

ТИББИЁТ
ИНСТИТУТЛАРИ
ТАЛАБАЛАРИ УЧУН



УҚУВ
АДАБИЁТИ

Р.Ғ. СУЛТОНОВ, Н.М. ХОЛМУҲАМЕДОВА

3
**Биохимиядан
амалий
машғулотлар**

28.902.Я93

ТИББИЁТ ИНСТИТУТЛАРИ ТАЛАБАЛАРИ УЧУН

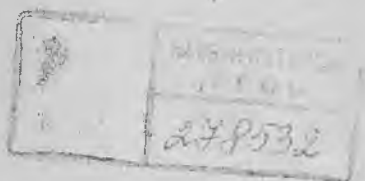
5А2.2 ўқув адабиети

с 96

Р. Ғ. СУЛТОНОВ, Н. М. ХОЛМУҲАМЕДОВА

БИОХИМИЯДАН АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР

Ўзбекистон Республикаси олий ва ўрта махсус таълим вазирлиги тиббиёт олий ўқув юртлари талабалари учун ўқув қўлланмаси сифатида тасдиқлаган.



Тошкент
Абу Али ибн Сино номидаги
тиббиёт нашриёти
1995

ҚИРИШ

Тиббиёт институтлари талабалари учун тавсия этилаётган ушбу ўқув қўлланмаси умумий ўқув дастури асосида тузилган.

Муаллифлар талабаларга амалий ва мустақил ишларни амалга ошириш жараёнида керак бўлган назарий йўлланмаларни, ўқиладиган бўлимнинг тиббиётдаги амалий аҳамиятини, чақалоқлик давридан то 14 ёшгача бўлган болаларда кечадиган биохимиявий жараёнларнинг ўзига хос хусусиятларини, соғлом организмнинг меъёр кўрсаткичларини ва уларни турли касаллик ҳолатларида сифат ва миқдор жиҳатидан ўзгаришларини ёки биохимиявий ўзгаришлар оқибатида келиб чиқадиган касалликларни ўргатишни асос қилиб олганлар. Қўлланмада дарсдан ташқари мустақил тайёрланиш, амалий машғулот жараёнида олган билимларни мустаҳкамлаш учун савол ва масалалар ҳам берилган. Вазият масалалар келажакда тиббий муаммоларни ҳал қилишда фикрлаш қobiliятини ривожлантириш мақсадида берилган. Шунингдек, ўтказилган тажрибалардан олинган натижаларни расмийлаштириш йўллари ва тегишли хулоса чиқариш учун имкониятлар яратилган. Ушбу ўқув қўлланмада биохимия лабораторияларида касалликларни аниқлаш учун қўлланиладиган барча замонавий биохимиявий усуллар келтирилган.

Ушбу ўқув қўлланмасидан нафақат болалар шифокорлари, балки даволаш, санитария-гигиена, стоматология, фармацевтика куллиётларида ҳамда кишлок хўжалиги, педагогика олий ўқув юрларида биология мутахассислиги бўйича тахсил олаётган талабалар, шунингдек илмий ходимлар ҳам фойдаланишлари мумкин.

Бу қўлланма муаллифларнинг Тошкент болалар тиббиёт олийгоҳининг биохимия кафедрасида орттирган амалий тажрибалари асосида ўзбек тилида чоп этилаётган биринчи китобидир.

Муаллифлар қўлланмада яхши ёритилмаган масалалар ва айрим камчиликлар юзасидан берилган фикр-

Такризчи:

II Тош ДавТИ биологик кимё кафедрасининг мудир
профессор *А. А. Аброров*

Султонов Ғ., Холмухамедова Н. М.

С 96 Биохимиядан амалий машғулотлар: (Ўқув қўлланма).— Т.: Абу Али ибн Сино номидаги тиббиёт нашриёти, 1995.— 304 б.— (Тиббиёт институтлари талабалари учун ўқув адабиёти).

Тавсия қилинган ўқув қўлланмасида болалар организмнинг таркибий ва функционал хусусиятлари, айрим биокимёвий жараёнларнинг ўзига хослиги кўрсатилган. Китобда шунингдек оксил, карбонсув, ёғлар алмашинуви охириги маҳсулотларининг болалар организми учун таркибий кўрсаткичлари берилган.

Қўлланмада кўпроқ ўсиш жараёнида болалар организмда рўй берадиган биокимёвий ўзгаришлар ҳам келтирилган.

Қўлланма тиббиёт институтлари учун мўлжалланган ўқув дастурига мувофиқ тузилган.

28.902я73

1903010000—024

С _____ 95

М 354 (04) 95

© Абу Али ибн Сино номидаги тиббиёт
нашриёти, 1995

ISBN 5—638—01081—5

ҚИРИШ

Тиббиёт институтлари талабалари учун тавсия этилаётган ушбу ўқув қўлланмаси умумий ўқув дастури асосида тузилган.

Муаллифлар талабаларга амалий ва мустақил ишларни амалга ошириш жараёнида керак бўлган назарий йўлланмаларни, ўқиладиган бўлимнинг тиббиётдаги амалий аҳамиятини, чақалоқлик давридан то 14 ёшгача бўлган болаларда кечадиган биохимиявий жараёнларнинг ўзига хос хусусиятларини, соғлом организмнинг меъёр кўрсаткичларини ва уларни турли касаллик ҳолатларида сифат ва миқдор жиҳатидан ўзгаришларини ёки биохимиявий ўзгаришлар оқибатида келиб чиқадиган касалликларни ўргатишни асос қилиб олганлар. Қўлланмада дарсдан ташқари мустақил тайёрланиш, амалий машғулот жараёнида олган билимларни мустаҳкамлаш учун савол ва масалалар ҳам берилган. Вазият масалалар келажакда тиббий муаммоларни ҳал қилишда фикрлаш қобилиятини ривожлантириш мақсадида берилган. Шунингдек, ўтказилган тажрибалардан олинган натижаларни расмийлаштириш йўллари ва тегишли хулоса чиқариш учун имкониятлар яратилган. Ушбу ўқув қўлланмада биохимия лабораторияларида касалликларни аниқлаш учун қўлланладиган барча замонавий биохимиявий усуллар келтирилган.

Ушбу ўқув қўлланмасидан нафақат болалар шифокорлари, балки даволаш, санитария-гигиена, стоматология, фармацевтика куллийетларида ҳамда қишлоқ хўжалиги, педагогика олий ўқув юртларида биология мутахассислиги бўйича таҳсил олаётган талабалар, шунингдек илмий ходимлар ҳам фойдаланишлари мумкин.

Бу қўлланма муаллифларнинг Тошкент болалар тиббиёт олийгоҳининг биохимия кафедрасида орттирган амалий тажрибалари асосида ўзбек тилида чоп этилаётган биринчи китобидир.

Муаллифлар қўлланмада яхши ёритилмаган масалалар ва айрим камчиликлар юзасидан берилган фикр-

Тақризи:

II Тош ДавТИ биологик кимё кафедрасининг муdiri
профессор А. А. Аброров

Султонов Ғ., Холмухамедова Н. М.

С 96 Биохимиядан амалий машғулотлар: (Ўқув қўлланма).— Т.: Абу Али ибн Сино номидаги тиббиёт нашриёти, 1995.— 304 б.— (Тиббиёт институтлари талабалари учун ўқув адабиёти).

Тавсия қилинган ўқув қўлланмасида болалар организмнинг таркибий ва функционал хусусиятлари, айрим биокимёвий жараёнларнинг ўзига хослиги кўрсатилган. Китобда шунингдек оксил, карбонсув, ёғлар алмашинуви охириги маҳсулотларининг болалар организми учун таркибий кўрсаткичлари берилган.

Қўлланмада кўпроқ ўсиш жараёнида болалар организмда рўй берадиган биокимёвий ўзгаришлар ҳам келтирилган.

Қўлланма тиббиёт институтлари учун мўлжалланган ўқув дастурига мувофиқ тузилган.

28.902я73

1903010000—024
С _____ 95
М 354 (04) 95

© Абу Али ибн Сино номидаги тиббиёт
нашриёти, 1995

ISBN 5—638—01081—5

ҚИРИШ

Тиббиёт институтлари талабалари учун тавсия этилаётган ушбу ўқув қўлланмаси умумий ўқув дастури асосида тузилган.

Муаллифлар талабаларга амалий ва мустақил ишларни амалга ошириш жараёнида керак бўлган назарий йўлланмаларни, ўқиладиган бўлимнинг тиббиётдаги амалий аҳамиятини, чақалоқлик давридан то 14 ёшгача бўлган болаларда кечадиган биохимиявий жараёнларнинг ўзига хос хусусиятларини, соғлом организмнинг меъёр кўрсаткичларини ва уларни турли касаллик ҳолатларида сифат ва миқдор жиҳатидан ўзгаришларини ёки биохимиявий ўзгаришлар оқибатида келиб чиқадиган касалликларни уратишни асос қилиб олганлар. Қўлланмада дарсдан ташқари мустақил тайёрланиш, амалий машғулот жараёнида олган билимларни мустаҳкамлаш учун савол ва масалалар ҳам берилган. Вазият масалалар келажакда тиббий муаммоларни ҳал қилишда фикрлаш қобилиятини ривожлантириш мақсадида берилган. Шунингдек, ўтказилган тажрибалардан олинган натижаларни расмийлаштириш йўллари ва тегишли хулоса чиқариш учун имкониятлар яратилган. Ушбу ўқув қўлланмада биохимия лабораторияларида касалликларни аниқлаш учун қўлланиладиган барча замонавий биохимиявий усуллар келтирилган.

Ушбу ўқув қўлланмасидан нафақат болалар шифокорлари, балки даволаш, санитария-гигиена, стоматология, фармацевтика куллийетларида ҳамда қишлоқ хўжалиги, педагогика олий ўқув юртларида биология мутахассислиги бўйича таҳсил олаётган талабалар, шунингдек илмий ходимлар ҳам фойдаланишлари мумкин.

Бу қўлланма муаллифларнинг Тошкент болалар тиббиёт олийгоҳининг биохимия кафедрасида орттирган амалий тажрибалари асосида ўзбек тилида чоп этилаётган биринчи китобидир.

Муаллифлар қўлланмада яхши ёритилмаган масалалар ва айрим камчиликлар юзасидан берилган фикр-

мулоҳазалар ва маслаҳатлар учун ҳамкасбларига ўз миннатдорчиликларини билдирадилар ва кейинги ишларида бу маслаҳатларни албатта инобатга оладилар.

Муаллифлар ушбу қўлланмани тузишда маслаҳат берган тақризчилар: Самарқанд тиббиёт институти биохимия кафедрасининг мудир, профессор В. А. Блинов, тиббиёт фанлари номзоди Б. С. Мирзаева, II Тошкент тиббиёт институти биохимия кафедрасининг мудир, профессор А. А. Абров, доцент Р. Р. Собирова ва ассистент Ш. Иноятовларга ўз миннатдорчиликларини билдирадилар.

І БЎЛИМ

ОКСИЛЛАРНИНГ ТУЗИЛИШИ ВА УЛАРНИНГ ХОССАЛАРИ

Оксиллар барча тирик хужайра ва организмнинг асосий таркибий қисми бўлиб, ҳаётий жараёнларда муҳим наизифаларни бажаради. Улар хужайра мембраналарининг таркибида турли моддаларни танлаб ўтказишда, ахборотларни қабул қилиб, уларни кейинги жараёнларга ўтказишда, организмда рўй берадиган кимёвий жараёнларни тезлаштиришда (ферментлар), моддалар алмашинувиши бошқаришда (гормонлар), химоя воситалари сифатида (антителолар), моддаларни ташишда (альбуминлар, глобулинлар), мушаклар қисқаришида (актин, миозин) қатнашади.

Оксиллар мураккаб тузилишга эга бўлган юқори молекулали органик бирикмадир. Уларнинг таркибига 20 хил аминокислота киради. Оксиллар тузилиши жиҳатидан икки гуруҳга бўлинади. 1. Оддий оксиллар. Бу гуруҳдаги оксиллар фақат аминокислоталардан ташкил топган. 2. Мураккаб оксиллар эса оксил ва оксил бўлмаган қисмлардан иборат. Биринчи ва иккинчи гуруҳдаги оксиллар ўз навбатида яна бир неча гуруҳчаларга бўлинади. Оддий оксилларга гистонлар, проламинлар, протаминлар, глютеинлар, альбумин ва глобулинлар киради. Улар бир-биридан физик-кимёвий хоссалари ва аминокислота таркибининг ўзига хослиги билан фарқланади. Мураккаб оксиллар таркибига кирган (оксил бўлмаган) простетиклар гуруҳига кўра етти турга бўлинади: нуклеопротеидлар (ДНК, РНК тутувчи оксиллар), фосфопротеидлар (фосфор кислота) хромопротеидлар (бўёвчи моддалар — пигментлар, гем, флавин тутувчи оксиллар), гликопротеидлар (карбон сувлар), липопротеидлар (ёғлар), метапротеидлар (металлар) ва мураккаб ферментлар (витаминлар) ни тутувчи оксиллар. Оксилларнинг турли-туманлиги ва уларнинг физик-кимёвий хоссалари уларнинг таркибига кирган аминокислоталарнинг хилма-хиллигига боғлиқ. Аминокислоталарнинг тузилиши турли хил бўлиб, улар кислотали, асосли ва нейтрал булиши мумкин. Оксиллар тўрт хил структурага (тузи-

лишга) эга. Тегишли аминокислотанинг қатъий тартиб билан, полипептид занжирда жойлашиши оксилнинг бирламчи структураси дейилади. Бу структура мустаҳкам пептид боғ ёрдамида ушланиб туради. Бирламчи структура оксилларнинг хилма-хиллигини, қандай турга оид эканлигини, физик-кимёвий хоссаларини ва кейинги структураларини белгилаб беради. Полипептид занжирнинг спиралланиши (ўралиши), α -ёки β -ўрамни ҳосил қилиши оксилнинг иккиламчи структураси дейилади. Ушбу структура водород боғлари ёрдамида мустаҳкамланади. Глобуляр оксилларга α -ўрам, фибрилляр оксилларга β -ўрам тааллуқли. Ўралган полипептид занжир кучсиз ион, Вандер-Ваальс боғлари ёрдамида тахланиб, шаклланади. Оксилларнинг фазовий шаклланиши учламчи структура дейилади. Оксилнинг фаол ёки фаолсиз ҳолатга ўтишида учламчи структуранинг фазовий шаклланиши ўзгаради. Айрим оксиллар бир нечта полипептид занжирдан иборат бўлади. Ҳар қайси полипептид занжир ўзининг бирламчи, иккиламчи, учламчи структурасига эга. Улар протомерлар дейилади. Бу протомерларнинг бир нечтаси ягона олигомерни ҳосил қилади. Бу оксилнинг тўртламчи структурасидир. Оксиллар тўртламчи структурасининг (протомерлар фазовий конформациясининг кетма-кет ўзгариши) фазовий конформацияси ўзгариши натижасида олигомер оксилнинг фаол ёки фаол бўлмаган ҳолатга ўтиши таъминланади. Оксиллар коллоид ҳолатда бўлиб, амфотер хоссаларини намоён қилади. Муайян рН муҳитда оксилларнинг карбоксил «СООН» ва амина «NH₂»-гуруҳлари диссоциланиши натижасида улар «нейтрал» зарядга эга бўлиши мумкин. Зарядлари «нейтрал» бўлган оксил электр майдонида «-» ёки «+» заряд томонга қараб ҳаракатлана олмайди. Демак, муайян рН муҳитида оксил молекуласи зарядининг нейтрал бўлиши изоэлектрик нуқта ҳолати дейилади. Бундай оксилнинг турғунлиги йўқолади ва оксил чўкмага тушади. Чўкмага тушган оксилнинг аввалги физик-кимёвий ва биологик хоссаси йўқолиши мумкин. Бундай оксил қайта сувда эримайди. Бу таъсир этувчи модданинг табиатига боғлиқ бўлади. Бундай ўзгаришлар натижасида оксил структурасининг бузилиши (ўралган, фазода маълум шаклга эга бўлган оксилнинг ёйилиши) рўй беради. Оксил молекуласи ва структурасининг ўзгариши натижасида унинг физик-кимёвий ва биологик хоссаларининг йўқолиши оксил денатурацияси дейилади. Чуқур ўзгаришлар билан кечадиган денатурация қайтмас бўлади (оксилнинг сувда эрувчанлиги бутунлай йўқолади). Ўзгариш юзаки бўлганда (оксил

кайта суида эриб, аввалги физик-кимёвий ва биологик ҳуҷайраларнинг тиклай олади) денатурация қайтар бўлади.

Оқсилларга ўтказиладиган барча сифат реакциялари ёки микдорий ўлчовлар, уларнинг таркибидаги у ёки бу функционал гуруҳларни аниқлашга ёки физик-кимёвий хоссаларига асосланади. Организмда аминокислота етишмаслиги оқсил етишмаслигига сабаб бўлади. Оқсил етишмаслиги, оқсил алмашинувининг бузилиши оқибатида турли асоратлар — касалликлар юзага келади. Демак, касалликларнинг келиб чиқиш сабабларини, уларда кучайтиладиган биокимёвий ўзгаришларни аниқлаш, рўй бериши мумкин бўлган кўнгилсизликларнинг олдини олиш учун оқсилларнинг тузилишини, хоссаларини, бажарадиган вазифасини ўрганиш бўлажак шифокор учун жуда муҳимдир.

Бўлимнинг мақсади:

1. Тўқима ва биологик суюқликлардан оқсилларни ажратишда қўлланиладиган айрим усуллар (гомогенизациялаш — майдалаш, тузлаш, чўктириш, центрифугация — катта тезликда айлантириш, диализ — туздан тозлаш ва ҳ.к.) билан таништириш.

2. Оқсил таркибидаги аминокислоталарнинг сифатини аниқлаш усулларини ўргатиш.

3. Оқсилларнинг микдорини ўлчаш усулларини ўргатиш.

4. Қон зардобидидаги оқсилларни электрофорез усули билан аниқлаш ва шу усул ёрдамида оқсилларнинг физик-кимёвий хоссаларини ўргатиш.

5. Оқсилларнинг тузилиши ва хоссаларини ўрганиш бўйича олинган билимлардан келажакда амалий иш фаолиятида фойдаланишни ўргатиш.

I ТЎҚИМА ВА БИОЛОГИК СУЮҚЛИҚЛАРДАН ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИШ УСУЛЛАРИ

Тўқимадан оқсилларни ажратиш олиш учун ушбу тўқима ҳужайралари бир-биридан ажратилади ва уларнинг мембраналари бузилади. Бундай мақсадга эришиш учун гомогенизациялаш (тўқимани майдалаш), ультратонув ш таъсири, вақти-вақти билан музлатиш каби усуллардан фойдаланилади. Сўнгра оқсиллар эритмага ўтказилади — экстракцияланади. Бунинг учун ажратилаётган оқсилнинг табиатига қараб буфер эритма ва органик эритувчилар ишлатилади. Тўқима турли оқсил аралашмаларини тутгани учун кейинги боскичда оқсилларнинг ҳар кайсисини алоҳида ажратилади (фракцияланади). Бунда

замонавий ультрацентрифугалаш, электрофорез, хроматография ва иммунобиология усулларидан фойдаланилади.

1-иш. МУШАҚ ТЎҚИМАЛАРИДАН ОҚСИЛЛАРНИ АЖРАТИШ

Миофибриллалар — қисқарувчи элементлар мушак хужайралари учун хос бирикмалардир. Улар *миозин* ва *актин* каби қисқарувчи оксиллар, тропомиозин ва тропонин каби бошқарувчи оксиллардан иборат. Миофибрилл оксиллар сувда эримайди, аммо бу оксилларни 0,5 моль/л туз эритмаси ёрдамида мушак тўқимасидан ажратиш олиш мумкин. Саркоплазманинг (мушак хужайра гиалоплазмаси) кўпчилик оксиллари сувда ёки кучсиз (0,05 моль/л) туз эритмасида эрийди.

Бу фракция таркибида мушак оксилларидан ташқари бошқа аъзоларда учрайдиган оксиллар ҳам бўлади. Мушак тўқималарига 5% ли калий хлорид (КСl) эритмаси таъсир эттирилганда миофибрилл ва саркоплазма оксиллари ажралади.

Текширилувчи материал: майдаланган мушак тўқимаси, 2г.

Реактивлар: калий хлориднинг 5% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,1 моль/л эритмаси, учхлор сирка кислота (УХСК) нинг 10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: центрифуга, центрифуга тарозиси, центрифуга пробиркалари, чинни ҳовонча, шиша кум, оддий пробирка ва штативлар, шиша таёқча, нипетка, бюретка, фильтр қоғоз, дока ва воронкалар.

Бажариладиган иш тартиби. 2 г мушак тўқимасини қайчи билан майдалаб, хужайраларини парчалаш учун чинни ҳовончага солинади. Унинг устига 2 мл 5% ли калий хлорид эритмаси ва шиша кум солиб ишқаланади. Сўнг яна 3 мл калий хлорид эритмаси солинади-да, беш дақиқа ишқалаш давом эттирилади. Унинг устига яна бир марта аввалги эритмадан 5 мл кўшиладида яна беш дақиқа ишқаланади. Шунда аралашма бир хил ҳолатга келади (бу аралашма экстракт дейилади).

2. Олинган аралашма (экстракт) иккита центрифуга пробиркасига солинади, шиша кум эса ҳовончада қолади. Пробиркалар центрифуга тарозисида пипетка орқали 5% ли калий хлорид эритмаси кўшиш орқали бир хил оғирликка келтирилади. Гомогенат дақиқасига 4000 марта айланадиган центрифугада 15 дақиқа айлантирилади. Бунда хужайра бўлакчалари, парчаланган хужайралар, бириктирувчи тўқима толалари чўкмага тушади. Чўкма устидаги суюқлик тоза пробиркага олинади.

3. Олинган экстракт билан оксилга хос рангли

реакциялар (14—22-ишлар) ўтказилади ва Лоури ёки Биурет усуллари ёрдамида оксил миқдори аниқланади (26—27-ишлар).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Мушак тўқималари оксилларини экстракцияланиш шартларини қисқача ёзиш, рангли реакциялар номини ва нима аниқланганини ҳамда топилган оксил миқдорини дафтарингизга ёзиш.

2-иш. СУТ ОКСИЛИ — КАЗЕИННИ АЖРАТИШ

Сут таркибида альбумин, глобулин ва мураккаб оксил — фосфопротеидлар вакили бўлган казеин бор. Казеин сут оксилларининг 80% ини ташкил қилади. Казеин нордон хоссага эга бўлиб, унинг изоэлектрик нуқтаси рН ни 6,7 атрофида. Казеин кальций тузлари билан бириккан бўлиб, эриган ҳолатда бўлади. Сут ачиганда ёки у нордонлаштирилганда (кислота қўшилганда) казеин ипир-ипир чўкмага тушади.

Текширилувчи материал: сут.

Реактивлар: хлорид кислотанинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, нитрат кислотанинг концентралланган эритмаси, молибден реактиви, мис (II) — сульфатнинг (CuSO₄) 1% ли эритмаси.

Қеракли анжомлар: 50 мл сифимли кимёвий стакан, 50 мл сифимли шиширлар, шиша таёкча, воронка, фильтр коғозлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1.50 мл сифимли кимёвий стаканга 3 мл сут ва 7 мл дистилланган сув солинади. Сууюкликлар аралаштирилиб, устига 10—15 томчи 1% ли хлорид кислота эритмаси қўшилади. Кислота жўла ёхтиёқорлик билан томчилаб солинади, чунки хлорид кислотанинг ортиқча миқдори казеин чўкмасини эритиб юборади. 3—5 дақиқа ўтказилан кейин ипир-ипир чўкма ҳосил бўлади.

2. Хлорид кислотадан ҳоли бўлиш учун стаканга 10 мл дистилланган сув солиб, 5 дақиқа қолдирилади. Сўнгра чўкма устидаги сууюклик осойишталик билан олиб ташланади. Чўкмага яна бир марта дистилланган сув солиб, хлорид кислотанинг ортиқча қисми олиб ташланади. Пробиркадаги сууюклик аста-секин аралаштирилади ва 5 дақиқа ўтгач аралашма коғоз филтрдан ўтказилади.

3. Казеин таркибида фосфор борлигига ишонч ҳосил қилиш учун казеин ишқорий мухитда парчаланеди (гидролизланади), гидролизат таркибидаги фосфор молибден реактиви ёрдамида аниқланади. Бунинг учун филтлдаги чўкма қайтар музлатгичли кенг пробиркага олинади ва унга 6 мл 10% ли натрий гидроксид эритмаси солинади. Пробирка кум ҳаммомида бир соат давомида қиздирилади. Сууюклик совитилгандан сўнг концентралланган нитрат кислота (20—30 томчи) билан лакмус бўйича кучсиз нордон мухитгача нейтралланади. Нейтраллаш жараёнида оксилларнинг чала парчаланган юқори молекулали махсулоти чўкмага тушади.

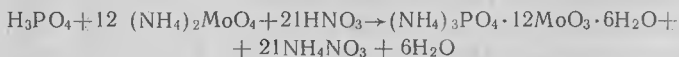
4. Эритма тиндирилгандан сўнг филтрланади. Сўнгра сууюликдан олиб оксилга хос Биурет ва фосфор кислотага хос молибден реакцияси ўтказилади:

а) 5 томчи гидролизатга 1—2 томчи натрий гидроксиднинг 10% ли

эритмасидан ва 2 томчи мис II сульфат тузининг 1% ли эритмасидан солинади. Ҳосил булган бинафша ранг оксил борлигини исботлайди.

б) 10 томчи молибден реактивига 5 томчи гидролизат солиб, бир неча дақиқа қайнатилади. Эритма оч сарик рангга бўялади. Аралашма совитилгач сарик рангли комплекс бирикма чўкмага тушади. Бу фосфор кислота борлигини исботлайди.

Ушбу реакция тенгламаси куйидагича:



Олинган натижаларни расмийлаштириш. Қазеин оксили ажратилишининг қисқача шартини, гидролизат билан ўтказилган рангли реакцияларнинг асосланишини ва унинг натижасини дафтарингизга ёзинг.

3-и ш. ТУХУМ ОКСИЛИ — АЛЬБУМИННИ АЖРАТИШ

Тухум таркибидаги оксилнинг 70% ини альбумин ташкил қилади. Альбуминни глобулиндан ажратиш унун тухум оксили дистилланган сувнинг 10% ли эритмасида суюлтирилади. Глобулинлар тузли эритмада яхши эрийди, сув билан эритилганда эса улар чўкмага тушади. Эритмани филтрлаш ёки центрифугалаш йўли билан альбуминлар глобулинлардан ажратиб олинади.

Текширилувчи материал: тухум оксили.

Реактивлар: дистилланган сув.

Керакли анжомлар: 100 ва 500 мл сифимли кимёвий стакан, 250 ва 500 мл сифимли цилиндрлар, 100 мл сифимли қолба, воронкалар, шиша таёқча, филтр қоғоз, центрифуга.

Бажариладиган иш тартиби. Тухум қобиғининг икки томонидан тешиқча очиб, унинг оксили 500 мл сифимли стаканга солинади ва устига 250 мл дистилланган сув солиб, шиша таёқча билан аралаштирилади. Эритманинг ҳажми 300 мл га етгунча дистилланган сув қўшилади. Оксил эритмаси 30 дақиқа уй ҳароратида қолдирилади. Бир оздан сўнг пробирка тубига глобулинлар чўккани кўринади. Эритма филтр қоғоздан ўтказилади. Филтратда қолган суюқлик билан оксилга хос сифат реакцияси ўтказилиб, унинг микдори Лоури ёки Биурет усули билан аниқланади (26—27-ишлар).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижаларни дафтарингизга ёзинг, тегишли хулоса чиқаринг. Биурет ва Лоури усулларининг асосини тушунтиринг.

1-ш. ОКСИЛЛАРНИ ИССИҚЛИК ТАЪСИРИДА ЧЎҚТИРИШ

Барча оксиллар жуда бекарор бўлиб, иссиқлик таъсирида чўкмага тушади. Бунда эритманинг рН муҳити катта аҳамиятга эга.

Қўичиллик оксиллар одатда манфий (—) зарядга эга, шунинг учун уларнинг изоэлектрик нуқтаси кислотали муҳитда бўлади. Маълумки, оксиллар изоэлектрик нуқта ҳолатида айниқса бекарор бўлиб чўкмага тушади. Демак, уларнинг заряди оксил заррачасининг турғунлигини таъминлайди.

Текширилувчи материал: тухум оксили ёки кон зардоби оксили.

Реактивлар: сирка кислотанинг 5% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 5% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, пипеткалар, шиша сабдалар ва спирт лампаси.

Бажариладиган иш тартиби. Ишни қўйидаги жадвалга мувофиқ бажаринг (1-жадвал). Эритмалар кўрсатилган миқдорда томчиларда олинади.

1- ж а д в а л

Пробиркалар	1	2	3	4	5
Тухум оксидининг 1% ли эритмаси	5	5	5	5	5 томчи
Сирка кислотанинг 1% ли эритмаси	—	1	5	5	5 томчи
Натрий хлориднинг тўйинган эритмаси	—	—	—	2	5 томчи
Натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси	—	—	—	—	2 томчи

Барча пробиркалар қайнагунча қиздирилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Қўйидаги жадвалга биноан кузатилган чўкма (+), кузатилмагани (—) ишораси билан ифодаланади ва тегишли хулоса шартланади.

2- ж а д в а л

Нейтрал муҳит	Кучсиз кислотали муҳит	Кучли кислотали муҳит	Кучли кислотали электрролит	Ишқорий муҳит

5-и ш. ОКСИЛЛАРНИ ОГИР МЕТАЛЛ ТУЗЛАРИ ТАЪСИРИДА ЧЎҚТИРИШ

Оз миқдордаги оғир металл тузлари таъсирида оксиллар чўкмага тушади. Рух, мис, кумуш, симоб ва бошқа оғир металллар билан ўзаро таъсирлашган оксил уларни адсорбциялайди ва улар билан тузсимон комплекс бирикма тузларини ҳосил қилади. Бу тузларнинг ортикча миқдори (кумуш нитрат, симоб II хлорид тузларидан ташқари) ҳосил бўлган чўкмани, оксил заррачасида мусбат заряд ҳосил бўлгани учун эритиб юборади. Аммо бу чўкма сувда эримади. Оғир металл тузлари билан захарланган беморларни даволашда оксилнинг оғир металл тузлари билан сувда эримайдиган комплекс бирикмаларни ҳосил қилиш хусусиятидан фойдаланилади. Захарланган беморга кўп миқдорда оксил (сут, қатик, тухум) берилади ва ҳосил бўлган комплекс бирикма парчаланиб сўрилишга улгурмасдан тезда организмдан чиқарилади (кустириш, меъдани ювиш, ҳуқна қилиш орқали).

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: мис (II) сульфат тузининг 1% ли эритмаси, кўрғошин ацетат тузининг 5—10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, шиша таёқчалар, томизгичлар (пипетка).

Бажариладиган иш тартиби. 1. Оксилларни мис сульфат билан чўқтириш. 5 томчи тухум оксили эритмасига оҳисталик билан 1—2 томчи мис сульфатнинг 1% ли эритмаси солинади. Бунда оч ҳаво ранг чўкма ҳосил бўлади, чўкма сувда эримади. Бошқа пробиркага юқоридагидек реактивлар солинади, ҳосил бўлган чўкма устига яна 5—10 томчи мис сульфат эритмаси солинади. Ортикча миқдордаги эритма чўкмани эритиб юборади.

2. Оксилларни кўрғошин ацетат билан чўқтириш.

5 томчи оксил эритмасига 2 томчи 5% ли кўрғошин ацетат эритмаси солинади. Ҳосил бўлган чўкма сувда эримади, аммо ортикча миқдордаги чўқтирувчи эритмада осон эрийди.

Олинган натижаларни 3-жадвалга мувофиқ расмийлаштиринг.

6- и ш. ОКСИЛЛАРНИ ҚОНЦЕНТРАНГАН МИНЕРАЛ ҚИСЛОТАЛАР ТАЪСИРИДА ЧЎҚТИРИШ

Оксиллар концентранган минерал кислоталар таъсирида қайтмас денатурация ҳолатига ўтади. Оксилнинг чўкмага тушиши оксил заррачаларининг сув қобиғи емирилиши ва оксил-кислота комплекс тузлари ҳосил бўлиши билан боғлиқ. Барча кислоталарнинг ортикча микдори (нитрат кислотадан бошқа) чўкмани эритади. Ортофосфат кислота оксилни чўкмага туширмайди. Оксилларнинг нитрат кислота билан чўкмага туширилиши тиббиёт амалиётида кенг қўлланилади. Бу усул билан сийдик таркибидаги оксил микдори аниқланади. (Робертс — Стольников — Брандберг усули).

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: концентранган нитрат ва сульфат кислота.

Керакли анжомлар: пробиркали штативлар ва пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Нитрат кислота билан оксилларни чўктириш. 5 томчи концентранган нитрат кислотага пробиркани 45° бурчакка оғдирган ҳолда 5 томчи оксил эритмаси оҳисталик билан томизилади. Суюқликлар бир-бири билан аралашмаслиги керак.

Иқкала суюқлик чегарасида ингичка оқ ҳалқа — оксил чўкмаси ҳосил бўлади. Сўнгра суюқликлар аралаштирилиб, яна ортикча микдордаги нитрат кислота қўшилади. Чўкманинг эримаслиги кузатилади.

2. Оксилларни сульфат кислота билан чўктириш. Сульфат кислота билан чўктириш ҳам нитрат кислота билан чўктириш каби ўтказилади. 5 томчи концентранган сульфат кислотага оҳисталик билан пробирка девори бўйлаб оксил эритмаси қуйилади. Бунда чўкма ҳосил бўлади. Унга ортикча микдорда сульфат кислота қўшилганда чўкма эриб кетади.

Олинган натижаларни 3-нчи жадвалга мувофиқ расмийлаштиринг.

7- и ш. ОКСИЛЛАРНИ ОРГАНИК ҚИСЛОТАЛАР БИЛАН ЧЎҚТИРИШ

Органик кислоталар ҳам оксилларни чўктириб, қайтмас денатурация ҳолатини юзага келтиради.

Учхлорсирка кислота ва сульфосалицил кислоталар оксилга сезгир бўлганлиги сабабли амалиётда кенг қўлланилади. Сульфосалицил кислота сийдик таркибидаги кам микдордаги оксилни ҳам аниқлаш имконини беради.

Шунингдек, бу кислота ёрдамида бошқа биологик суюқликлар, экссудатлар таркибидаги оксиллар аниқланиши мумкин. Бу кислотанинг сезгирлиги 1:50 000 дир. Сульфосалицил кислота оксиллардан ташқари унинг парчаланиш маҳсулотлари — юқори молекуляр пептон ва полипептидларни ҳам чўкмага тушира олади.

Учхлорсирка кислота эса фақат оксилларни чўкмага тушириб, уларнинг парчаланиш маҳсулотларини чўкмага тушира олмайди. Шунинг учун бу кислота қон оксилларини қуйи молекулали моддалардан ажратишда ишлатилади (аминокислоталар, полипептидлар ва сийдикчил). Оксилсиз азот қолдиқларини учхлорсирка кислота ёрдамида аниқлашда оксил азоти ва оксилсиз азотни алоҳида аниқлаш мумкин. Оксиллар чўкмага туширилгач, фильтратни қайнатиш йўли билан учхлорсирка кислотадан ҳоли бўлинади. Бунда учхлорсирка кислота хлороформ ва карбонат ангидридга парчаланadi.

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: сульфосалицил кислотанинг 20% ли эритмаси, учхлорсирка кислотанинг 10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Сульфосалицил кислота таъсирида чўктириш. 5 томчи оксил эритмасига 2 томчи 20% ли сульфосалицил кислота эритмаси солинади. Оксил чўкмага тушади.

2. Учхлорсирка кислота таъсирида чўктириш. 5 томчи оксил эритмасига 2 томчи учхлорсирка кислота эритмаси солинади. Оксил чўкмага тушади.

Олинган натижаларни 3-жадвалга мувофиқ расмийлаштиринг.

8-иш. ОКСИЛЛАРНИ ОРГАНИК ЭРИТУВЧИЛАР ТАЪСИРИДА ЧЎКТИРИШ

Спирт, ацетон, эфир ва бошқа шу каби органик эритувчиларда оксил эримайди, балки у чўкмага тушади. Оксил табиатига кўра спиртнинг турли концентрацияси талаб қилинади. Спирт оксил заррачасининг сув пардасини емириб, унинг эритмадаги ҳолатини турғунсизлантиради.

Спирт таъсирида чўктирилаётган оксил кучсиз кислотали ёки нейтрал ҳолатда бўлиши керак. Ушбу реакция электролит натрий хлорид иштирокида яхши кетади, чунки у оксил зарядини камайтиради. Оксил чўкмаси қайтар

ҳолатда бўлиши учун спирт киска муддатда паст ҳароратда таъсир эттирилади. Спиртнинг узок муддат таъсир этиши қайтмас ҳолат — денатурацияга олиб келади.

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: этил спирти ёки ацетон.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркадаги 5 томчи оксил эритмасига 15—20 томчи этил спирти (ёки ацетон) томизилади. Эритма хиралашади. Унинг устига бир томчи тўйинган натрий хлорид эритмаси томизилганда бир оздан сўнг чўкма тушгани кузатилади.

Олинган натижаларни 3-жадвалга биноан расмийлаштиринг.

3-жадвал

Оқсилни чўктирувчи моддалар	Реактивлар	Чўкманинг ҳосаси ва ранги	Реакцияларнинг асосланиши ва хусусиятлари

Бажарилган иш юзасидан чиқарилган хулосалар.

2. ОҚСИЛЛАРНИ ХОНА ҲАРОРАТИДА НЕЙТРАЛ ТУЗЛАР ТАЪСИРИДА ЧЎКТИРИШ — ТУЗЛАШ

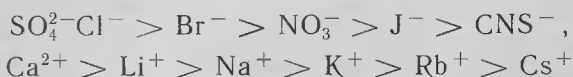
Оқсилларни юқори концентрацияли нейтрал тузлар — натрий хлорид, аммоний сульфат таъсирида чўктириш тузлаш дейилади.

Тузлаш реакцияси натижасида оксил макромолекуласининг сув қобиғи емирилади ва заряди нейтралланади.

Турли хил оқсилларни чўктириш учун турли миқдордаги туз талаб қилинади.

Глобулинлар юқори молекуляр оғирликка эга бўлгани учун альбуминларга нисбатан осон тузланади. Улар аммоний сульфатнинг ярим тўйинтирилган эритмаларида, альбуминлар эса тўйинган эритмалари таъсирида чўкмага тушади.

Натрий хлорид аммоний сульфатга нисбатан оксилларни чўкмага сустроқ туширади, чунки унинг сув қобиғини емириш хусусияти камроқ. Бу хусусият Гофмейстр қаторидаги ионларнинг жойланишига боғлиқ.



Оксилларни нейтрал туз эритмалари таъсирида чўкмага тушиши қайтар жараён бўлиб, оксил чўкмаси сувда қайта эрий олади, яъни физик-кимёвий хусусиятларини сақлаб қолади. Шу туфайли тузлаш усули оксилларни кристалл ҳолатида ажратиб олиш учун қўлланилади.

9-н ш. ОКСИЛЛАРНИ НАТРИЙ ХЛОРИД ВА НАТРИЙ СУЛЬФАТ ТУЗЛАРИ ТАЪСИРИДА ЧЎҚТИРИШ

Текширилувчи материал: тузлаш учун оксил эритмаси.

Реактивлар: натрий хлориднинг майда кукуни, аммоний сульфатнинг тўйинган эритмаси ва майда кукуни, сирка кислотанинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис сульфатнинг 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, штативлар, томизгичлар,

Бажариладиган иш тартиби. 1. Оксилларни натрий хлорид тузи билан чўктириш — тузлаш. Пробиркага 20 томчи оксил эритмаси солинади. Унга натрий хлорид кукунидан эритма тўйингунча, яъни қўшилган туз эригунча қўшилади. Бир неча дақиқа ўтгач глобулинлар чўкмаси ҳосил бўлади.

Пробиркадаги аралашма филтрдан ўтказилади. Бунда альбуминлар филтър тагидаги суюкликка ўтади. Улар хатто натрий хлорид билан тўйинтирилганда ҳам нейтрал эритмаларда чўкмага тушмайди.

Альбумин тутувчи эритмага (филтратга) бир томчи сирка кислотанинг 1% ли эритмасидан солиб қайнатилганда кучсиз кислотали муҳитда альбуминлар чўкмага тушади. Бир неча дақиқа ўтгач ушбу эритма филтрдан ўтказилади. Филтратда оксил қолмаганлигини исботлаш учун биурет реакцияси ўтказилади. Реакциянинг манфийлиги оксил йўқлигини кўрсатади.

2. Оксилларни аммоний сульфат билан тузлаш.

20 томчи оксил эритмасига 20 томчи тўйинган аммоний сульфат эритмаси солиб аралаштирилади. Ярим тўйинган аммоний сульфат эритмаси ҳосил бўлишидан глобулинлар чўкмага тушади. 5 дақиқа ўтгач пробиркадаги эритма филтрдан ўтказилади.

Фильтратга альбуминлар ўтади. Унга аммоний сульфат кукунидан тўйингунча, яъни тузнинг янги қўшимчаси эригунча солинади. Альбумин чўкмага тушади. Альбумин филтрдан ўтказилади. Фильтратда оксил қолмаганлигини исботлаш учун биурет реакцияси ўтказилади.

Олинган натижаларни куйидаги 4-жадвалга биноан расмийлаштиринг. Мусбат натижани «+», манфий натижани «—» ишораси билан белгиланг.

4- ж а д в а л

Оқсилларни тузлаш усули билан чўктириш

Ишлатилган оксил эритмаси ва оксил фракцияларининг номи	Натрий хлориднинг тўйинган эритмасида чўкадиган оқсиллар	Натрий хлорид билан тузлашдан сўнг кучсиз кислотали муҳитда чўкадиган оқсилнинг номи	Ярим тўйинтирилган аммоний сульфат эритмасида чўкмага тушган оқсиллар номи	Аммоний сульфатнинг тўйинган эритмасида чўкмага тушган оқсиллар

Бажарилган иш юзасидан чиқарилган хулоса.

3. Тузланган оксил эритмаларидан туз ва оқсилларни тозалаш (ажратиш). Тузлаш усули билан чўктирилган оқсиллар одатда тузлардан гел-филтрация ёки диализ усули ёрдамида тозаланadi. Бу усуллар ёрдамида оксил ва тузларнинг турли хил молекула ажратиш хоссага эга эканлиги аниқланади.

10- и ш. ОҚСИЛ ДИАЛИЗИ

Оқсил эритмаларини куйи молекулали моддалардан, тузлашдан кейинги ортиқча туз миқдоридан ҳоли қилишдаги энг қулай усуллардан бири диализдир.

Юқори молекулали бирикмаларни куйи молекулали бирикмалардан ярим ўтказгич мембраналар (коллодий, целлофан, пергамент қоғози ва ҳоказо) ёрдамида ажратиш диализ усули дейилади. Катта диаметрда эга бўлган оқсил молекулалари бундай мембраналардан ўта олмайди,

279532

қуйи молекулали бирикмалар — тузлар эса улардан осон ўтади.

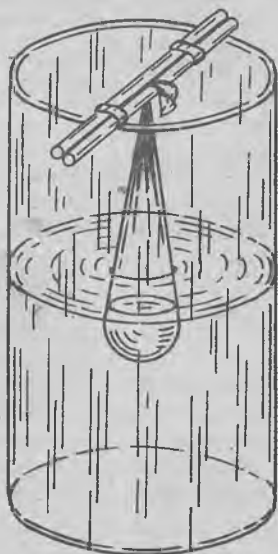
Текширилувчи материал: тухум оксилнинг 3% ли эритмаси.

Реактивлар: аммоний сульфат тузининг тўйинган эритмаси, барий хлориднинг 5% ли эритмаси, мис сульфатнинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар. 100 мл сифимли стакан. 150×150 мм ли целлофан, шиша таёқчалар ва резина боғлагичлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. 2 мл тухум альбумини эритмасига бир томчи тўйинган аммоний сульфат эритмасидан солинади.

Хўлланган целлофандан халтача ясалади ва унга пробиркадаги суюқлик солинади (1-расм).



1-расм. Оксил диализи.

Халтачанинг оғзи иккита шиша таёқча орасига олинади ва бу таёқчалар резина халқалар билан қисилади. Халтача дистилланган сув солинган стаканга туширилади. Халтачадаги суюқлик сатҳи стакандаги сув сатҳидан пастрокда бўлиши керак.

2. Бир соатдан сўнг стакандаги сувдан олиб қуйидаги реакциялар ўтказилади.

а) сульфат ионига сифат реакция. 1 мл сувга 3—4 томчи барий хлориднинг 5% ли эритмаси солинади. Эритманинг оқ рангда хиралашиши барий сульфатнинг чўкмага тушганлигини кўрсатади.

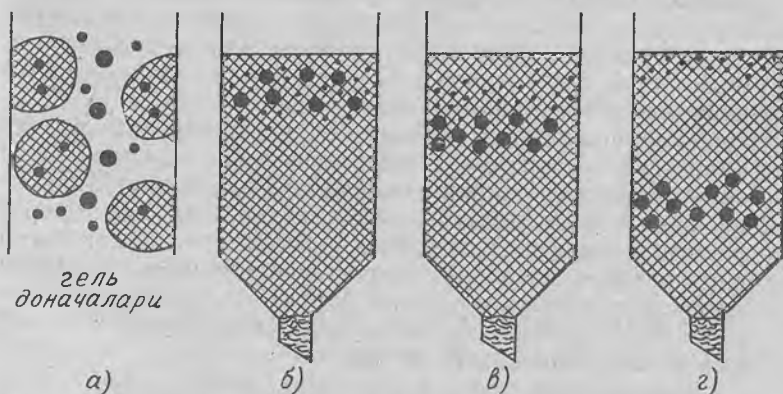
б) оксил борлигини исботлаш учун биурет реакцияси ўтказилади.

3. Халтача ичидаги суюқлик пробиркага олинади ва оксилга оид сифат реакция — биурет реакцияси ўтказилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Диализ усулининг асосланишини, диализатор расмини ва олинган натижаларни дафтарингизга ёзинг ва тегишли хулоса чиқаринг.

11-и ш. ТУЗЛАНГАН ОКСИЛ ЭРИТМАСИНИ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ УСУЛИ БИЛАН ТУЗЛАРДАН ТОЗАЛАШ

Усулнинг асоси: Оксил эритмалари таркибидаги қуйи молекулалари бирикмалардан гель-фильтрация усули ёрдамида тез ва бутунлай ҳоли бўлиш мумкин. Бунинг учун махсус хроматография колонкалар сувда ёки буфер эритмасида бўктирилган гель билан тўлдирилади. Ушбу усул билан моддаларни ажратиш улар таркибидаги молекулаларнинг катта-кичиклигига боғлиқ. Катта молекулалар гель тирқишларига кира олмайди ва колонкадан биринчи бўлиб чиқади. Кичик молекулалар эса гель тирқишлари ва колонкаларда ушланиб қолганлиги учун жуда секин ҳаракатланади (2-расм, а). Гель-фильтрация усулини кўпинча моддаларни элакдан ўтказиш орқали ажратиш дейилади. Шундай ажратишнинг учта босқичи 2-расм б, в, г да кўрсатилган. Кўпгина органик полимерлар шундай молекуляр элак хоссасига эга. Масалан, декстран полисахаридлар — сефадекслар шулар жумласидан. Тирқишларининг сони ва катта-кичиклигига қараб сефадексларнинг бир неча хили тафовут қилинади. Бу эса улардан турли катталиқдаги молекулаларни ажратишда фойдаланишга имкон яратади. Сефадекслар таркибида жуда кўп гидроксил «ОН» гуруҳи бўлганлиги учун улар осон бўкиб, гельга айланади. Гельнинг бўкиш хоссаси қанча юқори бўлса, сефадексларнинг тартиб сони шунча катта бўлади. Одатда оксил эритмаларини тузлардан тозалашда G=25 маркали сефадекслардан фойдаланилади.



2-расм. Моддаларни гель-фильтрация усули билан ажратиш.

Текширилувчи материал: 0,5% ли калий хроматдаги тухум оксилнинг 1% ли эритмаси (курук ҳолдаги калий хромат оксил эритмасига колонкага томизишдан олдин қўшилади).

Реактивлар: биурет реактиви, G=25 сефадекс гель, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: 1×25 см ли жўмакли колонка, ажратувчи воронкалар ёки таги ингичкалашган идишлар, воронкалар, кимёвий стаканлар, шиша таёқчалар, пробиркали штативлар, ўлчов пипеткалари шиша пахта.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Гельни тайёрлаш. 4 г сефадекс кукуни 200 мл сув солинган стаканга солиб бўктирилади. Ассий масса тиндирилгач майда заррачали сув оҳиста тўкиб ташланади. Бу жараён чўкма устидаги суюқлик тиниқ бўлгунча қайтарилaveraди. Хона ҳароратида сефадекснинг тўла бўкиши учун уч соат вақт кетади. Агар суспензия 100° С ли сув ҳаммомида қиздирилса, бу жараён бир соатга қисқаради.

2. Колонкани тайёрлаш 1×25 см ли колонкага жўмаги ёпик ҳолда оз миқдорда сув қўйилади. Колонканинг тубига бир бўлак шиша-пахта қўйилади. Ҳаво пуфакчалари киришидан эҳтиёт бўлиш лозим. Колонка штативга вертикал ҳолда ўрнатилади. Сўнгра колонкага воронка орқали қуюқ гел-сефадекс суспензияси қўйилади.

3. Оксил эритмасини томизиш.

Оксил эритмасини гелга томизишдан олдин колонка жўмаги очилади ва гел сефадекс устидаги сув устуни камайгани кузатилади: Гель устидаги сув 1—2 мм га етгач жўмак бекитилиб, гелга оҳисталик билан 5 мг калий хромат қўшилган оксил эритмасидан 1 мл томизилади. Жўмак очилиб эритманинг гелга сингиши кузатилади. Жўмак бекитилиб колонка деворлари 1 мл дистилланган сув билан чайилади. Жўмак яна очилиб, сув гелга сингдирилади. Жўмак қайта бекитилади ва яна пипетка билан жуда секин, девор бўйлаб 4—6 мл дистилланган сув қўйилади. Гель чайқалмаслиги керак.

