

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОЎЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

ОРГАНИК



К КИМЁ КАФЕДРАСИ

САНОАТ ФАРМАЦИЯСИ

факультети

ТАЛАБАЛАРИ УЧУН

“БИОЛОГИК КИМЁ”

фанидан

ЎҚУВ - УСЛУБИЙ ҚЎЛЛАНМА

Мавзу: Ферментлар

ТОШКЕНТ – 2006

Кириш

Фармацевтика институтида биокимёнинг саноат фармацияси факультети талабалари учун ушбу ўқув қўлланма умумий ўқув дастури асосида тузилган.

Муаллифлар талабаларга амалий ва мустақил ишларни амалга ошириш йўлланмаларни, ўқилаётган бўлимнинг саноат фармациядаги амалий аҳамиятини, организмда кечадиган биокимёвий жараёнларнинг ўзига хос хусусиятларини, уларни физик – кимёвий хоссаларини ўрганишга, шунингдек моддалар алмашинувининг турли жиҳатларини текширишга қаратилган.

Сўз боши

Ушбу ўқув қўлланмада биокимё ва молекуляр биология фанининг ҳозирги замон даражасига таянган ҳолда биологик жараёнларни кимёвий асосларини, молекуляр механизмларини ўрганиш ҳамда уларни назарий ва амалий имкониятларидан халқ хўжалигинининг турли соҳаларида фойдаланиш, дорилар таъсири механизмини устивор йўналишларини ўрганиш асосида янги дори воситалари яратишда ва шунингдек олинган биокимёвий маълумотларни фармакотерапияда қўлланилишига қаратилган.

ФЕРМЕНТЛАР

Тирик организмларда содир бўладиган барча кимёвий реакциялар махсус катализаторлар ёрдамида боради. Оқсил табиатга эга бўлган бундай катализаторлар *ферментлар* деб аталади. Ферментларнинг оқсилларга мансуб эканлигини исботловчи далиллардан бири протеолитик ферментлар таъсирида улар фаоллигининг камайишидир.

Оддий оқсиллардан, яъни фақата минокислоталардан ташкил топган ферментлар *бир компонентли* ферментлар дейилади. Масалан, рибонуклеаза, трипсин, папаин ва бошқалар. Агар ферментларм урақкаб оқсиллардан ташкил топган бўлса, яъни уларнинг таркибида аминокислоталардан ташқари бошқа бирикмалар ҳам учраса, улар *икки компонентли* ферментлар деб аталади. Оксидланиш-қайтарилиш реакцияларида иштирок этувчи ферментлар икки компонентли ферментлардир.

Ферментлар бир қатор ўзига хос хусусиятларга эга. Буларга ферментларнинг термолабиллиги, спецификлиги, муҳит рНининг ўзгаришига нисбатан сезувчанлиги, активатор ва ингибиторларнинг таъсирига сезувчанлиги, активатор ва ингибиторларнинг таъсирига мойиллиги киради. Ферментларнинг таъсири ва уларнинг активлиги реакцияда иштирок этаётган модданинг камайишига ёки ҳосил бўлаётган модданинг ортиб боришига қараб белгиланади. Одатда ферментатив препарат сифатида ўсимлик ва ҳайвон тўқималарининг шираларидан фойдаланилади. Бундай шираларда ферментлар эриган ҳолда бўлади. Юзирга қадар маълум бўлган ферментлар 6 синфга бўлинади:

1. *Оксидоредуктазалар* – оксидланиш ва қайтарилиш реакцияларини катализлайди.
2. *Трансферазалар* – маълум кимёвий гуруҳлари бир бирикмадан иккинчи бирикмага қўчирилишини таъминлайди.
3. *Гидролазалар* – мураккаб органик бирикмаларнинг сув ёрдамида парчаланиш реакцияларини катализлайди.
4. *Лиазалар* – субстратдан сув иштирокисиз маълум гуруҳларнинг ажралишини катализлайди. Бу ферментлар фаолияти туфайли ё қўшбој ҳосил бўлади ёки маълум гуруҳларнинг қўш бојларига бирикиши таъминланади.
5. *Изомеразалар* – ҳар хил органик бирикмаларнинг изомерланиш реакцияларини катализлайди.

6. *Лигазалар* – АТФ ёки шунга ўхшаш нуклеозид трифосфатлар энергияси ҳисобига оддий молекулалардан мураккаб бирикмалар ҳосил бўлиши реакцияларини катализлайди.

