

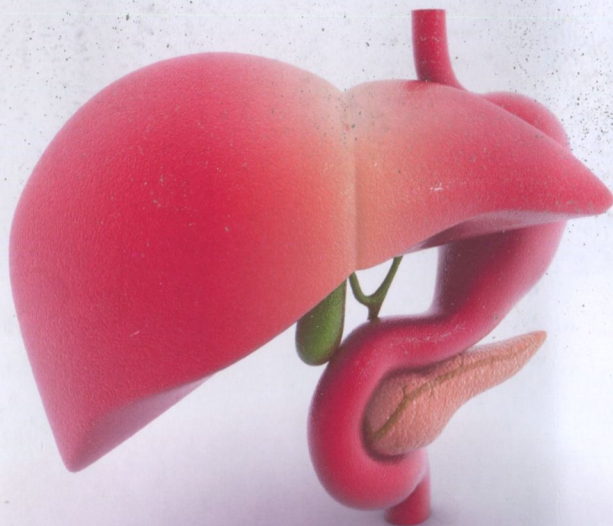


ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЪЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ

Т. В. ган.

ЯНГИ ФАРМАКОЛОГИК ФАОЛ
БИРИКМАЛАРНИ ГЕПАТО-БИЛИАР
ТИЗИМ ФАОЛИЯТИГА ТАЪСИРИНИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛ ЎРГАНИШ УСУЛЛАРИ

УСЛУБИЙ ҚўЛЛАНМА

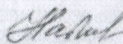


Тошкент 2017



ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ
ОЛИЙ ТАЪЛИМ МУАССАСАЛАРАРО ИЛМИЙ ТЕКШИРИШ
ЛАБОРАТОРИЯСИ

«КЕЛИШИЛГАН»
Илм ва инновацион ривожланиш
бўлими бошлиғи

 Т.А. Набиев
« 13 » 09 2017 й.



«ТАСДИҚЛАЙМАН»
Тиббий таълим бош
қўшма бўлими бошлиғи

Ў.С. Исмаилов
« 19 » 09 2017 й.

ЯНГИ ФАРМАКОЛОГИК ФАОЛ БИРИКМАЛАРНИ ГЕПАТО-
БИЛИАР ТЎЗИМ ФАОЛИЯТИГА ТАЪСИРИНИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛ ЎРГАНИШ УСУЛЛАРИ

(услубий қўллама)

«Тасдиқланди»		
ЎзР Соғлиқни сақлаш вазирлиги илмий фаолиятини мувофикаштириш Бўлими		
19. 09	2017 й.	
8.К-К	121	

Тошкент – 2017

Асосий тузувчи-муассаса: Тошкент Тиббиёт Академияси, Олий таълим муассасалариаро илмий текшириш лабораторияси(ОТМИТЛ).

Тузувчилар:

Мавланов Шухратжон Равшан ўғли - ОТМИТЛ кичик илмий ходими.

Хакимов Зиёвиддин Зайнутдинович - т.ф.д., Фамакология кафедраси профессори.

Рахманов Алишер Худайбердиевич - т.ф.д., катта илмий ходими, ОТМИТЛ фармакология ва токсикология бўлим бошлиғи.

Такризчилар:

Туляганов Р.Т. - б.ф.д., Тошкент Фармацевтика институти фармация кафедраси доценти.

Аминов С.Д. - т.ф.д., доцент, Тошкент педиатрия тиббиёт институти фармакология ва нормал физиология кафедраси мудир.

Фармакология мутахассислиги бўйича кафедра ва лаборатория илмий ҳодимлари ҳамда тиббиёт, фармацевтика ва биология йўналишлари бўйича олий ўқув юрти талабалари ва магистрларига мўлжалланган.

МУНДАРИЖА

Кириш	5
1.Экспериментал тадқиқотлар ўтказиш тартиби	7
1.1.Гепатопротекторлик хоссаси борлиги тахмин қилинган бирикмаларни ажратиш (скрининг).....	7
1.2.Ўткир токсик гепатит моделини ҳосил қилиш.....	8
1.3.Гепатопротекторлик хоссаси мавжудлигини исботловчи юқори информацион тестлар.....	9
1.3.1.Синалаётган янги бирикмаларни сафро ажратилишига таъсирини аниқлаш.....	9
1.3.2. Синалаётган янги бирикмаларни гексенал синамаси таъсирини аниқлаш.....	10
1.3.3. Синалаётган янги бирикмаларни жигардаги гликоген миқдорига таъсирини аниқлаш.....	10
1.3.4. Синалаётган янги бирикмаларни жигар тўқимасидаги сут кислотаси миқдорига таъсирини аниқлаш.....	12
1.3.5. Синалаётган янги бирикмаларни жониворлар қон зардобида аланинаминотрансфераза ва аспаратаминотрансфераза ферментлари фаоллигига таъсирини аниқлаш.....	13
1.3.6. Синалаётган янги бирикмаларни жигарни ёғли дистрофия даражасига таъсирини аниқлаш.....	16
1.4. Ажратиб олинган гепатоцитларда ўтказиладиган тажрибалар.....	17
2. Саралаш босқичида танлаб олинган бирикмаларни гепатопротекторлик хоссаларини кенг қўламда ўрганиш ва уларни таъсир механизмларини аниқлаш	18
2.1. Жигарни ўткир патологияларини лаборатория жониворларида шакллантириш (моделлаштириш).....	18
2.2.Синалаётган янги бирикмаларни жигарнинг экскретор функциясига таъсирини баҳолаш.....	20
2.3. Сафро таркибидаги умумий ўт кислоталари ва холестерин миқдорини аниқлаш усули.....	21
2.4. Гепатоцитларни ютувчанлик ва ажратилувчанлик фаолиятини кардиограмм тести ёрдамида аниқлаш.....	22
2.5. Жигарни дориларни парчалаш (биотрансформация) қобилиятини ўрганиш усули.....	25
2.6. Уридин-дифосфат-глюкуронилтрансфераза фаоллигини аниқлаш усули....	28
2.7. Сафро таркибини текшириш усуллари	29

2.7.1. Сафро таркибидаги дегидроокси ва тригидрокси холан кислоталарини фотометрик аниқлаш усули.....	29
2.7.2. Сафро таркибидаги тригидрооксихолон кислотаси миқдорини аниқлаш усули.....	30
2.7.3. Сафро таркибида билирубин миқдорини аниқлаш усули.....	30
2.7.4. Биологик суюқликларда бирламчи ва иккиламчи ўт кислоталари фракцияларини миқдорини хроматография усулларида ўрганиш.....	32
2.7.5. Юқори самарадор суюқлик хроматографияси усулида сафро кислоталарини аниқлаш.....	32
2.8. Жигар фаолиятига баҳо бериш учун қўлланиладиган қон зардобини биокимёвий текшириш услублари.....	34
2.8.1. Қон зардобидидаги билирубин миқдорини аниқлаш усули.....	34
2.8.2. Қон зардобидидаги умумий оқсилни аниқлаш усули.....	35
2.8.3. Қон зардобидидаги ишқорий фосфатаза фаоллигини аниқлаш усули.....	37
2.8.4. Қон зардобидида умумий холестеринни аниқлаш усули	38
2.8.5. Қон зардобидидаги зичлиги паст липопротеидлар миқдорини аниқлашнинг бевосита усули.....	40
2.8.6. Қон зардобидидаги зичлиги юқори липопротеидлар миқдорини аниқлашнинг бевосита усули.....	43
2.8.7. Қонда сут кислотаси миқдорини аниқлаш усули.....	48
2.9. Синалаётган янги бирикмаларни ёғларни перикисли оксидланиш жараёнига таъсирини ўрганиш усули.....	48
2.9.1. Қон зардобидида гидроперикислар миқдорини аниқлаш усули.....	49
2.9.2. Ёғларни перикисли оксидланиш маҳсулотларини тиобарбитур кислотаси воситасида аниқлаш усули.....	50
2.9.3. Супероксиддисмутаза ферменти фаоллигини аниқлаш усули.....	51
2.9.4. Каталлаза ферменти фаоллигини аниқлаш усули.....	53
2.9.5. Глютатионпероксидаза фаоллигини аниқлаш усули.....	54
2.9.6. Глютатионредуктаза фаоллигини аниқлаш усули.....	56
2.9.7. Қайтарилган глютатионни аниқлаш усули	57
2.9.8. Оксидланган глютатионни аниқлаш усули.....	58
3. Ажратилган гепатоцитлар	59
3.1. Гепатоцитларни ажратиш усули.....	59
3.2. Гепатоцитларни плазматик мембраналарини ҳолатини аниқлаш усули.....	60
Хулоса.....	61
Адабиётлар	62

КИРИШ

Жигар хасталиклари, уларни даволаш ва олдини олиш учун яратилган самарадор дори воситаларини кенг қўлланилишига қарамай ҳозирги кунда кенг тарқалган хасталиклардан ҳисобланади. Гепатобилиар тизим хасталиклари ичида ўткир ва сурункали вирусли гепатитлар, жигарни захарлар, дорилар ва алкоголь билан жароҳатланиши, ҳамда алкоголь билан боғлиқ бўлмаган стеатогепатози энг кўп учрашиши қайд этилган [1-4].

Жаҳон соғлиқни сақлаш ташкилоти маълумотига кўра 2004 йилда фақат вирусли гепатит В дан вафот этган инсонлар сони 1 млн дан ортиқ бўлган. 2012 йилда эса вирусли гепатит В дан ва уни асоратларидан вафот этганлар сони 600 мингдан ортиқ бўлган. Ушбу вирусни юктирган беморлар сони 2 млрд га яқиндир. Шубҳасиз ўлим сони камайиши кўп жиҳатдан фармакология фанини ютуқлари билан бир қаторда, самарадор вакциналарни қўллаш ва тиббиёт анжомларини стерилизациялашга бўлган талабни амалий жиҳатдан бажарилишини таъминлаш билан боғлиқдир. Шу билан бир қаторда, ЖССТнинг маълумотларига кўра вирусли гепатит С ташхиси қўйилган беморлар сони дунёда 150 млн ни ташкил этади ва яна 3-4 млн инсон йилига ушбу хасталик вирусини ўзига юктиради. Ачинарли томони шундаки вирусли гепатит С нинг асоратлари билан ўлим йилига 350 мингдан ортиқни ташкил этади (жигар циррози, жигар саратони).

Вирусли гепатитларни даволаш самарадорлиги ҳозирги кун талабига жавоб бермайди, чунки вирусларга қарши препаратларни таннархи юкори, колаверса уларни қўллаш, кучли ва кўп ривожланадиган нохуш таъсиротларини инобатга олганда, хавфсиз деб ҳисобланмайди. Шундан келиб чиққан ҳолда, гепатобилиар тизим хасталикларини даволашда кўп жиҳатдан гепатопротекторларни қўллашга талаб ортиб бормоқда.

Гепатопротекторлар деб турли фармакологик дори гуруҳларига мансуб бўлган, жигар хужайралари мембраналарини емирилишдан сакловчи ва гепатоцитларнинг регенерациясини рағбатлантирувчи препаратларга айтилади. Ушбу гуруҳ препаратлари шифокорлар томонидан анчагина кўп ва тез-тез

қўлланилади [5-7]. Ҳозирги кунда қўлланиладиган гепатопротекторларнинг таснифи уларни барчасини қамраб ололмайди, чунки жигар хасталикларини келиб чиқиш сабаблари (этиопатогенези) турличадир. Уларнинг кўпчиликларида сафро хосил бўлиши ва уни ажралишини кучайтиришга нисбатан гепатопротекторлик хоссалари устун туради. Аммо мамлакатимизда қўлланилаётган гепатопротекторларнинг аксарият қисми хорижий давлатлардан келтирилади, таннархи юқори бўлганидан маҳаллий доривор хом-ашёларидан гепатопротекторларни яратиш ва уларни тиббиёт амалиётига татбиқ этиш учун жигарни серкиррали фаолиятини ўрганиш зарурияти туғилади. Янги дори воситаларини яратишни уларсиз тасаввур этиб бўлмайди. Ушбу услубий қўлланма айнан жигарни турли хил хасталикларида ривожланадиган метаболик, функционал бузилишларни ўрганишда қўлланиладиган услулларни кенг ва мукамал ёритишга бағишланган. Гепатопротектор хоссасига эга бўлган дори воситалари жигарни метаболик даволаш воситалари ҳисобланади. Уларнинг фармакологик таъсири антиоксидантлик хоссаси ёки гепатоцитларни эндоген антиоксидант тизимини кучайтириш, ҳамда фосфолипаза фаоллигини сусайтириш ҳисобига, захарлилиги юқори бўлган лизофосфотитларни камайтириш ва мембраналар фосфолипидларини физиологик таркибини тиклаш, кальций ионлар миқдорини мувофиқлаштириш, туфайли цитолеммаларни, шу жумладан, митохондрия, цитоплазматик ретикулум ва лизосомалар мембраналарининг барьер функциясини меъёрга келтиришга асосланган. Ана шундай таъсир туфайли гепатопротекторлар оксил, ёғлар, углеводлар, биоэнергетика алмашинувини, жигарнинг захарларни парчалаш, экскретор, холеретик ва бошқа функцияларини тиклайди, гиперферментемияни сусайтиради, регенерация жараёнини рағбатлантиради.

Гепатопротекторларни соғлом жигарга таъсири бўлмаганлиги сабабидан уларни яратиш экспериментал жониворларда ўткир ва сурункали гепатит, ҳамда мойли гепатоз моделларидан фойдаланишни тақозо қилади. Гепатопротекторлик хоссасига эга эканлиги тахмин қилинган воситаларни

турли хил гепатотоксинлар билан жароҳатланган гепатоцитларнинг ўзида ёки уни органоидларида ўрганиш ёрқин келажакка эга, чунки гепатотоксинлар жигарнинг тузилиши, функцияси ва метаболизмини бузади.

Гепатопротекторларни клиникагача бўлган тадқиқотларда баҳолаш учта босқични ўз ичига олади:

1. Бирикмаларни бириктириш саралаш (скрининг).
2. Биринчи босқичда ажратиб олинган бирикмаларнинг гепатопротекторлик фаоллиги ва уларни таъсир механизмини кенг миқёсда ўрганиш.
3. Янги дори воситаларини клиникагача бўлган захарлилигини (умумий захарлик, канцероген, мутаген, иммунотоксик, гонадотоксик, эмбриотоксик ва ҳақозо) ўрганиш. Бу босқичда уларни терапевтик таъсир кенглиги ва самарадор дозаларни аниқлашга катта эътибор бериш лозим.

1. Экспериментал тадқиқотлар ўтказиш тартиби.

1.1. Гепатопротекторлик хоссаси борлиги тахмин қилинган бирикмаларни ажратиш (скрининг).

Гепатопротектор бўлиши мумкин бўлган бирикмаларни ушбу скрининг босқичида ажратиб олишнинг асосий мезони бўлиб уларни эталон воситаларига нисбатан юқори самарадорликка эга эканлиги ҳисобланади. Бу босқичда моддаларни ўткир захарлилигини аниқлаш зарур, чунки фақат кам захар ёки захарсиз бўлган моддаларни истиқболи юқоридир. Эталон воситаларни танлашда янги гепатопротекторларнинг олиниш манбаълари, кимёвий тузилиши ва тахминий таъсир механизмга эътибор берилади. Жумладан, ўсимликлардан олинаётган гепатопротекторлар силибор, легалон, ЛИВ-52 ва бошқалар билан солиштириб ўрганилади. Фосфолипид препаратлари эса Эссенциале билан, метаболик жараёнларнинг рағбатлантирувчилар - аденометионин билан солиштириб ўрганилади. Каламуш ва сичқонларда экспериментал тадқиқот ўтказиш жараёнида препаратларни энтерал қўллашда самарадор дозалари қуйдагилардан иборат: силибор – 40 мг/кг, лигалон- 100

мг/кг, ЛИВ-52 - 100 мг/кг, Эссенциале –150 мг/кг, аденометионин – 300 мг/кг [10-14].

Гепатопротекторлар сифатида қўлланилиши мумкин бўлган бирикмаларни ҳар бир услубда 3-5 дозада текшириш лозим. Бунда битта доза эталон препарат дозасига мос бўлиши керак. Гепатопротекторлик хоссаси кенг миқёсда текшириш ўтказилаётганида бирикманинг энг самарадор дозасидан фойдалинилади. Аксарият гепатопротекторлар клиник шароитда энтерал қўлланилганлиги сабабидан экспериментал тадқиқотларда синалаётган янги бирикмалар зонд воситаси билан жониворларни меъдасига киритилади. Янги гепатопротектор бирикмаларни саралаш (скрининг) майда тажриба жониворларида, ўткир гепатит модели яратилиб, бир қанча тестларнинг натижалари асосида амалга оширилади.

1.2. Ўткир токсик гепатит моделини ҳосил қилиш

Зотли ва зотсиз сичқон ва каламушларда ўткир токсик гепатит моделини тетрахлорметан, гелиотрин, ёки D-галактозаминни киритиш билан яратилади. Тетрахлорметаннинг 50% ёғли эритмаси ҳайвонлар меъдасига 4-5 мл/кг дозада бир марта ёки 1-1,25 мл/кг дозада 4-6 кун киритилади. Тери остига ушбу гепатотоксинни 4 кун давомида кунига бир мартадан 2,5 мл/кг ҳисобида юборилади. D-галактозаминни сувли эритмаларини корин бўшлиғига 1-3 кун давомида 300-1000 мг/кг дозада юборилади. Гепатопротекторлик хоссасига эга бўлиши тахмин қилинган моддаларни гепатотоксин киритилишидан бир соат олдин киритилади. Назорат гуруҳидаги жониворларга гепатопротекторлар эритилган суюқликни мос ҳажми киритилади (ўсимлик ёғи, сув, 1% крахмал шиллиғи).