4. Фракцияларни йиғиш. 12 та пробирканинг ҳар қайсисига 1 мл дан биурет реактиви солинади. Сув солинган ажратувчи воронка колонка билан бириктирилади ва колонка жўмаги очилади ва ҳар бир биурет реактиви солинган пробиркага 1 мл (20 томчи) дан оксил фракциялари йиғилади. Оксил фракциялари таъсирида пробиркалардаги эритманинг ранги ўзгарганлиги кузатилади. Калий хроматнинг чиқиши пробиркадаги эритманинг ранги сарғайишидан билинади.

Колонкадаги гел қолдиқлари калий хромат тўла йўқолгунга қадар сув билан ювилади. Шундан сўнг у кейинги ишлатишга тайёр бўлади.

Олинган натижалар куйидаги жадвалга ёзилади, усулнинг асоси қайд этилади. Рангсиз эритма «—» рангли эритма «+» ва бир неча «+» ишораси бўялишнинг жуда тўқ эканлигини билдиради.

5- ж а д в а л

Оксил фракцияларини гель-филтрация усули билан ажратиш

Пробиркалар тартиби Оқсил Калий хромат	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Олинган натижалардан тегишли хулоса чиқарилади.

Куйидаги саволларга жавоб беринг.

1. Оксилларнинг чўкмага тушиши нимага боғлиқ?
2. Нима учун оксиллар коллоид эритмаларни ҳосил қилади ва амфотерлик хусусиятини намоён этади?
3. Изоэлектрик нукта нима? Нима учун турли оксилларнинг изоэлектрик нуктаси турли муҳитга тўғри келади?
4. Оксилларнинг қайтар ва қайтмас чўктирилиши нимага боғлиқ?
5. Оксил денатурацияси нима?
6. Мушак тўқимаси оксиди — миозинни дистилланган сув ёрдамида ажратиш мумкинми?
7. Сут казеинини ажратишда унинг қандай хусусиятидан фойдаланилади?
8. Тухум альбуминини глобулин фракциясидан қандай ажратиш мумкин?
9. Оксилларни тузлаш нима? Усулнинг аҳамияти, ишлатилиши?
10. Тузланган оксиллардан тузларни қандай усул билан тозалаш мумкин? Гель-филтрация ва диализ усулларининг аҳамияти нимадан иборат.
11. Оксилларни оғир металл тузлари билан чўктирилишининг қандай хусусиятидан фойдаланилади?
12. Оксилларни минерал ва органик кислоталар билан чўктирилишининг тиббиётдаги аҳамияти қандай?

4. ОКСИЛЛАРНИНГ ЭЛЕКТРОКИМЁВИЙ ХОССАЛАРИ

Барча оксиллар электр зарядига эга. Заряднинг катта-кичиклиги оксил таркибига кирувчи аминокислоталарнинг ишланган гуруҳлари сонига боғлиқ. Оксил молекулалари-

нинг зарядга эга бўлиши уларнинг электр майдонида ҳаракатланишига имкон беради. Унинг бундай хусусиятидан тўқима ва биологик суюқликлар таркибидаги оксил аралашмасини электрофорез усули билан ажратишда фойдаланилади.

12-иш. КАЗЕИННИНГ ИЗОЭЛЕКТРИК НУҚТАСИНИ АНИҚЛАШ

Эритма муҳитининг маълум даражасида (pH) оксил молекуласининг «+» ва «-» зарядларининг тенглашиб «О» га тенг бўлиши изоэлектрик нукта ҳолати дейилади. Бундай ҳолатда оксил заррачаси электр майдонида ҳаракатлана олмайди, унинг турғунлиги йўқолади ва у чўкмага осон тушади. Оксилнинг изоэлектрик нуктасини аниқлаш оксил эритмасининг муайян pH муҳитида лойқаланиши — хираланишига боғлиқ.

Текширилувчи материал: натрий ацетатнинг 0,4% ли эритмаси. Казеиннинг 0,2 моль/л ли эритмаси.

Реактивлар: сирка кислотанинг 0,2 моль/л ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, ўлчовли пипеткалар, макробюреткалар.

Бажариладиган иш тартиби. Турли pH муҳитли буфер эритмасини тайёрлаш учун 6 та куруқ пробиркага жадвалда кўрсатилган микдорда тартиб билан эритма солинади.

6-жадвал

Пробиркаларнинг рақами	Эритмаларнинг таркиби, мл			Аралашманинг pH муҳити	Хираланиш даражаси
	CH ₃ COOH, 0,2 моль/л	H ₂ O	Казеиннинг натрий ацетатдаги 0,4% ли эритмаси		
1	1,6	0,4	0,2	3,8	
2	0,8	1,2	0,2	4,1	
3	0,4	1,6	0,2	4,4	
4	0,2	1,8	0,2	4,7	
5	0,1	1,9	0,2	5,0	
6	0,06	1,94	0,2	5,3	

Эритмалар яхшилаб аралаштирилади. 5—10 дақиқа ўтгач эритмаларнинг хиралашиши кузатилади. Казеиннинг изоэлектрик нуқтасига тўғри келадиган рН қийматида чўкма яққол кўринади.

Олинган натижаларни қуйидаги жадвалга мувофиқ тулдириг.

7- жадвал

рН	3,8	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3

Хиралашмаган эритма «—», хиралашган эритма «+», жуда хиралашган эритма бир нечта «+» ишораси билан белгиланади.

Олинган натижалар юзасидан тегишли хулоса чиқарилади ва дафтарга ёзилади.

13-и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ОҚСИЛЛАРИНИ ПОЛИАКРИЛАМИД ГЕЛИДА ЭЛЕКТРОФОРЕЗ УСУЛИ БИЛАН АЖРАТИШ

Полиакриламид гелида ўтказиладиган электрофорез усули оксил аралашмаларини ажратиш учун қулай ҳисобланади. Ушбу усул оксилларни электр майдонида ҳаракатланиши ва молекуляр элакдан ўтказилиши туфайли ҳам юқори кўрсаткичга эга. Электрофорез усули учун ишлатиладиган гель икки хил мономерларни: акриламид ва метилен-бисакриламидни полимерлаш йўли билан олинади. Полимерлаш реакциясида персульфат аммоний ва N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (ТМЭД) эритмаларининг аралашмаси катализатор вазифасини ўтайди. Катализатор ва мономерлар аввал буфер эритмада аралаштирилади, сўнгра аралашма махсус шиша найларга солинади ва шу найчаларда полимерланади.

Текширилувчи материал: суюлтирилган қон зардоби.

Реактивлар. 1, 2, 3-эритмалар тайёрлаш учун 7,5% ли гель эритмаси, 0,001% ли бромфенол кўк эритмаси; рН и 48,3 бўлган трис-глицин буфери; 10 Б қора амиднинг 7% ли сирка кислотада тайёрланган 1% ли эритмаси; 7% ли сирка кислота, дистилланган сув ишлатилади.

Керакли анжомлар. Электрофорез асбоби, шиша найчалар, пипеткалар, пробиркалар, штативлар, шприцлар, бўёқларни ювиш учун ишлатиладиган махсус мослама.

1. Электрофорез ўтказиш учун тайёрланиш. Барча тайёрланган реактивлар совутгичдан олиниб, хона ҳароратига етгунча столда қолдирилади. Яхшилаб ювилган ва қуритилган шиша найчалар вертикал ҳолда штативларга ўрнатилади. Найчаларнинг пастки қисми резина тикин билан беркитилади.

Гель тайёрлаш учун ўлчов цилиндрига навбати билан қуйидаги эритмалар солинади. 1-эритма 2 мл, 2-эритма 4 мл, 3-эритма 8 мл ва сув 2 мл. Аралашма пастер томизгичи ёрдамида шиша найчаларнинг $\frac{4}{5}$ ҳажмигача қуйилади. Сўнгра ҳар бир найчага гелни чайқатмаган ҳолда Пастер томизгичи билан дистилланган сув қуйилади.

Найчалар 37°C ли термостатга 15—20 дақиқага жойлаштирилади. Гель — сув орасида яққол чегара ҳосил бўлиши полимерланиш тугалланганлигини кўрсатади. Найчалар термостатдан олиниб, гел устидаги сув чайқатиш йўли билан тўкиб ташланади.

Найчадаги гел устига пастер томизгичи ёрдамида 2 томчи қон зардоби томизилади. Қон зардоби 20 марта суюлтирилган ва бромфенол кўк индикатори билан бўялган бўлиши керак. Найчаларнинг тагидаги резина тикин олиб ташланади. Найчалар электрофорез асбобининг юқори камерасига ўрнатилади.

2. Электрофорез. Электрофорез асбоби икки камерадан иборат (3-расм). Камералар бир-бирининг устига ўрнатилади. Юқори камерага ўрнатилган шиша найчалар пастки камерага тушиб туриши керак. Юқори ва пастки камералар найчаларни кўмиб тургунча рН и 8,3 бўлган буфер эритма билан тўлдирилади. Камеранинг марказига электродлар ўрнатилган: юқориси — катод (—), пасткиси — анод (+).

Электрофорез асбоби билан ишлаганда қуйидаги тартибга риоя қилинади.

1. Электрофорез асбоби доимий ток берувчи асбобга уланади. Электродларнинг керакли қутбларга уланганлиги кузатиб турилади.

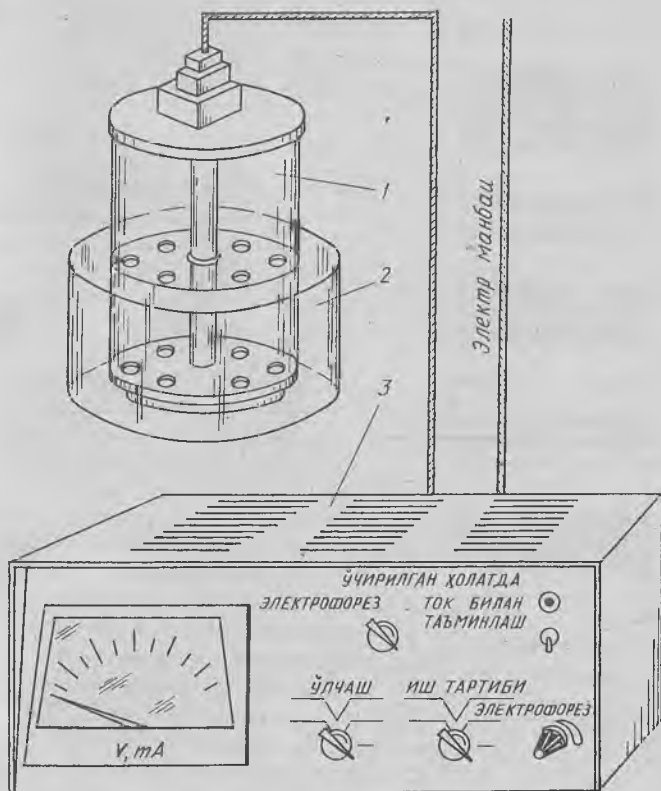
2. Ток берувчи асбоб (ТБА) нинг «электрофорез» деб ёзилган қўлчаси чап томоннинг охири ҳолатига келтирилади. «Сеть» — тумблери ўчирилади.

3. ТБА 220 В ли токка уланади.

4. Ток билан таъминловчи «электрофорез» қўлчаси, электрофорез ҳолатига келтирилади. Амперметр кўрсаткичи 25—50 мА га тўғриланади. «Ўлчаш» қўлчаси х1 мА ҳолатига келтирилади.

5. «Сеть» қўлчаси ишга туширилади, лампочка ёнади.

6. «Электрофорез» қўлчаси соат йўналиши бўйича, ҳар қайси найча учун 2 мА ҳисобида (10 найча учун 20 мА)



3-расм. Электрофорез асбоби.

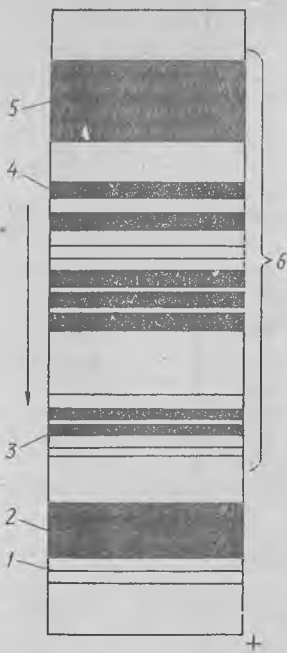
1-устки камера; 2-пастки камера; 3-электр манбаи.

кўрсаткичга эга бўлгунча буралади; 15 дақиқа ўтгач ток кучи ҳар қайси найчага 4 мА ҳисобида (10 найчага 40 мА) оширилиб, шу кўрсаткич тажриба ўтказиш тугагунча ушланиб турилади. Электрофорез 1—1,5 соат давом этади. Шу вақт ичида бўёқ узун бинафша йўл ҳосил қилади. Йўл найчанинг пастки қисмидан 0,5 см юқорирокда бўлиши керак.

7. Иш тугагач асбоб ўчирилади. Бунинг учун «Сеть» гүмблери ёпиқ ҳолатга келтирилади ва камера ТБА дан ажратилади.

Камеранинг юқори қисмидаги буфер алоҳида қолбага ва пастки камерадаги буфер бошқа қолбага солинади. Буферлар 10 мартагача ишлатилиши мумкин.

3. Электрофорездан сўнг гелъ устунчаларига ишлов



4-расм. Соғлом одам қон зардобидеги электрофореграммасы.

1- α -гликопротеин; 2-альбуминлар; 3-гаптоглобулин, церулоплазмин; 4- β , α -липопротеинлар; 5- γ -глобулинлар; 6- α , β -глобулинлар.

бериш. Камерада ажратилган найчалар рақамланган пробиркаларга солинади. Найчалардаги гель узун нинали шприцдан гель ва шприц орасига девор буйлаб секин-аста сув қуйиш орқали ажратиб олинади.

Гель устунчалари буюк солинган пробиркага солинади. 10 дақиқа ичида оксил ва гель буюялади. Сўнгра буюк бошка идишга олиниб, гель 7% ли сирка кислота эритмаси билан тўлдирилади. Гельнинг ортикча буюклари ювилиши учун эритма бир неча марта алмаштириб турилади. Натижада гель рангсизланиб, фақат оксилнинг буюялган қисми қолади (4-расм-

да соғлом одам қон зардобидеги оксилларнинг электрофореграммасы кўрсатилган). Бу оксилларнинг миқдорини аниқлаш учун денситометрия усулидан ёки фотоэлектроколориметрия йўлидан фойдаланилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Электрофорез усулининг асосланиши, иш тартиби ва унинг бажарилиши дафтарга ёзилади.

Қуйидаги саволларга жавоб беринг.

1. Электрофорез усули оксилларнинг қандай хусусиятига боғлиқ.

2. Оксил аралашмаларини қайси усул ёрдамида алоҳида оксилларга ажратиш мумкин?

3. Оксилларнинг изоэлектрик ҳолати нима?

4. Изоэлектрик нуқтаси рН и 1 га тенг бўлган пепсин электр майдонида қайси қутб томон ҳаракатланади? рН и 4,6 бўлган тухум альбумини-чи? рН и 7 бўлган миоглобин ва рН и 9,5 бўлган химотрипоноген-чи?

5. Оксилларнинг ионланиш даражасини қандай қилиб ошириш мумкин?

6. Полиакриламид гель электрофорези ишлаш кўрсаткичининг юқори даражаси нимага боғлиқ?

5. ОҚСИЛЛАРГА ЎТҚАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯЛАР, ОҚСИЛ ТАРКИБИДАГИ АМИНОҚИСЛОТАЛАРНИ АНИҚЛАШ

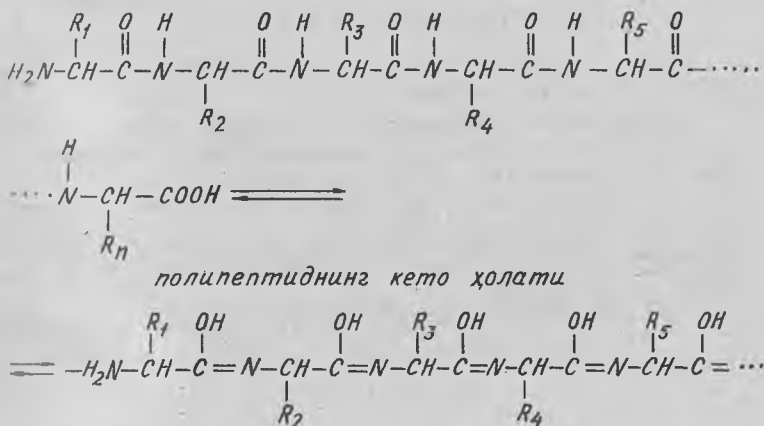
Оқсилларнинг турли-туманлиги улар таркибидаги аминокислоталар сони, сифати ва тартиби билан ўлчанади. Оқсил биосинтези жараёнида бирор таъсирот натижасида, аминокислоталарнинг ўрин алмашилиши (ўроксимон хужайра анемиясида) ёки тушиб қолиши сабабли турли прсий касалликлар келиб чиқиши мумкин. Оқсил ёки аминокислоталар етишмовчилиги ҳам турли касалликларга олиб келади. Шунинг учун турли биологик суюқликлар таркибидаги оқсилларни ва аминокислоталарни сифат ёки миқдорий анализи муҳим амалий аҳамиятга эга.

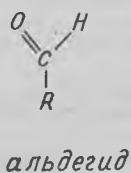
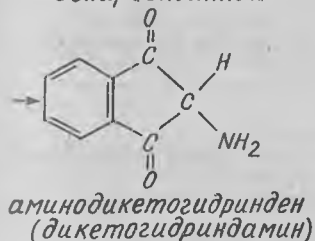
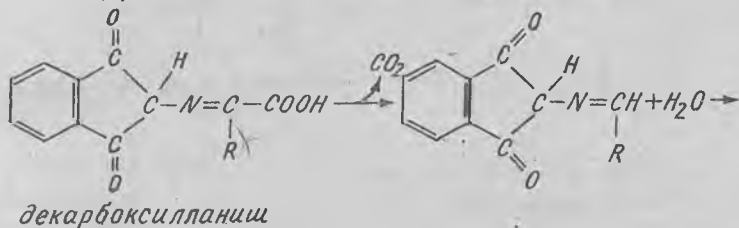
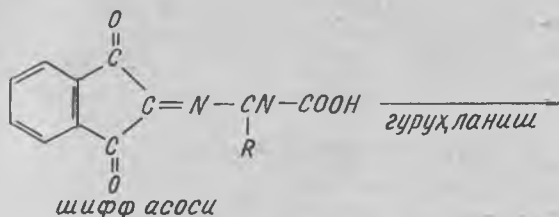
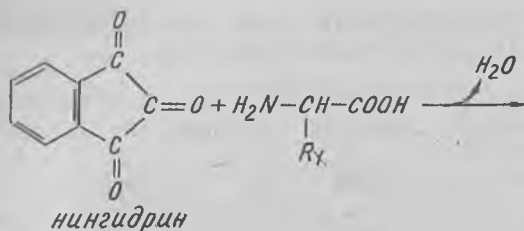
Оқсил ва аминокислоталарни аниқлаш улар таркибидаги функционал гуруҳларни турли реактивлар билан рангли бирикмалар ҳосил қилишига асосланган.

14-и ш. ОҚСИЛЛАРНИ БИУРЕТ РЕАКЦИЯСИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Реакциянинг асосланиши. Оқсил эритмаси ишқорий шароитда мис (II) сульфат эритмаси қўшилганда кўким-тир-бинафша рангга киради. Ушбу ранг мис ионларининг пептид боғлар билан ҳосил қилган комплекс бирикмасига боғлиқ. Бу реакцияни икки ва ундан ортиқ пептид боғ тутган пептидлар, оқсиллар беради. Ушбу реакция барча оқсилларга тегишли.

Реакция тенгламаси куйидагича:





Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: 0,1% ли нингидриннинг спиртли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, пипеткалар, спирт лампаси.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркадаги 4—5 томчи оксил эритмасига 3—4 томчи нингидрин эритмасидан солиб, 1—2 дақиқа қиздирилади. Кўкимтир-бинафша ёки бинафша ранг ҳосил бўлади.

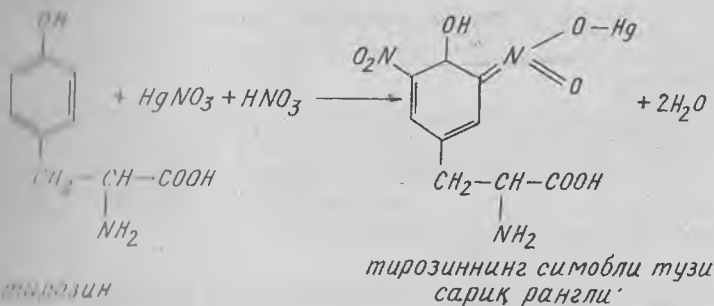
Олинган натижалар 8-нчи жадвалга ёзилади.

**ФЕНИЛАЛАНИН ВА ТИРОЗИН АМИНОКИСЛОТАЛАРИГА
ЎТҚАЗИЛАДИГАН ХУСУСИЙ СИФАТ РЕАКЦИЯ
(МИЛЛОН РЕАКЦИЯСИ)**

Миллон реакцияси фақат тирозин ва фенилаланиннинг бу реакция ҳисобланади.

Реакциянинг асоси. Оксил эритмасига Миллон реактиви (симобнинг нитрат кислотадаги эритмаси) қўшилганда тирозин ва фенилаланиннинг бензол ҳалқаси динитротирозиннинг симобли тузи ҳосил бўлади ва сабабли у қизил рангга киради.

Реакция тенгламаси куйидагича.



Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: Миллон реактиви.

Керакли ашжомлар: пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт лавчаси.

Бажариладиган иш тартиби. 5 томчи оксил эритмасига 1—2 томчи Миллон реактиви солиниб, эҳтиётлик билан кўздирилади. Қизил ранг ҳосил бўлади.

Олинган натижа 8-жадвалга ёзилади.

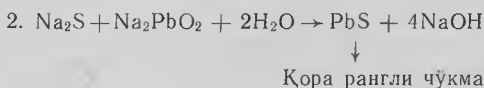
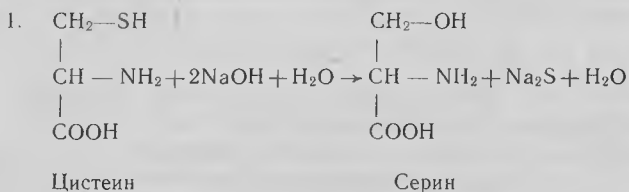
**18-иш. КУЧСИЗ БОҒЛАНГАН ОЛТИНГУГУРТ ТУТУВЧИ
АМИНОКИСЛОТАЛАРГА ЎТҚАЗИЛАДИГАН РЕАКЦИЯ.
ФОЛИ РЕАКЦИЯСИ**

Цистеин ва цистин аминокислоталарида олтингугурт жулда кучсиз боғланган бўлиб, уларни ишқор ёрдамида ажратиш мумкин.

Реакциянинг асосланиши. Ишқорий гидролиз натижасида ажралган олтингугурт қўرғошин билан бирикиб, бора рангли қўрғошин сульфид тузини ҳосил қилади. Бу туз эритмада чўкма ҳолатда бўлади.

Ушбу реакция цистеин алмашинуви бузилганда амикланади.

Реакция тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: оксил эритмаси,

Реактивлар: Фоли реактиви.

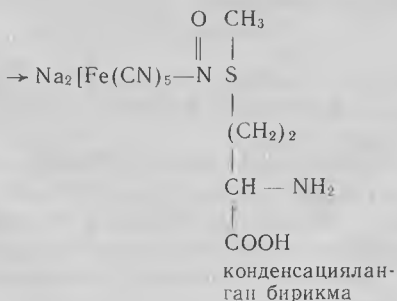
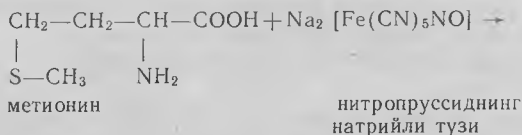
Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт лампы.

Бажариладиган иш тартиби. 5 томчи оксил эритмасига шунча микдорда Фоли реактиви солиб қиздирилади ва 1—2 дақиқага қолдирилади. Шунда қорамтир қўргошин сульфид чўкмаси ҳосил бўлади. Олинган натижа 8-жадвалга ёзилади.

19- и ш. МЕТИОНИНГА ЎТҚАЗИЛАДИГАН НИТРОПРУССИД РЕАКЦИЯСИ

Реакциянинг асосланиши. Метионин ишкорий шароитда натрий нитропруссид билан қизил рангли комплекс бирикма ҳосил қилади.

Реакция тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: натрий гидроксиднинг 20% ли эритмаси, натрий нитропруссиднинг 5% ли эритмаси.

Беракчи анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт эритмаси.

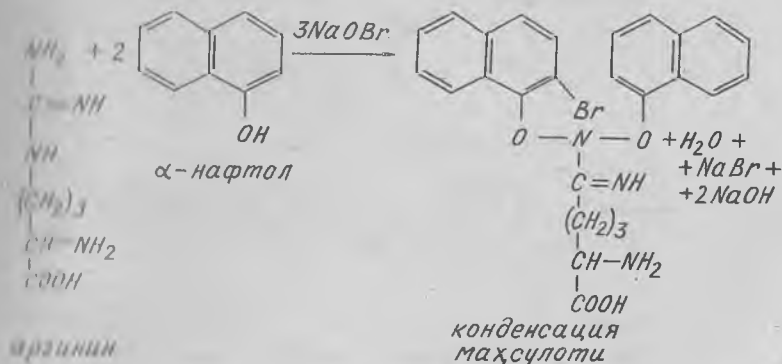
Бажариладиган иш тартиби. 5 томчи оксил эритмасига 1—5 томчи натрий гидроксиднинг 20% ли эритмасидан солинб бир печа дақиқа киздирилади. Эритма совитилганидан унга 2—3 томчи натрий нитропруссид эритмаси солинлади. Суюклик қизил тусга киради.

Олинган натижа 8-жадвалга ёзилади:

20-иш. АРГИНИНГА УТҚАЗИЛАДИГАН САҚАҒУТИ РЕАКЦИЯСИ

Реакциянинг асосланиши. Аргининнинг гуанидин гуруҳи α -нафтол иштирокида ишқорий муҳитда гипобромид билан оксидланиб, пушти-қизғиш рангли конденсацияланган маҳсулот ҳосил қилади.

Реакция тенграмаси куйидагича:



Текширилувчи материал: оксил эритмаси ёки 0,01% ли аргинин эритмаси.

Реактивлар: натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, α -нафтолнинг 0,2% ли спиртли эритмаси, натрий гипобромиднинг 2% ли эритмаси, калиевий эритмаси.

Беракчи анжомлар. Пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт эритмаси.

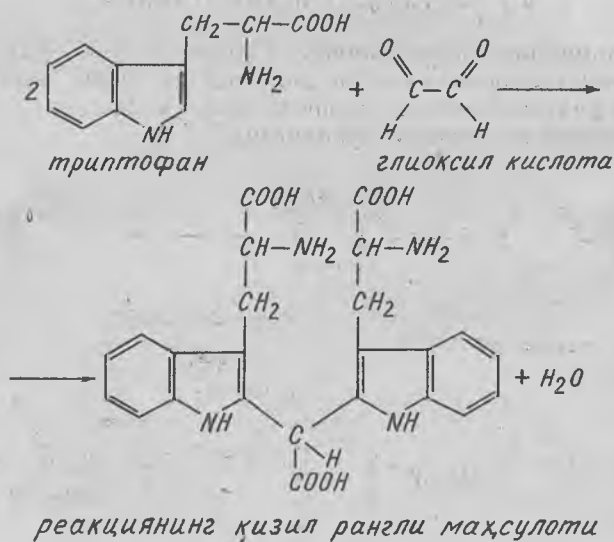
Бажариладиган иш тартиби. Пробиркаларнинг бирига оксил эритмасидан 10 томчи, иккинчисига 0,01% ли аргинин эритмасидан 10 томчи солиб уларнинг ҳар бирига 10% ли натрий гидроксид эритмасидан 10 томчи

ва α -нафтолнинг 2 % ли спиртли эритмасидан солинади ва яхшилаб аралаштирилади. Сўнг уларга натрий гипобромид эритмасидан солинади. Эритмага 40 % ли сийдикчил эритмасидан 5 томчи солинганда пушти-қизил ранг ҳосил бўлиши тезлашади. Эритма пушти-қизғиш тусга киради. Олинган натижа 8-жадвалга ёзилади.

21-иш. ТРИПТОФАНГА УТҚАЗИЛАДИГАН АДАМКЕВИЧ РЕАКЦИЯСИ.

Реакциянинг асосланиши. Триптофан глиоксил кислота билан ўзаро таъсирланиб, қизил-бинафша рангли бирикма ҳосил қилади.

Реакция тенгламаси қуйидагича.



Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота, глиоксил кислота.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт лампаси.

Бажариладиган иш тартиби. 5 томчи оксил эритмасига 5 томчи концентрланган глиоксил кислота ва 10 томчи концентрланган сульфат кислотадан жуда эҳтиётлик билан, пробирка девори бўйлаб томизилади. Эритмаларнинг аралашиб кетишига йўл қўймаслик керак. Қизил-бинафша рангли халқа ҳосил бўлгани кузатилади.

Оқсилларга ўтказилган рангли реакциялар

№	Реакциянинг номи	Ишлатилган реактивлар	Кузатилган ранг	Очилган бирикма

Ушбу реакциялар бўйича хулоса.

22 н.ш. ГИСТИДИНГА ПАУЛИ РЕАКЦИЯСИ

Реакциянинг асосланиши. Тирозин, триптофан ва гистидин ишқорий муҳитда diazo-реактив билан сарғиш-пушти рангли комплекс бирикма ҳосил қилади.

Реакция тенгلامаси қуйидагича:



Теллаштирилувчи материал. оксил эритмаси.

Реактивлар: натрий карбонат эритмаси, diazo-реактив.

Керакли анижомлар: пробиркалар, пипеткалар, штативлар ва спирт эритмаси

Ижарилладиган иш тартиби. 20 томчи оксил эритма-сига натрий карбонат эритмасидан ва diazo-реактивдан

1 мл солиб, ранг ҳосил бўлиши кузатилади. Бир неча дақиқа ўтгач гистидиннинг diaзореактив билан сарғиш-пушти рангли комплекс бирикмаси ҳосил бўлади.

Олинган натижа 8-жадвалга ёзилади.

6. ОКСИЛЛАР ГИДРОЛИЗИ ВА АМИНОКИСЛОТАЛАРНИ ФОРМОЛ ТИТРЛАШ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Қўпчилик оксиллар тиббиётда даволаш мақсадида қўлланилади (вакциналар, зардоблар, гаммаглобулинлар, гистоглобулинлар, ферментлар, гормонлар ва ҳ. к.). Ушбу оксилларни сунъий йўл билан олиш учун уларнинг тузилишини ўрганиш керак. Оксилни соф ҳолда ажратиш учун унинг парчаланишини, аминокислоталар таркибини, кетма-кетлигини ўрганиш лозим.

Оксилларни лаборатория шароитида ажратиш ва парчалаш жуда мураккаб жараён. Уларни парчалаш, яъни гидролизлаш учун турли хилдаги катализаторлардан фойдаланилади.

Гидролиз — мураккаб моддаларни қуйи моддаларга, боғларини узилиш жойига сув бириктирилиши билан кетадиган парчаланиш жараёнидир. Катализаторлар ишлатилишига кўра кислотали, ишқорли ва ферментли гидролиз турларига тафовут қилинади. Оксил гидролизининг охири маҳсулоти аминокислоталардир. Организмда оксил гидролизи доимо овқат ҳазм бўлиш вақтида рўй беради. Шунингдек, хужайра фаолиятида ҳам протеолитик ферментлар таъсирида хужайра оксилларининг гидролизи кузатилади. Кислотали гидролиз жараёнида айрим аминокислоталарнинг парчаланиши кузатилади: триптофан тўлиқ парчаланаяди, серин, треонин, цистин, тирозин, фенилаланин эса қисман парчаланаяди.

Гидролизланган оксил аралашмалари ишлов берилгандан сўнг турли касалликларда, гипопроteinемия ҳолатларида даволаш учун йўғон ичак орқали организмга юборилади.

23-и ш. ОДДИЙ ОКСИЛЛАРНИНГ КИСЛОТАЛИ ГИДРОЛИЗИ

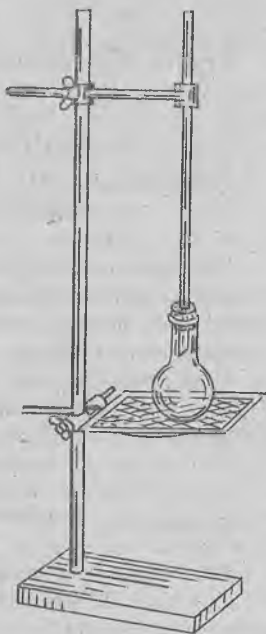
Оксиллар кислотали гидролиз жараёнида юкори молекулали пептидларга, қуйи молекулали пептидларга, оддий пептидларга, дипептид ва аминокислоталарга парчаланаяди. Оксилларнинг тўлиқ гидролизи узоқ вақт давом этади. Бунинг учун оксил эритмаси ҳаво совитгич

Ўрнатилган думалоқ тубли колбада кислота иштирокида қайнатилади (5-расм).

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар. Концентрланган хлорид кислота, натрий гидроксиднинг 1,10 % ли эритмаси, сирка кислотанинг 1 % ли эритмаси, нейтрал формалиннинг 20 % ли эритмаси (формалин узок сақланганда ҳаво кислороди билан оксидланиб, чумоли кислотасини ҳосил қилади. Шунинг учун ишлатишдан олдин бу эритма нейтралланиши керак. Бунинг учун 10 мл формалин эритмаси 0,05 н. ишқор эритмаси билан фенолфталеин индикатори иштирокида очушти рангга киргунча титрланади), фенолфталеиннинг 0,5% ли эритмаси (тайёрлаш усули 293-бетда кўрсатилган, 0,05 н. натрий гидроксид эритмаси (тайёрланиши 291-бетда), лакмус, индикатор қоғозчалари, майдаланган писта кўмир.

Керакли анжомлар. Ҳаво совитгичи ўрнатилган думалоқ тубли колба, шиша таёқчалар, титрлаш учун кимёвий стаканлар ёки колбачалар, 1,2 мл ли ўлчов пинеткалари, микро-ва макробюреткалар, 25 мл ли ўлчов цилиндрлари.



5-расм. Оксил гидролизи учун ишлатиладиган, ҳаво совитгичи билан бириктирилган думалоқ тубли колба.

Бажариладиган иш тартиби. Думалоқ тубли колбага оксил эритмасидан 20 мл ва концентрланган хлорид кислотадан 5 мл (нисбий зичлиги 1,19 бўлган) солиб, колба узун шиша най билан бириктириладида, абест тўрли штативга ўрнатилади (5-расм). Қолбадаги аралашма 45 ёки 90 дақиқа (ўқитувчи назоратида) ҳаво тортич шкафта қайнатилади. Оксилларнинг кислота-ли гидролизи жараёнида аминокислоталардан ташқари аммиак, водород сульфид, гидролизнинг бўялган маҳсулотлари, гумин моддалар ва бошқалар ҳосил бўлади. Шунинг учун гидролизатга писта кўмир солиб, кераксиз маҳсулотлар адсорбцияланади ва эритма филтрдан ўтказилади. Сўнг эритма индикатор ёрдамида нейтралланади.

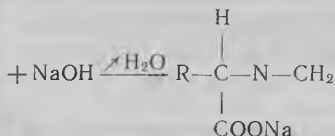
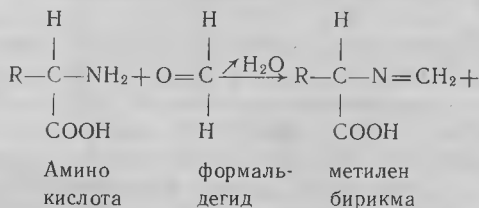
24-иш. СЕРЕНСЕН УСУЛИ БИЛАН ФОРМОЛ ТИТРЛАШ

Оксилнинг гидролизланиш жараёнида пептид боғларнинг узилишидан карбоксил ва аминогурӯҳлар сони тенг миқдорда ортиб боради. Аминогурӯҳлар сони ўлчаш йўли

билан оксилларнинг гидролизланиш даражаси ва азот сонига қараб оксил миқдорини ҳам ўлчаш мумкин.

Усулнинг асосланиши. Гидролизатга қўшилган формальдегид α -аминогуруҳни боғлаб, метилен бирикма ҳосил қилади (метиленаминокислота). Эркин ҳолдаги карбоксил гуруҳ эса ишқор ёрдамида титрланади.

Реакция тенгламаси куйидагича:



метиленбирик-
манинг натрий-
ли тузи

Бажариладиган иш тартиби. 1. Гидролизланмаган оксил эритмасидаги карбоксил гуруҳ миқдорини ўлчаш. 1 мл оксил эритмасига 5 томчи нейтрал формалин эритмаси ва 3 томчи фенолфталеин солиб, микробюреткадаги 0,05 н натрий гидроксид эритмаси билан турғун оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Титрлаш учун сарфланган натрий гидроксид миқдори жадвалга ёзилади.

2.45 ва 90 дақиқа гидролизланган оксил гидролизатидаги карбоксил гуруҳ миқдорини ўлчаш. 45 ва 90 дақиқа қайнатилган оксил эритмасига бир чимдим писта кўмир солиб яна 5 дақиқа қайнатилади. Қорамтир ранг оқаради. Шундан сўнг гидролизат 25 мл ли ўлчов цилиндрига олиниб ҳажми 25 мл га етказилади ва филтрдан ўтказилади. Филтрдан ўтган гидролизатдан 1,25 мл олиб устига уч томчи фенолфталеин томизилади ва 10 % ли натрий гидроксид билан микробюретка орқали оч-пушти рангга киргунча титрланади (20 мл оксил эритмасига 25 мл гидролизат тўғри келади, 1 мл оксил эритмасига эса 1,25 мл гидролизат тўғри келади). Ушбу титрлаш реакцияси хлорид кислотани нейтраллаш учун ўтказилади, ишқор миқдори ҳисобга олинмайди.

Нейтралланган гидролизатдан олиб (гидролизланмаган оксил эритмасидаги карбоксил гуруҳ микдорини ўлчаш каби), юқоридагидек карбоксил гуруҳ микдори ўлчанади ва олинган натижа жадвалга ёзилади.

Амино-гуруҳ микдорига кўра унинг азотини ҳисоблашда гидролиз жараёнида карбоксил ва аминогруҳлар сопи эквивалент равишда ортишини эътиборга олиб, карбоксил гуруҳни нейтраллаш учун кетган ишқор микдоридан фойдаланилади. Ишқор эритмасининг 1 литрига 14 г азот, 1 мл га 14 мг азот тўғри келади. 1 мл 0,05 н ишқор эритмасига эса 0,07 мг азот тўғри келади.

Гидролизланмаган оксил эритмаси, 45 ва 90 дақиқа гидролизлангандан сўнг топилган гидролизатор таркибидан азот микдори бўйича қилинган ҳисоблар жадвалга ёзилади, азот микдорига қараб эгри чизик чизилади.

Оксилнинг оралиқ парчаланиш маҳсулотларини биурет реакцияси ёрдамида аниқлаш. Нейтралланган гидролизат билан биурет реакцияси ўтказилади.

Олинган натижа 9-жадвалга ёзилади.

9- ж а д в а л

Оксил эритмаси ва унинг гидролизатини формол усул билан титрлаш ҳамда оралиқ маҳсулотларини аниқлаш

Титрлаш учун олинган эритма	Титрлаш учун кетган 0,05 н NaOH микдори	Аминогуруҳдаги азотни NaOH бўйича ҳисоблаш	Биурет реакция натижаси
Гидролизланмаган оксил эритмаси			
45 дақиқа қайнатилган гидролизат			
90 дақиқа қайнатилган гидролизат			

Ўтказилган тажриба бўйича хулоса:

25- и ш. ОКСИЛ ГИДРОЛИЗАТИ — АМИНОКИСЛОТАЛАР АРАЛАШМАСИНИ ХРОМАТОГРАФИЯ УСУЛИ БИЛАН АЖРАТИШ

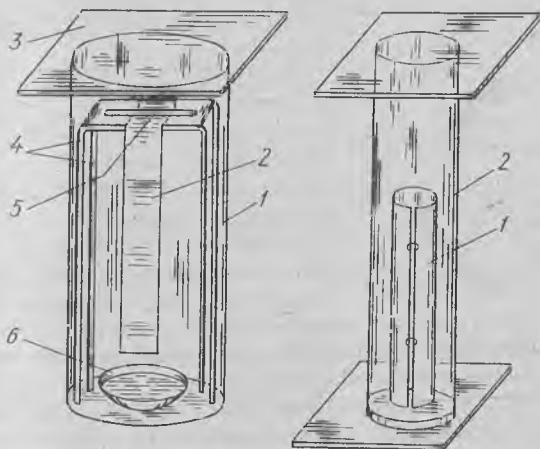
Гидролизат таркибидаги аминокислоталар аралашмасини ажратиш ва айрим аминокислоталарнинг сифатли микдорини аниқлашда қоғозда ўтказиладиган таксимловчи хроматография усули кенг қўлланилади. Бу усул М. С. Цветнинг 1903 йилда таклиф қилган хроматография анализининг ўзгартирилган кўринишидир.

Аминокислоталарни ажратиш уларни иккита аралашмайдиган эритмада (бири сув, иккинчиси сув билан тўйинтирилган органик эритма) эриш хусусиятини аниқлаш орқали амалга оширилади. Ҳозирги вақтда хроматография усулининг қуйидаги хиллари мавжуд: адсорбцион усул аминокислоталарнинг турли адсорбентларда адсорбцияланишига боғлиқ; ион алмаштирувчи хроматография усули аминокислоталарнинг зарядига қараб катионит ёки анионитлардан фойдаланилади. Афин хроматография — хусусий боғланиш ҳолатига эга бўлган ферментлар, иммуноглобулинлар, рецептор ва гормонлардан фойдаланиб тегишли бирикмалар ажратилади.

Аминокислоталар аралашмасини қоғоз хроматография усули билан ажратиш. Ушбу усул махсус тайёрланган хроматография — филтър қоғозидан ўтказилади. Намланган камерага жойлаштирилган хроматография қоғози 20 — 22 % сувни ушлаб қолиш хусусиятига эга. Демак, сув ҳаракатланмайдиган фаза, чунки у қоғозга шимилган, ҳаракатланувчи фаза сифатида органик эритувчилардан фойдаланилади. Уларга сув билан тўйинтирилган изопропил, изобутил, бутил спиртлари, фенол ва бошқалар киради. Хроматография қоғозига бир томчи аминокислота аралашмасидан томизилади, қоғознинг иккинчи учи тегишли органик эритувчига туширилади. Эритувчи қоғоз бўлакчаси бўйлаб шимила бошлайди ва эриган аминокислотани ўзи билан бирга йўналтиради. Аминокислоталарнинг қоғоз бўлакчасидаги ҳаракатланиш тезлиги унинг эрувчанлигига боғлиқ. Аминокислота сувда қанча яхши эриса, органик эритувчида шунча ёмон эрийди ва органик эритувчига нисбатан ҳаракатланиш тезлиги суст бўлади. Шу йўл билан аминокислоталар турли масофада тақсимланади.

Аминокислоталарни хроматография қоғозидан ҳаракатланишига қараб; юқорига, пастга ва доира бўйлаб ҳаракатланувчи хроматография турлари тафовут қилинади.

Аминокислоталарнинг хроматография қоғозидан тақсимланиш масофалари α -аминокислоталар учун ўтказиладиган нингидрин реакцияси ёрдамида аниқланади. Аралашмадаги муайян аминокислотани аниқлаш учун хроматография қоғозига гувоҳ аминокислоталар томизилади ва шу аминокислоталарнинг масофасига кўра тегишли аминокислота аниқланади. Шунингдек, тегишли аминокислота тақсимланиш коэффициенти R_f га кўра аниқланиши мумкин.



6-расм. Пастга (а) ва юқорига (б) йўналтирилган хроматография камералари.

а) 1-камера; 2-қоғоз; 3-камеранинг қошқоғи; 4-кемача учун мослама; 5-кемача; 6-эритма солинган идиш. б) 1-қоғоз; 2-камера.

7-расм. Айлана хроматограмма учун камера.



$Rf = a/b$. Бунда a — аминокислоталарнинг томирилган жойдан ўтган масофаси, b — эритманинг ўтган масофаси. Масофа Rf мм да ўлчанади.

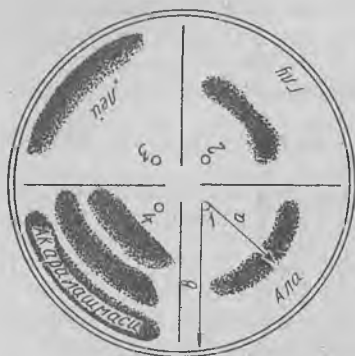
Коэффициент Rf ҳар қандай аминокислота учун тажриба ўтказилаётган шароитда хусусий катталиқдир.

Текширилувчи материал: гидролизланган аминокислота аралашмаси.

Реактивлар: тирозиннинг 0,4% ли эритмаси, глутамин кислотанинг 0,6% ли эритмаси, лейциннинг 0,5% ли эритмаси, нингидриннинг ацетондаги 0,2% ли эритмаси ва юқоридаги аминокислоталар аралашмаси, эритувчи системалари 15:15:10 нисбатда олинган бутил спирти, сирка кислота ва сув аралашмаси.

Керакли анжомлар: хроматография филтър қоғози, Петри қосачаси, хроматограммаларни илтиш учун мослама, пуркагич, 105°C ли қуритгич шкаф, қайчи, скальпеллар, ниша томизгичлар, килин нина.

Бажариладиган иш тартиби. Хроматография усули билан аминокислоталарни ажратиш учун ишлатиладиган камералар 6-расмда келтирилган (юқорига, пастга ва



8-расм. Аминокислоталарнинг айлана (доира) хроматограммаси.

айлана ҳаракатланадиган аминокислоталар хроматографияси).

1. Хроматография фильтр қоғозидан 11×11 см ли тўртбурчаклар ясалади. Тўртбурчак оддий қора қалам билан тўрт қисмга бўлинади. Чизиклар кесишган нуктадан радиуси 10 мм бўлган айлана чизилади. Тўртбурчакнинг томонлари тартиб рақамлари билан белгиланади. Шунданг сўнг хроматография қоғози Петри косачасига (7-расмдаги каби) ўрнатилади. Унинг четлари Петри косачасининг устида бўлиши керак.

2. Ҳар қайси бўлинмага ингичка томизгич ёрдамида синами аминокислота ва уларнинг аралашмаси эҳтиётлик билан томизилади (8-расм). Эритувчиларнинг шимилиши учун хроматография қоғозининг ўртасидаги тешикчага фильтр устунчаси ўрнатилади. Хроматография камерасига шу тешикча орқали қалин нина билан 10—15 мл эритувчи солинади. Идишнинг туби эритувчи билан тўлдирилган бўлиши керак. Камера қопқоқ билан беркитилади. Фильтр устунча орқали эритувчи секин-аста хроматография қоғозининг юқорисига қараб йўналади. Эритувчи хроматограмма чегарасига яқинлашганда жараён тугатилади, эритувчи етган чегара қалам билан белгиланади. Шундан кейин хроматограмма махсус мосламага жойлаштирилиб, $100\text{--}120^\circ\text{C}$ ли қуритгич шкафта қуритилади, шунда ажралган аминокислоталар қоғозга ўрнашади. Қуритиш жараёни 5—10 дақиқа, яъни эритувчининг ҳиди атрофга тарқалгунча давом эттирилади. Қуритилган хроматограмма аминокислоталарни аниқлаш учун нингидрин эритмаси пуркалади ва яна қуритилади. Натижада аминокислоталар ўрнашган жойда доғ ҳосил бўлади (8-расм).

3. Ҳар қайси аминокислотанинг « R_f » си топилади ва синама аминокислота билан аралашмадаги аминокислота солиштирилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Хроматография усулининг асосланишини, турини ҳамда олинган натижаларни дафтарга ёзиб, тегишли хулоса чиқаринг.

Аминокислоталарни аниқлашнинг аҳамиятини эслаб қолинг.

Қуйидаги саволларга жавоб беринг.

1. Ҳайвон ва одам оксилларига қайси аминокислоталар мисол бўлади?

2. Оксил молекуласидаги аминокислоталар қандай боғ билан боғланган?

3. α -аминокислоталар қандай реакция билан очилади? Ушбу реакциянинг асоси ва кимёвий тенграмаси қандай?

4. Оксилларга ўтказиладиган рангли реакциялар нимага асосланган?

5. Ароматик аминокислоталар қандай реакция билан очилади? Унинг асоси ва кимёвий тенграмаси қандай?

6. Кучсиз ва мустаҳкам боғланган олтингугурт тутувчи аминокислоталар қандай реакция билан очилади, унинг аҳамияти ва кимёвий тенграмаси қандай?

7. Оксил гидролизи нима? Оксил гидролизи учун қандай шароитлар керак? Оксил гидролизининг схемасини тузинг?

8. Оксил гидролизатидаги аминокислоталар аралашмаси қайси усул билан ажратилади? Усулнинг аҳамияти қандай? Усулнинг турларини айтинг?

9. Хроматография фильтр қоғозида ўтказиладиган усулнинг аҳамияти-нимадан иборат?

7. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ ОКСИЛ МИҚДОРINI АНИҚЛАШ

Қон зардоби ва бошқа биологик суюқликлар таркибидаги оксил миқдорини аниқлаш тиббиётда ва биологияда катта аҳамиятга эга. Қон зардоби оксилларининг миқдори турли ёшда турлича бўлади.

