein- disulphide oxidoreductases. *Biomed Biochem Acta.* (1984) 43.1.29-38

33. Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Langner J., and Wiederanders B. The insulin and glucagons degrading protein's of rat liver: a metal-dependet enzyme. *Biomed Biochim Acta.* (1984) 43.1.39-46.
34. Shroyer L.A., and Varandani P.T. Purification and characterization of a rat liver cytosol neutral thiol peptidase that degrades glucagons, insulin, and isolated insulin A and B chains. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985) 236.1.205-219.
35. Rohnet K.D. Jahr H., Schmidt S., Hahn H.J., and Zuhlke H. Demonstration of insulin degradation by – protein disulphide oxidoreductase (glutation – insulin transhydrogenase) and protease's of pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Acta.* (1976) 422.2.254-259.
36. Bjelland S., wallevik K., Kroll J., Dixon J., Morin J.E., Reedman R.B., Lambert N., Varandi R.T., Nafz M.A., Immunological identify between bovine preparation of thiol – protein - disulphide oxidoreductase, glutation – insulin transhydrogenase and protein – disulphide isomer's. *Biochim et Biophys Acta*, 1983, 197-199.
37. Roth R.A. Mesirov M.J. Production and characterization of monoclonal antilogy to rot liver thiol: protein disulphide oxidoreduction glutation transhydrogenase *BBA.* 189-192.
38. Гренер Д.К. Мари Р. Биохимия человека. 1998г.
39. Кохи К.Р. Молекулярный мехнизм действия инсулина 1985г.
40. Andreone I. Insulin modulation of gene expression, In: *Diabetes and Metobolism Reviews.* 1985
41. Kono T. Action of insulin on glucose transport and cAMP phosphodiesterase in fat cells: Involvement of two distinct molecular mechanisms. 1983.
42. Duckwort W.S., Hammel F.G., Liepnieks J.J., Peavy D.E., Ryan M.P., Hevmodson M.A., Frank B.H. Identification of A – chain cleavage sites in intact insulin produced by insulin protease and isolated hepatocytes *Biochim. Biophys Res. Commun.*, 1987, 147 (2), p.615-621.
43. Hani J. Shiik., Roth R.A. In vivo assotiation of J125 – insulin with a cytosolic insulin.

44. Sheaver J.D., Coulter C.F., Engeland W.S., Roth R.A., Caldwell M.D. Insuline is degraded extracellularly in wounds by insuline degrading enzyme. *Ann J. Physiol* 1997, 273 (4), E656-E664.
45. Hg F.M., Zhu S.Q., Cui D.F., Fan L., Hung Y.D., Zhang Y.S. Structure and activity of the B – chain of insuline. *Biochem. Int.* 1989, 18(2) p. 373-381.
46. Рахимов М.М. Мембранный катализ. Узб. б. ж. 2010 с.
47. Николаев С.Л., Стрелкова М.А., Комов В.П. *Вопр. Мед. Химик*, 2001, 47, (3) с. 329-337
48. Ахмедов А.Т., Юнусова И.Х., Ризаева Б.Р., Рахимов М.М. Инсулин – деградирующий фермент из печени крысы и влияние катионов. Узб. б. ж. 2010, с.
49. Юнусова И.Х., Ризаева Б.Р., Ахмедов А.Т., Рахимов М.М. Инсулин – деградирующий фермент из эритроцитов крыс. Узб. б. ж., 2011, с.
50. Mirsky J.A., Broth – Khan R.H., Insulin degradation.
51. Yokono K., Imamura Y., Shii K., Sakai H., Baba S. Purification and characterization of – insuline – degrading enzyme from pig skeletal muscle. *Endocrinology*. 1981, 108 (4), p. 1527-1532.
52. Yokono K., Roth R.A., Baba S. Identification of insulin degrading enzyme on the surface of cultured human lymphocytes, rat hepatoma cells and primory culture of rat hepatocytes *Endocrinology* 1982. 111 (4) p. 1102-1108.
53. Wroblewski V.J., Masnyk V., Khabatta S.S., Beker G.W. Mechanisms involved in degradation of human insulin by cytosolic fraction of human, monkey and rat liver. *Diabetes*, 1992. 41 (4), p 539-547.
54. Chesnau V., Perlman R.K., Li W., Keller G.A., Posner V.R. Insuline – degrading enzyme does not require peroxisoma localization for insulin degradation. *Endocrinology*, 1997, 138 (8), p. 3444-3451.
55. Chevenne D., Letailleur F., Trivin F., Porquet D. Effect of hemolysis on the concentration of insulin in serum determined by RIA and IRMA. *Clin. Chem.*, 1998, 44 (r) h. 354.