Хужайра изотермик кимёвий машина – нормал тўхтовсиз ишлаб туриши учун махсус биологик катализаторлар бўлиши зарур. Масалан, организм модда алмашинувида ферментлар иштирокига мисол қилиб, овқат ҳазм қилиш аъзоларидаги ферментлар бажарадиган вазифаларни кўрсатиш мумкин. Инсонларнинг баъзи касалликлари улар тўқималарида битта ёки бир қанча ферментларни етишмаслиги ёки камчилиги билан боғлиқ бўлади. Масалан, галактозани глюкозага айлантириб берадиган ферментнинг болаларда етишмаслиги галактоземияга сабаб бўлади, бунда бола ортиқча галактоза билан заҳарланади ва ҳаётининг биринчи ойларидаёқ нобуд бўлади. Баъзан паталогик ўзгаришлар бирор бир ферментнинг фаоллигини ортиб кетиши натижасида ҳам вужудга келиши мумкин. Ксанतिकсидаза фаоллигининг ошиши подаграга сабаб бўлади. Шунингдек, қон плазмасида, эритроцитларда ёки тўқима намуналарида баъзи бир ферментларни фаоллигини аниқлаш натижасида кўпчилик касалликларнинг диагнозини аниқлаш мумкин.

Ферментлар фан ва саноатнинг кўпгина тармоқларида кенг қўлланилади.

Озиқ-овқат ва фармацевтика саноатининг кўпгина тармоқлари – виночилик, нон ёпиш, пишлоқ пишириш, спирт олиш, чой, аминокислотала, витаминлар, антибиотиклар ишлаб чиқариш ҳам ҳар хил ферментатив жараёнлардан фойдаланишга асосланган. Шунинг учун ферментлар хоссаларини ва таъсир механизмини ўрганиш кимёгарларга халқ хўжалигининг барча соҳаларида қўлланиладиган янги анча мукаммаллашган катализаторлар яратишга имкон беради.

Ферментларнинг фаоллигини аниқлашда кимёвий усуллар билан бир қаторда спектрофотометрик, электрофотокolorиметрик, хроматографик ва бошқа усуллардан кенг фойдаланилмоқда.

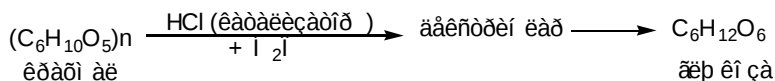
Ферментларнинг умумий хусусиятларини ўрганиш

Анорганик катализаторлар билан ферментлар таъсирини таққослаш

Ферментлар аорганик катализаторлардан бир қанча хоссалари билан фарқ қилади. Ферментлар юқори даражада ўзига хос биологик катализаторлардир. Улар ўртача ҳароратда, кучсиз кислотали, нейтрал ёки кучсиз ишқорий муҳит, ион кучи паст бўлган эримталарда, нормал атмосфера босими шароитида юқори фаолликини намойён қила олади.

Аорганик ва сунъий катализаторлар энг юқори ҳароратда (100-1000°C), кучли кислотали ёки кучли ишқорий муҳит, босим шароитида оптимал фаолликка эга бўлади.

Аорганик ва биологик катализаторларнинг фаоллигини крахмалнинг гидролизланиш мисолида солиштириб кўриш уммкин. Крахмал хлорид ёки сульфат кислота таъсирида узоқ вақт қайнатилганда гидролизланади, аввал декстринларга, сўнгра глюкоза:



Крахмал амилаза таъсирида мальтозагача парчаланади. Крахмал йод билан кўк рангли маҳсулот беради, гидролиз маҳсулотлари эса йод билан бинафша, қизил, жигар ранг-сариқ тус беради. Шунинг учун крахмал гидролизланса, рангли реакциялар ёрдамида бу жараённинг боришини кузатиб туриш мумкин.

1-амалий иш. Крахмални хлорид кислота таъсирида гидролизлаш

Текширилувчи материал: крахмал, сўлак

Реактивлар: 10% ли хлорид кислота, Люголь эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% эритмаси, дистилланган сув

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, с ўв ҳаммоми, най ўтказилган пробка

Ишнинг бажарилиши:

Пробиркага 2 мл 1% ди крахмал олиб 1 мл 10% ли хлорид кислота эритмасидан қшилади. Пробирка ојзи газ ўтказувчи най ўрнатилган пробка билан беркитилади ва 10 дақиқа давомида оҳиста қайнатилади. Сўнгра 2 та пробиркага 10 тмочидан гидролизатдан қуйиб, биринчисига 1-2 томчи Люголь эритмаси томизилади. Иккинчисига 10 мл 10% ли натрий гидроксид, 5 томчи 1% ли мис сульфат эритмаси қўшиб қиздирилади. Триммер реакцияси натижасида пробиркадаги суюқлик кўк ранга кирса, крахмал гидролизланмагани, ҳар иккала

пробиркадаги суюқлик сариқ ёки қизил рангга кириши крахмал гидролиз бўлганини билдиради.