Тетрахлорметан таъсирида ривожланган ўткир гепатит асосан жигар бўлакчаларининг марказий худудидаги гепатоцитларда ёғ ва оқсил дистрофияси ҳамда калликвацион некрозни ривожланиши билан ифодаланади, чунки у ерда цитохром P-450 га боғлиқ бўлган фермент тизимининг фаоллиги юқори бўлиб, гепатотоксиннинг жароҳатловчи метаболитларини ҳосил бўлиш

даражаси юқори бўлади. D-галактозамин РНК ва оксил синтезини бузиб, ўткир гепатит ривожлантиради ва у жигардаги морфологик ва биокимёвий ўзгаришлар даражаси бўйича инсонларда ривожланадиган вирусли гепатитга мос келади. Бу аснода, гелиотрин алколоиди таъсирида ривожланган ўткир гепатит янада муҳимроқ. Гелиотрин билан ўткир гепатит моделини яратиш учун ушбу алколоидни сувли эритмаси каламушларнинг териси остига 250-400 мг/кг миқдорида киритилиши лозим. Ушбу гепатитда оксил синтезини кескин сусайиши, жигар тўқимасида микроциркуляция жараёнини кучли бузилиши, ҳамда митохондрияларда кечадиган оксидланиш ва фосфорланиш жараёнларини бир – бирдан ажралиши туфайли юзага келади. Фармакологик, биокимёвий, морфологик текширувлар гепатопротекторлик хоссаси мавжудлиги тахмин қилинган моддаларни охириги марта киритилгандан сўнг 1 кун ўтгач ўтказилади.

1.3. Гепатопротекторлик хоссаси мавжудлигини исботловчи юқори информацион тестлар

1.3.1. Синалаётган янги бирикмаларни сафро ажратилишига таъсирини аниқлаш.

Тажрибада иккала жинсдаги, вазни 18-24 г бўлган сичконлардан фойдаланилади. Тажрибадан бир кун олдин ҳайвонларга сув ичиши эркин бўлган ҳолда овкат берилмайди. Ҳайвонларни декапитациясидан 30, 60, 90, 120 ва 180 дақиқа аввал текширилаётган модда ҳар бир кузатилаётган текшириш даврига мос равишда 3-4 дозадан ҳар бир гуруҳда 8-10 тадан сичконга юборилади. Қорин бўшлиғи очилади, жигар ажратилади ва сафро қопчасидан дистал ва проксимал ўт йўллари боғланиб кесиб олинад ва торсион торозида вазни ўлчанади. Сафро қопчасидаги сафро биокимёвий текширув учун ҳар бир гуруҳ учун алоҳида пробиркаларга йиғилади. Сафро қопчаси дистилланган сувда ювилиб фильтр қоғозидан куриштилади ва яна тарозида тортилади. Сафро қопчаси бўшатилишидан олдинги ва кейинги вазн фарқига кўра ажратилган сафро миқдори аниқланади. Ўрганилаётган модданинг фармакологик фаоллиги

эталон препарат билан солиштирилади. Агар модданинг фармакологик фаоллиги эталон препарат фаоллигидан устун бўлса, унинг таъсири чуқурроқ ўрганилади.

1.3.2. Синалаётган янги бирикмаларни гексенал синамаси натижаларига таъсирини аниқлаш.

Сичқонларда ва каламушларда (наркоз) уйқу давомийлигига асосланиб гексенални гепатоцитларда монооксигеназа фермент тизими орқали парчаланиш тезлигини кўрсатади. Бу жигарнинг жуда муҳим функцияси – захарларни парчалаш (антитоксик) хоссасини ифодалайди. Ушбу синамани ўтказиш учун гексенални қўллашдан айнан олдин тайёрланган 1% ли сувли эритмаси жониворларнинг (каламушларга-100 мг/кг, сичқонларга 80 мг/кг) қорин бўшлиғига киритилгач, уларни ёнбошларида ётишлари ҳамда ўринларидан туриш рефлексини тикланишигача бўлган вақт давомийлиги аниқланади. Гексенал ўрнига этаминал натрийни (каламушларда 40 мг/кг, сичқонларда 30 - мг/кг) қўллаш мумкин.

Синалаётган янги бирикмаларни жигарнинг нисбий оғирлиги, яъни жигар тўқимаси вазнини (мг) жонивор тана вазнига (грамм) бўлган нисбати, аъзодаги яллиғланиш даражасига нисбат беради.

1.3.3. Синалаётган янги бирикмаларни жигардаги гликоген миқдорига таъсирини аниқлаш.

Жигарда гликоген миқдорини аниқлаш аъзони углевод алмашинуви-даги аҳамиятини кўрсатади. Маълумки, жигардаги углевод захираси – гликоген барча ички аъзолар хужайраларини энергетик таъминотини амалга оширади.

Реактивлар:

1. 96⁰ этил спирти.
2. Калий гидроксиднинг 30% эритмаси.
3. Антрон реактиви. Концентрланган сульфат кислотасида (солиш-тирма оғирлиги 1,74) антроннинг 0,3% ли эритмаси (ушбу реактив бевосита ишлатишдан олдин тайёрланади).
4. Глюкозанинг 5 мг% (0,005%) эритмаси.

Иш тартиби:

Сўйилган ҳайвоннинг жигари тезлик билан тарозида ўлчаниб ундан 400-700 мг оралиғидаги миқдори аниқ ўлчаб олиниб Видал пробиркасидаги 3,0 мл кайнок 30% КОН эритмасига ташланади ва 20 дақиқага қайнаб турган сув хаммомига қўйилади. Тез-тез жадал аралаштириб туриш лозим. Сув хаммомидан олингач, пробиркалар совутилади ва унинг устига 96° ли этил спиртидан қўшилади. Пробирка ичидаги суюқлик кучли даражада аралаштирилади ва сув хаммомида биринчи пуфакчалар ҳосил бўлгунча сақланади. Пробиркалар совутилгач 15 дақиқа мобайнида 2500-3000 айлн/дақиқа центрифугаланади. Сўнгра чўкма устидаги суюқлик тўкилади. Пробиркалар оғзини фильтр қоғози устига айлантриб қўйиб 5-10 дақиқа сақланади. Чўкмаларни текширув учун олинган миқдори мос равишда 100 мл ва ундан кўпроқ миқдордаги дистилланган сувда эритилади. Тайёрланган эритма жадал аралаштирилгандан кейин унинг 1,0 мл миқдори олиниб устига антрон реактивидан 6,0 мл қўшилади ва шиша таёқча воситасида яхшилаб аралаштирилади. Параллел равишда солиштириш учун алоҳида пробиркада глюкозанинг стандарт эритмасининг 1,0 мл га антрон реактивидан 6,0 мл қўшилади. Барча пробиркалар қайнаб турган сув хаммомида 10 дақиқагача сақланади, совутилиб ФЭК да намуналарни оптик зичлиги қизил рангли фильтрда (620 нм тўлқин узунлигида) 10 мм кюветага солиниб ўлчанади. Бунда солиштира эритма сифатида 1,0 мл дистилланган сувга 6,0 мл антрон реактиви қўшилган ва сув хаммомида 10 дақиқа сақланган иккита намуналардан фойдаланилади. Жигар тўкимасидаги гликоген миқдори (ЖТГМ) қуйидаги формула асосида ҳисобланилади:

$$\text{ЖТГМ} = \frac{0,00005 \cdot E_{\text{намуна}} \cdot A \cdot B}{E_{\text{стандарт}} \cdot 1,11} = \Gamma\%$$

Бу ерда, 0,00005 – 1,0 мл стандарт эритмадаги глюкоза миқдори;

A – гликоген чўкмаси эритилган сув миқдори;

Б – 100 г/синамадаги жигар миқдори;

1,11 – глюкоза ва гликоген экстинкцияларини нисбатига мос бўлган коэффициент.

1.3.4. Синалаётган янги бирикмаларни жигар тўқимасидаги сут кислотаси миқдорига таъсирини аниқлаш.

Сут кислотаси анаэроб гликолиз туфайли ҳосил бўлади. Бу жараён жигар хасталикларида турли хил стрессларда кучайиб кетади. Гепатоцитлар сут кислотасидан гликогенни ресинтезини амалга оширади, аммо жароҳатланган жигар ҳужайралари ушбу жараённи амалга ошира олмаганлиги туфайли лактат ацидоз ривожланади. Сут кислотасининг миқдорини қонда ва жигар тўқимасида аниқлаш патологик ҳолатларда нафақат гипоксия, балки жигарни углеводлар алмашинувида тутган ўрнини баҳолашда муҳим аҳамиятни кашф этади.

Реактивлар:

1. 5% УХСК (уч хлор сирка кислотаси);
2. Концентрланган сульфат кислотаси;
3. Мис сульфат реактиви (3,0 мл концентрланган ортофосфат кислотасига 1 гр мис сульфат қўшилади);
4. 5% Натрий хлорид эритмаси;
5. Параоксидифенил (ПОДФ) 1,5 % сувли эритмаси.

Иш тартиби:

5% УХСК эритмасидан 1 мл ни тутган пробиркаларга жониворлар жигар тўқимаси гомогенатидан 0,1 мл куйилиб аралаштирилади ва 1500 об/дақиқа 5 дақиқа давомида центрифугаланади. Чўкма устидаги суюқликдан 0,2 мл олиниб устига 3,0 мл сульфат кислотаси ва 0,1 мл мис сульфатнинг эритмаси қўшилади, пробиркалар қайнаб турган сув хаммомига жойлаштирилади, сўнг совутилиб 2 томчидан ПОДФ қўшилади ва жадал чайкатилиб 10 дақиқага хонада қолдирилади. Сўнг уларни қайнаб турган сув хаммомига 1,5 дақиқага жойлаштирилади. Совутилгач ФЭК №7 нур фильтрида кесими 0,5 мм бўлган

кюветаларда концентрланган сульфат кислотасига солиштирилган ҳолатда уларни оптик зичлиги ўлчанади.

1.3.5. Синалаётган янги бирикмаларни жониворлар қон зардобида аланинаминотрансфераза (АЛАТ) ва аспартатаминотрансфераза (АСАТ) ферментлари фаоллигига таъсирини аниқлаш.

Жониворлар қон зардобида аланинаминотрансфераза (АЛАТ) ва аспартатаминотрансфераза (АСАТ) ферментлари фаоллиги гептоцитлар мембраналарининг ўтказувчанлигини ўрганиш даражасини кўрсатади ва гиперферментемия катталигини белгилайди.

Аспартатаминотрансфераза ферменти (АСАТ) фаоллигини аниқлаш усули.

Реактивлар:

1. Калий дигидрофосфат (K_2HPO_4).
2. Калийгидрофосфат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
3. L-аспарагин кислотаси ёки L-аспарагин кислотасининг натрийли тузи.
4. Фосфат буфер 0,1 моль/л, pH 7,4.
5. Субстрат-буферли эритма 0,25 моль/л L-аспарагин кислотаси 0,1 моль/л фосфат буферда pH 7,4, эритилган.
6. Қайтарилган β -никотинамидадениндинуклеотид, динатрийли тузи, 15 ммоль/л.
7. α -кетоглутарат кислотаси, 0,45 моль/л.
8. Малатдегидрогеназа (L-малат: NAD⁺ оксидоредуктаза).
9. Лактатдегидрогеназа.
10. Натрий гидроксид 5 моль/л; 1 моль/л.
11. Натрия хлорид 154 ммоль/л (физиологик эритма).

Иш тартиби:

Иш бошлашдан аввал 60 : 1 : 1 : 1 нисбатдаги субстрат-буферли эритма, NADH эритмаси, МДГ ва ЛДГ реактивлар аралашмасини тайёрлаб олиш лозим.

Тажриба намунаси: пробиркага 0,5 мл қон зардоби солинади, сўнгра 3,5 мл реактивлар аралашмаси қўшилиб, аралаштирилгач 10-15 дақиқага 30°C ёки 37°C ҳароратда инкубация қилинади. Инкубациядан сўнг пробиркага 0,1

мл α -кетоглутарат кислотаси солинади. Аралаштирилади ва 60 секундан сўнг (лаг-фаза) спектрофотометрнинг 10 мм қалинликдаги қюветасига солиниб 340 нм тўлқин узунлигида экстинкцияси дистилланган сувга нисбатан, аниқ 1, 2 ва 3 дақиқадан кейин (ёки қисқароқ лекин бир хил вақт оралигида) экстинкциясини ўлчанади.

Назорат намунаси: қон зардоби ўрнига физиологик эритма қуйилади.

Фермент фаоллиги қуйидагича ҳисобланади:

Назорат намунасига ўзгартириш киритиш қуйидаги формула орқали амалга оширилади.

Ўлчанган 4 та оптик зичликдан тажриба намунаси учун уни 1 дақиқа давомида $(\Delta E/\Delta t)$ тажриба ва $(\Delta E/\Delta t)$ назорат ўзгариши ҳисобланади, ҳар бир кейинги оптик зичлик кўрсаткичини олдингидан айрилади (натижа “манфий” белги билан бўлади). Учта оптик зичлик кўрсаткич ўзгаришидан ҳар бир тажриба намунаси учун ўртача арифметик қиймат $(\Delta E_{сп}/\Delta t)$ тажриба ва $(\Delta E_{сп}/\Delta t)$ назорат ҳисобланади.

E - тажриба намунаси катталиги коррекция қилинади:

$$(\Delta E_{сп}/\Delta t)_{таж} - (\Delta E_{сп}/\Delta t)_{буш} = (\Delta E/\Delta t)_{кор}$$

Коррекция қилинган катталикни тажриба намунаси кейинги ҳисоблаш учун ишлатилади.

$$\text{Фаоллик, моль}/(\text{с}\cdot\text{м}^3) = \text{нмоль}/(\text{с}\cdot\text{л}) \cdot 10^6 = V_{р.с} / \varepsilon \cdot l \cdot V \cdot (\Delta E / \Delta t)_{кор}$$

Бу ерда $V_{р.с}$ — реакция аралшма ҳажми, мл;

$V_{зардоб}$ — қон зардоби ҳажми, мл;

t — реакция давомийлиги, сек.;

$\Delta E / \Delta t$ — экстинкция ўзгариши 1 сек. давомида;

ε — NADH моляр экстинкция коэффициентини $\text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$;

l — қюветадаги суюклик қалинлиги метрда ($1 \cdot 10^{-2}$).

Аланинаминотрансфераза ферменти (АЛАТ) фаоллигини аниқлаш усули

Реактивлар:

1. Калий дигидрофосфат (K_2HPO_4).
2. Калийгидрофосфат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

3. Фосфат буфер 0,1 моль/л, рН - 7,4.

4. L-альфа-аланин

5. Субстрат-буфер эритма - 0,63 моль/л L-аланин 0,1 моль/л фосфат буферда, рН 7,4, эритилади.

6. Қайтарилган β -никотинамидадениндинуклеотид, динатрийли тузи, 15 ммоль/л.

7. Натрий гидроксид 5 моль/л ва 1 моль/л.

8. α -кетоглутар кислотаси, 0,56 моль/л.

9. Лактатдегидрогеназа.

10. Натрия хлорид, 154 ммоль/л (физиологик эритма).

Иш тартиби:

Иш бошлашдан олдин реактивлар аралашмасини тайёрлаб олиш лозим, у субстрат-буферли эритма, NADH ва ЛДГ эритмаларини 60:1:1 нисбатда аралаштириш ҳосил қилинади.

Тажриба намунаси: пробиркага 0,5 мл қон зардоби солинади, сўнгра реактивлар арашмасидан 3,5 мл қўшилади, аралаштирилади ва 30°C ёки 37°C 10-15 дақиқага инкубация қилинади, сўнг пробиркага 0,15 мл α -кетоглутарат кислотасини қўшилади. Аралаштирилади ва 60 секунддан сўнг (лаг-фаза) спектрофотометрнинг 10 мм қалинликдаги кюветага солиниб 340 нм тўлқин узунлигида дистилланган сувга нисбатан аниқ 1, 2 ва 3 дақиқадан кейин (ёки қисқароқ лекин бир хил вақт ораллиғида) экстинкциясини ўлчанади.

назорат намунасида – қон зардоби ўрнига натрий хлорид эритмасини қўшилади.

Ўлчанган 4 та оптик зичликдан тажриба синамаси учун уни 1 дақиқа давомида $(\Delta E/\Delta t)_{\text{тажриба}}$ ва $(\Delta E/\Delta t)_{\text{назорат}}$ ўзгаришии ҳисобланади, ҳар кейинги оптик зичлик кўрсаткичини олдингидан айрилади (натичжа “манфий” белги билан бўлади). Учта оптик зичлик кўрсаткич ўзгаришидан ҳар бир тажриба намунаси учун ўртача арифметик қиймат $(\Delta E_{\text{сп}}/\Delta t)_{\text{тажриба}}$ ва $(\Delta E_{\text{сп}}/\Delta t)_{\text{назорат}}$ ҳисобланади.

