

Ўзбекистон Республикаси Соғлиқни сақлаш вазирлиги

Тошкент Фармацевтика институти

Кўлёзма ҳуқуқида

Якубова Хуршида Бахтиёровна

**МАХАЛЛИЙ ПАПАИН АСОСИДА ЯРАТИЛГАН ДОРИ  
ШАКЛИНИНГ НАЗОРАТИ ВА СТАНДАРТЛАШ**

Ихтисослик: 5A720503 Фармацевтик таҳлил ва фармакогнозия  
мутахассислиги

Магистрлик даражасини олиш учун

**ДИССЕРТАЦИЯ**

Илмий раҳбар: ф.ф.д., проф. И.К. Азизов

Оппонент: ф.ф.д., проф. Ф.Ф. Ўрмонова

ТОШКЕНТ-2008

“ТАСДИКЛАЙМАН”

Кафедра муdiri

“ 1 ” июл 2008 й

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ  
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАР

Тошкент Фармацевтика институти ректорининг 2008 й “ 28 ” июл

№ Сон буйруғи билан тасдиқланган

Фармацевтик илми кафедраси буйича

Махаллий нахшан асосига

магистрлик диссертациясининг номи

Эратиман дора шаклини назорат  
ва стандартлаш мавзудаги магистрлик диссертацияси

Илмий рахбар Ф.Ф.Ф. проф. Ч.К. Якубов

бошчилигида

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

Ч.Б. Якубова

томонидан

(тингловчининг исми-фамилияси)

туғалланган ҳолда 2008 й “ 3 ” июл да фармацевтик

илми

кафедрасига дастлабки химоя учун тақдим этилади.

Тадқиқот ишида дунёнинг илмий турмушларида

фойдаланилади

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

Ишда Махаллий нахшанни бошлов материал

ларига шимобилизациялаш ва уларни  
стандартлашнинг берилиши кўзда тутилади

Ишда куйидаги масалалар баён этилади:

1-боб Далава ўсимлигини тарқатиши,

(номи)

ушунинг қалқ таъбадига ва замонавий тиб. илм.

2-боб Далава фермент сарфоти шимобилизациялаш

(номи)

ган бошлов материалларни стандартлаш

3-боб Шимобилизациялаш бошлов материалларини

(номи)

токсикология, микробиология таърифи

ва фармакологик таърифини ўрганиш.

(сана, ой, йил)

Илмий рахбар Ф.Ф.Ф. проф. Ч.К. Якубов

(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 2008 й “ 15 ” феврал да топширикни қабул қилди.

**Мундарижа:**

<b>Кириш</b> -----	4
<b>I. Адабиётлар шарҳи</b>	
1.1. Папайа ўсимлиги ва унинг тарқалиши-----	8
1.2. Папайа ўсимлигининг халқ табобатида қўлланилиши-----	14
1.3. Папайа ўсимлигидан олинган дори воситаларининг замонавий тиббиётда қўлланилиши-----	17
1.4. Иммунизацияланган ферментлар ва уларнинг тиббиётда қўлланилиши-----	22
<b>II. Амалий қисм.</b>	
2.1. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материали таркибидаги папаинни стандартлаш	
2.1.1. Папаин субстанцияси чинлигини аниқлаш-----	29
2.1.2. Папаин субстанциясининг аминокислоталар таркибини ўрганиш-----	32
2.2. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материалини тайёрлаш технологияси-----	34
2.3. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материалини стандартлаш:	
2.3.1. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материалини физикавий ва кимёвий хоссаларини ўрганиш-----	43
2.3.2. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материалини протеолитик фаоллигини ўрганиш-----	46
3. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материалини токсиклигини ўрганиш-----	51
4. Папаин ферменти сақловчи иммунизацияланган боғлов материали микробиологик тозаллигини ўрганиш-----	56

5. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган  
боғлов материални фармакологик фаоллигини ўрганиш.

Папаиннинг янги дори шаклини ярага қарши таъсирини ўрганиш-----61

III. Умумий хулосалар-----63

Адабиётлар рўйхати-----65

## Кириш.

**Тадқиқот мавзусининг долзарблиги.** Папая ёки ковун дарахти- *Carica papaya L.* Caricaceae-ковундошлар оиласига киради. Папая усимлигини ковун дарахти деб юритилишига сабаб, мевасининг шакли крвунга ухшаганлигидандир. Папая куп йиллик пальмасимон куринишдаги тропик ўсимлик булиб, буйи 7-8 метргача боради. Пояси битта, шохланмаган яшил утсимон ўсимлик. Поя юкорисида чиройли панжасимон киркилган, куп сонли катта баргли ўсимлик.

Мевалари тузилиши буйича ковунни эслатади. Меванинг териси калин булиб, ширали, сувли, сарик-заргалдок рангли ва ичида купгина яшил-кора уруглар саклайди. Энг катта мевалари уртача катталиқдаги ковун меасича келади. Битта ўсимлик йил давомида 40 тагача мева бериб, мевалар 400 граммдан бир неча килограммгача боради. Пишган мевалар таркибида 8-12% шакар, куп миқдорда витамин А, В1, В2, С, Д ва бошка керакли моддаларни саклайди.

Ковун дарахтининг ватани Марказий Америка булиб. у ердан купчилик тропик ва субтропик минтакаларга таркалган. Ковун дарахти яхши усиши ва мева бериши учун туртта шароит зарур: сув билан яхши таъминланиши, иссиқлик, совук булмаслиги ва юмшок шамол. Ўсимлик тез таркапади. 1-1.5 йилда мева беради. Йилнинг исталган вақтида битта ўсимликда бутонлар. тугилган мева, яшил ва пишган меваларни учратиш мумкин. Папаянинг мевасида, баргида ва поясида латекс деб номланадиган сутсимон шира тупланади.

Ковун дарахтининг мевалари ейилади. Шунинг учун хам бу ўсимлик барча тропик мамлакатларда, асосан Миср, Африка, Сингапур, Гавайа оролларида мевали дарахт сифатида ўстирилади. Уруглари хуштаъмлиги учун овкат тайёрлашда ишлатилади.

Кейинчалик бу ўсимликни Шимолий ва Жанубий минтакаларда иссиқхоналарда маданийлаштира бошлашган. 1971 йилдан

Закавказьеда махсус плантацияларда устира бошладилар. 1990 йилдан бери эса бизнинг Ўзбекистон шароитида ҳам бу дарахтни ўстириб-қўпайтириш мақсадларида иссиқхоналар барпо этилди.

Тиббиётда ковун дарахти ширасидан олинган папаин ишлатилади. Маълумки турли иклимли худудларда устирилган ковун дарахти ширасидан олинган папаиннинг протеолитик<sup>1</sup> фаоллиги турлича булади. Бу фермент ўсимликнинг илдизидан ташқари ҳдмма қисмида учрайди. Одатда папаин олиш учун манба сифатида максимал катталиққа эришган ковун дарахтининг яшил мевасидан фойдаланилади. Бу меваларнинг пусти остида қуп сонли сутли томирчаларда шира-латекс тупланади.

Тиббиёт амалиётида турли биологик фаол моддалар билан бир қаторда ферментлар ҳам тиббиётнинг барча тармоқларида даволовчи сифатида кенг миқёсда қўлланилиб келмоқда. Айниқса, ўсимликлардан олинган биологик фаол моддалар асосида дори воситаларини яратилиши бўйича жаҳоннинг етакчи фирмалари томонидан катта ишлар олиб борилмоқда.

Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда Ўзбекистон шароитида ўстирилаётган ўсимлик хом-ашёсидан ажратиб олинган папаин асосида янги дори воситаларини яратиш бўйича олиб борилаётган изланишлар долзарб ҳисобланади.

**Диссертациянинг мақсад ва вазифалари.** Тиббиёт амалиётида турли биологик фаол моддалар билан бир қаторда ўсимликлардан ажратиб олинган ферментлар ҳам даволовчи восита сифатида кенг қўлланилилади. Шундай ферментлардан бири папаин бўлиб, ундан тиббиётда қуйган жароҳатларни даволашда фойдаланилади. Папаин некрозга учраган тўқималарни сўрилиб кетишига, бириктирувчи тўқимали пайлардаги чандиқларни сўрилиб кетишига самарали таъсир этади. Папаин қуйишдан кейинги нам некрозда терини устки қисмини

некротик массадан тозалаш ва янгитдан тери қопламаси ҳосил бўлиш жараёнини тезлаштиради.

Ҳозирги вақтда иммобилизацияланган ферментлар олиш бўйича кўплаб тадқиқотлар олиб борилмоқда. Ферментларни иммобилизациялаш орқали уларнинг физиологик фаоллигини сақлаб қолган ҳолда, уларнинг таъсир вақтини узайтиришга, яъни пролонгациялаштиришга эришиш мумкин. Бундай мақсадларда табиий полимерлардан, жумладан, целлюлоза ва унинг хосилалари фойдаланиш муҳим аҳамиятга эга. Чунки, целлюлоза ва унинг хосилаларининг молекулалари таркибида реакцинофаол функционал гуруҳлар тутиш билан бирга физиологик индеферент ва организм учун зарарсиздир. Шу боис ҳам улардан парфюмерияда, озиқ-овқат ва фармацевтика саноатларида кенг фойдаланилади. Шунингдек кўплаб тадқиқотларда целлюлоза ва унинг хосилаларидан турли физиологик фаол моддаларни пролонгациялаш мақсадида фойдаланилган.

Маҳаллий хом-ашёлар асосида папаиннинг иммобилизацияланган боғлов материалларини яратиш ва уни тиббиёт амалиётида қўллаш учун стандартлаш бўйича илмий изланишларни олиб бориш долзарб ҳисобланади. Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда папаин асосида иммобилизацияланган боғлов материалларини яратиш ва уларни стандартлаш бўйича илмий изланишларни олиб боришни мақсад қилиб олдик.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий аҳамияти.** Папаин ферменти асосида иммобилизацияланган боғлов материали олиш учун иммобилизацияловчи восита сифатида стерилланган марли ва вискоза асосида олинган целлофандан (макромолекула) фойдаланилди.

Стерилланган марля, целлофан таркибига реакцинофаол функционал гуруҳлар киритишда перйодат оксидланиш реакциясидан фойдаланилди. Ҳосил қилинаётган алдегид гуруҳларнинг миқдорини

бошқариш учун реакция турли шароитларда олиб борилди ва маҳсулотга реакция давомийлиги, оксидловчи концентрацияси, муҳит рН и каби омилларнинг таъсири ўрганилди.

Боғловчи материалларнинг оксидланишига оксидловчи концентрациясининг таъсири ва активланган боғловчи материалларга папаин ферментини кимёвий боғ орқали бириктириш бўйича тадқиқотлар олиб борилди.

Иммобилизацияланган боғловчи материал таркибидаги папаин миқдори ва унинг протеолитик фаоллиги Ансон методи бўйича аниқланди.

Фаоллашган боғловчи материалларга ферментни иммобилизациялашнинг қулай шароитини танлаш мақсадида реакция турли шароитларда олиб борилди ва маҳсулотга реакция давомийлиги, муҳит рН и ва реагентлар нисбатининг таъсири ўрганилди.

## Биринчи боб. Адабиётлар шарҳи.

### 1.1. Папайа ўсимлиги ва унинг тарқалиши.

Папайа ёки қовун дарахти – *Carica papaya L.* Caricaceae-қовундошлар оиласига киради. Папайа ўсимлигини қовун дарахти деб юритилишига сабаб, мевасининг шакли қовунга ўхшаганлигидандир. Папайа кўп йиллик пальмасимон кўринишдаги тропик ўсимлик бўлиб, бўйи 7 – 8 метргача боради. Пояси битта, шохланмаган яшил ўтсимон ўсимлик. Поя юқорисида чиройли панжасимон қирқилган, кўп сонли катта барглари бор. Барг бандлари узун [3,4,32,33,59].

Папайа икки уйли ўсимлик. Гуллари оқ, кўримсиз, эркаклик гуллари шингил бўлиб жойлашган. Оналик гуллари кичик соябонга тўпланган бўлиб, гул банди жуда ҳам қисқа. Оналик гуллари чанглангандан сўнг мева ҳосил бўлади. Мевалари тузилиши бўйича қовунни эслатади. Меванинг териси қалин бўлиб, ширали, сувли, сариқ – зарғалдоқ рангли ва ичида кўпгина яшил – қора уруғлар сақлайди. Энг катта мевалари ўртача катталиқдаги қовун мевасича келади. Битта ўсимлик йил давомида 40 тагача мева бериб, мевалар 400 граммдан бир неча килограммгача боради. Пишган мевалар таркибида 8 – 12% шакар, кўп миқдорда витамин А, В1, В2, С, Д ва бошқа керакли моддаларни сақлайди [3,12,32,71,73].

Қовун дарахтининг ватани Марказий Америка бўлиб. у ердан кўпчилик тропик ва субтропик минтақаларга тарқалган. Қовун дарахти яхши ўсиши ва мева бериши учун тўртта шароит зарур: сув билан яхши таъминланиши, иссиқлик, совуқ бўлмаслиги ва юмшоқ шамол. Ўсимлик тез тарқалади. 1 – 1,5 йилда мева беради. Йилнинг исталган вақтида битта ўсимликда бутонлар, тугилган мева, яшил ва пишган меваларни учратиш мумкин. Папайанинг мевасида, баргида ва поясида латекс деб номланадиган сутсимон шира тўпланади [3,4,32,34].



Қовун дарахтининг мевалари ейилади. Шунинг учун ҳам бу ўсимлик барча тропик мамлакатларда, асосан Миср, Африка, Сингапур, Гавайа оролларида мевали дарахт сифатида ўстирилади. Уруғлари хуштаъмлиги учун овқат тайёрлашда ишлатилади [3,70,72].

Кейинчалик бу ўсимликни Шимолий ва Жанубий минтақаларда иссиқхоналарда маданийлаштира бошлашган. 1971 йилдан Закавказьеда махсус плантацияларда ўстира бошладилар. 1990 йилдан бери эса бизнинг Ўзбекистон шароитида ҳам бу дарахтни ўстириб-кўпайтириш мақсадларида иссиқхоналар барпо этилди [2,28,40,42].

Тиббиётда қовун дарахти ширасидан олинган папаин ишлатилади. Маълумки турли иқлимли худудларда ўстирилган қовун дарахти ширасидан олинган папаиннинг протеолитик фаоллиги турлича бўлади. Бу фермент ўсимликнинг илдизидан ташқари ҳамма қисмида учрайди. Одатда папаин олиш учун манба сифатида максимал катталиққа эришган қовун дарахтининг яшил мевасидан фойдаланилади. Бу меваларнинг пўсти остида кўп сонли сутли томирчаларда шира-латекс тўпланади. Уни ажратиб олиш учун меваларда унчалик чуқур бўлмаган кесимлар тилиб кўйилади. Бунда кесимлардан ташқарига меванинг устки қисмига сутли шира ажралиб чиқади. Латекс таркибида протеолитик ферментлар папаин, химопапаин А ва В, пептидаза А ва В, протеиназа, лизоцим сақлайди. Бу ферментлар ҳавода тез коагуляцияга учрайди. Папаинни қуритиш давомида ферментатив фаоллигини сақлаб қолиш учун қуйидагиларга амал қилиш керак: латекс ҳароратга жуда сезгир бўлиб, папаинни SH занжиридаги оксидланиш жараёнини қуритиш вақтида қайтарувчилар билан турғунлаштириш мумкин. Папаин оқсилга ўхшагани учун унинг ферментатив фаоллиги металл ионлари ёрдамида ингибирланади. Демак, латексни совуқ идишга йиғиш ва паст ҳароратда вакуум остида антиоксидантлар қўшиб қуритиш керак. Папайа латекси вакуум остида қуритиш вақтида очиқ ҳавога қараганда



ҳароратга чидамли бўлади. Максимал  $55^{\circ}$  С ҳароратгача қуритиш протеолитик фермент фаоллиги сақланишини таъминлайди [3,17,30,68].