10- ж а д в а л

Қон зардобидаги оксилнинг ёшга боғлиқлиги

Ёш	Оксил миқдори	
	г %	г/л
Янги туғилганларда	5,1	51
1 ойгача	"	"
1 ойлик	4,8	48
2 ойлик	5,3	53
5 ойлик	6,1	61
1 яшар	6,5	65
3—4 яшар	6,9	69
5—7 яшар	7,0	70
8—14 яшар	7,4	74
катта ёшдагиларда	6,5—8,0	65—80

Қон зардобдаги оксил микдорининг камайиши гипопро-
теанемия дейилади. Гипопротеанемия оксил етишмовчили-
гида, оксилларнинг сўрилиши бузилганда, уларнинг
синтезланиши пасайганда, кимёвий моддалар билан
захарланганда, ҳавfli ўсмаларда, қалқонсимон без
гиперфункциясида ва бошқа ҳолларда кузатилади.

Қон зардоби таркибида оксил микдорининг ортиб
кейтиши гиперпротеанемия дейилади. Бу ҳолат орга-
низмнинг кўп микдорда сув йўқотиши натижасида,
яъни қон қуюқлашганда кузатилади.

Гипопротеинемия асосан гипоальбуминемия билан
боғлиқ бўлса, гиперпротеинемия — гиперглобулинемия-
га боғлиқ бўлади.

Шунинг учун биологик суюқликлар таркибидаги
оксил микдорини аниқлаш амалий аҳамиятга эга.

26- и ш. ОКСИЛ МИҚДОРНИ БИУРЕТ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси. Барча оксиллар ишқорий муҳитда мис
(II) сульфат эритмаси билан бинафша рангли бирикма
ҳосил қилади. Эритманинг ранги оксил микдорига тўғри
пропорционал. Бўялган эритма колориметрланади, то-
пилган эритма зичлигига кўра аввалдан тайёрланган
ўлчов эгри чизигидан оксил микдори топилади.

Текширилувчи материал: 0,5; 1,0; 1,5 % ли ва концентрацияси
номаълум бўлган оксил эритмаси.

Реактивлар: Биурет реактиви (тайёрланиши 284- бетда).

Керакли анжомлар: Пробиркалар, штативлар, бюреткалар. Фото-
электроколориметр (ФЭК), қалинлиги 1 см бўлган кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Тўртта куруқ пробирка
олиб унинг биринчисига 0,5% ли, иккинчисига 1,0 % ли,
учинчисига 1,5 % ли оксил эритмаси солинади. Ушбу
эритмалар ўлчов эгри чизигини тайёрлаш учун керак
бўлади. Тўртинчи пробиркага микдори номаълум бўлган
оксил эритмасидан солинади. Мақсад ана шу пробир-
кадаги оксил микдорини аниқлаш ҳисобланади.

2. Ҳар қайси пробиркага 4 мл дан биурет реактиви
қуйилади, яхшилаб аралаштирилгач, ҳона ҳароратида
20 дақиқага қолдирилади. Шунда эритма аста-секин
рангга киради. Рангли эритманинг зичлиги яшил нур
филътри қаршисида (ФЭК нинг 540 нм тўлқин узунлигида)
1 см қалинликдаги кюветада ўлчанади. Назорат сифатида
биурет реактивидан фойдаланилади.

3. Биринчи учта пробиркадан олинган натижа бўйича ўлчов эгри чизиғи чизилади. Ордината ўқига оптик зичлик натижалари, абсцисса ўқига эса концентрацияси маълум бўлган доимий эритма натижалари келтирилади.

Микдори номаълум бўлган оксил эритмаси зичлигини билган ҳолда ўлчов эгри чизиғидан фойдаланиб, изланган оксил микдори топилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини ўлчов эгри чизиғини ва топилган оксил микдорини дафтарингизга ёзиб, тегишли хулоса чиқаринг.

27- и ш. ОКСИЛ МИҚДОРНИН И ОУРИ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Ушбу усул билан жуда кам микдордаги оксилни аниқлаш мумкин.

Усулнинг асоси. Усул кўк рангда бўялган маҳсулотларнинг ҳосил бўлишига асосланган. Оксил ишкорий шароитда мис ионлари билан биурет реакцияси ва молибденфосфат тузларини, вольфрамфосфат тузлари билан қайтарилиб кўк рангни ҳосил қилади. Рангнинг оч-тўқлиги оксил микдорига боғлиқ.

Текширилувчи материал: оксилнинг 1% ли ва 50,100 марта суюлтирилган эритмалари.

Реактивлар: «С» ва «Е» реактивлари.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, 1 мл ли ўлчов пипеткаси, бюреткалар, ФЭК, 1 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Бир катор пробиркаларга жадвалга мувофиқ оксил эритмалари ва тегишли реактивлар солинади.

11- ж а д в а л

Пробиркаларнинг тартиби	Оксил эритмаси	Сув	Е реактиви	С реактиви	Оптик зичлик
1	—	1 мл	5 мл	0,5 мл	
2	—	1 мл	5 мл	0,5 мл	
3	0,15	0,85 мл	5 мл	0,5 мл	
4	0,2	0,8 мл	5 мл	0,5 мл	
5	0,3	0,7 мл	5 мл	0,5 мл	
6	0,5	0,5 мл	5 мл	0,5 мл	

Эритма солинган пробиркалар яхшилаб аралаштирилади ва хона ҳароратида 30 дақиқа қолдирилади. Пробиркадаги эритмалар оксил микдорига боғлиқ ҳолда бўялади. Пробиркадаги эритмалар вақт ўтгандан сўнг (670 нм тўлқин узунлигида) қизил нур фильтрида, 1 см қалинликдаги кюветада фотоэлектроколориметрланади ёки 660 нм тўлқин узунлигида спектрофотометрланади. 3—6-пробиркаларга оксил микдори бўйича ўлчов эгри чизиғи чизилади ва ундан фойдаланиб текширилаётган оксил микдори топилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асоси, ўлчов эгри чизиғи ва номаълум оксил микдори дафтарга ёзилади, тегишли хулоса чиқарилади.

28-иш. ОКСИЛ МИҚДОРИНИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИК УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

Оксил таркибига кирувчи аминокислоталардан триптофан, тирозин, фенилаланин ультрабинафша нурларни (камрок даражада) ютиш қобилиятига эга. 280 нм тўлқин узунлигидаги оксил эритмаларининг зичлиги юқоридаги аминокислоталар микдорига тўғри пропорционал. Ушбу усул оксил аралашмасининг турли микдорини ўлчашда яхши натижа беради.

Текширилувчи материал: оксил эритмаси.

Реактивлар: триптофан, тирозин ва оксил эритмалари.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, ўлчовли пипеткалар, спектрофотометр.

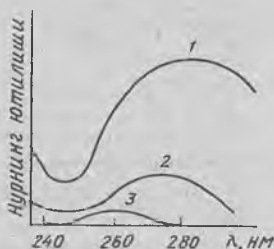
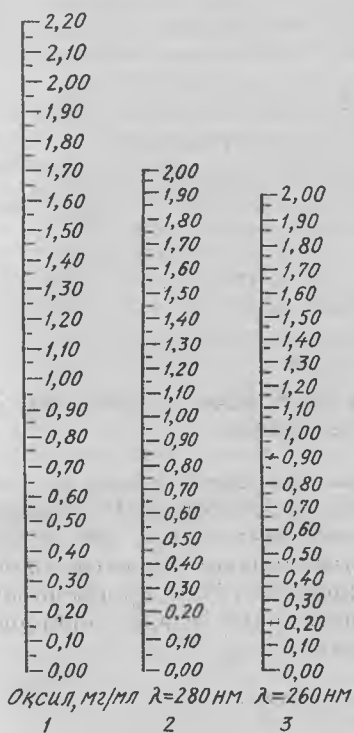
Бажариладиган иш тартиби. Рангсиз ва тиник триптофан, тирозин ва оксил эритмалари навбати билан 280 нм тўлқин узунлигидаги ва 1 см қалинликдаги кюветада спектрофотометрдан ўтказилади, сўнгра эритмаларнинг оптик зичлиги топилади. Топилган зичлик бўйича олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан фойдаланиб тегишли микдорлар аниқланади. Оксил микдори Адамс номограммасидан топилиши мумкин (9—10-расм).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Спектрофотометрик усулнинг асосини, олинган натижаларни дафтарингизга ёзиб, хулоса чиқаринг.

Қуйидаги саволларга жавоб беринг.

1. Оксил микдорини қандай усуллар билан аниқлаш мумкин?

2. Биурет, Лоури, спектрофотометрик усуллар қандай реакцияларга асосланган. Ушбу усулларнинг қайси бири



9- расм. Триптофан (1); тирозин (2); фенилаланин (3); аминокислоталарнинг нур ютиши.

10-расм. Оксил микдорини аниқлаш номограммаси.

оркали оксилнинг энг кам микдорини ўлчаш мумкин?

3. Биологик суюқликдаги оксил микдори 15 мг/л ни ташкил қилса, қандай усулдан фойдаланиш маъқул.

4. Оксил аралашмаси таркибида кўп микдорда триптофан ва тирозин бўлса қандай усулдан фойдаланиш маъқулроқ бўлади?

Оқсилларнинг тузилиши ва хоссаларига оид саволлар

1. Оксил эритмасини 80—90°C гача қиздирилганда оксил молекуласида қандай ўзгаришлар содир бўлади?

2. Оксил эритмасини кислотали ёки ишқорий муҳитда узок вақт давомида қайнатилганда қандай ўзгариш кузатилади. Ўзгаришларни қандай усул билан ўрганиш мумкин?

3. Оксил молекуласида олтингугурт тутувчи аминокислоталар борлигини қандай йул билан аниқлаш мумкин?

4. Оксилнинг табиати бирламчи, иккиламчи, учламчи, тўртламчи структурасига боғлиқ. Тўғри жавоб топиб, изохлаб беринг.

5. Оксил эритмасига оз микдорда кислота қўшиб қиздирилганда чўкмага тушади. Бунинг сабабини қандай тушунтириш мумкин?

6. Оксилнинг аминокислоталар таркиби ўрганилганда унинг тарки-

бида кўп микдорда асосий хоссага эга бўлган аминокислоталар борлиги аниқланди. Ушбу оксиллар электр майдонида қайси заряд томон ҳаракатланади? Нордон — кислотали аминокислоталар бўлса-чи?

7. Оксил гидролизати таркибида триптофан, гистидин, фенилаланин ва тирозин аминокислоталарни борлигини қандай аниқлаш мумкин?

8. Қасалхоналардаги биохимия лабораторияларида биологик суюқликлар таркибидаги оксилларни аниқлаш учун кўпинча концентранган нитрат кислотадан фойдаланилади. Бунинг сабаби нимада? Нима учун бошқа минерал кислоталарга нисбатан нитрат кислота кўпроқ ишлатилади?

9. а) Оксилнинг фазовий структураси унинг бирламчи структураси билан белгиланади, б) оксилларнинг биологик фаолияти унинг фазовий структураси билан белгиланади деган тушунчаларни қандай изоҳлаш мумкин?

10. Миоглобин ва гемоглобин протомерлари (HbA , HbA_2 , HbF) нинг бирламчи структуралари бир хил. Қандай қилиб биологик эволюция жараёнида қардош оила оксиллари келиб чиққан?

11. Оксилларнинг асосий биологик фаолияти лигандлар билан хусусий боғланиш хоссасидир, чунки оксилларнинг бирламчи тузилиши кўпчилик оксилларни аниқлайди. Ушбу фикрни тўғри ёки нотўғри эканлигини изоҳлаб беринг.

12. Кўпчилик доривор моддалар организмдаги оксиллар билан бирикади, чунки улар табиий лигандларнинг ўхшаш турларидир. Ушбу тушунчани изоҳлаб беринг.

13. Ўроксимон хужайра камқонлиги билан оғриган беморда сурупкали кислород етишмовчилиги (гипоксия ҳолати) ривожланади ва беморни ўлимга олиб келади. Бунинг сабабини ва қасалликнинг асосий механизмини тушунтириб беринг.

14. Ўроксимон хужайра камқонлиги билан оғриган беморнинг гемоглобини электрофорезда қайси томонга («анод», «катод») ҳаракатланади. Соғлом кишиларнинг гемоглобини-чи?

II БЎЛИМ

МУРАКҚАБ ОКСИЛЛАРНИНГ ТУЗИЛИШИ (ПРОТЕИДЛАР)

Муракқаб оксиллар простетиклар гуруҳи ҳисобланган оксил ва оксил бўлмаган бирикмалардир. Уларга нуклеопротейдлар (таркибида нуклеин кислота тутувчи), хромопротейдлар (гем ва флаворин тутувчи), фосфопротейдлар (фосфор кислота тутувчи), гликопротейдлар (карбонсун тутувчи), липопротейдлар (ёғ тутувчи), металлпротейдлар (металл тутувчи оксиллар) мисол бўлади. Муракқаб оксиллар — ферментлар ҳам мавжуд.

1. НУКЛЕОПРОТЕИДЛАР

Нуклеопротейдлар барча тирик организмларнинг ядро оксилдир. Ушбу оксиллар (протаминлар ва гистонлар) таркибида кўп микдорда лизин, гистидин, аргинин каби

аминокислоталар бўлганлиги учун улар асос хоссасига эга. Шундай хоссаси борлиги туфайли улар нуклеин кислоталар билан бирика олади. Нуклеопротеидларнинг асосий қисми хроматинлар (дезоксирибонуклеопротеин) ва рибосомалар (рибонуклеопротеинлар) дан ташкил топган. Хроматин массасининг $\frac{3}{2}$ қисмини оксиллар $\frac{1}{3}$ қисмини ДНК ташкил қилади. Хроматин таркибида 10% гача РНК бор. Уларнинг ярмидан кўпи гистонлардир.

Ҳар қандай тирик ҳужайра таркибида уч хил рибонуклеин кислота бўлади, рибосомал (рРНК — 80%), транспорт (тРНК — 15%), инфорацион (ахборот ўтказувчи) (иРНК — 5%). Нуклеин кислоталар (ДНК, РНК) оксил каби бирламчи, иккиламчи, учламчи ва тўртламчи тузимга эга. Нуклеин кислоталарнинг биологик аҳамияти жуда катта. Улар ҳужайраларнинг (ядро ва цитоплазмалари) таркибий қисми бўлиш билан бир қаторда жуда муҳим вазибаларни бажаради. Ҳужайранинг бўлиниши, ирсий белгиларнинг наслдан наслга ўтказилиши, оксил биосинтези нуклеопротеидларига боғлиқ.

Турли ирсий касалликларнинг келиб чиқиш сабабларини билиш, ирсий касалликларга мойиллик, улардаги ўзгарувчанлик ҳамда организм иммунологик тўқималарининг (трансплантацион) қарама-қаршилик ҳолатларини ўрганишда нуклеин кислоталарнинг тузилишини, ирсий белгиларни ўтказиш механизмини, уларнинг турли таъсирортлар натижасида ўзгаришини (мутацион ўзгаришлар) билиш жуда зарур.

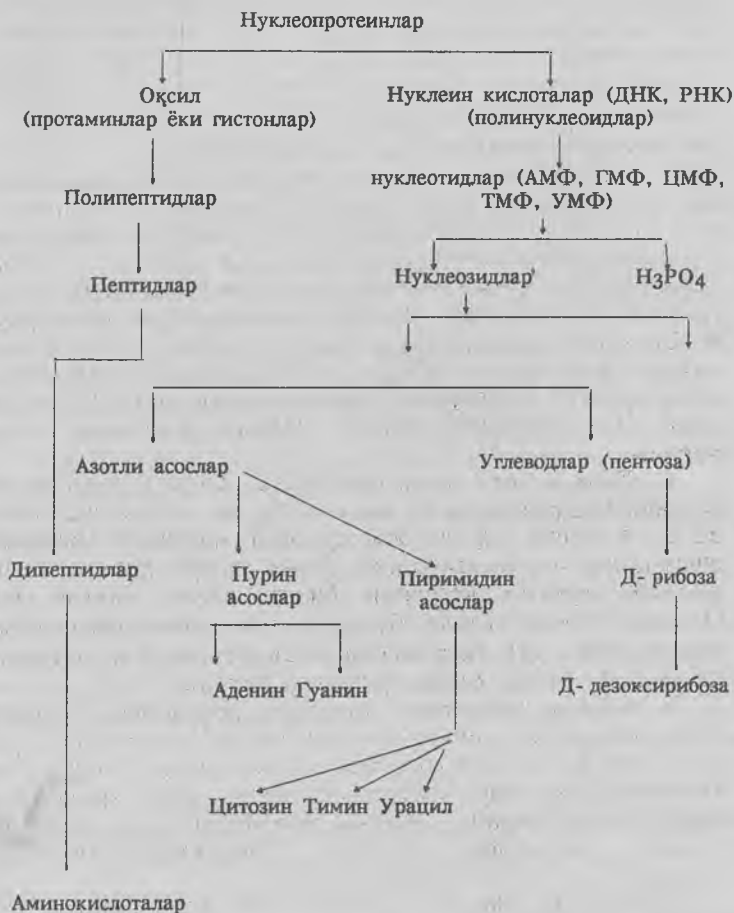
Бўлимнинг мақсади:

1. ДНК ва РНК ларнинг тузилишини тушуниш ва генетик ахборотни наслдан наслга ўтказишнинг молекуляр механизмларини билиш мақсадида нуклеин кислоталарни ажратиш усуллари, уларнинг тузилиши ва хоссаларини ўргатиш.

2. ДНК ва РНК нинг таркибий қисмларини, боғланишини, фарқи ва ўхшашликларини билиш мақсадида сифат ва миқдорий аниқлаш усуллари билан таништириш.

29- и ш. НУКЛЕОПРОТЕИНЛАРНИНГ ТАРКИБИЙ ҚИСМИГА СИФАТ РЕАКЦИЯ.

Нуклеопротеинлар қисман гидролизлаганда улар оксил ва нуклеин кислоталарга парчаланади. Тўлиқ гидролиз натижасида нуклеин кислоталар куйидаги таркибий қисмларга парчаланади:



Гидролиз маҳсулотлар рангли реакциялар ёрдамида аниқланади:

Текширилувчи материал: янги хамиртуруш (ачитқи).

Реактивлар: сульфат кислотанинг 10% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ва 30% ли эритмаси. Мис (II)-сульфатнинг 1% ли ва 7% ли эритмаси, аммиакнинг концентранган эритмаси, кумуш нитратнинг 1% ли эритмаси, молибден реактиви.

Керакли анжомлар: қайтар холодильник ўринатилган кенг пробиркалар, асбест тўрлар ёки кумуш ҳаммомлар, воронкалар, филтрлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Гидролиз. Кенг пробиркага 0,5 г хамиртуруш (ачитқи), устига 4 мл 10% ли сульфат кислота солинади ва пробкали қайтар холодильник (музлатгич) билан бирлаштирилади (25—30 см

узунликдаги шиша най). Мослама асбест тўрли иситгичда ёки кум ҳаммомида бир соат давомида қайнатилади.

Бир оздан сўнг гидролиз тўхтатилади, суюқлик совитилади ва филтёр қоғоз орқали ўтказилади. Филтёрдан ўтган суюқлик таркибидаги гидролиз маҳсулотлари сифат реакциялар ёрдамида аниқланади.

2. Полипептидларни аниқлаш учун биурет реакцияси, 5 томчи гидролизатга 10 томчи 10 % ли натрий гидроксид эритмаси ва бир томчи мис сульфат эритмаси солинади. Суюқлик бинафша тусга киради.

3. Пурин асосларига кумуш синамаси, 10 томчи гидролизат бир томчи концентрланган аммиак эритмаси билан нейтралланади. Сўнг унга 5 томчи 1 % ли кумуш нитрат эритмаси солинади. 3—5 дақиқа ўтгач пурин асосларининг (аденин ва гуанин) кумушли бирикмалари ипир-ипир чўкмага тушади. Чўкма қорамтир тусга киради.

4. Рибоза ва дезоксирибозага Тромер реакцияси. 5 томчи гидролизатга 10 томчи 30 % ли натрий гидроксид ва 1—3 томчи 7 % ли мис сульфат эритмаси солинади. Эритмалар аралаштирилиб, унинг юқори қисми қиздирилади. Эритма қайнаши билан қизил рангли мис (I) оксид ҳосил бўлади. Бу чўкма рибозанинг оксидланиши ва мис (II) гидроксиднинг қайтарилиши оқибатида мис (I) оксид ҳосил бўлишига боғлиқ.

5. Фосфор кислотага молибден реакцияси. 5 томчи гидролизатга 20 томчи молибден реактивдан солиб, бир неча дақиқа аланга юзасида қайнатилади. Гидролизат таркибида фосфор кислота бўлгани учун эритма оч сарик рангга киради. Эритма совитилганда эса аммоний фосфор — молибден комплекс бирикмаси чўкмага тушади.

Олинган натижалар қуйидаги жадвалга биноан расмиёлаштирилади.

12- ж а д в а л

Реакциянинг номи	Очиладиган бирикма номи	Ишлатилган реактивлар	Реакция маҳсулоти	Реакциянинг асосланиши

30-и ш. БУҚОҚ БЕЗИ ЁКИ ҚОРА ТАЛОҚ ТЎКИМА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНИНИ АЖРАТИШ

Дезоксирибонуклеопротеинни буқоқ бези тўкимасидан ажратиб олиш унинг ишқорий ва тузли эритмаларда яхши эриб, сувда эримаслиги ва шунинг учун ишқорий эритмаларни нейтраллаганда ёки тузли эритмаларни суюлтирилганда ДНП чўкмага тушишига боғлиқ. Дезоксирибонуклеопроtein (ДНП) таркибидаги ДНК ни дезоксирибозани очадиган сифат реакция орқали топиш мумкин. Бунинг учун ДНП кислота дифениламин реактиви билан қиздирилади. Натижада ДНП гидролизланиб, дезоксирибоза ажралади ва дифенил реактиви билан кўк ранг ҳосил қилади. ДНП таркибидаги оксил эса биурет реакцияси ёрдамида очилади.

Текширилувчи материал: буқоқ бези ёки қораталок тўкимаси.

Реактивлар: натрий хлориднинг 5 % ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,4 ва 10 % ли эритмалари, мис (II) сульфатнинг 1 % ли эритмаси, дифениламин реактиви (тайёрланиши 287-бетда), дистилланган сув, шиша кукуни.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, чинни ховончалар, воронкалар, шиша таёкчалар, 100—150 мл ли кимёвий стакан, дока филтрлар, сув ҳаммоми, тарози, қадок тошлари, 25 ва 100 мл ли ўлчов цилиндрлар.

Бажариладиган иш тартиби. ДНП ни ажратиш. Буқоқ бези ёки қораталокдан 0,5 г олиб 100 мг шиша кукуни қўшилади ва 15 мл 5 % ли натрий хлорид эритмасидан охисталик билан чинни ховончага солиб ишқаланади. Бир хил ҳолатга келтирилган аралашма дока филтрдан ўтказилади. Сўнгра стаканга шиша таёкча билан аста-секин аралаштирилган ҳолда 80—90 мл филтрдан ўтказилган суюклик солинади. Сувда эрмайдиган ДНП чўкмага тушади, унинг чўкма-ипчалари шиша таёкчага ўралади ва тоза пробиркага шиша таёкча орқали аста ўтказилади.

ДНП ипчалари 1—2 мл 0,4 % ли натрий гидроксид эритмаси билан эритилади (ДНП ипчаларини тўлиқ эришини кузатиш).

2. ДНКни аниқлаш. 5—10 томчи ДНП эритмасига икки марта кўп ҳажмда дифениламин реактиви солинади ва пробирка 5—10 дақиқага қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Эритма секин-аста кўк рангга киради, чунки дифениламин дезоксирибоза билан реакцияга киришади.

3. ДНП таркибидаги оксилни аниқлаш. 5—10 томчи ДНП эритмасига 10 томчи 10 % ли натрий гидроксид эритмаси ва 1 томчи 1 % ли мис сульфат эритмаси солиб

биурет реакцияси ўтказилади. Кўкимтир-бинафша ранг ҳосил бўлиши оксил борлигини исботлайди.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. ДНП ажратиш усулини, ДНП нинг таркибий қисми ва аниқлаш реакциялари натижасини дафтарингизга ёзинг.

31-и ш. ДНК МИҚДОРНИ КАЛОРИМЕТРИК УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси. ДНК таркибидаги дезоксирибоза дифениламин билан кўк ранг ҳосил қилади. Рангнинг зичлиги ДНК миқдorigа тўғри пропорционаллигидан, фотоэлектроколориметрдан фойдаланилади.

Текширилувчи материал. ДНК нинг сувли эритмаси.

Реактивлар: дифениламин реактиви (тайёрланиши 287-бетда) дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, 1—2 мл ли ўлчов пипеткалари, ФЭК, 0,5 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Битта текширув ва битта назорат пробиркаси тайёрланади. Биринчисига ДНК нинг сувли эритмасидан 1 мл, иккинчисига 1 мл дистилланган сув солинади. Ҳар иккала пробиркага 2 мл дан дифениламин реактиви солиб, 10 дақиқа сув ҳаммомида ушлаб турилади. Бир оздан сўнг пробиркалардаги суюқликлар совитилади ва ФЭК нинг қизил нур фильтрида назорат суюқлиги каршисида кўрилади. Текширилувчи ДНК нинг оптик зичлигини топгач, ўлчов эгри чизиғидан унинг миқдори аниқланади.

3. Ўлчов эгри чизиғини тайёрлаш. 3 та пробиркага концентрацияси турлича бўлган (50, 100, 200 мкг/мл) ДНК эритмасидан 1 мл ва дифениламин реактивидан 2 мл солиб, 10 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида киздирилади. Эритма совитилгач юқоридагидек фотоэлектроколориметрланади. Топилган оптик зичлик ва ДНК миқдоридан ўлчов эгри чизиғи тузилади. Абсцисса ўқиға ДНК миқдори, ордината ўқиға оптик зичликлар келтирилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга ўлчов эгри чизиғини чизинг. Усулнинг асосини ва топилган ДНК миқдорини дафтарингизга ёзинг.

32-и ш. КОЛОРИМЕТРИК УСУЛ БИЛАН РНК МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси. РНК таркибидаги пентоза орцин реактиви билан рангли бирикма ҳосил қилади. Рангнинг оптик зичлиги калориметрда ўлчанади ва ўлчов эгри чизиғидан РНК миқдори топилади.

Текширилувчи материал. РНК ning сувли эритмаси.

Реактивлар: орцин реактиви (тайёрланиши 509-бетда) дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, пипеткалар, ФЭК, 0,5 см калинликдаги кювета.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Текширув тажриба пробиркасига 1 мл РНК эритмаси ва 2 мл орцин реактиви солинади. Назорат пробиркасига эса 1 мл дистилланган сув ва 2 мл орцин реактиви солинади. Иккала пробирка сув ҳаммомида 20 дақиқа тутиб турилади. Бир оздан сўнг эритмалар совитилиб, ФЭК ning қизил нур фильтрида назорат пробиркаси қаршисида оптик зичлик топилади. РНК ning микдори ўлчов эгри чизигидан аниқланади.

2. Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш. 3 та пробиркага 1 мл дан 50, 100, 200 мкг/мл РНК эритмаси ва 2 мл дан орцин реактиви солиб, юкоридагидек сув ҳаммомида қиздирилади. 20 дақиқа ўтгач, эритмалар совитилиб, ФЭК да уларнинг оптик зичлиги аниқланади. Абсцисса ўкига РНК ning микдори, ордината ўкига оптик зичлик келтирилиб, ўлчов эгри чизиги тузилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга усулнинг асосини, ўлчов эгри чизигини ва аниқланган РНК микдорини ёзинг.

2. ФОСФОПРОТЕИДЛАР

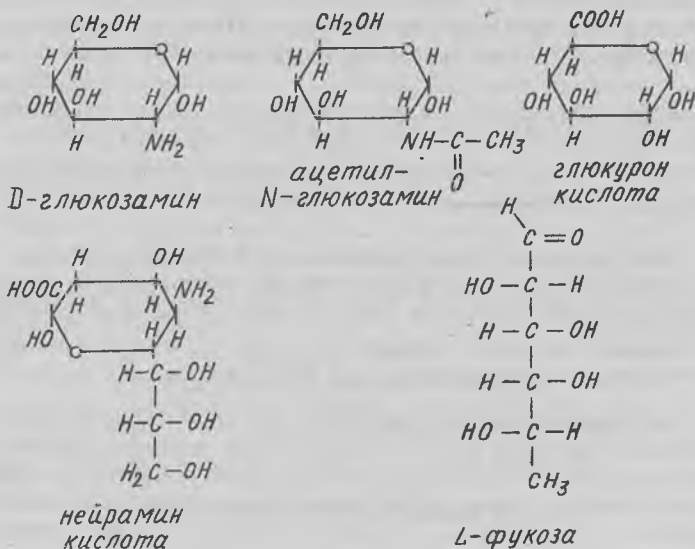
Мураккаб оксиллар — фосфопроteidлар таркибида фосфор кислота қолдиғи (0,5—0,9 %) мавжуд. Улар оксил молекуласига серин ва треонин аминокислоталарининг гидроксил гуруҳи оркали бирикади.

Фосфопроteidлар вакилига сут казеини, тухум оксили — вителин, балиқ тухуми оксили — ихтулин ва айрим ферментлар — фосфорилаза, фосфоглюкомутаза, пепсин ва бошқалар киради. Фосфопроteidлар эмбрион таракқиёти ва организм учун зарур озика маҳсулоти ҳисобланади. Сут казеини таркибида барча ўрнини алмаштириб бўлмайдиган аминокислоталар ва суяк тўқималарининг ўсиши ва ривожланиши учун зарур бўлган фосфор ва кальций бор, улар тўла сифатли оксиллар қаторига киради.

Казеин оксилини сутдан ажратиш ва таркибий қисмларини аниқлаш (2-ишда келтирилган) билан сиз оксилларни биологик суюкликлардан ажратиш бўлимида ташишгансиз.

3. ГЛИКОПРОТЕИДЛАР

Гликопротеидлар — оксил ва оксил бўлмаган нейтрал ва нордон гликозамингликанлардан ташкил топган мураккаб оксил ҳисобланади. Қарбонсув таркибига гексозалар, гексозаминлар (глюкозамин, галактозамин, маннозамин), глюкурон, сиал кислоталар, сирка, сульфат, нейтрал кислота ва *L*-фукозалар киради.



Гликопротеидлар таркибида 85—95% гача углеводлар бўлганда улар углевод хоссасини намоён қилади ва аксинча, 85—95% оксил бўлганда оксил табиатига эга бўладилар.

Углевод табиатли гликопротеидлар глюкозамингликанлар дейилади. Шундай нордон глюкозамингликанларга гиалурон, хондроитинсульфатлар ва гепарин киради. Нейтрал гликозаминлар таркибига нейтрал шакарлар (галактоза, манноза, *L*-фукозалар) ва сиал кислота киради.

Гиалурон кислота бириктирувчи тўқима, кўз қорачиғи, сариқ тана, киндик тизимчаси, юрак клапанлари таркибига киради. Гиалурон кислота глюкурон, ацетил глюкозамин ва дисахаридларнинг полимеридир. Уларнинг нисбий молекуляр массаси миллиондан ортиқ. Хондроитин сульфат кислота тоғай ва бириктирувчи тўқималар, гепарин эса жигар ва ўпка тўқималари таркибига киради.

Нейтрал глюкозамингликанлар сўлак, меъда шираси, бачадон ўсимталари, қон плазмаси, қон гуруҳини аниқловчи моддалар, гормонлар, ферментлар (церулоплазмин, трансферин, холинэстераза) таркибида бўлади. Глюкозамингликанларни организм тўқималаридаги суюқликлар таркибида эркин ҳолда учратиш мумкин.

Гликопротеидлар организмда таянч-химоя вазифасини бажаради. Улар ҳужайралараро ва тўқималараро моддалар таркибига кириб қовуштирувчи таъсир кўрсатади, бўғимларни боғловчи восита ҳисобланади.

33-и ш. СЎЛАК ТАРҚИБИДАГИ МУЦИННИ АЖРАТИШ

Тухум оксили ва муцин таркибидаги углеводларни Молиш реакцияси ёрдамида аниқлаш мумкин.

Текширилувчи материал: тухум оксилнинг 10 % ли эритмаси, сўлак.

Реактивлар: сирка кислотанинг концентрланган эритмаси, сульфат кислотанинг концентрланган эритмаси, тимолнинг 1 % ли спиртли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, пипеткалар, шиша таёқчалар, фильтр қоғози.

Бажариладиган иш тартиби. 1—2 мл сўлак пробиркага йиғилади ва унга 10—20 томчи сирка кислота томчилаб солинади. Муцин чўкмага тушгач, чўкма устидаги суюқлик аста-секинлик билан тўқиб ташланади, куйка эса фильтр қоғозда қуритилади. Муцин куйкаси билан молиш реакцияси ўтказилади.

Молиш реакцияси. 10 томчи муцин эритмасига 3 томчи тимолнинг 1 % ли спиртли эритмаси солинади ва аралаштирилади. Сўнгра пробирка девори бўйлаб эҳтиёткорлик билан 20—30 томчи сульфат кислотанинг концентрланган эритмаси қўйилади. Эритма силкитилганда пробирка тубида фурфуролнинг тимол билан ҳосил қилган қизил рангли конденсация маҳсулоти кўринади.

Олинган натижани расмийлаштириш. Дафтарингизга муцинни ажратиш ва Молиш реакцияси асосини ҳамда унинг натижасини ёзинг.

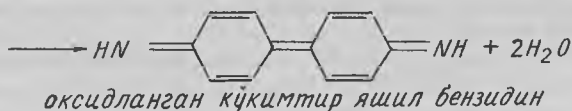
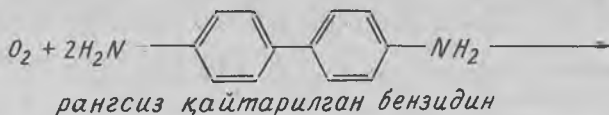
4. ХРОМОПРОТЕИДЛАР

Хромпротеидлар таркибига оксил ва бўёвчи моддалар киради. Бўёвчи моддалар каторига гем, витамин В₂ (рибофлавин), каротинларни киритиш мумкин. Хромпротеидларга эса қон гемоглобини, мушак миоглобини, ферментлардан каталаза, цитохромлар, пероксидаза, са-

риқ тана ферменти ва бошқалар мисол бўлади. Хромопротеидлар муҳим биологик вазифани бажаради. Улар кислород ташиш ва оксидланиш-қайтарилиш жараёнларида иштирок этади.

34- и ш. ГЕМОГЛОБИННИНГ ГЕМИН ГУРУҲИНИ АНИҚЛАШ УЧУН СИФАТ РЕАКЦИЯСИ

Усулнинг асоси. Гемоглобин водород пероксид таъсирида бензидинни оксидлайди, оқибатда эритма кўк рангга киради, турганда эса у кизаради. Ушбу реакция жуда катта сезгирликка эга. Шунинг учун биологик суюқликлардаги (меъда ва ўн икки бармоқ ичак шираси) жуда кам микдордаги қонни аниқлашга имкон беради ва адлия тиббиётида ҳам кенг қўлланилади.



Реактивлар: Водород пероксиднинг 3 % ли эритмаси, бензидиннинг 1 % ли эритмаси, аммоний ёки калий родонид тузининг 1 % ли эритмаси, нитрат кислотанинг концентрланган эритмаси, водород хлорид кислота-нинг 10 % ли эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар ва томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Бензидин реакцияси. Биринчи пробиркага 5 томчи суюлтирилган қон, иккинчи пробиркага 5 томчи сув солиб, ҳар қайсисига 5 томчи 1 % ли бензидин эритмаси ва 5 томчи водород пероксиднинг 3 % ли эритмаси қуйилади. Шунда пробиркаларнинг биридаги суюқлик кўк рангга киради.

2. Темирни аниқлаш. Ҳароратга чидамли чинни идишчага 1—2 томчи қон ва 2—4 томчи нитрат кислота-нинг концентрланган эритмасидан солиб қурук қолдик қолгунча киздирилади. Сўнгра унинг устига водород хлориднинг 10 % ли эритмасидан солиб эритиладида Fe^{3+} га сифат реакция ўтказилади. Бунинг учун эритмага

1—2 томчи аммоний ёки калий родонид эритмаси солинади. Суюклик кизил ёки пушти рангга киради.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Қоннинг гемин гуруҳини, темирни аниқлаш сифат реакциясининг асосини ва натижасини дафтарингизга ёзинг. Ушбу усулнинг қўлланилишини айтинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Мураккаб оксиллар классификацияси. Оддий ва мураккаб оксилларнинг фарқи нимада?
2. ДНК нинг нуклеотидлар таркиби ва вазифаси қандай?
3. РНК нинг нуклеотидлар таркиби ва вазифаси қандай?
4. Нуклеин кислоталарнинг бирламчи, иккиламчи, учламчи тузилиши ва уларнинг биологик аҳамияти қандай?
5. ДНК нинг денатурацияси ва реактивацияси. ДНК — ДНК, ДНК — РНК гибридлари.
6. ДНК репликациясининг механизми ва аҳамияти, реакцияда иштирок этувчи ферментларнинг ўзига хос хусусияти қандай?
7. Транскрипция жараёни ва биологик код нима?
8. Трансляция жараёнининг кетма-кетлиги, унда иштирок этадиган ферментлар ва оксил омиллари қандай?
9. Транскрипция, трансляция жараёнларини сусайтирувчи ингибиторларни айтинг. Уларни тиббиётда қўлланилиши қандай?
10. Хромопротеидларнинг таркибий қисми ва биологик вазифаси қандай?
11. Фосфо-ва гликопротеид вакилларини айтинг, уларнинг биологик аҳамияти қандай?
12. Нуклеотидларнинг таркибий қисмини қандай сифат реакциялар билан очиш мумкин? Фосфопротеидлар, гликопротеидларни-чи?

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Амино-окси-, метилпиримидинлар ДНК ва РНК молекулалари таркибига кирадими? Бу бирикмалар РНК ва ДНК фаолиятига қандай таъсир килади?
2. Қандай бирикмалар ДНК молекуласи ўзгаришига — мутацияга олиб келади?
3. Мутация натижасида ДНК молекуласида адениннинг ёки гуаниннинг дезаминланиши кузатилди. Бундай ўзгариш қандай оқибатга олиб келади?
4. Мутация натижасида бирор нуклеотиднинг тушиб қолиши кузатилади. Бунинг оқибати қандай ўзгаришларга олиб келади?
5. иРНК тўртта цистрондан иборат бўлса, оксил молекуласининг полипептид занжирлари сони нечтага тенг бўлади?
6. Бемор организмда яллиғланиш жараёни авж олмоқда, буни тўхтатиш учун антибиотиклардан фойдаланилди. Улар қандай таъсир кўрсатади?
7. Оксил полипептид занжири таркибига 300 та аминокислота кирган бўлса, код сони нечтага тенг бўлади? Жавобингизни изоҳлаб беринг.
8. ДНК молекуласи икки занжирли ва РНК молекуласи бир занжирли бўлиши керак деган тушунча қандай фикр ва изоҳ билан тасдиқланади?

9. Хужайра таркибида бир неча хил и-РНҚ ва т-РНҚ топилган. Бунни қандай тушунтириш мумкин?

10. Хужайрага тушган кучли кимёвий бирикма таъсирида ДНК зажирининг бир томонидаги азотли асос тушиб қолгани кузатилади. Бундай ўзгаришни репарация системалари тузатиши мумкинми? Азот асослари иккала занжирдан баробар тушиб қолган бўлса-чи?

III БЎЛИМ

ФЕРМЕНТЛАР

Ферментлар (энзимлар) — оксилларнинг юқори даражада ихтисослашган синфидир. Улар организмдаги кимёвий жараёнларнинг тезлигини ошириш ва уларни бошқариш вазифасини бажаради.

Ферментлар оддий ва мураккаб тузилишга эга. Оддий ферментлар фақат аминокислоталардан ташкил топган бўлса, мураккаблари оксил бўлмаган қисмлардан иборат бўлади. Ферментнинг оксил қисми апофермент (хароратга чидамсиз), оксил бўлмаган қисми (апоферментдан осон ажраладиган қисми) кофермент ва ажралмайдиган қисми кофактор қисм дейилади. Иккала қисмнинг йиғиндиси холофермент дейилади. Апофермент — субстратни танлаш, кофермент эса «фаол марказ» вазифасини бажариш учун керак. Ферментлар таъсирига учрайдиган моддалар «субстрат» дейилади. Фермент шу субстрат номига «аза» қўшимчаси қўшиш орқали ёки таъсир кўрсатадиган ферментатив реакция номи билан юритилади. Масалан, амилум (крахмал) амилаза ферменти таъсирида парчаланadi. Ферментларнинг субстратларга таъсири махсус «фаол марказ» томонидан амалга оширилади. Оддий ферментларда бу вазифани айрим аминокислоталарнинг функционал гуруҳлари: метионин — CH_3 , цистеин — SH , треонин — OH , аргинин — NH_2 , глутамин — COOH , гистидин — имидазол халқаси ёки бир нечта аминокислоталарнинг йиғиндиси бажаради. Мураккаб ферментларда эса «фаол марказ» вазифасини натрий, калий, магний, кальций, темир, марганец, мис, рух ионлари (кофакторлар) бажаради. Коферментлар сифатида кўпинча витаминлар: тиаминдифосфат, рибофлавин, фосфопиридоксаль, никотин кислота, биотин ва бошқалар, ҳамда витамин тутувчи нуклеотидлар: флавинононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), никотинамид динуклеотид (НАД), никотинамид динуклеотидфосфат (НАДФ) каби бирикмалар хизмат қиладилар.

Барча ферментлар катализлайдиган реакция турига кўра 6 синфга бўлинади. Улар ўз навбатида яна синфчаларга бўлинади.

1. Оксидоредуктазалар. Оксидланиш-қайтарилиш жараёнини тезлатади. Улар донордан акцепторга электрон ўтказиш реакциясини катализлайди.

2. Трансферазалар. Бир субстратдан иккинчиси-га муайян функционал гуруҳларни: амин, ацетил, метил, ацил ва ҳоказо ўтказиш реакциясини тезлатади.

3. Гидролазалар. Муайян кимёвий боғларни сув иштирокида парчалайди. Меъда-ичакдаги ҳазм жараёнида қатнашади.

4. Лиазалар. Сувсиз шароитда органик бирикмалардаги С—С боғларининг парчаланиш реакциялари тезлигини оширади.

5. Изомеразалар. Изомерланиш реакцияларини катализлайди. Альдозаларни кетозаларга, «цис» конфигурацияни «транс» шаклга ўтиши ва аксинча реакцияларда иштирок этади.

6. Лигазалар. АТФ энергияси ҳисобига амалга ошириладиган синтезланиш реакциялари тезлигини оширади.

Ҳар қандай фермент 4 та сондан иборат бўлган ўз «шифр» ига эга. Масалан, пепсин ферментининг классификация шифри КФ 3.4. 4.1. Шифрнинг биринчи сони «3» — гидролазалар синфига мансуб эканлигини, иккинчи сони «4» синфнинг кичик синфи — пептидазалар эканлигини, учинчи сон «4» пептидазалар синфининг кичик синфчаси бўлмиш — эндопептидазаларга мансуб эканлиги ва тўртинчи сон «1» — ферментнинг тартиб номерини кўрсатади.

Ферментлар организмда хужайра ичида ва хужайрадан ташқарида жойлашади. Хужайра ичидаги ферментлар бажарадиган вазифасига кўра катъий дифференцияланган: хужайра мембранасида, цитоплазмасида, митохондриясида, рибосомасида, лизосомасида ва ҳоказо органоидларда жойлашади. Ушбу ферментлар кон ва бошқа суюкликларда одатда учрамайди, учраса ҳам жуда кам миқдорда бўлади.

Турли касалликларда (гепатит, инфаркт) хужайраларнинг емирилиши натижасида ферментлар ташқарига — қонга чиқиб, уларнинг миқдори ошади. Шу туфайли улар аниқловчи (индикатор) ферментлар бўлиб, касаллик турини, даражасини аниқлашда катта аҳамиятга эга.

Умуман ферментлар уч йўналишда ўрганилади.

1. Касаллик ва унинг турини аниқлаш (ташхис қўйиш

ва дифференциация қилиш мақсадида ферментлар микдори аниқланади).

2. Ферментларнинг синтезланиши бузилиши оқибатида келиб чиқадиган фермент етишмовчилиги ва унинг асоратлари билан боғлиқ бўлган касалликлар ўрганилади.

3. Турли касалликларни даволашда ферментларнинг дори сифатида қўлланилиши билан боғлиқ бўлган йўлланмалар ўрганилади.

Юқорида айтилганларни ҳисобга олган ҳолда ферментларни умумий хусусиятларини ва хоссаларини ўрганиш, унинг микдорини аниқлаш шифокор учун жуда муҳим вазифа ҳисобланади.

Бўлимнинг мақсади:

1. Тўқима ва биологик суюқликлар таркибидаги ферментларни аниқлаш ва уларнинг микдорини ўлчаш усуллари билан таништириш. Олинган билимлардан келажакдаги иш фаолиятида фермент вазифасини бузилишдан келиб чиққан касалликни аниқлаш масалаларини ечиш ва даволаш тадбирларини назорат қилиш мақсадида фойдалана олиш.

2. Ферментатив катализнинг ўзига хос хусусиятларини тушуниш учун ферментларнинг тузилиши ва хусусиятлари билан таништириш.

3. Ферментларнинг таъсир механизми билан таништириш. Олинган билимларни моддалар алмашинуви жараёни ва уларнинг бошқарилишини ўрганишда, фермент етишмовчилигидан келиб чиққан касалликларда кузатиладиган ўзгаришларни билишда ва ферментларни даволаш мақсадида қўллаш тадбирларини татбиқ эта олиш.

ФЕРМЕНТЛАРНИНГ УМУМИЙ ХУСУСИЯТИНИ ЎРГАНИШ

Ферментлар барча оксилларга тааллуқли бўлган физик-кимёвий хусусиятларни намоён қилиш билан бирга фақат ўзига хос бўлган хусусиятларни ҳам намоён қила олади. Улар юқори фаолликка эга бўлиб, субстрат ва кимёвий реакцияларга танлаб таъсир кўрсатади ва ҳар қандай таъсиротга жуда сезгир бўлади. Ферментатив реакцияларнинг тезлиги бир қанча шароитларга боғлиқ. Масалан, реакция аралашмадаги фермент ва субстрат микдори активатор ёки ингибиторлар, кофакторлар, коферментлар, ион микдори, оптимал муҳит (рН) ва ҳарорат меъёрида бўлиши зарур.

1. ФЕРМЕНТЛАР ФАОЛЛИГИНИНГ МУҲИТГА БОҒЛИҚЛИГИ

Ҳар қандай фермент ўзига хос муайян муҳитда (рН) юқори фаолликка эга бўлади. Шу муҳит ўзгариши билан ферментнинг фаоллиги ҳам сусаяди: Бунга сабаб шуки, ферментнинг ионланувчи гуруҳлари муҳит ўзгариши билан ўз фазовий ҳолатини ўзгартиради ва фермент фаоллигига таъсир кўрсатади. Кўпгина субстратлар электролитлар каби ионлашган ёки ионлашмаган ҳолатда реакцияга киришади.

Қуйидаги жадвалда айрим гидролитик ферментларнинг оптимал муҳити (рН) келтирилган.

13- ж а д в а л

Фермент	Субстрат	Оптимал муҳит (рН)			
		1—2 ойлик	1 яшар	4—11 яшар	катталарда
Пепсин	Тухум, сут оқсили	5,8	3,4	2,5—2,0	1,5
Трипсин	Тухум, сут оқсили	5,8	3,4	2,0—2,5	1,5 (7,8)
Уреаза	Сийдикчил	—	—	—	6,4—6,9
— амилаза	Крахмал	—	—	—	7,2
Аргиназа	Аргинин	—	—	—	9,5
Ишқорий фосфатаза	— глицерин фосфат	—	—	—	9,0—10,0
Нордон фосфатаза	— глицерин фосфат	—	—	—	4,5—5,0

35 -и ш . АМИЛАЗА ФАОЛЛИГИГА МУҲИТНИНГ (рН) ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: 10 марта суюлтирилган сўлак амилазаси.

Реактивлар: крахмалнинг 1 % ли эритмаси, йоднинг калий йоддаги эритмаси, 0,07 моль/л ли фосфат буфернинг рН и турлича (5,4—8,0) бўлган эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, пипеткалар, шиша ойначалар.

Бажариладиган иш тартиби. Амилазага таъсир қиладиган оптимал муҳитни амилазанинг крахмалга кўрсатган таъсиридан билиш мумкин. Оптимал муҳитда амилаза крахмални тўлиқ парчалайди. Оптимал муҳитдан силжиган вақтда эса крахмалнинг парчаланиши сусаяди. Крахмалга йод эритмасини томизганда у кўк рангга киради. Крахмал парчаланганда эса ранг ҳосил бўлмайди.

1. Ишни бошлашдан олдин 1 мл сўлакка 9 мл дистилланган сув қўшиб амилаза эритмаси тайёрланади. Сўнг пробиркага 1 мл 1% ли крахмал эритмасидан ва 1:10 суюлтирилган амилазадан 0,5 мл олиб, аралаштирилади-да 36—40°C да ўн дақиқа ушланади. Вақти-вақти билан эритмадан бир неча томчи олиб (шиша ойначага) йод эритмасидан томизилади. Крахмал парчаланганини сариқ ранг ҳосил бўлганлигидан билиш-мумкин. 10 дақиқа ичида крахмал тўлиқ парчаланadi.

2. Амилазанинг оптимал муҳитини топиш учун қатор пробиркаларга турли муҳитли фосфат буфери солинади.

14- жадвал

Пробиркалар	1	2	3	4	5	6	7	8
0,07 моль/л фосфат буфери рН и, мл	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Крахмалнинг 1% ли эритмаси, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1:10 суюлтирилган сўлак 10 дақиқа ичида крахмални парчалайди	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб, 10 дақиқага 38—40°C ли сув ҳаммомига қўйилади. Бир оздан сўнг ҳар бир пробиркага йод эритмаси томизилади. Пробиркалардаги рангнинг ўзгаргани кузатилади.