Е тажриба намунаси катталиги коррекция қилинади:

$$(\Delta E_{cp}/\Delta t)_{\text{тажриба}} - (\Delta E_{cp}/\Delta t)_{\text{назорат}} = (\Delta \bar{E}/\Delta t)_{\text{кор.}}$$

Коррекция қилинган катталикни тажриба намунаси кейинги ҳисоблаш учун ишлатамиз.

$$\text{Фооллиги, моль}/(\text{с} \cdot \text{м}^3) = \text{нмоль}/(\text{с} \cdot \text{л}) \cdot 10^6 = V_{p.c} / \varepsilon \cdot 1 \cdot V \cdot (\Delta E / \Delta t)_{\text{кор.}}$$

Бу ерда, $V_{p.c}$ —реакцион аралшма ҳажми, мл;

V — қон зардоби ҳажми, мл;

t —реакция вақти, сек.;

$\Delta E / \Delta t$ —экстинкция ўзгариши 1 сек. давомида;

ε —молярэкстинкция коэффиценти НАДН в м² · моль⁻¹;

1 — кюветадаги суюклик қалинлиги метрда ($1 \cdot 10^{-2}$).

1.3.6. Синалаётган янги бирикмаларни жигарни ёғли дистрофия даражасига таъсирини аниқлаш.

Жигарни ёғли дистрофияси даражасини аниқлаш янги гепатопротекторларни терапевтик самарадорлигин баҳолашда муҳим аҳамият кашф этади. Сичкон ва каламушларда ўтказилган тажрибаларда жигарни ёғли дистрофия даражасини морфологик ва биохимик услубларда ўрганиш мақсадга мувофиқдир. Биокимёвий услубда жигар тўқимасида умумий ёғ миқдори аниқлаш кенг қўлланиладиган усулда амалга оширилади. Бундан ташқари, жигар тўқимасидаги ёғ миқдорини аниқлаш учун жониворларнинг ушбу аъзосидан олинган аниқ вазнли миқдори термостатда (60°C) вазни ўзгармайдиган холга келгунча қуритилади. Хўл ва қурук жигар вазни орасидаги фарқ азода қанча сув мавжуд эканлигини (яъни шишни) кўрсатади. Қуриган жигар майдалангач (100 ёки 200 мг) миқдори фильтр қоғозидан тайёрланган жилдларга жойлаштирилиб уларни вазни аниқлангач дихлорэтан (ДХЭ) солинган сокслетнинг юқори қисмига жойлаштирилади. 8-10 соат давомида ДХЭ билан экстракция қилинади. Жилдлар термостатда (60 °C) қуритилгач уларни вазни аниқланади. Жилдларни аввалги ва экстракциядан кейинги вазнлари орасидаги фарқ жигар тўқимасидаги ёғ миқдорини белгилайди.

Гистокимёвий йўл билан жигардаги ёғ миқдори 10% нейтрал формалинда фиксацияланган жигар тўқимаси бўлақчаларидан яхлатувчи

микротомда кесмалар тайёрлаб III ёки IV судан бўёғи билан бўялгач аникланади.

Жигар тўқимасидаги ёғ микдорини ушбу услубда баҳолашда 5 балли мезондан фойдаланилади:

1 балл – ёғ босишининг энг кичик даражаси - ёғ босган гепатоцитлар триада худудида бўлақларнинг чекка қисмида жойлашган;

2 балл – ёғ босишининг кучсиз даражаси –ёғ босган гепатоцитлар жигар перипортал зонасида пластинкаларини (балкаларини) $1/4 - 1/3$ қисмини эгаллаган;

3- балл – ўртача даражада –ёғ босган гепатоцитлар периферик бўлақчалардаги жигар бўлақчаларини $1/3-1/4$ қисмини эгаллаган;

4 балл – юқори даража – ёғ томчиларини тутган гепатоцитлар жигар пластинкаларини $1/2-2/3$ қисмини эгаллаган;

5 балл – энг юқори даража – стеатоз жигар бўлақчаларини бутунлай эгаллаган.

Олимларнинг фикрича липидларни гистокимёвий услуб билан аниклаш биокимёвий аниклаш услубига нисбатан сезгирроқ ҳисобланади.

1.4. Ажратиб олинган гепатоцитлардаги тажрибалар

Ажратиб олинган гепатоцитлар яшаш муҳитига тетрахлорметан (2-4 ммоль) ёки Д-галактозамин (1,85-3,0 ммоль) кўшиб жароҳатлантирилади. Уларни тирик қолганларини трипан кўкини шимиш тести (цитоплазматик мембраналари жароҳатланмаган гепатоцитлар бўялмайди, чунки бўёқни ютмайди) ҳамда гепатоцитлар инкубация қилинган суюқликда АлАТ, АсАТ ва ЛДГ ферментларини ажралиши даражасига асосланиб аникланади. Синалаётган янги дори воситаси гепатотоксинлар билан жигар хужайраларини жароҳатланишидан аввал (1-2 соат) инкубация суюқлигига ҳар-хил микдорда кўшилади.

2. Саралаш босқичида танлаб олинган бирикмаларни гепатопротекторлик хоссаларини кенг кўламда ўрганиш ва уларни таъсир механизмларини аниқлаш

2.1. Жигарни ўткир патологияларини лаборатория жониворларида шакллантириш (моделлаштириш).

Оқ каламушларда ўткир гепатитни шакллантириш учун таъсир механизми турлича бўлган гепатотоксинлардан фойдаланилади.

1) Жигар бўлакчаларининг марказида жойлашган гепатоцитлар биомакромолекулалари билан ковалент боғланувчи цитохром Р-450 монооксигеназасига боғлиқ фермент системасида эркин радикаллар ва электрофил интермедиатлар ҳосил қилувчи гепатотоксинлар: СС1₄, галотан, бромбензол, парацетамол, тетрациклин, изониазиддан иборат. Оқ каламушларга: бромбензолни қорин бўшлиғига бир марта 0,25-0,4 мг/кг дозасида юборилади.

Парацетамолни (ацетаминофен) меъдага 500-1000 мг/кг дозада 1-2 кун киритлади.

Тетрациклинни меъдага 500 мг/кг дозада 5 кун давомида ҳар куни бир мартадан киритилади.

Изониазидни меъдага 540 мг/кг дозада 6 кун давомида кунига бир мартадан киритилади.

2) Жигарни перепортал қисмида жойлашган гепатоцитларни, уларда қайтарилган глютатион етишмаслиги туфайли жароҳатловчи, цитоплазмадаги ва митохондрияларнинг алкогольдегидрогеназаси ёрдамида оксидловчи электрофил метаболит-акролеин ҳосил қилувчи аллил спиртини 0,05-0,1 мг/кг дозада ёки қорин бўшлиғига 0,05 мг/кг дозада 1-2 кун юборилади.

3) Жигар митохондрияларида ўртача ва узун занжирли мой кислоталарини β-оксидланиши ва орнитин циклида мочевино синтезини бузилиши туфайли эндоген захарланиш, ҳамда жигар энцефалопатиясини ривожлантирувчи 4-пентен кислотасини қорин бўшлиғига 7 кун давомида 20 мг/кг дозада киритилади.

4) Жигарда РНК ва оксил синтезини бирламчи бузувчи гепатотоксинлар: D-галактозамин, аминазин, гелиотрин, фаллоидин ва бошқалар.

Галотанни нафас йўлларига 0,5-1,0 хажм% концентрацияда 2-4 соат мобайнида ингалация қилинади (бунда нафас йўлларига киритилаётган аралашмада кислороднинг миқдорини 10-14 хажм% гача камайтиради). Тетрахлорметан ва D-галактозамин таъсирида ривожланадиган ўткир гепатитлар юқори келтирилган.

Каламушларда ёғли гепатоз моделини гидразин (1-2 кун давомида меъдага 180-200 мг/кг дозада) ёки этанол (7 кун мобайнида меъдага этил спиртининг 40% эритмасини 7-10 мл/кг миқдорда) киритиш орқали амалга оширилади.

Синалаётган янги бирикманинг гепатопротекторлик хоссасини аниқлаш учун жигар артерияси ва дарвоза венасини вақтинчалик (20-30 дақиқага) қисиб қўйиш орқали жигар жароҳатланишини яратиб ўрганиш мумкин. Бунда вужудга келадиган ишемия жигар трансплантацияси, юрак-томир етишмовчилигини ва миокард инфарктида юзага келувчи вазиятни моделлаштиради. Гепатопротекторларни жигар паренхимасининг регенерация жараёнига таъсирини, уни 1/3 ёки 1/2 қисмини олиб ташлаш билан юзага келтириладиган моделида баҳолаш мумкин. Синалаётган янги гепатопротекторларни профилактик (олдини олиш) мақсадида текшириляётганда улар организмга гепатотоксинлар киритилишидан аввал ёки ишемия чақирилишидан 1-2 соат аввал киритилади. Зарур ҳолатда гепатотоксинлар билан бир вақтда киритилса ҳам бўлади. Гепатопротекторларнинг шифобахш таъсирини баҳолашда улар жигар патологияси яратилиб бўлингач киритилади. Гепатопротекторларни профилактик қўллаш муддати гепатотоксинларни қўллаш муддатига муносиб келади ва қўшимча 7-10 кун бўлиши мумкин. Гепатопротекторларни шифобахш таъсирини ўрганишда улар 10-14 кун қўлланиши лозим.

Гепатопротекторлик хоссаси мавжуд бўлган янги синалаётган бирикмаларнинг жароҳатланган жигар паренхимасига таъсирини қуйидаги синамалар орқали баҳолаш мумкин.

2.2. Синалаётган янги бирикмаларни жигарнинг эксcretор функциясига таъсирини баҳолаш

Бунда профилактик ва даволаш мақсадида синалаётган янги бирикмаларни жигардан ажралган сафро миқдори, ҳамда сафро тақибидаги билирубин, сафро кислоталари, холестерин, фосфолипидлар миқдорига таъсири майда лаборатор жониворларида (сичкон, каламуш) наркоз ҳолатида, катта ҳайвонларда (итлар) аввалдан сафро йўлларида фистулалар ўрнатилиб тетик (наркозсиз) ҳолатларида ўрганилади.

Сафро ажратиш фаолиятини ўрганиш учун соғлом ҳамда экспериментал гепатит чақирилган каламушларда этаминал натрий (40мг/кг, қорин бўшлиғига) воситаси орқали наркоз берилгач умумий сафро йўлига канюла (эластик, полиэтилендан тайёрланган ингичка найча) ўрнатилиб ҳар соатда ажратилган сафро миқдори ўлчанади (мл/соат ёки мг/соат). Олинган сафро миқдори жониворларнинг нисбий вазнига ҳисобланади (мл/100 г тана вазнига). Синалаётган ва қиёсий баҳолаш учун олинган маълум препарат жониворлар меъдасига махсус зонд орқали наркоз беришдан олдин ёки сафро йўлларида канюла ўрнатилгандан сўнг киритилади. Таҷрибалар одатда 5-6 соат давомида ўтказилади. Ҳар соатда ажратилган сафро тарқибидаги билирубин, холестерин, сафро кислоталари ва фосфолипидлар миқдори қуйидаги усулларда аниқланади:

Таҷриба ҳайвонларига экспериментдан 20 – 22 соат олдин овқат берилмайди. Этаминал натрий (40 мг/кг) ёки барбамил (80мг/кг) ёрдамида наркоз ривожлантирилгач қорин бўшлиғи очилади ва умумий ўт йўлига полиэтилен канюла ўрнатилади. Канюла орқали ажралаётган сафро соатли порцияларда пробиркаларга йиғилади ва уларнинг ҳажми аниқланади. Соат давомида ажралаган сафро тезлиги аниқлангандан сўнг 12 бармоқ ичакка ўрганилаётган модда эритмаси ёки суспензияси юборилади ва 3-6 соат давомида ажралган сафро миқдори аниқланади. Олинган натижалар бошланғич ажралган сафро миқдори ва контрол гуруҳ (параллел равишда бир хил ҳажмда

сув ёки бошқа эритма юборилган) билан солиштирилади. Сафро хайдовчи фаолликка 60 дақиқа давомида сафро ажралиш тезлиги (мг/дақиқа/100 г тана вази), шунингдек тажриба давомида ажратилган сафронинг умумий миқдори асосида баҳо берилади.

2.3. Сафро таркибидаги умумий ўт кислоталари (УЎК) ва холестерин миқдорини (Хол) аниқлаш усули

Сафро хайдовчи препаратлар холекинетик ва холесекретикларга ажратилади. Биологик фаол модданинг холесекретик хоссасини тўлиқ ўрганиш учун сафронинг кимёвий таркибини тахлили қилиш муҳим аҳамиятга эгадир. Холесекретиклар сафро таркибидаги ўт кислоталар синтезини кучайтирувчи хоссага эга бўладилар ва бундай препаратлар ҳақиқий холесекретиклар ҳисобланади. Сафро таркибидаги ўт кислоталари ва холестеринни миқдорини аниқлашнинг турли усуллар мавжуд. Одатда темир хлоридни совутилган эритмасини ўт кислоталари ва холестерин билан рангли комплекс бирикмалар ҳосил қилишига асосланган усулдан фойдаланилади.

Реактивлар:

1.96% этил спирти.

2.Темир хлориднинг эритмаси: 100 мл концентранган яхлаш хоссасига эга бўлган сирка кислотасига 100 мг темир хлорид қўшилади ва эритма ҳолатига келгунча чайқатиб турилади. Ушбу эритманинг устига 100 мл концентранган сульфат кислотаси мунтазам аралаштирилиб турган ҳолда қўшилади. Эритма совитилгач қўллашга тайёр бўлади. Тўғри тайёрланган ушбу реактив хол кислотасининг 0,1 мг га 3,5 мл реактив қўшилганда ҳосил бўлган эритманинг оптик зичлиги 385 нм да 0,950 – 1,000 кўрсаткичига эга бўлиши керак. Реактив 2 ой мабойнида ўз хоссаларини йўқотмайди.

Иш тартиби:

Сафро таркибидаги кислоталар ва холестеринни аниқлаш учун сафро 96 % этил спиртида 5 марта суюлтирилгач 1500 айл/дақиқа тезликда центрифугаланади. Чўкма устидаги суюкликдан 0,1 мл олиниб устига 3,5 мл

темир хлориднинг эритмаси қуйилади. Хона хароратида сақланган ушбу аралашма 20 дақиқадан кейин спектрофотометрнинг 480 нм тўлқин узунлигида оптик зичлиги ўлчанади. Сўнгра аралашма 60°C хароратидаги сув хаммомида 30 дақиқа сақланади. Аралашма совигач спектрофотометрнинг 385 нм тўлқин узунлигида унинг оптик зичлиги аниқланади. Сафро таркибидаги УЎК ва Холестериннинг миқдори (мг %) қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$C_{\text{уўк}} = 114 \cdot D_{385} \cdot P$$

$C_{\text{уўк}}$ – сафро кислоталарининг умумий миқдори (мг%);

D_{385} – 385 нм даги оптик зичлик кўрсаткичи;

P – сафронинг суюлтириш даражаси.

Сафро таркибидаги холестерин миқдорини ушбу услуб билан аниқланганда қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$C_{\text{хол}} = 50 \cdot (D_{480} - 0,04 \cdot D_{385}) \cdot P$$

$C_{\text{хол}}$ – холестериннинг умумий миқдори (мг%);

D_{480} – эритманинг 480 нм оптик зичлигининг кўрсаткичи;

D_{385} – 385 нм даги оптик зичлик кўрсаткичи;

P – сафронинг суюлтириш даражаси.

Агар холестеринни аниқлашда эритманинг оптик зичлиги 0,1-0,5 дан ортик бўлса, сафрони суюлтириш даражасини ошириш лозим.