56. Bennet R.G., Hammel F.G., Duckworth W.C. Characterization of the insulin inhibition of the peptidolytic activities of the insulin-degrading enzyme – proteasome complex. *Diabetes*, 1997, 46 (r), p. 197-203.
57. Duckworth Bennet R.G., Hamel F.G. The significance of intracellular insulin to insulin action. *G. Investiy. Med.*, 1997, 45 (r) p 20-27
58. Duckworth Bennet R.G., Hamel F.G. Insulin acts intracellularly on proteasomes through insulin-degrading enzyme. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 1998, 244 (r), p 390-394.
59. Fowcett J., Rabkin R. Degradation of insulin by isolated rat renal cortical endosomes. *Endocrinology*, 1993, 133 (4), p. 1539-1547.
60. Ogawa W., Shii K., Yonezawa K., Baba S., Yokono K. Affinity purification of insulin-degrading enzyme and its endogenous inhibitor from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267 (2), p. 1310-1316
61. Savoy L.A., Muir A.V., Davies J.G., Oford R.E. Insulin protease. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268 (29), p. 21538-21544
62. Yonezawa K., Yokono K., Shii K., Hari J., Yoso S., Sakamoto T., Kawase Y., Akiyama H., Takemori S., Biological properties of an initial degradation product of insulin by insulin-degrading enzyme. *Endocrinology*, 1989, 124 (1)
63. Seabright P.J., Smith G.D. The characterization of insulin degradation products in endosomes. *Biochem. Soc. Trans* 1995, 23 (1), p. 1s
64. Duckworth W.S., Bennet R.G., Hamel F.G., Ryan M.P., Roth R.A. Human red blood cell insulin-degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease share antigenic sites and generate identical products from insulin. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265 (5) p 2984-2987.
65. Варейкис Э.Й., Матулявичюс В.А., Лашас Л.В. и др. // В сб.: Теоретические и практические аспекты познания биохимических процессов, 1983.
66. Матулявичюс В.А., Варейкис Э.Й., Лашас Л.В. Инсулиноподобное вещество и инсулиндеградирующий комплекс гемолизата эритроцитов человека // *Биохимия*, 1986.-Т.5.-вып.2.-С.278-28

Хаджиметова Севара Рауповнанинг “Қондаги глюкоза миқдорини ўзгартирувчи фермент системасини ўрганиш” мавзусида магистрлик диссертациясига

Т а қ р и з

Инсон организмидаги оксил табиатга эга бўлган гормонлар ичида инсулин алоҳида ўринга эга. Бу гормон бир қатор метаболик жараёнларда қатнашади ва организмдаги асосий физиологик ҳолатларда иштирок этади. Инсулиннинг метаболик ўзгариши турли хил патологик ҳолатларга сабабчи бўлади. Уларнинг ичида энг ўрганилгани ва кенг тарқалгани қандли диабетдир. Қандли диабет – бир умирлик касаллик, уни бутун ҳаёт давомида даволаш зарур. Мабодо бемор даволанмаса, организмда чуқур ўзгаришлар юз бериб, унинг асоратлари ривожланиб кетади.

Ҳозирги кундга келиб ҚД билан чалинган беморлар сони дунёда 350 млн дан ортиб кетган ва бу миқдор муттасил ортиб бориш билан бирга “ёшариб” бормокда. Яъни ҚД хасталиги борган сари кўплаб ёшларда учрамоқда.