2-амалий иш. Крахмалнинг ферментлар ва кислоталар таъсирида гидролизланиши

3 та пробиркага крахмалнинг 0,3% ли натрий хлорид эритмасидаги 1% ли эритмасидан 10 томчидан қуйиб, биринчисига 10 марта суюлтирилган сўлақдан 5 томчи, иккинчисига 10% ли хлорид кислота эритмасидан 5 томчи, учинчи пробиркага 5 томчи сув (назорат) қуйиб, учала пробирка 38°C ли сув җаммомида 10 дақиқа давомида иситилади, сўнг пробиркалардаги суюқликларни 2 га бўлиб, бир қисми билан крахмалаг йод таъсир эттириш, иккинчи қисми билан Троммер реакциялари ўтказилади.

Ферментлар фаоллигининг муҳитга бојлиқлиги

лар қандай фермент ўзига хос муайян муҳитда (рН) юқори фаолликка эга бўлади. Шу муҳит ўзгариши билан ферментнинг фаоллиги ҳам сусаяди. Бунга саба шуки, ферментнинг ионланувчи гуруҳлари муҳит ўзгариши билан ўз фазовий ҳолатини ўзгартиради ва фермент фаоллигига таъсир кўрсатади.

1-амалий иш. Пепсиннинг фаоллигига рН муҳитнинг таъсири

Оптимал муҳитда пепсин вақт бирлиги ичида фибрин оксилани тўлиқ парчалайди.

Тегиширилувчи материал: меъда шираси ёки 0,2% ли хлорид кислотадаги 0,1% ли пепсин эритмаси

Реактивлар: фибрин, рН 1,5-5,0 гача бўлган фосфат-цитрат буфери

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, сув җаммоми ёки термостат

Ишнинг бажарилиши:

5 та пробиркага турли муҳитли буфер эритмадан 1 мл дан солинади.

Пробиркалар	1	2	3	4	5
Буфер эритманинг рН	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0

Пробиркаларнинг ҳар қайсисига 0,5 мл дан пепсиннинг 0,2% ли хлорид кислотадаги 0,1% ли эритмаси ва фибрин солинади. Пробиркадаги маҳсулотлар яхшилаб аралаштирилади ва 38-40°C ли сув ҳаммомига ёки термостатга 40-50 дақиқага қўйилади. Бир оздан сўнг оқсил бўлакчаларининг эриш даражаси аниқланади. Оптимал муҳитда оқсил бўлакчалари тўлиқ эриб, муҳит силжиган пробиркаларда эса эримаганлиги кузатилади.

2-амалий иш. Амилаза фаоллигига муҳитнинг (pH) таъсири

Текширилувчи материал: сўлак

Реактивлар: натрий гидрофосфатнинг 0,2 М эритмаси, лимон кислотанинг 0,1 М эритмаси, 0,5% ли крахмалнинг 1% ли натрий хлориддаги эритмаси, 0,1% ли йод эритмаси

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар

Ишнинг бажарилиши:

7 та пробиркага жадвалда кўрсатилган миқдорда 0,2 м иккиламчи натрий фосфат ва 0,1 м лимон кислота эритмасидан қўйилади. Натижада pH 5,6 дан 8,0 гача бўлган буфер эримталар ҳосил бўлади. Iар бир пробиркага 10 марта суюлтирилган сўлақдан 10 томчидан, 0,5% ли крахмал эритмасидан 10 томчидан қўйилади.

Пробиркадаги суюқлик яхшилаб аралаштирилгач, хона хароратида 5 дақиқа қолдирилади, сўнг 4 пробиркадаги суюқликдан 1 томчи олиб, йод билан реакция қилиб кўрилади. Агар кўк ранг ҳосил бўлса, яна 5 дақиқага қолдирилади. Олинган аралашма бошқа, яъни қизил ёки сариқ рангга бўялса, ҳамма пробиркага 0,1% ли йод эритмасидан 1-2 томчидан томизилади. Ўайси пробиркада крахмал тўла гидролизланган бўлса, шу пробирканинг pH кўрсаткичи текширилатган ферментнинг (амилазанинг) pH оптимумига тўјри келади.