2.4. Гепатоцитларни ютувчанлик ва ажратилувчанлик фаолиятини кардиограмм тестлари ёрдамида аниқлаш:

Кардиограмм синамаси – жигар ҳужайраларининг қондан бирикмаларни ютиб олиниши (шимилиши) ва уларни сафро таркибида ажратиш тезлиги ва даражасини кўрсатади. Ушбу синамани ўтказиш кардиограмм эритмасини жониворлар томирига юборилгандан сўнг қон зардобидида препарат концентрациясини спектрофотометрик услубда аниқлашга асосланган. Ушбу бўёқни фармакокинетик кўрсаткичлари икки қисмли математик модел асосида ҳисобланади. Ушбу синаманинг афзаллиги шундан иборатки, унинг кўрсаткичлари асосида жигарда қон айланиш тезлигини ҳам аниқлаш имкони

мавжуд. Кардиогриннинг фармакокинетикаси асосан уни плазма оксиллари билан бирикиши ва жигар хужайраларини ютиш – ажратиш фаолиятига боғлиқ бўлади, чунки у организмда метаболизмга учрамайди ва сафро билан конъюгатлар кўринишида чиқарилади. Айнан шу сабабли кардиогриннинг фармакокинетик параметрлари жигарнинг ютиш-ажратиш фаолиятига ва унда кон айланиш тезлигини билвосита баҳо беришга имкон беради. Қадокланган кардиогрин кутичасидаги ампулага жойлашган махсус эритувчида бевосита ишлатилишидан олдин эритма тайёрланиб, вена ичига 0,5 мг/кг ҳисобида юборилади. Юборилишдан олдин ва юборилгандан 2, 5, 7, 30, 45 ва 60 дақиқа кейин кон олинади ва кардиогринни микдори спектрофотометрик усулда кон зардобининг оптик зичлиги 805 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Модданинг қондаги концентрацияси, унинг стандарт эритмалари оптик зичлигини ўлчаш асосида тузилган калибровка эгри чизиғи асосида аниқланади. Кардиогриннинг фармакокинетик параметрлари икки қисмли фармакокинетик модели асосида ҳисобланади.

$$C_t = B \cdot e^{-\beta \cdot t} + A \cdot e^{-\alpha \cdot t} \quad (1)$$

Бунинг учун кардиогрин концентрациясини вақт ўтишига нисбатан қонда ўзгариш функциясини ярим логарифмик қоғозга аниқ вақтда (абсцисса) кон зардобидеги препаратни концентрациясини (ордината) ни қўйиш орқали тўғри чизик ўтказилади ва қуйидаги функция асосида кардиогрин фармакокинетикасининг кўрсаткичлари ҳисоблаб топилади. Бунинг учун аввал ярим логарифмик қоғозда чизилган чизиклар асосида А ва В, $t_{1/2\alpha}$ ва $t_{1/2\beta}$ ларнинг қийматлари топилади. Юқоридаги (1) формула асосида ҳисоб-китобни ўтказиш учун аввал β ва α қийматлари қуйидаги формулалар асосида ҳисобланади:

$$\beta = \frac{0,693}{t_{1/2\beta}}; \quad \alpha = \frac{0,693}{t_{1/2\alpha}} \quad (2)$$

ушбу қийматлардан фойдаланиб (1) формула асосида α фазадаги кардиогрин концентрациясини қиймати қайта ҳисобланади ва у ярим логарифмик қоғозга

тегишли вақтга мос равишда туширилади ва чизик қайтадан ўтказилади. Янги чизилган чизикдан фойдаланиб α фазадаги C_{p0} (яъни A) ва $t_{1/2\alpha}$ ҳисобланади. Ушбу кўрсаткичлар асосида препаратни қондан жигар хужайраларига ўтиш (K_{12}), хужайрадан қайта қонга ўтиш (K_{21}) ҳамда хужайрадан сафрога ўтиш (K_{el}) константалари қуйидаги формулалар асосида ҳисобланади:

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{el} = \text{дақиқ} \alpha^{-1} \quad (3)$$

$$K_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A + B} = \text{дақиқ} \alpha^{-1} \quad (4)$$

$$K_{el} = \frac{\alpha \cdot B}{K_{21}} = \text{дақиқ} \alpha^{-1} \quad (5)$$

Кардиограмм препаратини организмнинг ички муҳитида тақсимланиши қуйидаги формулалар асосида ҳисобланади. Жумладан марказий камерада тақсимланиши (V_c)

$$V_c = \frac{\text{Доза (мкг)}}{A + B} \text{ мл/кг} \quad (6)$$

Мувозанатлашган ҳолатдаги тақсимоти (V_{dss}).

$$V_{dss} = V_c \cdot \frac{K_{12} + K_{21} + K_{el}}{K_{12} + K_{el}} \text{ мл/кг} \quad (7)$$

Препаратнинг преферик камерадаги тақсимоти (V_p)

$$V_p = V_{dss} - V_c = \text{мл/кг} \quad (8)$$

Препаратни қондаги концентрацияси вақтга нисбатан ўзгариш чизиғи остидаги юза (AUC фармакокинетик эгри остидаги юза):

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \quad (9)$$

препаратни умумий клиренси (Cl) қуйидаги формула билан ҳисобланади.

$$Cl = \frac{\text{Доза (мкг)}}{AUC \cdot \text{тана вазни}} = \text{мл} \cdot \text{дақиқа} \cdot \text{кг}$$

$t_{1/2\alpha}$ - ярим тақсимланиш даври

$t_{1/2\beta}$ - ярим элиминация даври;

V_c – марказий камерада тақсимланиши;

V_{dss} – мувозанатлашган соҳада тақсимланиши;

V_p - периферик камерада тақсимланиши;

K_{12} – препаратни марказий камерадан периферик камерага ўтиш константаси;

K_{21} - препаратни периферик камерадан марказий камерага ўтиш константаси;

K_{e1} - препаратни периферик камерадан сафрога ўтиш константаси;

AUC – фармакокинетик эгри остидаги юза;

Cl_p – плазма клиренси (препаратни кон зардобини тарк этиш тезлиги, яъни, кон зардобини препаратдан тозаланиши, мл/дақиқа/кг).

Жигарда кон айланиш тезлигини аниқлаш учун гематокрит аниқланиб, умумий циркуляциядаги кон ҳажми (V_k) ва жигардан кон ўтиш тезлигини (V_n) аниқлаш бўйича тадқиқотлар ўтказилади, улар қуйидаги формула бўйича ҳисобланди:

$$V = \frac{V_k \cdot 0,693}{T_{1/2\alpha} \cdot M} = \text{мл} \cdot \text{дақиқа} \cdot \text{кг}$$

Бу ерда, V_k - циркуляциядаги кон ҳажми (мл), $T_{1/2\alpha}$ – препаратни ярим тақсимланиш даври, M – тана вазни кг.

2.5. Жигарни дориларни парчалаш (биотрансформация) қобилиятини ўрганиш усули

Экспериментал ва клиник тадқиқотларда жигарнинг захарсизлантириш (захарларни парчалаш) ҳоссабини аниқлашда кўпинча антипирин синамасидан фойдаланилади. Антипириннинг фармакокинетик хусусиятларига баҳо бериш учун препаратнинг янги тайёрланган сувли эритмасини куёнларни томирига 25 мг/кг

дозада юборилади. Сўнгра 30 дақиқа, икки ва тўрт соат кейин бўйин қўқ томиридан олинган кон зардобда препаратни микдори спектрофотометрик усулда аниқланади.

Реактивлар:

1. Антипирииннинг стандарт эритмаси: 100 мг антипириин 1 л дистилланган сувда эритилади;
2. Рух реактиви: 100 г ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) га 40 мл 6 N H_2SO_4 қўшилиб 1 л сувда эритилади.
3. Натрий гидроксиднинг (NaOH) 0,75 N эритмаси;
4. Сульфат кислотасининг (H_2SO_4) 4 N эритмаси;
5. Натрий нитритнинг ($NaNO_2$) 0,2% эритмаси (бевосита ишлатишлишидан олдин тайёрланади).

Иш тартиби:

2 мл кон зардоби 50 мл ҳажмли Эрлен - Мейрнинг шиша идишига қўйилиб устидан 2 мл рух эритмаси ва 2 мл дистилланган сув қўшилиб яхшилаб аралаштирилади. Шундан сўнг унинг устига бир текисда мунтазам чайқатилиб турилган холда 2 мл 0,75 N натрий гидроксид эритмаси томчилаб қўшилади. 10 дақиқадан кейин ҳосил бўлган аралашмани 3500 айл/дақиқа тезликда 15 дақиқа центрифугаланади. Сўнг чўкма устидаги (супернатант) суюқликдан 3 мл олиниб унга 1 томчи 4 N сульфат кислотаси қўшилади, аралаштириб, спектрофотометр кюветасига қўйилади ва унинг оптик зичлиги 350 нм тўлқин узунлигида оддий сувга қарши ўлчанади. Бундан кейин тажриба ва назорат намуналарига 2 томчидан натрий нитритнинг 0,2% ли эритмасидан томизилади, яхшилаб аралаштирилади ва 20 дақиқага ёруғлик тушмайдиغان жойда сақланган кайтадан 350 нм да унинг оптик зичлиги ўлчанади.

Ушбу услуб антипирииннинг сульфат кислота мавжуд бўлган муҳитда натрий нитрит билан 4-нитрозоантипириин ҳосил қилишига асосланган, у эса спектрофотометрда 350 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Препарат концентрацияси кимёвий тоза антипириинни стандарт эритмаларини оптик

зичлигини ўлчаш асосида тузилган калибровка эгри чизиги бўйича топилади. Препаратни ярим элиминация даврининг кўрсаткичи $t_{1/2}$ логарифмик коғозга вақт (абцисса) ва препаратнинг кон зардобидаги концентрацияси (ордината) туширилиб унда C_{p0} (препаратнинг назарий жихатдан вақт нолга тенг бўлганда кон зардобидаги концентрацияси) қиймати топилади. Чизикдаги C_{p0} нинг ярим қийматига тўғри келган вақт препаратни ярим элиминация даври кўрсаткичидир $t_{1/2}$ (дақиқа ёки соат). препаратни организмни ички муҳитида тақсимланиш кўрсаткичи (aVd) қуйидаги формула асосида ҳисобланади:

$$aVd = \frac{\text{Препарат дозаси (мкг)}}{C_{p0} \cdot \text{тана вазни}} = \text{мл/кг};$$

Бу ерда, C_{p0} – антипириин концентрацияси "ноль"инчи вақтда (мкг/мл), m - тана вазни кг.

Препаратнинг метаболик клиренси (MCR , яъни препаратнинг метаболизмга учраши – парчаланиши туфайли қонда унинг концентрациясини камайиш кўрсаткичи) қуйидагича ҳисобланади:

$$MCR = \frac{0,693 \cdot aVd}{t_{1/2} \cdot \text{соат}} = \text{мл} \cdot \text{кг} / \text{соат};$$

Бу ерда, 0,693 – константа;

aVd – препаратни организмни ички муҳитида тақсимланиш кўрсаткичи;

$t_{1/2}$ - препаратни ярим элиминация даври (соат).

Препаратнинг элиминация константаси - K_{el} қуйидаги формула орқали топилади:

$$K_{el} = \frac{0,693}{t_{1/2}} = \text{соат}^{-1}$$

Препаратнинг қондаги концентрациясини вақтга боғлиқ камайиши асосида чизилган чизик остидаги юза (AUC) қуйидаги формула бўйича ҳисобланади:

$$AUC = \frac{C_{p0}}{K_{el}} = \text{мкг/мл} \cdot \text{с} \cdot \text{ам}^{-1}$$

2.6. Уридин-дифосфат-глюкуронилтрансфераза (УДФГ) фаоллигини аниқлаш усули

Реактивлар:

1. Таркибида 1 мМ этилендиамин тетра ацетат (ЭДТА) бўлган 0,25 М сахароза эритмаси, рН – 7,4;
2. Тритон X – 100;
3. Инкубация суюқлиги (қўлланилишидан олдин тайёрланади): 5 мг магний хлор ва 3 мг п-нитрофенолни 0,5 мл 0,05 М трис-буферда эритилади, рН – 7,4;
4. УДФГ кислотасининг 2 мг 0,05 М трис-буфердаги эритмаси;
5. Глициннинг 0,1 н натрий гидроксиддаги 4% эритмаси.

Иш тартиби:

Сўйилган жониворларнинг жигари тезда ажратиб олиниб умумий вазни аниқлангач ундан 200 мг қисми гомогенизаторда совуқ ажратиш эритмасида (1 ммоль ЭДТА тутган 0,25 М сахароза эритмаси, рН – 7,4) гомогенизация қилинади. Центрифуга пробиркаларига 0,05 мл магний хлорид ва р-нитрофенолдан ташкил топган инкубация аралашмаси (0,05 М трисбуфер, рН-7,4 нинг 5 мл да 5мг магний хлорид ва 3 мг р-нитрофенол қўллашдан олдин эритилади) қуйилади. Инкубация аралашмасига 0,05 мл (1 мкмоль) уридин-дифосфат-глюкурон кислотаси (2 мг уридин-дифосфат кислотасини 0,02 мл 0,05 М трис буферда эритилади), ҳамда 0,05 мл гомогенат қўшилади. Назорат пробиркасида фақат уридин-дифосфат кислотаси (уни ўрнига 0,05 мл 0,05 М трис буфер қўшилади) дан ташқари барча реактивлар қўшилади. Аралашмани 37 °С да 10 дақиқа инкубация қилинади ва ҳар бир пробиркага 4% глицин (NaOH ни 0,1 N ли эритмасида тайёрланади) эритмаси қўшилади ва 405 нм тўлқин узунлигида 4% глицин эритмаси билан солиштирган ҳолда

спектрофотометрда оптик зичлиги ўлчанади. Олинган натижалар 1 гр жигар тўқмасига куйидаги формула асосида ҳисобланади:

$$40 \times (K-O)$$

Ундаги К ва О боғланган субстратларнинг назорат ва тажриба намуналаридаги миқдори. Ферментнинг фаоллиги (1 гр жигар тўқмаси) 1 дақиқа давомида боғланган субстрат миқдори билан белгиланади. Соғлом жониворларда (1 гр жигар тўқмасини 1 дақиқада боғланган) 2-4 ммоль р-нитрофенолга тенг.

2.7. Сафро таркибини текшириш усуллари

2.7.1. Сафро таркибидаги дегидроокси ва тригидрокси холан кислоталарини фотометрик усулда аниқлаш.

Реактивлар:

1. 96° этил спирти;
2. Янги тайёрланган фурфуролнинг 1% ли сувли эритмаси;
3. Сульфат кислотасини 80% эриитмаси;
4. Сульфат кислотасининг 50% ли эритмаси;
5. Хол (холевая) кислотаси.

Иш тартиби:

Умумий сафро кислоталари (УСК) аниқлаш учун сафро 30-40 марта 96° спиртда суюлтирилди ва 1500 айл/дақиқа тезлигида 10 дақиқа давомида центрифугаланади. Чўкма устидаги суюқликдан 0,1 мл олиниб пробиркага куйилади ва унинг устига фурфуролнинг 1% эритмасидан 0,5 мл ҳамда 80% сульфат кислотаси эритмасидан 3 мл қўшилиб бир неча марта шиддатли аралаштирилади, сўнгра 12 дақиқа давомида 60°С ли сув хаммомида инкубация қилинади. Сўнгра пробиркалардаги суюқлик оқиб турган совуқ сувда совутилиб реакция натижасида ҳосил бўлган маҳсулот оптик йўли 0,5 см бўлган кюветаларга солиниб таркибида сафродан ташқари барча қўшмалар бўлган аралашмага (назорат синамаси) солиштирилиб ФЭК да №5-светофильтра ўлчанади.

2.7.2. Сафро таркибидаги тригидроксихолон кислотаси (ТГХК) миқдорини аниқлаш усули.

Иш тартиби:

Пробиркага 0,5 мл центрифугаланган сафро эритмаси устига 1% фурфуролнинг сувли эритмасидан 0,5 мл ҳамда 50% сульфат кислотасидан 0,3 мл қўшилиб бир неча марта шиддат билан аралаштириб 60 °С сув хаммомида 20 дақиқа давомида инкубация қилинади, сўнгра оқиб турган совуқ сувда совутилиб реакция натижасида ҳосил бўлган маҳсулот оптик йўли 0,5 см бўлган кюветаларга солиниб, таркибида сафродан ташқари барча қўшимчалар бўлган аралашмага (назорат синамаси) солиштирилиб ФЭК да №8 светофилтрда ўлчанади.

Сафро кислоталарини сафродаги миқдорини қуйидаги формула орқали ҳисобланади.

$$УСК = K_1 \cdot D_5 \cdot P$$

$$ТГХК = K_2 \cdot D_8 \cdot P$$

$$ДГХК = УСК - ТГХК$$

Ушбу формулада, D_5 ва D_8 реакция маҳсулотларининг ФЭКни мос равишда №5 ва №8 да аниқланган оптик зичлиги;

P – сафрони суюлтириш даражаси;

K_1 ва K_2 доимий ўлчам бирлиги бўлиб ҳолат кислотасини ФЭК да №5 ва №8 филтрларидаги аниқланган оптик зичлигига нисбатан ($\Delta C/\Delta D$) K , ҳолат кислотасининг стандарт эритмасини (0,5 г/л) 3 марта такроран худди УСКларини аниқлаш орқали топилади.

K_2 ни аниқлаш учун ҳолат кислотасини стандарт эритмасини ТГХК ни аниқлашга ўхшаб топилади.

2.7.3. Сафро таркибида билирубин миқдорини аниқлаш усули.

Маълумки фақат жигар хужайралари (гепатоцитлар) қондаги билирубинни ютиб уни глюкурон кислотаси билан боғлаб конъюгацияланган (моно ёки диглюкоуронид) кўринишида сафро таркибида ажратади. Жигар хасталикларида гепатоцитларнинг ушбу функциясини бузилиши туфайли

билирубин миқдорининг қонда ортиб кетиши сариклик ривожланишига олиб келади. Шуни назарда тутган ҳолда сафро таркибидаги билирубин миқдорини аниқлаш алоҳида аҳамиятга эга.

Реактивлар:

1. 96° этил спирти;
2. Эрлих – Диазо реактивини ишлатилишидан олдин тайёрлаш учун А реактивдан 8,0 мл ва Б реактивдан 0,25 мл қўшиш билан ҳосил қилинади. А - реактив 5,0 гр сульфанил кислотасига 15,0 мл HCL кислотасини (солиштирма оғирлиги 1,25) қўшиб 1,0 л хажмгача сув қўшиб эритилади. Б – реактив NaNO_2 нинг 0,5% ли сувли эритмаси (тажриба ўтказиладиган куни тайёрланади).

Иш тартиби.

Сафро аввалдан сув билан 20-40 марта суюлтирилади ва унинг 1,0 мл га 3,0 мл этил спирти, ҳамда 1,0 мл Эрлих реактиви қўшилиб 10 дақиқага қоронғи жойда сақланади, сўнгра ФЭК нинг яшил ранг фильтрида этил спиртига солиштириб оптик зичлиги 5,0 мм ли кюветада ўлчанади. Сафро таркибидаги билирубин миқдори стандарт билирубиндан тайёрланган хар хил концентрацияли эритмаларини ФЭК да яшил светофильтрда оптик зичлиги аниқланиб чизилган эгри чизикдан фойдаланиб аниқланади. Олинган натижа мкг/соат/100гр тана вазнига кўринишида тақдим этилади.