Кристаллик папаин ажратиб олингандан сўнг, активаторлар қўшилмаганда жуда паст ферментатив фаолликни намоён қилади. Папаиннинг активаторлари ролида қайтарувчи хоссасини намоён қилувчи ҳар хил моддалар – цистеин, глутатион, тиогликол кислота, натрий тиосульфат, натрий борогидрид ва бошқа баъзи бирикмалар бўлиши мумкин. Агар папаиннинг фаоллиги қайтарувчилар ёрдамида ошиб борса, оксидловчилар билан қайта ишлаш ферментнинг инактивациясини чақиради [30,61,68].

Олдинлари мевани йиғиб олгач, аниқ ҳароратда қуритиб, майдалаб порошок кўринишида сотувга «папаин» номи билан чиқарилган. Битта дарахтдан бир йилда 100 грамм атрофида папаин субстанцияси олинади.

Олдинлари тозаланмаган ёки баъзан тозаланган папаин кўп сонли текширишлар объекти бўлиб ҳисобланган. Кейинчалик эса қовун дарахти латекси бир неча протеолитик фермент сақлаши аниқланган бўлиб, ундан иккита фермент кристаллик кўринишда олинган. Биринчи марта папайадан Болз ва бошқалар томонидан 1937 йилда кристалланган папаин ва Янсон ва Болз томонидан 1941 йилда кристалланган химопапаин ажратиб олинди [3,16,30,68].

Кейинчалик папайа латекси таркибида смола, ёғ кислоталар, сувда эрувчан оқсиллар, глобин, албумин, пептон, пектин ва ўсимликда учрайдиган 4 хил фермент: папаин, химопапаин, лизоцим ва протеиназа X сақлаши аниқланди. Қовун дарахти меваси латексидан олинган лекозим, лепокаин, карпаиназа, кукумазим деб номланувчи дори препаратлари барча тўртта протеиназаларни ўзида сақлайди. Ушбу протеолитик ферментлар сульфгидрил протеиназалар кўринишида бўлиб, субстратларини ўзига хослиги билан бир-биридан озгина фарқ қилади [3,8,16,29,30,35].



## 1.2. Папайа ўсимлигини халқ табобатида қўлланилиши.

Қовун дарахти қадимдан ўстирилган бўлиб, Майя ва Ацтекаларда дарахт кенг маданийлаштирилган. Қадимдан папайа Африка ва Осиё халқ табобатида шифобахш восита бўлиб ҳисобланган. Папайа мевалари инсон организмга яхши таъсир кўрсатиб ошқозон – ичак тракти функциясини яхшилайти, бирор касаллик ўтказилганда ва организмдан жуда қувват кетганда тезлик билан қувватни тиклашга ёрдам беради. Асосан уни ёши ўтган кишиларга беришни маслаҳат беришади. Бразилияда папайа баргларида тайёрланган чойни меъда касалликларига ва гипотензив восита сифатида ишлатишган.

Тропик минтақаларда яшовчи халқ папайани сутсимон ширасини экзема, яра, сўгал, қадоқ ва сепкилларни даволашда шунингдек, ичакдаги гижжаларни сурадиган восита сифатида қўллашган. Ямайкада папайани пишмаган мевалари теридаги хроник жароҳатларни маҳаллий даволашда, Африкада эса куйган ерларни даволашда қўллашган. Ғарбий Африкада (Сенегал) папайани латексидан микробга қарши восита сифатида фойдаланишган. Амазонка ҳавзаларидаги хиндулар папайани пишмаган меваларини майдалаб, 2 – 6 та аспирин таблеткаси билан биргаликда тахминан 2 кун давомида бошланадиган абортни чақиритишга қўллашади [38,70,72].

Ҳиндистонда папайа баргларига опий ва ош тузи қўшиб дракункелез – паразит касаллигини маҳаллий даволаш учун суртма тайёрлашади. *Dracunculus meinensis* (Гвинея қурти, медин қурти) инсонларни зарарловчи, паразит касалликларни чақирувчи тўқима паразитидир. Паразит гижжалар инсон териси ва тери ости клечаткасининг ичигача киради. Бу суртмани 3 кун давомида қўллаш касаллик белгиларини пасайтиради ва тўқимадан гижжаларни ажралиб чиқишини яхшилайти. Тринидадда халқ табобатида папайа уруғини

кучукдан инсонларга ўтадиган гижжаларга қарши даволашда фойдаланилган [21,39,46,72].

Таркибида фермент сақловчи ўсимликларни қўллаган ҳолда жароҳатни даволаш узоқ ўтмишга бориб тақалади. Жарроҳлик йўли билан даволаш Тиббиётнинг асосий йўналиши бўлиб, унда энг аввало ферментлардан фойдаланилган. Инсониятнинг ривожланиш давриданок йирингли жароҳат, абсцесс ва бошқа юмшоқ тўқималардаги септик касалликларни даволашда папайа мевасининг юмшоқ қисмини жароҳат юзасига қўйишган. Бу ўсимлик таркибида катта миқдорда фермент сақлаб, жароҳатдаги йирингни тезда тозалаш ва жароҳатни битказиш қобилиятига эга.

Африкаликлар папайа барглари дамламаси ёрдамида бери – бери иситмасини даволашган, шунингдек уни гижжаларга қарши восита сифатида ишлатишган. Махаллий халқ гўштни юмшоқ ва майин бўлиши учун папайа баргларини қўшиб қайнатишган.

Папаин вино тайёрлаш ва пиво қайнатишда қўлланилади. Оз миқдорда папаин эритмасини пиво ва бошқа ичимликларга қўшиш тезлик билан уларни яроқлилик муддатини яхшилади. У оқсил моддаларни эритиб, ичимликларни хираланиши ва бузилишини олдини олади.

Папаин қадимдан овқат хазм қилиниши бузилишида жуда яхши дори воситаси сифатида маълум бўлиб, 100 йиллардан ҳам олдин папаин қимматбаҳо модда сифатида Британия фармакопеяси ва бошқа давлатлар фармакопеясига киритилган асосий манбалардан бири бўлиб ҳисобланади [3,66,71,72].



### 1.3. Папайа ўсимлигидан олинган дори воситаларининг замонавий тиббиётда қўлланилиши

Тиббиёт амалиётида турли биологик фаол моддалар билан бир қаторда ферментлар ҳам тиббиётнинг барча тармоқларида даволовчи сифатида кенг миқёсда қўлланилиб келмоқда. Ҳайвонлардан олинган протеолитик фермент препаратлар – трипсин, хемотрипсин терапевтик мақсадда ишлатиш учун олинади. Ҳозирда бутун жаҳон ортопедия, травматология, нейрохирургия, офтальмология ва тиббиётнинг бошқа соҳаларида қовун дарахтининг протеолитик ферментлари кенг миқёсда ишлатила бошлади. Бу эса қовун дарахтига бўлган қизиқишни уйғотди.

Маълумки, папаин Швейцариянинг «Флука» фирмаси, Германиянинг «Мерк» фирмаси, Югославиянинг «ЛЕК» фирмаларида лекопаин ёки лекозим ишлаб чиқарилади. Папаиндан АҚШ, Буюк Британия, Канада, Япония, Югославия, Австралия, Швеция, Белгия ва бошқа мамлакатларда фойдаланилади [25,28,49].

Қовун дарахтидан олинadиган ферментларнинг асосий хоссалари тўғрисида айтиб ўтадиган бўлсак, у протеолитик, яллиғланишга қарши, антикоагуляцион (қон ивишини секинлаштиручи), оғриқ қолдирувчи, гемолитик таъсирларга эга. Папайадан олинadиган протеолитик ферментлар мустақил равишда (Papase, Warner – Cilcott), шунингдек комбинацион ҳолатларда (Baculin, Anre – grand, Bilate, Central, Calsarbain, Sutliss and case: Dignezym, Birgin – Arden) турли патологик – вагинал инфекцияларда, ошқозон – ичак ва бошқа касалликларда кенг қўлланилади [24,25,28,41,47].

Маълумотларга кўра, папаин ферменти ҳайвон ва бактериал ферментлардан кўра оқсилни кўпроқ парчалайди ва уни овқат ҳазм қилиш фаолиятида ёрдамчи модда сифатида ишлатиш тавсия этилади.

Папаин ўлик тўқималарни эритади ва яраларни даволашда катта роль ўйнайди, тирик тўқимани ўсишини тезлаштиради. Бундан ташқари, папаин кислотали, нейтрал ва ишқорий эритмаларда ҳам таъсир қила олади, ивиган ва қуйилган оқсилларни ҳам эритади [3,25].

Тиббиётда кўз касалликларини (офтальмология) даволаш соҳасида папаин ферментини сақлаган дори препаратларидан кенг миқёсда фойдаланилади. Масалан:

- а) яллиғланиш билан кечадиган касалликларда;
- б) некрозга учраган тўқималарни сўрилишида, бунда ферментнинг ўлик тўқималарини эритиш хоссасини инобатга олиш лозим;
- в) керотид (кўз мугуз пардасининг яллиғланиши) натижасида пайдо бўлган чандиқларни сўрилиб кетишида, бунда унинг тирик тўқималар ўсишини тезлаштирувчи таъсирини ҳисобга олиш даркор;
- г) кўз мугуз пардасининг хиралашиши билан кечадиган мугуз парда яраларининг сўрилиб кетиши ҳам шу ферментга боғлиқ;
- д) кўз рангдор пардасининг қаттиқлигини юмшатишда;
- е) кўз ёши йўллариининг беркилишида, кўз шишасимон танасини хиралашишида, шишасимон модда ва кўзнинг олд камерасига қон қуйилганда шу ферментдан фойдаланилади [26,49,50,51,52].

Табиий папаиннинг қўллаш соҳасини кенгайтириш учун Грузия ФА фармакокимё институтида папаиннинг инъекцион формаси – “Карипазим” ортопедик практика ва офтальмологияда ишлатиш учун ишлаб чиқилган.

Тиббиётнинг нейрохирургия амалиётида:

- а) умуртқа поғонасидаги чандиқларни сўрилиб кетишида фаол иштирок этади;
- б) умуртқа поғонасининг остеохондрозиди, умуртқалараро дисклардаги ўсимталарнинг баъзи шаклларида дископункционал энзимотерапия деб аталувчи хондролитик таъсирли энзим сифатида

отеохондрозни ферментли даволаш практикасида папаин муҳим ўрин тутди. Тажрибада исботланганки, папаин эритмасини қуёнлар венасига юборилганда, 3 – 4 кундан сўнг қулоқ тоғайларини юмшаб қолишига олиб келади. Бу ўзгаришлар тоғайнинг асосий моддасидан хондроитин сульфатни ювилиши билан бир вақтда мукополисахаридларни катта миқдорини қонга ажралиб чиқиши ва уларни сийдик билан чиқиб кетиши билан тушунтирилади. Уларда тоғайни даволаш тури ўтказилади;

в) умуртқалараро дисклардаги ўсимталардаги маълум бир шишларни эритади [1,6,7,9,10].

Папаиннинг тўқима оқсилли компонентларига танлаб таъсир кўрсатувчи таъсири уни остеохондрозда пульпоз ядрони эритиш учун қўллашга асос бўлиб хизмат қилади.

Исботланганки, папаин пульпоз ядросининг дегенерацияланган тоғайларини, фиброз халқанинг пластинкаларини танлаб эритади, бунда дегенерацияланган тоғайни эритиш учун керак бўладиган доза нормал пульпоз ядро учун кетадиган дозага қараганда 100 марта кам. Папаиннинг умуртқа каналида жойлашган бўғим, суяк, нерв – томир хосилаларига лизоцим таъсирини кўрсатмайдиган дозировкалари пульпоз ядрони қолдиқ бўлиб тўпланган ноколлаген оқсиллардан тозалайди ва бир вақтнинг ўзида бу тўқималардан нисбатан паст молекулали компонентлар – хондроитин – сульфат ва бошқа протеин полисахарид комплексларни ҳосил қилиш билан оқсил боғламларини бузади [20,22,23].

Умуртқа поғонаси касалликларини хирургик даволашни битта тури хемонуклеозис дископункцион усул ҳисобланади. Умуртқа поғонаси остеохондрозда хемонуклеозисни маъноси умуртқалараро дискдаги зарарланган пульпоз ядросига танлаб таъсир кўрсатишдан иборатдир.

Бел остеохондрозда папаин билан дископункцион даволаш умуртқалараро дискдан бу касалликнинг ҳар хил клиник кўринишларида

ва патогенезида катта роль ўйновчи пульпоз ядрогаги ҳамма дегенератив – ўзгарган тўқималарни нохирургик йўл билан олиб ташлаш имконини яратади.

Папаинни суяк ўсиш зонасига таъсир этиши амалиётда кўрсатиб ўтилган. Препаратни маҳаллий қўллаганда ҳар хил дозировкаларда суякларни ўсишини эпифиодезгача секинлаштириши мумкин. Папаиннинг бу таъсирини скелетнинг алоҳида қисмларини ўсишини тўхтатиш ёки секинлаштириш учун қўллаш мумкин [3,20].

Неврология соҳасида:

- а) мия пардасидаги чандиқларни сўрилиб кетишида қўлланилади;
- б) оптохизмал лептоменингитни даволашда;
- в) елка курагининг периартрити, елка эпикондилити каби миодистрофик синдромларни даволашда кенг қўлланилади [15,18].

Тиббиётнинг қон касалликларини даволаш соҳаси ҳам бу ферментнинг ажойиб хоссаларидан кенг кўламда фойдаланади, яъни:

- а) унинг антикоагулянт таъсири туфайли қондаги ивиш жараёни фаоллиги йўқолган;
- б) тромбларни сўрилишида, яъни тромбларни лизисга учрашида протеолитик ферментларнинг таъсири кузатилган [4,21].

Хирургия амалиётида бириктирувчи тўқимали пайлардаги чандиқларни сўрилиб кетишида унинг таъсири юқори бўлади.

Тиббиётда папаиндан куйган касалларни даволашда яллиғланишга қарши, некрозга учраган тўқималарни сўрилиб кетишида, бириктирувчи тўқимали пайлардаги чандиқларни сўрилиб кетишида фойдаланиш мумкин. Папаинни куйишда қўллаш юқори самарали ҳисобланади. Папаин куйишдан кейинги нам некрозда терини устки қисмини некротик массадан тозалаш ва янгитдан тери қопламаси ҳосил бўлиш жараёнини тезлаштиради [36,37,62].

Грузия ФА фармакокимё институтида табиий папаиннинг «Карипазим» деб номланган тайёр дори шакли олишни стандартлаш усули, тозалаш ва ишлаб чиқариш технологияси ишлаб чиқилган. Препарат куйишга қарши восита сифатида клиник текширувлардан муваффақиятли ўтган. Табиий маҳсулотдан олинган папаиндан фойдаланиш папаиннинг қимматбаҳо энзимли препаратини четдан импорт қилиб олишни чегаралашга имкон беради [19,24,57].

Папаин ферменти фармакотерапевтик фаоллигини сальмонеллёз билан зарарланган каламушларни даволашда ижобий натижалар намоён бўлган [43,44,45,64,67].

Папаин косметологияда турли тери касалликларини даволашда ишлатилади. Папаин эритмаси қийин тузаладиган яра – чақалар инфекциялари, флегмона, гематома ва маститларни даволашда қўлланилади. Папаиннинг 0,5% новокаинли эритмаси операциядан кейинги чандиқларни сўрилиб кетишида жуда яхши восита ҳисобланади. Папаин яна сочи мустаҳкамлашда ва юз терисидаги сепкил ва сариқ доғларни кетказишда қўлланади.

Ўзбекистонда ўстирилган қовун дарахти асосида кремлар, шампунлар, лосьонлар ва бошқа косметик препаратлар ишлаб чиқарила бошланди [28,41,42,63].