Муаммонинг долзарблиги ҚД нинг катта иқтисодий-ижтимоий аҳамиятга эга эканлиги. Унинг бутун дунёда ва Ўзбекистонда жадал кўпайиши, шунингдек бевақт меҳнат қобилиятини йўқотишга ва эрта ўлим сонининг ортиб кетишига олиб борувчи томирли хасталикларнинг тарқалиши билан изоҳланади.

Маълумки протеолитик ферментлар инсулинни бошқа субстратлар қаторида ферментатив деградацияга учратади ва полипептид боғларни ўзгартиради. Лекин шу вақтгача инсулинга специфик таъсир қилувчи ферментлар сони ва жойлашиши аниқ эмас. Инсулин парчаловчи фермент инсулиназанинг қонда инсулиннинг глюкозани транспортида қатнашиш жараёнига таъсир этиши маълум. Шу сабабли инсулиназани эритроцитлардан ажратиш ва инсулинга спецификлигини ўрганиш муҳим.

Диссертация ишини бажаришда қуйидаги вазифалар бажарилди:

- Экстракт (лизат) олиш;
- Сорбент тайёрлаш;

- Биоспецифич хроматография усулини ишлаб чиқиш;

Биринчи марта эритроцитлардан инсулин парчаловчи фермент ажрати олинди.

Эритроцитлардаги инсулиназа ферментининг инсулинга спецификлигига асосланиб, қондаги инсулин миқдорини аниқлаш, яъни қандли диабет касаллигида ташкил қуйидаги фойдаланиш мумкин.

С.Р.Хаджиметованинг диссертация иши 62 саҳифадан иборат бўлиб, у кириш қисми, адабиётлар шарҳи, тадқиқотлар қисми, умумий хулосалар, қатор фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловани ўз ичига олган.

Диссертация ишини бажаришда диссертент томонидан ўрганилаётган соҳадаги илмий адабиётлар кераклигича тўлиқ ўрганилган ва таҳлил қилинган. Диссертация ишининг тажрибалар бўлимларидаги тадқиқотлар замонавий усуллар ёрдамида амалга оширилган бўлиб, бунда юқори аниқликка эга бўлган асбоб-ускуналардан фойдаланилган.

Диссертация ишнинг кириш қисмида танланган мавзунинг долзарблигига асосланиб, олиб борилган тадқиқотларнинг мақсад ва вазифаларини, уларни амалга ошириш режалари аниқ кўрсатилган. Диссертант шу қисмда ўзи олиб борган тадқиқотлар натижаларининг илмий янгилигини ва амалий аҳамиятини ифодалаб берган.

Биринчи бобда адабиётлар шарҳи келтирилиб, Инсулин ва инсулиназалар, қонда глюкоза даражасини бошқариш, эритроцитлардаги инсулиназа ферментини ажратиб олиш ва хусусиятларини ўрганиш келтирилган.

Диссертациянинг иккинчи бобида олиб борилган изланишлар асосида объектларнинг тавсифи ва усуллари келтирилган, ишлатиладиган ёрдамчи моддалар, сифат ва миқдори таҳлил усулларини келтирилган.

Ишни ижобий томони:

- 1) Илк бор эритроцитлардан инсулин парчаловчи фермент ажратиб олинган;

2) Шу фермент асосида кондаги инсулин микдорини аниклаш мумкинлиги асослаб берилган;

3) Шу усул бўйича қандли диабет касаллигида ташхис қўйишда фойдаланиш мумкин;

Саволлар:

1) Келтирилган расмлар манбааси кўрсатиб ўтилса яхши бўларди (расм 1,2,3 ва б.)

2) Иммунобиологик препаратлар бор, лекин микробиологик препаратлар деганда нимани инобатга оласиз?

Хулоса: Умуман катта аҳамиятга эга муаммо кўтарилган ва уни ижобий баҳолаш мумкин.

Расмий оппонент

Тошкент Фармацевтика институти,

Фармакология кафедраси

Профессори т.ф.д.

X.U.Алиев

ning imzosini tasdiqlaymiz
ToshFarmi XB boshlig'i



Мажлис раиси, д.у.ф.д.