Билирубин учун калибровка эгри чизиғи тузиш: Бунинг учун 1 мг кимевий тоза таркибли билирубинни 5,0 мл тоза хлороформда эритилади (унинг 0,1 мл да 20 γ – 0,00002 гр билирубин бор) ушбу эритманинг 2,5 мл га тенг миқдорда хлороформ қўшилиб 0,1 мл (10 γ) билирубин туган эритма ҳосил қилинади. Шу тартибда 0,1 мл да 5 ва 2,5 γ билирубин туган эритмалар ҳосил қилинади. Ҳосил бўлган 4 та эритманинг хар биридан 0,1 мл дан 5 та пробиркага солиниб сафрода билирубин миқдорини аниқлаш тартиби бўйича 0,9 мл сув, 3,0 мл 96° этил спирти ва 1,0 мл Эрлих –Диазо реактиви қўшилиб оптик йўли 5 мм бўлган кюветаларда ФЭК нинг яшил фильтрида оптик зичлиги ўлчанади.

2.7.4. Биологик суюқликларда бирламчи ва иккиламчи ўт кислоталари
фракцияларини миқдорини хроматография усулларида ўрганиш.

Сафро кислоталари липидлар метаболизмида муҳим роль ўйнайди. Сафро кислоталари гепатоцитларда холестериндан синтезланади, сафро тақибда ўт қопида йиғилади ва 12 бармоқ ичакка ажратилади. Кимёвий тузилишига кўра барча сафро кислоталари сафро суюқлигида мицелла ҳосил қилади ва табиий детергентлар вазифасини бажаради. Сафро кислоталари ошқозон ости беги липазасини кофактори ҳисобланиб, уни фаоллаштиради, ёғларни ва ёғда эрувчи витаминлар абсорбциясида муҳим аҳамият касб этади.

Бирламчи сафро кислоталари хол ва хенодеоксихол кислоталари жигарда синтезланади ва энтерогепатик циркуляцияда турли хил кимёвий ўзгаришларга учрайди. Ичак микрофлораси таъсирида сафро кислоталарининг таурин ва глицин аминокислоталар билан конъюгацияси, шунингдек сульфатланиш, глюкуроинидация натижасида иккиламчи сафро кислоталар ҳосил бўлишига олиб келади. Жигар ва ўт йўллари касалликлари, жумладан жигар циррози, гепатитлар ўт кислоталари таркибини сезиларли бузилишига ва қон зардобини, сийдик таркибида миқдорини ортишига олиб келади. Шунинг учун сафро кислоталарини фракцион таркибини ўрганиш жигарнинг сафро ажратиш фаолияти бузилишлари даражасини ишонарли аниқлашга ва дори воситалари таъсирида бу ўзгаришларни тикланиш самарадорлигига баҳо беришга имкон беради [8].

2.7.5. Юқори самарадор суюқлик хроматографияси (ЮССХ).

Юқори самарадор суюқлик хроматографияси ёки юқори босимли суюқлик хроматографияси деб ҳам номланувчи аналитик текширув усули бўлиб, классик устунли (колонкали) хроматографияни замонавий ускуналарни қўллаб амалга оширилади. ЮССХ бир вақтнинг ўзида мураккаб таркибга эга намуналарни, уларни ташкил қилувчи алоҳида компонентларга ажратиш имконини беради. Таркибий қисмини ташкил қилувчи бирикмаларни детектор ёрдамида битта ёки бир неча бирикмаларнинг концентрациясини аниқлаш

мумкин. ЮССХ суюқлик хроматографиясини блок-модулли тузилишга эга хроматография системасида амалга оширилади, бунда насос блоки ёрдамида ҳосил қилинган юқори босим (50-100 атмосфера) остидаги маълум бир таркибдаги суюқ ҳаракатчан фаза (элюент) белгиланган доимий тезликда (100-1000 мкл/дақиқа) турғун фазадан (хроматографик колонка) узлуксиз ўтказилади. Хроматографик колонка узунлиги 50-250 мм пўлат най, ички диаметри 2-5 мм бўлиб ички бўшлиғи диаметри 3-10 мкм бўлган бир хил жинсли сорбент зарралари билан зич ва бир хилда тўлдирилган бўлади.

Иш тартиби:

Текшириладиган намуна 10-100 мкл ҳажмда хроматография системасига киргизилади. Киргизилган намуна ҳаракатланувси фаза таркибида сорбентдан (турғун фаза) ўтиш даврида унинг таркибига кирувчи бирикмалар кўп мартаба адсорбцияланади ва десорбцияланади ва кимёвий бирикмалар сорбент билан ҳар бири турлича муносабатда бўлиши туфайли улар колонкада турли тезликда ҳаракатланади ва таркибий қисмларлари хроматография колонкасида турли вақтда чиқади. Ажратилган кимёвий бирикмалар детектордан ўтади ва ёзувчи қурилма ёки махсус компьютер программаси чўкки кўринишида ифодалайди.

Бу усулда биологик суюқликларда сафро кислоталарини фракцияларга ажратиш олиш бошқа усулларга кўра жуда самарадор ҳисобланади, жумладан текшириш учун биологик суюқликни жуда кам миқдори кифоя қилади, сафрони фақат спиртда (этанол ёки метанол) билан экстракциялаш етарли бўлади, фракцияларга жуда яхши ажралади ва сезгирлиги жуда юқори усулдир. Сафро таркибидаги сафро кислоталарининг таурин ва глицин билан конъюгатлари, жумладан литохол кислота, дезоксихол кислота, хенодезоксихол кислота, урсодезоксихол кислота ва бошқа хол кислоталари ЮССХ системасидан бир марта ўтказишнинг ўзида жуда яхши фракцияларга ажратилади.

Таҳлил учун 1 мл сафро 2 мл метанолда суюлтирилади ва аралашма центрифуга қилинади, сўнгра супернатант микропорали филтрдан (0,22 μm) ўтказилади ва 10 μl намуна инжектордан киргизилади. Ҳаракатчан фаза

сифатида ацетонитрил – сув (хроматография учун тайёрланган) 54:46 нисбатда 0,5 моль/л тетрабутиламмоний фосфат қўшилган аралашмадан фойдаланилади, оқим тезлиги 1,0 мл/дақиқа ташкил этади. Турғун фаза учун тескари-фазали C_{18} хроматография колонкасидан фойдаланилади. Ўт кислоталари УБ-детекторда 210 нм тўлқин узунлигида чизиш ускунасида акс эттирилган диаграмманинг ўткир бурчакли учбурчаклар (чўкқи) юзасини ҳисоблаш асосида аниқланади. Сафро кислоталари фракцияларининг миқдори стандарт ўт кислоталари таҳлилида олинган чўкқиларга солиштириб аниқланади [9].

2.8. Жигар фаолиятига баҳо бериш учун қўлланиладиган қон зардобини биокимёвий текшириш усуллари

2.8.1. Қон зардобидagi билирубин миқдорини аниқлаш усули.

Усул принципи: HCl таъсирида билирубиннинг тетрапиррол боғлари узилади, натижада иккита дипиррол ҳосил бўлади, бу эса диазобензосульфон кислотаси билан диазотирланиб пушти-бинафша ранг азобилирубин ҳосил қилади. Боғланган билирубин тезда реакцияга киришади, боғланмаган эса кофеин реактивини қўшгандан сўнг реакцияга киришади.

Реактивлар:

1. Кофеин реактиви: 5 грамм кофеин, 7,5 грамм бензонат натрий, 12,5 грамм натрий ацетатни 90 мл сувда 50-60 °C ҳароратда эритилади ва яхшилаб аралаштирилади. Совутилгандан сўнг 100 мл гача сув қуйилади. Эритма 2 ҳафта давомида стабил.
2. Натрий хлорид: 154 ммоль/литр (изотоник эритма).
3. Диазореактив I: 5 грамм сульфанил кислотасини 300-400 мл сувда иситиб эритилади, унга 15 мл концентирланган HCl қўшилади. Агар сульфанил кислотаси тўлиқ эриб кетмаса колбани илиқ сувга солинади ва аралаштирилади. Эритма совугандан сўнг 1 литргача сув қўшилади. Реактив қора рангли шиша идишда сақланганда стабил.
4. Диазореактив II — натрий нитрит, (5 грамм/литр (0,07 моль/литр): 0,5 грамм натрий нитрит 100 мл ўлчовли колбага солинади ва белгигача сув қўшилади.

Реактив шиша идишда сақлананди. Ишни бошлашдан олдин 10 миллилитр diaзореактив I ва 0,3 миллилитр diaзореактива II аралаштирилади.

5. Натрий карбонат, 0,1 моль/литр: 10,6 грамм сувсиз NaCO_3 эритилади ва 1 литргача сув қўшилади.

6. Сирка кислотаси, 4 моль/литр: 25 миллилитр концентирланган сирка кислотасига 100 миллилитргача сув қўшилади.

Иш тартиби:

Билирубинни аниқлаш кетма-кетлиги, 3 та пробиркаларга (2 та намуна ва 1 та бўш) реактив солинади, жадвал кўрсатилган бўйича:

Реагентлар	намуна, мл		Бўш проба, мл
	Умумий билирубин	боғланган билирубин	
Зардоб	0,5	0,5	0,5
Кофеин реактиви	1,75	-	1,75
Натрий хлорид эритмаси	-	1,75	0,25
диазоаралашма	0,25	0,25	-

Пробиркалардаги суюклик яхшилаб аралаштирилгандан сўнг ФЭК да 500-560 нм (яшил светофилтр) 0,5 см қалинликдаги кюветада сувга солиштириб уларнинг оптик зичлиги аниқланади.

2.8.2. Қон зардобдаги умумий оксил миқдорини аниқлаш усули.

Усулнинг принципи

Оксиллар ишқорий муҳитда мис сульфат билан реакцияга киришиб бинафша рангли комплекс бирикма ҳосил қилади. Бўялиш жадаллигига қараб зардобдаги оксил миқдори аниқланади.

Реактивлар:

1. Натрия хлориднинг 154 ммоль/л(изотоник эритмаси): 9 г NaCl 1 л дистилланган сувда эритилади. 2. Натрий гидроксидни 0,2 моль/л эритмаси: 8 г NaOH 1 л дистилланган сувда эҳтиёт бўлиб эритилади. 3. Калия йодиднинг 30

ммоль/л эритмаси: натрий гидроксиднинг 0,2 моль/л эритмасида тайёрланади: 0,5 г КОН 100 мл ҳажмли колбага солиниб Натрий гидроксиднинг 0,2 моль/л эритмаси билан эритилади (100 мл ҳажмгача). Реактив 2 ҳафта давомида қора идишда сақланса бузилмайди. 4. Шароб кислотанинг калий-натрийли тузи (4-сувли-сегнет тузи). 5. Мис сульфат 5-сувли тузи. 6. Биурет реактиви: 4,5 г сегнет тузини натрий гидроксиднинг 0,2 моль/л эритмасини 40 мл да унга 1 г мис сульфат ва 0,5 г калий йодид қўшиб эритилади. Эритманинг ҳажми 100 мл гача натрий гидроксиднинг 0,2 моль/л эритмаси ёрдамида етказилади. Реактив қора рангли шиша идишда сақланганда турғундир. 7. Биурет реактивини ишчи эритмаси: 20 мл биурет реактивини 80 мл 0,5% ли калий йодид эритмаси билан аралаштирилади. Реактив турғун. 8. Альбуминни калибровка эритмаси: 100 г альбумин (инсон қон зардобидан олинган) 154 ммоль/л натрий хлориднинг эритмасида эритилади:

Иш тартиби:

Намуна синамаси: 0,1 мл зардобга 5 мл биурет реактивини ишчи эритмаси қўшилади ва аралаштирилади, кўпик ҳосил бўлишидан эҳтиёт бўлиш керак. 30 дақиқадан сўнг (1 соатдан кўп эмас) фотометрнинг қалинлиги 1 см бўлган кюветасида 500-560 нм (яшил светофильтр) тўлқин узунлигида назорат эритмасига қарши ўлчанади.

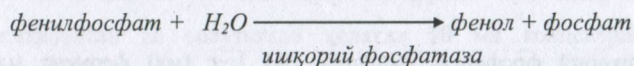
Назорат эритмаси: 5 мл биурет ишчи эритмасига 0,1 мл 154 ммоль/л натрий хлорид эритмаси қўшилади ва намуна синамасига ўхшаб ишлов берилади. Калибровка графиги асосида оксил миқдори ҳисобланади. Калибровка графигини яратиш: альбуминнинг калибровка эритмасидан қуйида кўрсатилганидек ишчи эритмалар тайёрланади.

Ҳар бир пробиркадан 0,1 мл га Биурет реактивининг ишчи эритмасидан 5,0 мл қуйилади ва 30-60 дақиқадан сўнг ФЭК да оптик зичлиги назорат намунасига солиштирилиб ўлчанади. Олинган натижалар асосида калибровка графиги курилади. Меъёрий кўрсаткичлари 65-85 г/л (6,5-8,5/100мл).

Пробирка раками	Альбуминни калибровка эритмаси, мл	Натрий хлориднинг 154 ммоль/л эритмаси, мл	Альбуминнинг концентрацияси, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	0	100

2.8.3. Қон зардобдаги ишқорий фосфатаза (ИФ) фаоллигини аниқлаш усули.

Фенолни 4-аминофеназон билан комплексини миқдорий аниқлашга асосланган бўлиб, бунда у натрий перийодатли муҳитда максимал нур ютилиши $\lambda = 560$ тўлқин узунлигида бўлган қизил рангга бўйлади.



Реактивлар: 1. 0,2 М фосфатли буфер, 0,1 % 4-аминофеназон билан $\text{pH} = 10,0$. Эритма совутгичда сақланганда 1 ой давомида тургун.

2. Субстрат-буферли эритма. 0,1 М фенилфосфатни динатрийли тузи 0,2 М фосфатли буферда, $\text{pH} = 10,0$. Ёки: тест жамламасидаги 1 та таблеткани 50,0 мл буфер эритмада эритилади. Эритма ишлатилишдан олдин тайёрланади.

3. Оксидловчи эритма. 0,5 % ли перийодат натрий (NaIO_4) дистилланган сувдадаги эритмаси. ёки: тест жамламадаги 10,0 мл концентранланган оксидловчи эритмани дистилланган сувда 100,0 мл гача суюлтирилади. Эритма совутгичда сақланганда узоқ муддат бузилмайди.

4. Асосий стандарт эритма: 50 ммоль/л фенолнинг дистилланган сувдаги эритмаси ёки: тест жамламада ампуладаги фенол эритмасини дистилланган сувда 50,0 мл гача суюлтирилади. Эритма совутгичда сақланганда ҳафта давомида яроилилигини йўқотмайди.

5. Анжомлар: фотометр, спектрофотометр, сув хаммоми, секундомер.

Фермент манбаи: эритроцитлар гемолизати, кон зардоби, 0,9 % NaCl да тайёрланган тўқима гомогенати.

Иш тартиби:

Пробиркага 2,4 мл субстрат солинади, 5 дақиқа давомида 37 °C сув хаммомида ушланади, 0,1 мл фермент манбаи солинади ва аралаштирилади, сув хаммомида 37 °C 10 дақиқа давомида инкубация қилинади. Инкубация охирида синамага 2,4 мл оксидловчи эритма қўшилади. Синама 5 дақиқа давомида эритма бўялиши учун хона ҳароратида ушланади ва унинг даражаси оптик йўли 10 мм бўлган кюветада дистилланган сувга қарши $\lambda = 560$ нм тўлқин узунлигида колориметр ёрдамида ўлчанади. Назорат синамаси: юқорида кўрсатилган таркиб бўйича тайёрланади, фақат 0,1 мл фермент манбаи оксидловчи эритмадан сўнг пробиркага солинади. Назорат синамаси ҳар бир фермент манбаи учун алоҳида тайёрланади.

Ҳисоблаш. Ишқорий фосфатаза фаоллиги (A) 1 г (мл) фермент манбаи томонидан 37 °C да 1 соат давомида инкубация қилинганда фенол миқдори билан ммоль да ифодаланади:

$$A = \frac{C \cdot n \cdot V \cdot 60}{V_a \cdot t}$$

Бу ерда: C – калибровка жадвалида топилган моллардаги фенол миқдори;
n – ишқорий фосфатаза сақловчи фермент манбаининг суюлтирилганлик даражаси;

V – бошланғич 1 г тўқима гомогенати ҳажми;

60 – соатни дақиқага айлантириш коэффициентини;

V_a – синамадаги фермент манбаи ҳажми;

t – инкубация давомийлиги, дақиқада.

2.8.4. Қон зардобида умумий холестерин миқдорини аниқлаш усули.

Кучли кислотали сувсиз муҳитда холестерин сульфат, сирка кислотаси ва сирка ангидриди билан ўзаро реакцияга киришади. Реакция давомида холестерин боқичма-боқич оксидланиб боради. Реакциянинг ҳар бир босқичи

холестерин молекуласи олдинги ҳосил бўлган бирикмага нисбатан биттага кўпроқ қўшалок боғга эга бўлган бирикма ҳосил бўлиши билан бирга кечади. Натижада охириги бирикмани оксидланишидан сульфат кислотада эрийдиган, 410 ва 610 нм да максимал абсорбция берувчи бўяладиган 3,5-холестодиен ҳосил бўлади. Бўялган бирикма турғун бўлмаганлиги сабабидан унинг фотометрияси аниқ вақтда амалга оширилиши керак.