Папаин ферменти халқ хўжалигида ҳам кенг қўламда ишлатилади. Масалан:

- а) пиво пиширишда ва вино тайёрлашда;
- б) гўшт маҳсулотларини қайта ишлашда;
- в) консерва саноатида;
- г) текстил саноатида матоларни қайта ишлашда;
- д) терини қайта ишлаш жараёни кабиларда ишлатилади.

Папаин ферментини қўллаган холда янги дори турини яратиш ҳозирги куннинг долзарб масалаларидан бири ҳисобланади [3,42].

## 1.4. Иммуобилизацияланган ферментлар ва уларнинг тиббиётда қўлланилиши

«Фермент» (лотинчада «fermentum» – ачиш, бижғиш) атамасини биринчи бўлиб голланд табиатшуноси Й. Ван – Гельмонт таклиф қилган, ушбу йўсинда номаълум агент спиртни бижғитиш қобилиятига эга эканлиги аниқланган. Ферментларни ўрганиш борасида Луи Пастер ўзини катта хиссасини қўшган бўлиб, у ачиш жараёнини кузатиш давомида ферментлар тирик ҳужайра компонентлари эканлигини аниқлади.

Ферментлар (энзимлар) – организм ҳаёти учун асосий зарур воситалар бўлиб, улар барча биологик жараёнларда қатнашади. Инсон организмда минглаб турли ферментлар доимо ишлаб туради. Фақатгина ферментлар ёрдами билан қариган ва ишдан чиққан ҳужайралар янгиланиши, озиқа моддалари энергия ва тикланиш маҳсулотларига айланиши, заҳарли моддалар зарарсизлантирилиши, организм касаллик чақирувчи микроорганизмлардан ҳимоя қилиниши мумкин. Инсон ҳаёти ва соғлигини сақлашда ферментлар керакли восита бўлиб ҳисобланади. Ферментлар балансини бузилиши натижасида турли касалликлар келиб чиқиши мумкин: оддий шамоллашдан тортиб онкологик касалликларгача [13,17,31,60].

Ферментларни иммуобилизациялаш, *immobilized enzymes* – ферментларни иммуобилизациялашнинг моҳияти – уларнинг фаол шаклларини эримайдиган асос гелъ ёки ярим ўтказувчан мембрана системасига боғлаб бириктиришдан иборат. Бундай усулда олинган ферментнинг таъсир муддати узайтирилган бўлади.

Ҳозирги вақтда мато асосга турли хил иммуобилизацияланган фермент препаратлари ва физиологик фаол моддалар асосида иммуобилизацияланган материаллар ишлаб чиқарилмоқда. Бундай

усулда олинган материалдан йирингли – некротик жароҳатларни турли этиологияларида, шунингдек косметологияда даволашда фойдаланилади. Полифермент препаратларига эътиборни ортиши уларни қулайлиги, ажратишнинг осонлиги, нисбатан қийматининг пастлиги билан тушунтирилади. Жароҳат юзасига бундай препаратларни (боғлов воситалари) қўллаганда иммобилизацияланган модда ва қон плазмаси оқсили ташувчиларини бир – бирига таъсирини эътиборга олиш керак [5,38,56,58].

Иммобилизацияланган ферментлар (лотинча *immobilis* – қўзғалмас, ҳаракатсиз), фермент препаратлар молекуласи матрица ёки ташувчилар (тўғрироғи полимерлар) билан боғланган бўлиб, бунда тўлиқ ёки қисман ўзаро каталитик хосса сақланади. Иммобилизацияланган ферментлар одатда сувда эримайди; ўзаро икки фазада субстрат молекулалари, каталитик реакция маҳсулотлари, ингибиторлар ва активаторлар алмашилиши мумкин. Ферментларни иммобилизациялашни бир нечта асосий усуллари мавжуд:

- 1) фермент ва матрица орасида ковалент боғ ҳосил қилиш йўли билан;
- 2) мономерларни полимеризациялаш, ферментлар қатнашишидан ҳосил бўлган матрицани полимер сеткага (одатда гелга) киргиштириш;
- 3) қарама-қарши зарядланган ферментлар гуруҳи ва матрицани электростатик боғлаш;
- 4) ҳосил бўлган матрицадаги мономерлар ва ферментларни сополимерлаш;
- 5) валент бўлмаган гидрофоб таъсирланиш натижасида боғланган фермент ва матрицани ўзаро таъсирланиши, водород боғ ва бошқалар ҳосил қилиш;
- 6) капсулалаш – фермент молекуласи яқинида ярим ўтказувчан капсула яратиш, масалан: ферментни липосомага киритиш;
- 7) фермент молекулаларини ўзаро қўшиб улаш.

Иммобилизацияни асосий ходисаси ферментатив реакцияни икки фазали системада ўтказадиган, қачонки фермент сувли фазада бўлиб, субстратлар ва реакция маҳсулотлари органик ва сувли фазада ўзаро тақсимланса, моддалар тақсимланиш коэффициентига боғлиқ холда фазалар ўртасида реакция мувозанати керакли тамонга силжишига имкон беради; фазаларни диспергирлаш уларнинг тақсимланиш юзасини кенгайтиради ва энг муҳими субстратни ферментга киришини яхшилайти. Иммобилизация усулларининг орасида энг кўп тарқалгани ферментни матрица билан ковалент боғлаш орқали олиш ва ферментни гелга киритиш ҳисобланади. Биринчи холатда одатда матрица сифатида целлюлоза, декстран гели (сефарозу, агарозу), кичик тешикли шиша ёки кремнезим, шунингдек синтетик полимерлардан фойдаланилади. Ковалент иммобилизациядаги матрица ферментни одатда аввал фаоллаштиради. Бунинг натижасида  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$  гуруҳлар билан ўзаро таъсирлашувчи бирикмалар билан реакцияга кириша олувчи фаол гуруҳларни ташийдиган бўлиб қолади. Иккинчи холатда гел ҳосил қилувчи полимер сифатида полиакриламиддан фойдаланилади. Амалиётда иммобилизация бир вақтнинг ўзида бир нечта усуллар билан тез – тез амалга оширилади. Ферментлар фиксациясида уларнинг молекулалари ва матрицалари орасида ўзаро ковалент боғланиш билан бирга одатда ноковалент ўзаро таъсирлашув ҳам вужудга келади. Бундай модификацияланган оқсил молекулалари электростатик зарядини ўзгартиради ва уларни ионалмашинув смолаларига мустаҳкам бирикишига етарлича имкон туғдиради. Зарядланган гуруҳларга эга паст молекулали моддалар ёки эрувчан полимерларни фермент молекуласига олдиндан кимёвий модификациялаш усули ҳам маълум. Иммобилизациянинг барча турларида матрица фермент билан ўзаро таъсирлашиб субстратнинг фаол марказга киришни қийинлаштирадиган бўшлиқ яратади ёки фаолсизлантиради. Ферментнинг ковалент

атрофида эритувчининг юққа аралашмайдиган қатлам (Нернест қатлами) мавжудлигига асосланган. Ушбу қатламнинг қалинлиги аралаштириш тезлигига боғлиқ. Шунинг учун колонкада иммобилланган ферментлар билан эритма токи тезлигининг ошиши ферментатив реакция тезлигини оширади. Ички диффузион барьер полимер матрица тўри ичида эркин диффузия субстратларининг чекланганлиги натижасида вужудга келади. Ферментларни иммобиллаш бир қатор афзалликларга эга. Буларга қуйидагилар киради: фермент препаратларининг юқори стабиллиги, уларни реакция муҳитидан йўқотиш ва такрорий қўллаш имкониятининг мавжудлиги, шунингдек фермент колонкаларида узлуксиз жараёни вужудга келтириш имкониятининг мавжудлиги. Иммобилланган ферментларнинг денатурацияловчи таъсирларга – қиздиришга, агрессив муҳитлар таъсирига, автолиз ва бошқаларга стабиллиги муҳим роль ўйнайди. Юқорида зикр этилган таъсирларга протеолитик ферментлар мойилдир. Иммобиллаш ушбу фермент молекулаларини бир – биридан ажратади ва бундай жараёни тўлиқ йўқотади. Шу орқали протеолитик фермент пепсинни унинг ўтмишдоши пепсиногендан ҳосил бўлиш механизмини ўрганиб чиқишга эришилди (бунда 42 та аминокислота қолдиғидан иборат пепсиногендан охириги пептид ажралиб чиқади). Ушбу реакция пепсиннинг ўзи орқали катализланиши кўрсатилган. Иммобилланган ферментлар L – аминокислоталар, ярим синтетик пенициллинлардан олинадиган 6 – аминопенициллин кислота ишлаб чиқаришда, преднизолон синтезида, лактоз танқислиги билан оғриган беморлар учун қўлланиладиган озиқ – овқат маҳсулотларидан лактозани ажратиб олишда, мочевина, глюкоза ва бошқа моддаларни экспресс аниқлаш учун фермент электродлар тайёрлашда, «сунъий буйрак» ва «сунъий жигар» аппаратлари яратиш учун, жароҳат ва куйган жойларнинг битиш жараёнида ҳосил бўлувчи эндотоксинларни йўқотишда баъзи бир

онкологик касалликларни даволаш учун қўлланилади. Имобилланган ферментлардан фойдаланиладиган иммунофермент таҳлил усуллари клиник ва лаборатория практикасида муҳим аҳамият касб этади [73,74].

Одатда Тиббиётда иммобилизацияни қўзғалувчи танадаги шикастланган қисмларини бартараф қилиш мақсадида тинчланишини таъминлаш учун қўллаш тушунилади. Иммобилизацияни кўп холларда синган суякларга қўллаш учун тавсия берилади. Иммобилизацияланган воситалар фақатгина синган жойларга қўлланибгина қолмай, балки иммобилизация алоҳида усул сифатида шикастланган қўзғалувчи қисмни тинчланишини таъминлашда қулай бўлиб, бўғим, нерв, суяк бутунлиги сақланган холда юмшоқ тўқималарни кенг шикастланганида, оёқ-қўлларни шамоллашида, оёқ ва қўлдаги йирик томирлар жароҳатланганида, шунингдек умумий куйишда қўлланилади.

Иммобилизация юмшоқ тўқималар ва ички аъзоларни қўшимча жароҳатланиш хавфини камайтирувчи усул.

Иммобилизация жароҳатлар ва очиқ синишларда бўладиган жароҳат инфекцияларини олдини олиш ва уларга қарши курашишда кучли таъсир кўрсатувчи усул. Иммобилизация йўли билан жароҳатларни тинчлантириш тўқималарни инфекция қўзғатувчиларга нисбатан қаршилигини кучайтиради. Шунингдек, иммобилизация жароҳат инфекцияларини олдини олувчи усул.

Шу мақсадда биз папаин асосида яратилган иммобилизацияланган боғлов материалларини яратишни олдимизга мақсад қилиб қўйдик. Папаин зарарланган жароҳат ва яраларни қийин битишида қўлланади. Тажрибаларда папаинни 0,2%ли эритмаси абсцесс, флегмона, чипқон, мастит, парапроктит, инъекция ва операциядан кейинги йиринглашларни даволашда ижобий натижа беради. Папаинни 0,01%ли цистеин, димексид ва фурациллин билан комбинацияси 2,5 марта фермент дозасини пасайтиради. Папаин жароҳатни некротик ерларини тозалашга

ёрдам беради, йирингли некротик босқичларда яллиғланиш жараёнини узайишини қисқартиради, яраларни тез битириб, терини ривожланишини яхшилайти, олдиндан пайдо бўлган коллоид яралар битишини таъминлайди. Асосан папаинни жароҳатланиш вақтида йиринглаш жараёни узайиб кетган холларда, йиринглаш хали суяк тўқимасигача етиб бормаган холларда қўллаш жуда фойдали. Папаинни антибиотиклар ва бир-бирига ўхшаган препаратлар билан биргаликда жарроҳликда қўллаш («Лекозим» препарати), ички металоостеосинтез ёки бўғимларни эндопротезлашда тарқалган чуқур йиринглашларни батамом тугатади. Жарроҳликда папаин асосида иммобилизацияланган боғлов материални тайёрлаш технологияси ишлаб чиқилган. Бундай боғлов материалларини қўллаш некротик масса ва йиринглашларни тез ўтиб кетишини яхшилайти ва инфилтрат ўлчамини тезда камайтиради. Жароҳат юзасига боғлов материални қўйиб бундай усулда даволашда кўп миқдордаги макрофаг ва фибробластлар ўраб олинади. Эътиборли тамони шундаки, иммобилизацияланган папаин қўлланганда жароҳатдаги оғриқ камайтирилади (иммобилизацияланмаган ферментни қўллаганда эса тез – тез оғриқ ва ачишиш кузатилади) [11,27,38,65].

№	Група	Қўллаш усули	Натижа
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5

## II боб. Амалий қисм.

### 2.1. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материали таркибидаги папаинни стандартлаш:

#### 2.1.1. Папаин субстанцияси чинлигини аниқлаш

Папаин субстанциясини чинлигини аниқлаш учун уни протеолитик фаоллигини аниқлашда Ансон усули ва папаин субстанциясининг молекуляр массасини аниқлаш усулларидадан фойдаланилди

Папаин субстанциясининг протеолитик фаоллигини Ансон усули бўйича аниқланган маълумотлар жадвалда келтирилган. Жадвалдан кўришиб турибдики, таҳлил этилган папаин субстанция намуналарининг протеолитик фаоллиги 80 ПЕ дан юқори.

#### 1 Жадвал

#### Папаин субстанцияси чинлигини протеолитик фаоллиги бўйича аниқлаш

Намуналар	Намуналар протеолитик фаоллиги	Таҳлилнинг метрологик кўрсаткичлари
Намуна-1	81,5 ПЕ	$\bar{X} = 81,5$
Намуна-2	82,0 ПЕ	$f = 4$
Намуна-3	81,2 ПЕ	$s^2 = 0,335$
Намуна-4	80,7 ПЕ	$s = \sqrt{0,335} = 0,58$
Намуна-5	82,1 ПЕ	$\Delta X = 1,6$
		$\Delta \bar{X} = 0,72$
		$\varepsilon = 1,97\%$
		$\bar{\varepsilon} = 0,89\%$

Маҳаллий папаинни идентификациялаш учун «Merck» фирмасининг папаин намунаси билан молекуляр массасини аниқлаш қиёсий ўрганилди. Молекуляр массасини аниқлаш полиакриламид гелида (ПААГ) электрофорез усулида олиб борилди. Бунда оқсил маркерлари сифатида қуйидаги молекуляр массали намуналар олинди – 25000 Д, 17800 Д ва 12500 Д.

Тажриба учун олинган папаинни аниқлаш учун қуйида унинг молекулярни массасини аниқлаб олдик. Бунинг учун полиакриламид гелда (ПААГ) додецилсулфат натрий (ДДС-Na) 75 ёки 10% ли гел иштирокида электрофорез ёрдамида аниқладик.

Геллар хаворанг кумасси (R-250) билан бўядик. Фойдаланилаётган намуналар 0,05 дан 0,1 мг/мл концентрацияларда тайёрланди. Гелга киритилган синовларнинг хажми – 10 мкл. Электрофорез 0,01 М Na-фосфат буферда pH-8,3 да, 0,1% ДДС-Na таркибли, 2% ли b-меркаптоэтанолда ва озгина миқдорда 0,05 н бромфенол кўк, 40% сахароза иштирокида олиб борилди. Маркер сифатида хар хил молекуляр массали оқсиллардан фойдаланилди. Электрофорез 17 МА ток кучида 4-4,5 соат давомида олиб борилди.

Папаинни молекуляр массасини аниқлаш учун денатурирланган электрофорез усулидан фойдаланилди, маркер оқсил сифатида хемотрипсиноген (Mr=25000 Д), миоглобин (Mr=17,8) ва цитохром (Mr=12,5 Д) дан фойдаланилди.