Пробирка №	0,2м NaHPO ₄ миқдори (мл)	0,1м лимон кислота миқдори (мл)	Аралашманинг pH қиймати	0,5%ли крахмалнинг 1% ли NaCl даги эритмасининг миқдори	10 марта суюлтирилган сўлак миқдори	Йод билан реакция натижасида ҳосил бўлган ранги
1	0,58	0,42	5,6	10 томчи	10 томчи	
2	0,63	0,37	6,0	10 томчи	10 томчи	
3	0,69	0,31	6,4	10 томчи	10 томчи	

4	0,77	0,23	6,8	10 томчи	10 томчи	
5	0,87	0,13	7,2	10 томчи	10 томчи	
6	0,94	0,06	7,6	10 томчи	10 томчи	
7	0,97	0,08	8,0	10 томчи	10 томчи	

3-амалий иш. Ферментатив реакция тезлигига ҳароратнинг таъсири

Ферментлар оқсил табиатга эга бўлганлиги учун уларнинг муҳим характери хоссаси термолабиллиги, яъни юқори ҳароратга сезгирлигидир. 70-75°C да фермент денатурацияланиб, каталитик хоссалари йўқолади. Ўр қандай каталитик реакциялар сингари ферментатив реакция тезлиги ҳарорат кўтарилиши билан ортади. Ферментлар фаоллигини ўлчашда албатта оптимал ҳарорат бўлиши шарт. Шу сабабли ферментларнинг фаоллиги 25°C ёки 37°C ораллиғида ўлчанади.

Тегиширилувчи материал: 10 марта суюлтирилган сўлак эритмаси

Реактивлар: крахмалнинг 1% ли эритмаси, йоднинг 0,1% ли эритмаси

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, музли стакан

Ишнинг бажарилиши:

4 та пробирка олиб, уларнинг ҳар бирига 10 томчидан, 1% ли крахмал эритмасидан қуйилади, биринчи пробиркани музли стаканга, иккинчисини хона ҳароратида, учинчисини 15°C ли сув ҳаммомига, тўртинчисини 75°C сув ҳаммомига ёки термостатга қўйилади, 5 дақиқадан кейин пробиркаларнинг ҳаммасига шу турган ҳолатида 10 марта суюлтирилган сўлақдан 10 томчидан қўшиб, яна 5 дақиқа шу ҳолатга қолдирилади. Бу муддат ўтгандан сўнг пробиркалардаги аралашмалардан алоҳида пробиркаларга 1-2 томчидан олиб, устига 1 томчидан 0,1% ли йод эритмасидан томизилади. Агар ҳамма пробиркалардаги суюқликлар кўк рангга кирса, инкубация яна 5 дақиқа давомида қолдирилади ва йод билан реакция қайтадан бажарилади. Турли хил пробиркалардаги суюқликлар йод билан ҳар хил рангга кириши крахмалнинг ҳар хил даражада гидролизланганлиги кузатилади. Ферментатив реакциянинг энг юқори тезлиги 45°C да эришилади, гидролизнинг энг секин кетиши ёки кетмаслиги 1 ва 4 пробиркаларда, яъни 0°C ва 75°C да кузатилади.

Фермент миқдорининг реакция тезлигига таъсири

Ферментатив реакциянинг бошланғич тезлиги субстрат миқдорининг ортиқча бўлши шarti билан фермент миқдoriga тўғри пропорционадир. $V=RE$, бунда R-реакция тезлиги константаси, E-фермент миқдори.

Ушбу боғлиқликни график ифодалашда тўғри чизиқ ҳосил бўлади.

Турли фермент препаратлари фаоллигини таққослаш йўли билан ушбу препаратлардаги ферментлар миқдорини аниқлаш уммкин.

1-амалий иш. Амилаза миқдорини крахмалнинг парчаланиш тезлигига таъсири

Тегиширилувчи материал: 1:10 суюлтирилган сўлак амилазаси

Реактивлар: крахмалнинг 1% ли эритмаси, калий йодда тайёрланган йоднинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув, натрий хлориднинг 0,85%ли эритмаси

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, термостат ёки сув ҳаммоми

Ишнинг бажарилиши

Иш тартиби жадвалга мувофиқ бажарилади.

Пробирка №	Натрий хлорид эритмаси, мл	Крахмал эритмаси, мл	Дистилланган сув, мл	Амилаза, мл
1	0,5	1,0	0,9	0,1
2	0,5	1,0	0,7	0,3
3	0,5	1,0	0,5	0,5
4	0,5	1,0	0,3	0,7

Пробиркадаги эритмалар аралаштирилади ва 38°Сли термостат ёки сув ҳаммомида 15 дақиқага қўйилади. Бир оздан сўнг крахмалнинг турли фермент миқдори таъсирида парчаланиш даражаси крахмалнинг йод билан берган рангли реакцияси ёрдамида аниқланади.

2-амалий иш. Ферментнинг ўзига ҳослиги

лар қандай фермент фақат ўзига хос кимёвий реакция тезлигини ошириш қобилиятига эга. Ферментлар юқори даражада танланувчанлик қобилиятини намоён қилади. Ферментларни ўзига хослиги уч турга бўлинади: нисбий, мутлоқ, стереокимёвий.