Реактивлар:

1. Музлаш хоссасига эга бўлган сирка кислотаси.
2. Концентрланган сульфат кислотаси.
3. Сирка ангидриди.
4. Абсолют этил спирти.
5. Кислотали аралашма: куруқ колбага 10 мл музлаш хоссасига эга бўлган сирка кислотаси ва 50 мл сирка ангидриди қуйилади, сўнгра доимий аралаштирилган ва совутилган ҳолатда 10 мл концентрланган сульфат кислотаси қўшилади. Аралашма рангиз ёки бироз саргимтир бўлиши керак. Совутгичда қора рангли, қопқоғи зич ёпиладиган идишда сақланади.
6. Калибровка эритмаси: 232 мг холестеринни 2-3 мл хлороформда эритилади ва ҳажми 100 мл бўлгунча абсолют этил спирти қуйилади. Тайёрланган эритмада холестериннинг концентрацияси 6 ммоль/л ташкил қилади.

Иш тартиби.

2,1 мл кислотали аралашма устига пробирка девори бўйлаб секин 0,1 мл гемоллиз бўлмаган плазма ёки қон зардоби секин қўшилади, аралаштирилади ва 20 дақиқага 37 °С ҳароратга термостат ёки сув хаммомига қўйилади, сўнгра тўлқин йўли 0,5 см бўлган кюветада 625 нм тўлқин узунлигида фотометрия қилинади.

Калибровка эгрисини тузиш ва ҳисоблаш: 0,05-0,2 мл калибровка эритмасига кислотали эритма шундай миқдорда қўшилади-ки, эритмани умумий ҳажми 2,2 мл бўлиши керак, аралаштирилади ва 37 °С ҳароратда 20 дақиқа ушланади. Худди тажриба намунаси каби фотометрия қилинади. 0,05 мл олинган

калибровка намунасининг кўрсаткичи холестеринни плазмадаги 3 ммоль/л миқдорига тўғри келади; 0,1 мл олингани эса 6 ммоль/л тўғри келади ва х.

Эслатма:

1. Сув тушиши эритмани хира тортишига олиб келади.
2. Қон зардобида гемолиз ёки унинг излари ва гипербилирубинемия текшириш натижаларини юқори бўлишига сабаб бўлади.
3. Фотометрияни оптик йўли 1,0 см бўлган кюветаларда ҳам ўтказиш мумкин, бунда кислотали эритма миқдори 2 марта оширилади, лекин текшириляётган материал миқдори аввалгидек (0,1 мл) қолади.
4. Агар намунадаги холестерин концентрацияси 16 ммоль/л дан ортиқ бўлса, текшириш такрорланади, текшириш ўтказиляётган намуна 0,9% натрий хлорид эритмасида 1:1 нисбатда суялтирилади.

2.8.5. Қон зардобидаги зичлиги паст липопротеидлар (ЗПЛП) миқдорини аниқлашнинг бевосита усули.

Қон зардобида ЗПЛП лар таркибидаги холестерин бирорта ишлов бериш ёки центрифугалашсиз бевосита ўлчанади. Текшириш 2.боосқичда амалга оширилади.

1. ЗПЛПлардан бошқа ЛПЛлардан ҳалос бўлиш (элиминациялаш):

Холестерин-эфирлари $\xrightarrow{\text{Холестеринэстераза}}$ Холестерин + ёғ кислоталари

Холестерин + O₂ $\xrightarrow{\text{Холестериноксидаза}}$ 4-Холестенон + H₂O₂

2H₂O₂ $\xrightarrow{\text{Каталаза}}$ 2H₂O + O₂

2. ЗПЛПлардаги холестеринни аниқлаш

Холестерин –эфирлари $\xrightarrow{\text{Холестеринэстераза}}$ Холестерин + ёғ кислоталари

Холестерин + O₂ $\xrightarrow{\text{Холестериноксидаза}}$ 4-Холестенон + H₂O₂

2H₂O₂ + TODS + 4 – AA $\xrightarrow{\text{Пероксидаза}}$ Кинонимин + 4H₂O

Ҳосил бўляётган рангнинг даражаси текширув ўтказиляётган намунадаги ЗПЛПлар таркибидаги холестерин концентрациясига пропорционал.

Клиник аҳамияти: ЗПЛПлар таркибидаги холестеринни кўпинча “ёмон холестерин” деб аташади, чунки унинг юқори даражаси семириш, кандли

диабет ва нефроз билан биргаликда учрайдиган юрак – томир хасталикларини ривожланишининг кучли тахликага эга бўлган омил ҳисобланади. Клиник таъхис фақат биргина лаборатор тест асосида қўйилмайди, балки у бошқа лаборатор текширувлар натижаси ва клиник белгиларнинг барчасига асосланган бўлмоғи лозим.

Реактивлар

Реагент 1 (R1) ферментлар	GOOD pH 7.0 (20°C)	50 ммоль/л	
	Холестеринэстераза	380 Е/л	
	Холестеринооксидаза	380 Е/л	
	Каталаза	400 Е/л	
	N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-5-диметоксанилин (TODS)	0,45 ммоль/л	
Реагент 2 (R2) ферментлар	GOOD pH 7.0	50 ммоль/л	4-
	Аминоантипирин (4-АА)	1ммоль/л	
	Пероксидаза (POD)	1000 Е/л	
Калибратор HDLc/LDKc CAL	Холестерин ЗЮЛП/Холестерин ЗПЛП инсон қонининг лиофилизациялашган зардобы		

Тайёргарлик:

R1 ва R2 ишлатишга тайёр ҳолда бўлади.

HDLc/LDKc CAL: идишдаги моддалар 1 мл дистилланган сувда эритилди. Идиш қоққоғи беркитилиб модда эригунча шиддат билан чайқатилади. Реагентларни сақлаш ва уларни турғунликлари тўпламининг барча компонентлари қадоқланган идиш устида кўрсатилган муддатда (мустваккам беркитилган идишларда, 2-8 °C ҳароратда тўнкарилиб кетишини олдини олган ҳолатда) бузилмаслиги қафолатланган.

R1 ва R2: очилгандан кейин 2-8 °C да сақланса 4 ҳафта давомида турғун.

HDLc/LDKc CAL: Эритилгандан сўнг 2-8 °C да сақланса 1 ҳафта, -20 °C сақланганда 5 ҳафта давомида турғун.

Очилгандан сўнг сақлаш 2-8 °C бўлса, 2 ой.

Реагентлар ичида заррачалар ёки у лойқаланган бўлса, улардан фойдаланиш мумкин эмас.

Қўшимчалар:

- Нур фильтри 600 нм бўлган анализатор;
- Оптик йўли 1 см узунликка эга бўлган кюветалар;
- Керакли лаборатор анжомлар.

Намуналар:

Қон зардоби ёки гепаринизацияланган қон плазмаси гемолизсиз бўлиши лозим. Намуна олингач текширув (тест) имконияти борича тез ўтказилиши лозим. Қайтадан музлатиш ва намуналарни эритишга йўл қўймаслик мақсадга мувофиқ.

Қон зардоби 2-8 °С да сақланганда 7 кун давомида турғун

Иш тартиби.

1. Тест шароитлари:

Тўлқин узунлиги: 600 (590-700)нм

Кювета: оптик йўли 1 см

Ҳарорати: 37 °С

Услуб: стандарт бўйича белгиланган вақтда кинетикаси
3 с тўхтатиш, 300 с реакция

2. Солиштириш реактиви : Дистилланган сув ёки реагент 2 анализаторни дистилланган сувга қарши нолга қўйиш

3. Пробиркаларга куйидаги миқдорларда ўлчаб солиниш тартиби

	Бланк	Стандарт	Намуна
Калибратор	-	4 мкл	-
Намуна	-	-	4 мкл
Реагент 1	300 мкл	300 мкл	300 мкл

4. Аралаштирилган 5 дақиқа давомида 37 °С да инкубация қилинг. Намуна (A₁) ва стандартни оптик зичлигини 600 нмда ўлчанг.

5.

Реагент 2	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------	---------	---------	---------

6. Аралаштиринг 5 дақиқа давомида 37 °С да инкубация қилинг.

7. Намуна (A₂) ва стандартни оптик зичлигини 600 нм да ўлчанг.

Ҳисоблаш:

Намуна ва стандартни оптик зичлигини ўзгариши ҳисобланади: $\Delta A = A_1 - A_2$

$$C_{\text{хол ЗПЛП}} = \frac{\Delta A_{\text{намуна}}}{\Delta A_{\text{стандарт}}} \cdot C_{\text{стандартники}}$$

Ўзгартириш коэффициенти: мг/дл · 0,02586 = ммоль/л

Сифат назорати.

Иш тартиби характеристикасини мониторинг учун намуна тавсия этиладиган қон зардоблари. Агар намуна қиймати зарур бўлган ўлчамлардан ташқарида бўлса, ўлчов асбоби, реагентлар ва калибраторни камчиликларсиз эканлигини текшириш лозим. Агар назорат кўрсаткичлари керакли

натижаларни бермаса, ҳар бир лаборатория ўзларини назоратловчи тизимини ишлаб чиқаришлари лозим.

Референс қиймати.

Тахлика даражасини аниқлаш:

Тахлиф этилаётгани: <2,59 ммоль/л (<100 мг/дл)

Ўртача: 3,36-4,14 ммоль /л (130-160 мг/дл)

Юқори: >4,14 ммоль/л (>160 мг/дл)

Бу кўрсаткичлар чамалаш мақсадида келтирилган. Ҳар бир лаборатория ўзининг референт диапазонини аниқлаш лозим.

Тестнинг таснифи

Ўлчаш диапазони: аниқланаётган паст баландлик даражаси 0,096 ммоль/л (3,7 мг/дл) чизикли бўлиш даражасигача 25,86 ммоль/л (1000 мг/дл).

Агар олинган натижа чизикли даражадан ортиқ бўлса, намунани 2 марта

Натрий хлориднинг 9 г/л эритмасида эритиб натижани 2 га кўпайтириш керак.

Махсулдорлиги:

	Сериялар ичида			Сериялар орасида		
Ўртача (мг/дл)	63,2	107	49,0	65,2	112	253
SD	0,64	1,89	0,79	0,3	0,7	1,7
CV	1,01	1,76	1,61	0,45	0,6	0,65

Сезгирлиги: 1 мг/дл = 0,0012А

Интерференция.

Аскорбин кислотасини 50 мг/дл гача, гемоглобинни 500 мг/дл гача ёки билирубинни 30 мг/дл гача миқдори олинган натижаларни деярли ўзгартирмайди. ЗЛПЛ лардаги холестеринни аниқлашга таъсир этиши мумкин бўлган дори воситалари ва бошқа моддаларнинг рўйхати Young et al. да келтирилган.

2.8.6. Қон зардобдаги зичлиги юқори липопротеидлар (ЗЮЛП)

миқдорини аниқлашнинг бевосита усули.

Колорометрик усул билан ЗЮЛПдаги холестеринни бевосита ферматив аниқлаш.

Услуб принципи. ЗЮЛПлар холестеринни бевосита чўқтирмасдан аниқлаш услуби детергентнинг факат ЗЮЛПларни эритиш хоссасига асосланган. Бунда ЗЮЛПдан ажралган холестерин холестеринэстераза, холестериноксидаза ва хромогенлар билан реакцияга киришиб ранг хосил қилади. ЗЛПлар, зичлиги

жуда паст липопроteidлар ва хиломикронлар ушбу ферментатив реакцияда детергент улар юзасида адсорбциялангани учун блокланади. Эритма рангининг даражаси намунадаги зичлиги юкори бўлган липопроteidлардаги холестерин концентрациясига пропорционал.

Клиник аҳамияти: ЗЮЛПлар заррачалари кон окимида липопроteidлар транспортини таъминлайди. Бундан ташқари ЗЮЛПларни “яхши холестерин” деб аташади, чунки унинг юкори даражаси юрак-томир хасталикларини ривожлантириш хафини камайтиради ва аксинча унинг камайиши юрак-томир хасталиги ривожланиш хафини оширади. Клиник ташхиз қўйиш фақат шу тест натижаси билан чекланмаслиги лозим, балки у бошқа лаборатор текширишлар ва клиник белгилар мажмуаси асосида қўйилмоғи даркор.

Реагентлар таркиби

Реагент 1 (R1) ферментлар	GOOD pH 7.0 (20°C)	
	Холестеринооксидаза	< 1000 Е/л
	Пероксидаза	< 1300 Е/л
	DSBmT	< 1 ммоль/л
Реагент 2 (R2) ферментлар	GOOD pH 7.0	
	Холестеринэстераза	< 1500 Е/л
	4-Аминоантипирин (4-AP)	< 1 ммоль/л
	Детергент	< 2%
	Аскорбинооксидаза	< 3000 Е/л
Калибратор HDLc/LDLc CAL	Холестерин ЗЮЛП/Холестерин ЗПЛП инсон қонининг лиофилизациялашган зардоби	

Огохлантириш

HDLc/LDLc CAL: Инсон зардобининг таркибий қисмлари ушбу тестга салбий таъсир кўрсатмаслиги тан олинган, жумладан HbsAg, С гепатит вируси ва ВИЧ ½ (HIV ½)га қарши таначалар (антитела). Аммо улар билан юкумлиликга эга бўлган моддалар билан мулоқат қилиш керак.

Тайёргарлик:

R1 ва R2 ишлатишга тайёр ҳолда бўлади.

HDLc/LDKc CAL: идишдаги моддалар 1 мл дистилланган сувда эритилдаи. Идиш қоққоғи беркитилиб модда эригунча шиддат билан чайкатилади. Реагентларни сақлаш ва уларни тургунликлари тўпланинг барча компонентлари қадоқланган идиш устида кўрсатилган муддатда (мустахкам беркитилган идишларда, 2-8 °C ҳароратда тўнкарилиб кетишини олдини олган ҳолатда) бузилмаслиги қафолатланган. Реагентларни музлатиш мумкин эмас.

R1 ва R2: очилгандан кейин 2-8 °C да сақланса 8 ҳафта давомида тургун.

HDLc/LDKc CAL: Эритилгандан сўнг 2-8 °Cда сақланса 1 ҳафта, -20 °C сақланганда 5 ҳафта давомида тургун.

Очилгандан сўнг сақлаш 2-8 °C бўлса, 2 ой.

Реагентлар ичида заррачалар ёки у лойқаланган бўлса, улардан фойдаланиш мумкин эмас.

Кўшимчалар:

- Нур фильтри 600 нм бўлган анализатор;
- Оптик йўли 1 см узунликка эга бўлган кюветалар;
- Керакли лаборатор анжомлар.

Намуналар:

Қон зардоби ёки гепаринизацияланган қон плазмаси гемолизсиз бўлиши лозим. Намуна олингач текширув (тест) имкониёчи борича тез ўтказилиши лозим. Қайтадан музлатиш ва намуналарни эритишга йўл қўймаслик мақсадга мувофиқ.

Қон зардоби 2-8°C да сақланганда 7 кун ёки -20°Cда 1 ой давомида тургун.

Иш тартиби.

4. Тест шароитлари:

Тўлқин узунлиги: 600 -700 нм

Кювета: оптик йўли 1 см

Ҳарорати: 37 °C

Услуб: стандарт бўйича белгиланган вақтда кинетикаси
3 с тўхтатиш, 300 с реакция

Бланк: дистилланган сув ёки реагент бўйича

5. Солиштириш реактиви : Дистилланган сув ёки реагент анализаторни дистилланган сувга қарши нолга қўйиш

6. Пробыркаларга қуйидаги миқдорларда ўлчаб солиниш тартиби

	Бланк	Стандарт	Намуна
Калибратор	-	3 мкл	-
Намуна	-	-	3 мкл
Реагент 1	300 мкл	300 мкл	300 мкл

7. Аралаштирилган 5 дақиқа давомида 37 °С да инкубация қилинг.

8. Намуна (A₁) ва стандартни оптик зичлигини 600 нмда ўлчанг.

9. Қўшинг:

Реагент 2	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-----------	---------	---------	---------

7. Аралаштириг 5 дақиқа давомида 37 °С да инкубация қилинг.

8. Намуна (A₂) ва стандартни оптик зичлигини 600 нм да ўлчанг.

Ҳисоблаш:

Намуна ва стандартни оптик зичлигини ўзгариши ҳисобланади: $\Delta A = A_1 - A_2$

$$C_{\text{хол ЗЮЛП}} = \frac{\Delta A_{\text{намуна}}}{\Delta A_{\text{стандарт}}} \cdot C_{\text{стандартники}}$$

Ўзгартириш коэффициенти: мг/дл · 0,02586 = ммоль/л

ЗПЛП холестерини концентрациясини ажратиб ташлаш.

ЗПЛП лардаги холестерин концентрацияси умумий холестерин концентрациясидан ЗЮЛП лар холестерини ва триглицеридлар концентрацияси инобатга олинган ҳолда қуйидаги формула билан ҳисобланади:

$$\begin{aligned} \text{ЗПЛП}_{\text{хол.}} &= \text{УХ} - \text{ЗЮЛП}_{\text{хол.}} - \frac{\text{TГ}}{5} \text{ (мг/дл) ёки} \\ \text{ЗПЛП}_{\text{хол.}} &= \text{УХ} - \text{ЗЮЛП}_{\text{хол.}} - \frac{\text{TГ}}{2,2} \text{ (ммоль/л)} \end{aligned}$$

Сифат назорати.

Иш тартиби характеристикасини мониторинг учун намуна тавсия этиладиган қон зардоблари. Агар намуна қиймати зарур бўлган ўлчамлардан ташқарида

бўлса, ўлчов асбоби, реагентлар ва калибраторни камчиликларсиз эканлигини текшириш лозим. Агар назорат кўрсаткичлари керакли натижаларни бермаса, ҳар бир лаборатория ўзларини назоратловчи тизимини ишлаб чиқаришлари лозим.