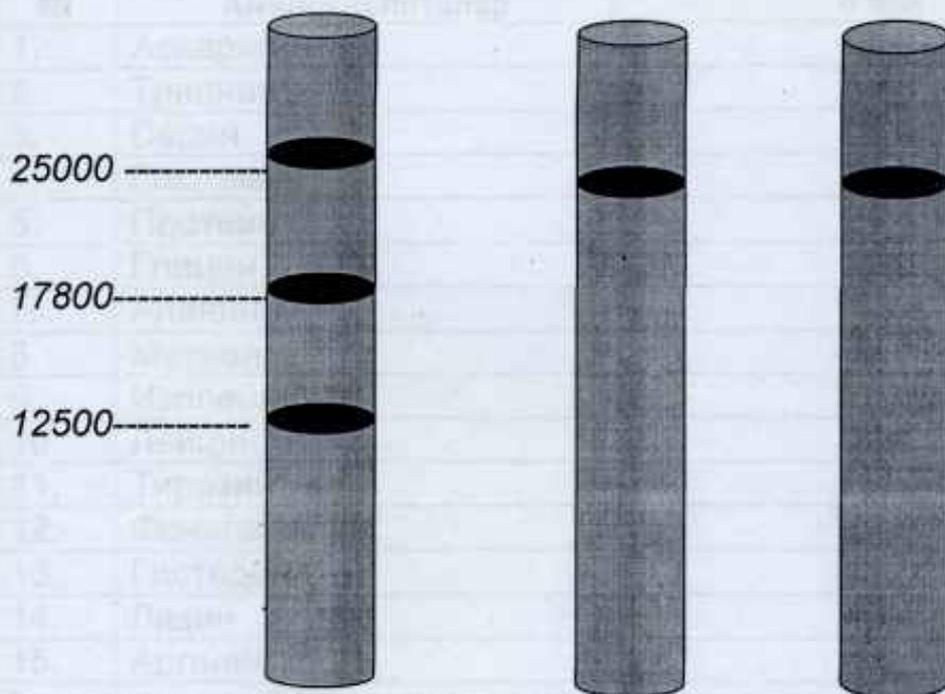
Денатурирланган агентлардан гелларни ювиш ва кейинги ранг берилиши геллардан оқсил компонентларини ювилиши мустасно шароитларда олиб борилди. Усул гелни 25% этанолда 3,56% формальдегидда гелни бўктириш ва R 250 кумассини 0,11% гача 1 соат давомида қўшиб борилишини ўз ичига олади. Тахмин қилинишича, худди

шундай шароитларда формальдегид гел матрицаси билан оқсилни ковалент бириктиради, бу аминокислоталар аминогруппалари ва бирламчи аминлар орасида метилли кўприкча хосил қилиниши ҳисобига боради. Формалдегид бошқача механизм бўйича таъсир қилиши ҳам мумкин.

Эксперимент натижалари қуйида келтирилган. Маҳаллий папаиннинг молекуляр массаси 23000 Д эканлиги ва унинг «Мерск» фирмаси папаин намунасини молекуляр массаси билан мослиги аниқланди.

Юқоридаги маълумотларга асосланиб, маҳаллий папаин намунасини «Мерск» фирмаси папаин намунаси билан бир хиллиги ҳақида хулоса қилиш мумкин.

### **Папаин нисбий молекуляр массасини ПААГ электрофорез усулида аниқлаш**



1. Маркерлар: А-12500, В-17800, С-25000.
2. Намуна- «Мерск» фирмаси папаини (стандарт).
3. Намуна- маҳаллий папаин.

### 2.1.2. Папаин субстанциясининг аминокислоталар таркибини ўрганиш

Аминокислоталарнинг таркибини аниқлашда «Микротекс» (Прага) УИ-339 анализаторидан фойдаланиб, таҳлилни амалга оширилди.

Бу изланишларни Ўсимлик моддалари кимёси институтида бирга олиб борилди.

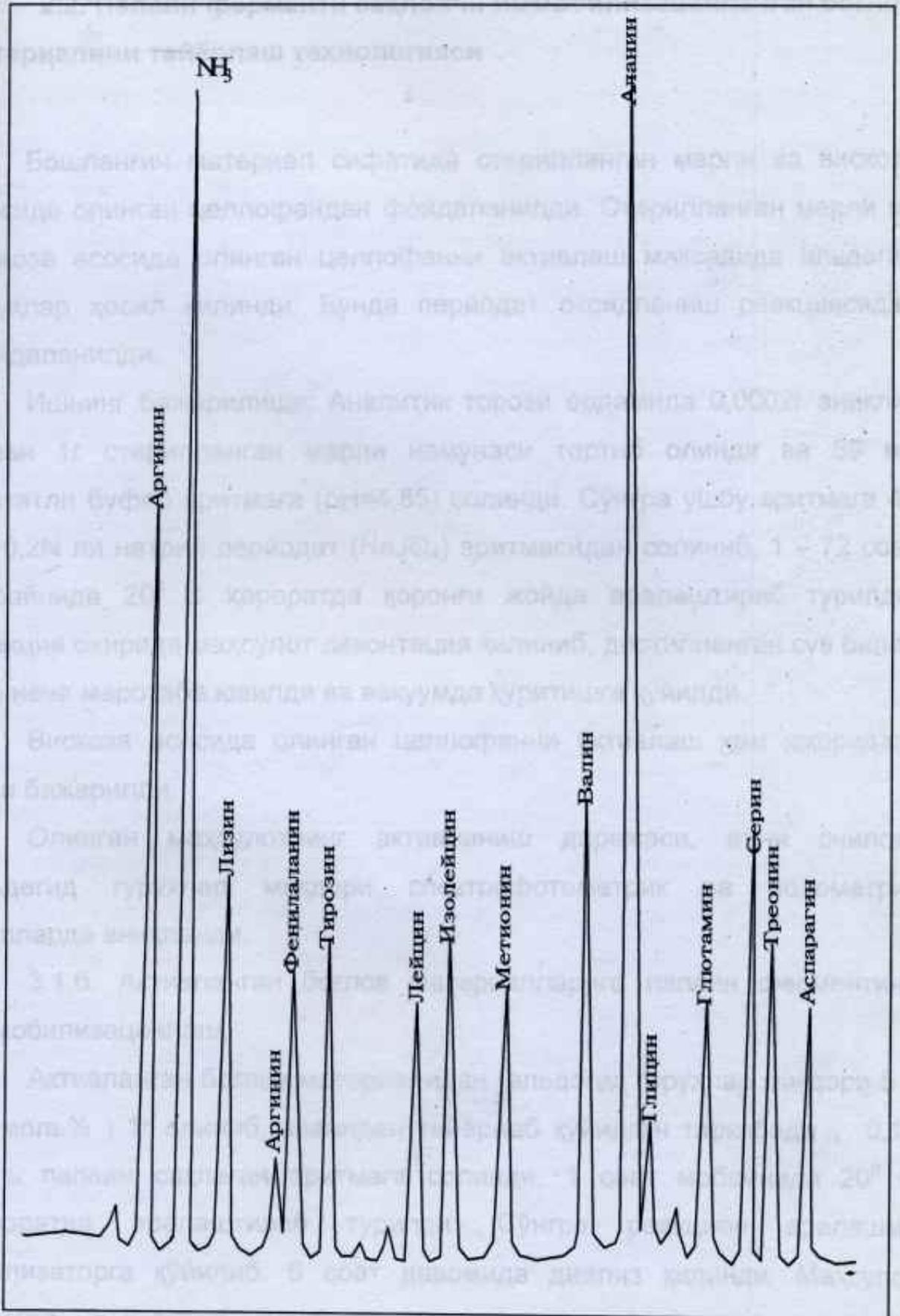
Юқоридагилардан хулоса қилиб айтганда, Ўзбекистон шароитида ўстирилган қовун дарахти сутли ширасидан олинган папаин субстанциясининг аминокислоталар таркиби, чет эл фирмаларида ишлаб чиқариладиган папаин аминокислоталар таркибига мос келади.

## 2 Жадвал

### Папаин субстанциясининг аминокислоталар таркиби

№	Аминокислоталар	n mol
1.	Аспарагин	58,6
2.	Трионин*	64,8
3.	Серин	64,4
4.	Глютамин	56,8
5.	Протеин	21,4
6.	Глицин	19,0
7.	Аланин	103,8
8.	Метионин*	62,0
9.	Изолейцин*	76,5
10.	Лейцин*	59,4
11.	Тирозин*	111,7
12.	Фенилалалин*	34,8
13.	Гистедин	11,8
14.	Лизин	40,4
15.	Аргинин	136,7

\* - алмашинмайдиган аминокислоталар



Расм 1. Папаин субстанциясининг аминокислота таркиби

## 2.2. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материални тайёрлаш технологияси

Бошланғич материал сифатида стерилланган марли ва вискоза асосида олинган целлофандан фойдаланилди. Стерилланган марли ва вискоза асосида олинган целлофанни активлаш мақсадида альдегид гуруҳлар ҳосил қилинди. Бунда перйодат оксидланиш реакциясидан фойдаланилди.

Ишнинг бажарилиши: Аналитик торози ёрдамида 0,0002г аниқлик билан 1г стерилланган марли намунаси тортиб олинди ва 50 мл ацетатли буфер эритмага ( $\text{pH}=4,85$ ) солинди. Сўнгра ушбу эритмага 46 мл 0,2N ли натрий перйодат ( $\text{NaJO}_4$ ) эритмасидан солиниб, 1 – 72 соат мобайнида  $20^0$  С ҳароратда қоронғи жойда аралаштириб турилди. Реакция охирида маҳсулот деконтация қилиниб, дистилланган сув билан бир неча мартаба ювилди ва вакуумда қуритишга қўйилди.

Вискоза асосида олинган целлофанни активлаш ҳам юқоридаги каби бажарилди.

Олинган маҳсулотнинг активланиш даражаси, яъни очилган альдегид гуруҳлар миқдори спектрофотометрик ва йодометрик усулларда аниқланди.

3.1.б. Активланган боғлов материалларига папаин ферментини иммобилизациялаш.

Активланган боғлов материалдан (альдегид гуруҳлар миқдори 5 – 10 моль% ) 1г олиниб, аввалдан тайёрлаб қўйилган таркибида 0,15 моль папаин сақлаган эритмага солинди. 1 соат мобайнида  $20^0$  С ҳароратда аралаштириб турилди. Сўнгра реакцион аралашма диализаторга қўйилиб, 6 соат давомида диализ қилинди. Маҳсулот деконтация қилиниб, сув билан ювилди ва вакуум остида қуритилди.

Олинган маҳсулот таркибидаги иммобилизацияланган фермент миқдори протеолитик фаолликнинг аниқлашнинг Ансон методи бўйича аниқланди.

Тиббиёт амалиётида турли биологик фаол моддалар билан бир қаторда ўсимликлардан ажратиб олинган ферментлар ҳам даволовчи восита сифатида кенг қўлланилади. Шундай ферментлардан бири папаин бўлиб, ундан тиббиётда куйган жароҳатларни даволашда фойдаланилади. Папаин некрозга учраган тўқималарни сўрилиб кетишига, бириктирувчи тўқимали пайлардаги чандиқларни сўрилиб кетишига самарали таъсир этади. Папаин куйишдан кейинги нам некрозда терини устки қисмини некротик массадан тозалаш ва янгитдан тери қопламаси ҳосил бўлиш жараёнини тезлаштиради [28].

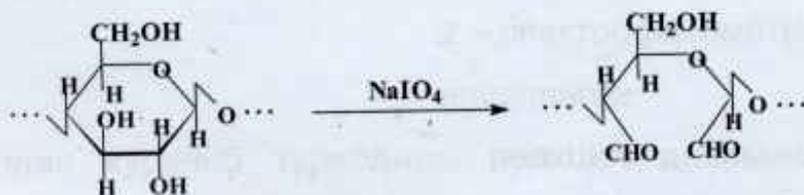
Ҳозирги вақтда иммобилизацияланган ферментлар олиш бўйича кўплаб тадқиқотлар олиб борилмоқда. Ферментларни иммобилизациялаш орқали уларнинг физиологик фаоллигини сақлаб қолган ҳолда, уларнинг таъсир вақтини узайтиришга, яъни пролонгациялаштиришга эришиш мумкин. Бундай мақсадларда табиий полимерлардан, жумладан, целлюлоза ва унинг хосилалари фойдаланиш муҳим аҳамиятга эга. Чунки, целлюлоза ва унинг хосилаларининг молекулалари таркибида реакцинофаол функционал гуруҳлар тутиш билан бирга физиологик индеферент ва организм учун зарарсиздир. Шу боис ҳам улардан парфюмерияда, озиқ-овқат ва фармацевтика саноатларида кенг фойдаланилади. Шунингдек кўплаб тадқиқотларда целлюлоза ва унинг хосилаларидан турли физиологик фаол моддаларни пролонгациялаш мақсадида фойдаланилган.

Маҳаллий хом-ашёлар асосида папаиннинг иммобилизацияланган боғлов материалларини яратиш ва уни тиббиёт амалиётида қўллаш учун стандартлаш бўйича илмий изланишларни олиб бориш долзарб ҳисобланади. Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда папаин асосида иммобилизацияланган боғлов материалларини яратиш ва уларни

стандартлаш бўйича илмий изланишларни олиб боришни мақсад қилиб олдик.

Биз ҳам тадқиқотларимизда папаин асосида иммобилизацияланган фермент олиш учун иммобилизацияловчи восита сифатида стерилланган марли ва вискоза асосида олинган целлофандан фойдаландик. Маълумки, марлининг асосий таркиби целлюлозадан, целлофан эса вискозадан (целлюлоза ксентогенати) иборат. Уларни кимёвий фаоллаш, яъни целлюлоза ва целлюлоза ксентогенати таркибига маълум миқдорда реакцинофаол функционал гуруҳлар киритиш, сўнгра эса шу функционал гуруҳларга папаинни кимёвий бириктириш мумкин.

Макромолекулалар таркибига реакцинофаол функционал гуруҳлар киритишнинг бир қанча усуллари бўлиб, биз тадқиқотларимизда перйодат оксидланиш реакциясидан фойдаландик. Оксидловчи сифатида перйодат кислотанинг натрийли тузидан фойдаланилди. Оксидланиш реакцияси тенгламасини шартли равишда қуйидагича ифодалаш мумкин:



Реакция тенгламалардан кўриниб турибдики, бунда глюкопираноза халқадаги  $C_2-C_3$  боғнинг узилиши содир бўлади ва диалдегид гуруҳлар ҳосил бўлади. Шу билан бирга асосий макромолекуланинг қисман деструкцияланиши содир бўлади. Алдегид гуруҳлар миқдорининг ортиши боғловчи материалнинг физик-механик хусусиятларига салбий таъсир этиши, яъни механик мустаҳкамлигини пасайишига олиб келиши мумкин. Шунинг учун ҳосил қилинаётган алдегид гуруҳларнинг миқдорини бошқариш учун реакция шароитини тўғри танлай билишни талаб этади.

Бу холни ҳисобга олиб, реакция турли шароитларда олиб борилди ва маҳсулотга реакция давомийлиги, оксидловчи концентрацияси, муҳит рН и каби омилларнинг таъсири ўрганилди [36,37,53,54,55].

Боғловчи материалларнинг оксидланиш даражасига реакция давомийлигининг таъсири қуйидаги жадвалда келтирилган.