Олинган натижалар қуйидаги жадвалга биноан расмийлаштирилади.

15- жадвал

Пробиркалар	1	2	3	4	5	6	7	8
Пробиркадаги рН муҳит	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Кузатилган ранг								

Амилазага таъсир қиладиган оптимал муҳитни аниқлаб, тегишли хулоса чиқаринг.

36-иш. ПЕПСИННИНГ ФАОЛЛИГИГА рН МУҲИТНИНГ ТАЪСИРИ

Оптимал муҳитда (рН) пепсин вақт бирлиги ичида фибрин оксилени тўлиқ парчалайди (эритади).

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

Реактивлар: фибрин ёки пиширилган тухум оксиди бўлакчалари. рН и 1,5—5, 0 гача бўлган фосфат-цитрат буфери (тайёрланиш усули 507-бетда) ёки трис-НСI буфери.

Керакли анжомлар: штативлар, пробиркалар, пипеткалар, сув ҳаммоми ёки термостат.

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

Пробиркалар 1 2 3 4 5

Буфер эритманинг

рН и 1,5 2,0 3,0 4,0 5,0

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

Олинган натижаларни расмийлаштириш.

Олинган натижани, оптимал муҳитни аниқлаб дафтарингизга ёзинг ва тегишли хулоса чиқаринг. Натижа жадвалда келтирилиши мумкин.

16- жадвал

Пробиркалар	1	2	3	4	5
Пробиркадаги муҳит рН и	1,5	2,0	3,0	4,0	5,0

Оксид бўлакчаларининг эриш даражасини «+» ёки «—» ишоралари билан белгиланг.

37- и ш. ТРИПСИН ФАОЛЛИГИ УЧУН ОПТИМАЛ МУҲИТ (рН) И НИ АНИҚЛАШ

Оптимал муҳитда трипсин таъсирида оксил парчаланишидан тирозин ҳосил бўлади. Унинг миқдори трипсин фАОллигига тўғри пропорционалдир.

Текширилувчи материал: меъда ости бези шираси ёки трипсин кристаллари.

Реактивлар. Казеиннинг 1 % ли эритмаси, рНи 5,4—8 гача бўлган 0,07 М фосфат буфер, ухлорсирка кислотанинг (УХСК) 5 % ли

эритмаси, трипсиннинг 0,005 моль/л хлорид кислотдаги 0,0005 % ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,5 моль/л эритмаси, фенол реактиви.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, пипеткалар, бюреткалар, воронка ва филтёрлар, термостат ёки сув ҳаммоми, ФЭК, 0,5 см калинликдаги кювета.

Бажариладиган иш тартиби. Тўртта пробиркага рН и 5,4; 6,2; 7,0; 8,0 бўлган фосфат буфер эритмасидан 1 мл дан солинади.

Пробиркалар	1	2	3	4
Буфер эритма рН и	5,4	6,2	7,0	8,0

Пробиркаларнинг ҳар кайсисига 1 мл дан казеин эритмаси ва 0,5 мл трипсин эритмасидан солиб аралаштирилади. Пробиркалар 40°С ли сув ҳаммомига ёки термостатга 15 дақиқага қўйилади.

2. Бир оздан сўнг реакция 2,5 мл УХСК эритмасидан пробиркаларга қуйиш билан тугатилади. Суюқликлар филтёрдан ўтказилади. Филтёр остидаги суюқлик таркибидаги тирозин миқдори аниқланади.

3. Тирозинни аниқлаш учун 4 та пробиркадаги суюқликнинг 2,5 мл си алоҳида 4 та пробиркага олинади ва уларнинг устига 0,5 мл дан фенол реактиви солиб аралаштирилади. 20 дақиқа ўтгач ривожланган ранг зичлиги ФЭК (қизил нур филтёри қаршисида) аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади сўнгра эгри чизик чизилади. Абсцисса ўқига рН, ордината ўқига реакция тезлиги (мкмоль/мин) ёки реакция тезлигига тўғри пропорционал бўлган оптик зичлик келтирилади.

17- жадвал

Пробиркалар	1	2	3	4
рН муҳити	5,4	6,2	7,0	8,0
Оптик зичлик				

Муҳитнинг (рН) трипсин фаоллигига таъсири тушунтирилади, тегишли оптимал муҳит белгиланади ва хулоса чиқарилади.

2. ФЕРМЕНТАТИВ РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ҲАРОРАТНИНГ ТАЪСИРИ

Одатда ҳарорат ортиши билан ферментатив реакция тезлиги ҳам бир неча марта ортади. Аммо фермент оксил табиатига эга бўлганлиги учун юкори ҳароратда денатура-

ция ҳолати юз бериб, фермент активлиги сусаяди. Ҳар қандай фермент ўзига хос оптимал даражадаги ҳароратни талаб қилади. Шу оптимал ҳароратнинг пасайиши ёки ортиши фермент активлигига таъсир кўрсатади. Фермент активлигини ўлчашда албатта оптимал ҳарорат бўлиши шарт. Шу боис ферментнинг активлиги 25°C ёки 37°C да ўлчанади.

38-иш. АМИЛАЗА ФАОЛЛИГИГА ҲАРОРАТНИНГ ТАЪСИРИ

Турли даражадаги ҳароратда амилазанинг фаоллиги, крахмалнинг парчаланишини йод реакцияси ёрдамида аниқлаш мумкин.

Текширилувчи материал: сулак амилазаси.

Реактивлар: калий йодда эритилган йоднинг 1% ли эритмаси, крахмалнинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, пипеткалар, сув ҳаммоми ёки термостат, муз ҳаммоми, шиша ойначалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1.4 жуфт пробирка тайёрланади. Унинг тўрттасига крахмалнинг 1% ли эритмасидан 0,5 мл ва тўрттасига суюлтирилган сулак амилазасидан 0,5 мл солинади.

2. Биринчи жуфт пробирканинг (бири крахмалли, иккинчиси амилазали) бирини муз солинган ҳаммомда; иккинчисини хона ҳароратига, учинчисини 40°C ли сув ҳаммомига ёки термостатга ва тўрттинчисини қайнаб турган сув ҳаммомига 10 дақиқага қўйилади.

3. Бир оздан сўнг пробиркалардаги суюқликлар аралаштирилади ва юқоридаги шароитда яна 10 дақиқа ушланади.

4. Бир оздан сўнг учинчи жуфт пробиркадаги суюқликдан уч томчи шиша ойначага олиб йод билан реакция ўтказилади. Агар суюқлик кўк ранг берса, пробиркалар яна 10 дақиқа ўша шароитда ушланади. Сўнг ҳар қайси пробиркага икки томчи йод эритмаси томизилади. Крахмалнинг йод билан ҳосил қилган ранги кузатилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар жадвалга ёзилади, турли шароитда ўтказилган тажриба пробиркалардаги ранг солиштирилади.

18- жадвал

Пробиркалар	1	2	3	4
Ҳарорат, °C	0	20	40	100
Крахмалнинг йод билан ҳосил қилган ранги				

Оптимал ҳарорат белгиланиб, тегишли хулоса чиқарилади.

Аргиназанинг фаоллигига ҳароратнинг таъсирини ўрганиш учун аргининнинг аргиназа таъсирида парчаланшидан ҳосил бўлган сийдикчил миқдори аниқланади.

Текширилувчи материал: жигар экстракти.

Реактивлар. рН и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, 0,007 моль/л аргинин эритмаси, сийдикчилнинг 0,02 мг/мл доимий эритмаси, УХСК нинг 5 % ли эритмаси, сийдикчилни аниқлаш учун рангли реактив.

Керакли анжомлар. 1—2 мл ли ўлчов нипеткалари, микробюреткалар, штатив ва пробиркалар, муз ва сув ҳаммоми, воронкалар, фильтрлар, термостат, ФЭК, 1 см қалинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Учта пробирка тайёрланади. Унинг ҳар қайсисига 0,2 мл аргиназа ферменти тутувчи жигар экстракти, 1,6 мл глицин буфер эритмаси, 0,2 мл аргинин эритмаси солиб аралаштирилади. Тўртинчи пробиркага (назорат учун) 2 мл УХСК ва юқоридаги эритмаларнинг ҳаммасидан солиб аралаштирилади.

2. Биринчи пробирка муз солинган ҳаммомда (4°C), иккинчиси хона ҳароратида (20°C), учинчиси сув ҳаммоми ёки термостатда (40°C) 15 дақиқа сақланади. Бир оз вақт ўтгандан кейин ферментатив реакция ҳар қайси пробиркага 2 мл 5 % ли УХСК дан солиб тўхтатилади ва сўнг филтрланади.

3. Филтрдан ўтказилган суюқликларнинг ҳар қайсисидан 2 мл дан олиб таркибидаги сийдикчил миқдори аниқланади. Бунинг учун 2 мл филтратга 2 мл рангли реактив (мочевинани аниқлайдиган) солинади, аралаштириладида 15 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомига кўйилади.

4. 15 дақиқадан сўнг пробиркадаги суюқликлар совитилади ва ҳосил бўлган рангнинг оптик зичлиги ФЭК нинг яшил (540—560 нм) нур филтрининг назорат суюқлиги қаршисида топилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар жадвалга ёзилиб, сўнг эгри чизик чизилади.

19- жадвал

Пробиркалар	Керакли ҳарорат, °С да	Топилган оптик зичлик
1	4	
2	20	
3	40	

Абсцисса ўқиға оптик зичлик, ордината ўқиға эса харорат даражаси келтирилиб эгри чизик чизилади, аргиназа ферменти учун оптимал харорат белгиланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

3. ФЕРМЕНТАТИВ РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИНИ ОШИРИШ ВА СУСАЙТИРИШ

Ферментатив реакция тезлигига харорат, мухитдан ташқари шу реакция система таркибида бошқа моддаларнинг бўлиши ҳам таъсир кўрсатади. Фермент фаоллигини оширувчи моддалар активаторлар, сусайтирувчи моддалар эса ингибиторлар дейилади. Ферментларнинг фаоллигига турли моддаларнинг турлича таъсир этиши амалий аҳамиятга эга ва ферментларнинг таъсир этиш механизмларини тушуниш учун ҳам керак. Турли дориларнинг таъсир этиши, ишлатилиши уларнинг фермент фаоллигини оширишига ёки сусайтиришига асослангандир.

40-иш. ПЕПСИНОГЕН ФАОЛЛИГИНИНГ ОШИШИГА АКТИВАТОРЛАРНИНГ ВА СУСАЙИШИГА ИНГИБИТОРЛАРНИНГ ТАЪСИРИ

Меъда шиллик каватидаги безлардан фаол бўлмаган пепсиноген ажралади. Меъда ширасига ажралган фермент хлорид кислота таъсирида (рН и 1,5—2,5) фаол ҳолатга ўтади. Пепсиноген пепсинга айланади. Фаол бўлмаган ферментни фаол ҳолатга ўтганлигини фибриннинг эришидан билиш мумкин.

Текширилувчи материал: меъда шираси ёки 0,2 % ли хлорид кислотада тайёрланган пепсиннинг 0,1 % ли эритмаси.

Реактивлар. Хлорид кислотанинг 2 % ли эритмаси, натрий карбонатнинг 1 % ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10 % ли эритмаси, фибрин.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, пипеткалар, сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 4 та пробирка тайёрланади. Унинг биринчисига 0,5 мл сув, иккинчисига 0,5 мл 2 % ли хлорид кислота эритмаси, учинчисига 0,5 мл 10 % ли натрий гидроксид эритмаси, тўртинчисига эса натрий карбонатнинг 1 % ли эритмаси солинади. Тўрттала пробиркага 1 мл дан меъда шираси ёки пепсиннинг хлорид кислотада тайёрланган 0,1 % ли эритмасидан қуйиб, суюқликлар аралаштирилади ва лакмус қоғоз билан уларнинг муҳити аниқланади. Сўнг ҳар қайси пробиркага

1,0—1,5 см узунликдаги фибрин толасидан солиб 20—30 дақиқа 37—40°C ли термостатга ёки сув хаммомига жойлаштирилади. Бир оздан сўнг ҳар қайси пробиркадаги фибриннинг эриш даражаси аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар қуйидаги жадвалга ёзилади. Фибриннинг эриш даражаси «+», эримагани «-» билан белгиланади.

20- жадвал

Пробиркалар	Эритма муҳити	Ишлатилган активатор ва ингибиторлар	Фибриннинг эриш даражаси
1			
2			
3			
4			

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

41-и ш. АМИЛАЗА ФАОЛЛИГИГА АКТИВАТОР ВА ИНГИБИТОРЛАРНИНГ ТАЪСИРИ

Активатор ва ингибиторларни амилаза активлигига таъсири крахмалнинг парчаланishi ва йод биан ҳосил қилган рангидан аниқланади.

Текширилувчи материал: сўлак амилазаси.

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

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар ва 10 мл ли ўлчов цилиндрлари, сув хаммоми ёки термостат.

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

2. Ҳар қайси пробиркага (1:10) суюлтирилган сўлак амилазасидан 20 томчи ва крахмалнинг 1% ли эритмасидан 5 томчи солиб аралаштирилади-да 5 дақиқа хона ҳароратида қолдирилади.

3. 1 мл сув солинган учта пробирка тайёрланади. Пробиркадаги сув йод эритмаси билан бўялади. Шу пробиркаларга юқоридаги тажриба пробиркалардаги

суяқликдан 2—3 томчи солиб крахмални амилаза таъсирида парчаланишидан ҳосил бўлган бўёқ кузатилади. Биринчи пробирка бинафша ёки қорамтир кизил рангга, иккинчи пробирка (натрий хлорид солинган) сарик рангга ва учинчи пробирка (мис (II) сульфат солинган) эса кўк рангга бўялганлиги кузатилади. Агар айтилган ранг кузатилмаса тажриба 10—15 дақиқадан сўнг қайтарилди.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади, натрий хлорид ва мис (II) сульфатнинг таъсири аниқланади.

21- жадвал

Фермент	Субстрат	Фермент таъсир қилган вақт	Йод билан ҳосил бўлган ранг		
			Тажриба пробиркалари		
			1	2	3
			H ₂ O	NaCl	CuSO ₄
Амилаза	Крахмал	5 10 15			

Амилаза учун активатор аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

42- и ш. ТРИПСИН ФАОЛЛИГИНИ ТРАСИЛОЛ БИЛАН СУСАЙТИРИШ

Трасилол — трипсин, фибринолизин, химотрипсин каби қатор протеолитик ферментлар фаоллигини сусайтирувчи полипептид табиатга эга бўлган модда. Ушбу модда меъда ости беши яллиғланганда ва ҳужайралари нобуд бўлганда (панкреонекроз ва сурункали панкреатит касалликлари) уларни даволаш мақсадида қўлланади. Меъда ости бешидан ажралган ферментлар фаол бўлмайдди, улар ичак ширасига тушгандан сўнг фаол ҳолатга ўтади. Аммо касалликларда ушбу ферментлар фаол ҳолда ажралади ва меъда ости беши тўқималарини парчалаши мумкин. Шу боис тўқималарни ўз-ўзини парчаланиши олдини олиш мақсадида трасилолдан фойдаланилади.

Текширилувчи материал: 0,005 моль/л хлорид кислотада тайёрланган 5·10⁻⁴% ли трипсин эритмаси.

Реактивлар: казеиннинг 1% ли эритмаси, 0,1 моль/л фосфат буфер эритмаси, УХСК нинг 10% ли эритмаси, трасилолнинг 100 ТБ мл ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,5 моль/л эритмаси.

Керакли анжомлар: 1, 2, 5 мл ли пипеткалар, пробиркалар, воронкалар, филтрлар, термостат ёки сув ҳаммоми, ФЭК, 0,5 см қалинликдаги қюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Жадвалга мувофиқ 3 та пробиркада аралашма тайёрланади.

Тажриба пробиркаларидаги суюкликлар яхшилаб аралаштирилади ва 37°C ли термостатга ёки сув ҳаммомига 20 дақиқага жойлаштирилади. Сўнг биринчи икки пробиркага 3 мл УХСК эритмасидан солинади ва аралаштирилади. 5—10 дақиқадан сўнг суюкликлар филтрланади.

22- жадвал

Пробиркалар	1	2	3
Казеин эритмаси, мл	1,0	1,0	1,0
Фосфат буфери, мл	1,5	1,5	1,5
Трасилол эритмаси, мл	—	1,0	—
УХСК эритмаси, мл	—	—	3,0
Трипсин эритмаси, мл	0,5	0,5	0,5

2. Алоҳида 3 та пробиркага 5 мл натрий гидроксид эритмаси, 2,5 мл филтрат ва 0,5 мл фенол реактиви солиб аралаштирилади. Кўк ранг ҳосил бўлади. Рангнинг оптик зичлиги 630—690 нм тўлқин узунлигидаги (қизил нур фильтри) ФЭК да аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

23- жадвал

Тажрибанинг тури	ФЭК кўрсаткичи	Хулоса
Ингибиторли тажриба		
Ингибиторсиз тажриба		
Назорат пробирка		

43- и ш. АРГИНАЗАНИ M_n^{2+} ИОНЛАРИ БИЛАН ФАОЛЛАШ ВА УНИНГ ОРТИҚЧА МИҚДОРИ БИЛАН РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИНИ СУСАЙТИРИШ

Аргиназа табиати жиҳатидан металл тутувчи ферментлар қаторига киради ва таъсир кўрсатиш учун M_n^{2+} ионлари — кофактор бўлишини талаб қилади. M_n^{2+} ионларининг оптимал миқдори $2 \cdot 10^{-4}$ га тенг. Бундан ортиғи аргиназа фаоллигига салбий таъсир кўрсатади, яъни реакция тезлигини сусайтиради.

Текширилувчи материал: тоза ҳолда ажратилган аргиназа ферменти.

Реактивлар: рН и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, $MnCl_2$ нинг 0,002 ва 0,2 моль/л, УХСКнинг 5% ли, аргининнинг 0,007 моль/л эритмаси сийдикчил микдорини ўлчаш учун рангли реактив (тайёрланиши 500-бетда), сийдикчилнинг доимий эритмаси (0,02 мг/мл).

Керакли анжомлар: 1,2 мл сийғимли пипеткалар, макробюреткалар, пробиркалар, воронкалар, фильтрлар, сув ҳаммоми, термостат, ФЭҚ, 1 см калияликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 24-жадвалда келтирилган эритмалардан аралашма тайёрланади.

Аралашма солинган пробиркалар чайкатилиб, 15 дақиқага қолдирилади (пробиркалар $37^{\circ}C$ ли термостатга жойлаштирилади). Бир оз вақт ўтгач реакцияни тўхтатиш учун ҳар бир пробиркага 2 мл УХСК дан солинади, аралаштирилади ва филтрдан ўтказилади.

24- ж а д в а л

Ишлатиладиган эритмалар	Пробиркалар		
	1	2	3
Аргиназа ферменти, мл	0,2	0,2	0,2
Глицин буфери, мл	1,6	1,4	1,4
$MnCl_2$ нинг 0,002 моль/л эритмаси	—	0,2	—
$MnCl_2$ нинг 0,2 моль/л эритмаси	—	—	0,2
Аргинин эритмаси, мл	0,2	0,2	0,2

2. Филтрдан ўтган суюқлик таркибидаги сийдикчилни аниқлаш учун 2 мл филтратга 2 мл рангли реактив қўшилади, аралаштирилади ва 15 дақиқага қайнаб турган сув ҳаммомига жойлаштирилади.

3. Пробиркалардаги аралашма совитилгач ҳосил бўлган рангнинг оптик зичлиги ФЭҚ нинг яшил нур филтрида, дистилланган сув қаршисида аниқланади (яшил нур филтрининг тўлқин узунлиги 520—540 нм).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. ФЭҚ кўрсаткичларига кўра тажриба натижалари такқосланади ва $MnCl_2$ нинг турли микдорини таъсири аниқланади. Аргиназа фаоллигини қандай микдордаги $MnCl_2$ ошириши ва сусайтириши белгиланиб, тегишли хулоса чиқарилади.

44-иш. АРГИНАЗА ФАОЛЛИГИНИ СУБСТРАТ АНАЛОГИ — ГУАНИДИН БИЛАН СУСАЙТИРИШ

Текширилувчи материал: жигардан ажратилган аргиназа.

Реактивлар: рН и 9,5 бўлган глицин буфери, УХСК нинг 5% ли эритмаси, аргининнинг 0,007 моль/л эритмаси, гуанидиннинг 2% ли

эритмаси, сийдикчил микдорини ўлчаш учун рангли реактив (тайёрланиши 288-бетда), сийдикчилнинг доимий эритмаси (0,02 мг/мл).

Керакли анжомлар: ўлчовли пипеткалар, пробиркалар, макроюреткалар, воронкалар, фильтрлар, сув хаммоми, термостат, ФЭҚ ва 1 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Тўртта пробиркада 25- жадвалга мувофиқ аралашма тайёрланади.

25- ж а д в а л

Ишлатиладиган эритмалар	ингибитор-сиз тажриба	Ингибитор-ли тажриба	Назорат 1	Тажриба 2
Аргиназа ферменти, мл	0,2	0,2	0,2	0,2
УХСК эритмаси, мл	—	—	2,0	2,0
Глицин буфери, мл	1,6	1,4	1,6	1,4
Аргинин эритмаси, мл	0,2	0,2	0,2	0,2
Гуанидин эритмаси, мл	—	0,2	—	0,2

Эритма яхшилаб аралаштирилади ва 20 дақиқа термостатга қўйилади. Ферментатив реакция тажриба пробиркаларига 2 мл УХСК эритмаси солиш билан тўхтатилади, суюқликлар аралаштирилиб, фильтрланади. Фильтрат таркибидаги сийдикчил ФЭҚ усули билан аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижаларни дафтарга ёзиб тегишли хулоса чиқаринг.

4. ФЕРМЕНТЛАРНИНГ ЎЗИГА ХОСЛИГИ, СУБСТРАТГА НИСБАТАН ТАНЛАНУВЧАНЛИГИ

Хар қандай фермент фақат ўзига хос кимёвий реакция тезлигини ошириш қобилятига эга. Ферментлар юқори даражада танланувчанлик қобилятини намоён қилади. Танланувчанлик уч турга тафовут қилинади: нисбий, мутлоқ стериокимёвий. Нисбий танланувчанлик хоссасини меъда-ичакда жойлашган протеолитик, липолитик, амилитик ферментлар намоён қилади. Пепсин, трипсин, химотрипсин, аминопептидаза, карбоксипептидаза каби ферментлар гуруҳи оксил молекуласидаги пептид боғини (СО—NH) парчалаш реакцияларини катализлайди. Аммо юқоридаги ферментлар пептид боғининг қайси аминокислоталар орасида ҳосил бўлишига қараб таъсир кўрсатади.

Айрим ферментлар ягона бир субстрат ёки ферментатив реакцияга таъсир кўрсата олади. Масалан, уреаза фақат

сйдикчилнинг парчаланиш реакциясини катализлайди, аргиназа эса фақат аргининнинг сйдикчил ва орнитингача парчаланиш реакциясини катализлайди ва ҳоказо. Бундай ферментлар мутлоқ танланувчанлик хоссасига эга.

Айрим ферментлар субстратнинг стерооқимёвий конфигурациясига ҳам сезгирлик кўрсатади. Цис шаклдаги субстратга таъсир кўрсатувчи фермент транс шаклга таъсир кўрсата олмайди ва аксинча. Субстратнинг альфа ёки бетта шакли, Z ёки D оптик изомерларига ҳам турли хилдаги ферментлар таъсир кўрсатади. Бу гуруҳ ферментлар стерооқимёвий танланувчанлик хоссасига эга.

45-иш. АМИЛАЗА ФЕРМЕНТИНИНГ ТАНЛАНУВЧАНЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Сўлак амилазасининг субстратга нисбатан танланувчанлигини турли хил субстратга (сахароза, амилаза) кўрсатган таъсиридан билиш мумкин. Амилаза крахмални мальтоза ҳолатигача парчалайди. Унинг оралик маҳсулотлари — декстринлардир. Крахмалнинг парчаланиш даражасини крахмални йод билан ҳосил қилган рангли реакциясидан аниқлаш мумкин. Крахмал йод билан кўк ранг, декстринлар эса бинафша ёки қорамтир қизил ранг ҳосил қилади. Крахмалнинг охири парчаланиш маҳсулотлари — мальтоза ёки глюкоза йод билан ранг ҳосил қилмайди.

Мальтоза ёки глюкозани Троммер реакцияси ёрдамида аниқлаш мумкин. Ушбу реакция глюкоза, мальтоза таркибидаги альдегид гуруҳини аниқлашга асосланган. Крахмалда эса альдегид гуруҳ йўқ ва шунинг учун крахмал Троммер реакциясини бермайди.

Текширилувчи материал: 1:10 суюлтирилган сўлак амилазаси.

Реактивлар. Крахмалнинг 1% ли эритмаси, сахарозанинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси, калий йодда тайёрланган йоднинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, термостат ёки сув ҳаммони.

Бажариладиган иш тартиби. Учта пробирка тайёрланади. Унинг ҳар бирига суюлтирилган сўлак амилазасидан 1 мл дан солинади. Сўнг биринчи пробиркага 1 мл крахмал, иккинчисига 1 мл сахароза ва учинчисига 1 мл дистилланган сув солиб, суюкликлар аралаштирилади-да 10—15 дақиқа 37°C ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади.

Ишлатиладиган реактивлар	1 тажриба	2 тажриба	3 назорат
Сўлак амилазаси, мл	1,0	1,0	1,0
Крахмал эритмаси, мл	1,0	—	—
Сахароза эритмаси, мл	—	1,0	—
Дистилланган сув, мл	—	—	1,0

37°C да 15 дақиқа ушланади

Крахмалнинг йод билан

рангли реакцияси ("+", "—")

Троммер реакцияси ("+", "—")

2. Пробиркадаги суюкликлар билан йод ва Троммер реакциялари ўтказилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар 26 жадвалга ёзилади, амилаза қайси субстратни парчалагани аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

46-и ш. САХАРОЗАНИНГ ТАНЛАНУВЧАНЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Сахароза сахарозани глюкоза ва фруктозага парчала-ниш реакциясини катализлайди. Реакция натижасида ҳосил бўлган глюкозани Троммер реакцияси билан аниқлаш мумкин. Сахароза Троммер реакциясини бермай-ди, чунки у глюкозадаги полуацетальгидроксил фруктоза билан боғланган.

Текширилувчи материал: куритилган хамиртурушдан ажратилган сахароза.

Реактивлар. Крахмалнинг 1% ли эритмаси, сахарозанинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, чинни ховонча, воронкалар, фильтрлар, термостат ёки сув ҳаммоми, тарози ва қадоқлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. 0,5 г куритилган хамиртуруш чинни ховончада яхшилаб эзилади. Сўнг унинг устига 5 мл дистилланган сув солиб яна эзилади. Олинган аралашма фильтрдан ўтказилади. Фильтрдан ўтган суюклик сахароза ферментини тутати.

25- жадвалга мувофиқ ферментга таъсир қилувчи аралашма — суюклик тайёрланади. Тайёрланган аралашмалар 38°C ли сув ҳаммоми ёки термостатда 15 дақиқа ушланади.

Ишлатиладиган реактивлар	1	2	3
Сахароза ферменти, мл	1,0	1,0	1,0
Сахароза эритмаси, мл	1,0	—	—
Крахмал эритмаси, мл	—	1,0	—
Дистилланган сув	—	—	1,0

38°C да 15 дақиқа ушланади

Троммер реакцияси ("+", "—")

3. Троммер реакцияси. 5 томчи аралашмага 10% ли натрий гидроксид эритмасидан 10 томчи ва мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмасидан 1—3 томчи солиб аралаштирилади-да қайнагунча қиздирилади. Қизил рангли мис (I) гидроксид ёки мис (I)-оксид чўкмаси ҳосил бўлади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Юқоридаги жадвалга олинган натижалар ёзилади. Сахароза учун тегишли субстрат аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

47-и ш. УРЕАЗА ФЕРМЕНТИНИНГ ТАНЛАНУВЧАНЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Уреаза сийдикчилни аммиак ва карбонат ангидрид (CO_2) га парчаланиш реакциясини катализлайди. Реакция натижасида ҳосил бўлган аммиак (NH_3) фенолфталеин билан аниқланиши мумкин.

Текширилувчи материал: уреаза ферменти.

Реактивлар: сийдикчилнинг 1% ли эритмаси, тиомочевина (тиосийдикчил) нинг 1% ли эритмаси, фенолфталеин эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар ва пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркаларнинг бирига 1 мл сийдикчил, иккинчисига 1 мл тиомочевина эритмаси солинади. Иккала пробиркага (10—20 мг ловия уни ёки 1 мл ловия унидан ажратилган уреаза эритмаси ва 2—3 томчи фенолфталеин эритмаси солиб аралаштирилади ва бир неча дақиқа хона ҳароратида қолдирилади. Сийдикчил эритмаси солинган пробиркада оч пушти ранг ҳосил бўлади. Иккинчисида эса ранг ҳосил бўлмайди.

Тажриба жадвалга мувофиқ равишда бажарилади.

28- жадвал

Тажриба	Уреаза, мл	Сийдикчил эритмаси, мл	Тиомочевина эритмаси, мл	Фенолфталеин, мл	Реакция натижаси
1	10—20	1,0	—	2—3 томчи	
2	10—20	—	1,0	2—3 томчи	

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижа жадвалга ёзилади. Уреазанинг танлаган субстрати аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

48-иш. АРГИНАЗА ФЕРМЕНТИНИНГ СУБСТРАТ ТАНЛАШИНИ АНИҚЛАШ

Аргиназа ягона субстрат — аргининнинг парчаланishi реакциясини катализлайди ва мутлоқ танлаш хоссасини намоён қилади. Аргинин ушбу фермент таъсирида орнитин ва сийдикчилга парчаланadi. Аргининнинг тузилишига ўхшаш бўлган гуанидин ва креатин фермент таъсирига учрамайди.

Текширилувчи материал: жигардан ажратилган аргиназа.

Реактивлар: Аргининнинг 0,007 моль/л эритмаси, креатиннинг 0,01 моль/л эритмаси, гуанидиннинг 0,01 моль/л эритмаси, рН и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, УХСК нинг 5% ли эритмаси, сийдикчилни аниқлаш учун рангли реактив (тайёрланиши 288-бетда) сийдикчилнинг 0,02 мг доимий эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, пипеткалар, макробюреткалар, сув ҳаммоми, термостат, воронкалар, филтрлар, ФЭК, 1 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Турли субстратлар солинган учта пробирка тайёрланади. Иш тартиби 27-жадвалга мувофиқ бажарилади.

29-жадвал

Тажриба-лар	Глицин буфери, мл	Аргиназа эритмаси, мл	Аргинин эритмаси, мл	Креатин эритмаси, мл	Гуанидин эритмаси, мл
1	1,4	0,4	0,2	—	—
2	1,4	0,4	—	0,2	—
3	1,4	0,4	—	—	0,2

2. Учта назорат тажриба пробиркалари тайёрланади. Бунинг учун уччала пробиркага 2 мл УХСК эритмаси ҳамда тажриба учун олинган эритмаларнинг барчасидан солинади ва аралаштирилади. УХСК реакция тезлигини сусайтиради.

3. Барча пробиркалардаги суюкликлар яхшилаб аралаштирилади ва 37°С ли термостатда ёки сув ҳаммомида 15 дақиқа сақланади. Бир оздан сўнг текширув тажриба пробиркаларига 2 мл УХСК эритмаси солинади. Суюкликлар аралаштирилиб ҳар қайси пробирка алоҳида филтрланади.

4. Сийдикчил микдорини ўлчаш учун ҳар қайси филтратдан 2 мл олиниб, устига 2 мл рангли реактив солинади, аралаштирилади ва қайнаб турган сув ҳаммомида 15 дақиқа қиздирилади.

5. Суюқликлар совитилгач текширув ва назорат тажриба суюқликлар дистилланган сув қаршисида ФЭКнинг 540—560 нм тўлқин узунлиги (яшил нур филтри) да оптик зичликлар топилди. Сийдикчилнинг микдори сийдикчилнинг доимий эритмасига нисбатан ҳисобланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Аргиназа ферментининг танлаган субстрати аниқланади ва тегишли ҳулоса чиқарилади.

5. ФЕРМЕНТ МИҚДОРНИНГ РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ТАЪСИРИ

Ферментатив реакциянинг бошланғич тезлиги субстрат микдорининг ортиқча бўлиши шарти билан фермент микдорига тўғри пропорционалдир. $V = RE$, бунда R — реакция тезлиги константаси, E — фермент микдори. Ушбу боғлиқликни график ифодалашда тўғри чизик ҳосил бўлади.

Турли фермент препаратлари фаоллигини таққослаш йўли билан ушбу препаратлардаги ферментлар микдорини аниқлаш мумкин.

49-иш. АМИЛАЗА МИҚДОРНИ КРАХМАЛНИНГ ПАРЧАЛАНИШ ТЕЗЛИГИГА ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: 1:10 суюлтирилган сўлак амилазаси.

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

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

Бажариладиган иш тартиби. Иш тартиби жадвалга мувофиқ бажарилади.

30-жадвал

Тажриба пробиркалар	Натрий хлорид эритмаси, мл	Крахмал эритмаси, мл	Дистилланган сув, мл	Амилаза, мл
1	0,5	1,0	0,9	0,1
2	0,5	1,0	0,7	0,3
3	0,5	1,0	0,5	0,5
4	0,5	1,0	0,3	0,7

Пробиркадаги эритмалар аралаштирилади ва 38°C ли термостат ёки сув ҳаммомида 15 дақиқа ушланади. Бир оздан сўнг крахмалнинг турли фермент микдори таъсирида парчаланиш даражаси крахмалнинг йод билан берган рангли реакцияси ёрдамида аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади. Ферментнинг қандай микдори крахмални парчалаши аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

50-и ш. РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА АРГИНАЗА МИҚДОРИНING ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: жигар аргиназаси.

Реактивлар: рН и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, аргининнинг 0,007 моль/л эритмаси. УХСК нинг 5% ли эритмаси, сийдикчилни аниқлаш учун рангли реактив, биурет реактиви, сийдикчилнинг 0,02 мг ли доимий эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, макробюреткалар, сув ҳаммоми, воронкалар, филтрлар, термостат, ФЭК, 1 см қалинликдаги қюветалар, сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 5 та пробиркада жадвалга мувофиқ эритмалар аралашмаси тайёрланади.

31- ж а д в а л

Таъриба пробирка- лар	Аргиназа эритмаси, мл	Глицин буфер, мл	Фермент миқдори, мкг/мл оқсилга	Оптик зичлик	Сийдик- чилнинг мкмоль/мл миқдори
1	0,1	1,5			
2	0,2	1,4			
3	0,3	1,3			
4	0,4	1,2			
5	0,5	1,1			

Эритмалар аралаштирилгач устига 0,2 мл аргинин эритмаси солинади.

2. Барча пробиркалар 40°C ли термостат ёки сув ҳаммомида 20 дақиқа ушланади. Бир оздан сўнг ферментатив реакция тезлиги ҳар қайси пробиркага 2 мл 5% ли УХСК эритмаси солиш билан тўхтатилади. Суюқликлар аралаштирилгач филтрдан ўтказилади.

3. Реакция натижасида ҳосил бўлган сийдикчилни аниқлаш учун 2 мл филтратга 2 мл рангли реактив қўшиб аралаштирилади ва қайнаб турган сув ҳаммомида расо 20 дақиқа қиздирилади. Ривожланган рангнинг зичлиги

ФЭК нинг 540—560 нм тўлкин узунлигида (яшил нур фильтри) дистилланган сув қаршисида ўлчанади. Сийдикчил микдори 1 мл тажриба эритмасининг доимий сийдикчил эритмасига нисбати бўйича ҳисобланади.

4. Фермент препаратидоги оксил микдорини ўлчаш учун 1 мл фермент препаратига 4 мл биурет реактивидан солиб аралаштирилади ва 20 дақиқа ўтгач ранг зичлиги фотоэлектроколориметрланади (назорат тажрибасини тайёрлаш учун 1 мл дистилланган сувга 4 мл биурет реактиви солинади). Рангли эритма зичлиги 540—560 нм тўлкин узунлигида (яшил нур фильтрида) назорат эритма қаршисида ўлчанади. Оксил микдори ўлчов эгри чизигидан топилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар жадвалга ёзилади ва фермент микдори ўзгаришининг реакция тезлигига таъсири эгри чизик билан ифодаланади. Ордината ўқига реакция тезлиги (мкмоль/дақиқа) ёки оптик зичлик бирлиги, абсцисса ўқига эса фермент микдори (мкг/мл) келтирилади. Иш бўйича тегишли хулоса чиқарилади.

51 - и ш . ПРОТЕОЛИТИК РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ТРИПСИН МИКДОРИНИНГ ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: трипсин ферменти.

Реактивлар: казеиннинг 1% ли эритмаси, рНи 8,0 бўлган фосфат буфер эритмаси (0,1 моль/л), УХСК нинг 5% ли эритмаси, трипсиннинг $5 \cdot 10^{-4}$ микдордаги эритмаси 0,005 моль/л хлорид кислота эритмасида тайёрланади, натрий гидроксиднинг 0,5 моль/л эритмаси, фенол реактиви.

Керакли анжомлар: пробиркалар, ўлчовли пипеткалар, воронкалар, фильтрлар, термостат ёки сув хаммоми, ФЭК, 0,5 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Жадвалга мувофиқ реакцияон аралашма тайёрланади. Трипсин эритмаси иложи борича пробиркаларга тезлик билан солинади. Фермент солингач суюқликлар аралаштирилади ва 40°C ли сув хаммоми ёки термостатга 15 дақиқага кўйилади.

2. Реакция тезлиги тажриба пробиркаларига 3 мл УХСК нинг 5% ли эритмасидан солиб тўхтатилади. Суюқликлар аралаштирилиб, филтрдан ўтказилади.

3. Филтрат таркибидоги реакция маҳсулоти — тирозин микдори аниқланади. 2,5 мл филтратга 0,5 мл фенол реактиви солинади ва 20 дақиқадан сўнг ривожланган ранг зичлиги ўлчанади. ФЭК нинг 630—690 нм тўлкин узунлиги (қизил нур фильтри) да назорат эритмаси қаршисида ўлчанади. Тирозиннинг микдори ўлчов эгри чизигидан топилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади ва график равишда ифодаланади. Ордината ўқига реакция тезлиги (ёки оптик зичлик бирлиги), абсцисса ўқига фермент миқдори келтирилади. Фермент миқдорининг реакция тезлигига боғлиқлиги аниқланади ва тегишли хулоса чиқарилади.

32- ж а д в а л

Тажриба-пробиркалари	Казеин эритмаси, мл	Фосфат буфер эритмаси, мл	Трипсин эритмаси, мл	Фермент миқдори оқсилга нисбатан мкг/мл ҳисобида	Оптик зичлик	Реакция тезлиги мкмоль/дақиқа
1	1,0	1,9	0,1			
2	1,0	1,7	0,3			
3	1,0	1,5	0,5			
4	1,0	1,2	0,8			

6. СУБСТРАТ МИҚДОРНИНГ ФЕРМЕНТАТИВ РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ТАЪСИРИ

Ферментатив реакция тезлиги субстрат миқдorigа боғлиқ. Чунки субстрат миқдори кам бўлса реакция тезлиги пасаяди. Субстрат миқдори ортиб бориши билан реакция тезлиги ҳам ортиб боради. Аммо субстрат миқдори жуда юқори бўлганда реакция тезлиги сусая бошлайди. Демак, тегишли фермент ортикча субстрат миқдори билан тўйинади ва ферментнинг фаоллигини сусайтиради. Субстрат миқдорининг ферментатив реакция тезлигига боғлиқлигини Михаэлис — Ментен тенгламаси ва эгри чизигидан тушуниш мумкин. $K_M — 1/2V_{max}$.

Ферментатив реакциянинг максимал тезлиги сарфланган субстратнинг ярмига тенг бўлган кўрсаткич Михаэлис константаси дейилади ва миқдор бирлиги қилиб моль/л олинади. Михаэлис константаси ферментнинг субстратга нисбатан мойиллигини кўрсатади. Ушбу бирлик қанчалик катта бўлса, ферментнинг субстратга нисбатан мойиллиги ҳам шунча катта бўлади.

52-иш. АРГИНИН МИКДОРИНИНГ ФЕРМЕНТАТИВ РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: жигар аргиназаси.

Реактивлар: pH и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, 0,007 моль/л аргинин эритмаси, 5% ли УХСК эритмаси, сийдикчилли аниқлаш учун рангли реактив, сийдикчилнинг 0,02 мг/мл ли доимий эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, штативлар, ўлчовли пипеткалар, макробюреткалар, воронкалар, филтрлар, термостат, сув ҳаммоми, ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 33-жадвалга мувофиқ реакцион эритма аралашмалари тайёрланади. Аргинин эритмаси тартиб билан ва иложи борица тезлик билан пробиркаларга солинади.

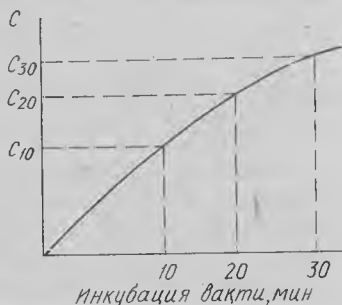
33-жадвал

Тажриба-лар тартиби	Фермент эритмаси, мл	Глицин буфер эритмаси, мл	Аргинин эритмаси, мл	Субстрат миқдори, мкмоль/мл	Реакция тезлиги, мкмоль/мл
1	0,1	1,6	0,1		
2	0,1	1,5	0,2		
3	0,1	1,4	0,3		
4	0,1	1,3	0,4		
5	0,1	1,2	0,5		

2. Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб, 40°C ли термостат ёки сув ҳаммомида 20 дақиқа ушланади. Реакция тезлиги 2 мл 5% ли УХСК эритмасини қўшиш билан тўхтатилади. Эритмалар аралаштирилиб, филтрдан ўтказилади.

3. Филтрат таркибидаги реакция маҳсулоти — сийдикчил миқдори ФЭК усули билан аниқланади (юқорига қаранг).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади. Ферментатив реакция тезлигининг субстрат миқдорига боғлиқлиги графикада ифода-



11-расм. Сийдикчил миқдорининг фермент билан инкубация қилинган вақтга боғлиқлиги.

ланган. Ордината ўқига реакция тезлиги, абсцисса ўқига эса аргинин миқдори келтирилади. Натижалар бўйича тегишли хулоса чиқарилади.

Аргиназа катализлайдиган реакция учун Михаэлис константасини K_M ҳисоблаш мумкин. Эгри чизиқ бўйича реакциянинг максимал тезлиги жуда аниқ бўлмасада, қўйидагича ҳисобланиши мумкин. Биринчидан, боғлиқлик чизиғи тўғри бўлиши керак. Бунинг учун ордината ўқига 1 нисбати, абсцисса ўқига эса $1/1$ келтирилади. Тўғри чизиқ ҳосил бўлади. $1/K_M$ — тесқари катталики. Тўғри чизиқ абсцисса чизиғи билан кесишгунча давом эттирилади ва $1/K_M$ нинг катталиги топилади (11- расм).

5 3 - и ш . СУБСТРАТ МИҚДОРНИНГ ТРИПСИН КАТАЛИЗЛАЙДИГАН РЕАКЦИЯ ТЕЗЛИГИГА ТАЪСИРИ

Текширилувчи материал: кристалланган трипсин.

Реактивлар: казеиннинг 1% ли эритмаси, рН и 8,0 бўлган 0,1 моль/л фосфат буфер эритмаси, УХСК нинг 5% ли эритмаси, 0,005 моль/л хлорид кислотада тайёрланган $5 \cdot 10^{-4}$ % ли трипсин эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, ўлчовли пипеткалар, воронкалар, филтрлар, термостат ёки сув ҳаммоми, ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Жадвалга мувофиқ эритма аралашмалари тайёрланади.

34- ж а д в а л

Тажриба пробиркалар	Казеин эритмаси, мл	Фосфат буфер эритмаси, мл	Трипсин эритмаси, мл	Субстрат миқдори, мкмоль/мл	Ферментатив реакция, мкмоль/л
1	0,2	2,3	0,5		
2	0,4	2,1	0,5		
3	0,6	1,9	0,5		
4	0,8	1,7	0,5		

Эритмалар аралаштирилгач 15 дақиқа 37°C ли сув ҳаммоми ёки термостатга қўйилади. Реакция тезлигини тўхтатиш учун 3 мл 5% ли УХСК эритмаси қўшилади, аралаштирилади ва филтрланади.

2. Филтрат таркибидаги тирозин миқдори ФЭК усули билан аникланади (юқорига қаранг).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади. Субстрат миқдорида боғлиқ бўлган реакция тезлиги график билан ифодаланади. Тегишли хулоса чиқарилади.

Аргиназа микдорини ўлчаш айрим касалликларни аниқлашда катта аҳамиятга эга. Тўқима оксилларининг парчаланиши ортганда, узоқ вақт оч қолганда, аллоксан диабетда, витамин В₁ етишмовчилигида, организмга кортикостероид ва тироксин гормонлари юборилганда жигар аргиназасининг фаоллиги ортиши кузатилади. Шунингдек, жигар касалликларида аргиназа фаоллиги ўзгаради.

Аргиназа фаоллигини икки йўл билан аниқлаш мумкин.

1. Субстрат — аргинин микдорининг парчаланиш тезлиги-га қараб ва парчаланмай қолган аргинин микдорини аниқлаш орқали.

2. Реакция маҳсулоти ҳисобланган орнитин ва сийдикчил микдорини ўлчаш йўли билан.

Ушбу ишда аргиназанинг парчаланиш маҳсулоти — сийдикчил аниқланади. Сийдикчил тиосемикарбозид иштирокида диацетилмонооксим билан нордон муҳитда қизил рангли бирикма ҳосил қилади. Рангнинг зичлиги калориметрик усул билан аниқланади.

Текширилувчи материал. Ҳайвон жигари қиймаси ёки ацетон кукуни.

Реактивлар. Натрий хлориднинг 0,9% ли эритмаси, рН и 9,5 бўлган глицин буфер эритмаси, аргининнинг 0,007 моль/л ли эритмаси (рН 9,5) УХСК нинг 5% ли эритмаси, рангли реактив сийдикчилнинг 0,02 мг м.л доимий эритмаси, биурет реактиви.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, ўлчовли пипеткалар, макробюреткалар, воронкалар, фильтрлар, қайчи, Уоринг гомогенизатори, муз ва сув хаммони, термостат, ФЭЖ ва кюветалар, тарози.

Бажариладиган иш тартиби. Жигар қиймаси (гомогенат) ни тайёрлаш.

1. Янги сўйилган каламуш жигари 0,9% ли натрий хлориднинг совитилган эритмасида ювилади. Тахминан 1—2 г жигар муз устида қайчи билан майдаланади. Сўнгра майдаланган жигар Уоринг гомогенизаторида 2—3 мл глицин буфер эритмаси билан 2—3 дақиқа қиймаланади. Гомогенизациялаш 2 марта қайтарилади ва гомогенат (қийма) глицин буфери билан 1:10 суюлтирилади (1 г жигарга 10 мл глицин буфер солинади). Суюлтирилган қийма икки қаватли докадан ўтказилади.

2. Жигарнинг ацетонли кукунидан ферментни ажратиш. 200 мг ацетон кукунига 15 мл глицин буферидан солиб, 37°C ли термостатда 20 дақиқа ушлаб турилади. Вақти-вақти билан қолба чайқатиб турилади. Сўнгра аралашма филтрланади ва филтрат таркибидаги фермент ишлатилади.

3. Ферментнинг субстратли инкубациясини тайёрлаш. Иш жараёни 35- жадвалга мувофиқ бажарилади. Тажри-

банинг бири текшириш, иккинчиси назорат ҳисобланади. Реактивларнинг қўшилиш навбатига роя қилинади.

35- ж а д в а л

Таҷрибалар	Глицин бу- фери, мл	Аргинин эритмаси, мл	УХСК эрит- маси, мл	Аргиназа эритмаси, мл
Текширув	1,4	0,2	—	0,4
Назорат	1,4	0,2	2,0	0,4

Текширув ва назорат пробиркаларидаги эритмалар аралаштирилиб, 37°C ли термостатга жойлаштирилади.

Бир оздан сўнг текширув пробиркасига 2 мл 5% ли УХСК эритмасидан солиб аралаштирилади. Иккала пробиркадаги эритма филтрланади. Филтрат таркибидаги сийдикчил аниқланади.

4. Сийдикчил микдорини ўлчаш. Биринчи пробиркага текширув, иккинчисига назорат филтратларидан олинади (2 мл дан). Иккала пробиркага рангли реактивдан 2 мл солинади. Эритмалар аралаштирилиб, қайнаб турган сув ҳаммомига 15 дақиқага қўйилади. Вақт ўтгач эритмалар совитилиб, ҳосил бўлган ранг зичлиги ФЭКнинг 540—560 нм узунлигида (яшил нур филтри) дистилланган сув қаршисида ўлчанади. 1 см қалинликдаги кюветалар ишлатилади. Ҳосил бўлган ранг тезда йўқолади. Шунинг учун оптик зичлик 20 дақиқа ичида ўлчаниши керак. Таҷриба синама кўрсаткичидан назорат синама кўрсаткичи айирилади. Топилган сондан сийдикчил микдорини ҳисоблашда фойдаланилади. Сийдикчил микдори доимий сийдикчил микдорига нисбатан ҳисоблаб топилади. Доимий сийдикчил микдорини аниқлаш учун 2 мл доимий эритмага 2 мл рангли эритма қўшиб 15 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида қайнатилади, совитилади ва колориметрланади.

Ҳисоблаш. 1 мл инкубацион аралашма таркибидаги сийдикчил микдорини доимий сийдикчил эритмасига нисбатан аниқлаш учун қуйидаги тенгламадан фойдаланилади.

$$X = \frac{E_{\text{текширув}}}{E_{\text{доимий}}} \cdot 0,02$$

$E_{\text{текширув}}$ — таҷриба учун олинган аралашманинг оптик зичлиги $E_{\text{доимий}}$ — доимий сийдикчил эритмасининг оптик зичлиги 0,02 мг/мл — доимий сийдикчил эритмасидаги сийдикчил микдори.