Комидов Х.М.

Мажлис каттаби, доц.

Зейнова Х.Т.

- Биоспецифик хроматография усулини ишлаб чиқиш;

Биринчи марта эритроцитлардан инсулин парчаловчи фермент ажратиб олинди.

Эритроцитлардаги инсулиназа ферментининг инсулинга спецификлигига асосланиб, қондаги инсулин миқдорини аниқлаш, яъни қандли диабет касаллигида ташкил қуйидаги фойдаланиш мумкин.

С.Р.Хаджиметованинг диссертация иши 62 саҳифадан иборат бўлиб, у кириш қисми, адабиётлар шарҳи, тадқиқотлар қисми, умумий хулосалар, қатор фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловани ўз ичига олган.

Диссертация ишини бажаришда диссертент томонидан ўрганилаётган соҳадаги илмий адабиётлар кераклигича тўлиқ ўрганилган ва таҳлил қилинган. Диссертация ишининг тажрибалар бўлимларидаги тадқиқотлар замонавий усуллар ёрдамида амалга оширилган бўлиб, бунда юқори аниқликка эга бўлган асбоб-ускуналардан фойдаланилган.

Диссертация ишнинг кириш қисмида танланган мавзунинг долзарблигига асосланиб, олиб борилган тадқиқотларнинг мақсад ва вазифаларини, уларни амалга ошириш режалари аниқ кўрсатилган. Диссертант шу қисмда ўзи олиб борган тадқиқотлар натижаларининг илмий янгилигини ва амалий аҳамиятини ифодалаб берган.

Биринчи бобда адабиётлар шарҳи келтирилиб, Инсулин ва инсулиназалар, қонда глюкоза даражасини бошқариш, эритроцитлардаги инсулиназа ферментини ажратиб олиш ва хусусиятларини ўрганиш келтирилган.

Диссертациянинг иккинчи бобида олиб борилган изланишлар асосида объектларнинг тавсифи ва усуллари келтирилган, ишлатиладиган ёрдамчи моддалар, сифат ва миқдори таҳлил усулларини келтирилган.

Ишни ижобий томони:

- 1) Илк бор эритроцитлардан инсулин парчаловчи фермент ажратиб олинган;

- Эритроцит (лигит) олинди;

- Сорбент тайёрлаш;

Биотехнология кафедрасининг 14- июнь
2012- йил 21 – СОНЛИ МАЖЛИСИ БАЁНИДАН

КУЧИРМА

Қатнашдилар: Каф. мудири проф. Комилов Х.М., кафедра ходимлари: доц. Зоирова Х.Т., Доц Адилбекова Д.Ю., доц. Пўлатова Ф.О, ассис.Махмудов С.Д., ассис. Неъматова Г.А., ассис. Абдужалилова Х.Д., ассис. Исаева Б.Т., Рахимов.М.М.

Кун тартиби : Саноат Фармация факультетининг 5А522902-иммунобиологик ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Хаджиметова Севаранинг «Қондаги глюкоза миқдорини ўзгартирувчи фермент системасини ўрганиш» мавзусидаги Магистрлик диссертацияси муҳокамаси.

Эшитилди: Саноат Фармация факультетининг 5А522902-иммунобиологик ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Хаджиметова Севаранинг «Қондаги глюкоза миқдорини ўзгартирувчи фермент системасини ўрганиш» мавзусидаги Магистрлик диссертацияси тингланди. Кафедра ходимлари доц. Зоирова Х.Т., доц.Адилбекова Д.Ю. томонидан берилган саволларга тўлиқ жавоб берди. Музокарадан сўнг магистрант Хаджиметова С.химояга тайёр деб топилди.

Қарор килинди: Саноат Фармация факультетининг 5А522902 иммунобиологик ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Хаджиметова Севаранинг «Қондаги глюкоза миқдорини ўзгартирувчи фермент системасини ўрганиш» мавзусидаги Магистрлик диссертацияси химояга тавсия этилсин

Мажлис раиси, проф.



Комилов Х.М.

Мажлис котиби, доц



Зоирова Х.Т.