Референс қиймати.

Тахлика даражасини аниқлаш:

	Эркаклар		Аёллар	
Паст тахлика:	1,29 ммоль/л	>50 мг/дл	1,55 ммоль/л	>60 мг/дл
Стандарт тахлика:	0,91-1,29 ммоль/л	35-50 мг/дл	1,16-1,55 ммоль/л	45-60 мг/дл
Юқори тахлика:	0,91 ммоль/л	<35 мг/дл	<1.16 ммоль/л	<45мг/дл

Бу кўрсаткичлар чамалаш мақсадида келтирилган. Ҳар бир лаборатория ўзининг референт диапазонини аниқлаш лозим.

Тестнинг таснифи

Ўлчаш диапазони: аниқланаётган паст баландлик даражаси 0,065 ммоль/л (2,5 мг/дл) чизиқли бўлиш даражасигача 5,17 ммоль/л (200 мг/дл).

Агар олинган натижа чизиқли даражадан ортиқ бўлса, намунани 1:2 марта Натрий хлориднинг 9 г/л эритмасида эритиб натижани 2 га кўпайтириш керак. Махсулдорлиги:

	Сериялар ичида			Сериялар орасида		
	32,9	50,6	101,4	32,8	50,0	100,1
Ўртача (мг/дл)	32,9	50,6	101,4	32,8	50,0	100,1
SD	0,3	0,2	0,7	0,4	0,7	1,1
CV	0,8	0,5	0,7	1,3	1,5	1,1

Сезгирлиги: 1 мг/дл = 0,0016А

Интерференция.

Тўғри ва умумий билирубинни 60 мг/дл гача, гемоглабинни 1000 мг/дл ёки липемия 1800 мг/дл гача миқдори олинган натижаларни деярли ўзгартирмайди.

2.8.7. Қон зардобидаги сут кислотаси микдорини аниқлаш усули.

Реактивлар:

6. 5% УХСК (уч хлор сирка кислотаси);
7. Концентрланган сульфат кислотаси;
8. Мис сульфат реактиви (3,0 мл концентрланган ортофосфат кислотасига 1 гр мис сульфат қўшилади);
9. 5% Натрий хлорид эритмаси;
10. Параоксидифенил (ПОДФ) 1,5 % сувли эритмаси.

Иш тартиби:

5% УХСК эритмасидан 1 мл ни тутган пробиркаларга жониворлар қон зардобидан 0,1 мл қўйилиб аралаштирилади ва 1500 об/дақиқа 5 дақиқа давомида центрифугаланади. Чўкма устидаги суюқликдан 0,2 мл олиниб устига 3,0 мл сульфат кислотаси ва 0,1 мл мис сульфатнинг эритмаси қўшилади, пробиркалар қайнаб турган сув хаммомига жойлаштирилади, сўнг совутилиб 2 томчидан ПОДФ қўшилади ва жадал чайқатилиб 10 дақиқага хонада қолдирилади. Сўнг уларни қайнаб турган сув хаммомига 1,5 дақиқага жойлаштирилади. Совутилгач ФЭК №7 нур фильтрида кесими 0,5 мм бўлган кюветаларда концентрланган сульфат кислотасига солиштирилган ҳолатда уларни оптик зичлиги ўлчанади.

2.9. Синалаётган янги бирикмаларни ёғларни перикисли оксидланиш жараёнига таъсирини ўрганиш усули.

Ёғларни перикисли оксидланиши (ЁПО) хужайра мембраналарини таркибий қисми бўлган фосфолипидларнинг нобуд бўлишига ва шу туфайли улар билан боғлиқ бўлган ферментлар фаоллигини кескин сусайишига олиб келади. Бу ўз навбатида апоптоз – хужайра ўлимига олиб келади. Физиологик шароитда тўқима хужайраларининг янгиланишида ушбу жараён муҳим ўрин тутади. Патологияларда қон айланиши (микроциркуляция) бузилиши тўқималар гипоксиясини ривожлантиради ва ЁПО даражаси кескин кучайиб кетади. Ҳозирги кунда олимлар гепатопротекторларнинг антиоксидантлик

хоссасига эга эканлигини яқдиллик билан тасдиқлайдилар. Демак, гепатопротекторлар ЁПО тўхтатиш хоссасига эга экан. Бунда улар эркин радикалларни сўндириш ёки антиоксидант системасига тегишли ферментлар (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза в.х.к.) фаоллигини тиклаш ёки уларни ошириш билан амалга ошади. Ушбуларни инобатга олиб гепатопротекторлик хоссаси мавжудлиги тахмин қилинаётган бирикмаларни ЁПО жараёнига таъсирини ўрганиш лозим. Бу йўсиндаги тадқиқотларда жигарни прооксидантлик хоссасига эга бўлган гепатопротекторлар таъсирида (тетрахлометан, парацетамол, этил спирти, аллил спирти ва бошқалар) ривожланадиган моделлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқдир. Жигар патологиясини ривожлантириш учун гепатотоксинлар киритишдан аввал (1-2 соат) ёки улар билан биргаликда синалаётган бирикма самарадор дозада киритилиб 24 соатдан кейин қон зардобиди ёки жигар тўқимасининг гомогенатида ЁПО маҳсулотларини аниқлаш талаб қилинади. Қўшимча диенконъюгатлар (гидроперикислар, малондиальдегидини тиобарбитур кислотаси билан ҳосил қиладиган бирикмалари аниқланади).

Бундан ташқари қайтарилган ва оксидланган глутатион ҳамда номлари юқорида қайд этилган ферментлар фаоллигини ўрганиш асосида жигарни антиоксидантлик тизимини фаоллигини аниқлаш мумкин.

2.9.1. Қон зардобиди гидроперикислар миқдорини аниқлаш усули.

Реактивлар:

1. Этилендиаминтетраацетат – ЭДТА (1 мг/мл);
2. Гептан ва изопропанол (1:1) аралашмаси;
3. Гептан;
4. Хлорид кислотасининг рН-2 бўлган эритмаси.

Иш тартиби.

Венадан олинган қон зардобини 0,2 мл га 4,0 мл гептан+изопропанол аралашмаси қўшиб лаборатор силкитгичда 10-15 дақиқа аралаштирилади. Сўнгра, пробиркаларга 1,0 мл хлорид кислотаси эритмаси ва 2,0 мл гептан

қўшилади ва шиддат билан аралаштирилади. 20-30 дақиқа ўтгач суюқлик иккига ажралади. Уни гептан қисми тартиб олиниб оптик қалинлиги 1,0 см бўлган кюветаларда эриитманинг оптик зичлиги спектрофотометрнинг D_{233} тўлқин узунлигида ўлчанади. Солиштирама намуна юқорида келтирилган тартибда тайёрланган аралашманинг 0,2 мл қон зардоби ўрнига дистилланган сув қўшиш билан тайёрланган аралашмадан иборат бўлади. Қон зардобидаги липидлар гидроперикиси нисбий бирликда куйидаги формула билан ҳисобланади:

$$D_{233} = \frac{(\Delta_{233} \cdot V_3)}{V_p} = 20 \cdot \Delta_{233}$$

Бу ерда, V_3 - гептан экстрактининг умумий ҳажми – 4,0 мл;

V_p – текширишга олинган қон зардобининг миқдори – 0,2 мл;

Δ_{233} – спектрофотометрнинг кўрсаткичи (экстинкцияси).

2.9.2. Ёғларни перикисли оксидланиш маҳсулотларини тиобарбитур кислотаси (ТБК) воситасида аниқлаш усули.

Таркибида 2-3 та диен боғи бўлган ёғ кислоталарини перикисли оксидланиш маҳсулотлари ичида ТБК билан бирикиб ҳосил бўладиган асосий маҳсулот бу малон деальдегидидир (МДА). Соғлом танада унинг миқдори жуда паст бўлиб, патлогияда кўпаяди. Шу сабабли гепатопротекторларни МДА миқдорига таъсирини ўрганиш муҳим аҳамиятга эга.

Реактивлар:

1. Ортофосфор кислотасининг 1% ли эритмаси;
2. ТБК нинг 0,6% ли эритмаси (қўллашдан 0,5-1 соат олдин тайёрланади);
3. Темир сульфат эритмаси (28 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ни 10 мл дистилланган сувда эритилади);
4. Бутанол (кимёвий тоза);

Иш тартиби.

0,3 мл янги ажратилган қон зардобига ёки плазмага (ЭДТА бўлиши керак эмас) 3,0 мл ортофосфор кислотасининг эритмаси қўшилади ва устига 1,0 мл

ТБК эритмаси қўйилади, сўнгра 0,1 мл темир сульфат эритмаси қўйилади. Пробиркадаги суюқлик яхшилаб аралаштирилгач сув хаммомига 1 соатга қўйилади. Совитилгач 4,0 мл бутанол қўйилади, жадал аралаштирилиб 3000 айл/дакика тезликда 10 дакика центрифугаланади. Сўнгра бутанол қисми тортиб олиниб спектрофотометрнинг 535 нм тўлқин узунлигида бутанолга қарши ўлчанади. Биологик намунадаги МДА миқдори қуйидаги формула билан аниқланади.

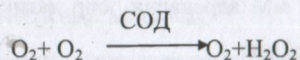
$$A = \frac{E_{\text{таж}} \cdot 10^6 \cdot 4 \text{ мл}}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,3 \text{ мл}} = E_{\text{таж}} \cdot 85,47 \text{ (нмоль/мл ёки мкмоль/л)}.$$

A – намунадаги МДА миқдори (мкмоль/л ёки нмоль/л)

Бу ерда, $1,56 \cdot 10^5$ - моль·см⁻¹ МДАнинг моляр экстинкция коэффициентидир. 4 мл бутанол фазасининг ҳажми, 0,3 – кон зардобининг ҳажми.

2.9.3. Супероксиддисмутаза ферменти фаоллигини аниқлаш усули.

Супероксиддисмутаза (СОД) супероксид анион – радикаллари дисмутазалайди, яъни водород пероксидга айлантиради.



Ҳосил бўлган маҳсулот каталаза ферменти таъсирида сувга айланади ва СОД ни инактивация бўлишидан сақлайди. СОД нинг турлари кўп ва улар хужайра органелларининг турли қисмларида жойлашган ва таркибида ҳар – хил металллар учрайди (Zn, Cu, Mn, Fe). Ҳайвонлар тўқимасида ушбу фермент митохондрияларда жойлашган.

Реактивлар:

1. Адреналинни 1% эритмаси (дорихонадан олинади) 5,46 ммоль/л;
2. 0,2 М бикарбонат буфери рН – 10,65 (0,2 М бикарбонат буфери эритмасига NaHCO₃ куруқ кукунини қўшиш орқали рН – 10,65 гача келтирилади) ;
3. NaCl нинг 0,9% физиологик эритмаси;
4. ТБК нинг 0,25 % эритмаси.

Фермент манбаи сифатида тўқималар гомогенати, эритроцитлар гемолизатлари қўлланиши мумкин.

Иш тартиби:

Тажриба намунаси кюветага 2 мл карбонат буфери қуйилиб устидан 0,1 мл адреналин эритмаси ва 0,1 мл фермент манбаи қўшилгач, яхшилаб аралаштирилиб тезлик билан спектрофотометрнинг 347 нм тўлқин узунлигида ўлчанади, сўнгра намуналарнинг оптик зичлиги ҳар 15 – 30 секундда сувга нисбатан 3-5 дақиқа давомида ўлчанади. Стандарт намунаси худди тажриба намунасига ўхшаб тайёрланади, фақат фермент манбаи ўрнига 0,1 мл дистилланган сув қўшилади. Олинган натижалар жадвал сифатида ёзилгач фермент фаоллигини ҳисоблаш учун қуйидаги ишлар амалга оширилиши керак:

- Оптик зичлигини динамикада ўлчаш натижаларига асосланиб адреналинни ишқорий шароитда аутооксидланиш ва СОД таъсирида уни ингибицияланиши эгри чизиғини тузиш.
- СОД фаоллигини адреналинни аутооксидланишини ишқорий шароитда ингибицияланиш даражасини ҳисоблаш ва уни фоизларда фермент манбаи бирлигига ҳамда мМ адреналин бир дақиқада фермент манбаи бирлигига нисбатан ҳисоблаш.
- Адреналинни аутооксидланиш тезлигини аниқлашда спектрофотометрнинг 347 нм тўлқин узунлигига адреналин эритмасини 5,46 ммоль эканлигини инobatга олиб ҳисоблаш лозим (% ёки ммоль/дақ).

Ҳисоблаш:

Ингибицияланиш % (фаоллик бирлиги) = $[1 - (E_{ст} - E_{таж} \cdot V/E_{ст} \cdot t \cdot V_0)] \cdot 100$

Бунда - $E_{ст}$ ва $E_{таж}$ мос равишда стандарт ва тажриба намуналарининг экстинкцияси;

t – аутооксидланиш давомийлиги, дақиқада;

V – эритроцитлар гемолизатининг бошланғич ҳажми (ёки 1 гр тўқима гомогенатининг ҳажми);

V_0 – намунадаги фермент манбасининг ҳажми.

Фермент фаоллигини қуйидаги формула ёрдамида ҳам ҳисоблаш мумкин.

$$A = \Delta E \cdot K \cdot V/t \cdot V_0$$

Бунда – А фермент фаоллиги мМ адреналин/дақиқа · фермент манбаи ҳажми бирлиги;

ΔE – стандарт ва тажриба намуналарининг экстинкцияси орасидаги фарқи;

K – адреналинни мМ га ҳисоблаш коэффиценти;

V_0 – намунадаги фермент манбасининг ҳажми.

V – эритроцитлар гемолизатининг бошланғич ҳажми ёки 1 г тўқима гомогенатининг ҳажми;

t – адреналинни аутооксидланишини инкубацияланиш давомийлиги, дақиқаларда.

2.9.4. Каталаза ферменти (КТ) фаоллигини аниқлаш усули.

Каталаза ферменти водород периксидан сув ҳосил бўлишини таъминлайди.

Реактивлар:

1. 0,3% водород периксининг эритмаси;
2. 4% ли $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ ёки MoO_4Na_2 .

Фермент манбаи сифатида тўқималар гомогенати, эритроцитлар гемолизатлари қўлланиши мумкин.

Иш тартиби:

2,0 мл перикис эритмасига 0,1 мл фермент манбаи қўшилади. Аниқ 10 дақиқадан кейин $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$ нинг 1,0 мл эритмаси қўшилади, ҳосил бўлган ранг даражаси спектрофотометрнинг 410 нм тўлқин узунлигида назорат намунасига қарши ўлчанади (назорат намунаси барча реактивлар бўлиб 2,0 мл перикис эритмасига ўрнига дистилланган сув қўшилади). Бўш намуна тайёрлашда фермент манбаи ўрнига 0,1 мл дистилланган сув олинади.

Ҳисоблаш:

$$A = (E_{\text{бўш}} - E_{\text{таж}}) \cdot K \cdot V/t \cdot V_0$$

Бунда – А каталаза ферментининг фаоллиги мМ/дақ⁻¹ · г (мл);

E – бўш ёки тажриба намуналарининг оптик зичлиги;

K – перикис водородни мМ экстинкция коэффициенти ($22,2 \cdot 10^3 \text{ Мм}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);

V_0 – намунага қўшилган ҳажм (0,1 мл);

V – эритроцитлар гемолизатининг ёки 1 г тўқима гомогенатининг бошланғич ҳажми;

t – инкубацияланиш давомийлиги, дақиқаларда.

2.9.5. Глютатионпероксидаза (ГП) фаоллигини аниқлаш усули.

ГП фаоллиги нафақат H_2O_2 , балки ёғларни перикисли оксидланиши кучайганда ҳосил бўлувчи бошқа органик липидпероксинларини ҳам зарарсизлантиради (жумладан, линолен ва линоленол кислоталарнинг гидроперекисларини, холестерин-7 β гидроперокси, баъзи синтетик моддалар (кумен-, трет-бутил - гидропероксидлари). ГП оксиллар, липидлар НАДФ-Н, НАДНларни оксидланишидан ҳимоя қилади, липидларнинг перикисини қайтаради. Сут эмизувчиларда ГП энг юқори фаоллигини жигар, эритроцитлар ва буйрак усти безида аниқланган. Ушбу ферментни фаоллигини кескин сусайиши липидларни перикисли оксидланишининг кучайиб кетишига олиб келади.

Реактивлар:

1. 0,3 М К-фосфатли буфер рН 7,4;
2. 12 мМ Азиднинг натрийли тузи;
3. 6 мМ ЭДТА (этилендиамин тетра ацетат);
4. 2,5 мМ қайтарилган глютатион;
5. 1,8 мМ H_2O_2 ;
6. 10% УХК (уч хлорсирка кислотаси);
7. 250 мМ сахароза;
8. 0,1 мМ ЭДТА (этилендиамин тетра ацетат);
9. 10 мМ трис-НСl буфер рН 7,4;
10. 3,8% натрий цитрат.

Инкубация муҳитининг таркиби (1 та намуна учун)

1. 1,0 мл Калий фосфат буфери;

2. 12 мМ тугган азиднинг натрийли тузидан 0,1 мл;
3. 6 мМ ЭДТА тугган эритмадан 0,1 мл;
4. Қайтарилган глютатион (GSH) эритмасидан 0,5 мл;
5. Фермент манбаи 0,2 мл (эритроцитлар гемолизати ёки тўқималар гомогенати);
6. Водород перекисининг эритмасидан 0,5 мл.