Сийдикчил миқдори мкмоль/мл бирлигида ҳисобланади. Агар $X=12$ мг/мл бўлса, бу вақтда

$$X_1 = \frac{1200}{60} + 200 \text{ мкмоль/мл бўлади.}$$

60 — сийдикчилнинг моляр массаси.

Ферментнинг солиштирма фаоллигини аниқлаш. Фермент препарати оксили 2 мг га тенг. 1 мл фермент эритмаси таркибидаги оксил миқдори топилади. Ферментнинг субстрат билан реакцияга кирган даври 15 дақиқа бўлса, у вақтда ферментнинг солиштирма фаоллиги

$$\frac{200}{15:2,0} = 6,6 \text{ мкмоль/мг дақиқа га тенг бўлади.}$$

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Текширув, назорат ва доимий сийдикчил эритмалари учун ФЭК нинг оптик зичликлари бўйича аргиназа фаоллиги ҳисобланади. Ҳисоб ва натижалар дафтарга ёзилади. Тегишли хулоса чиқарилади.

55-иш. ТРИПСИННИНГ ПРОТЕОЛИТИК ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Трипсиннинг протеолитик фаоллигини аниқлаш казеин оксилининг парчаланиш маҳсулоти — тирозин аминокислотасини аниқлашга асосланган. Тирозин фенол реактиви билан кўк ранг ҳосил қилади. Унинг зичлиги ФЭК да ўлчанади.

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

Реактивлар: казеиннинг 1% ли эритмаси, рН и 8,0 бўлган фосфат буфер эритмасининг 0,1% ли, УХСК нинг 10% ли, натрий гидроксиднинг 0,5 моль/л эритмаси, фенол реактиви.

Керакли анжомлар: пробиркалар, томизгичлар, воронкалар, бюреткалар, филътрлар, термостат, сув ҳаммоми ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Жадвалга мувофиқ реакцион аралашма тайёрланади.

36- ж а д в а л

Тажрибалар	Казеин эритмаси, мл	Фосфат буфер эритмаси, мл	УХСК эритмаси, мл	Трипсин эритмаси, мл
Текширув	1,0	1,5	—	0,5
Назорат	1,0	1,5	3,0	0,5

Аралашмалар 37°C ли термостат ёки сув хаммомига 20 дақиқага қўйилади. Реакцияни тўхтатиш учун текширув пробиркасига 3 мл 10% ли УХСК эритмаси солинади. 5—10 дақиқадан сўнг пробиркадаги суюқлик филтрдан ўтказилади.

2. Тирозин микдорини аниқлаш. Иккита пробиркага 0,5 моль/л ли натрий гидроксид эритмасидан 5 мл, унинг биринчисига текширув пробиркасидаги филтрат, иккинчисига назорат филтратидан 2,5 мл солиб аралаштирилади. Унинг устига 0,5 мл фенол реактивидан қўшиб яна аралаштирилади. Қўк ранг ҳосил бўлади. 20 дақиқа ўтгач суюқликлар ФЭК нинг 630—690 нм тўлқин узунлигида колориметрланади. Текширув ва назорат суюқликларининг оптик зичликлари фаркланади. Сўнгра ўлчов эгри чизиғи бўйича ферментатив реакция жараёнида тирозиннинг қўпайиши аниқланади.

3. Трипсиннинг фаоллигини ҳисоблаш. Трипсиннинг фаоллиги 1 мл фермент эритмаси учун олинган бирликда ифодаланади. Солиштирма фаолликни аниқлаш 1 мг оксил ҳисобида амалга оширилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга топилган оптик зичликлар, фермент фаоллиги, тирозин микдорини ёзинг ва тегишли хулоса чиқаринг.

56-и ш. ЖИГАР УРОКАНИНАЗАСИНИНГ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Уроканиназа жигарга хос фермент — уроканин кислотанинг глутамин кислота ва бошқа маҳсулотларгача парчаланиш реакциясини катализлайди. Қасалликларни бир-биридан ажратишда ва жигар, ўт йўллари касалликларини олдиндан аниқлашда қон уроканиназаси фаоллигини аниқлаш катта аҳамиятга эга.

Фермент фаоллиги, уроканин кислотанинг реакциядан олдинги ва кейинги микдори ўзгариши колориметрик усул билан аниқланади. Уроканин кислота ишқорий шароитда сульфанил кислота билан бўялган бирикмани ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: жигар экстракти.

Реактивлар: 0,01 моль/л уроканин кислота эритмаси, рН и 7,2 булган 0,02 моль/л калий фосфат буфер эритмаси, рН и 4,8 булган 3 моль/л ацетат буфер эритмаси, натрий карбонатнинг тўйинган эритмаси, 86% ли этил спирти, 0,5% ли сульфанил кислота эритмаси, натрий нитритнинг 0,5% ли эритмаси (ишлатишдан олдин тайёрланади).

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, воронкалар, филтър қоғози, муз хаммоми, сувли хаммом, ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Фермент препаратини тайёрлаш. 1—2 г жигар гомогенизаторда майдаланади ёки чинни ховончада шиша туйғич билан ишқаланади. Ишқалаш 2—3 мл 0,02 моль/л калий фосфат буферига амалга оширилади. Сўнг гомогенат шу буфер билан 1:20 нисбатда (жигар оғирлигига қараб) суюлтирилади. Тўқима бўлакчалари ва парчаланмаган хужайралардан гомогенатни центрифугалаш ёки филтрлаш йўли билан ҳоли бўлиш мумкин. Ажратилган экстракт — 4° — 8°С ли совутгичда 1—2 кун сақланиши мумкин.

2. Уроканиназа фаоллигини аниқлаш. 37- жадвалга мувофиқ 3 та пробиркада инкубацион аралашма тайёрланади.

37- ж а д в а л

Тажрибалар	Калий фосфат буфери, мл.	Уроканин кислота, мл	Фермент препарати, мл
Текширув	1,7	0,15	0,15
1- назорат	1,85	—	0,15
2- назорат	1,7	—	0,15

Тажриба пробиркалар 37°С ли термостатда ёки сув ҳаммомида 20 дақиқа ушланади. Сўнгра назорат пробиркасига 0,15 мл 0,01 моль/л уроканин кислотасидан ва уччала пробиркага зудлик билан оксилларни чўктириш учун 0,6 мл 3 моль/л ацетат буфер эритмасидан солинади.

Барча пробиркалардаги суюкликлар аралаштирилиб, 3 дақиқага қайнаб турган сув ҳаммомига жойлаштирилади. Оксил чўкмаси филтрлаш билан олиб ташланади.

Барча пробиркалардаги филтратларга 0,5 мл тўйинган натрий карбонат эритмаси, 0,5 мл этил спирти, 0,6 мл янги тайёрланган diazoreактив (сульфанил кислота ва натрий нитрит кислотаси 1:2 нисбатда аралаштирилади) солинади. Эритма муз ҳаммомида аралаштирилади. Diazoreактив солингандан сўнг сарғиш-пушти ранг ҳосил бўлади. Бу ранг спирт қўшилгани учун бир неча соат давомида сақланади. Текширув ва 2- назорат пробиркаларидаги рангли эритмаларнинг оптик зичлиги 1- назорат суюклиги қаршисида ФЭҚ нинг (450—480 нм тўлқин узунлигида) кўк нур филтрида ўлчанади. 2- назорат пробиркага субстрат ферментатив реакцияни тўхтатишдан олдин солинади (оксилни чўктиришдан олдин). Текширув ва назорат суюкликлари таркибидаги уроканин кислота микдори ўлчов эгри чизиғидан топилади.

3. Фермент фаоллигини ҳисоблаш. Фермент фаоллиги текширув ва назорат пробиркаларидаги уроканин кислота айирмасига нисбатан аниқланади. Уроканиназа фаоллиги фермент препаратларидаги 1 мг оксилга нисбатан ҳисобланади ва бир дақиқада уроканин кислотанинг парчаланиш даражаси аниқланади. Уроканиназа нанамоль/дақиқа бирлиги билан ифодаланади.

Мисол. 2-назорат эритманинг оптик зичлиги 0,60, ўлчов эгри чизигидаги уроканин кислота миқдори 82 нмольга тенг (субстратнинг бошланғич миқдори). Текширувчи эритманинг оптик зичлиги эса 0,36, 49 нмольга тўғри келади (ферментатив реакциядан сўнг қолган субстрат миқдори). 0,15 мл фермент препарати таркибидаги оксил миқдори 0,8 мг. Демак, ферментнинг солиштирма фаоллиги қуйидагича:

ферментнинг солиштирма фаоллиги

$$\frac{82 \text{ нмоль} - 49 \text{ нмоль}}{0,8 \text{ мг} \cdot 20 \text{ дақиқа}} = 2,1 \text{ нмоль мг дақиқа}$$

57-иш. СЎЛАК АМИЛАЗАСИ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Сўлак ва меъда ости беши шираси таркибидаги α -амилаза крахмални декстринга ва мальтозага парчаланиш реакциясини катализлайди.

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

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

Текширилувчи материал: сўлак амилазаси.

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

Керакли анжомлар: пробиркалар, шипеткалар, сув ҳаммоми, термостат.

Бажариладиган иш тартиби. Ўнта пробиркага тартиб билан 1 мл дан дистилланган сув солинади. Биринчи пробиркага 1:10 суялтирилган сўлакдан 1 мл солиб аралаштирилади. Унинг бир мл си иккинчисига ва ундан 1 мл си учинчисига ва шу тарзда давом эттирилиб аралаштирилади. Охириги пробиркадаги 1 мл сўлак аралашмаси олиб ташланади. Натижада пробиркаларда сўлакнинг турли даражада суялтирилган эритмаси тайёрланади.

Пробиркалар	1:	2:	3:	4:5:	6:	7:	8:	9:	10
Амилазанинг суюлтирилиш даражаси	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	ва ҳ.к.

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

Мисол. Сариқ ранг 5-пробиркада кузатилган бўлса, унинг суюлтирилган даражаси 1:320 га тенг. Амилазанинг шу суюлтирилган даражаси, 30 дақиқада 1 мл крахмални парчалаш тезлигини топиш учун қуйидаги ҳисоблаш усулидан фойдаланилади.

$$1:320 \text{ ————— } 2 \text{ мл} \\ 1 \text{ ————— } X \quad X = \frac{2 \text{ мл} \cdot 1}{1/320} = 640 \text{ мл}$$

Демак, 1 мл суюлтирилган амилаза 30 дақиқада 640 мл 1% ли крахмал эритмасини парчалайди. Амилаза фаоллигини халқаро бирликка ўтказиш учун 100 мл ————— 1 г. $X = \frac{640}{100} = 6,4 \text{ г} \times 1000 = 640 \text{ мг}$ 640 мл ————— X г.

Соғлом одамларда сўлак амилазасининг фаоллиги 12—32 мг/сек ёки 12—32 г (сек/л).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Суюлтирилган амилаза даражасини, ҳисоблашни дафтарингизга ёзиб тегишли хулоса чиқаринг.

58-иш. ЖИГАР ГИСТИДАЗАСИ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Гистидаза (гистидин — аммиак — лиаза) жигарга хос фермент ҳисобланган гистидин аминокислотасини молекулалараро дезаминлаш реакциясини катализлайди. Ферментатив реакция жараёнида аммиак ва уракаин кислота хосил бўлади. Ферментнинг фаоллиги уроканат кислота микдори билан ўлчанади.

Текширилувчи материал: жигар экстракти — гистидазаси.

Реактивлар. рН и 8,5—9, 0 бўлган 0,1 М гистидин эритмаси, рН и 9,2 бўлган 0,1 М калий фосфат буфери эритмаси, рН и 4,8 бўлган 3 М ацетат буфери, 0,001 М натрий уроканат эритмаси, диазореактив, этил спирти.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, воронкалар, фильтр қоғозлар, термостат, сув ҳаммоми, ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Фермент манбаини тайёрлаш. 1—2 г ҳайвон жигари яхшилаб қондан тозаланади ва чинни ҳовончада шиша кум билан эзилади. Қиймага 1:20 нисбатда суюлтирилган калий фосфат буферидан 2 мл солинади. Экстракт яхшилаб аралаштириладида филтрдан ўтказилади. Фильтр остидаги суюклик фермент манбаи сифатида ишлатилади.

2. Ферментатив реакция ўтказиш. Учта пробиркада 38- жадвалга мувофиқ инкубацион аралашма тайёрланади.

38- ж а д в а л

Тажриба пробиркалари	Калий фосфат буфери, мл	Гистидин эритмаси, мл	Фермент манбаи, мл
Текширув	1,7	0,5	0,15
1- назорат	1,85	—	0,15
2- назорат	1,7	—	0,15

Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб, 20 дақиқа 37°С ли термостат ёки сув ҳаммомига қўйилади. Бир оз вақт ўтгач иккинчи назорат пробиркасига 0,15 мл гистидин эритмаси солинади. Ферментатив реакцияни тўхтатиш учун барча пробиркаларга 0,6 мл ацетат буфер эритмаси солиб аралаштирилади ва пробиркалар қайнаб турган сув ҳаммомига 5—10 дақиқага жойлаштирилади. Сўнгра пробиркалардаги суюқликлар филтрдан ўтказилади.

3. Фермент фаоллигини ўлчаш. Ҳар қайси тажриба пробиркаларида алоҳида-алоҳида 0,5 мл дан филтрат олиб, устига 0,5 мл этил спирти ва 0,6 мл диазореактив солинади ва эритмалар аралаштирилади. Сарик-ковок ранг ҳосил бўлади. Унинг зичлиги ФЭК нинг 450—480 нм тўлқин узунлигида (кўк нур филтри) иккинчи назорат эритмаси қаршида ўлчанади.

4. Гистидаза фаоллигини ҳисоблаш. Топилган оптик зичлик бўйича гистидиннинг миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизиғидан топилади. Ўлчов эгри чизиғи гистидиннинг турли миқдори учун оптик зичлик

топилиши билан тузилади. Ордината ўқига гистидиннинг нмоль да ифодаланган микдори, абсциссага — оптик зичлик келтирилади.

Ўлчов эгри чизиғи ураканин кислотанинг турли микдори учун ҳам тузилиши мумкин.

Фермент фаоллигини ҳисоблаш учун намуна: назорат пробиркада субстрат кам ёки мутлок парчаланмай қолади. Ферментатив реакция ўтказилган текширувда эса субстратнинг маълум микдори парчаланган. Демак, назорат кўрсаткичидан текширув кўрсаткичининг айирмаси топилади. Масалан, назорат тажрибанинг оптик зичлиги 0,50, ўлчов эгри чизиғи бўйича у 72 нмоль гистидинга тенг бўлса, текширув тажрибанинг оптик зичлиги 0,30, у 45 нмольга тенг. Демак, унинг айирмаси 27 нмольга тенг. Ферментнинг солиштирма фаоллигини аниқлаш учун шу фермент таркибидаги оксил микдори топилади ва оксил мг ҳисобида олинади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, ўлчов эгри чизиғини, фермент фаоллигини ҳисобланг ва унинг натижасини дафтарингизга ёзинг. Ушбу ферментнинг фаоллигини аниқлашнинг аҳамияти ҳақида тегишли хулоса чиқаринг ва дафтарингизга ёзинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Ферментларнинг таъсир килиш назариялари.
2. Биокатализдаги энергетик тўсик ва фаолланиш энергиясининг аҳамияти.
3. Коферментлар, металл ионлари ва кофакторларнинг ферментатив реакциялардаги аҳамияти.
4. Ферментларнинг фаол маркази ва уларнинг биологик вазифалари.
5. Ферментларнинг ўзига хослиги — субстратга нисбатан танланувчанлиги, турлари ва уларнинг аҳамияти.
6. Ферментларнинг фаоллигига таъсир қилувчи омиллар: рН муҳит, ҳарорат, ион кучи, активатор ва ингибиторлар, субстрат ва фермент микдори.
7. Фермент фаоллигининг қайтар, қайтмас, рақобатли, рақобатсиз ҳолда сусайиши (ингибиторланиши).
8. Фермент фаоллигини ўлчаш бирликлари.
9. Ферментларнинг синфланиши, катализлайдиган реакциялари.
10. Мультимолекуляр ферментлар системаси (пируватдегидрогеназа, цитратсинтаза, глутаматдегидрогеназа ва ҳоказо).
11. Ферментларнинг аъзоларга хослиги. Турли касалликларда улар фаоллигининг қон зардобда ўзгариши ва касалликларни аниқлашдаги аҳамияти.
12. Бирламчи энзимопатиялар; ферментларнинг ирсий етишмовчилиги.
13. Ферментлар етишмовчилигида витаминлар, нуклеотидлар, гем ва металлларнинг аҳамияти.

14. Ферментлар фаоллигининг бошқарилиши. Аллостерик бошқарилиш. Бошқарилишнинг узга йуллари.
15. Изоферментлар ва уларнинг ахамияти.
16. Ферментлар ва уларнинг ингибиторларидан тиббиётда фойдаланиш.

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Суюқлик таркибида амилаза, пепсин ва трипсин ферментлари бор. Ушбу ферментларни қандай қилиб аниқлаш мумкин?
2. Оксилларни, карбонсувларни, ёғларни оддий моддаларгача парчалаш учун қандай ферментлардан фойдаланиш мумкин? Ферментларнинг таъсир механизмини тушунтиринг.
3. Меъда шираси таркибида хлорид кислота камайган беморга (анацид, гипоцид, гастрит) тузланган қарам, помидор, бодринг, сирка эссенциясини истеъмол қилиш тавсия қилинади. Бунинг сабабини тушунтиринг.
4. Бемор жигар касаллиги билан оғриган деб гумонсираган, шифокор қандай йул билан фикрINI тасдиқлаши мумкин?
5. Шифохонада даволанаётган бемор қонида лактатдегидрогеназа (ЛДГ) ферментининг фаоллиги ошганлиги аниқланди. Бу жигар, юрак, буйрак хасталиклари учун хос. Қасалликни аниқлаш учун қандай замонавий усуллардан фойдаланиш мумкин?
6. Ўрта ёшли кишининг юраги атрофида қаттиқ оғрик пайдо бўлди. У шифохонага келтирилди. Миокард инфаркти касаллигини аниқлаш учун хасталикнинг биринчи соатларида қандай фермент аниқланиши мумкин.
7. Бемор сийдигида амилаза ферментининг фаоллиги бирмунча ошганлиги аниқланди. Буни қандай изоҳлаш ва қандай касаллик туғрисида фикр юритиш мумкин?
8. Шифохонада даволанаётган бемор сийдигида трансаминаза ферменти ошганлиги кузатилди. Буни қандай изоҳлаш ва қандай касаллик ҳақида фикр юритиш мумкин?
9. Меъда ости беzi яллиғланган (панкреатит) беморга трасилол берилди. Бу қандай дори, унинг таъсири қандай?
10. Бемор қон зардобиди аргиназа ва гистидаза ферментларининг фаоллиги ошганлиги маълум бўлди. Шифокор қандай касаллик туғрисида фикр юритиши керак?

IV БЎЛИМ

ГОРМОНЛАР

Гормонлар одам ва ҳайвонларнинг аъзоларидаги махсус безлардан ишланиб чиқиб, бевосита қон оқимиға қуйилади. Гормон юнонча *hormon* — сўзидан олинган бўлиб, қўзғотаман, уйғотаман деган маънони англатади. Улар тўқима, аъзолар ва бутун организмда кечадиган моддалар алмашинувини, кўпайиш, ўсиш каби функционал ҳолатларни бир меъёрга солиб турадиган фаол органик моддалардир. Ички эндокрин без фаолияти марказий нерв системаси (МНС) томонидан бошқариб турилади.

Гормонлар кимёвий табиати жиҳатидан шартли равишда қуйидаги гуруҳларга бўлинади.

1. Оксил ва пептид табиатли гормонлар. Буларга гипоталамус гормонлари (тиролиберин, люлиберин, само-тастатин ва бошқалар), гипофиз гормонлари (ўсиш гормонлари, фолликулаларни жадаллаштирувчи гормон, лютеинловчи гормон, пролактин, тиреотроп, адренотроп, гонадотроп, меланотроп гормонлари, вазопрессин ва окситоцин), меъда-ости бези гормонлари (инсулин, глюкогон), қалқонсимон без олди гормони (паратгормон), қалқонсимон без гормони (кальцитонин) киради.

2. Аминокислота маҳсули бўлган гормонлар. Буларга буйрак усти безининг мағиз кисмидан ажралувчи гормонлар (адреналин, норадреналин) ва қалқонсимон без гормонлари (тироксин, трийодтиронин) киради.

3. Стероид гормонлар. Бу гуруҳга буйрак усти безининг пўстлоқ кисмидан ажралувчи гормонлар (глюкокортикоидлар, минералокортикоидлар), жинсий без гормонлари (андрогенлар, экстрогенлар) киради.

4. Гормоноид моддалар. Айрим тўқима ва хужайраларда гормонларга ўхшаш моддалар (простагландинлар, гистамин, серотонин ва ҳоказо) ишлаб чиқарилади. Улар маҳаллий таъсир кўрсатади.

Махсус хужайраларда, ички секреция безларида ҳосил бўлган гормонлар йиғилмасдан бевосита қон оқимида куйилади ва қон плазмаси оксиллари ёки қон элементлари билан бирикади. Бундай шаклда боғланган гормонлар унча фаол бўлмайди. Улар қон оқими билан муайян хужайраларга етказилади ва тегишли рецепторлар билан комплекс бирикма ҳосил қилиб, қатор мураккаб биокимёвий ўзгаришларни содир қилади.

Рецепторлар табиати жиҳатидан оксил, кўпинча глюкопротеид бўлиб, у хужайра мембранасида ёки цитоплазмасида жойлашган. Гормон рецепторлари махсус танланувчанлик хоссасига эга бўлиб, биокимёвий ўзгаришларга сабабчи бўладилар. Рецептор ва гормоннинг ўзаро бирикиши қайтар бўлиши мумкин. Гормонлар рецептор билан ўзаро таъсирланишига кўра икки гуруҳга бўлинади.

1. Хужайрага киролмайдиган, протоплазма мембранасининг ташки кисмидаги рецептор билан ўзаро таъсирланадиган гормонлар. Буларга барча оксил, пептид табиатига эга бўлган гормонлар ва катехоламинлар киради. Ушбу гормонлар айрим моддалар — глюкоза ва аминокислоталар учун хужайра мембранаси ўтказувчанлигини оширади. Аллостерик таъсир кўрсатиш йўли билан фермент фаоллигини бошқаради.

2. Хужайра ичига кира оладиган, цитоплазма рецепторлари билан ўзаро таъсириланадиган гормонларга тиреоидлар ва стероидлар киради. Бундай гормонлар хужайра ядросининг генетик аппаратига таъсир кўрсатиб, ферментларнинг синтезини уларнинг оксил қисми ва коферментларини (ёки ферментларнинг парчаланишини) бошқариб туради.

Шуни эсда тутиш керакки, ички секреция безларининг ривожланиши ва фаолиятининг шаклланиши узок вақт давом этади. Бу турли ёшдаги болаларда турлича кечади. Бола туғилгандан кейинги биринчи кунларда ўсиш гормони, инсулин ва катехоламинларнинг миқдори нисбатан юкори бўлиб, кортикостероидларнинг миқдори камроқ эканлиги аниқланган. Бола эмизуқли даврида унинг қалқонсимон ва буқоқ безлари жуда тез ривожланади ва у 6—7 ёшга киргунча давом этади. 7 ёшдан 16 ёшгача жинсий безлар фаолияти ривожланади. Бу вақтда гипофизнинг фаоллиги ошиб, гонадотроп гормонларнинг ишлаб чиқарилиши кучаяди. Буйрак усти безининг пўстлоқ қисмидан эса андроген, кортикостероидларнинг ишлаб чиқарилиши ортади.

Гормонларнинг таъсири махсус механизмлар орқали тўхтатилади. Улар гормон рецепторнинг қайта бирикишини таъминлайди. Гормонларнинг парчаланиши эса жигар хужайраларида амалга оширилади.

Ички секреция безлари фаолиятининг ошиши (гиперфункция), камайиши (гипофункция), гормонлар парчаланишининг жадаллашуви ёки рецепторлар фаолиятининг бузилиши натижасида организмда физиологик ўзгаришлар содир бўлади. Бирор без фаолиятининг бузилиши бошқа безларнинг ҳам фаолияти бузилишига олиб келади. Гормонлар у ёки бу моддалар алмашинувига таъсири жиҳатидан маълум нисбатда (антогонист ёки синергист) бўлиши туфайли, уларнинг нисбатлари ўзгариши натижасида касаллик (патологик) ҳолати содир бўлади.

Кўпчилик гормонлар ҳозирги вақтда эндокрин ва эндокрин бўлмаган касалликларни даволашда қўлланади.

Бўлимнинг мақсади:

1. Гормонларнинг модда алмашинув жараёнларини бошқаришдаги ўрни ва таъсир механизмини тушунтириш.

2. Эндокрин касалликларининг келиб чиқиш сабаблари ва механизмини тушунтириш. Қасалликни аниқлашда қўлланиладиган усуллар ва улардан фойдаланишда гормонларнинг тузилиши билан таништириш.

3. Гормонларни очиш ва миқдорини ўлчаш усулларини

ўргатиш ва келажакда ундан фойдалана олиш йўллари ни тушунтириш.

4. Эндокрин ва бошқа касалликларда гормонлардан фойдаланиш йўллари ни ўргатиш.

ГОРМОНЛАРДА ЎТҚАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯЛАР ВА УЛАРНИНГ МИҚДОРИНИ ЎЛЧАШ

Гормонларни ўрганишда ва аниқлашда икки хил йўлдан фойдаланилади: биологик (хайвонларда ўтказиладиган тажрибалар билан), кимёвий (у ёки бу гормонда ўтказиладиган рангли реакция ёрдамида).

Гормонларни очадиган сифат реакциялар ўтказишдан олдин куйидаги жадвални тулдириш.

39- ж а д в а л

Ички секреция безлари ва уларнинг гормонлари

Ички секреция безларининг номи	Ажраладиган гормоннинг номи	Гормоннинг кимёвий табиати	Рецепторнинг жойланиши	Кўрсатилган таъсири	Аниқландиган реакция номи

1. МЕЪДА ОСТИ БЕЗИ ГОРМОНИ — ИНСУЛИН

Меъда ости безининг Лангерганс оролчаларидаги β — хужайраларидан ишланиб чиққан проинсулиндан инсулин ҳосил бўлади. Бу гормон оксил табиатига эга бўлиб, иккита полипептид занжирдан иборат. Биринчи полипептид занжир 21 та, иккинчиси 30 та аминокислотадан ташкил топган. Полипептид занжирлари олтингугурт (дисульфид) кўприкчалари орқали боғланган.

Инсулиннинг модда алмашинувига таъсири турлича. Унинг аҳамияти углевод алмашинувида айниқса каттадир. Инсулин глюкоза ва аминокислоталарни хужайрага ўтиши учун мембраналарнинг ўтказувчанлигини оширади. Қон таркибидаги қанд миқдори ни меъёрида ушлаб турилишини таъминлайди. Глюкозани фаол ҳолатга — глюкоза 6- фосфатга айланишида иштирок этувчи глюкокиназа (гексокиназа) ферменти фаоллигини оширади. Жигар ва мушакларда гликоген синтезини жадаллаштиради. Углеводлардан ёғ ҳосил бўлишини (липогенез), глюкозо-6 фосфатни апотомик йўлига кириб оксидланишини ва

НАДФН дан ёғ кислоталари ҳосил бўлишини ҳамда айлана йўл билан оксидловчи фосфорланишни тезлатишда фойдаланилади.

Инсулин адреналиннинг антагонистидир. Минерал тузлар алмашинувида қон таркибидаги фосфатларни ва калийни камайтириб, хужайраларни калий билан бойтади. Инсулин етишмовчилиги қандли диабет касаллигига олиб келади.

Инсулин ичакда протеолитик ферментлар таъсирида тез парчаланadi. Шунинг учун инсулин тери остига юборилади. Қандли диабет касаллигини даволашда инсулин кенг қўламда қўлланилади.

Инсулинни аниқлашда унинг оксил табиатидан фойдаланилади. Оксилларга хос бўлган барча реакциялар инсулин учун ҳам хосдир.

59-иш. ИНСУЛИННИНГ ОКСИЛ ТАБИАТИНИ ТАСДИҚЛОВЧИ СИФАТ РЕАКЦИЯЛАР

Текширилувчи материал: инсулин эритмаси.

Реактивлар: натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, мис (II) сульфатнинг 1% ли эритмаси, Миллон реактиви, кўрғошин ацетатнинг 5% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Биурет реакцияси. 1 мл инсулин эритмасига 5—6 томчи натрий гидроксид эритмаси ва 1—2 томчи мис (II) сульфат эритмасидан солиб аралаштирилади. Эритма пушти-сиёҳ рангга киради.

2. Миллон реакцияси. 5—10 томчи инсулин эритмасига 2—3 томчи Миллон реактивидан солиб аста-секин қиздирилади. Қизил рангли чўкма ҳосил бўлади.

3. Фоли реакцияси. 5—10 томчи инсулин эритмасига 2—3 мл натрий гидроксид эритмасидан ва 2—3 томчи 5% ли кўрғошин ацетатдан солиб паст-хароратда 10 дақиқа қиздирилади. Эритма совитилгач 1—2 томчи натрий гидроксид эритмасидан қўшилади. Эритма сарик рангга киради.

4. Геллер реакцияси. 10 томчи концентрланган нитрат кислота солинган пробиркага баробар ҳажмда (10 томчи) инсулин эритмаси девор бўйлаб солинади. Пробирка 45° га эгилган ҳолатда ушланади. Икки эритма оралиғида оқ (узук каби) халқа ҳосил бўлганлиги кузатилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Кузатилган натижалар куйидаги жадвалга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

Таърибанинг номи	Очиладиган реактив	Ишлатилган реактивлар	Кузатиш раъги	Хулоса

2. ҚАЛҚОНСИМОН БЕЗ ГОРМОНЛАРИ

Қалқонсимон без кучли гормонал фаолликка эга бўлган тироксинни ишлаб чиқаради. Унинг таркибида 70% дан ортиқ йод сақланади. Ушбу без шунингдек 0,2—0,9% йод тутган, гормонал фаолликка эга бўлган оксил табиатли модда — йодтиреоглобулин, учйодтиронин ва иккйодтиронинларни кам микдорда ажратади. Йодтиреоглобулин қон таркибида учрамайди. Улар қалқонсимон безнинг протеолитик ферментлари таъсирида парчаланганидан сўнг тироксин ва уч йодтиронин шаклида қонга тушади.

Қалқонсимон без фаолиятининг ортиши ёки сусайиши (гипер-, гипофункция) организмда асосий модда алмашинувининг ўзгаришига сабаб бўлади.

Қалқонсимон без фаоллигининг пасайиши йодтирониннинг микдори камайишига, асосий модда алмашинувининг ва тана ҳароратининг пасайишига олиб келади. Гипофункция ёшлиқдан бошланса, боланинг ўсиши сусаяди ва тана ривожланишининг мутаносиблиги бузилади. Бундай касаллик кретинизм деб аталади. Қатта ёшдагиларда эса микседема кузатилади. Йодтиронин етишмаслигининг яна бир тури эндемик буқокдир. Бу ҳолат йод етишмаслигидан содир бўлади. Касаллик асосий модда алмашинуви жараёнининг пасайиши билан ифодаланади.

Қалқонсимон безнинг гиперфункцияси кенг тарқалган базедов касаллигини содир қилади. Бунда қалқонсимон безнинг катталиги, йодтиреоглобулиннинг синтези ортиши, қон таркибидаги йодтиреоглобулинлар микдорининг 2—5 марта ортиши кузатилади. Бу касалликда ҳам парчаланиш (катаболизм), ҳам синтезланиш (анаболизм) жараёнларининг баравар равишда кучайиши кузатилади. Катаболизм анаболизмга нисбатан устунлик қилади. Беморнинг вазни камаяди. Йодтиронинлар турли аъзо хужайраларидаги айрим генлар транскрипциясини жадаллаштириши туфайли оксил синтезини оширади. Бундай ҳолат маълум даражада энергия сарфланишига сабаб бўлади. Натрий, калийга боғлиқ АТФ- азаларнинг микдо-

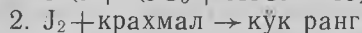
ри ортади. АТФ сарфланишининг ортиши натижасида озика маҳсулотларининг парчаланиш жараёни жадаллашади ва АТФ синтезининг кучайишига сабаб бўлади. Тиреоксикоз билан оғриган беморларнинг асосий модда алмашинуви соғлом кишиларга нисбатан 30—60% га ошган бўлади.

Қалқонсимон без — тиреокальцитонин қонда кальций миқдорини камайтирувчи гормонни ҳам ишлаб чиқаради. Қалқонсимон без гормонлари тиббиётда беморларни даволашда кенг қўлланилади.

60-иш. ТИРЕОИДИН ТАРҚИБИДАГИ ЙОДНИ АНИҚЛАШ

Тироксинни ишқорий муҳитда гидролизлаш натижасида калий йодид ҳосил бўлади. Унга калий йодад таъсир эттирилганда йод ажралади. Ажралган йодни крахмал таъсирида ҳосил бўлган кўк рангдан билиш мумкин.

Ушбу кимёвий реакция тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: тиреоид таблеткалари.

Реактивлар: калий карбонатнинг 10% ли эритмаси, сульфат кислотанинг 10% ли эритмаси, крахмалнинг 1% ли эритмаси, калий йодиднинг (KJO_3) 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар ва штативлар, пипеткалар, чинни ховонча, кум ҳаммоми, лакмус қоғози.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Тиреоиднинг битта таблеткаси чинни ховончада эзилади. Куқун пробиркага олиниб, устига 3 мл калий карбонат эритмаси солинади ва аралаштирилади. Сўнгра пробирканинг устини ёпиб қум ҳаммомида 10—15 дақиқа қайнатилади. Тироксин гидролизлангандан кейин гидролизат совитилади ва сульфат кислота билан нейтралланади.

2. Гидролизат лакмус бўйича кучсиз кислотали ҳолатга келтирилади. Унга бир томчи крахмал эритмаси, 1—2 томчи калий йодид эритмасидан солиб аралаштирилади. Суюқлик йод ажралган тақдирдагина кўк рангга қиради.

Олинган натижани расмийлаштириш. Тироксин таркибидаги йодни аниқлаш усулининг нимага асослинишни ва қандай касалликларда унинг миқдори ўзгаришини, олинган натижани дафтарингизга ёзинг.

3. БУЙРАК УСТИ БЕЗИНИНГ МАҒИЗ ҚИСМИ ГОРМОНЛАРИ, АДРЕНАЛИН ВА НОРАДРЕНАЛИН

Адреналин ва норадреналин буйрак усти безининг мағиз қисмида фенилаланин ва тирозин аминокислоталаридан ҳосил бўлиб, хромаффин пуфакчаларида тўпланади. Норадреналин симпатик нерв толалари учида ажралиб, постсинаптик ҳужайраларга таъсир килувчи нейромедиатордир. Адреналин гипоталамусдаги нерв учларида секреция қилинади. Бу гормонлар қон томирларини қисқартириб, қон босимини кўтариш ва юрак уришини тезлатиш хусусиятига эга. Улар таъсирида организм одатдан ташқари қўзғалган ҳолатга келиши мумкин.

Адреналин гипофизнинг олд бўлагидан ажраладиган АКТГ, меъда ости безининг α -ҳужайраларидан ажраладиган глюкагон гормонлари каби мускуллардаги гликогеннинг парчаланишини тезлатиб, қонда глюкоза, мускулларда эса сут кислота миқдорини оширади. Адреналиннинг карбонсув алмашинувига таъсири тез амалга оширилади. Шу билан у юқоридаги гормонлардан фарқ қилади.

АКТГ (гипофизнинг олди бўлаги гормони) гликоген парчаланишини жадаллаштиради. Унинг таъсирини жигар, мушак, буйрак усти безининг фаолсиз фосфорилаза «в»ни фаол фосфорилаза «а»га айлантиришдан иборат. Ушбу ферментларнинг фаолланиши аденилатциклаза системаси орқали амалга оширилади.

Соғлом одам венасидаги қонда адреналин 0,04 мкг %, норадреналин 0,2 мкг % ни ташкил қилади. Қатта ёшдаги кишилар сийдигининг суткалик миқдорида 13,3 мкг адреналин ва 79,8 мкг гача норадреналин бўлади. Ёш болаларда эса 0,6—2, 1 мкг адреналин ва 3,8—19, 3 мкг норадреналин бўлиши кузатилади.

Айрим касалликларда, масалан фенилпируозум олигофрениясида (фенилаланин тирозинга айланмай фенилпируозум кислота ҳолатида сийдик билан ажралади) катехоламинларнинг қондаги миқдори соғлом кишиларникига нисбатан камаяди.

Мушаклар меъеридан ортик ишлаганда, инсулин гипогликемиясида, гипертиреоз ҳолатида, Иценко-Кушинг синдромида (кортизон миқдорининг ортиши), буйрак касалликларида катехоламинларнинг миқдори нисбатан ортади.

Феохромоцитома — буйрак усти безининг мағиз қисми ўсмаси касаллигида беморнинг сийдиги таркибида катехоламинларнинг миқдори кескин ортади. Адреналин меъда-

ичак ферментлари таъсирида тез парчаланadi. Шунинг учун даволаш мақсадида адреналин тери ости ёки мушак орасига юборилади.

6 1 - и ш . АДРЕНАЛИНГА ЎТҚАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯЛАР

Адреналин ва норадреналинларнинг пирокатехин ҳалқаси темир (III) хлорид ионлари билан фенолят бирикмаларини ҳосил қилиши натижасида яшил ранг найдо, бўлади. Шунингдек, адреналин ва норадреналин diaзореактив билан азобўёқ ҳосил қилиб рангининг ўзгаришига олиб келади.

Текширилувчи материал: 1:1000 адреналин эритмаси.

Реактивлар. Темир (III) хлориднинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, калий йодиднинг 10% ли эритмаси, сирка кислотанинг 10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар ва пилеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Темир (III) хлорид билан ўтказиладиган реакция. Пробиркага 3 томчи адреналин, бир томчи темир (III) хлорид эритмаси солиб аралаштирилади. Эритма яшил рангга киради. Бир томчи натрий гидроксид эритмаси томизилганда эритма кизаради.

2. Адреналинга ўтказиладиган diaзореакция. Пробиркага 2—3 томчи адреналин эритмаси, 2 томчи калий йодид ва 2 томчи сирка кислота солиб аралаштирилади ва бир оз киздирилади. Шунда суюқлик кизғиш бинафша рангга киради.

Олинган натижани расмийлаштиринг. Дафтарингизга усулнинг асосланишини ва натижасини ёзинг. Қайси касалликларда адреналин ва норадреналиннинг миқдори ўзгаради.

6 2 - и ш . ОКСИДЛАНГАН АДРЕНАЛИННИНГ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯСИ

Усулнинг асосланиши. Адреналин ҳаво кислороди таъсирида оксидланади ва ишқор таъсирида флюоресценцияланган маҳсулотларни ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: 0,1% ли адреналин эритмаси.

Реактивлар: 10% ли натрий гидроксид эритмаси.

Керакли анжомлар: флюороскоп, пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркага ўн томчи сув, 6 томчи 10% ли натрий гидроксид ва 6 томчи адреналин эритмаси солиб аралаштирилади. Ҳосил бўлган яшил рангли махсулот флюороскопда кўрилади.

Олинган натижани расмийлаштинг.

63-и ш. СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ АДРЕНАЛИН ВА НОРАДРЕНАЛИН МИҚДОРИНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асосланиши. Айрим моддалар ультраби-нафша нур таъсирида нурланиб, ўзи нур тарата бошдайти (флюоресценцияланади), яъни у нурланишнинг янги манбаи бўлиб қолади. Бу махсус асбоб — флюореметр орқали аниқланади. Флюоресценциянинг шиддати модданинг эритмадаги миқдорига тўғри пропорционал бўлиб, аниқланаётган модданинг миқдори флюоресценция қиймати билан ўлчанади. Усулни бажаришдан мақсад адреналин ва норадреналинни алюмин оксид билан (рН 8,4) адсорбциялаб, сирка кислота билан ажратилади ва калий ферроционид таъсирида адренохром билан оксидланиб норадренохромга айланади. Адренохром ва норадренохром ишқор ва аскорбин кислота билан қайтарилади ва флюоресценцияланувчи моддалар (лютинлар) ҳосил бўлади. Доимий (стандарт) ва текширув тажрибалар учун бир хил ишқор қўлланилади. Ҳар хил ишқор қўлланилганда турлича флюоресценцияланиш ҳолатлари кузатилиши мумкин. Адренолютин ва норадренолютин орасидаги флюоресценцияланиш улар энг юқори кўзғолганда кузатилади. рН — 4,2 да элюатдаги адреналин, рН — 6,2 да эса адреналин ва норадреналинлар аниқланади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: трилон Б нинг 0,5 ва 1% ли эритмаси, аммиак эритмаси (5 мл дистилланган сувга бир томчи 0,5% ли аммиак, 8,0 гача рН қушилади), натрий гидроксиднинг 5% ли эритмаси, сирка кислотанинг 0,25% ли эритмаси (концентрланган сирка кислотадан тайёрланади), рН и 4,2 ва 6,2 бўлган 0,1 М ли фосфат буфер эритмаси, калий ферроциониднинг ($K_3[Fe(CN)_6]$) 0,25% ли эритмаси, 0,2% ли аскорбин кислота эритмаси, алюмин оксиднинг калий хлорид билан ишлов берилган шакли, битартарат адреналин ва норадреналин кристаллари, натрий тиосульфат ва натрий фторид тузлари.

Керакли анжомлар. ЭФ — 3М флюориметри, сезувчанлигини ўн баробар оширадиган асбоб, бирламчи нур фильтри В₁ — 1, ўтказиш максимуми 436 нм. иккиламчи нур фильтри В₂ — 2, ўтказувчанлик максимуми 530 нм. хроматография устуни, 50,100 мл ли ўлчов колбалари, 50 мл ли Эрленмеер колбачалари, 10 мл ли центрифуга пробиркалари, оддий пробиркалар, шиша воронка ва таёқчалар, 1—10 мл ли ўлчов пипеткалари, рН и 7,4—8,8 бўлган «Рифан» индикатори, универсал индикаторлар, дақиқасига 4000 марта айланадиган центрифуга, фильтр қоғозлар.

Бажариладиган иш тартиби. Янги йиғилган сийдикка (катехоламинларни оксидланишдан сақлаш учун) 200 мг тиосульфат ва 2:1 нисбатда натрий фторид солинади. Сўнгра 50 мл ли колбага 17,5 мл сийдик ўлчаб солинади ва кайнаш даражасига келгунча қиздирилади. Аралашма курук колбага филтрдан ўтказилади. Унга 250 мг трилон Б дан (оксидланишдан сақлаш учун) солиб, эригунча аралаштирилади. Эритманинг рН муҳити 1 н. аммиак эритмаси томизиш билан 8,2—8,4 га етказилади. Муҳит «Рифан» индикатори ёрдамида аниқланади. Бунинг учун аралашма шиша таёкча ёрдамида индикаторга томизилади. Катехоламиннинг алюмин оксид билан адсорбцияланиши учун одатда махсус беркитгичли шиша устундан фойдаланилади (шлифланган колонка). Амалий машғулотлар учун эса шиша устунлар ўрнига алюмин оксид солинган кенг пробиркалар ишлатилиши мумкин.

2. Шиша устунларни тайёрлаш. Адреналин ва норадреналинни адсорбциялаш. Шиша устун тубига шиша пахта қўйилади ва устуннинг жўмраги берк турган ҳолда 1 г алюмин оксид (Al_2O_3) солинади ва устуннинг учи колбага туширилади. Алюмин оксиддан олдин 10 мл бидистилланган сув, сўнгра рН муҳити 8,2 га етказилган сийдик ўтказилади. 1—2 мл сийдикнинг бир дақиқа ичида устунчадан ўтиш тезлиги жўмрак билан сув орқали бошқарилади. Сийдик устундан ўтказилгач, адсорбент 5 мл аммиакли сув билан (2,5 мл дан) икки марта ювилади. Худди шу сув билан нейтралланган сийдик филтрати солинган колба чайилади. Устун ичида қолган сув қолдиклари филтёр коғоз бўлакчалари ёрдамида олиб ташланади.

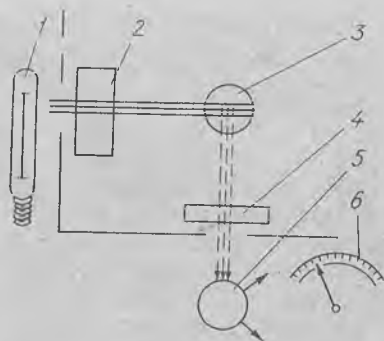
3. Адреналин ва норадреналинни алюмин оксиддан ажратиш (элюациялаш). Адреналин ва норадреналинни алюмин оксиддан ажратиш учун 0,25 н. сирка кислотанинг 3,5 мл си иккига бўлиб ишлатилади. Аввал устуннинг жўмраги ёпиқ ҳолда сирка кислота устунга солинади ва шиша таёкча билан алюмин оксидга аралаштирилади ва чўктирилади. Чўкма тушгандан (3—5 дақиқадан) сўнгра устуннинг жўмраги очилиб, ажралма (элюат) центрифуга пробиркасига йиғилади. Сирка кислотанинг иккинчи қисми устундан ўтказилганда алюмин оксид билан аралаштирилмайди. Ажратилаётган ажралма (элюат), биринчи ажратилган элюат устига йиғилади. Элюатнинг умумий микдори 0,25 н. сирка кислота билан 7 мл га етказилади.

4. Лютеинларнинг ҳосил бўлиши (адренолютин ва норадренолютин).

Йиғилган элюатнинг муҳити (совуқ ҳароратда) рНи

12-расм. Флюорометрнинг тузилиш схемаси.

1-нур манбаи, кварц лампа; 2-бирламчи нур фильтри; 3-тажриба эритмаси солинган пробирка; 4-иккиламчи нур фильтри; 5-нур қабул қилувчи асбоб; 6-ўлчов асбоби.

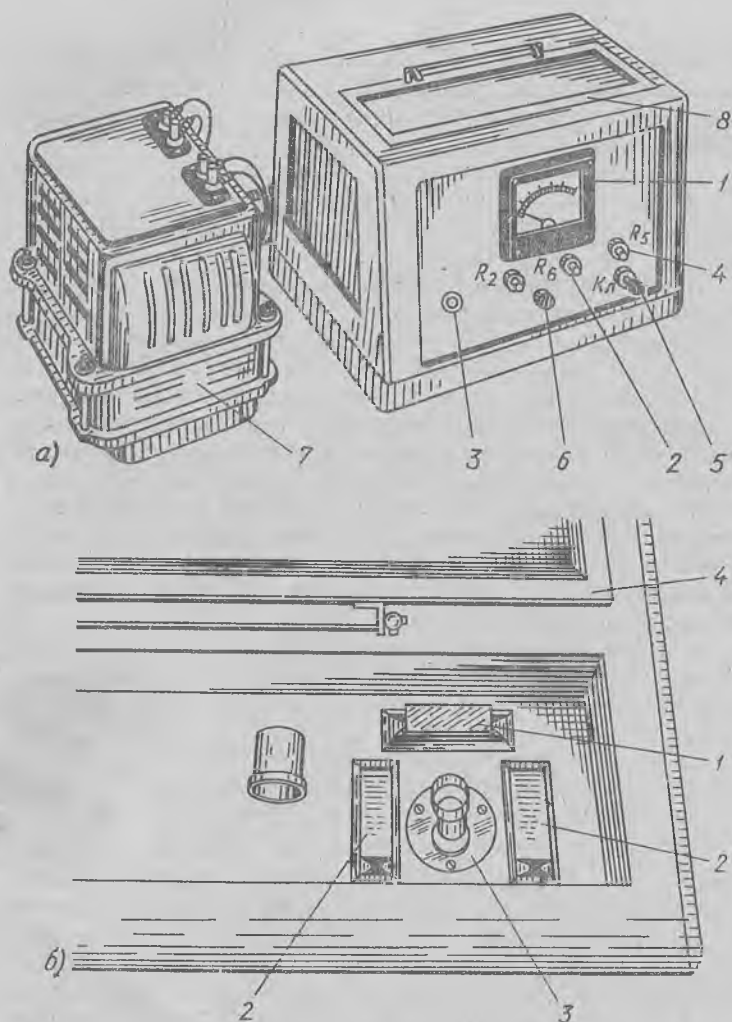


1 н аммоний гидроксид билан 4,2 га етказилади. Мухит майда бўлакчаларга қирқилган универсал индикатор ёрдамида текширилади. Шундан сўнг тажриба учун иккита текширув ва иккита назорат пробиркалари тайёрланади. Уларга рН и 4,2 бўлган фосфат буферидан солинади ва устига 1 мл дан нейтралланган элюат қуйилади. Қолган элюат рН муҳити 6,2 га аммоний гидроксид билан етказилади-да юқоридагидек текширув ва назорат пробиркаларига 1 мл дан солинади. 1 мл элюатни нейтраллаш учун сарфланган аммоний гидроксид микдорини ҳисобга олинг. рН и 6,2 бўлган элюат таркибидаги адреналин ва норадреналин микдорини аниқланг. Иш давомида иккита текширув пробиркасига 0,25% ли калий ферроционид эритмасидан 0,1 мл дан солиб аралаштирилади ва тўрт дақиқа қолдирилади. Шундан сўнг тўрттала (текширув ва назорат) пробиркага 0,25% ли аскорбин кислотадан 1 мл солиб аралаштирилади-да яна 4 дақиқа қолдирилади. Барча пробиркалардаги суяқликларнинг ҳажми бидистилланган сув билан 10 мл га етказилади, назорат тажриба пробиркаларига 0,25% ли калий ферроционид¹ эритмасидан 0,1 мл дан солинади. Пробиркалар муз солинган сувли идишга жойлаштирилади ва икки дақиқа ўтгандан сўнг флюориметрланади (12,13-расмлар). Шундан эслатиш керакки, 30 дақиқадан сўнг флюоресценция даражаси пасаяди.