3 Жадвал

**Боғловчи материалларнинг оксидланиш даражасига реакция давомийлигининг таъсири**

Боғловчи материал		Оксидланиш даражаси, мол%							
		Реакция давомийлиги, соат							
		1,0	3,0	6,0	12,0	24,0	48,0	72,0	96,0
Бинт	1	5,3	7,8	10,3	15,5	29,6	31,4	30,7	29,3
	2	5,5	8,2	12,0	17,3	34,2	35,5	40,2	46,5
Целлофан	1	3,4	6,3	7,3	8,9	10,3	12,6	12,0	9,4
	2	3,6	6,8	8,1	9,7	11,3	15,8	18,8	19,2

Альдегид гуруҳлар миқдори: 1- йодометрик усулда аниқланган  
2 – спектрофотометрик усулда аниқланган

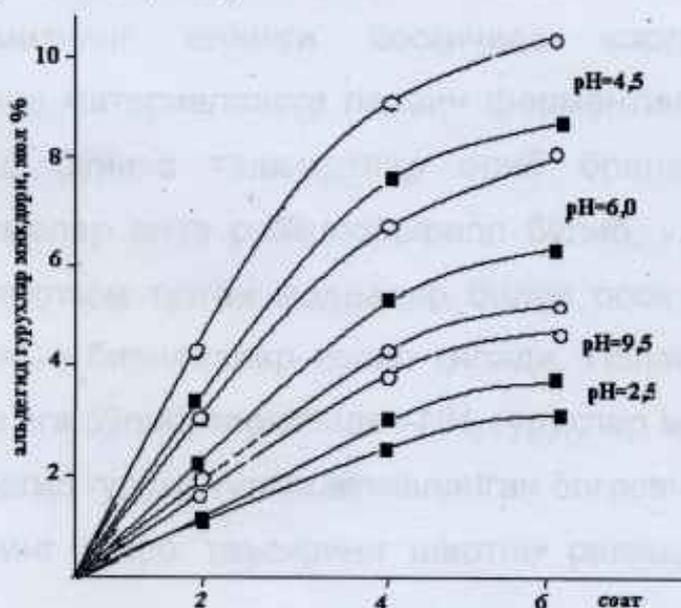
Жадвалдан кўришиб турибдики, реакция давомийлиги ортиши билан боғловчи материалларнинг оксидланиш даражаси ҳам ортиб боради ва бунда кутилганидек, целлофаннинг оксидланиш даражаси бинтга нисбатан камроқ. Албатта бу целлюлоза ксентогенати таркибидаги 2- ва 3-углерод атомларида жойлашган эркин гидроксил гуруҳларнинг целлюлозага нисбатан камлиги билан тушунтирилади. Қолаверса ушбу материаллар ўзига хос структурага эга бўлиб, бу ҳам макромолекулаларнинг реакцион қобилиятини белгилайди.

**Перйодат оксидлаш.** Перйодат оксидлаш реакциясини қуйидаги тартибда олиб борилди. Ҳажми 500 мл бўлган механик аралаштиргич,

термометр ва қайтарма совутгич билан жиҳозланган уч бўғизли колбага керакли миқдордаги ( $V=10 \text{ см}^2$ ) боғловчи материал солиниб устига 150 мл рН 4,5 бўлган буфер эритма қуйилади. Сўнгра аралаштирилиб турилган ҳолда керакли миқдорда  $\text{NaJO}_4$  0,2 N ли эритмасидан қўшилади ва реакцион аралашма 2,5 соат мобайнида  $25^\circ\text{C}$  даврий аралаштирилади. Реакция сўнгида маҳсулот эритмадан ажратиб олиниб дистилланган сув билан  $\text{JO}_4^-$  и  $\text{JO}_3$  ионлари йўқолгунча ювилиб вакуумга қуритиш учун қўйилади.

Шуни айтиб ўтиш керакки, намуналарнинг оксидланиш даражаси йодометрик усулда аниқланганда 48 соатдан сўнг нисбатан камайиши кузатилди. Бизнинг фикримизча, бунда ёнаки реакция тезлиги, яъни ҳосил бўлган алдегид гуруҳларнинг ортиқча оксидловчи таъсирида карбоксил гуруҳга ўтиши ортади. Бу ўз навбатида оксидловчи сарфи ортгани билан алдегид гуруҳларнинг миқдори камайишига олиб келади.

Қуйидаги расмда боғловчи материалларнинг оксидланиш даражасига рН-муҳит таъсири кўрсатилган.



Расм 2. Боғловчи материалларнинг оксидланиш даражасига рН-муҳит таъсири.

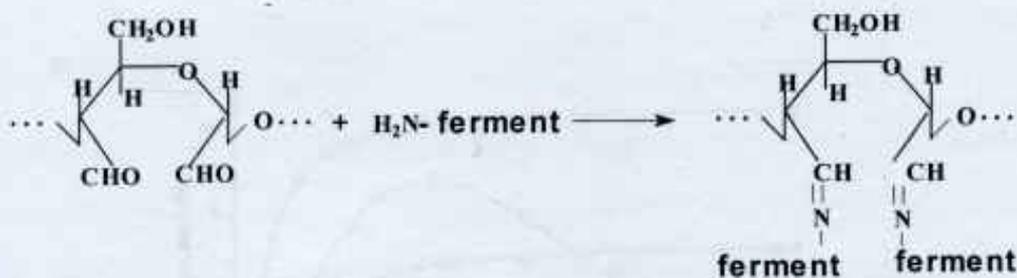
■ - целлофан; ○ - бинт.

Расмдан кўриниб турибдики, реакция кучсиз кислотали муҳитда юқори тезлик билан боради, кучли кислотали ва кучли ишқорий муҳитда эса йодат иони зарядсиз ва зарядли комплекс ҳосил қилади. Бу реакция тезлигини тушириб юборади.

Боғловчи материалларнинг оксидланишига оксидловчи концентрациясининг таъсири ўрганилди. Тадқиқотларимиз натижасида реакция 0,2н  $\text{NaJO}_4$  эритмасида юқори тезлик билан бориши, ўта суюлтирилган эритмаларда эса реакция тезлигини камайиши ва концентрланган эритмаларда эса ёнаки реакция тезлигини ортиб кетиши аниқланди.

Олинган намуналарнинг физик-кимёвий хоссалари ўрганилганда, намуналарнинг оксидланиш даражаси 10 мол % ортганда уларнинг механик мустаҳкамлиги камайиб кетиши ва дастлабки структураси сезиларли ўзгариши аниқланди. Бу ҳолат боғловчи материалнинг хусусиятини камайтириши боис, кейинги тадқиқотларимизда таркибида 10 мол% гача алдегид гуруҳи тутган намуналардан фойдаландик.

Тадқиқотларимизнинг кейинги босқичида юқорида олинган активланган боғловчи материалларга папаин ферментини кимёвий боғ орқали бириктириш бўйича тадқиқотлар олиб брилди. Маълумки, диалдегидли бирикмалар анча реакцинофаол бўлиб, улар таркибида бирламчи амин гуруҳлари тутган моддалар билан осон таъсирлашиб, азометин боғли ( $\text{N}=\text{C}-$ ) бирикмалар ҳосил қилади. Папаин молекуласи мураккаб тузилишга эга бўлиб, таркибида  $-\text{NH}_2$  гуруҳлар мавжуд. Шунинг учун таркибида алдегид гуруҳи тутган активланган боғловчи материал ва папаин ферментининг ўзаро таъсирини шартли равишда қуйидагича ифодалаш мумкин:

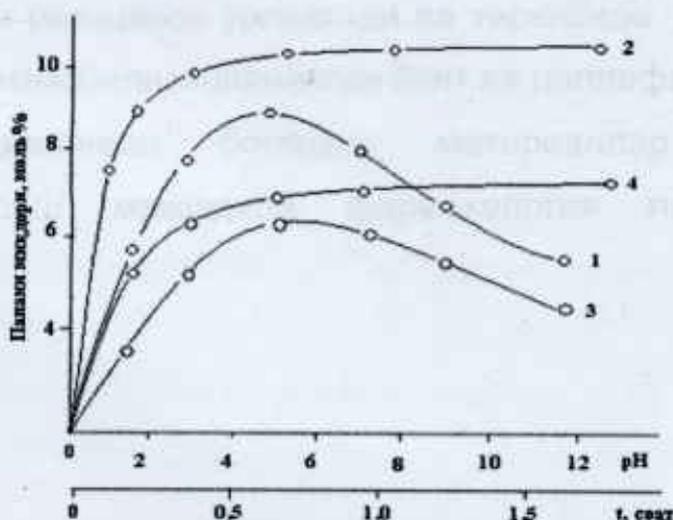


Реакция тенгламасидан кўриниб турибдики, ҳар бир оксидланган глюкопираноза халқасига иккитадан аминогурӯҳи бирикади. Иммуобилизацияланган боғловчи материал таркибидаги папаин миқдори ва унинг протеолитик фаоллиги Ансон методи бўйича аниқланди [12,41,75].

**Папаинни иммуобилизациялаш.** Папаинни активланган боғловчи материалларга иммуобилизациялаш қуйидаги тартибда амалга оширилди. Ҳажми 500 мл бўлган механик аралаштиргич, термометр ва қайтарма совутгич билан жиҳозланган уч бўғизли колбага керакли миқдордаги ( $V=10 \text{ см}^2$ ) активланган (диалдегид) боғловчи материал солиниб, устига pH 5 бўлган буфер эритмадан 200 мл қўшилади. Бунда боғловчи материалларнинг қисман бўкиши кузатилади. Сўнгра аралаштириб турилган ҳолда керакли миқдордаги папаин ферментининг сувли эритмасидан солиниб,  $20^\circ\text{C}$  температурада 60 минут мобайнида даврий аралаштирилади. Реакция сўнгида маҳсулот эритмадан ажратиб олиниб дистилланган сув билан бир неча марта ювилиб, вакуумга қуритиш учун қўйилади.

Фаоллашган боғловчи материалларга ферментни иммуобилизациялашнинг қулай шароитини танлаш мақсадида реакция турли шароитларда олиб борилди ва маҳсулотга реакция давомийлиги, муҳит pH и ва реагентлар нисбатининг таъсири ўрганилди.

Қуйидаги 2 расмда папаинни активланган бинт ва целлофанга бирикишига муҳит pH ва реакция давомийлигининг таъсири келтирилган.



Расм 3. Папаинни бирикишига муҳит рН (1 бинт и 3 целлофан) ва реакция давомийлигининг (2 бинт и 4 целлофан) таъсири.

Расмдан кўриниб турибдики, диалдегидларнинг бирламчи амин тутган бирикмалар билан таъсирлашиши бирмунча юқори тезлик билан боради. Реакциянинг дастлабки 30 дақиқасида ферментнинг диалдегид гуруҳларга бирикиши батамом тугалланиши аниқланди (Расм 2, 2 ва 4 эгри чизиқлар).

Реакция унумига рН-муҳитини таъсири ўрганилганда, реакция рН=5 да юқори унум билан бориши, рН нинг юқорироқ (ишқорий) ва пастроқ (кислотали) қийматларида бириккан фермент миқдорининг камроқ бўлиши аниқланди (Расм 2, 1 ва 3 эгри чизиқлар).

Реакциянинг жараёнига реагентлар нисбатининг таъсири ўрганилганда, реакцион аралашмадаги фермент миқдорини орттириш билан бириккан фермент миқдорининг ортиши, бунда ҳар бир диалдегид гуруҳга 2 та аминогуруҳ бирикиши аниқланди.

Шундай қилиб, тадқиқотлар натижасида бинт ва целлофанни перйодат оксидланиш реакцияси орқали активлаш реакцияси ўрганилди ва таркибида 5-10 мол% альдегид гуруҳлари тутган намуналар олинди.

Фаоллашган бинт ва целлофанга папаин ферментини кимёвий боғ орқали бириктириш реакцияси ўрганилди ва таркибида 10 мол % гача папаин ферменти иммобилизацияланган бинт ва целлофан олинди.

Иммобилизацияланган боғловчи материаллар протеолитик фаоллиги текшириш мақсадида фармакология лабораториясига берилди.

#### Физикавий хоссаглари

Санфетхалар ўлчами жадвалда кўрсатилган.

4 Жадвал

№	Санфетхалар ўлчашлари	Узунлиги (см)	Кенлиги (см)	Четлашдишлар (см)
1.	Килок	10,0	7,0	0,5
2.	Урточи	14,0	10,0	1,0
3.	Катта	20,0	14,0	1,5

Харак бўлса санфетхалар четлари ислари чиқиб кетмаслиги учун қайта ишланади.

5 Жадвал

#### Санфетхалар таркиби

№	Ингредиентлар номи	Квалитетининг қили	Миқдори гн(100 г)	Четлашдишлар (г)
1.	Тиббийёт деҳали били	ГОСТ 1172-93	38,0	0,35
2.	Папаин	БСБ 4279- 0328-2000	1,0	0,025
3.	Гликокан		0,5	0,02
4.	Дистилланган сув	ГОСТ 6709-72	60,0	0,5

**2.3. Папаин ферменти сақловчи имобилизацияланган боғлов материални стандартлаш:**

**2.3.1. Папаин ферменти сақловчи имобилизацияланган боғлов материални физикавий ва кимёвий хоссаларини ўрганиш**

Боғлов материали сифатида қўлланиладиган салфеткалар, тиббий докадан иборатдир.

### Физикавий хоссалари

Салфеткалар ўлчами жадвалда кўрсатилган

4 Жадвал

№	Салфеткалар ўлчамлари	Узунлиги (см)	Кенглиги (см)	Чегаравий четланишлар (см)
1.	Кичик	10,0	7,0	0,5
2.	Ўртача	14,0	10,0	1,0
3.	Катта	20,0	14,0	1,5

Керак бўлса салфеткалар четлари иплари чиқиб кетмаслиги учун қайта ишланади.

5 Жадвал

### Салфеткалар таркиби

№	Ингредиентлар номи	Квалификация	Миқдори (г/100 г)	Чегаравий четланишлар (г)
1.	Тиббиёт докали бинти	ГОСТ 1172-93	38,0	0,35
2.	Папаин	ВФС 42 Уз-0325-2000	1,0	0,025
3.	Новокаин		0,5	0,02
4.	Дистилланган сув	ГОСТ 6709-72	60,0	0,5

Изох: Салфеткалар таркибига ўсимлик компонентлари тиббиёт ва косметик препаратларда қўллаш учун рухсат этилган миқдорда киритишга рухсат этилади.

6 Жадвал

### Салфеткалар физик-кимёвий кўрсаткичлари ва таркиби

№	Кўрсаткич номлари	Тавсифи ва меъёрлари
1	Ташқи кўриниши, ранги, хиди	Уч қаватли тиббиёт докаси, сариқ-оқ ёки крем рангли мойсимон кўринишда, ҳидсиз
2	Асосий моддани (папаин) умумий оғирликка нисбати % дан кам бўлмаган миқдори	1,0
3	Тиббиёт докаси умумий оғирликдан, кам бўлмаган %	38,0
4	Стерилликка текширув	стерил
5	Токсикликка текширув	Токсик эмас

Упаковкаланган салфеткаларнинг стерилизацияси ДФ да кўрсатиб ўтилган меъёрий-техник ҳужжатга кўра радиацион усулда олиб борилиши керак ва 17 Грейга тенг.

7 Жадвал

### Салфеткаларни тайёрлаш учун қўлланилган асосий ва ёрдамчи материаллар

№	Материал номи	Меърий-техник ҳужжат	Материалнинг вазифаси
1.	Тиббий докали бинт	ГОСТ 1172-93	Ёрдамчи материал
2.	Папаин		Биологик фаол

	2. ПАТЛАНИ БУЗГАНДА БИР КИМНИН	ИМАЖИНИ	КОМПОНЕНТ
3.	Новокаин	ГФХ, ФС 467	Махаллий анестезик
4.	Дистилланган сув	ГОСТ 6709-72	Гел хосил қилувчи мухит
5.	Комбинирланган полиэтилен юқори босимда	ТУ.225-002- 00463800-93	Қутилаш учун

Бирликлари: 1 гр тегишлик препаратда курсаткидан  
қилиб берилган.

Бу сунъий препарат бўлиб, асосан ультрафиолда  
диагностика учун қулланилади.