Нисбий ўзига хослиги меъда-ичакда жойлашган протеолитик, липолитик, амилаolitik ферментлар намоён қилади. Айрим ферментлар ягона бир субстрат ёки ферментатив реакцияга таъсир кўрсата олади. Масалан, уреаза фақат мочевинани парчаланиш реакциясини катализлайди, ариназа эса фақат арининнинг ва х.к.

Айрим ферментлар субстратнинг стереокимёвий конфигурациясига ҳам сезгирлик кўрсатади. Цис-шаклидаги субстратга таъсир кўрсатувчи фермент тран-шаклига таъсир кўрсата олмайди ва х.к.

Текширилувчи материал: сўлак

Реактивлар: крахмалнинг 1% ли эритмаси, сахарозанинг 1% ли эритмаси, ачитқи, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, сув ҳаммоми

Ишнинг бажарилиши

4 та пробирка олиб, 2 тасига 10 томчидан 1% ли крахмал, қолган 2 тасига 10 томчи 1% ли сахароза эритмаси қўшилади. 1 ва 3 пробиркаларга 5 марта суюлтирилган сўлақдан 5 томчидан, 2 ва 4 пробиркаларга 5 томчидан ачитқи ширасидан қуйиб, 38°C ли сув ҳаммомига 10 дақиқага қўйилади. Вақт ўтгандан сўнг биринчи иккита пробиркадаги аралашмага йод таъсир эттирилади. 3-4 пробиркалардаги суюқлик билан Троммер реакцияси ўтказилади. Рангли реакцияларнинг натижасига қараб ферментларнинг ўзига хослиги тўјрисида хулоса чиқарилади.

3-амалий иш. Фермент фаоллигига активатор ва ингибиторларнинг таъсири

Ферментларнинг фаоллигига реакция муҳотида иштирок этаётган бир қатор кимёвий моддалар ҳам таъсир кўрсатади. Реакция муҳотида баъзи бир ионларнинг иштирок этиши ферментатив реакция тезлигини орттиради. Бундай моддалар *активаторлар* деб аталади. Активаторлик вазифасини кўпинча Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} каби металл катионлари

бажарди. Ферментатив реакция фаоллигини псайтирувчи моддалар *ингибиторлар* дейилади. Ингибиторларга цианидлар, ојир металл тузлари мисол бўла олади.

Текширилувчи материал: сўлак амилазаси

Реактивлар: натрий хлориднинг 1% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси, крахмалнинг 1% ли эритмаси, калий йодда тайёрланган йоднинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, штатив, сув җаммоми

Ишнинг бажарилиши:

1. Пробиркаларнинг биринчисига 10 т омчи дистилланган сув, иккинчисига 8 томчи сув ва 2 томчи натрий хлориднинг 1% ли эритмаси, учинчисига 8 томчи сув ва 2 томчи мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси солинади.

Хар қайси пробиркага суюлтирилган (1:10) сўлак амилазасидан 20 томчи ва крахмалнинг 1% ли эритмасидан 5 томчи солиб аралаштирилади ва 5 дақиқа хона хароратида қолдирилади.

2. 1 мл сув солинган учта пробирка тайёрланади. Пробиркадаги сув йод эритмаси билан бўялади. Шу пробиркаларга юқоридаги тажриба пробиркаларидаги суюқликдан 2-3 томчи солиб, крахмалнинг амилаза таъсирида парчаланишидан ҳосил бўлган бўёқ кузатилади. Биринчи пробирка бинафша ёки қорамтир қизил ранга, иккинчи пробирка (натрий хлорид солинган) сариқ ранга ва учинчи пробирка (мис (II) сульфат солинган) эса кўк ранга бўялганлиги кузатилади. Амилаза учун активатор аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

4-амалий иш. Пепсиноген фаоллигининг ошишига активаторларнинг ва сусайишига ингибиторларнинг таъсири

Меъда шиллиқ қаватидаги безлардан фаол бўлмаган пепсиноген ажралади. Меъда ширасига ажралган фермент хлорид кислота таъсирида фаол ҳолатга ўтади, пепсиноген пепсинга айланади. Фаол бўлмаган ферментни фаол ҳолатга ўтганлигини фибриннинг эришидан билиш мумкин.