Доимий (стандарт) эритмалар. Адреналин ва норадреналиннинг асосий доимий эритмаси 1:200 тайёрланади (эритмалар паст ҳароратда), совитгичда бир ойгача ўз фаоллигини сақлайди.

Адреналин ёки норадреналиннинг доимий эритмаси

¹ Назорат тажрибадаги адреналин ва норадреналин ишқор ва аскорбин кислота иштирокида оксидланмайди.



13-расм. Электрон флюороскопнинг умумий кўриниши:

а-ташки кўриниши; 1-гальванометр; 2-реостат дастаси; 3-реостат тугмаси ва дастаси, R_2 ; 4-реостат дастаси; R_5 ; 5-клаввиш копки; 6-диафрагма дастаси; 7-стабилизатор; 8-копқок. б-юқоридаги кўриниши. 1-бирламчи нур фильтри учун уяча; 2-иккиламчи нур фильтри учун уячалар; 3-эритма солинган кювета; 4-копқок.

25 мл да 5 мг тутиши керак (1 мл эритмада 200 мг адреналин ёки норадреналин эриган бўлиши керак). Бунинг учун адреналин битартаратнинг 9,1 мг, норадреналин битартаратнинг 10 мг си водород хлориднинг 4 томчи

1н. эритмасида эритилиб ҳажми бидистилланган сув билан 25 мл га етказилади (адреналин ва норадреналин алохида тайёрланади) 1. Асосий эритмалардан ишчи эритмалар тайёрланади.

1. Адреналиннинг моляр массаси 183, адреналин битартратнинг моляр массаси эса 354; норадреналиннинг моляр массаси 168, норадреналин битартратнинг моль массаси эса 339, 2 га тенг.

Ишчи эритмаларни тайёрлаш. Адреналин ва норадреналиннинг асосий доимий эритмасидан 0,2 мл олиб ҳажми бидистилланган сув билан 50 мл га етказилади. Ишчи эритманинг 1 мл сида 0,8 мкг гормон бўлади. Адреналин ва норадреналиннинг доимий (стандарт) эритмаси тажрибадагидек ишкорий муҳитда ферроционид билан оксидланади. Тажриба суюкликларининг ҳажми бидистилланган сув билан 10 мл га етказилади. Ушбу эритманинг 1 мл сидаги адреналин ва норадреналин миқдори 0,008 мкг ёки 8 нг ни ташкил қилади. Пробиркалар икки дақиқа музга жойлаштирилиб сўнг флюориметрланади. 1 нг адреналин ва норадреналин учун флюориметр кўрсаткичи қуйидагича ҳисобланади.

1 нг/мл доимий адреналин

$$\frac{\text{pH} - 4,2 \text{ да назорат тажриба флюор. кўрс}}{8}$$

1 нг/мл доимий норадреналин

$$\frac{\text{pH} - 6,2 \text{ да назорат тажриба флюорим. кўрс}}{8}$$

Ҳисоблаш. Текширув тажрибаларнинг флюоресценцияси ва назорат тажриба флюоресценциялари ўлчаниб, текширув кўрсаткичидан назорат кўрсаткичининг айирмаси топилгандан сўнг адреналиннинг рН и 4,2 ва рНи 6,2 даги миқдори ҳамда норадреналиннинг рН и 6,2 даги миқдори топилади. Бир суткалик сийдик таркибидаги микрограмм билан ўлчанадиган адреналин ва норадреналин миқдори қуйидаги тенгламадан топилади.

Бир суткалик сийдик таркибидаги адреналин (норадреналин)нинг мкг даги миқдори.

$$\frac{A(N) \cdot 10.7.24 \text{ соатлик сийдик миқдори:}}{12,5 \cdot 1000}$$

A(N) тажрибадаги нанограммларда ифодаланган адреналин ва норадреналиннинг миқдори.

10 — тажриба қилинаётган эритмаларнинг ҳажми, мл.

7 — элюатнинг (ажралма) ҳажми, мл;

12,5— текшириш учун олинган сийдик миқдори (24 соатлик сийдик миқдори 1200 ёки 1500 мл ни ташкил килади).

1000 — нанограммни микрограммга айлантириш коэффициентини (1 нг — 0,001 мкг ёки 0,001 граммга тенг). **Мисол.** рН — 4,2 да адреналин учун топилган флюориметр кўрсаткичи: назорат тажриба учун — 16, текширув тажриба учун — 24 бўлса, уларнинг айирмаси $24 - 16 = 8$ га тенг: Агар адреналиннинг доимий (стандарт) эритмаси учун 1 нг мл га 4 бўлинма тўғри келса, у ҳолда пропорция тузиб, адреналиннинг нанограммда ифодаланган миқдори 1 мл тажриба учун топилади.

1 нг ————— 4 бўлинма

x ————— 8 (текширув тажриба учун) $X = \frac{8}{4} = 2 \text{ нг/мл}$,

бундан, 24 соатлик сийдик таркибида

$$\frac{2 \text{ нг (мл тажриба)} \cdot 7.10.1200}{12,5.1000} = 13,4 \text{ мкг.}$$

Норадреналин миқдорини топиш учун рН — 4,2 ва рН — 6,2 да топилган флюориметр кўрсаткичлари айирмасини аниқлаб, юқоридагидек пропорция тузилади ва нг/мл да ифодаланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Ушбу усулнинг асосини флюориметр кўрсаткичлари бўйича ҳисоблаб адреналин, норадреналинлар учун топилган миқдорни ҳамда ўзгариш сабабларини дафтарингизга ёзинг.

4. БУЙРАК УСТИ БЕЗИНИНГ ПЎСТЛОҚ ҚИСМИ ГОРМОНЛАРИ

Буйрак усти безининг пўстлоқ каватидан 46 та дан ортик стероид моддалар ажратиб олинган. Уларнинг барчаси кортикостероидлар деб номланади. Ушбу гормонлар таъсир кўрсатиш турига кўра шартли равишда қуйидагиларга бўлинади: глюкокортикоидлар (углевод, оксил, ёғ, нуклеин кислоталар алмашинувига таъсир кўрсатади), минералокортикоидлар (сув ва минерал тузлар алмашинувига таъсир кўрсатади).

Биринчи гуруҳга кортикостерон, кортизон, гидрокортизон (кортизол), 11- дезоксикортизол ва 11- дегидрокортикоидлар кирди.

Иккинчи гуруҳга эса— дезоксикортикостеронлар, алдостерон ва 18- оксидезоксикортикостеронлар кирди. Бу

гормонлар холестерин унумлари бўлиб, гипофиз АКТГ томонидан бошқарилади. Кортикостероидлар транскрипция жараёнларини жадаллаштиради ва оксил-коферментлар синтезини амалга оширади. Глюкокортикоидлар хужайра мембраналари ўтказувчанлигини сусайтиради ва шу билан глюкоза ва аминокислоталарнинг хужайрага ўтишини камайтиради. Аммо жигарда қарама-қарши ҳолат кузатилади. Глюкокортикоидлар гликонеогенез (углевод бўлмаган бирикмалардан глюкоза ҳосил қилиш) жараёнига таъсир этиб, гипергликемия ҳолатини ривожлантиради. Шу билан бирга мушакларда гликоген синтезини, тўқималарда глюкозанинг оксидланишини пасайтириб, ёғларнинг парчаланшини кучайтиради.

Минералокортикоидлар асосан натрий, калий, хлор ва сув алмашинувини бошқаради. Улар натрий, хлор ионларини организмда ушлаб, калий ионларини сийдик билан чиқарилишида иштирок этади. Шифохоналарда 11-оксикортикостероидларнинг (эркин, боғланган шакллари ва умумий микдорини) кўрсаткичларини билиш касалликларни аниқлашда амалий аҳамиятга эга. Ҳомиладорлик даврида, айниқса АКТГ гормони организмга юборилганда ушбу гормонларнинг умумий микдори ортади. Аёлларда бу гормоннинг ўртача кўрсаткичи эркакларникига нисбатан юқори бўлади. Кекса одамларда эса кортикостероидларнинг микдори бирмунча камаяди.

Аддисон касаллигида қон таркибидаги кортикостероидлар батамом йўқолади. Иценко—Кушинг синдроми билан оғриган беморлар қонида кортикостероидларнинг микдори 2—3 марта ортади. Операциядан кейинги даврда кортикостероидлар микдорининг 3—5 марта ортиши ва бир неча кун давомида ўзгармаслиги кузатилади.

Кортикостероидларнинг яшаш вақти 70—90 дақиқа давом этади. Уларнинг биологик фаоллиги (активлиги) 17-углерод атомидан ён занжирининг узилиши билан йўқолади. Фаолсизланган гормонлар 17-кетостероидлар номи билан охириги маҳсулот сифатида сийдик орқали ташқарига чиқарилади. Сийдик таркибидаги 17-кетостероидлар микдорини аниқлаш муҳим аҳамиятга эга.

Соғлом эркакларнинг 24 соатлик сийдиги билан 44,5 мкмоль (ёки бир суткалик сийдикда 12,8 мг), аёллар сийдиги билан 36,8 мкмоль (10,6 мг) 17-кортикостероидлар ажралади. 6 ёшгача бўлган болаларнинг суткалик сийдиги билан 10,41—13,86 мкмоль (3—4 мг) гача; 12 яшар қизларда 17,33—34,67 мкмоль (5—10 мг), ўғил болаларда бундан кўпроқ 17-кортикостероидлар ажралади. 25 ёшларга келиб юқоридаги кўрсаткичлар сони

ортади ва ёш улғайган сари кўрсаткичлар секин-аста камайиб боради. Уйку вақтида сийдик билан ажраладиган 17-кетостероидлар миқдори ҳаракатланиш даврига нисбатан кўпроқ бўлади. Кучли ҳаяжонланганда қон ва сийдикдаги 17-кетостероидлар миқдори анча ортади. Буйрак усти бези фаолияти камайганда ва ортганда 17-кетостероидлар миқдори ўзгаради. Аддисон касаллигида (фаолиятнинг сусайиши — гипофункция ҳолати) 17-кетостероидларнинг чиқарилиши соғлом кишилардаги кўрсаткичнинг $1/3$ — $1/5$ қисмини ташкил қилади. 17-кетостероидлар миқдорининг камайиши, шунингдек гипертиреоз ва жигар касалликларининг оғир турида (цирроз) кузатилади. Симмондс (пангипопитуитаризм) касаллигида, гипофизар паканаликда 17-кетостероидларнинг миқдори йўқ даражага келади. Буйрак усти бези ўсмаларида — Иценко-Кушинг ёки адреногенитал синдромда сийдик таркибида 17-кетостероидлар миқдорининг ортиши кузатилади. Иккала жинсга боғлиқ туғма гиперплазия (кўпроқ қизларда учрайди) касаллигида ҳам 17-кетостероидлар ва кортикостероидларнинг пайдо бўлиши бузилади.

64-иш. КОРТИЗОЛГА ЎТҚАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯ

Усулнинг асосланиши. Барча кортикостероидлар кўк тетразол билан рангли реакция беради. Бунинг натижасида циклопентанпергидрофенантрен халқаси 17-углерод атомининг охири гуруҳи қайтарилади.

Реактивлар. Кортизолнинг спиртли эритмаси, 10% ли гидроксидтетраметилнинг аммонийли эритмаси, кўк тетрозольнинг 95% ли этанолдаги 5% ли эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, штативлар, пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. Кортизолнинг спиртли эритмасининг 1 мл сига гидроксидтетраметиламмонийнинг 0,25 мл ва кўк тетрозольдан 0,25 мл солиб аралаштириладида 25 дақиқа қоронғи жойда қолдирилади. Суюқлик пушти рангга киради. Биологик суюқликлар таркибидаги кортикостероидлар миқдори колориметрик усул билан аниқланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Қуйидаги жадвални тўлдириш ва тегишли хулоса чиқаринг.

Гормон	Синтезла- ниш жойи	Кимёвий тузилиши	Сифат ре- акция	Кузатила- диган ранг	Реакция механизми
Инсулин					
Тироксин					
Адреналин					
Кортизол					

65-и ш. СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ 17-КЕТОСТЕРОИДЛАРГА СИФАТ РЕАКЦИЯ

Усулнинг асосланиши. Ушбу усул 17-кетостероидларнинг М-динитробензол билан таъсирланиб ишқорий мухитда конденсацияланган пушти-бинафша рангли маҳсулотга айланишига асосланган.

Текширилувчи материал: янги олинган сийдик.

Реактивлар: М-динитробензолнинг спиртдаги 2% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг спиртдаги 8 моль/л эритмаси.

Керакли анжомлар. Пробиркалар, пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркага 20 томчи сийдик ва 30 томчи М-динитробензол эритмаси солинади (М-динитробензол секин девор бўйлаб солинади). Пробиркани силкитмаслик керак. Худди шу йўл билан 6 томчи натрий гидроксид солинади. Суюкликнинг юқори кавати пушти-бинафша рангга бўялганлиги кузатилади.

Олинган натижани расмийлаштириш. Кузатилган ранг-ни дафтарингизга ёзиб, реакциянинг асосини эсланг.

66-и ш. ҚОН ПЛАЗМАСИ ТАРКИБИДАГИ 11-ОКСИКОРТИКОСТЕРОИДЛАР МИҚДОРИНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асосланиши. Қон плазмасидан ажратиб олинган кортикостероидлар, 11- ва 21-углерод атомларида гидроксил гуруҳни ва 4—3 кетогуруҳни А халқасида тутгани учун, концентрланган сульфат кислота — этил спирт аралашмаси билан ишлов берилгандан сўнг флюоресценцияланади.

Текширилувчи материал: кон.

Реактивлар: дефлегматор ёрдамида 2 марта хайдалган гексан, тозаланган метиленхлорид (хлороформ), натрий карбонатнинг 0,2 н эритмаси, икки марта хайдалган этил спирти, Савиль реакциясини берувчи концентрланган сульфат кислота, кортикостероидларни флюоресценцияловчи реактив (3:1 нисбатда тайёрланган сульфат кислота ва этил спирт

аралашмаси), гормонларнинг доимий (стандарт) эритмалари: гидрокортизон ва кортикостеронлар микдори ва уларнинг бир-бирига нисбати қон зардобига яқин бўлиши керак. Икки хил доимий эритмадан фойдаланилади:

1) 20 мг гидрокортизон ва 5 мг кортикостерон 100 мл эритмада тайёрланади; 2) 40 мг гидрокортизон ва 10 мг кортикостерон 100 мл эритмада тайёрланади. Доимий (стандарт) эритмалар қуйидагича тайёрланади: тортиб олинган кортикостероидлар бир неча томчи (10—15) спиртда эритилади, унинг ҳажми керакли концентрацияга келтирилади ва эритма совутгичда сақланади.

Керакли анжомлар: интерференцион нур фильтри ФМ-1 ёки ИФ-1 маркали флюориметрлар: бирламчи нур ўтказишнинг юқори даражаси 475 нм тўлқин узунлик ва 540—550 нм тўлқин узунликдаги иккиламчи нур фильтрлар, сув ҳаммоми, сув (насоси) тортқич, 20—25 мл ли зич беркитгичли пробиркалар, пастер пипеткалари.

Бажариладиган иш тартиби. Гепарин солинган пробиркаларга 2,0—2,5 мл дан қон йиғилади. Қон плазмасини ажратиш учун пробиркалар дақиқасига 3000 марта айланадиган центрифугада 20 дақиқа айлантирилади. Шундан сўнг ўлчов пробиркаларига қон плазмасидан 1 мл ва устига 3 мл гексан солинади. Пробирка қопқоқ билан зич қилиб беркитилади ва бир дақиқа яхшилаб чайқатилади. Пробиркадаги гексан сувга уланган тортқич (насос) ёрдамида тортиб олинади. Қолган гексан эса 40°C ли сув ҳаммомида вакуум билан ҳайдалади. Плазмага 10 мл метиленхлорид солинади ва бир дақиқа чайқатилгандан кейин плазма гексан каби пастер пипеткаси ўрнатилган сув тортқич ёрдамида тортиб олинади. Олинган ажралма (экстракт) олдин 0,5 мл 0,2 н. натрий карбонат эритмасида, сўнгра 0,5 мл дистилланган сувда бир дақиқа давомида ювилади. Бу суюқликлар ҳам вакуум насосига уланган Пастер пипеткаси ёрдамида сўриб олинади. Шундан сўнг 8 мл метиленхлоридли экстракт 15—20 мл сиғимли тоза пробиркага ўтказилади ва унга 2,5 мл концентранган сульфат кислота ва этил спирт (3:1) аралашмаси қуйилади (аралашма ишлатишдан олдин тайёрланади). Пробиркадаги суюқликлар бир дақиқа давомида чайқатилгандан кейин метиленхлорид олиб ташланади. Тажриба пробиркалар бир соатдан кейин флюориметрланади. Назорат тажриба учун сульфат кислота — этил спирт аралашмаси ишлатилади.

Флюориметрия. Ишлов берилган юқори микдорга эга бўлган кортикостероидларнинг доимий эритмаси кюветага солиниб, флюориметрнинг махсус уясига жойлаштирилади. Асбобнинг кўрсаткичи бошқарувчи даста ёрдамида 85—90 га келтирилади. Сўнг худди шундай кюветага сульфат кислота — этил спирт аралашмасидан солиб асбобга жойлаштирилади ва «О» кўрсатувчи бошқарувчи

даста билан кўрсаткич «О» га келтирилади. Шундан сўнг тартиб билан доимий (стандарт) ва текширилувчи суякликларнинг флюоресценцияси ўлчанади.

Қуйидаги тенглама асосида кортикостероидларнинг микдори ҳисобланади: $X = \frac{E \cdot C_{ст}}{E_{ст}}$, бунда x — қон плазма-

сидаги аниқланаётган кортикостероидларнинг микдори, мкг/100 мл; E — асбоб кўрсаткичидан олинган текширилувчи эритманинг флюоресценцияси. $C_{ст}$ — доимий (стандарт) тажрибадаги кортикостероидлар микдори мкг/100 мл; $E_{ст}$ — доимий микдор тутувчи (стандарт) эритманинг флюоресценция кўрсаткичи; Барча аниқланган доимий эритмаларнинг ўртача қийматидан $C_{ст}/E_{ст}$ катталиги топилади.

11-оксикортикостероидларнинг қон плазмаси таркибидаги ўртача микдори 130—230 мкг/л (13—23 мкг/100 мл) ни ташкил қилади.

67-иш. СИЙДИК ТАРҚИБИДАГИ 17-КЕТОСТЕРОИДЛАР МИҚДОРИНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асосланиши. 17-кетостероидлар м-динитробензол билан таъсирланиб, ишқорий муҳитда бинафша-пушти рангга киради. Рангнинг оч-тўқлиги 17-кетостероидлар микдорига боғлиқ.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: водород хлориднинг концентрланган кислотаси, концентрланган сирка кислота, наркоз учун ишлатиладиган эфир ёки хлороформ, натрий гидроксиднинг 10 ва 30% ли эритмаси, 96% ли этил спирт, калий гидроксиднинг метанолда тайёрланган 5 н эритмаси, формальдегид (формалиннинг 40% ли эритмаси 1:5 нисбатда дистилланган сув билан аралаштирилади), м-динитробензолнинг спиртда тайёрланган 2% ли эритмаси, кетостероидларнинг доимий (стандарт) эритмалари: дигидроэпиандростерон ва андростеронлар бир мл да 100 мкг қилиб тайёрланади (100 мкг/мл). Шу доимий эритманинг 5 мг си 50 мл абсолют этил спиртда эритилади (эритмалар қопқоғи зич беркиладиган идишда, музлатгичда сақланади).

Керакли анжомлар. Кичик стаканчалар, воронкалар, зич беркиладиган ажратувчи воронка, центрифуга пробиркалари, сув ҳаммоми, томизгичлар, ўлчов пипеткалари, ФЭК ва кюветалар.

1. Глюкоронидларни гидролизлаш. 17-кетостероидлар глюкурон кислота билан комплекс ҳолда учраганлиги учун

кислотали гидролиз йўли билан соф ҳолда ажратиб олинади. Бунинг учун иккита қуруқ стаканга суткалик сийдикдан 20 мл олинади ва унга концентрланган водород хлориддан 3 мл, концентрланган сирка кислотадан 1 мл, 40% ли формалиндан 0,2 мл солинади. Суюкликлар аралаштирилиб (чайқатилиб), стаканлар воронка билан беркитилади ва қайнаб турган сув ҳаммомига қўйилади. Сув қайнашга бошлагандан роса 15 дақиқа ўтгач суюкликлар гидролизланади. Гидролиз тугагач стаканлар совук сув тагида совитилади ва ҳар қайси стакандаги суюклик алоҳида ажратувчи воронкаларга ўтказилади.

2. 17- кетостероидларни экстракция қилиш ва тозалаш. Гидролизат 10 мл эфир билан 2 марта экстракцияланади ва суюкликлар ажратувчи воронкада 1,0—1,5 дақиқа давомида чайқатилади. Суюкликлар қатламларга ажралиши билан юқорисидаги эфир тутувчи қатлам бошқа қуруқ қолбага олинади, тагидаги қатлам эса гидролизланган стаканга қайтадан олинади ва устига яна 10 мл эфир солиб аралаштирилади. Суюкликлар икки қатламга ажралгунча ажратувчи воронкада чайқатилади (1—2 дақиқа). Юқори қатламдаги суюклик олдинги суюкликка қўшилади. Эфир тутувчи суюклик — экстракт 10 мл 10% ли натрий гидроксид билан уч марта ажратувчи воронкада ювилади. Нордон моддалар ва эстроген тутувчи ишқорий қатлам олиб ташланиб, эфир экстракти 10 мл дистилланган сув билан ювилади. Пастки сув тутувчи қатлам тўлиқ тортиб олинади. Кетостероидлар тутувчи эфир экстракти эса оз-оздан центрифуга пробиркаларига ўтказилади.

3. Эфирли экстрактни буғлатиш. Эфирли экстракт солинган центрифугали пробирка штативга ўрнатилади ва 50—55°C ли сув ҳаммомида қуруқ қолдик қолгунча буғлатилади. Қуритилган экстракт рангсиз бўлиши керак. Мана шу босқичдан сўнг тажрибалар кейинги кунгача совитгичда қолдирилиши мумкин. Пробиркалар пахта билан беркитилади.

4. Фотометрлаш. Экстрактнинг (рангсиз) қуруқ қолдигига 96% ли этил спиртдан 0,2 мл, м-динитробензолнинг 2% ли спиртли эритмасидан 0,2 мл ва калий гидроксиднинг 5 н эритмасидан 0,2 мл солинади. Суюкликлар эҳтиётлик билан аралаштирилади ва ранг ривожланиши учун хона ҳароратида қоронғи жойда бир соатга қолдирилади. Бир оздан сўнг суюкликларга 50% ли этил спиртидан 3 мл ва хлороформдан 2 мл солиб чайқатилади. Бинафша-пушти рангга бўялган маҳсулот пастки қатламга ўтади. Юқори-

даги спиртли қатламда сарғиш-жигарранг бўёқ қолади. 1—2 дақиқадан сўнг бу қатлам сув тортгичга уланган Пастер пипеткаси ёрдамида жуда секинлик билан тортиб олинади. Хлороформли каватнинг пипеткага сўрилишидан сакланиш керак. Қолган хлороформли каватга 96% ли этил спиртдан 1 мл солинади ва аралаштирилади. Ҳосил бўлган ранг бир соат сақланади. Рангнинг зичлиги ФЭКнинг 530 нм тўлқин узунлигида (яшил нур фильтри), 5 мм ли кюветада назорат тажриба суюқлиги қаршисида ёки сув қаршисида ўлчанади.

Назорат тажриба суюқликларини тайёрлаш. Иккита пробиркага 96% ли этил спиртдан 0,2 мл, м-динитробензолнинг спиртли эритмасидан 0,2 мл ва метанолда тайёрланган калий гидроксиднинг 5 н эритмасидан 0,2 мл солиб аралаштирилади. Қолган иш тартиби текширув тажрибадагидек ўтказилади.

Ҳисоблаш. 17-кетостероидларнинг миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизиқ ёки қуйидаги тенглама бўйича аниқланади. Тенглама бўйича ҳисоблаш:

$$X = \frac{E_{\text{текш}} \cdot D}{1,45 \cdot 20}$$

бунда x — бир суткада йиғилган сийдик таркибидаги 17-кетостероидлар миқдори, мг бир суткалик сийдик миқдори (суткалик миқдор), $E_{\text{текш}}$ — текширув тажрибанинг оптик зичлиги, D — бир суткалик сийдик миқдори, мл, 1,45 — ҳисоблаш қиймати, 20 — аниқлаш учун олинган сийдик миқдори, мл.

Бир суткада ажратилган 17-кетостероидларнинг сийдикдаги миқдори эркаклар учун 44,48—2,27 мкмоль/сут. (12,83—0,8 мг/сут), аёллар учун 36,78—2,38 мкмоль/сут (10, 6120, 66 мг/сут) ни ташкил қилади. Бу миқдор турли касалликларда турлича ўзгариши мумкин.

5. ЖИНСИЙ БЕЗ ГОРМОНЛАРИ

Жинсий гормонлар — эркакларнинг ва аёлларнинг жинсий безларида, бачадонда ва қисман буйрак усти безларида ҳосил бўлади. Аёлларнинг жинсий безларидан уч хил гормон ишлаб чиқарилади: эстрогенлар, прогестеронлар, релаксин (полипептид) ва ҳомиладорлик даврида йўлдошнинг ўзидан кўп миқдорда эстроген, прогестин (асосан прогестерон) ва ўзига хос гормонгонадотропин (хориогонадотропин — оксил табиатига эга) ишлаб чиқарилади.

Аёллар жинсий гормонлари — эстрагенлар — эстран унумларидир. Табиий эстрогенларга эстрадиол, эстран ва сарик тана гормони — прогестеронлар киради. Ушбу гормонларнинг асосий вазифаси, вояга етган аёл организмни ўзидан кўпайишга тайёрлашдан иборатдир. Бу гормонлар иккиламчи жинсий белгиларни ривожлантириш ва тухум хужайраларнинг овуляциядан сўнг чатишишига қулай шароит яратади. Прогестерон ўз навбатида қатор ўзига хос вазифаларни бажаради: бачадон шиллик қаватини тухум хужайрасини (чатишиш юзага келган ҳолда) қабул қилишга тайёрлайди, хомиладорлик даврида ҳомилани сақлаш ва кўкрак бези тўқималарини ривожлантиришдан ва овуляциядан сақлашдан иборат. Эстрогенлар оксил синтезини жадаллаштириш билан организмга анаболик таъсир кўрсатади. Эстрогенлар жигарда парчаланadi ва сийдик орқали сульфат ёки глюкурон кислота билан бириккан ҳолда ажралади.

Даволаш мақсадида табиий гормонлардан ташқари эстроген фаоллигига эга бўлган сунъий дорилар, синэстрол, стильэстроллар ҳам ишлатилади. Ушбу дорилар айниқса ўсма касалликларини даволашда простата бези ракиннинг ривожланишини сусайтирувчи восита сифатида қўлланилади.

Эркаклар жинсий безларидан андрогенлар ишлаб чиқарилади. Эркак жинсий гормонларидан энг аҳамиятлиси тестостерон уруғдоннинг интерстициал хужайраларида (Лейдиг хужайраларида) ҳосил бўлади. Ушбу гормоннинг ҳосил бўлиши гипоталамо-гипофизар система томонидан бошқарилади. Тестостерон сперматозид эпителийларини дифференциялайди (бир-биридан ажратади).

Сперматогенез ва иккиламчи жинсий белгиларни ривожлантиришдаги андрогенларнинг фаолияти молекуляр жиҳатдан ҳали тўлиқ ўрганилмаган. Аммо улар таъсирида ДНК, РНК, оксил, ёғлар таркиби ва полисахаридлар синтезининг кучайиши, тана вазнининг ортиши каби анаболик таъсири яхши маълум. Эркакларнинг 100 мл қон плазмаси таркибида 27,76 нмоль/л) (0,8 мкг), аёлларда 2,42 нмоль/л (0,07 мкг) тестостерон бўлади. Тинч ҳолатда бир суткада 35 мг га яқин тестостерон ҳосил бўлади.

Тестостероннинг парчаланиш даври бир неча ўн дақикани ташкил қилиб, 17- кетостероид шаклида сийдик билан ажралади.

Айрим касалликларда андрогенларнинг гидроксилланган шаклини бемор сийдиги билан ажралиши ортади ва шу қаторда 17- кетостероидларнинг сийдикдаги микдори эквивалент равишда камаяди. Шунини айтиб ўтиш керакки,

аёллар организмида тестостероидал 17-кетостероид ҳосил бўлиши мумкин. Кўкрак беги раки билан оғриган аёллар сийдигида кўпинча 17-кетостероидлар микдори камайганлиги аниқланади.

Тестостерон ва уларнинг сунъий аналоглари кўкрак беги ракини даволашда яхши натижа бермоқда.

68-иш. Фолликулинга сифат реакция

Усулнинг асосланиши. Реакция концентрланган сульфат кислота билан ўтказилиб, фолликулиннинг (эстроннинг) оч сарғиш рангли тусланувчи эфир бирикмаларини ҳосил қилишдан иборат.

Текширилувчи материал: фолликулиннинг спиртли ёки ёгли эритмаси.

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота, натрий гидроксиднинг 30% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: флюороскоп (833 модель) М-РТУ-42. Пробиркалар, пипеткалар ва штативлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Концентрланган сульфат кислота билан ўтказиладиган реакция. Спиртдан ҳоли бўлиш учун 20—30 томчи фолликулиннинг спиртли эритмаси 5—10 дақиқа сув ҳаммомида қайнатилади. Пробиркада қолган спиртсиз фолликулинга 20 томчи концентрланган сульфат кислота солиб, қайтадан 5—10 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилади. Пробиркадаги суюқлик аста-секин оч-сарғиш тусга кириб, қиздирилганда тўқ ковоқ ранга айланади. Эритманинг флюороскоп остида яшил тусга кираётгани (флюоресценцияланиши) кузатилади. Фолликулиннинг ёгли эритмаси билан хона ҳароратида реакция ўтказиш мумкин. Бунинг учун 2 томчи фолликулиннинг ёғдаги эритмасига 30 томчи концентрланган сульфат кислота қўшилганда аста-секин оч сарғиш ранг ҳосил бўлади.

2. Фенол гуруҳларига Фолин реакцияси, 2 томчи фолликулинга бир томчи 30% ли натрий гидроксид эритмаси ва бир томчи Фоли реактиви солинади. Кўк ранг ҳосил бўлиши фенол гуруҳи борлигини исботлайди. Олинган натижаларни дафтарингизга ёзиб, расмийлаштинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Қандай моддалар гормонлар дейилади?
2. Оксил табиатли гормонларни қайд этинг.
3. Аминокислота унумлари гормонларини айтинг.
4. Стероид тузилишга эга бўлган гормонларни айтинг.

5. Гормонларнинг таъсир механизми қандай?
6. Мембранага боғлиқ бўлган гормонларнинг таъсир механизми қандай?
7. Цитоплазма гормонларининг таъсир механизми қандай?
8. Оксил табиатига эга бўлган гормонлар қандай аниқланади?
9. Адреналин, тироксин ва кортизол қандай сифат реакция билан очилади?
10. Гормонларни очиш учун сифат реакциялари қандай хоссага асосланган?
11. Гормонлар микдорини аниқлашнинг тиббиётдаги аҳамияти қандай?
12. Гормонлар фаолигининг ўзгариши қандай касалликларга олиб келиши мумкин? Мисоллар келтиринг.
13. Сийдик таркибидаги 17-кетостероидларни аниқлашнинг аҳамияти қандай?

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Қайси гормон фаолиятининг бузилиши қандли диабет касалигига олиб келади. Касалликни даволаш учун қандай тadbирлар қўлланилади. Бемор қони таркибидаги инсулин етарли микдорда эканлиги аниқланди, аммо қон таркибидаги қанд микдори меъъридан анча ортиқ. Нима учун бундай ҳолат юз берди? Сиз қандай фикрдасиз.
2. Қандли диабет касаллигини даволаш учун инсулинни ичишга эмас, балки мушак ичига юбориш буюрилади. Бунинг сабаби нима?
3. Бемор инсулин билан даволанди. Ушбу дорининг карбонсувларга, ёғларга, фосфор ва калий алмашинувига таъсири қандай эканлигини тушунтириб беринг.
4. Беморнинг ҳулқи унинг асли табиатига зид, у жуда жаҳлдор, кўпчилик билан тил топиша олмайди. Бунинг сабаби нима? Шифокор қайси гормон фаолияти ўзгарганлиги ҳақида фикр юритиши керак?
5. Адреналин ва глюкагон гормонлари қон таркибидаги қанд микдорини оширади. Нима учун бу жараён икки гормон орқали амалга оширилади? Гормонларнинг таъсир қилишдаги фарқи қандай?
6. Организмга кортизон гормони юборилганда қон таркибидаги қанд микдори бирмунча ортади. Нима учун? Жавобингизни изоҳланг.
7. Тиреотоксикоз билан оғриган бемор қалқонсимон безининг бир бўлаги олиб ташланди. Операциядан сунг тиреотоксикоз аломатлари йўқолди, аммо туз алмашинувида ўзгариш содир бўлди. Бунинг сабабини тушунтириб беринг.
8. Беморнинг организми жуда заифлашган, ундаги моддалар алмашинуви жараёнини ошириш учун (адренал) аденилат-циклаза системаси орқали таъсир қилиш кўзда тутилган. Сизга маълум бўлган биологик фаол моддаларнинг қайсилари бу системани фаоллаштиради, қайсилари сусайтиради?
9. Ҳикилдок раки билан оғриган бемор буйнининг юмшоқ туқималари олиб ташланди. Бир неча ой ўтгач беморда микседема касаллиги белгилари пайдо бўлди. Буни қандай тушунтириш мумкин?
10. Меъда девори яраси (язва желудка) билан шифохонада ётган бемор узок муддат стероид гормонлар билан даволанди. Сизнинг фикрингиз қандай? Шифокор тўғри қилганми? Аксинча бўлса нима учун? Фикрингизни тушунтириб беринг. Стероид гормонлар бириктирувчи туқималарга қандай таъсир кўрсатишини тушунтиринг.
11. Беморда қалқонсимон безнинг фаолияти ошган деб фараз қилган шифокор ўз фикрини қандай биокимёвий кўрсаткичлар асосида тасдиқламоғи лозим.
12. Беморнинг тана ҳарорати, ҳаракат фаоллиги бирмунча ортган,

қўллари калтирайди. Шифокор бундай ҳолатни қайси ички секреция беши фаолияти ўзгариши билан боғламоғи керак.

13. Бемор сарик касаллиги билан оғриган. Унинг қони ва сийдиги таркибида стероид гормонларнинг миқдори камайганлиги аниқланди. Шифокор бу ҳолатни қайси ички секреция беши фаолияти бузилиши билан боғлаши керак?

14. Еши улғайган, организми заифлашган беморга операциядан олдин қони ва сийдиги таркибидаги стероид гормонларни аниқлаш кераклиги айтилди. Бунга сабаб нима? Нима учун стероид гормонларнинг қон ва сийдик таркибидаги миқдори шифокорни қизиқтирди?

V БЎЛИМ

МОДДА ВА ЭНЕРГИЯ АЛМАШИНУВИ, МОДДАЛАР АЛМАШИНУВИНИНГ УМУМИЙ ЙЎЛЛАРИ

Модда ва энергия алмашинуви тирик организмнинг яшаши, ўзидан кўпайиши, сақланиши ва фаолияти учун йўналтирилган қонуний жараёндир. Тирик организм уни ўраб турган ташқи муҳит билан ҳамбарчас боғлиқдир. Ташқи муҳитдан олинган озиқа маҳсулотлар — оксиллар, ёғлар, карбонсувлар, минерал тузлар организмда кислород иштирокида оралик ва охириги маҳсулотларгача парчаланиб энергия ҳосил қилади. Бундай кимёвий жараён катаболизм ёки диссимилляция деб номланади. Бир вақтда парчаланиб маҳсулотлари ва энергия организм (орган, ҳужайра) учун керак бўлган ўзига хос мураккаб органик моддаларнинг синтезланиши учун ишлатилади. Бу жараён анаболизм ёки ассимилляция деб номланади. Катаболизм ва анаболизм жараёнлари бир-бири билан ҳамбарчас боғланган жараёнлардир. Уларнинг йиғиндиси метаболизм ёки моддалар алмашинуви деб юритилади.

Катаболизм жараёни ва энергия ажралиши босқичма-босқич амалга оширилади.

Биринчи босқичда истеъмол қилинган оксиллар, карбонсувлар, ёғлар меъда-ичак системасида махсус ферментлар таъсирида тегишли аминокислоталар, гексозалар, глицерин ва ёғ кислоталаригача парчаланиб, сўрилади. Ушбу оддий моддалар аъзо, тўқима ҳужайраларига етказилади.

Иккинчи босқичда ҳужайра цитоплазмасида аминокислоталар, моносахаридлар, глицерин ва ёғ кислоталар ўзига хос йўл билан махсус ферментлар иштирокида янада кичик молекулаларга парчаланади (пируват, α -кетоглутарат, оксалоацетатлар ҳосил бўлади).

Учинчи босқич митохондрияда боради. Бунда пируватдан ва ёғ кислоталардан махсус йўллар билан ферментлар таъсирида бир хил маҳсулот — ацетил-КоА (сирка кислотанинг фаол шакли) $\text{CH}_3\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$ ҳосил бўлади. Бу маҳсулот митохондрия матриксида ферментлар иштирокида оксидланиб, тегишли субстратларни ҳосил қилади. Бу жараёнда 3-карбон кислота (лимон кислота) ҳосил бўлади. Шунинг учун бу йўл 3-карбон кислота ёки Кребс халқаси номи билан аталади. Бу халқада: изоцитрат, α -кетоглутарат, малат, сукцинатлар ҳосил бўлади. Ушбу субстратлардан НАД га ёки ФАД га боғлиқ дегидрогеназалар водородни олиб, митохондриянинг ички мембранасига узатади. Ички мембранада водород электронлари тўқима нафас олиш занжири ферментлари ёрдамида кетма-кет (НАД-ФАД-КоО-цитохромлар орқали) кислородга узатилади. Натижада ички сув ҳосил бўлади. Бу йўл электронларни ўтказиш занжири дейилади. Ушбу йўл НАД коферментидан бошланиб ФАД, цитохромлардан кислородгача, яъни сув ҳосил бўлгунча давом этса — узун йўл дейилади. ФАД дан кислородгача босиб ўтилган йўл қискартирилган йўл дейилади. Бошқа субстратлар — аскорбин кислота, глутатион ва ҳоказодан электронлар, цитохром орқали кислородгача узатиладиган йўл қўшимча йўл дейилади. Электронларни ўтказиш занжирида редокс потенциалларни 0,16 В дан ортиқроқ ўзгариши АДФ дан АТФ ҳосил бўлишига олиб келади. Узайтирилган йўлда 3 та АТФ, қискартирилган йўлда 2 та АТФ ва қўшимча йўлда 1 та АТФ ҳосил бўлишига олиб келади. Шундай қилиб, Кребс халқасида ҳосил бўлган изоцитратдан 3 АТФ, олма кислотаси — малатдан 3-АТФ, кетоглутаратдан 3 АТФ ва сукцинатдан 2 АТФ ҳосил бўлишига имкон яратилади. Демак, Кребс халқасида бир молекула фаолашган сирка кислотанинг оксидланиши натижасида 12 АТФ ҳосил бўлади. Кребс халқасида шунингдек сув, CO_2 , яъни охириги маҳсулотлар ҳосил бўлади. Парчаланиш жараёнининг биринчи босқичида 0,6—1,0 % энергия ажралади. Аммо бу энергия сўрилиш жараёнлари учун сарфланади. Иккинчи босқичда 30 % энергия ажралади. Учинчи босқичда эса 60—70 % энергия ажралади. Ажралган энергиянинг 60 % и иссиқлик шаклида тарқалади. 40—50 % и эса АТФ молекуласида боғланади. Шу энергия ҳисобига ҳужайраларнинг ишлаши ва АТФ — АДФ-халқа фаоллиги амалга оширилади. Парчаланиш жараёнида ҳосил бўлган аминокислоталар, моносакхаридлар, глицерин ва ёғ кислоталар организмга хос бўлган

мураккаб моддаларни синтезлаш учун ишлатилади. Ҳар қандай анаболизм жараёни энергия сарфланиши билан амалга оширилади.

Катаболизм ва анаболизм жараёнларининг ўзига хослиги



Соғлом, катта ёшдаги одамларда катаболизм ва анаболизм жараёнлари бир-бирига тенг бўлади.

Узоқ муддат оч қолиш, тўйиб овқат емаслик, ҳарорат кўтарилиши ва титраш ҳолатларида катаболизм анаболизмдан устун келади. Бу ҳолда организм ўзининг заҳира энергиясини сарфлайди ва натижада одам кескин озиб кетади, ҳатто ўлим юз бериши мумкин. Қасалликдан тузалиш, ҳомиладорлик, эмизиш ва боланинг ўсиш даврларида аксинча, анаболизм катаболизмдан устунлик қилади. Аммо бу устунлик ҳаддан ташқари юқори бўлса, у одамни ортикча семиришга, гигантизмга, яъни қасалликка олиб келиши мумкин. Шунинг учун модда ва энергия алмашинуви қонунларини билиш ва уни бошқариш йўллари урганиш келажак шифокор учун амалий ва назарий жиҳатдан катта аҳамиятга эга.

Бўлимнинг мақсади:

1. Сукцинатдегидрогеназа ва цитохромоксидаза ферментлари фаоллигини аниқлаш йўли билан уларнинг ҳужайраларда жойланиши ва электрон ташиш занжирини молекуляр механизмлари тушуниш ва олинган билимларни янада мустаҳкамлаш.

2. Аденозинтрифосфатнинг тузилишини, синтезланишини ва организмда асосий макроэргик бирикма эканлигини ўрганиб, унинг таркибидаги енгил боғланган фосфатни аниқлаш.

3. АТФ-аза ферменти фаоллигини аниқлаш, унинг амалий аҳамиятини ўрганиш.

4. Креатинкиназа ферментининг фаоллигини аниқлаш ва унинг амалий аҳамиятини билиш ва шифохоналарда қўллаш.

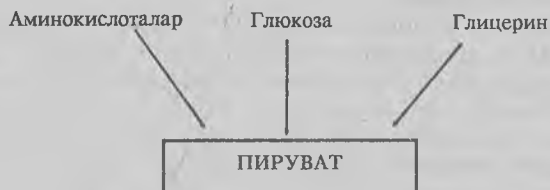
5. Қон таркибидаги каталаза ферменти фаоллигини аниқлаш ва унинг амалий аҳамиятини билиш ва шифохоналарда қўллаш.

6. Қон зардоби ва сийдик таркибидаги алмашинув жараёнининг оралиқ маҳсулоти ҳисобланган пируватни аниқлаш, унинг аҳамиятини ўрганиш ва ундан фойдаланиш.

69- и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ВА СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ ПИРОУЗУМ КИСЛОТА МИҚДОРINI АНИҚЛАШ

Мураккаб моддалар меъда ва ичакларда ферментлар таъсирида парчаланганда аминокислоталар, моносахаридлар, глицерин ва ёғ кислоталар ҳосил бўлади. Улар тўқима ҳужайраларига тушгандан сўнг ҳужайра цитоплазмасида ўзига хос йўллар билан ферментлар таъсирида парчланишни давом эттиради.

Айрим аминокислота (аланин, цистеин, серин ва хоказо) лардан ва глюкозанинг парчланишидан оралиқ маҳсулот — пируозум кислота ҳосил бўлади.



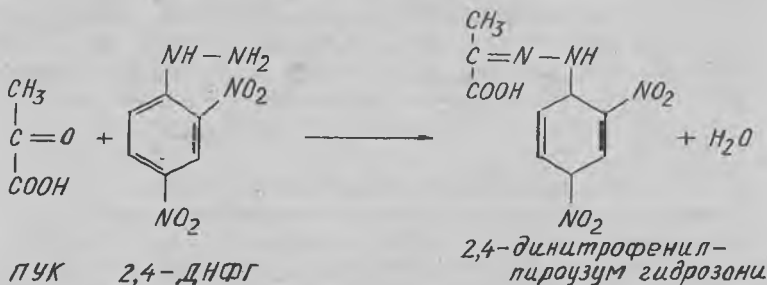
Пируозум кислотанинг навбатдаги оксидланиши ҳужайралардаги АТФ/АДФ миқдорига боғлиқ бўлади. АТФ миқдорининг камайиши, АДФ нинг ортиши пируватдегидрогеназа комплекси фаоллигининг амалга ошишига олиб келади. Бу жараён кислород бўлишини талаб қилади. Кислород етишмовчилигида эса пируват сут кислотагача оксидланади (анаэроб оксидланиш). Аэроб шароитда пируватдегидрогеназа, ацетилтрансфераза ва дегидролипоатдегидрогеназа ферментлари ҳамда (ТПФ) — тиаминпирофосфат, оксидланган липоат, КоА, НАД, ФАД коферментлари қатнашади. Пируватдегидрогеназа комплексининг мол массаси 7—10 млн бўлиб, унинг

таркибига 30 молекулагача биринчи фермент, иккинчи фермент ва 10 молекулагача 3-фермент киради. Пируватнинг оксидланиши кетма-кет, босқичма-босқич амалга оширилади ва реакция маҳсулоти — $\text{CH}_3\text{CO} - \text{S} - \text{CoA}$ ҳосил бўлади. Пироузум кислотанинг оксидланишида қатнашадиган коферментлар таркибига B_1 , B_2 , PP, пантоген ва липоат витаминлари киради. Шу витаминлар етишмовчилигида, қандли диабет касаллигида, юрак фаолияти сусайганда, гипофизар-адренал система фаоллиги ортганда ва айрим дорилар таъсирида (камфора, стрихнин, адреналин наркотик моддалар) қон зардоби ва сийдик таркибида пироузум кислота микдори ортади ёки камаяди.

Пироузумдегидрогеназа комплекси митохондрида жойлашади, шунинг учун пируват митохондрия матриксида оксидланади. Пироузум шунингдек карбоксилланиб оксалоацетатга айланади. Оксалоацетат Кребс халқасида сирка кислотанинг фаол турини цитратга айланишида асосий субстрат ҳисобланади. У етишмаганда Кребс халқасининг фаоллиги сусаяди ва дегидрат субстратлари ҳосил бўлмаслигига ва АТФ етишмаслигига сабаб бўлади. Шунинг учун пироузум кислота микдорини аниқлаш амалий аҳамиятга эга. Кичик ёшдаги болалар организмида пироузумнинг анаэроб йўл билан сут кислотагача оксидланиши устун туради. Бола ўсиши билан бу устунлик ҳам камайиб боради.

Усулнинг асосланиши. Пируват 2,4-динитрофенилгидрозин билан ишқорий шароитда қизил-қўнғир рангли 2,4 динитрофенилгидрозонни ҳосил қилади. Рангнинг зичлиги пироузум кислота микдорига тўғри келади. Рангнинг зичлиги фотоэлектродколориметрда ўлчанади.

Кимёвий тенглама куйидагича:



Текширилувчи материал: қон зардоби, сийдик.

Реактивлар: 2,4-динитрофенилгидрозиннинг 1 % ли эритмаси, хлорид кислотанинг концентрланган эритмаси, калий гидроксиднинг спиртдаги 2,5 % ли эритмаси, толуол, пироузум кислотанинг доимий (стандарт) эритмаси (6,25 мг пируват 100 мл дистилланган сувда эритилади).

Керакли анжомлар. Пробирка ва штативлар, 10 мл ли цилиндр, 1,2 мл ли ўлчов пипеткалар, термостат, сув хаммоми, ФЭЖ ва 1 см ли кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Тўртта пробирка олинади. Унинг биринчисига 1 мл қон зардоби, иккинчисига 1 мл сийдик (текширилувчи тажриба) ва учинчи, тўртинчи пробиркаларга 1 мл дан дистилланган сув солинади (назорат тажриба). Барча пробиркаларга 0,5 мл дан 2,4—ДНФГ нинг 1 % ли эритмасидан солиб аралаштирилади. Пробиркадаги суюқликлар 5 дақиқага қолдирилади.

2. Бир оз вақт ўтгач, пробиркаларга 3 мл толуол солинади, улар зарли беркитгичлар билан ёпилиб 3 дақиқа чайқатилади ва яна 2—3 дақиқага қолдирилади. Суюқликлар икки қаватга ажралади. Унинг юқорисидаги толуол қавати аста-секин сўриб олинади.

3. Суюқликларнинг пастки қавати бошқа курук пробиркага ўтказилади ва устига калий гидроксид эритмасидан 2 мл солинади.

10 дақиқа ўтгач ривожланган ранг зичлиги ФЭЖ нинг 4-нур фильтри қаршисида ўлчанади.

Пироузум кислота миқдорини ҳисоблаш. Пироузум кислота миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади. Топилган миқдор бир суткада ажратилган сийдик миқдори (1200—1500 мл) га кўпайтирилади. Қон зардоби таркибидаги пироузум кислота миқдори эса 1000 мл қон зардоби учун ҳисобланади. Ўлчов эгри чизигидан топилган миқдор 1000 га кўпайтирилади.

х-а. 3.1500. Бунда а — мкг да ўлчанган пироузум кислота миқдори, 3 — суюлтириш даражаси, 1500 бир суткалик сийдик миқдори.

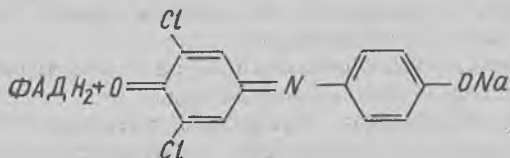
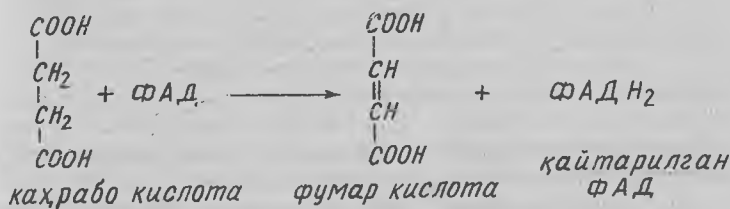
Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга усулнинг асосини, пироузум кислотанинг қон зардоби ва сийдик таркибидаги ўртacha миқдорини, олинган натижани ёзиб солиштиринг. Пироузум кислота миқдори қайси касалликларда ўзгаришини айтинг.