Иш тартиби:

Пробиркаларга инкубация мухитидан 1,7 мл дан куйилиб устига 0,2 мл фермент манбаи куйилади. Реакцияни H_2O_2 эритмасидан 0,5 мл қўшиб бошланади. Назорат намунасига фермент манбаи ўрнига 0,2 мл фосфат буфери қўшилади, 2 дақиқадан сўнг УХКдан 1,0 мл куйилади ва 3000 айл/дақиқа тезликда 15 дақиқа давомида центрифугаланади. Назорат намунасидаги оксидланган глютатионни спектрофотометрнинг 260 нм тўлқин узунлигида водород пероксидига нисбатан, тажриба намунасиоптик зичлигини эса назорат намунасига нисбатан аниқланади.

Ҳисоблаш:

$$A = \frac{\Delta E \cdot \gamma}{2} \cdot 40 \text{ (мкМ ГССГ/мл} \cdot \text{дак}^{-1}\text{)};$$

Бунда, А-ГП фаоллиги

$$\Delta E = E_{\text{наз}} - E_{\text{таж}}$$

$E_{\text{наз}}$ – назорат намунасининг оптик зичлиги

$E_{\text{таж}}$ – тажриба намунасининг оптик зичлиги

2 – реакция давомийлиги дақиқада

40 – эритроцитларнинг гемолизатининг 1,0 мл га қайта ҳисоблаш коэффициенти

γ – ГССГ ни мкМ га ҳисоблаш коэффициенти.

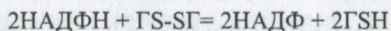
Фермент фаоллигини 1,0 г тўқимага ҳисоблаш:

$$A = \frac{\Delta E \cdot \gamma}{2} \cdot 50 \text{ (мкМГССГ/мл} \cdot \text{дак}^{-1}\text{)};$$

Бунда, 50 – фермент фаоллигини 1,0 г тўқимага ҳисоблаш коэффиценти.

2.9.6. Глютатионредуктаза фаоллигини аниқлаш.

Ушбу фермент оксидланган глютатиондан қайтарилган глютатионни ҳосил бўлишини амалга оширади.



Реактивлар:

1. 0,05 М калий фосфат буфер рН 8,0 (K₂PO₄/KOH)
2. 1мМ ЭДТА (этилендиамин тетра ацетат);
3. 7,5 мМ оксидланган глбтатион;
4. 1,2 мМ НАДФ·Н;
5. 250 мМ сахароза;
6. 10 мМ трис-НСl буфер рН 7,4;
7. 3,8% натрий цитрат.
8. 0,1мМ ЭДТА (этилендиамин тетра ацетат).

Инкубация муҳитининг таркиби (1 та намуна учун).

1. Калий фосфат буфер 2,0 мл;
2. 1 мМ ЭДТА эритмасидан 0,2 мл;
3. 7,5 мМ оксидланган глютатион эритмасидан 0,5 мл;
4. Фермент манбаи;
5. НАДФ·Ннинг 1,2 мМ эритмасидан 0,1 мл.

Фермент манбаи сифатида эритроцитларнинг гемолизати ёки тўқималар гомогенати қўлланилади.

Иш тартиби :

Спектрофотометрнинг кюветасига 2,7 мл инкубацион муҳит ва 0,2 мл фермент манбаи қўшилади. Реакция 0,1 мл НАДФ·Н қўшилгач бошланади ва

тезлик билан аралашманинг оптик зичлиги 340 нм да ва кейинчалик 10 дақиқа давомида 37 °Сда қайта ўлчанади.

Глютатионредуктаза фаоллигини эритроцитлар гемолизатининг ёки қон зардобининг мл га ҳисоблаш:

$$A = \frac{\Delta E \cdot \gamma}{10} \cdot 40;$$

Бунда, А-глютатионредуктаза ферменти фаоллиги мкМНАДФН/мл/ дақ

$$\Delta E = E_0 - E_{10}/$$

γ - НАДФ · Н ни мкМ га ҳисоблаш коэффенценти

E_0 – инкубация муҳитининг реакция бошланишидан аввалги оптик зичлиги

E_{10} – 10 дақиқа давом этган реакциядан кейинги инкубация муҳитининг оптик зичлиги.

10– реакция давомийлиги дақиқларда

40 – 1,0 мл эритроцитлар гемолизатига ҳисоблаш коэффиценти

Тўқимадаги глютатионредуктаза фаоллигини ҳисоблашда 40 коэффиценти ўрнига 50 коэффицентидан фойдаланилади.

2.9.7. Қайтарилган глютатионни аниқлаш усули.

Реактивлар.

1. Чўкма ҳосил қилиш реактиви. 500 мл хажмдаги шиша идишга дистилланган сувнинг кичик хажмларида эритилган (музланадиган) метафосфор кислотаси – 6,68 г, трилон Б – 0,8 г, натрий хлорид – 120,0 г қўшилиб, эритмани хажми 400 мл гача етказилади;
2. 0,3 М Na_2HPO_4 ;
3. Элман реактиви (5',5-дителиобис-2-нитробензой кислота) – 0,04% эритма;
4. Қайтарилган глютатионнинг стандарт эритмаси – 5ммоль/л, ундан суолтириш асосида 9 та ишчи эритмалар тайёрланади: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ва ҳақозо 8,5 ммоль/л гача.

Биологик материал сифатида эритроцитлар гемолізати, қон зардоби, тўқима гомогенати олиниши мумкин.

Иш тартиби:

Ингредиентлар	Тажриба намунаси, мл	Бўш намуна, мл
Биологик материал	2,0	-
Чўкмага туширувчи реактив	3,0	3,0
Дистилланган сув	-	2,0
Аралаштирамиз ва хона ҳароратида ушлаб турамыз, сўнгра 15 дақиқа давомидида 3000-3500 айл/дақиқа центрифугаланади, кейин чўкма усти (центрифугат) суюқлиги олинади.		
Центрифугат	2,0	2,0
0,3 М Na_2HPO_4	8,0	8,0
Эллман реактиви	0,1	0,1

5 дақиқадан сўнг тажриба намунасини назорат намунасига солиштирган ҳолда қалинлиги 10 мм бўлган қюветаларда 412 нм тўлқин узунлигида ўлчанади, қайтарилган глютатионни миқдорини стандарт эритмани турли концентрацияларини оптик зичлигини инобатга олиб ўтказилган эгри чизик асосида ҳисобланади. Глютатионни миқдорини ммоль/мл эритроцитлар гемолізати ёки қон зардобига нисбатан ифодаланади.

2.9.8. Оксидланган глютатионни аниқлаш усули.

Асосий пробиркага 2,5 мл Na_2HPO_4 , 0,3 мл Эллман реактиви ва 0,2 мл оксил тугмаган центрифугат қўшилади. 5 дақиқадан кейин уни назорат намунасига (таркибида оксил бўлмаган филтрат) солиштириб 480 нм да

ўлчанади. Оксидланган глутатион миқдорини аввалдан оксидланган глутатионнинг стандарт эритмасини (2 мМ/л гача) 480 нм оптик зичлиги кўрсаткичлари асосида тузилган эгри чизик асосида ҳисобланади. Оксидланган глутатион миқдорини ммоль/мл эритроцитлар гемолизати ёки қон зардоби кўринишида ифодаланади.

3. Ажратилган гепатоцитлар

3.1. Гепатоцитларни ажратиш усули.

Тажриба ҳайвонларини наркоз остида (этаминал натрий, кетамин, тиопентал натрий ва бошқалар) қорин бўшлиғи очилади ва жигарни дарвоза венасига игна жойлаштириб боғланади. Жигардан чиққан венани кесилади ва шу асосида жигарни қондан тозалаш мақсадида перфузия қилинади. Перфузия қилиш эритмаси атмосфера ҳавоси билан тўйинтирилган бўлиб таркибида 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 3 мМ NaHCO₃, 27 мМ лимон кислотасининг натрийли тузидан иборат бўлади, эритманинг pH-7,4, ҳарорати 37 °C бўлиши керак. Ушбу эритма билан жигар 10-20 дақиқа перфузиялангач таркибида қўшимча ЭДТА (охирги концентрацияси 2 мМ) бўлган перфузия эритмаси билан яна 20-30 дақиқа перфузия қилинади. Шундан сўнг жигарни қорин бўшлиғидан ажратиб олиниб, тезлик билан ҳарорати 0 °C бўлган, таркибида 250 мМ сахароза, 5мМ KCl, 1,6 мМ Na₂HPO₄, 0,4 мМ K₂HPO₄, 0,8 мМ MgCl₂, 10 мМ трис HCl, 1% БСА (хўкизни қон зардобидан ажратилган альбумин) тутган ва pH-7,4 бўлган эритмага солиниб қайчи билан майдаланади. Тўқиманинг бўлакчаларини ушбу эритма муҳитида частотаси 50 Гц да 60 сония давомида вибрация қилинади. Ушбу жараёнда жигарнинг 70% қисми алоҳида хужайраларгача ажралади. Нелон элақдан ўтказилган суюқлик таркибида 30-40% хужайралар соғлом жароҳатланмаган ҳолда бўлади. Нобуд бўлган хужайралардан ҳалос бўлиш учун ушбу суспензияни 100 айл/дақ тезликда 1-2 дақиқа мобайнида центрифугаланади. Ажратиб олинган соғлом хужайраларни таркиби 10 мМ HEPES – NaOH ва 10 мМ глюкоза тутган pH-7,4 Кребс-Гейзелейт эритмасида инкубация қилинади. Бунда хужайраларнинг концентрацияси 1 мл да 2 млн бўлиши лозим. Инкубация карбоген (95% O₂ +

5% CO₂) атмосферасида 37 °C хароратда доимий аралаштириб турилган бўлади.

3.2. Гепатоцитларни плазматик мембраналарини ҳолатини аниқлаш усули.

Бунинг учун гепатоцитларни трипан кўкининг 0,5%ли эритмаси билан бўйаш услубини кўллаш мумкин. Унинг асосида трипан кўкини соғлом хужайранинг плазматик мембранасидан ўта олмаслиги ётади. Бўйашни гепатоцитлар ва 0,5% трипан кўки эримаси 1:9 нисбатда 5 дақиқа давомида амалга оширилади. Гепатоцитларни ҳисоблаш Горяев камерасида лейкоцитларни миқдорини ҳисоблаш усули бўйича аниқланади. Шуни назарда тутмоқ лозимки, плазматик мембранаси жароҳатланган гепатоцитлар кўк рангга эга бўлади. Соғлом гепатоцитлар эса бироз сариқ рангга эга бўлиб, доира шаклида бўладилар. Ушбу услубда соғлом хужайраларни миқдори 80-85% ташкил этади. Гепатоцитларни плазматик мембранасини жароҳатланиш даражасини баҳолаш бошқа услуб билан яъни сукцинат таъсирида рағбатлантирилган эндоген нафас олиш орқали амалга ошириш мумкин. Бу услубнинг асосида сукцинатни гепатоцитларнинг жароҳатланмаган плазматик мембранасидан ўта олмаслиги ётади. Услубни амалга ошириш учун гепатоцитларни Дюльбеко муҳитининг 1,0 мл да 37 °C да эндоген нафас олиш тезлигини поляграфда ёпиқ платина электродидан фойдаланиб аниқлангач 60-90 сониядан сўнг сукцинатнинг натрий тузидан 2 мМ тугал концентрацида кўшилади. Бунда эндоген нафас олиш (O₂ ютилиши) 30% ортиқ бўлиши мумкин эмас.

Гепатоцитларни плазматик мембраналарини ўтказувчанлигини ўзгариши аниқлаш учун гепатоцитлар суспензиясидаги муҳит суюқлигида АсАТ ва АлАТ ферментларини фаоллигини аниқлаш орқали амалга ошириш мумкин. Одатда ушбу ферментлар фаоллиги супернатантда аниқланмайди ёки кучсиз даражада ижобий бўлади. Ферментлар фаоллигини юқори бўлиши ва айниқса АсАТники жигар хужайраларини кучли даражада жароҳатланиши, ҳаттоки некрозидан

далолат беради. Ушбу ферментлар фаоллигини аниқлаш куйидагича амалга оширилади. Гепатоцитлар суспензиясини 0,5 мл ни 5 дақиқа давомида 1000 айл/дақиқа тезликда центрифуга қилинади. Чўкма устидаги суюқлик (супернатант)дан 0,1 мл олиниб унга 0,5 мл субстрат қўшилади, аралаштирилиб термостатда 37 °С 30 дақиқа инкубация қилинади. Шундан сўнг 0,5 мл ДНФГ (динитрофенилгидразин) қўшилиб хона ҳароратида 20 дақиқа инкубация қилинади, сўнг 5,0 мл 0,4 М NaOH эритмасидан қўшилиб 10 дақиқадан кейин спектрофотометрнинг 540 нм тўлқин узунлигида оптик зичлиги ўлчанади. Назорат гепатоцитлардан ташқари таркибий қисм бўлади. Фермент фаоллиги пирозум кислотасининг турли хил концентрация оптик зичлигини кўрсаткичлари асосида тузилган эгри чизиқ асосида ҳисобланади ва мМ/сек даифодаланади.

Хулоса

Ҳозирги кунда гепатопротектор воситаларининг фармакологик гуруҳи асосан ўсимликлардан тайёрланган препаратлардан иборатдир. Шу билан бир қаторда экологик ҳолатнинг бузилиши туфайли жигарнинг метаболик фаолиятини захарли моддалар таъсиридан ҳимоя қилиш мақсадида ушбу гуруҳ воситаларига бўлган талаб юқори ҳисобланади. Аммо бу борада Республикамиз соғлиқни сақлаш тизимида асосан чет давлатлардан келтирилган препаратлар қўлланилмоқда (силибор, легалон, ЛИВ – 52 ва бошқалар). Шуларни инobatта олганда янги гепаторотектор воситаларини яратиш долзарб вазифалар қаторидан ўрин олган. Ушбу услубий қўлланмада келдирилган текширувлар мажмуаси келажаги порлоқ бўлган гепатопротектор воситаларини клиникагача бўлган текширувларини ўтказишда қўл келади ва текширувларни эрта босқичларидаёқ захарлилиги юқори, фаоллиги паст бўлган бирикмалардан ҳалос бўлишга имкон туғдиради.

Ушбу рисола бўйича мулоҳоза ва таклифларни муаллифлар мамнуният билан қабул қиладилар.

Адабиётлар

1. Звягинцева Т.Д., Глушенко С.В. Хронические диффузные заболевания печени: патогенетические подходы к лечению//Здоровья Украины.- 2010.- №1.-С.46-47.
2. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Наумов Т.А. и соавт. Иммуноклеточной статус и выраженность эндотоксинемии у больных алкоголизмом с различной степенью алкогольного поражения печени // Клиническая наркология.-2008.-№10.-С.42-48.
3. Suk K. T., Kim D. J. Drug-induced liver injury: present and future // Clin. Mol. Hepatol. -2012.-Vol.18, №3.-P. 249-257.
4. Sun H., Yu L., Wei H., Liu G. A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted mice tumor model// J. Biomed. Biotechnol. -2012.2012:584728.
5. Дегтярева И.И, Скрыпник И.Н, Невойт А.В. и соавт. Гепатопротекторы-антиоксиданты в терапии больных с хроническими диффузными заболеваниями печени. //Новые медицинские технологии.- 2002.- №6.- С.18-24.
6. Никитин И.Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности. //Фарматека.- 2007.- №13.- С.14-18.
7. Федяк О. Клішчо-економний аналіз фармакотерапії хронічними вірусними гепатитами.// Ліки України плюс.- 2010.-№1.- С.40-46.
8. Saar K., MuK Ilner S. //Bile acids Liquid Chromatography 2130-2135.
9. Wildgrube H.J., Stockhausten H., Petri J., Fussel U., Lauer H. Naturally occurring conjugated bile acids, measured by high-performance liquid chromatography, in human, dog, and rabbit bile//Journal of chromatography.- 1986.-Vol.353.-P.207-213.
10. Lee C.K., Choi J.S. Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats//Pharmacology. -2010.-Vol.85, №6.-P. 350-6.

11. Шабанов П. Д., Султанов В.С., Лебедев А.А. и соавт. Защитные эффекты полипренолов на модели подострого гепатоза с энцефалопатией у крыс// Медицинский академический журнал.-2010.-Т.10,№2.-С.50-57.
12. Спрыгин В.Г. Применение олигомерных проантоцианидинов для профилактики метаболических нарушений углеводного обмена в печени крыс при поражении этиловым спиртом//Сибирский медицинский журнал.-2012.-№ 4.-С.131-134.
13. Петров А.Н., Шевчук М.К., Георгианова Е.К., Сивак К.В., Стосман К.И. Разработка экспериментальных моделей алкогольного гепатита различной степени тяжести //Токсикология.-2015.-Т.16.-С.187-202.
14. Sankar M., Rajkumar J., Sridhar D. Hepatoprotective Activity of Heptoplus on Isoniazid and Rifampicin Induced Liver Damage in Rats. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. -2015.-Vol.77, №5.-P.556-562.



MUHARRIRIYAT VA NASHRIYOT BOLIMI

Объем – 2,5 уч. изд. л. Тираж – 100. Формат 60x84. 1/16. Заказ №885-2017. Отпечатано
РИО ТМА 100109. Ул. Фароби 2, тел: (998 71)214-90-64, e-mail: rio-tma@mail.ru