Жиддан

№	Бирликлари				
	1 мг/мл	10 <sup>-1</sup> мг/мл	10 <sup>-2</sup> мг/мл	10 <sup>-3</sup> мг/мл	10 <sup>-4</sup> мг/мл
1	0,55	0,07	0,09	0,1	0,07
2	0,65	0,17	0,2	0,05	0,0
3	0,6	0,1	0,73	0	0,5
4	0,55	0,07	0,05	0	0,4
5	0,4	0	0	0	0,5
6	0,3	0	0	0	0,1
7	0,2			0	0
8	0,1				0
9	0,09				
10	0,05				

### 2.3.2. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материаллини протеолитик фаоллигини ўрганиш.

Протеолитик фаоллик Ансон усули бўйича аниқланади. Усул текширилаётган фермент препаратини казеинат натрий иштирокида пептидлар ва аминокислоталаргача гидролизланишига асосланган.

Протеолитик фаоллик бирлиги деб, ферментнинг 1 минутда ҳарорат  $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  да казеинат натрийни 1 мк мол тирозинга мос келувчи чўкмайдиган трихлорсирка кислота ҳолатига ўтказишига айтилади. Протеолитик фаоллик 1 гр текширилаётган препаратдаги кўрсатилган бирлик сонидан ифодаланади.

Биз ўрганишлар натижасида полижел асосида ҳам изланишлар олиб бордик. Полижел – бу сунъий препарат бўлиб, асосан ултратовуш диагностика учун қўлланиладиган контакт гел ҳисобланади.

8 Жадвал

№ кунлар	Е	E <sub>660</sub> даги оптик фаоллик бирлиги			
		гель 10г+10мг 1мг/1г	гель 10г+20мг 20мг/г	гель 10г+5мг 0,5мг/г	гель 10г+100мг 10мг/г
1	0,65	0,27	0,48	0,1	0,57
2	0,65	0,17	0,2	0,05	0,5
3	0,6	0,1	0,13	0	0,5
4	0,55	0,07	0,05	0	0,4
5	0,4	0	0	0	0,3
6	0,3	0	0	0	0,1
7	0,2			0	0
8	0,1				0
9	0,09				
10	0,09				

Намуналарни тайёрлаш:

1. Намуна 1. Хажми 10 мл бўлган ўлчов пробиркасида 0,6 г папаин сувда эритилди (концентрация 0,6 мг/1 мл).
2. Намуна 2. Майдон юзаси ( $2 \text{ см} \times 5 \text{ см} = 10 \text{ см}^2$ )  $1 \text{ см}^2$  га 0,28 мг (концентрация 0,14 мг/1 мл) папаин иммобилизацияланган вискоза асосида олинган целлофан.
3. Намуна 3. Майдон юзаси ( $10 \text{ см} \times 5 \text{ см} = 50 \text{ см}^2$ )  $1 \text{ см}^2$  га 0,28 мг (концентрация 0,14 мг/1 мл) папаин иммобилизацияланган стерилланган марли.

Керакли эритувчиларни тайёрлаш:

1. Универсал буфер эритмасини тайёрлаш.

Бунинг учун 0,1 моль/л сирка кислотаси, ортофосфор кислотаси ва бор кислотаси тенг хажмларда аралаштирилади. рН 1,8 ли буфер эритмаси олинади. Ушбу аралашмага 1 моль/л натрий ишқорини қўшиб, рН  $7,2 \pm 0,2$  бўлган эритма олинади.

2. Казеинат натрий (субстрат) эритмасини тайёрлаш.

2,000 г (аниқ тортма) қуритилган казеинат натрийни 90 мл буфер эритмада (рН 7,2) эритилади ва  $70^{\circ}\text{C}$  ҳароратда аралаштирилади. Сўнгра уни хажми 100 мл бўлган ўлчов колбасига ўтказилади ва белгисигача буфер эритмаси билан етказилади. Эритмани сақлаш муддати музлатгичда 3 кундан ошмаслиги керак.

3. Фолин реактивини тайёрлаш.

1000 мл хажмли қайтар холодильник уланган ости юмалоқ колбага 700 мл сув қуйилади ва 100,0 г вольфрам кислотасининг натрийли тузи, 25,0 г молибден кислотасининг натрийли тузи қўшилади. Сўнгра унга 85% ли ортофосфор кислотасидан 50 мл ва концентрланган хлорид кислотасидан 100 мл қўшилади. Аралашма асбестли сеткада 10 соат давомида қайнатилади. Совутилган аралашма Эрленмейер колбасига

ўтказилади, колба деворлари ва холодильник 50 мл сув билан чайқатилади. Сўнгра унга литий сульфат ва 5 томчи бром қўшилади. Суюқлик очиқ колбада тяга остида 20 минут давомида кучсиз оловда бром парлари йўқолгунча қайнатилади. Эритма сариқ рангда бўлиши керак. Сўнгра эритма совутилади ва хажми сув билан 1 литргача етказилади, зарур холларда уни шишали пахта билан тўлдирилган Аллин трубкаси орқали филтрланади. Тайёрланган эритма қорайтирилган шиша склянкада музлатгичда сақланади.

Фолиннинг ишчи эритмаси асосий эритмани 1:2 нисбатда (Фолин реактивидан 1 қисм ва дистилланган сувдан 2 қисм) суюлтириш орқали тайёрланади.

4. 0,3 моль/л учхлорсирка кислота эритмасини тайёрлаш.

50,0 г учхлорсирка кислота (аниқ тортма) хажми 1000 мл ли ўлчов колбасига ўтказилади, сувда эритилади ва хажми белгисигача сув билан етказилади.

5. 0,2 моль/л хлорид кислота эритмасини тайёрлаш.

17,0 мл концентрланган хлорид кислотаси (зичлиги 1,19) хажми 1 литрли ўлчов колбасига ўтказилади ва белгисигача сув билан етказилади.

6. 2 моль/л натрий гидроксид эритмасини тайёрлаш.

8,0 г натрий ишқори 100 мл хажмли ўлчов колбасига ўтказилади, 50 мл сувда эритилади ва белгисигача сув билан етказилади.

Тажрибани бажариш.

3 та пробирка олинади (1 та назорат, 2 та синов). 3 та пробиркага 2 мл дан казеинат натрий (субстрат) солинади ва ультратермостатда  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ҳароратда аралаштирилади. 10 минутдан сўнг ҳар бир пробиркага 2 мл дан 1, 2, 3 эритма намуналаридан солинади.

Пробиркалар чайқатилади ва 10 минутга  $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  ҳароратда гидролизга қолдирилади. 10 минутдан сўнг 2 та пробиркага (синов) 4 мл

дан учхлорсирка кислота эритмасини ферментатив реакцияни тўхтатиш ва оқсилларни чўктириш учун қўшилади.

Аралашмалар тезда аралаштирилади ва пробиркалардаги аралашмаларни  $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  ҳароратда яна 20 минут ушлаб турилади. Сўнгра аралашмалар куруқ пробиркаларга кулсизлантирилган қоғоз фильтр орқали филтрланади. Филтрат тиниқ бўлиши керак.

Пробиркалардан 1 мл дан филтрат олинади уларга тахминан 5 мл натрий карбонатнинг 0,5 моль/л концентрацияли эритмасидан қўшилади, аралаштирилади ва тезда 1 мл Фолин реактивининг ишчи эритмасидан қўшилади. Реакцион аралашма 20 минутга қолдирилади. Реакция натижасида аралашмаларда ҳаво ранг ҳосил бўлади. Назорат пробиркасига 2 мл 1, 2, 3 эритма намуналари ва 4 мл учхлорсирка кислота эритмаси қўшилади, 10 минут  $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  ҳароратда термостатда ушлаб турилади, сўнгра унга 2 мл субстрат солинади, яна 20 минут термостатга қўйилади. Сўнгра эритма кулсизлантирилган фильтр орқали филтрланади. Пробиркадан 1 мл филтрат олинади, унга 5 мл натрий карбонатнинг 0,5 моль/л концентрацияли эритмасидан қўшилади, аралаштирилади ва 1 мл Фолин реактивининг ишчи эритмасидан қўшилади.

Оптик зичлик қатлам қалинлиги 10 мм бўлган спектрофотометрда 660 нм тўлқин узунлигида спектрофотометрда аниқланади.

660 нм да оптик зичлик кўрсаткичлари:

Намуна 1 - 1,0;

Намуна 2 - 0,1;

Намуна 3 - 0,06.

Протеолитик фаолликни ҳисоблаш учун тирозин бўйича калибровка графиги (градуировка характеристикаси) тузилади ва тирозин эквиваленти (ТЭ) ҳисобланади, яъни 1 мл стандарт эритмада 1 мк моль тирозин берадиган оптик зичлик. Тирозин эквиваленти ҳар бир

спектрофотометр ва Фолин реактивининг ҳар бир янги улуши учун тузилади.

Калибровка графиги бўйича тирозин эквиваленти (ТЭ) топилди, 1 мл даги 1 мк моль тирозиннинг оптик зичлиги ТЭ = 1,5 га мос келди.

Намуналарнинг протеолитик бирлиги ПЕ қуйида келтирилган формула бўйича ҳисобланди:

$$PE = \frac{D \cdot 4 \cdot V}{TЭ \cdot 10 \cdot m} \cdot 1000,$$

Бу ерда:

Д – текширилувчи эритманинг оптик зичлиги;

4 – фермент эритмасига учхлорсирка кислотаси қўшилгандан кейинги реакция аралашма хажмининг нисбати;

V – эритма хажми;

ТЭ – градуировка характеристикаси бўйича аниқланган тирозин эквиваленти, мл/мк моль;

10 – субстратни гидролизланиш вақти, минут;

m – намуналар эритмасини тайёрлаш учун олинган препаратнинг граммлардаги миқдори;

1000 – 1 г фермент препарати учун олинган бирликнинг ўтиш коэффиценти.

Ҳисоблаш:

$$PE = \frac{1,0 \cdot 4 \cdot 0,1}{1,5 \cdot 10 \cdot 0,006} \cdot 1000 = 4444 PE / g$$

$$PE = \frac{0,1 \cdot 4 \cdot 0,1}{1,5 \cdot 10 \cdot 0,0014} \cdot 1000 = 1904 PE / g$$

$$PE = \frac{0,06 \cdot 4 \cdot 0,1}{1,5 \cdot 10 \cdot 0,0014} \cdot 1000 = 1142 PE / g$$

### 3. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материалени токсиклигини ўрганиш

Папаин асосида яратилган иммобилизацияланган боғлов материалда токсикологик текшириш ўтказилди. Боғлов материалнинг ҳар бир см<sup>2</sup> майдон юзасига 0,28 мг дан 80 ПЕ ли папаин эритмаси шимдирилди ва ушбу боғлов материалда токсикологик текшириш келишилган кўрсатма ва методик хужжатлар асосида ўтказилди [ ].

Текшириш масаласига киритилди:

- Папаин асосида яратилган иммобилизацияланган боғлов материалнинг тақдим этилган намуналаридан экстракт олиш;
- Токсиклигини аниқлаш;
- Терига резорбтив таъсирини баҳолаш;
- Маҳаллий таъсирланиш таъсирини баҳолаш.

Тақдим этилган папаин асосида яратилган иммобилизацияланган боғлов материали намуналарини токсикологик текшириш ўтказилгандан кейин олинган экстрактда:

1. Олинган экстракт ИСО Халқаро стандарти 10.993 – 1; 10.993 – 10 – 99 га келишилган ҳолда ўтказилди.

Тақдим этилган папаин асосида олинган иммобилизацияланган боғлов материали намуналаридан экстракт қуйидаги усулда олинди. Текширилувчи намунани 20 мл 0,9% ли натрий хлориднинг физиологик эритмаси сақланган флаконга солинди. Экстракция вақти HS – 62A термостатда 50<sup>0</sup> С ҳароратда 72 соатни ташкил қилди. Синовдан ўтаётган намуналарда экстракция бажарилгандан сўнг натижалар органолептик текширилганда ҳиди, мазаси, хиралиги йўқлиги аниқланди. Экстракт лаборатория ҳайвонларида синовдан ўтказилди.

2. Текширилаётган намунадан олинган экстрактнинг кучли токсиклигини ўрганиш.

Кучли токсикликни текшириш икки хил жинсдаги ҳар бир жинсдан 6 тадан, оғирлиги 18 – 20 гр бўлган оқ сичқонларда ўтказилди. Ҳар бир синовдан ўтаётган материал индивидуал тарзда ўрганилди. Экстракт 1мл дан қоринга юборилди. Эритмани бир марталик киргизилгандан кейин кун давомида ҳар соатда, 2 – 3 кун эса кун давомида 3 марта ва кейинги 7 кунлик тажриба давомида кунда 1 марта киритилиши назорат қилиб турилди. Бунда сичқонларнинг умумий хатти-ҳаракати, жунининг ранги, шиллиқ пардаларининг ҳолати, нафас олиши, юрак уриши, ҳаракат фаоллиги ва ўлими ҳисобга олинди. Кузатишлар шуни кўрсатдики, иммобилизацияланган боғлов материалидан олинган экстрактлар ҳайвонларнинг умумий ҳолатига токсик таъсир кўрсатмади. Экстракт киритилгандан сўнг сичқонлар хатти – ҳаракатида алоҳида ўзгаришлар кузатилмади.

7 кунлик кузатиш давомида сичқонларда ўлим ҳолати аниқланмади.

Иммобилизацияланган боғлов материалидан олинган экстракт сичқонларга инъекция қилинганда токсик таъсирга эга эмаслиги аниқланди.

3. Тажриба ҳайвонларининг шикастланмаган терисида экстрактни қўзғатувчи таъсирини ўрганиш.

Тажрибада жинсий етилган, оғирлиги 2,0 – 2,2 кг бўлган тахминан 14 кун давомида вивария шароитида сақланган альбинос қуёнлардан фойдаланилди. Экстрактни синовдан ўтказишгача бўлган даврда ҳайвонларнинг тана ҳарорати, умумий ҳолати, орқа терисини жун қопламани баҳолаш ўтказилди. Тажрибагача 1 сутка олдин орқа бўлимидаги кўкрак териси текширилди, орқасининг иккала тамонидаги қисмидан 10X15 см ўлчамида жуни қайчи билан кесиб ташланди. Ўнг тамондан жун кесилган тери устига синалаётган экстракт билан намланган салфетка, чапга эса натрий хлориднинг физиологик эритмаси

намланган салфетка қўйилди. Салфеткалар 20 мл хажмдаги эритмалар билан намланди. Экспозиция вақти 4 соатни ташкил қилди. Текширилувчи экстракт ва назорат эритмасини бир марталик таъсиридан кейинги тери қатламининг ҳолати 1, 24 ва 72 соатдан сўнг қуйидаги жадвалда келтирилган тери реакцияларининг таснифланиши бўйича балларда кузатилди.

## 9 Жадвал

ГОСТ Р ИСО 10993.10-99 бўйича тери реакцияларининг таснифлаш тизими

Реакцияни тасвирланиши	Балларда баҳолаш	
	Таклиф этилган	Ҳақиқий
Қизариш ва яра чақанинг пайдо бўлиши		
Қизаришларнинг йўқлиги	0	
Жуда кучсиз қизариш (бироз билинадиган)	1	-
Билинадиган қизариш	2	-
Ўртача қизариш	3	-
Аниқ кўриниб турадиган қизариш (ёрқин қизил яра чақанинг пайдо бўлиши)	4	-
Шишнинг пайдо бўлиши		
Шишнинг йўқлиги	0	
Жуда кучиз шиш (бироз билинадиган)	1	-
Билинадиган шиш	2	-
Ўртача шиш	3	-
Аниқ кўриниб турадиган шиш	4	-
Мумкин қадар максимал балларнинг миқдори	8	-

Тажриба участкасидаги терини назорат участкасидаги терига 1, 24 ва 72 соатдан кейин таққосланганда, текширилувчи экстракт ва таққосланувчи (0,9 % ли натрий хлориднинг физиологик эритмаси) эритмалар орасида терига таъсир этиши бўйича фарқ йўқлиги кузатилди. Барча тақдим этилган боғлов материаллари синовдан ўтказилганда максимал миқдордаги балл 0 ни ташкил қилди, шунингдек ҳайвон терисига аппликация қилинган экстракт альбинос қуёнлар тери қатлами ҳолатини ўзгартрмади. Олинган маълумот натижалари текширилувчи намунанинг токсик таъсири йўқлигидан гувоҳ беради.