70-и ш. МУШАҚ СУҚЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗА ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

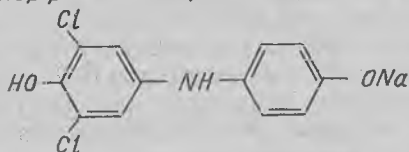
Биологик оксидланиш жараёнида табиати жиҳатидан уч хил фермент иштирок этади. Буларга НАД га боғлиқ бўлган, ФАД га боғлиқ бўлган дегидрогеназа ферментлари ва гем тутувчи ферментлар — цитохромлар киради.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) — темир флавопротеид ферментлар туркумига кириб, хужайра митохондриясида жойлашади.

Усулнинг асосланиши. Сукцинатдегидрогеназа ферменти ФАД коферментига боғлиқ. ФАД сукцинатни оксидлаб (унинг водородини ўзига тортиб олади) ўзи қайтарилди. Қайтарилган ФАД·Н₂ бошқа оксидланган акцепторга дихлорфенолиндофенолга водород электронларини узатади. Кўк рангдаги оксидланган дихлорфенолиндофенол қайтарилганда рангсизланади ва мушак таркибидаги СДГ фаоллигини тасдиқлаб беради.



*Оксидланган кўк рангли
дихлорфенолиндофенол*



*қайтарилган рангсиз
дихлорфенолиндофенол*

Текширилувчи материал: мускул тўқимаси қиймаси.

Реактивлар: Қаҳрабо кислотанинг 1% ли эритмаси, дихлорфенолиндофенолнинг 0,1% ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, воронкалар, шиша таёқчалар, чинни ҳовонча, дока филтрлар, сув хаммоми ёки термостат.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Ферментни ажратиш. 1—2 г янги мушак тўқимаси қайчи ёрдамида майдаланади ва чинни ҳовончада сув билан эзилади. Ҳосил бўлган мушак қиймаси икки қаватли дока орқали воронкадан ўтказилади. Қийма 25 мл сувда ювилади. Ювилган мушак

киймаси тоза пробиркага олинади ва устига 4 мл сув солиб шиша таёқча билан аралаштирилади. Пробиркадаги аралашма уч қисмга бўлинади. Биринчи пробиркадаги мушак ферментининг фаоллиги қайнатиш йўли билан йўқотилади (ноактивланади).

2. Фермент фаоллигини аниқлаш. Қуйидаги жадвалга биноан реакция аралашма тайёрланади.

42- жадвал

Пробиркалар	Сукцинат, мл	Дистилланган сув, мл	Дихлорфенол-индофенол
1	1,0	0,5	2 томчи
2	1,0	0,5	2 томчи
3	—	1,5	2 томчи

Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб 15 дақиқа 37°C ли термостат ёки сув ҳаммомида ушланади. Дихлорфенол индофенолнинг рангсизланишини кузатамиз.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар қуйидаги жадвалга биноан расмийлаштирилади. Фермент фаоллигини аниқлаш реакциясини асослаб беринг.

43- жадвал

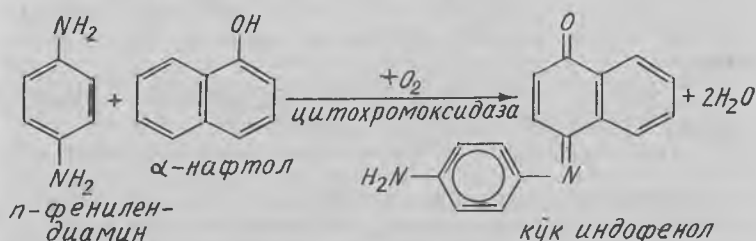
Ферментнинг номи	Коферменти	Электрон берувчи (донор)		Электрон олувчи (акцептор)		Реакция натижаси
		тўқимада	тажрибада	тўқимада	тажрибада	

71-и ш. МУШАК ТАРҚИБИДАГИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗА ФЕРМЕНТИНИ (ЦХО) АНИҚЛАШ

Цитохромоксидаза ферменти тўқима нафас олиш занжирида, электронларни кислородга ўтказиш жараёнида иштирок этади. Ушбу жараённинг маҳсулоти сифатида ички сув ҳосил бўлади. ЦХО табиати жихатидан мис, темир тутувчи оксиллардир (металлопротеид). Фермент митохондрия билан мустаҳкам боғланган.

Усулнинг асосланиши. Цитохромоксидаза ферменти иштирокида фенилендиамин, α -нафтол ва кислород билан, оксидланган индофенол кўк бирикмасини ҳосил қилишдан иборат.

Реакция тенгламаси куйидагича:



Текширилувчи материал: мушак киймаси.

Реактивлар: p -фенилендиаминнинг 1% ли эритмаси, α -нафтолнинг 1% ли спиртдаги эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар ва штативлар, чинни ховончалар, коғоз филтрлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Мушакдан ферментни ажратиш. 0,3—0,5 г янги мушак 1:20 нисбатда дистилланган сув билан чинни ховончада эзилади. Қиймани филтр коғоз варақлари орасига солиб сувдан ажратилади.

2. Ювилган ва тозаланган мушак киймаси икки қисмга ажратилади. Унинг бир қисми филтр коғозга, иккинчи қисми 1 мл дистилланган сув солинган пробиркага солиб қайнатилади. Суюқлик совитилгандан сўнг суви аста-секин тўқиб ташланади. Пробирка тубида қолган шиша таёқча билан филтр коғозга олинади.

3. Филтр коғоз устидаги ҳар иккала мушак киймасига 1—2 томчи «Нади» индофенол реактиви томизилади. 5—10 дақиқа ўтгач мушак қиймасининг бири кўкимтир — бинафша рангга бўялади. Ушбу ранг цитохромоксидаза ферментининг p -фенилендиамин ва α -нафтолни оксидланган индофенол бирикмасини ҳосил бўлиш реакциясини тезлатганини исботлайди. Қайнатилган мушак киймасида фермент фаоллиги тўхтатилган. Шу боис мушакнинг бу қисмида реакция содир бўлмайди.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар олдинги ишда берилган жадвалга мувофиқ расмийлаштирилади.

72-и ш. ЮРАК МУШАҚЛАРИДАН АЖРАТИЛГАН ОКСИДЛАНГАН ВА ҚАЙТАРИЛГАН ЦИТОХРОМ С СПЕКТРЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Электронларнинг ўтказиш занжирида 5 турдаги цитохром иштирок этади (В, С, C_1 , А ва A_3). Улар темир тутувчи оксиллар бўлгани учун нур ютишига кўра аниқланади.

Қайтарилган цитохром С сарғиш-яшил нур узунлигида (550 нм) аниқланади. Оксидланган цитохром эса бу узунликда бўлмайти.

Текширилувчи материал: юрак мушагидан ажратилган цитохром С.

Реактивлар: гексацианоферрат (II) калийнинг 0,01 моль/л эритмаси, натрий гидросульфат тузи (курук кукуни).

Керакли анжомлар. 0,6—0,8 см диаметрли пробиркалар, спектроскоп.

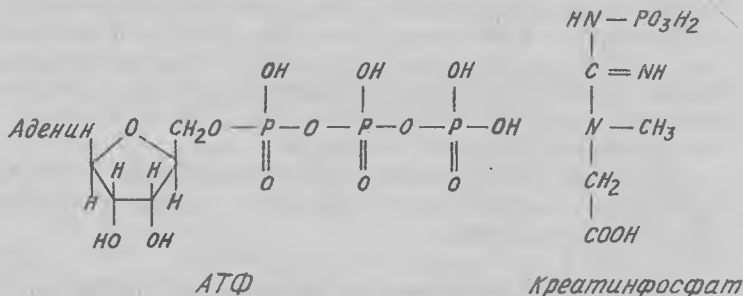
Бажариладиган иш тартиби. 1. Бир мл цитохром солинган пробиркага эритмадаги барча фермент молекулаларини оксидлаш учун 0,01 моль/л калий (III) гексоцианоферрат эритмасидан 0,3 мл солинади. Эритманинг спектри спектроскоп ёрдамида аниқланади. Спектрнинг сарғиш-яшил қисмида нур ютилиши кузатилмайди.

2. Худди шу пробиркадаги эритмага бир неча донна натрий гидросульфат кукуни солинади. Цитохром С қайтарилади. Спектроскопда иккита нур ютиш йўли кўринади. Уларнинг бири сарғиш-яшил (540 нм) қисмида, иккинчиси — яшил қисмида (520 нм).

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини ва цитохром С нинг оксидланган ва қайтарилган шаклларини, нур ютган қисмини дафтарингизга чизинг.

73- и ш . МУШАҚ ТАРКИБИДАГИ МАКРОЭРГИК БИРИКМАЛАР (АТФ ВА КРЕАТИНФОСФАТ) МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

Мушақ тўқималарида икки хил макроэргик бирикма учрайди. Улар АТФ ва креатинфосфатдир. Улар мускулларни қисқариши учун керак даражадаги энергия билан таъминлайди.



АТФ ҳосил бўлишининг асосий йўли тўқималарнинг нафас олиш жараёнида бўладиган оксидловчи фосфорланишидир. Креатинфосфат эса АТФ иштирокида ҳосил бўлиб, тинч ҳолатда кўшимча макроэргик (энергия тутувчи) манба ва мушаклар фаолияти ошганда АДФ дан АТФ ҳосил бўлишини тезлатувчи омилдир.

Усулнинг асосланиши. АТФ ва креатинфосфат таркибидаги фосфор қолдиғи кислотали гидролизланганда осон ажралади. Назорат тажрибада (гидролизгача бўлган) фосфор миқдори ва гидролиздан сўнг аниқланган фосфор (текширилувчи тажриба) миқдорини солиштириш йўли билан кучсиз боғланган фосфор миқдорини ўлчаш мумкин. Ажралган фосфор миқдори аммоний молибдатнинг аскорбин кислота иштирокида берган рангли реакцияси асосида аниқланади.

Текширилувчи материал: янги олинган мушак тўқимаси.

Реактивлар: учхлорсирка кислотанинг (УХСК) 2,5 % ли эритмаси, хлорид кислотанинг 1 моль/л эритмаси, натрий гидроксиднинг 1 моль/л эритмаси, аммоний молибдатнинг 1 % ли эритмаси, аскорбин кислотанинг 1 % ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, пипеткалар, воронкалар, фильтр қоғоз, 10 мл ли ўлчов пробиркаси ёки цилиндр, муз ёки сув ҳаммоми, ФЭК, 1 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. 0,5 г мушак киймаси солинган пробирка муз ҳаммомига қўйилади, устига совитилган УХСК эритмасидан 5 мл солинади. Пробиркадаги суюқлик шиша таёқча билан АТФ ни ажратиб олиш учун аралаштирилади. Бунда креатинфосфат ҳам ажралади. Суюқлик 5 дақиқа давомида аралаштирилади. Олинган аралашма музга жойлаштирилган пробиркага филтрланади.

Қолган мушак киймасига яна 5 мл дистилланган сув солиб, паст ҳароратда 5 дақиқа давомида макроэргик бирикмаларни ажратиш давом эттирилади. Олинган экстракт юқоридаги пробиркага филтрланади ва пробиркадаги суюқлик ҳажми дистилланган сув билан 10 мл га етказилади.

2. Иккита пробиркага оксидсиз филтратдан 0,5 мл солинади. Унинг бири назорат тажриба, иккинчиси — текширилувчи тажрибадир.

Текширилувчи пробиркага водород хлориднинг 1 моль/л-эритмасидан 1 мл солиб, усти зар қоғоз билан беркитилади ва фосфор боғларини узиш мақсадида қайнаб турган сув ҳаммомида 10 дақиқа қиздирилади. Суюқлик совитилгандан сўнг натрий гидроксиднинг 1 моль/л эритмасидан 1 мл солинади. Назорат пробиркасига эса

суюкликни қайнатмай туриб водород хлорид ва натрий гидроксид эритмаларидан 1 мл дан солинади.

Текширилувчи ва назорат пробиркаларига суюкликларнинг ҳажми 10 мл га етгунча дистилланган сув солинади (7,5 мл).

3. Кейинги ишлар текширилувчи ва назорат тажрибалар учун бир вақтда олиб борилади. Иккала пробиркадан 5 мл дан суюклик олиб бошқа пробиркаларга солинади. Уларнинг ҳар бирига аммоний молибдат эритмасидан 0,5 мл, аскорбин кислотадан 0,5 мл ва 2 мл дистилланган сув солинади. Суюкликлар аралаштирилиб 10 дақиқага уй хароратида қолдирилади.

4. Назорат ва текширилувчи суюкликлар ФЭҚ нинг қизил нур фильтрида (670 нм тўлқин узунлигида) кўрилади. Текширилувчи пробиркада аникланаётган анорганик фосфат (гидролиздан кейин) бўш боғланган фосфат кислота ва фосфат тузларининг йиғиндиси ҳисобланади. Назорат пробиркасида аникланаётган фосфат эса фақат фосфор тузларидан иборатдир.

5. Текширилувчи суюклик учун топилган оптик зичлик кўрсаткичидан назорат учун топилган оптик зичлик кўрсаткичи айирилади. Бўш боғланган анорганик фосфатнинг текширилувчи тажриба учун олинган микдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади.

Ҳисоблаш. Бўш боғланган фосфор микдори 100 г мушак учун мг да суюлтириш эътиборга олинган ҳолда ҳисобланади.

$$x = A \cdot 3,3 \cdot 400 \cdot 100$$

бунда, x — 100 г тўқима учун 1 мг АТФ ҳисобида олинган макроэргик бирикмаларнинг микдори (мг 100 г) A — текширилувчи тажриба учун топилган АТФ микдори (мг), 3,3·400 — суюкликнинг суюлтирилган даражаси ҳисобга олинган ҳолда 1 г тўқима учун ҳисоблаш коэффициентини.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асоси ва натижаси дафтарга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

74-и ш. ҚОН ТАРКИБИДАГИ АТФ-АЗА ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза) ферменти АТФ ни сув иштирокида парчалаб энергия ажралишини тезлатади-ган реакцияни катализлайди.

Усулнинг асоси. Ёрилган эритроцитлар таркибидаги

АТФ-аза АТФ ни АДФ ва анорганик фосфатгача парчалайди. Ажралган анорганик фосфат эса аммоний молибдат билан рангли маҳсулот ҳосил қилади. Рангнинг зичлиги АТФ миқдорига тўғри келади.

АТФ-аза ферментининг фаоллиги янги туғилган болаларда кузатиладиган гемолитик анемияда, лейкозда, бронхиал астмада, нафас йўлларининг яллиғланиши ва рахит касалликларида одатдагидан бир неча баробар ортиб кетади.

44- жадвал

АТФ-аза фаоллигининг ёшга нисбатан ўзгариши (мкг Р/1 мл эритроцит ҳисобида)

Янги туғилган болаларда	1 ёшгача	3 ёшгача	4—7 ёшгача	11—13 ёшда	14—16 ёшда	17 ёшдан юқори
308	196	166	128	147	108	108

Текширилувчи материал: қон эритроцитлари.

Реактивлар: УХСК нинг 2,5 % ли эритмаси, водород хлориднинг 1 моль/л эритмаси, натрий гидроксиднинг 1 моль/л эритмаси, аммоний молибдатнинг 1 % ли эритмаси, аскорбин кислотанинг 1 % ли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив, пробиркалар, 1—2 мл ли пипеткалар, ФЭК, термостат ёки сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. Икки пробирканинг бирига эритроцитлари ёрилган (гемолизланган) қондан 1 мл, иккинчисига дистилланган сувдан 1 мл солинади. Уларга 0,1 моль/л ли АТФ эритмасидан 1 мл дан солинади. Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб бир соат 37°C ли термостатда ёки сув ҳаммомида сақланади. Бир оздан сўнг оксилларни чўктириш учун пробиркаларга 0,5 мл УХСК эритмасидан солинади. Суюқликлар филтрланади. Филтр остидаги суюқликка 1 мл аммоний молибдат эритмаси қуйилади ва аралашма 10—20 дақиқа термостат ёки сув ҳаммомига жойлаштирилади. Ҳосил бўлган ранг зичлиги ФЭК нинг қизил нур филтри қаршисида ўлчанади. Текширилувчи ва назорат тажрибалар учун топилган оптик зичлик кўрсаткичларининг фарқи аниқланади. Фермент фаоллигининг даражаси олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади. Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш учун турли миқдордаги АТФ эритмасидан фойдаланилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижаларни дафтарингизга ёзиб, тегишли хулоса чиқаринг.

75- и ш. КРЕАТИНКИНАЗА ФЕРМЕНТИ. ФАОЛЛИГИНИ
АНИҚЛАШ

Креатинкиназа ферменти асосан мушак тўқималарида жойлашган бўлиб, енгил қайтар реакция: АТФ даги фосфат қолдикни креатинга ва креатинфосфатдан АДФ га ўтказишни катализлайди. Креатинфосфатнинг парчаланишидан ҳосил бўлган фосфат иони оксилдан тозалангач, сариқ рангли фосфор аммоний молибден комплекс бирикмаси шаклида аниқланади, чунки ушбу фермент креатинфосфатдаги фосфорни АДФ га енгил ўтказа олади.



Креатинкиназа организмда мушаклар қисқаришини энергия билан таъминлашда иштирок этади, айниқса мушакларнинг фаол қисқариши жараёнида энергияга бўлган талаб ортади.

Мушаклар фаол ишлаганда, истмалаганда, узок муддат оч қолганда, қандли диабетда, витамин Е етишмаслигида, мушаклар шикастланганда, гипотиреозда, марказий нерв системаси касалликларида, юрак инфарктида қон зардобида креатинкиназа ферментининг фаоллиги бирмунча ортади. Мушаклар фаолияти сусайганда (миопатия, мушаклар дистрофиясида) фермент фаоллиги аксинча сусаяди. Чақалоқлар ва кичик ёшдаги болалар қон зардобининг таркибидаги креатинкиназа ферментининг фаоллиги турли ёшда турлича бўлади.

45- жадвал

Болалар қон зардобининг таркибидаги креатинкиназа ферментининг ёшга қараб ўзгариши

Болаларнинг ёши	Қон зардобидаги креатинкиназа фаоллиги	
	мкмоль/мин л	мкмоль л ⁻¹ —С ⁻¹
Янги туғилган болаларда	180	3,0
3 ҳафтадан 3 ойгача	91	1,5
3 ойдан 1 ёшгача	66	1,1
3—6 ёшларда	62—59	1,03—0,98
Катталарда	46	0,77

Креатинкиназа ферменти фаоллигини аниқлаш шифокорларнинг амалий ишида катта аҳамиятга эга. Фермент фаоллиги турли усуллар билан аниқланади. Берилаётган усул тайёр реактивлар йиғиндиси билан ишлашга асосланган.

Усулнинг асоси. Креатинфосфатнинг парчаланишидан ҳосил бўлган фосфат кислотанинг комплекс бирикмаси аниқланишига асосланган. Бирикма сариқ ранг ҳосил қилади. Унинг зичлиги фермент фаоллигига тўғри келади.

Текширилувчи материал: қон зардоби

Реактивлар: Тайёр реактивлар йиғиндисидан фойдаланилади:

1. Идишдаги 0,670 г субстрат 80°C гача иситилган бидистилланган сувнинг 10 мл сида эритилади. Эритма совитилгач яна 15 мл бидистилланган сув солинади ва аралаштирилади. Эритма совукда сақланади. Эритманинг хираланиши фермент фаоллигига таъсир кўрсатади. Шунинг учун эритма филтрланиши керак.

2. Буфер эритма — 0,450 г буфер аралашмаси субстрат тайёрлагандек тайёрланади ва сақланади.

3. Активатор — 45 мг цистеинхлорид 5 мл бидистилланган сувда эритилади. Совукда сақланади. Эритма икки кун ичида сарфланиши керак.

4. АТФ эритмаси. 40 мг АТФ 2,1 мл бидистилланган сувда эритилади. Эритма доимо янгитдан тайёрланади.

5. Реактив тайёрлаш. Аммоний ваннадий эритмаси ва аммоний молибден эритмалари аралаштирилади.

Керакли анжомлар. Штатив ва пробиркалар, пипеткалар, термостат ёки сув ҳаммоми, воронкалар, ФЭК ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Фермент фаоллигини аниқлаш жадвалда кўрсатилган тартибда олиб борилади.

46- ж а д в а л

	Пробиркалар			
	1	2	3	4
Субстрат эритмаси	0,50	—	0,50	—
Буфер эритмаси	—	0,50	—	0,50
Эталон эритмаси	—	—	0,05	—
Активатор эритмаси	0,20	—	—	—
Қон зардоби	0,05	0,05	—	—
Бидистилланган сув	—	0,20	0,20	0,25

Барча пробиркалардаги суюқликлар аралаштирилади ва 5 дақиқа 37°C ли сув ҳаммомида ёки термостатда ушланади

АТФ эритмаси	0,10	0,10	0,10	0,10
--------------	------	------	------	------

Суюкликлар аралаштирилиб 37° С да бир соат ушланади ва уларга УХСК эритмасидан 0,3 мл дан солинади.

УХСК эритмаси	0,30	0,30	0,30	0,30
---------------	------	------	------	------

Суюкликлар аралаштирилиб, 5 дакика ўтгач оксиди центрифугада чуқтирилади ёки фильтр қоғоздан ўтказилади.

Оқсилсиз суюқлик (филтрат)	0,60	0,60	0,60	0,60
Реактив аралашмаси	0,80	0,80	0,80	0,80

Суюкликлар аралаштирилиб 5 дакика ўтгач фотоэлектродколориметрланади (400 нм тўлқин узунлигида). 1 см калинликдаги кювета ишлатилади. Суюкликнинг зичлиги спектрофотометрда ўлчаниши ҳам мумкин. Фермент фаоллигини ҳисоблаш. $X = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \cdot 20$; Креатинкиназа фаоллиги Е/л кон зардоби учун ҳисобланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижаларни дафтарингизга ёзинг. Тегишли хулоса чиқаринг.

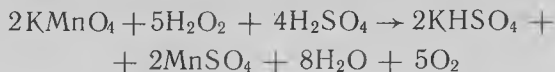
76-и ш. КАТАЛАЗА ФЕРМЕНТИ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Каталаза организмнинг барча тўқималарида, оксидланиш-қайтарилиш жараёнларида ҳосил бўлган водород пероксидни сув ва кислородгача парчаланиш реакциясини катализлайди. Кимёвий табиати жиҳатидан ушбу фермент гем тутувчи ферментлар каторига киради.

Каталаза ферментининг фаоллиги турли касалликларда пасаяди ва организмнинг водород пероксид билан захарланиши кузатилади. Турли хилдаги камқонлик ҳолатларида, темир етишмовчилигида ва сурункали касалликларда каталазанинг фаоллиги ўзгаради. Шифохоналарда бу фермент фаоллигини аниқлаш амалий аҳамиятга эга.

Усулнинг асоси. Реакцияга киришмай (ларчаланмай) қолган водород пероксид ва парчаланган пероксиднинг фарқини топиш йўли билан фермент фаоллиги аниқланади.

Усулнинг кимёвий тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: кон.

Реактивлар: водород пероксиднинг 10 % ли ва 1 % ли эритмаси, калий перманганатнинг 0,1 н эритмаси, сульфат кислотанинг 10 % ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, пипеткалар, стаканчалар ёки колбачалар.

Бажариладиган иш тартиби. 10—15 мл дистилланган сувга бармоқдан олинган 0,1 мл кон солинади ва аралаштирилади. Суюқликнинг умумий ҳажми дистилланган сув билан 100 мл га етказилади. Суюқлик 30 дақиқага қолдирилади. Бу вақтда эритроцитлар ёрилади ва ичидаги фермент ташқарига чиқади. Ушбу суюлтирилган ва гемолизланган қондан 1 мл дан олиб, 10 мл дистилланган сув солинган иккита қолбага солинади. Қолбаларнинг бири 3—5 дақиқа қайнатилади. Каталаза ферменти фаоллигини йўқотади. Сўнг ҳар иккала қолбага 2 мл дан водород пероксиднинг 1 % ли эритмасидан солиб 30 дақиқа қолдирилади. Реакция 5 мл сульфат кислота-нинг 10 % ли эритмаси қўшиш билан тўхтатилади. Водород пероксиднинг парчаланиш даражаси перманганат калийнинг 0,1 н эритмаси билан титрлаш орқали аниқланади. Текширилувчи (қайнатилмаган) ва назорат (қайнатилган) тажрибалар учун кетган калий перманганат миқдорининг фарқи топилади.

Фермент фаоллигини ҳисоблаш. Фермент фаоллиги каталаза сони билан ифодаланади. Водород пероксиднинг мг миқдори 1 мл қондаги каталаза билан парчаланиши каталаза сони дейилади. Соғлом одамларда унинг ўртача миқдори 12—20 ТБ га тенг.

$X + (A_2 - A_1) \cdot 1,7$ бунда A_2 — назорат тажриба эритмасини титрлаш учун кетган калий перманганат миқдори, A_1 — текширилувчи тажриба учун кетган калий перманганат миқдори, 1,7—0,1 н. H_2O_2 грамм эквиваленти.

Олинган натижаларни дафтарингизга ёзиб, расмийлаштиринг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Модда ва энергия алмашинувининг аҳамияти,
2. Катаболизм ва унинг босқичлари, аҳамияти.
3. Анаболизм, унинг аҳамияти.
4. Катаболизм ва анаболизм жараёнларининг бир-бирига боғлиқлиги.
5. Экзоэргик ва эндоэргик реакциялар.
6. Макроэргик бирикмалар (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УТФ, ТТФ, креатинфосфат, ацетил-КоА ва ҳоказолар).
7. АДФ — АТФ халқаси.
8. НАД га боғлиқ дегидрогеназалар, тузилиши, биологик аҳамияти.

9. НАД коферментига боғлиқ бўлган субстратлар.
10. ФАД га боғлиқ дегидрогеназалар, ФМН-дегидрогеназалар, уларнинг тузилиши ва биологик аҳамияти.
11. ФМН, ФАД коферментларининг субстратлари.
12. Цитохромлар, уларнинг турлари, тузилиши, биологик аҳамияти.
13. Пироузум кислотанинг оксидланиш йўли билан декарбоксилланиши, реакциянинг кетма-кетлиги, иштирок этадиган коферментлари, аҳамияти.
14. Кребс (уч карбон кислоталар) халқаси, реакциянинг кетма-кетлиги, иштирок этадиган ферментлар ва коферментлар.
15. Кребс халқасида ҳосил бўладиган субстратлар.
16. Ҳосил бўлган субстратларнинг дегидратланиши, коферментлари.
17. Нафас олиш занжирида коферментларнинг кетма-кет жойлашиши.
18. Узуқ, қискартирилган, қўшимча нафас олиш занжири (электронларни ўтказиш занжири).
19. Оксидланиш-қайтарилиш потенциаллари, уларнинг ўзгариши.
20. Оксидловчи фосфорланиш (нафас олиш занжирига боғлиқ бўлган фосфорланиш), унинг назариялари, ҳосил бўлган АТФ микдори.
21. Субстратли фосфорланиш.
23. Кребс халқасининг (нафас олиш занжири) электрон ўтказиш занжири билан боғлиқлиги.
24. Кребс халқаси ва (ЭЎЗ) электрон ўтказиш занжирининг бошқарилиши.
25. Кислород етишмовчилиги (гипоксия) ҳолатларида нафас олиш занжирининг ўзгариши.

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Митохондрия суспензиясига изоцитрат ва АДФ солиниб 37°C да бир неча дақиқа ушланса қандай ўзгариш содир бўлади? Қандай моддалар ҳосил бўлади? Реакцияни қандай ферментлар катализлайди? Р/О қиймати нечага тенглигини аниқланг.
2. Митохондрия суспензиясига лактат, АДФ ва 2,4-динитрофенол солиб 37°C да бир неча дақиқа ушланади. Кузатиладиган ўзгаришларни изоҳлаб беринг. Қандай моддалар ҳосил бўлади? Р/О қиймати қандай бўлади?
3. Митохондрия суспензиясига сукцинат, АДФ солиб 37°C да бир неча дақиқа ушланса, ушбу моддалар микдори қандай ўзгаради. Реакциянинг Р/О қиймати нечага тенг бўлади. Реакцияни қандай фермент катализлайди.
4. Қалтирашнинг биологик аҳамияти қандай? Тана ҳарорати қандай қилиб қалтираш билан ушлаб турилади? Қалин кийинишнинг сабаби нима?
5. Витамин РР, В₁, В₆, В₂ ларнинг қайсилари НАД га, ФАД га боғлиқ ва қайсилари пируватдегидрогеназа комплекси таркибига киради?
6. Шифохонада камқонлик хасталигидан даволанаётган беморнинг қон таркибидаги ферменти аниқланди. Қандай фермент аниқланди, унинг аҳамияти қандай эканлигини айтинг.
7. Беморнинг қон таркибида каталаза ферментининг фаоллиги кескин пасайганлиги аниқланди. Беморнинг ҳаёти хавф остида эканлигини тушунган шифокор қандай тадбирларни қўлламоғи лозим.

ОКСИЛ ВА АМИНОКИСЛОТАЛАР АЛМАШИНУВИ

Оксил алмашинуви мураккаб жараён бўлиб, бир нечта босқичда амалга оширилади. Оксил алмашинувининг биринчи босқичи меъда-ичак системасида амалга оширилади. Протеолитик ферментлар — пепсин, трипсин, хемотрипсин, аминопептидазалар, карбоксипептидазалар ва дипептидазалар таъсирида оксиллар аминокислоталаргача парчаланadi. Ҳосил бўлган аминокислоталар конга сўрилиб, хужайраларга етказилади ва асосан оксиллар, пептидлар, пептид табиатига эга бўлмаган моддалар (гем, пурин, пиримидинлар), холин, таурин, биоген аминлар, тироксин, адреналин гормонлари ва бошқа кўпгина бирикмалар синтези учун ишлатилади. Озиқа оксилларининг биологик қиймати аминокислоталар таркиби билан ўлчанибгина қолмай, балки шу оксилларнинг сингиш даражаси билан ҳам ўлчанади. Маълумки, озиқа оксиллар организмга алмаштириб бўлмайдиган аминокислоталарни (фенилаланин, гистидин, триптофан, валин, лейцин, изолейцин, метионин, тиреонин, лизин ва аргининни) етказиб беради. Айтилган аминокислоталарнинг бирортаси етишмаганда оксиллар синтези бузилади. Оксилларнинг кўпчилик қисми гўшт, балик, тухум, пишлоқ орқали организмга тушади. Ўсимлик маҳсулотларидан ловия, нўхат, мош каби дуккакликлар ҳам оксилларга бой.

Организмда 30 г эркин аминокислота бўлиб, кон таркибида унинг миқдори 35—65 мг/дл ни ташкил қилади. Аминокислоталарнинг асосий қисми оксиллар таркибига киради. Қатта кишилар организмда 15 кг оксил бўлади. 400 г гача оксил бир суткада парчланиб, қайта синтезланади. Оксил алмашинуви азот тенглиги билан ўлчанади, яъни озиқа оксиллари билан тушган азот ва организмдан чиқарилган азотнинг фарқи топилади. Ўсувчи организмда ҳомилдорлик даврида, сурункали оғир касалликдан тузалиш даврида чиқарилаётган азот миқдори организмга тушаётган азотдан камроқ бўлади. Бундай ҳолат мусбат азот тенглиги дейилади. Аксинча, узок муддат сурункали касаллик билан касалланганда, оч қолганда, қариликда, ўсма касалликларида организмдан чиқарилаётган азот миқдори организмга тушаётган азот миқдоридан кўпроқ бўлади. Бу манфий азот тенглиги

дейлади. Ўрта ёшдаги соғлом одамларда чиқарилаётган ва организмга тушаётган азот миқдори тенг бўлади. Бундай ҳолат азот тенглиги (азот мувозанати) дейлади. Оксиллар алмашинувининг иккинчи босқичи хужайра цитоплазмасида ва митохондриясида амалга оширилади. Бунда аминокислоталар парчаланиб улардан аммиак, CO_2 , H_2O ва АТФ, азотсиз углеводли бирикмалар, биоген аминлар ҳосил бўлади. Аминокислоталарнинг дезаминланишидан ҳосил бўлган аммиак жигарда сийдикчилга айланади ва охириги маҳсулот сифатида сийдик билан ташқарига чиқарилади.

Суткалик азот тенглигини сақлаш учун одам 30—50 г оксил истеъмол қилиши керак. Аммо бу миқдор инсон соғлиғи ва ишлаш қобилиятини сақлаш учун етарли эмас. Бир суткалик ўртача физиологик қобилиятни сақлаш учун одам ёшига ва вазнига қараб турли миқдорда, 100 г гача оксил истеъмол қилиши мумкин (47- жадвалга қаранг). Оксил алмашинуви ёшга ва касалликларга қараб турлича ўзгаради. Шу боис оксиллар алмашинувини ўрганиш шифокор учун амалий аҳамиятга эга.

Бўлимнинг мақсади:

1. Ўқувчиларни меъда шираси таркибини аниқлаш усуллари билан таништириш, уларга меъда ва ичак протеолитик ферментлари фаоллигини ўлчаш усулларини ўргатиш. Олинган билимлардан келажакда меъда-ичак касалликларини аниқлашда ва даволашда фойдаланиш йўллари ўргатиш.

2. Аминокислоталарнинг трансаминланиши, декарбоксилланиши бўйича бажарилган амалий ишларга қараб оксилларнинг тўқималарда алмашинув йўллари ўрганиш, билимларни бойитиш ва мустаҳкамлаш.

3. Сийдик таркибидаги оксиллар алмашинувидан ҳосил бўлган охириги маҳсулотларни (сийдикчил, сийдик кислота, креатинин) аниқлаш ва олинган билимларни амалда қўллашни ўрганиш.

МЕЪДА ВА МЕЪДА ОСТИ БЕЗИ ШИРАСИ ТАРҚИБИНИ АНИҚЛАШ

Оксилларнинг меъдада ҳазм бўлиши пепсин таъсирида амалга оширилади. Бунда меъда шираси таркибидаги хлорид кислота катта аҳамиятга эга. Хлорид кислота меъда безларини қопловчи хужайраларда ҳосил бўлиб, меъдага ажралади. Шунинг учун катта ёшли одамларнинг меъда шираси кучли нордон хоссага эга. Унинг рН и 1—2 га тенг бўлади. Меъда безларининг асосий

хужайраларида фаол бўлмаган фермент — пепсиноген ишлаб чиқарилади. Хлорид кислота таъсирида (нордон муҳитда) пепсиноген фаол пепсинга айланади. Пепсиногеннинг N-учидан 42 та аминокислота (18 %) (5 нейтрал, 1 ишқорий пептид) ажралиб, пепсин ҳосил бўлади. Пепсиннинг кейинги молекулалари аутокатализ йўли билан ҳосил бўлади. Бундан ташқари, нордон шароитда оксиллар денатурацияланади ва уларнинг пепсин таъсирида парчаланиши осонлашади. Хлорид кислота таъсирида меъдага тушган микроорганизмлар ҳалок бўлади. Чақалоклар меъда ширасининг рН и ўсиш жараёнида ўзгариб боради (47-жадвалга қаранг). Чақалоклар меъда шираси таркибида сут оксиллини ивитадиган ренин ферменти бор. У Ca^{2+} ионлари иштирокида эриган сут казеинини эримайдиган турига айлантиради. Катта ёшдаги одамларнинг меъда ширасида ренин бўлмайди. Сут оксиллари пепсин ва хлорид кислотанинг биргаликда таъсири натижасида ивийди.

Кўпинча меъда-ичак касалликларида хлорид кислота ва пепсиноген ишлаб чиқарилиши бузилади. Бу вақтда хлорид кислота миқдори ёки кўпаяди ёки камаяди. Хлорид кислота ва пепсиноген ишлаб чиқарилишининг батамом бузилиши одатда бир вақтда содир бўлади.

Ошқозон-ичак касалликлари, меъда безлари фаолиятини аниқлаш мақсадида меъда шираси таркибидаги хлорид кислота миқдори текшириб кўрилади. Бунинг учун зонд ёрдамида меъда шираси олинади. Меъда безлари фаолиятини аниқлаш учун тери остига гистамин юборилади ва ҳар 15 дақиқада меъда шираси тортиб олиниб текширилади.

47- жадвал

Меъда шираси кислоталигининг ёшга боғлиқлиги (100 мл меъда ширасини нейтраллаш учун сарфланган 0,1-N натрий гидроксиднинг мл миқдори)

Янги туғилганларда	1—2 ойлик-да	1 ёшда	4—7 ёш-да	7—11 ёшда	катталарда	
рН	7,0	5,8	3,4	2,5	2,0	1,5—2,0
Эркин НСІ	0,5	0,8—4,5	6—10	10—15	15—20	20—40
Умумий кислоталик	2,8	3,6—10	12—21	30—35	40—60	40—60
Пепсиннинг нисбий бирлиги	—	2,8	16—32	16—32	16—32	—
Ренин (химозин)	—	16—32	216—512	512	512	—

Соғлом одамларга гистамин юборилгандан бир соат ўтгач хлорид кислота микдори 100 ммоль/л га етади, яъни у юкори даражада бўлади. Меъда ва 12 бармоқ ичак яраларида, гиперацид гастритда хлорид кислота микдори юкори бўлади. Гиноацид гастритда эса аксинча хлорид кислота микдори камаяди. Атрофия ҳолатларида хлорид кислота, пепсин мутлоқ бўлмайди. Бу кўпинча ҳавфли камқонликда кузатилади. Бунга сабаб Қасла омилининг бўлмаслиги натижасида витамин В₁₂ нинг сўрилмаслигидир.

1. МЕЪДА ШИРАСИ КИСЛОТАЛИЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Қатта ёшдаги одам бир суткада 1,5 л гача меъда шираси ажратади. Меъда шираси рангсиз кучли кислоталиликка эга бўлиб, унинг таркиби қуйидагича:

1. Солиштирма оғирлиги	1,006—1,009
2. рН	0,92—1,58
3. Н ₂ О	99,5 %
4. Курук қолдик	0,5—0,6 %
5. Органик моддалар	0,4—0,5 %
6. Анорганик моддалар	0,1 %
7. Хлорид кислота:	
а) умумий микдори	0,45—0,6 %
б) эркин хлорид кислота	0,4—0,5 %
8. Хлоридлар	0,5—0,6 %

Меъда шираси таркибида пепсин, гастриксин, ренин каби ферментлар, гастрин гормони, Қасла омили (витамин В₁₂ нинг сўрилишини осонлаштиради), гликопротеинлар — муцинлар ва кислотали муҳит яратувчи фосфатлар ва бошқа моддалар учрайди. Меъда шираси таркибидаги хлорид кислота микдори кескин камайиши натижасида сут кислота пайдо бўлади. Айрим касаллик ҳолатларда меъда шираси таркибида қон ва ўт кислоталар, ўт пигментлари пайдо бўлади.

77- иш. МЕЪДА ШИРАСИ ТАРКИБИДАГИ ЭРҚИН ХЛОРИД КИСЛОТАГА УТҚАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯ

Текширилувчи материал: меъдадаги меъда шираси, қон тутувчи меъда шираси, сут кислота тутувчи меъда шираси.

Реактивлар: 0,2 % ли водород хлорид эритмаси, 2,4-диметиламиноазобензолнинг спиртдаги 0,5 % ли эритмаси (индикаторнинг рангга ўтиш рН и 2,9—4,0), қонго индикатор қоғози (3,0—5,2), фенолнинг 2 % ли эритмаси, темир (III) хлориднинг 1 % ли эритмаси, водород

пероксиднинг 1 % ли эритмаси, бензидиннинг спиртдаги 0,2 % ли эритмаси.

Керакли анжомлар: шиша ойначалар, шиша таёкчалар, бюреткалар, пробиркалар ва штативлар.

Бажариладиган иш тартиби. а) конго индикатор коғозига шиша таёкча ёрдамида бир томчи 0,2 % ли хлорид кислота эритмаси томизилади. Қоғоз кўкаради. Ушбу иш меъда шираси билан қайтарилади. Меъда шираси томизилган жойда кўк рангнинг ҳосил бўлиши унинг таркибида эркин хлорид кислота борлигини исботлайди.

б) иккита пробирканинг бирига 0,2 % ли хлорид кислота эритмаси, иккинчисига меъда ширасидан 10 томчи солиб уларнинг устига 1—2 томчи диметиламиноазобензол эритмаси томизилади. Ҳар иккала пробиркадаги суюқликнинг ранги ўзгариши, яъни кизғиш-олча ранг пайдо бўлиши кузатилади.

в) меъда шираси таркибидаги сут кислотага ўтказиладиган сифат реакция (Уффельман реакцияси). Ушбу реакция уч валентли темир тузларининг сут кислота билан ҳосил қиладиган темир (III) лактатнинг сариқ-яшил тусга киришига асосланган. Бу бирикма хлорид кислота таъсирида тезда парчаланadi.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Иккита пробиркага фенолнинг 2 % ли эритмасидан 20 томчи солиб, устига темир (III) хлориднинг 1 % ли эритмаси бинафша ранг ҳосил бўлгунча томизилади.

2. Пробиркадаги суюқликларнинг бирига кислоталилиги камайган, сут кислота тутувчи меъда ширасидан 1—3 томчи солинади, иккинчи пробиркага эса кислоталилиги ўртача меъда ширасидан 1—3 томчи солинади.

3. Биринчи пробиркадаги бинафша рангли суюқлик сариқ-яшил рангга киради. Иккинчи пробиркадаги бинафша ранг меъда шираси таркибидаги хлорид кислота таъсирида рангсизланади.

г) меъда шираси таркибидаги қонни бензидин реакцияси билан аниқлаш. Қон гемоглобини водород пероксидни сув ва кислородга парчалаш хоссасига эга. Ҳосил бўлган кислород эса бензидинни оксидлайди ва унинг рангини ўзгартиради.

Бажариладиган иш тартиби. Иккита пробиркага 1 % ли водород пероксид эритмасидан 5 томчи ва 0,2 % ли бензидиннинг спиртдаги 0,2 % ли эритмасидан 4—5 томчи солиб уларнинг бирига қон тутувчи, иккинчисига қонсиз меъда ширасидан 20 томчи томизилади ва аралаштирилади. Қон тутувчи меъда шираси солинган пробиркадаги

суюклик бензидинни оксидлагани учун кўкаради. Иккинчисида қон бўлмагани учун ранг ўзгариши кузатилмайди.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Ўтказилган сифат реакция натижаларини қуйидаги жадвалда келтиринг.

48- жадвал

Аниқланаётган таркибий қисм	Ишлатилган реактивлар	Меъда шираси		
		меъёрда	сут кислотали	қонли
Эркин HCl	Конго қизили Диметиламиноазобензол			
Сут кислота	Темир (III) феноляти			
Қон	Бензидин			

78-и ш. МЕЪДА ШИРАСИ КИСЛОТАЛИЛИГИНИ ЎЛЧАШ

Меъда шираси таркибида 4 хил кислоталилик тафовут қилинади: Ҳеч қайси бирикма билан боғланмаган водород хлорид кислота (эркин HCl); оксил билан боғланган (боғланган HCl); эркин ва боғланган водород хлорид кислотанинг йиғиндиси (умумий HCl); эркин, боғланган ва умумий HCl нинг йиғиндиси ҳамда меъда ширасидаги кислотали муҳит ярата оладиган бошқа нордон моддаларнинг йиғиндиси (умумий кислоталилик).

Меъда ширасининг ушбу кислоталиликлари индикатор иштирокида натрий гидроксиднинг 0,1 моль/л эритмаси билан титрлаш йўли орқали аниқланиши мумкин.

Умумий кислоталилик фенолфталеин индикатори иштирокида (pH нинг ўтиш чегараси 8,2—10) 1000 мл меъда ширасини титрлаш учун (HCl ва бошқа кислоталик хусусиятига эга бўлган моддаларни нейтраллаш учун) сарфланган 0,1 моль/л натрий гидроксид миқдори билан ўлчанади. Умумий кислоталиликнинг ўртача миқдори 40—60 моль/л га тенг.

Эркин хлорид кислота диметиламиноазобензол индикатори иштирокида (pH и 1,0—3,0) 100 мл меъда ширасини нейтраллаш учун сарфланган 0,1 моль/л натрий гидроксид миқдори билан ўлчанади. Унинг ўртача миқдори 20—40 моль/л га тенг.

Боғланган хлорид кислота юкоридагидек ализарингидросульфонат натрий индикатори иштирокида

(рН и 4,3—6,3) ёки фенолфталеин ва диметиламиноазобензол индикатори ёрдамида аниқланган умумий кислоталиқни эркин кислоталиқдан айириш йўли билан топилади. Унинг ўртача миқдори 10—20 моль/л.

Текширилувчи материал: меъда шираси.

Реактивлар: натрий гидроксиднинг 0,1 моль/л эритмаси, фенолфталеиннинг спиртдаги 1 % ли эритмаси, диметиламиноазобензолнинг спиртдаги 0,5 % ли эритмаси, ализарингидросульфонат натрийнинг (қизил ализарин) 1 % ли сувдаги эритмаси.

Керакли анжомлар: 50—100 мл ли қолбалар, бюреткалар, пробиркалар ва штативлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Учта қолбага 5 мл меъда шираси солинади. Уларнинг биринчисига 1—2 томчи фенолфталеин, иккинчисига 1—2 томчи диметиламиноазобензол, учинчисига 1—2 томчи ализарин қизил индикатори солиб аралаштирилади. Сўнгра ҳар қайси қолба алоҳида 0,1 моль/л натрий гидроксид эритмаси билан титрланади. Титрлаш жараёнида суюқликларнинг ранги ўзгаради. Қолбаларнинг тагига оқ қоғоз қўйилади. Титрлаш жараёнида жуда эҳтиёт бўлиш керак. Титрлаш тугагач кислоталиқ миқдори ҳисобланади.

2. Барча кислоталиқни битта қолбада аниқлаш.

Қолбага 5 мл меъда шираси, 1—2 томчи диметиламиноазобензол ва 1—2 томчи фенолфталеин томизилади. Кислотали шароитда фенолфталеин рангсиз, диметиламиноазобензол эса қизил рангга бўялади. Титрлаш жуда оҳисталиқ билан ўтказилади. Бюреткага солинган натрий гидроксидни титрлаш учун сарфланган миқдори маълум белгисидан бошлаб ҳисобга олинади. Масалан, меъда шираси қизил рангининг сарғиш-қизғиш тусга ўтиши учун натрий гидроксид эритмасидан 1,5 мл сарфланади. Титрлаш оч сарик ранг ҳосил бўлгунча давом эттирилади. Меъда шираси оч сарик рангга кириши учун натрий гидроксиднинг «О» дан сарфланган миқдори 2,0 мл ни ташкил қилди. Бу иккинчи белги. Оч сарик рангни оч пушти рангга ўтгунча титрлаш учун 2,5 мл натрий гидроксид сарфланди. Меъда ширасининг қизил рангдан сарик-қизғиш (сарик ранг) рангга ўтишида диметиламиноазобензол индикаторининг рН и 1—3 гача ўзгарганлиги маълум бўлди. Демак, эркин хлорид кислота тўлиқ нейтралланади. Иккинчи (сарик-қизғиш рангининг оч сарик рангга ўтиши) белги умумий ва боғланган хлорид кислотани топиш учун ишлатилади. Охири оч пушти рангининг ҳосил бўлиши (учинчи белги) умумий кислоталиқ кўрсаткичидир.

Хисоблаш учун мисол: 100 мл меъда шираси таркибидаги кислотани нейтраллаш учун сарфланган натрий гидроксид микдори куйидагича: 1. Биринчи белгигача сарфланган натрий гидроксид микдори 1,5 мл. $20 - 30$ эркин хлорид кислота (моль/л). 2. Умумий кислоталилик. Учинчи белгигача сарфланган натрий гидроксид микдори $2,5 \cdot 20 = 50$ титрл. бирл. (моль/л). 3. Иккинчи ва учинчи белгилар учун сарфланган натрий гидроксид йиғиндисининг ўртача арифметик қиймати умумий хлорид кислота кўрсаткичи хисобланади. $2,0 - 2,5 - 4,5/2 - 2,25 \cdot 20 = 45$ (моль/л). Умумий хлорид кислота кўрсаткичидан эркин хлорид кислота кўрсаткичини айирсак боғланган хлорид кислота микдорини топган бўламиз. $50 - 30 - 20$. Катта ёшдаги соғлом одамлар меъда ширасининг кислоталилиги ўртача куйидагича: Эркин HCl — $20 - 40$ титр бирлигига; боғланган HCl $10 - 20$ титр бирлигига; умумий хлорид кислота $40 - 60$ титр бирлигига, умумий кислоталилик $40 - 60$ титр бирлигига (моль/л) тенг. Эркин хлорид кислота микдорининг ортиб кетиши гипоцид гастрит, меъда ва 12 бармоқ ичак яраларида кузатилади. Тўкималар яллиғланганда қон ёки ўт пигментлари меъда ширасига ўтиши мумкин. Кислота микдорининг одатдагидан камайиши гипоцид гастритда кузатилади. Кислоталиликнинг йўқолиб кетиши аноцид гастритда кузатилади. Бу ҳолда микроорганизмлар кўпайиб, бижғиш аломати юзага келади ва меъда шираси таркибида сут кислота пайдо бўлади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижаларни куйидаги жадвалга ёзинг. Ўртача кўрсаткич билан таққосланг ва тегишли хулоса чиқаринг.