Текширилувчи материал: меъда шираси

Реактивлар: хлорид кислотанинг 2% ли эритмаси, натрий карбонатнинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, фибрин

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, пипеткалар, сув җаммоми

Ишнинг бажарилиши:

4 та пробирка тайёрланади. Унинг биринчисига 0,5 мл сув, иккинчисига 0,5 мл 2% ли хлорид кислота эритмаси, учинчисига 10% ли натрий гидроксид эритмаси, тўртинчисига эса натрий карбонатнинг 1% ли эритмаси солинади. Тўрттала пробиркага 1 мл дан меъда ширасидан қуйиб, суюқликлар аралаштирилади ва лакмус қўјози билан уларнинг муҳити аниқланади. Сўнг ҳар қайси пробиркага 1,0-1,5 см узунликдаги фибрин толасидан солиб, 20-30 дақиқа 37-40°C ли сув җаммомига ёки термостатга жойлаштирилади. Бир оздан сўнг ҳар қайси пробиркадаги фибриннинг эриш даражаси аниқланади.

Фибриннинг қандай муҳитда эриганлигини ва активатор номини белгилаб, тегишли хулоса чиқарилади.

50-амалий иш. Трипсин фаоллигини трасилол билан сусайтириш

Трасилол – трипсин, фибронолизин, химотрипсин каби бир қатор протеолитик ферментлар фаоллигини сусайтирувчи полипептид табиатга эга бўлган модда. Ушбу модда меъда ости беъи яллијланганда ва хужайралари нобуд бўлганда (панкеронекроз ва сурункали панкреатит касалликлари) уларни даволаш мақсадида қўлланилади. Меъда ости беъидан ажралган ферментлар фаол бўлмайди, улар ичак ширасига тушгандан сўнг фаол ҳолатга ўтади. Аммо касалликларда ушбу ферментлар фаол ҳолда ажралади ва меъда ости беъи тўқималарини парчалаши мумкин. Шу боис тўқималарни ўз-ўзини парчаланиши олдини олиш мақсадида трасилдолдан фойдаланилади.

Текширилувчи материал: 0,005 моль/л хлорид кислотада тайёрланган $5 \cdot 10^{-4}$ % ли трипсин эритмаси

Реактивлар: кодеиннинг 1% ли эритмаси, 0,1 моль/л фосфат буфер эритмаси, УКХСнинг 10% ли эритмаси, трасилолнинг 0,5 моль/л эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,5 моль/л эритмаси

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, воронкалар, термостат еки сув ҳаммоми, ФЭК, 0,5 см қалинликдаги кюветалар

Ишнинг бажарилиши:

1. Жадвалга мувофиқ 3 та пробиркада аралашма тайёрланади:

Пробиркалар	1	2	3
Кодеин эритмаси, мл	1,0	1,0	1,0
Фосфат буфери, мл	1,5	1,5	1,5
Трасилол эритмаси, мл	-	1,0	-
УХСК эритмаси, мл	3,0	-	3,0
Трипсин эритмаси, мл	0,5	0,5	0,5

Тажриба пробиркаларидаги суюқлик яхшилаб аралаштирилади ва 37°C ли термостат ёки сув ҳаммомига 20 дақиқага жойлаштирилади. Сўнг биринчи ва учинчи пробиркаларга 3 мл УХСК эритмасидан солинади ва аралаштирилади, 5-10 дақиқадан сўнг суюқликлар филтралнади.

2. Алоҳида 3 та пробиркага 5 мл натрий гидроксид эритмаси, 2,5 мл фильтрат ва 0,5 мл фенол реактиви солиб аралаштирилади. Кўк ранг ҳосил бўлади. Рангнинг оптик зичлиги 630-690 нм тўлқин узунлигидаги (қизил кур фильтри) ФЭКда аниқланади. Натижалар езилиб, тегишли хулосалар чиқарилади.

Ферментлар фаоллигини аниқлаш

Ферментлар барча аъзо, тўқима хужайраларида турлича миқдорда бўлади. Ферментларнинг миқдори шу аъзо хужайраларининг фаолиятига бојлиқ бўлади. Одатда қон таркибида хужайра ферментларининг миқдори жуда кам бўлади. Хужайрада содир бўлган ўзгаришлар оқибатида у ердаги ферментлар ташқарига – қонга чиқиши туфайли уларнинг миқдори ортади. Ёшон зардобдаги ферментлар миқдорининг фаоллиги ортишига қуйдагилар сабаб бўлиши мумкин. Хужайраларнинг кексалик туфайли емирилиши, хужайра мембраналарининг бузилиши, тўқима ва хужайраларнинг некрозга учраши, ферментлар синтезининг ортиши, ферментнинг каталитик фаоллиги ортиши ва бошқалар. Ёшон томиридаги ферментлар фаоллигининг сусайиши эса РЭС хужайралари томонидан ютишнинг

бузилиши, сийдик, аҳлат ва ўт орқали экскреция қилишнинг бузилиши ва фермент фаоллигининг камайишига олиб келиши мумкин.