Иммобилизацияланган боғлов материални ҳайвон терисида макроскопик текширилганда токсик таъсири кузатилмади

Иккинчидан намуналар текширилганда терига маҳаллий – қўзғатувчи таъсирини кўрсатмади.

4. Кўз шиллиқ қаватида экстрактни қўзғатувчи таъсирини ўрганиш.

Тажриба оғирлиги 2,0 – 2,3 кг бўлган икки хил жинсдаги, олдиндан кузатув остида бўлган ва соғлом кўзли қуёнларда ўтказилди. Экстракт қуёнлар кўзининг ички конъюнктивал халта қисмига 0,1 мл миқдорида томизилди. Ҳайвонларнинг бошқа кўзи интакт назорат ҳисобланди. Пахтадаги текширилувчи экстрактни ҳайвонларнинг иккала кўзига томизилганда 1, 24 ва 72 соатдан кейинги таъсири кузатилди. Бунда шох парда, кўз рангдор пардаси ҳолати, конъюктиви, шиллиқ ҳолати, қон томирлар ҳолати, кўздан ёш оқаётганлиги ёки йўқлиги баҳоланди.

Ўрганилаётган папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материалдан олинган экстрактни кўзга томизиб, 72 соат давомида қўйилган тажриба натижалари кузатилганда, кўзнинг рангдор пардасига, шох пардасига, конъюктивига қитиқловчи таъсири кузатилмади. Қуёнлар кўзидан ёш оқишини ўзгартрмайди.

Тақдим этилган папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материали намуналардан олинган экстракт кўзга томизилганда тери юзаси ва кўз шиллиқ қаватига қўзғатувчи таъсир кўрсатмади.

Хулоса қилиб айтадигин бўлсак, папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материалидан олинган экстракт органолептик текширилганда, экстрактнинг хиди, таъми, хиралиги ва ёт аралашмалари йўқлиги кузатилди.

Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материалидан олинган экстракт текширилганда терига резорбтив, маҳаллий қўзғатувчи ва токсик таъсир кўрсатмади.

#### 4. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материали микробиологик тозалигини ўрганиш

XI Давлат фармакопеясидаги «Дори воситаларининг микробиологик назорат усуллари» умумий мақоласида стерил бўлмаган дори воситаларида микроорганизмлар миқдорини аниқлаш учун текшириладиган намуна эритма, суспензия ёки эмульсия кўринишида экиш учун агарланган муҳитдан фойдаланишга асосланган чашкали – агарли 2 қатламли усул тавсия қилинади. Чашкали усулнинг самаралилиги ва натижаларнинг яхши чиқишига қарамасдан, баъзи ҳолатларда микроорганизмлар колонияларини санашда қийинчиликлар учрайди. Масалан, баъзи спора ҳосил қилувчи бактериялар экмалари инкубациясидан 24 соат ўтганидаёқ Петри чашкасида озика муҳитининг бутун юзасини қоплаб олувчи ва бир – бири билан аралашиб кетадиган колониялар ҳосил қилади. *Mucor*, *Rhizopus* оиласи моғор замбуруғи диффуз ўсиши ҳам агарда колониялар сонини аниқлашга йўл қўймайди. Бундай ҳолатларда бошқа усулларни қўллаш мақсадга мувофиқдир, улардан бири кўп ишончли сонлар (КИС) усули ҳисобланади [13].

Усул инкубация шароитида бактерия ёки замбуруғлар учун оптимал бўлган суюқ озика муҳитида ривожланадиган микроб ҳужайраларининг энг кўп ишончли сонларини статистик аниқлашга асосланган. КИС усули биринчи бўлиб, АҚШ Фармакопеясининг 19 нашрида стерил бўлмаган дори воситаларида микроб билан зарарланишнинг юқори бўлмаган даражали микроорганизмларни ҳисоблаш усули сифатида киритилган. Ҳозирги вақтда усул АҚШ ва Европа мамлакатларида кенг қўлланилади.

Материаллар ва усуллар текшириладиган намуна (препарат, субстанция ёки ёрдамчи материал) эритма, суспензия ёки эмульсия ҳолида 1:10, 1:100, 1:1000 нисбатларда суюлтирилиб, мос келадиган

эритувчи ва эмульгаторлардан фойдаланиб, 1 г ёки 1 мл намунадан тайёрланади. 1 г ёки 1 мл намунадаги бактериялар умумий сонини аниқлаш учун суюқ озиқа муҳитидан фойдаланилади. Масалан, Давлат фармакопеясининг XI нашрида тавсия этилган турли бактерияларни ўсишини таъминлайдиган №8 ёки шунга ўхшаш озиқа бульонлари.

Замбуруғларнинг умумий сонини аниқлашда суюқ Сабуро муҳити қўлланилиб, бактериялар ўсишини тўхтатиш учун антибиотиклар киритилади, масалан, муҳит стерилизациялангунча муҳит таркибига 50 мг/л миқдоридаги левомецетин қўшилади.

Тахминий натижаларни янада эртароқ муддатларда (48 – 72 соат) олиш учун таркибида 0,3%, агар – агар сақловчи суюқ Сабуро муҳитидан фойдаланиш мумкин.

Суюқ озиқа муҳити 12 та стерилланган пробирканинг ҳар бирига 9 мл дан қуйилади. Биринчи қатор пробиркаларга 1 мл дан 1:10 нисбатда суюлтирилган, иккинчи қаторга 1 мл дан 1:100 нисбатда суюлтирилган, учинчи қаторга 1 мл дан 1:1000 нисбатда суюлтирилган текширилувчи намунадан қуйилади. Тўртинчи қатордаги пробиркаларга намуналарни эритишда, суспензиялашда ва эмульгирлашда фойдаланиладиган суюлтирувчидан 1 мл дан қуйилади. Озиқа муҳитида бактерияларни ўстириш учун  $(30-35)^{\circ}\text{C}$  ҳароратда, озиқа муҳитида замбуруғларни ўстириш учун эса  $(20-25)^{\circ}\text{C}$  ҳароратда 5 сутка давомида инкубацияланади. Экмаларнинг инкубация вақти тугагандан сўнг биринчи, иккинчи ва учинчи қатор пробиркалар сони белгиланиб, микроорганизмлар ўсиши аниқланади. Тўртинчи қатор пробиркаларидаги муҳит (назорат суюлтирувчи) стерил ҳолатда қолиши керак. Қуйида келтирилган жадвалдан фойдаланиб, олинган уч хонали сонга мос келадиган бактериялар ёки забуруғларнинг кўпроқ ишончли миқдори аниқланади.

Масалан: биринчи қатор пробиркаларда микроорганизмларнинг ўсиши 3 та пробиркада кузатилди, иккинчи қаторда 2 та пробиркада, учинчи қаторда 1 та пробиркада кузатилди. Олинган сон "321" жадвал бўйича "150" рақамига мос. Демак, 1 г ёки 1 мл текширилувчи намуна 150 микроорганизм (бактерия ёки замбуруғлар озиқа муҳити ва экмаларнинг инкубация ҳароратига боғлиқ холда) сақлайди.

## 10 Жадвал

Микроорганизмларни аниқлашнинг кўп ишончли сонлар усули

Микроорганизмлар ўсиши кузатиладиган пробиркалар сони			1 г ёки 1 мл препаратдаги микроорганизмларнинг кўп ишончли сонлари
Препаратни суюлтириш			
1:10	1:100	1:1000	
Пробиркадаги препаратнинг мос миқдори			
100 мг	10 мг	1 мг	
3	3	3	1100 дан кўп
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	90
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

Агар текширилувчи препаратнинг табиатига боғлиқ холда натижалар ҳисобини аниқ аниқлаб бўлмаса (муҳитнинг хиралашиши,

рангининг ўзгариши ва бошқалар), ўсган микроорганизмларнинг борлигига ишонч ҳосил қилиш учун мос келадиган суюқ ёки агарли муҳитларга экилади.

Боғлов материалларининг микробиологик тозалиги текширилишида стерил асбоблар: қайчи, пинцет, игна ва бошқалардан фойдаланилди. Таҳлил махсус боксларда амалга оширилди.

### **Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материални микробиологик текшириш**

Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материали микробиологик тозалигини ўрганиш учун боғлов материалнинг бурчак қисмидан бир неча қавати 2 см ўлчамда кесиб олинади.

Қирқилган бўлаклар асептика қоидаларига амал қилинган ҳолда озиқ муҳит сақлаган чашкага ўтказилди.

Меърий хужжатлар талаби бўйича боғлов материалидаги микроорганизмларнинг сони кўрсатилган меъёрлардан ошиб кетмаслиги керак. Тажриба натижаларидан кўриниб турибдики, боғлов материаллари микробиологик текширилганда, яъни бактерия ва замбуруғларнинг сони белгиланган меъёрлардан ошмаслиги меъёрий хужжатлар талабларига мос келиши аниқланди.

Тажриба натижалари қуйидаги жадвалда келтирилган:

11 Жадвал

### **Боғлов материалидаги микроорганизмларнинг таҳлили**

Кўрсаткичлар	Меъёрий хужжатлар талаблари	Таҳлил натижалари	МХ талабларига мослиги
Аэроб бактерияларнинг	$10^2$ дан кўп бўлмаслиги	200	Мос келади

умумий сони (1 гр. ёки 1 мл)	керак		
Моғор ва ачитқи замбуруғлар умумий сони (1 гр. ёки 1 мл)	10 <sup>1</sup> дан кўп бўлмаслиги керак	10 дан кам	Мос келади
<i>Staphylococcus aureus</i> (1 гр. ёки 1 мл)	Бўлмаслиги керак	-	Мос келади
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 гр. ёки 1 мл)	Бўлмаслиги керак	-	Мос келади
<i>Escherichia coli</i> (1 гр. ёки 1 мл)	Бўлмаслиги керак	-	Мос келади
<i>Salmonella</i> (1 гр. ёки 1 мл)	Бўлмаслиги керак	-	Мос келади
<i>Enterobacteriaceae</i> (1 гр. ёки 1 мл)	Бўлмаслиги керак	-	Мос келади

## 5. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материални фармакологик фаоллигини ўрганиш

### Папаиннинг янги дори шаклини ярага қарши таъсирини ўрганиш

Тажрибалар икки хил жинсдаги, 178-205 гр. оғирликдаги 12 каламушларда ўтказилди. Тажриба бошланишигача хайвонларни тиопентал натрий билан беҳуш қилдик. Сўнгра беҳушлантирилган каламушларга асептик шароитда, олдиндан туксизлантирилган елка териси юзасига стандарт диаметрли ва чуқурликдаги 1x1 см ўлчамда ва 0,5 мм чуқурликда тери яралари ҳосил қилинди. Яраларни очиқ ҳолда қолдирдик.

Тажриба яраларини битиш жараёнини яраларни тўла битиб кетишигача кузатилди.

Хайвонларни ҳар бири 6 тадан қилиб 2 та гуруҳга бўлинди. 1-гуруҳ синов гуруҳи эди, бу гуруҳга новокаиннинг 1% ли эритмаси билан намланган, папаинсиз индеферент марляли боғлов материали фойдаланилди.

2-гуруҳ эса синов гуруҳи бўлиб, бу гуруҳга новокаиннинг 1% ли эритмаси билан намланган, папаин ферменти иммобилизацияланган (марлядаги папаин активлиги-1142 ПЕ/г) марляли боғлов материали фойдаланилди.

Даволаш патология – экспериментал тери яраларини ҳосил қилгандан сўнг тезда бошланди. Бунинг учун ярага папаин ферменти иммобилизацияланган марляли боғлов материални ҳар куни 1 мартадан 3 кун давомида қўйилди. Синов хайвонларига аналогик шароитларда папаинсиз марляли боғлов материали қўйилди. Папаиннинг ўрганилаётган дори формаси эффекти қуйидагича баҳоланди:

а) Ярани битиш тезлиги бўйича, яра экссудати мавжудлиги ва унинг ҳужайра таркиби бўйича;

б) тузилишига кўра унга ёндош тўқималар ва эпителизация вақти бўйича;

в) унинг майдонини ўзгариши бўйича, см<sup>2</sup>.

Тажрибалар шуни кўрсатдики, жароҳатлангандан сўнг бир сутка ўтгач синов ҳайвонларида яра майдони 1,4 марта ортди. Яранинг четлари ва таги шишди, ташқи юзада экссудат ҳосил бўлди.

Кузатишнинг 3-куни яра характеристикаси олдинги ҳолда қолди. Яра юзасида жигарранг-тўқ қизил рангли, яра тубига етарлича маҳкам ёпишган юпқа қатлам ҳосил бўлди. Кейинчалик синовнинг 7-кунида ташқи юза секин-аста таранглашди, 16 куни батамом битиб кетди. Яра ўрнида тўла регенерацияли тук билан қопланган қатлам ҳосил бўлди.

Папаиннинг ўрганилаётган дори шакли билан даволанаётган хайвонларда дастлабки 3 кунда яралар қуруқ, қон оқмаган ва йирингламаган ҳолда бўлди. Хеч бир ҳолатда шишли реакциялар кузатилмади. 5-кун ҳосил бўлган қатлам тагида тиниқ, донатор грануляция кузатилди. Шундай қилиб, 5-кунда хайвонларда яра атрофида яллиғланишли ўзгаришлар босилди, грануляциялар пайдо бўлди. Бу вақтга келиб папаин препарати таъсирида яра юзасининг майдони бошланғичига нисбатан (1 см<sup>2</sup>) 43% га камайди. 7-куни пўстлоқ тушиб кетди. Кейинчалик 10-кунда эпидермис янги дериват ҳосил қилиш билан тўла тикланиши юз берди.

Юқорида баён қилинганларга асосланган ҳолда хулоса қилиш мумкинки, папаин ферменти имобилизацияланган марляли боғлов материали каламушлар терисида тажриба яраларида яққол ярага қарши таъсирга эга.

Боғлов материалининг ярага қарши таъсирини чуқурроқ ўрганиш аниқ амалий таъсирга эгадир.

## Умумий хулосалар.

1. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материали таркибидаги папаинни стандартлаш борасида: иммобилизацияланган боғловчи материал таркибидаги папаиннинг молекуляр массаси «Merck» фирмасининг папаин субстанцияси молекуляр массаси билан қиёсий ўрганилди, маҳаллий папаиннинг молекуляр массаси 23000 Д эканлиги ва унинг «Merck» фирмаси папаин намунасини молекуляр массаси билан мослиги аниқланди.

2. Иммобилизацияланган боғловчи материал таркибидаги папаин субстанциясининг аминокислоталар таркибини ўрганилди ва Ўзбекистон шароитида ўстирилган қовун дарахти сутли ширасидан олинган папаин субстанциясининг аминокислоталар таркиби, чет эл фирмаларида ишлаб чиқариладиган папаин аминокислоталар таркибига мос келишини аниқланди.

3. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материаллини тайёрланди.

4. Фаоллаштирилган боғлов материалларига папаин ферментини иммобилизациялаш учун иммобилизацияловчи восита сифатида стерилланган марли ва вискоза асосида олинган целлофандан фойдаланилди.

5. Фаоллашган бинт ва целлофанга папаин ферментини кимёвий боғ орқали бириктириш реакцияси ўрганилди.

6. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материаллини физикавий ва кимёвий хоссаларини ўрганилди.

7. Протеолитик фаолликни Ансон методи бўйича аниқлаш усулини иммобилизацияланган боғловчи материал таркибидаги папаин миқдорини аниқланди.