Фермент миқдори ўлчаш тиббиётда амалий аҳамиятга эга. Улар мкмоль да ҳисобланади.

Эритма таркибидаги фермент миқдори 1 мл эритма учун бирлик ҳисобида ўлчанади (Е/мл). Кўпинча фермент фаоллиги 1 мг ёки кг оқсил ҳисобида белгиланади. Бу бирлик солиштирма фаоллик дейилади.

Турли ферментларнинг каталитик фаоллигини солиштиришда ферментнинг молекуляр фаоллиги ўлчанади.

Е/мкмоль ферментнинг 1 мкмоль бирлигига тўғри келади. Бунинг учун ушбу ферментнинг молекуляр оғирлиги ва эримтадаги миқдори маълум бўлиши ва у соф ҳолда ажратилган бўлиши керак.

1-лаборатория иши. Сўлак амилазаси фаоллигини аниқлаш

Сўлак ва меъда остибеси шираси таркибидаги α -амилаза крахмални декстрингача ва мальтозагача парчаланиш реакциясини катализлайди.

Тил ости, қулоқ олди ва сўлак безининг турли касалликларида (яллиланиш, ўсма ва бошқаларда) сўлак амилазаси фаоллигини аниқлаш катта аҳамиятга эга.

Амилазанинг фаоллиги 1 мл сўлак таъсирида 30 дақиқа ичида 37°C да 1% ли крахмалнинг 1 мл и парчаланиши билан ўлчанади.

Текширилувчи материал: сўлак амилазаси

Реактивлар: крахмалнинг 1% ли эритмаси, калий йодда тайёрланган йоднинг 1% ли эритмаси

Керакпи анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, сув ھаммоми ёки термостат

Ишнинг бажарилиши:

10 та пробиркага тартиб билан 1 мл дан дистилланган сув солинади. Биринчи пробиркага 1:10 суюлтирилган сўлақдан 1 мл солиб аралаштирилади. Унинг 1 мл ини иккинчисига ва ундан учинчисига ва шу тарзда давом эттирилиб аралаштирилади. Охириги пробиркадаги 1 мл сўлак аралашмаси олиб ташланади. Натижада пробиркаларда сўлакнинг турли даражада суюлтирилган эритмаси тайёрланди.

Пробиркалар	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Амилзанинг суюлтириш даражаси	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1250	1:2560	1:5120	ва х.к.

Барча пробиркаларга 2 мл 1% ли крахмал эритмасидан солиб аралаштирилади ва 38-40°Сли термостат ёки сув җаммомига 30 дақиқага жойлаштирилади. Вақт ўтгач, пробиркалардаги аралашма совитилади ва уларнинг устига 1-2 томчидан йод эритмаси томизиб аралаштирилади. Эритмалар турли рангга бўялади. Кўк ранг крахмал парчаланганлигини, сариқ ранг эса крахмалнинг мальтозага парчаланганлигини кўрсатади. Амилаза фаоллигини аниқлаш учун крахмалнинг тўлиқ парчаланган сариқ рангли эритмасининг суюлтириш даражаси топилади.

Масалан, сариқ ранг 5-пробиркада кузатилган бўлса, унинг суюлтириш даражаси 1:320 га тенг. Амилзанинг шу суюлтирилган даражаси 30 дақиқада 1 мл крахмалнинг парчаланishi тезлигини топиш учун қуйидаги ҳисоблаш усулидан фойдаланилади:

$$1:320 - 2 \text{ мл}$$

$$1 - x, x = 2 \text{ мл} \cdot 1/1:320 = 640 \text{ мл}$$

Демак, 1 мл суюлтирилган амилаза 30 дақиқада 640 мл 1% ли крахмал эритмасини парчалайди. Амилаза фаоллигини халқаро бирликка ўтказиш учун:

$$100 \text{ мл} - 1$$

$$640 \text{ мл} - x, x = 640/100 = 6,4 \text{ г} \times 1000 = 6400 \text{ мл}$$

Сојлом одамларда сўлак амилазасининг фаоллиги 12-32 мг/сек ёки 12-32 сек/л.

Суюлтирилган амилаза даражасининг ҳисобланиши дафтарга езилиб, тегишли хулоса чиқарилади.

2-амалий иш. Тарвуз уруји мајзидаги уреаза ферментининг фаоллигини аниқлаш

Уреаза ферменти дуккакли ўсимликларда кенг тарқалган. Айниқса, улар соя, нўхат, канаваляда кўп миқдорда бўлади. У тарвуз урујларида ҳам кўп учрайди.

Уреаза ферменти мочевинани карбонат ангидрид ва аммиакга парчалайди.

Текширилувчи материал: тарвуз уруји

Реактивлар: мочевинанинг 1% ли эритмаси, фенолфталейн

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, термостат

Ишнинг бажарилиши:

Соя ёки тарвуз уруји маъжидан 5 г олиб, чинни ховончада ун ҳосил бўлгунча яхшилаб эзилади. Сўнгра 2 та пробирка олиб, ҳар бирига 1 г соя ёки тарвуз уруји унidan солинади. Биринчи пробиркага 1 мл сув, иккинчисига 1 мл мочевиначининг 1% ли эритмасидан қўйилади. Пробиркалар 40°C да 15 дақиқа давомида термостатга қўйилади. Кейин ҳар иккала пробиркага 1-2 томчидан фенолфталеин томизилади. Иккинчи пробиркадаги муҳит фермент таъсирида ҳосил бўлган аммиак ҳисобига ишқорий муҳит бўлиб, пушти ранга эга бўлади.

3-амалий машъулот. Тирозиназанинг фаоллигини аниқлаш

Тирозиназа (катехолксидаза) ферменти оксидланиш-қайтарилиш реакцияларини таҳлил қилувчи ферментларга мансуб бўлиб, ўсимликлар таркибида кенг тарқалган, кимевий таркиби жиҳатидан металлпротеид бўлиб, таркибида 0,2-0,25% мис бўлади. Бу фермент нисбий спецификликка эга.

Текширилувчи материал: картошка

Реактивлар: тирозиннинг 0,1%ли эритмаси, дистилланган сув

Керакли анжомлар: қиръич, шиша таёқча, дока, воронка, пипетка, сув ҳаммоми еки термостат

Ишнинг бажарилиши:

Картошка қиръич ёрдамида майдаланиб 2-3 қават дока орқали сиқиб шираси олинади. Иккита пробиркага 1 мл дан картошка шираси солинади. Биринчи пробиркага 2-3 томчи сув, иккинчиси пробиркага 2-3 томчи тирозиннинг 0,1% ли эритмаси яхшилаб аралаштирилиб, 60 дақиқа давомида 40°C термостатга қўйилади. Вақти-вақти билан 3-4 марта пробиркалар яхшилаб аралаштирилиб турилади. Вақт ўтач, тирозин қўшилган пробиркада қора ранг ҳосил бўлади. Бу ранг тирозиназа ферменти таъсирида тирозиндан ҳосил бўлган меланинга ҳосдир.

5-амалий иш. Цитохромоксидазанинг фаоллигини аниқлаш

Цитохромоксидаза барча ўсимлик ва ҳайвонларда кенг тарқалган бўлиб, кимёвий таркиби жиҳатидан гемин табиатли ферментлар гуруҳига киради. Цитохромлар, хусусан, цитохромоксидаза турли феноллар ва ароматик аминларни ҳаво кислороди ёрдамида оксидлаши мумкин.

α -нафтол билан N-диметил-п-фенилендиаминнинг ишқорий эритмаси (“НадиНе реактиви”), цитохром ва цитохромоксидаза ёрдамида ҳаво кислороди иштирокида оксидланиб, индофенол кўкини ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: мушак тўқимаси

Реактивлар: “НАДИ” реактиви, дистилланган сув

Керакли анжомлар: чинни ховонча, дока, фильтр қојози, пробиркалар, пипетка, сув җаммоми

Ишнинг бажарилиши

1. Цитохромоксидаза препаратани тайёрлаш.

Яхшилаб майдаланган 300 мг янги мушак тўқимасини чинни җавончага солинади, унинг устига 6 мл дистилланган сув қуйиб, қайтарувчи моддалар ва сувда эрувчи майдаланган тўқимани дока еки фильтр қојози ёрдамида филтрлаб, яна 2 марта экстракция қилинади, бунда таркибида цитохромлар ва цитохромоксидаза бор деярли рангсиз бўтқа қолади, бу қолдиқдан цитохромоксидаза препарати сифатида фойдаланилади.

2. Цитохромоксидазанинг цитохромлар ва ҳаво кислороди иштирокида “НАДИ” реактивини оксидлаш.

Олинган цитохромоксидаза препаратининг бир қисмини фильтр қојозга қуйиб, 1-2 томчи “НАДИ” реактиви томиизалди, 3-5 дақиқадан сўнг кўк ёки яшил ранг пайдо бўлади. Препаратнинг бир қисми пробиркага солинади ва қайнаб турган сув җаммомида 5 дақиқа давомида қиздириб, совитилгач, яна фильтр қојозга қўйилади ва юқоридаги реакция такрорланади. Фермент фаоллиги йўқолганлиги учун кўк ранг ҳосил бўлмайди.