8. Папаин ферменти сақловчи иммобилизацияланган боғлов материалли токсиклигини, микробиологик тозаллигини ва фармакологик фаоллигини ўрганиб чиқилди. Папаиннинг янги дори шаклини ярага қарши таъсирини ўрганилди ва ижобий натижалар олинди. С. 148

2. Азизов И.А., Рахмонов М.Р., Кандалов С.С., Мукалов Н.А. Антибиотиклар маълумоти папаини яратуварида ва Узбекистанда қилиб ва фарғалик. 2000. №3 (4). С. 51-53

3. Александров Я.Г. Дельное дерево. Флора. 1949. №10. С. 66-67.

4. Ал-Базоров Б.Ш., Музаф Е.Г., Ташев Н.Т. Лечение воспалительного спондилолистеза гемоторакса папаином. Грудная хирургия. 1983. №2. С. 32-33.

5. Андрусь Г.К., Удал В.М., Покотамбетова Б.А. Влияние папаина на рост рожков микробов и его чувствительность к антибиотикам. //Здравоохранение Казахстана - 1985 №11. С. 65-67.

6. Балаба Т.Я., Улъян А.И., Муродов И.Н. и др. Биохимические механизмы действия папаина на соединительную ткань хрящозастывающей массы при остеоартрозе. // Ортопедия, травматология и протезирование. 1980. №10. С. 8-10.

7. Боскена Э.А. О применении десмолизинного папаина при лечении протрузии межпозвоночных дисков и позвоночной грыжи. // Ортопедия, травматология и протезирование. Пунктирное лечение. Д. 1973. С. 19-20.

8. Березинский Д.В. Ферменты дубового и их ингибиторы в традиционной медицине. // Вестник АМН. 1971. С. 69-70.

9. Ветрыцкий Т. Влияние папаина на поясничном остеохондрозе внутримышечным введением папаина. // Автореф. дис. мед. наук - М., 1973. С. 16.

### Адабиётлар рўйхати.

1. Абуладзе Г.В. Влияние суммы протеолитических ферментов террилитина, лекозима, стрептозы на здоровье и некротические ткани. //Матер. Респ. науч конф. по энзимологии.- Тбилиси, 1981. С. 149.
2. Азизов И.К., Рахимов М.Р, Камилова С.С, Мусаева Н.А. Фитохимическое изучение папайи произрастающей в Узбекистане. //Кимё ва фармация. 2000. №3 (4). С. 51-53
3. Александров А.Г. Дынное дерево. //Природа. 1949. №10. С. 66-67
4. Альбазаров Б.Ш., Мухин Е.Г.,Ткачев Н.Т. Лечение послеоперационного свернувшегося гемоторакса папаином. //Грудная хирургия. 1983. №2. С. 32-33.
5. Андрунь П.К., Удод В.М., Исмагамбетова Б.А. Влияние папаина на рост раневой микрофлоры и её чувствительность к антибиотикам. //Здравоохранение Казахстана. – 1985. №11. С. 66-67.
6. Балаба Т.Я., Казьмин А.И., Фурцева Л.Н. и др. Биохимические механизмы действия папаина на соединительную ткань межпозвоночных дисков при остеохондрозе. // Ортопедия, травматология и протезирование. 1980. №10. С. 6-10.
7. Бородина Л.А. О применении дископункционного лечения папаином при ранних проявлениях остеохондроза с профилактической и лечебной целью. // Остеохондроз позвоночника. Пункционное лечение. Л., 1975. С. 66-69.
8. Веремеенко К.Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике.- Киев: Здоровье. 1971. С. 65-70.
9. Ветрилэ С.Т. Лечение больных с поясничным остеохондрозом внутридискковым введением папаина.// Автореф. дис. мед. наук - М., 1973. С. 16.

10. Волков Е.Б., Леонтьева Ф.С. Применение папаина в лечении остеохондроза позвоночника. // Матер. Респуб. конф. травматологов-ортопедов Литвы совместно с травматологами-ортопедами Латвии.-Клайпеда. 1977. С. 95-98.
11. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологические активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: Наука. 1990. С. 336.
12. Голобородко О.П. Определение активности папаина. //Украинский биохимический журнал. – Украина: Наукова думка. 1986, Т. 58. №3. С. 61 – 64.
13. Государственная фармакопея СССР XI. В 2-х т.-М.: Тиббиёт, 1987. Т.1. С. 333; Т.2. С. 397.
14. Гринкевич Н.М., Софронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. / М.: Высш. школа, 1983. С. 89-90, 101-102, 117-118.
15. Гришин Н.Г. Применение папаина (лекозима) при оперативном лечении контрактуры Дюпюитрена. // Актуальные вопросы травматологии и ортопедии. – М., 1980. Вып. 21. С.78-80.
16. Даминов Т.А, Чирко В.Ю, Захимов М.Р, Чирко Ю.Г. Протеолитические ферменты растительной природы. // Метод. рекомендации для студентов медицинских вузов. -Ташкент, 1998. С. 25.
17. Диксон Малкольм, Уэбб Эдвин. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т.1. С. 120-125.
18. Заславский Е.С., Гутман Е.Г. Лечение плече-лопаточного периартрита и эпикондилитов плеча протеолитическим ферментом папаина. // Ортопедия, травматология, протезирование. 1975. №1. С. 68-70.
19. Имнадзе Е.Д., Абуладзе Г.В. Применение суммы протеолитических ферментов дынного дерева для лечения ожоговой

болезни в эксперименте. //Биологически активные вещества флоры Грузии. -Тбилиси, 1987. С. 178-190.

20. Калинин В.В. Местная и общая реакция организма при пункционном лечении поясничного остеохондроза протеолитическим ферментом – папаином //Матер. конф. молодых нейрохирургов. -Минск, 1967. С. 285.

21. Калинин В.В. Дископункционное лечение поясничного остеохондроза протеолитическим ферментом – папаином.: Автореф. дис. канд. мед. наук.-М., 1969. С. 32.

22. Казьмин А.И., Балаба Т.Я., Фурцева Л.Н., Ветриле С.Т. Биохимические эффекты действия папаина на соединительную ткань при подкожном его введении в сочетании с гальванизацией и больных остеохондрозом позвоночника.// Сб. тр. ЦИТО. М. 1983. Вып. 26. С. 77-81.

23. Казьмин А.И., Ветрилэ С.Т. Лечение поясничного остеохондроза внутрискосвым введением папаина. //Ортопедия, травматология и протезирование. 1973.№8. С. 7 – 13.

24. Карлов С.Т., Иванов Л.И. Применение папаина при лечении некротических и ожоговых ран. //Воен. – мед. ж. 1979. №9. С. 24 –25.

25. Касымова Т.Д., Юлдашев Х.П. Протеолитические ферменты дынного дерева в медицине.//Кимё ва фармация. 1993. №4. С. 27 – 29.

26. Киселев Г.А., Ковалева Т.В. Применение папаина в микрохирургии глаукомы. //Казан. мед. журн. 1978. №1. С. 32-34.

27. Левин М.И. Транспортная иммобилизация. – М.: Медгиз. 1957. С. 6 – 8.

28. Махсумов А.Г., Чирко Ю.Г., Дубова Н.А., Чагай А.А., Чирко М.Ю. Физико–химические и биологические свойства папаина из дынного дерева (*Carica papaya*) выращенного в Узбекистане. //Кимё ва фармация. 1993. №6. С. 9 – 10.

29. Межлумян Л.Г., Касымова Т.Д., Юлдашев П.Х. Протеиназы из млечного сока *Carica papaya*. //Химия природных соединений. 2003. №3. С. 171 – 174.
30. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты- М.: Наука, 1971. С. 207-230.
31. Мосс Д. Ферменты.- М.: Мир. 1970. С. 210-214
32. Муравьёва Д.А., Гаммерман А.Р. Тропические и субтропические лекарственные растения.- М.: Тиббиёт, 1974. С. 221-223.
33. Муравьёва Д.А. Фармакогнозия.- 3-е изд., перераб. и доп.-М.: Тиббиёт, 1991. С. 560
34. Мусаева Н.О., Азизов И.К., Раҳимов М.Р., Комилова С.С. Фитохимическое изучение папайи, произрастающей в Узбекистане. //Кимё ва фармация. 2000. №3 (4). С. 51 – 52.
35. Мусаева Н.О., Раҳимов М.Р., Азизов И.К. Сравнительное изучение молекулярной массы и ферментативной активности отечественного папаина. //Кимё ва фармация. 2001. №3. С. 8 – 19.
36. Наджимутдинов Ш., Сарымсаков А., Усманов Х.У. Исследования некоторых закономерностей синтеза диальдегидов целлюлозы и ее простых эфиров. //Cellulose Chem. Technol., 16. 1981, С. 613-628.
37. Наджимутдинов Ш., Сарымсаков А., Усманов Х.У.. Химическая структура и реакции диальдегидцеллюлозы. //Cellulose Chem. Technol., 9. 1975, С. 617-639.
38. Применение протеолитических энзимов растения *CARICA PAPAYA* (лекозим, лекопаин) в широкой медицинской практике // Сб. докл. симп.-М., 1978.-350 С
39. Прокопенко Л.Г., Сипливая Л.Е. Экстракорпоральный иммуносупрессорный эффект папаина. // Антибиотики и химиотерапия.- 1992-№3. С. 31-34.

40. Рахимов М.Р. Некоторые свойства папаина из дынного дерева (*Carica papaya*) выращенного в Узбекистане. //Кимё ва фармация. 1996. №6. С. 14 – 17.

41. Раҳимов М.Р., Отахўжаев М.А., Чирко М.Г., Маҳсумов А.Г., Чирко М.Ю. Қовун дарахти (*Carica papaya*) дан папаин олиш ва унинг баъзи хоссалари. //Кимё ва фармация. 1996. №1. С. 31 – 32.

42. Раҳимов М.Р., Азизов И.К., Мусаева Н.О. Папаин асосида янги дори шакллари яратиш борасида изланишлар. //Кимё ва фармация. 1997. №5 (6). Б. 53 – 55.

43. Рахимов М.Р. Влияние цитохрома С папаина на активность карбоангидрозы и структуру митохондрий печени при сальмонеллёзе // Матер. 4-го съезда терапевтов Узбекистана. Ташкент,–1995. С.-162.

44. Рахимов М.Р. Чирко Ю.Г. Клеточный энергетический заряд печени крыс после введения этанола и папаина» // Хронические заболевания печени от вирусных гепатитов до циррозов печени с портальной гипертензией: Матер респ. конф.-Ташкент,–1996.–С. 99-100.

45. Рахимов М.Р. Влияние экстракта дынного дерева (*Carica papaya*), выращенного в Узбекистане, на содержание свободных аминокислот в тканях животных с сальмонеллёзным энтерokolитом // Тез. Респ. науч. конф. с межд. участием «Новые аспекты диагностики, лечения и профилактики заболеваний органов пищеварения».-Ташкент, 1996 С. 77.

46. Рахимов М.Р. О фармакотерапевтических свойствах протеолитического фермента папаина-растения папая, культивированного в Узбекистане // Кимё ва фармация.-2000.-№ 3-4.–С. 144-116.

47. Рахимов М.Р. Фармакологическое исследование папаина растения папая культивированного в Узбекистане // Эксперим. и клинич. фармакология – 2000.-№ 3.- С. 55-57.

48. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России-М: «АстроФармСервиз». 1996. С. 1296.
49. Старков Г.Л. Электрофорез папаином в клинике глазных болезней // Офтальмологический журн.-1975.-№6. С. 450-453.
50. Старков Г.Л. Опыт папаинотерапии при болезнях глаз. // Проблемы офтальмологии (Матер. науч. конф. посв. 100-летию со дня рождения Филатова)-Киев, 1976. С.255.
51. Старков Г.Л., Осна А.И., Россинский В.И., Савиных В.И., Андрейчук В.И., Заславский Е.С. Папаин как лечебный фермент в медицине. //Ж. Клиническая Тиббиёт. – М., Тиббиёт. 1978. №8. С. 119 – 121.
52. Старков Г.Л., Россинский В.И., Андрейчук В.И., Савинюк В.И. Лечение глазных болезней отечественным папаином. // Офтальмологический журн. 1977.-№8. С. 600-603.
53. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Диальдегидцеллюлоза высокой степени окисления. //Химия растительного сырья. 1999. №2. С. 91-102
54. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Химические превращения азотсодержащих производных. //Химия растительного сырья. 1999. №2. С. 55-61
55. Сюткин В.Н., Николаев А.Г., Сажин С.А., Попов В.М., Заморянский А.А. Диальдегидцеллюлозы. //Химия растительного сырья. 2000. 1. С. 27-35.
56. Удод В.Д. Ферментативная терапия папаином маложаживающих и гнойных ран. // Актуальные вопросы травматологии и ортопедии.- М 1977.-Вып. 16. С. 78-80.
57. Удод В.М. Отверченко Г.Н. Россинский В.И. Применение отечественного папаина при лечении термических ожогов // Здравохранение Казахстана.-1978.-№9. С. 67-69.

58. Удод В.М., Сторожук Г.И., Трофименко С.П., Шабаш Ч.Г. Экспериментально-клиническое обоснование применения папаина в гнойной хирургии. // Вестн. хирургии им. Грекова.-1984.-№6. С. 48-51.
59. Хужаев В.У., Арипова С.Ф. Псевдокарпаин из *Carica papaya*. //Химия природных соединений. 2000. №4. С. 342.
60. Чуешова В.И. Промышленная технология лекарств. В 2-х т. Харьков: НФАУ МТК. 2002. С. 259 – 299.
61. Azizov I.K., Rahimov M.R, Musaeva N.O. Quality control and stanardization of papain substanse Asta Pharmaceutica turcica Formely "Eczacilik Bulteni" vol/ XLII Supp/ 2000 Iporsip-2000 // The second international postgraduate research symposium on pharmaceutics with the participation of undergraduates by Istanbul university Faculty of pharmacy September 6-8/. –2000. – P. 56
62. Azizov I.K., Rahimov, M.R. Tillaeva C.U., Komilova S.S, Musaeva N.O. Study of seeds of papaya cultivated in Uzbekistan10<sup>th</sup> International Pharmaceutical Technologi Simposium (IPTS – 2000)- Istanbul-Turkey, 2000.- P. 167-168
63. Rachimov M.R. «Charakterization of Papain isalated in Uzbekistan Recent progress pharmaceutical, cosmetic and food excihitnts» //19<sup>th</sup> international pharmaceutical texnology symposium, Ankara, 1987. - P. 153-155.
64. Rachimov M.R. «Morphofunctional, Toxiconygenic Characteristics of carica papaya's extract grown in Uzbekistan. //2<sup>nd</sup> international Symposiom on thechemistry of natural» Compounds (SCNC) Eskisehir Turkey. 1996 –P 158
65. Rachimov M.R, Musaeva N.O. Ferments of *Carica papaya* Book of abstracts of international conference. // Medicinal raw material and phytopreparations for medicine and agriculture- (September 29-october 1 1999).- Karaganda,1999.- P. 142

66. Временная Фармакопейная статья ВФС 42 Уз-0325-2000,
67. Временная Фармакопейная статья ВФС 42 Уз-0324-2000,
68. The United States pharmacopeia. «Papain». U.S.P. 23 № F. 18 1995. – P. 1154.
69. [http://www.trondo.ru/Fruktovyie – I plodovyye – rasteniya/papaya – 3.html](http://www.trondo.ru/Fruktovyie%20I%20plodovyye%20rasteniya/papaya%203.html)
70. [http://exoticfruit.ru/papaiya – carica – papaya.html](http://exoticfruit.ru/papaiya%20carica%20papaya.html)
71. [http://toptropicals.com/cgi – bin/garden – catalog/cat.cgi uid=CARICA PAPAYA 8 dang=ru](http://toptropicals.com/cgi-bin/garden-catalog/cat.cgi?uid=CARICA_PAPAYA_8_dang=ru)
72. <http://www.landplants.ru/encikloped/5494/>
73. [http://www.biotechnolog.ru/prombt10\\_1.htm](http://www.biotechnolog.ru/prombt10_1.htm)
74. <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/1663.html>