49- жадвал

Титрлаш учун олинган меъда шираси, мл	Титрлаш учун сарфланган натрий гидроксид, мл	100 м меъда шираси учун титрлаш бирлиги
Хулоса:	олинган натижа	ўртача кўрсаткич
Эркин HCl		
Боғланган HCl		
Умумий HCl		
Умумий кислоталилик		

79- и ш. ПЕПСИН ТАЪСИРИДА ОҚСИЛЛАР ПАРЧАЛАНИШИНИ АНИҚЛАШ

Пепсин ички пептид боғларнинг парчаланиш жараёни тезлатади. Бир грамм пепсин 25 кг тухум оксилени 1 соатда парчалайди. Пепсин Тир — Х, Глу — Лей, Вал — Лей орасидаги пептид боғни парчалайди. Пепсин таъсирида катта бўлакчи пептидлар—альбумозлар ҳосил бўлади.

Пепсин таъсирини, эримайдиған оксилларни фибриннинг эришини кузатиш билан аниқлаш мумкин. Эриған оксил биурет реакциясини беради ва эритмада пептидлар ҳосил бўлганлигини исботлайди.

Текширилувчи материал: меъда шираси ёки пепсиннинг 0,2 % ли хлорид кислотадаги 0,1 % ли эритмаси.

Реактивлар: пишған тухум оксили ёки фибрин бўлакчалари, натрий гидрокарбонат тузининг 10 % ли эритмаси, кизил лакмус.

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, бюреткалар, пипеткалар, 37—40°C ли термостат ёки сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Учта пробиркага 1 мл дан пепсин эритмаси ёки меъда шираси солинади. Биринчи пробиркадаги эритма икки дақиқа қайнатилади ва совук сув остида совитилади. Иккинчи пробиркадаги эритма 10 % ли натрий гидрокарбонат эритмаси билан (3—4 томчи) нейтралланади. Учинчи пробиркадаги эритма ўзгартирилмайди.

2. Уччала пробиркага фибрин ёки тухум оксиленинг кичик бўлакчаси солинади ва 37—40°C ли термостатга 35—45 дақиқага жойлаштирилади. Бир оздан сўнг пробиркалар термостатдан олиниб, эритмалари аралаштирилади. Пробиркага солинған оксил бўлакчаларининг эриған-эримаганлиги кузатилади. Оксил бўлакчалари эриған пробиркада биурет реакцияси ўтказилади (26-ишга қаранг).

Олинған натижаларни расмийлаштириш. Олинған натижалар қуйидаги жадвалда келтирилади ва тегишли ҳулоса чиқарилади.

50- жадвал

Пробиркалар	Субстрат	Фермент	Эритма муҳити	Кузатилган ўзгаришлар	Биурет реакцияси	Ҳулоса

80-и ш. МЕЪДА ОСТИ БЕЗИ ШИРАСИ ФЕРМЕНТЛАРИ ТАЪСИРИДА ОКСИЛЛАРНИНГ ПАРЧАЛАНИШИ

Оксиллар ва ҳосил бўлган альбумозларнинг парчаланиши 12 бармоқли ичакда давом этади. Парчаланиш жараёни меъда ости бези шираси таркибидаги трипсин, химотрипсин таъсирида амалга оширилади. Улар таъсирида кичик бўлакли пептидлар ва кам миқдорда эркин аминокислота ҳосил бўлади. Ушбу ферментларнинг таъсирини аниқлаш учун фермент манбаи сифатида панкреатиннинг 0,5 % ли натрий карбонатдаги 2 % ли эритмаси ёки меъда ости безининг глицеринли ажратмасидан фойдаланилади. Субстрат сифатида пиширилган тухум ёки фибрин бўлакчалари ишлатилади.

Текширилувчи материал: 0,5 % ли натрий карбонатда тайёрланган панкреатиннинг 2 % ли эритмаси ёки меъда ости безининг глицеринли ажратмаси.

Реактивлар: фибрин ёки пиширилган тухум бўлакчалари, сирка кислотанинг 1 % ли эритмаси, кўк лакмус қоғоз.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар 40°C ли термостат ёки сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. Учта пробиркага панкреатин эритмаси ёки панкреатин ажратмасидан 1 мл солинади. Биринчи пробиркадаги эритма бир неча дақиқа қайнатилади ва сув тагида совитилади. Иккинчи пробиркадаги эритманинг муҳити (лакмус қоғози ёрдамида) 1 % ли сирка кислота билан нордонлаштирилади. Учта пробирканинг ҳар бирига фибрин оксиди бўлакчалари солинади ва 37—40°C ли термостатга жойлаштирилади.

40—60 дақиқадан сўнг пробиркалар термостатдан олинади ва эритмалар аралаштирилади. Оксил бўлакчалари билан бўлган ўзгаришлар кузатилади ва барча пробиркадаги эритмалар билан биурет реакцияси ўтказилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

51- жадвал

Эритма ёки реактив	Пробиркалар		
	1	2	3
Субстрат			
Фермент			
Эритма муҳити			
Кузатилган ўзгаришлар			
Биурет реакцияси			

**81-и ш. МЕЪДА ШИРАСИ ТАРҚИБИДАГИ ПЕПСИН ВА
СИЙДИК ТАРҚИБИДАГИ УРОПЕПСИН ФАОЛЛИГИНИ
МИҚДОРИЙ АНИҚЛАШ**

Усулнинг асоси. Меъда шираси таркибидаги пепсин сут оксили — казеиноденни ивитиш хоссасига эга. рН и $4,9,25^{\circ}\text{C}$ да сут-ацетат аралашмасининг пепсин таъсирида ивиши оксилнинг сингиш вақтига тўғри келади. Пепсиннинг фаоллик бирлиги килиб 5 мл сут-ацетат аралашмасининг 60 дақиқада ивитадиган миқдори олинади (ушбу нисбий бирлик 0,010 мг кристалл пепсинга тўғри келади). Меъда ширасининг 1 мл сида 40—60 пепсин бирлиги бор.

Сийдик таркибидаги уропепсиннинг фаоллиги юқоридагидек аниқланади.

Текширилувчи материал: меъда шираси ёки текширилувчи пепсин эритмаси, сийдик.

Реактивлар: рН и 4,9 бўлган ацетат буфер эритмаси (тайёрланиши 284-бетда), сут-ацетат аралашмаси (тайёрланиши 283-бетда). Водород хлориднинг 2 М эритмаси, пепсиннинг доимий стандарт эритмаси (100 мг кристалл пепсин 100 мл 0,2% ли водород хлоридда эритилади).

Керакли анжомлар. Термостат, сув ҳаммоми, секундомер, микропиткалар, термометр, пробиркалар ва штативлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Пробиркага 0,1 мл меъда шираси, устига 5 мл сут-ацетат аралашмаси солинади. Иккала пробирка 25°C гача иситилган сув ҳаммомига 5 дақиқага қўйилади. Сўнг сут-ацетат аралашмаси тезда меъда шираси солинган пробиркага олинади ва секундомерда ўлчанади, пробиркадаги эритмалар силкитилади. Аралашмали пробирка эгилган ҳолда сув ҳаммомида ушланади ва пробирка деворида казеин ивитмаси ҳосил бўлиши кузатилади. Ивиқ ҳосил бўлган заҳоти секундомер тўхтатилади ва ивиқ ҳосил бўлган вақт ёзиб олинади.

Ҳисоблаш. 1 мл меъда шираси таркибидаги пепсин фаоллигини ҳисоблаш учун 60 сони топилган вақт сонига бўлинади. Шу йўл билан 0,1 мл меъда шираси таркибидаги пепсиннинг миқдор бирлиги топилади. Шу сон 10 га кўпайтирилганда 1 мл меъда шираси учун пепсин фаоллиги топилади. Масалан, сут-ацетат аралашмасида биринчи ивиқ ҳосил бўлиши 15 дақиқада аниқланди. Демак, $60:15=4,0$ бирлик. 1 мл учун эса $4,0 \times 10=40,0$ ёки бу $4,0,01 \text{ мг}=0,4 \text{ мг}$ кристалик пепсин фаоллигига тўғри келади.

2. Уропепсинни аниқлаш. Пробиркага бир суткада йиғилган 0,5 мл сийдик ўлчаб олинади. Сийдик таркиби-

даги уропепсинни фаоллаш учун рН и 3,0 га тенг бўлган 0,1 мл 2 М водород хлорид эритмаси солинади. Қонго кизили кўк-бинафша рангга киргунча ушлаб турилади. Пробиркадаги аралашма 37°C ли термостатга бир соатга жойлаштирилади.

2. 25°C гача иситилган сув ҳаммомига фаолланган уропепсин ва 5 мл сут-ацетат аралашмаси солинган пробирка жойлаштирилади. Пробиркалар 5 дақиқа ушла-нади. Уропепсиннинг фаоллиги юкоридагидек аниқланади.

Ҳисоблаш. Уропепсин фаоллигини ҳисоблаш учун 60 сони ивиш бошланган вақтга бўлинади ва бу сон 2 га ва бир суткада ажратилган сийдик микдорига кўпайтирилади. Демак, бир суткалик сийдик учун уропепсиннинг фаол микдори топилади. Ўртача сийдик билан 150—300 уропепсиноген бирлиги ёки 1,5—3,0 мг ажратилади.

Ахилия ҳолатларида меъда ширасида ва сийдикда ферментлар бўлмаслиги кузатилади. Яра касалликларида пепсин фаоллиги одатдагидан бирмунча юкори бўлади.

Олинган натижаларни расмийлаштинг. Натижа-ларни дафтарингизга ёзиб хулоса чиқаринг.

Олинган билимларни мустаҳкамлаш учун саволлар

1. Меъдада оксилларнинг сингишида хлорид кислотанинг аҳамияти қандай?

2. Меъдада оксиллар парчаланиши учун қандай шароитлар талаб қилинади?

3. Меъда шираси таркибида қандай кислоталиликлар тафовут қилинади? Улар қайси усул билан аниқланади? Кислоталиликни аниқлашнинг қандай амалий аҳамияти бор?

4. Оксилни парчаловчи ферментларнинг фаол бўлмаган ҳолда ишлаб чиқарилишининг аҳамияти қандай? Ушбу ферментлар қандай қилиб фаол ҳолатга ўтадилар?

5. 12 бармоқли ичакда оксилларнинг — пептидларнинг парчаланиши учун қандай шароитлар талаб қилинади. Қандай ферментлар оксиллар-нинг парчаланишида иштирок этади. Ферментлар қандай йўл билан фаол ҳолатга ўтади.

6. Ферментларни аниқлаш усули нимага асосланган? Уларнинг фаоллигини аниқлаш қандай аҳамиятга эга?

7. Ингичка ичакда оксилларни парчалашда қандай ферментлар иштирок этади? Уларнинг фаол ҳолатга ўтиши қандай амалга оширилади?

8. Оксиллар парчаланишини босқичма-босқич амалга оширилиши-нинг аҳамияти қандай?

2. АМИНОҚИСЛОТАЛАР АЛМАШИНУВИ

Организмда оксилларнинг парчаланиши ва ҳосил бўлиши бир-бири билан чамбарчас боғлиқ. Вазнининг ва оксил таркибининг доимийлиги анаболизм ва катаболизм нисбати тенглигидан дарак беради. Танада оксилларнинг

янгилиниши учун озика оксилларининг парчаланишидан ҳосил бўлган аминокислоталар уларнинг умумий манбаини ҳосил қиладилар. Аминокислоталар миқдори тахминан 500 г га тўғри келади.

Аминокислоталарнинг асосий қисми хусусий оксиллар, гем, пурин, пиримидин асослари ва шу каби бирикмалар ҳосил бўлиши учун сарфланади. Анаболизм жараёнида қатнашмаган аминокислоталар (100 г га яқин) организм тўқима ва ҳужайраларида парчаланadi. Уларни ўрнини тўлдириш учун организм ташқаридан худди шунча оксилни озика билан қабул қилиши керак.

Улар ҳужайра цитоплазмасида аминокислоталарга хос бўлган йўл билан парчаланadi. Буларга аминокислоталарнинг амино гуруҳини йўқотиши — дезаминланиш мисол бўлади. Дезаминланиш жараёни 4 хил бўлади: қайтарилиш (бу йўл билан цистеин ва аспарагин аминокислоталар дезаминланади); гидролиз (серин, треонин), молекула ичида дезаминланиш ва оксидланиш йўли билан (қолган аминокислоталар) дезаминланиш. Бу вақтда организм учун заҳарли аммиак ҳосил бўлади. Аммиакнинг заҳарсизланишида α -кетоглутарат кислота катта аҳамиятга эга. У аммиакни бириктириб олиб, глутамин кислотага айланади ва жигарга тушади. Жигарда глутамин кислота яна дезаминланиб аммиак ҳосил қилади. Бу қайта жараён глутамитдегидрогеназа ферменти иштирокида амалга оширилади. Жигарга тушган аммиак у ерда сийдикчилга айланади (орнитин халқасида). Сийдикчил сийдик орқали чиқарилади. Сийдикчил миқдорини қон зардобиди ва сийдикда аниқлаш катта амалий аҳамиятга эга, чунки у аминокислоталарнинг парчаланиш тэзлиги кўрсаткичи бўлиб ҳисобланади (сийдикчил миқдорини аниқлаш қон ва сийдик бўлимида келтирилган).

Ҳужайра цитоплазмасида аминокислоталар ўз аминогуруҳларини аммиак ҳосил қилмай кетокислоталарга беради. Натижада янги аминокислота ва янги кетокислота ҳосил бўлади. Бу жараён трансаминланиш деб аталади. Бу реакцияни трансaminaза ферменти катализлайди. Бу жараённинг аҳамияти алмаштириб бўладиган аминокислоталар ҳосил қилишдан иборат. Трансфераза — аминотрансфераза ферментлари ҳужайра цитоплазмасида жойлашган бўлиб, қон зардобиди жуда кам миқдорда учрайди. Аммо айрим касалликларда ҳужайра мембранасининг яллиғланиши натижасида унинг ўтказувчанлиги ортади ва фермент қон зардоби таркибиди кўпаяди. Шу боис ушбу фермент фаоллигини қон зардобиди аниқлаш катта амалий аҳамиятга эга.

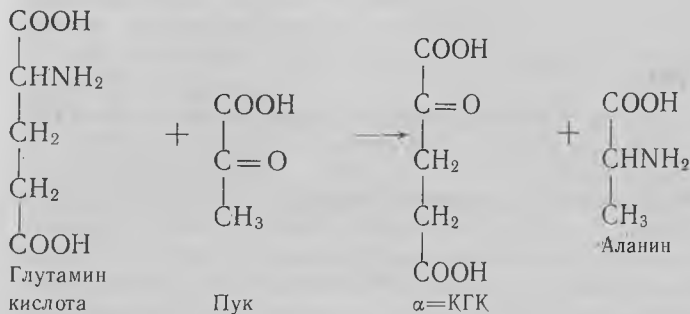
Аминокислоталарнинг айримлари ўзига хос йўл билан парчаланиши мумкин. Уларнинг охириги маҳсулотлари $\text{CH}_3\text{CO}-\text{S}-\text{CoA}$ ҳосил бўлади — булар кетоген аминокислоталардир. Ацетил КоА дан ёғлар, холестерин, кетон таначалар ҳосил бўлиши мумкин. Энергияга муҳтожлик ортганда бу бирикма Кребс халқасига кириб тегишли субстратларни ҳосил қилади. Субстратлардан водород ажралиб, нафас олиш занжирида АТФ синтезланишига олиб келади. Айрим аминокислоталардан пирозум кислота (ПУК) ҳосил бўлади. Булар глюкоген аминокислоталардир. ПУК гликонеогенез йўли билан глюкоза ҳосил бўлишида ва гликоген тўпланишида иштирок этиши мумкин. Айрим аминокислоталар керакли бирикмалар ҳосил бўлишида иштирок этади. Масалан, глицин, аргинин ва метионин креатинфосфат, макроэргик бирикма ҳосил бўлишида иштирок этади. Креатинфосфатнинг парчаланишидан креатинин ҳосил бўлади ва сийдик билан охириги маҳсулот сифатида ажралади. Унинг микдорини аниқлаш айрим касалликларни билиш учун амалий аҳамиятга эга (Креатининни аниқлаш усули сийдик ва қон бўлимида келтирилган). Шунингдек, сийдик билан мураккаб оксиллар алмашинувидан ҳосил бўлган охириги маҳсулотлар — сийдик кислота, билирубин каби бирикмалар ажралади (сийдик ва қон бўлимида келтирилган).

Айрим касалликларда оксиллар алмашинувининг ўзгариши кузатилади. Шу туфайли аминокислоталар алмашинувини билиш, алмашинув натижасида ҳосил бўладиган охириги ва оралик маҳсулотларни аниқлаш касалликни аниқлашда ва уни даволашда бўлғуси шифокор учун катта аҳамиятга эга.

82- и ш. АМИНОКИСЛОТАЛАРНИНГ ТРАНСАМИНЛАНИШИНИ ЎРГАНИШ

Усулнинг асоси. Мушак тўқима хужайраларида трансаминланиш реакцияси боришини ўрганиш учун субстрат сифатида глутамин ва пирозум кислоталардан фойдаланилади.

Реакция тенгламаси



Ушбу реакцияни аминотрансфераза ферменти катализлайди. Унинг коферменти витамин В₆ нинг фаол тури ҳисобланган фосфопиридоксалдир. Ҳосил бўлган янги аминокислота аланин хроматография усули билан аниқлашниши мумкин.

Текширилувчи материал: мушак қиймаси.

Реактивлар: рН и 7,4 бўлган фосфат буферида тайёрланган глутамин кислотанинг 1% ли эритмаси, пирозум кислотанинг 1% ли эритмаси, монобромсирка кислотанинг 0,025% ли эритмаси, калий гидрокарбонатнинг 0,1% ли, сирка кислотанинг 2% ли эритмалари, эритувчилар системаси, нингидриннинг ацетонда тайёрланган 0,2% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробирка ва штативлар, воронкалар, қоғоз фильтрлар, бюреткалар, пипеткалар, Петри косачаси, пинцетлар, пуркагичлар, хроматограммалар учун осмалар, куритгич шкафлар, термостат.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Иккита пробиркага (бири текширилувчи, бири назорат) 0,5 мл дан пирозум кислота ва глутамин кислота солинади. Уларга 1 мл калий гидрокарбонат эритмаси, 0,2 мл монобромсирка кислота (гликолиз реакцияси кетмаслиги учун) солинади.

2. Иккала пробиркага 0,5 г дан янги тайёрланган мушак қиймаси солинади. Назорат пробиркага шу захоти 0,3 мл сирка кислота солиб, ферментларни фаолсизлантириш учун 2—3 дақиқа қайнатилади.

3. Пробиркалар 1,5 соатга термостатга жойлаштирилади. Вақти-вақти билан аралаштириб турилади. Бир оздан сўнг пробиркалар термостатдан олинади. Текширилувчи пробиркага 0,3 мл сирка кислота солиб, 2—3 дақиқа қайнатилади. Эритмаларнинг ҳар бири алоҳида тоза пробиркага қоғоз фильтр ёрдамида ўтказилади.

4. Хроматография 25- ишдагидек ўтказилади. Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асоси-

ни, трансаминланиш реакциясини, R_1 ни ҳисоблашни дафтарингизга ёзинг. Хроматограмми дафтарингизга ёпиштириб қўйинг. Тегишли хулоса чиқаринг. Трансаминланиш реакциясининг аҳамиятини эслаб қолинг.

83- и ш. АМИНОКИСЛОТАЛАРНИНГ ДЕКАРБОКСИЛЛАНИШИНИ ЎРГАНИШ

Аминокислоталарнинг карбоксил гуруҳни CO_2 ҳолатда йўқотиши декарбоксилланиш дейилади. Ушбу жараён декарбоксилаза ферментлари томонидан катализланади. Ферментларнинг коферменти, витамин B_6 нинг фаол шакли фосфопиридоксалдир. Қўпинча аминокислоталарнинг декарбоксилланиши натижасида биоген аминлар ҳосил бўлади. Биоген аминлар фармакологик фаол моддалар сифатида организмга турлича таъсир кўрсатади. Масалан, гистамин, тирамин, триптамин, цистамин, серотонин, гамма аминомой кислота ва ҳоказо.

Декарбоксилланиш жараёни микроорганизмларда жуда шиддатли кетади, шунинг учун уларни фермент манбаи сифатида, ишлатиш мумкин.

Усулнинг асоси. Глутамин кислота ичак микроорганизми *E. coli* билан бир оз ушлаб турилганда гамма мой кислота ҳосил бўлади. Ҳосил бўлган бирикмени электрофорез усули билан аниқлаш мумкин.

Тегишли материал. *E. coli* бактерияси.

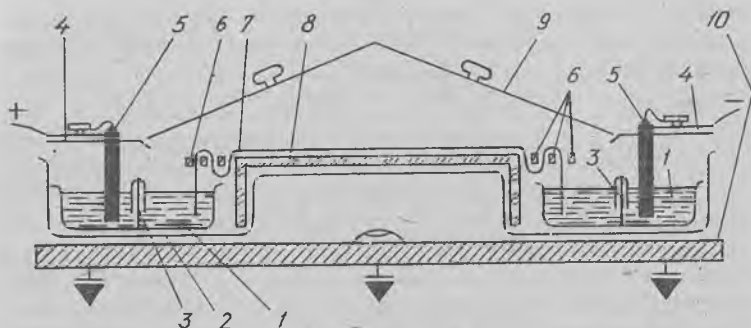
Реактивлар. рН и 8,6 бўлган веронал буфер эритмаси, рН и 6 бўлган фосфат буфер эритмаси, глутамин кислотанинг 0,5% ли эритмаси, фенолнинг 5,0% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: электрофорез ўтказиш учун махсус асбоб, центрифуга, центрифуга пробиркалари, пробиркаларни тенглаштириш тарозиси, пипеткалар, микропипеткалар ёки капиллярлар, 100°C ли куритгич шкаф, 37°C ли термостат.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Декарбоксилланиш реакциясини ўтказиш. Бактериал масса чўкмасининг 1 мл си га рН и 6,0 бўлган буфер эритмасида тайёрланган глутамин кислотанинг 1 мл си ни солиб аралаштирилади ва бир соатга 37°C ли термостатга жойлаштирилади.

Инкубацион аралашма центрифуга пробиркаларига солиниб тарозида тенглаштирилгач, 5 дақиқа давомида дақиқасига 2500 марта айланадиган центрифугада айлан-тирилади. Чўкма устидаги эритма тоза пробиркага олинади.

2. Қоғоз электрофорезини ўтказиш. Электрофорез асбоби икки қисмдан иборат бўлиб, унинг бири —



14-расм. Қоғозда ўтказиладиган электрофорез учун ЭФА-1 асбоби.

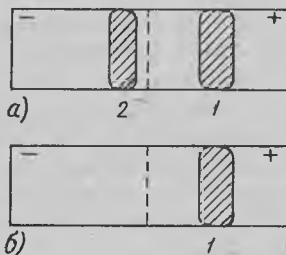
1-Электрод учун ариқчалар; 2-ванна; 3-тўсик; 4-электродлар ўрнатилган мослама; 5-кўмир электродлари; 6-қоғоз лента ўрнатиладиган мослама; 8-қоғоз ленталарни ушлаб турувчи рамка; 9-шиша қопқок; 10-ванна учун мослама.

электродлар ўрнатилган кювета, иккинчиси доимий ток берувчи стабилизатордан иборат. Электрод ўрнатилган кюветанинг ариқчаларига буфер эритма солинади ва намланган электрофореграмманинг учи икки томонга тушириб қўйилади. Электрофореграмманинг манфий «—» томонидан текширилувчи эритма томизилади. Иккинчи хроматограммага эса глутамин кислота томизилади. Эритмалар 0,05 мл дан ишлатилади (14- расм) (электрофорез усули 115- ишда келтирилган).

200—300 В, 1,5—2,0 мА ток кучида 1—1,5 соат давомида электрофорез ўтказилади. Бир оздан сўнг асбоб токдан ўчирилади, кювета қопқоғи очилади ва электрофореграммалар махсус мосламага олинади ва 100°C да қуритилади. Қуритилган электрофореграммага 0,1% ли нингидрин эритмаси пуркалади. Иккита доғ ҳосил бўлгани кузатилади. Уларнинг бири глутамин кислотанинг, иккинчиси γ-мой кислотанинг доғидир (15- расмга қаранг).

Ишлатилган барча идишлар (пипеткалар, пробиркалар) 5% ли фенол эритмасида бир неча дақиқа дезинфекцияланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга декарбоксилланиш реакциясини, ҳосил бўлган биоген амин-



15-расм. Глутамин кислотанинг декарбоксилланиш маҳсулоти;

а-тажриба; б-кузатиш.

ларни, уларнинг биологик таъсирини, усулнинг асосини ёзинг. Тегишли хулоса чиқаринг. Электрофореграммани дафтарингизга ёпиштириб қўйинг.

84- и ш. ТИРОЗИНАЗА ТАЪСИРИНИ ЎРГАНИШ

Тирозин меланоцитлар оксидланганда меланин ҳосил бўлади. Тузилиши жихатидан улар полимер бўлиб, ҳали яхши ўрганилмаган. Шу пигментларнинг миқдори соч, тери, кўз гавҳари рангини аниқлайди. Меланинларнинг ҳосил бўлишида иштирок этадиган ферментлардан бири тирозиназадир. Ушбу фермент мис тутувчи металлопротеидлар гуруҳига киради. Тирозиназа ферменти субстратларни ҳаво кислороди иштирокида оксидлайдиган оксидазаларга киради. Улар ўсимлик организмда кўп бўлгани учун ўсимликлардан фермент манбаи сифатида фойдаланиш мумкин.

Текширилувчи материал: картошка туганаклари.

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

Керакли анжомлар: пробиркалар, штативлар, скальпеллар, чинни ховончалар, 37—40°C ли термостат, дока ёки фильтр қоғози, тарози ва кадоқ тошлари.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Фермент манбаини тайёрлаш.

Пўстидан тозаланган картошка туганаклари (2,0—4,0 г) паррак-паррак қилиб чинни ховончага солинади. Унга 10 мл дистилланган сув солиб эзилади. Ҳосил бўлган аралашма филтрдан ўтказилади.

Олинган филтрат 1 млдан қилиб иккита пробиркага солинади. Пробиркаларнинг бири 1—2 дақиқа давомида қайнатилади ва оқиб турган сувда совитилади. Иккала пробиркага тирозиннинг 0,1% ли эритмасидан 1,0 мл дан солинади. Пробиркадаги суюқликлар аралаштирилиб, 37—40°C ли термостатга жойлаштирилади. Вақти-вақти билан пробиркалардаги эритмалар аралаштириб турилади. Пробиркалардаги эритмаларнинг бири тирозиназа таъсирида қораяди. Ушбу пробиркадаги тирозин ҳаво ва тирозиназа таъсирида меланинга ўхшаш маҳсулот ҳосил қилади. Назорат пробиркадаги тирозин ўзгармайди, чунки кучсиз фермент унга таъсир кўрсатмайди ва эритма ранги қораймайди.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Тажиба натижалари ва хулоса дафтарга ёзилади.

Олинган билимларни мустақкамлаш учун саволлар

1. Глутамин кислота ва мушак қиймаси инкубацияланганидан сунг хроматограммада аниқланган янги аминокислота доғлари ҳосил бўлишини қандай тушунтириш мумкин?
2. Глутамин аминокислота декарбоксилланганини қандай тушунтириш ва аниқлаш мумкин?
3. Тирозиназа таъсирини қандай аниқлаш мумкин?
4. Дезаминланиш ва трансаминланиш реакцияларининг фарқи қандай? Декарбоксилланиш реакциясини тушунтиринг?

Тайёрланиш учун саволлар

1. Оксилларнинг сингиши. Протеолитик ферментлар, уларнинг ўзига хос хусусияти.
2. Аминокислоталарнинг сурилиши ва организмдаги вазифаси.
3. Трансаминланиш реакциялари. Трансаминазалар. Уларнинг аҳамияти.
4. Дезаминланиш реакцияси ва уларнинг турлари.
5. Трансдезаминланиш реакцияси, уларнинг ферментлари, биологик аҳамияти.
6. Организмда алмаштириб буладиган аминокислоталарнинг ҳосил бўлиши.
7. Аминокислоталардан глюкоза ҳосил бўлиши, уларнинг аҳамияти.
8. Аминокислоталарнинг дезаминланишидан ҳосил бўлган аммиакни зарарсизлантириш йўллари.
9. Сийдикчилнинг синтезланиш реакцияси ва унинг кетма-кетлиги, иштирок этадиган ферментлари.
10. Сийдикчилнинг синтезланиши бузилиши.
11. Гинераммониемия ҳолатлари. Сийдикчилнинг қондаги ва сийдикдаги ўртача микдори.
12. Серин, глицин, метионин аминокислоталарининг креатин, холин, глутатион ҳосил бўлишдаги иштироки, уларнинг катаболизми ва ўзаро боғланишлари.
13. Фенилаланин ва тирозин аминокислоталарини тироксин, катехоламин ва меланин биосинтезидаги иштироки, анаболизм жараёнларида қатнашиши.
14. Фенилаланин ва тирозинларнинг парчаланиши. Уларнинг алмашинувида кузатиладиган патологик ҳолатлар. Фенилкетонурия, гомогентенинурия, альбинизм ва ҳоказо.
15. Аминокислоталарнинг декарбоксилланиши. Биоген аминлар — гистамин, серотонин гамма-аминомой кислоталар ҳосил бўлиши.
16. Биоген аминларнинг биологик аҳамияти ва уларнинг нерв синапсларида импульс ўтказиши.
17. Биоген аминларнинг парчаланиши.
18. Нуклеин кислоталар алмашинуви: пурин ва пиримидин асослари синтезида иштирок этувчи бирикмалар ва ферментлар.
19. Сийдик кислота ҳосил бўлиши. Подагра касаллиги, уни даволаш йўллари.
20. Сийдикчил ва сийдик кислотани сийдик таркибида аниқлаш усуллари. Улар микдорини аниқлашнинг аҳамияти.

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Беморнинг меъда шираси қуйидаги кўрсаткичларга эга: рН и 6,0; умумий кислоталиги 20 ммоль/л; HCl нинг эркин кислоталиги 8 ммоль/л; бириккан HCl 3 ммоль/л. Бу кўрсаткичларга қараб шифокор қандай хулоса чиқаради ва уни даволаш режаларини қандай белгилайди.

2. Беморнинг меъда шираси таркибида хлорид кислота ва пепсин йўқлиги аниқланди. Шифокор қандай касаллик ҳақида фикр юритиши керак. У даволаш режаларини қандай белгилани лозим.

3. Беморнинг меъда шираси таркибида кон борлиги аниқланди. Қандай касаллик туғрисида фикр юритиш ва қандай даволаш режаларини тузиш керак.

4. Бемор боланинг иштаҳаси йўқ. Овқатнинг ҳазм бўлиши кийинлашиб, у еган овқатини қайт қилиб ташлаяпти. Шифокор қандай мулоҳаза юритиши ва қандай қилиб болани бу ҳолатдан чиқариши мумкин.

5. Овқат маҳсулоти таркибида аспарагин аминокислота деярли йўқ. Бу ҳолат организмни ўзгаришга олиб келадими? Моддалар алмашинуви қандай бўлишини айтинг.

6. Боланинг сийдиги таркибида фенилпирузум кислота миқдори кўпайган. Фенилкетонурия ҳолати юзага келган. Бу ҳолатни қандай тушунтириш мумкин ва қандай даволаш режаларини тузиш керак.

7. Боланинг сийдиги бир оз турганда қорайди. Нима учун бундай ҳолат юзага келди. Бу ҳолатдан қандай қилиб чиқиш мумкин.

8. Беморнинг қони таркибида аммоний ионлари миқдори кўпайганлиги, сийдикчил миқдори эса камайганлиги аниқланди. Бундай ҳолатни аниқлаган шифокор қандай фикр юритиши керак. Бундай ҳолатнинг юзага келишига сабаб нима? Бундай беморни даволаш мумкинми?

9. Тажриба учун олинган мушукларнинг бир гуруҳига факат аргинин ва орнитиндан иборат бўлган сунъий оксил берилган. Иккинчи гуруҳига эса факат орнитиндан иборат оксил берилди. Биринчи гуруҳ хайвонлари 4,5—5 соатдан сўнг нобуд бўлган. Иккинчи гуруҳдаги хайвонлар эса тирик қолган. Бунинг сабаби нима? Бу ҳолатни қандай тушунтириш мумкин.

10. Фақат бир турдаги оксиллар билан озикланадиган организмда оксил алмашинувининг бузилиши кузатилди, турли хилдаги оксиллар билан озикланган организмда эса моддалар алмашинуви жараёни меъёрида эканлиги аниқланди. Бунинг сабабларини тушунтиринг.

12. Озика оксиллари таркибида метионин аминокислотаси етишмаслиги маълум бўлди. Шу оксиллар билан озикланган киши организмда қандай ўзгаришлар бўлиши мумкин.

7- БЎЛИМ

КАРБОНСУВЛАР АЛМАШИНУВИ

Карбонсувлар одам ва хайвон организмда мураккаб ва кўп қиррали вазифаларни бажаришига кўра муҳим ҳаётий аҳамиятга эга. Улар барча биологик жараёнлар учун асосий энергия манбаи бўлиб ҳисобланади. Чунки организм фаолияти учун сарфланадиган умумий энергиянинг 60—70 фоизи карбонсувларнинг оксидланишидан

ҳосил бўлади. Карбонсувлар оксиллардан фаркли ўларок тўқималарда (жигар, мушак) тўпланади ва организмга керакли бўлган вақтда сарфланиши билан манба вазифасини ўтайди. Карбонсувлар хужайра девори ва мембранаси таркибига кириб, хужайрааро муносабатларни ҳосил қилади. Таянч, қопловчи, бириктирувчи тўқималар таркибида ҳимоя вазифасини, иммунитет реакцияларида иштирок этувчи, қон гуруҳини аниқловчи, қон ивишини сусайтирувчи омиллар таркибига кириб хусусий вазифани бажаради. Улар ион алмашинувида, нерв импульсларини ўтказишда, моддаларни ташишда иштирок этади. Карбонсувлар нуклеопроteidлар, гликолипидлар, гликопротеидлар, нуклеотид коферментлар, оксиллар, ёғлар ҳосил бўлишида иштирок этади. Карбонсув етишмовчилигида ёғлар ва оксилларнинг алмашинуви бузилади.

Одам ва ҳайвон организми карбонсувларни синтезламайди, шунинг учун уларни тайёр ҳолда ўсимлик ва ҳайвонлардан олади. Катта ёшдагилар учун карбонсувларга бўлган бир кунлик эҳтиёж 450—500 граммни ташкил қилади. 7 ёшгача бўлган болалар учун эса уларнинг ҳар бир килограмм вазнига 10—15 грамм карбонсув тўғри келади. Мактаб ёшидан бошлаб карбонсувга эҳтиёж 15 граммдан ортади.

Карбонсувлар асосан ўсимликлар таркибида бўлиб, 85—90 фоизни ташкил қилади, аммо целлюлоза, ксилан ва пектинлар меъда-ичак йўлида, хужайраларда парчаланмайди. Улар ахлат массаси ҳосил бўлишида иштирок этади. Асосий карбонсувлар крахмал, гликоген, сахароза, лактоза, фруктоза ва глюкоза шаклида истеъмол қилинади.

Истеъмол қилинган карбонсувлар меъда-ичак системасида ферментлар таъсирида моносахаридларгача парчаланadi. Карбонсувлар асосан глюкоза шаклида ўзлаштирилади ва ичак деворида фермент таъсирида галактоза ва фруктоза глюкозага айланади. Глюкозанинг ортиқча миқдори жигарда ушланиб гликогенга айланади. Шу туфайли қондаги қанд миқдори 100—120 мг% ёки 3,3—5,5 ммоль/л ни ташкил қилади. Янги туғилган боланинг қонидаги қанд миқдори онанинг қонидаги қанд миқдорига тўғри келади. Бола туғилгандан 3—6 соат ўтгач унинг қонидаги қанд 3,5 ммоль/л гача камаяди. Бундай ҳолатни физиологик гипогликемия ҳолати дейилади. Ҳаётининг иккинчи кунидан бошлаб қанд миқдори аста-секин кўтарилади ва 5—6-кунларга бориб, ҳақиқий қанд миқдорига тенглашади (4,5 ммоль/л). Бола 14,15 ёшга етганда эса катта ёшдагиларнинг қанд миқдорига тенгла-

шади. Хужайраларда глюкоза кислородли шароитда (дихотомик) иккига бўлиниш йўли билан ва тўғри апогомик (фруктоза ҳосил қилиш) йўл билан парчаланеди. Бунда НАДН₂, НАДФН₂ коферментлар ва фосфорланган бирикма ҳосил бўлиши АТФ синтезига олиб келади. Кислородсиз шароитда глюкоза сут кислотাগача парчаланеди.

Бўлимнинг мақсади. 1. Амалий машғулотда карбонсувлар алмашинувидан ҳосил бўлган маҳсулотларни ажратиш, уларнинг миқдорини ўлчаш ва аниқлаш йўли билан глюкозанинг тўқимада оксидланиш йўллариини ўрганиш ва олинган билимларни мустаҳкамлаш.

2. Қон таркибидаги канд миқдорини ўлчаш усуллари билан танишиш ва уни амалиётда қўллаш. Усулларнинг афзалликлари ва камчиликларини билган ҳолда муайян шароитда керакли усулдан фойдаланишни ўргатиш.

3. Қондаги канд миқдорини бир меъёрда бошқарилишини ўрганиш, амалий тажрибада олинган натижалар асосида глюкоза алмашинувининг бузилиши натижасида содир бўладиган касалликларнинг келиб чикиш сабабларини ва даволаш йўллариини ўрганиш ва келажақда олинган билимларни тадбиқ қилиш.

1. КАРБОНСУВ АЛМАШИНУВИ

85- и ш. КАРБОНСУВЛАРНИНГ МЕЪДА-ИЧАК ЙЎЛЛАРИДА ПАРЧАЛАНИШИ

Карбонсувларнинг парчаланиши сўлак, меъда ости беши шираси, ичак шираси ферментлари таъсирида амалга оширилади. Бу ферментлар амило ферментлар бўлиб, уларга альфа, бетта, гамма амилазалар, лактазалар, сахаразалар ва мальтазалар киради.

Текширилувчи материал: меъда, меъда ости беши ширасининг 5% ли эритмаси, сўлак.

Реактивлар: крахмалнинг 1% ли эритмаси, целлюлозанинг 1% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси.

Қеракли анжомлар. Штативлар, пипеткалар, пробиркалар, бюреткалар, 37°C ли термостат ёки сув ҳаммони, газ горелкаси.

Бажариладиган иш тартиби. Қуйидаги жадвалга мувофиқ тажриба пробиркалари тайёрланади.

Пробиркадаги суяқликлар аралаштирилиб, 37°C ли термостатга 30 дақиқага жойлаштирилади. Бир оздан сўнг пробиркаларга солинган полисахаридларнинг парчалангани ҳосил бўлган маҳсулотларга Тромер реакцияси ўтказиш

Пробиркалар	Крахмал эритмаси, мл	Целлюлоза эритмаси, мл	Сўлак, мл	Меъда шираси, мл	Меъда ости беши шираси, мл
1	1,0	—	1,0	—	—
2	—	1,0	1,0	—	—
3	1,0	—	—	1,0	—
4	—	1,0	—	1,0	—
5	1,0	—	1,0	1,0	—
6	—	1,0	1,0	1,0	—
7	1,0	—	—	—	2,0
8	—	1,0	—	—	2,0

билан аниқланади. Бунинг учун ҳар қайси пробиркага 10% ли натрий гидроксид ва мис (II) сульфат эритмасидан 5 томчидан солиб, бир дақиқа давомида аста-секин қиздирилади. Эритманинг қизил рангга кириши мис (I) оксид ҳосил бўлганини кўрсатади ва крахмалнинг мальтозагача парчаланганини исботлайди (троммер реакциясини ўтказиш учун пробиркадаги эритмаларга натрий гидроксид ва мис (II) сульфат эритмасидан 5 томчи солинади ва қиздирилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар куйидаги жадвалга ёзиб расмийлаштирилади.

53- жадвал

Пробиркалар	Субстрат номи	Реакция маҳсулоти	Ферментнинг номи	Фермент манбаи	Меъда-ичак қисми	Натижа

86- и ш. ЖИГАР ГЛИКОГЕНИНИ АЖРАТИШ

Гликоген оқсилга ўхшаб гидрофиллик (сувни севиш) хоссасига эга. Унинг шу хоссасидан фойдаланиб, ишқорий ва ишқорий-ер металл тузлари ёрдамида тузлаш усули билан ёки оғир металл тузлари ҳамда спирт таъсирида чўктириб гликогеннинг сувли эритмасини ажратиш мумкин.

Ўртача овқатланадиган одам жигарида 80—120 г гликоген йиғилади. Бир кун оч қолган одамнинг барча гликогени парчаланиб, одатдаги сифат реакциялар билан гликогенни аниқлаб бўлмайди.

Текширилувчи материал: бир кун оч қолган ва оч қолмаган ҳайвон жигари.

Реактивлар: Ухлорсирка кислотанинг (УХСК) 5% ли эритмаси, этил спирти, аммоний сульфат тузи кукуни, кўрғошин ацетатнинг 10% ли эритмаси, йоднинг калий йодда тайёрланган 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар. Дорихона тарозиси ва қадоқлари, штатив ва пробиркалар, воронкалар, шиша таёкчалар, қоғоз фильтрлар, чинни ҳовонча, кимёвий стаканлар, газ горелкаси.

Усулнинг асоси. Ушбу усул гликогенни сувда яхши эриши ва кучсиз кислотали шароитда турғун бўлишига асосланган. Гликогенни ажратиш тўқимани механик равишда парчалаб, 5% ли УХСК эритмаси ёрдамида экстракциялаш (гликогенни эритмага чиқариш) дан иборат. Бу шароитда оксиллар денатурацияланиб, чўкмага тушади. Чўкма эритмадан филтрлаш йўли билан олиб ташланади.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Тажриба учун бир кун оч қолдирилган ва овқат берилган ҳайвон жигари олинади. Ўлдирилган ҳайвон жигари тезлик билан ажратилади, қондан тозаланади, қайчи билан майда бўлақчаларга бўлинади ва стананда қайнаб турган физиологик эритмага солиниб, фосфорилаза ферменти кучсизлантирилади 10—15 дақиқадан сўнг жигар бўлақчалари стакандан олинади.

2. Жигар бўлақчаси 0,5 г қилиб тортиб олинади ва чинни ҳовончага солинади. Унинг устига УХСК нинг 5% ли эритмасидан 3 мл солиб, ўн дақиқа давомида яхшилаб эзилади. Сўнгра устига 3 мл дистилланган сув солиб яхшилаб аралаштирилади ва хўлланган филтр қоғоз орқали тоза пробиркага ўтказилади.

3. Ажратилган гликоген сифат реакция билан аниқланади.

а) биринчи пробиркага 10 мл дистилланган сув, иккинчи ва учинчи пробиркаларга 1 мл гликоген филтрати солинади ва уччала пробиркага 1—3 томчи йод эритмаси томизилади. Пробиркалардаги эритмаларнинг ранги солиштирилади.

б) учта пробиркага тўйиб овқатланган ҳайвон жигаридан тайёрланган филтратдан 10 томчи солинади. Сўнгра биринчи пробиркага 10 томчи этил спирти, иккинчисига кўрғошин ацетат эритмасидан 10 томчи, учинчисига эса аммоний сульфат тузидан тўйингунча солинади. Пробиркаларда чўкма ҳосил бўлиши кузатилади. Оч қолган ҳайвон жигари филтрати билан ҳам худди шундай тажриба ўтказилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Тажриба натижалари

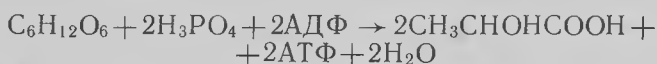
қуйидаги жадвалга ёзилади. Тўқ ва оч қолдирилган ҳайвон жигари билан ўтказилган тажриба натижалари солиштирилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

54- жадвал

Гликоген манбаи	Ишлатилган реактивлар		
	спирт	қўроғошин ацетат	аммоний сульфат
Тўқ ҳайвон жигари			
Оч қолган ҳайвон жигари			

87- и ш. ГЛЮКОЗАНИНГ МУШАК ТЎҚИМАСИДА КИСЛОРОДСИЗ ШАРОИТДА ОКСИДЛАНИШИ (ГЛИКОЛИЗ)

Глюкозанинг тўқималарда кислородсиз шароитда оксидланиши гликолиз дейилади. Оксидланиш субстрати гликоген бўлса — гликогенолиз дейилади. Ушбу оксидланиш реакцияси тенгламаси қуйидагича:



Тўқима ва аъзолар етарли даражада кислород билан таъминлана олмаган шароитда гликолиз ва гликогенолиз организмнинг физиологик вазифаларини бажаришга имкон яратади. Бундай жараён кўпроқ мушак тўқималарида амалга ошгани учун гликолизни ўрганишда мушак тўқималаридан фойдаланиш қулай.

Гликолиз жараёнида бир қанча оралиқ маҳсулотлар ҳосил бўлади. Жумладан, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, фосфотриозалар, фосфоенолпируозум, пируозум ва охириги маҳсулот ҳисобланган сут кислота. Мушакларда гликолиз жараёни кетишини исботлаш учун мушак қиймаси ферментлари таъсирида глюкозани ачи-тиб, ҳосил бўлган сут кислотани аниқлаш мумкин.

Усулнинг асоси. Сут кислота сульфат кислота таъсирида сирка альдегидга айлантирилгач, вератрол (пиракатехиннинг диметил эфири) билан ўзаро реакцияга кириб, рангли бирикма ҳосил қилишидан иборат.

Текширилувчи материал: мушак қиймасининг суюлтирилган ара-лашмаси.

Реактивлар. рН и 8,0 бўлган фосфат буфер эритмаси, глюкоза эритмаси, учхлор сирка кислотанинг 10% ли эритмаси, мис сульфатнинг ярим тўйинтирилган эритмаси, кальций гидроксид тузи, концентранган сульфат кислота, вератролнинг 0,1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар. Штатив ва пробиркалар, 10 мл ли улчов цилиндр, бюреткалар, шиша воронкалар, фильтр қоғоз, беркитгичлар (пробиркалар), шиша таёқчалар, сув ва муз ҳаммоми, 37°C ли термостат, техник тарози ва кадоқлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Ачитиш учун эритма тайёрлаш. Текширув ва назорат тажриба пробиркаларига рН и 8,0 бўлган фосфат буфер эритмасидан 3 мл ва глюкозанинг 1% ли эритмасидан 1 мл дан солиб аралаштирилади. Иккинчи пробиркага ферментатив реакцияни тўхтатиш учун 1 мл 10% ли УХСК эритмаси солинади. Эритмалар устига мушак қиймасидан 1 г солинади. Эритмалар аралаштирилади ва унинг кислород билан таъсирланишини чеклаш учун 10 томчи вазелин билан қопланадида 37°C ли термостатга роса 1,5 соатга жойлаштирилади.

2. **Оқсилларни чўктириш.** Пробиркалар термостатдан олинади ва реакцияни тўхтатиш учун биринчи назорат эритмасига 1 мл 10% ли УХСК эритмаси солинади. Натижада оқсиллар чўкмага тушади. Эритмалар бошқа тоза пробиркага филтрланади.

3. **Карбонсувларни чўктириш.** Оқсилдан ҳоли қилинган карбонсув филтратига мис сульфатнинг ярим тўйинтирилган эритмасидан 1 мл ва кальций гидроксид тузидан 0,5 г солинади. Пробиркалар қопқоқ билан зич қилиб беркитилади ва 15 дақиқа чайқатилади. Сўнгра эритмалар ҳўлланган фильтр қоғоздан ўтказилади. Бу йўл билан глюкозанинг ортиқча микдори олиб ташланади.

4. **Сут кислотани аниқлаш.** Филтрат солинган пробиркалар муз ҳаммомида совитилади ва унга аста-секин концентрланган сульфат кислота томизилади. Томизиш вақтида пробиркалар чайқатиб турилади. Аралашманинг исишига йўл қўймаслик керак. Сут кислотанинг оксидланишини тезлатиш учун пробиркалар қайнаб турган сув ҳаммомига 4 дақиқага қўйилади. Вақт ўтгач пробиркалар муз ҳаммомида совитилади. Совитилган аралашмага вератролнинг 0,1% ли спиртли эритмасидан 1—2 томчи солиб, бир неча дақиқа аста чайқатилади. Биринчи пробиркада мушак ферментлари таъсирида гликолиз реакцияси ўтганлигидан сут кислота тўқ пушти ранг ҳосил қилади. Назорат пробиркада эса тажриба бошлангунча бўлган сут кислота оч пушти рангга киради.

Натижаларни расмийлаштириш. Тажриба натижалари куйидаги жадвалга ёзиб расмийлаштирилади. Текширув ва назорат эритмаларининг ранги солиштирилиб, тегишли хулоса чиқарилади.

Субстрат	Гликолиз ферментлари манбаи	Пробиркалардаги ранг	
		Текширув пробирка	Назорат пробирка

88- и ш. МУШАҚ ТЎҚИМАЛАРИДАГИ ФОСФОТРИОЗАЛАРНИ АНИҚЛАШ

Гликолиз жараёнида оралик маҳсулотлар — глицероальдегидфосфат, диоксиацетонфосфат триозалар ҳосил бўлади.

Усулнинг асоси. Хона ҳароратидаги ишқорли муҳитда фосфотриозалардан анорганик фосфат осон ажралади. Текширув ва назорат тажрибаларидан ҳосил бўлган триозалар миқдорини таққослаш йўли билан аниқлаш мумкин.

Текширилувчи материал: мушак тўқимаси киймаси.

Реактивлар: УХСК нинг 2,5% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 2 ммоль/л эритмаси, хлорид кислотанинг 2 ммоль/л эритмаси, аскорбин кислотанинг 1% ли эритмаси (эритма ишлатилишдан олдин тайёрланади), аммоний молибдатнинг 0,025 моль/л сульфат кислотада тайёрланган 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, бюреткалар, шиша таёкчалар, ФЭК, 1 см калинликдаги коветалар, воронкалар, қоғоз филтрдлар, 10 мл ли ўлчов пробиркалари, цилиндрлар, муз хаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 1,5 мл совитилган УХСК эритмаси солинган пробиркага 0,5 г мушак тўқимаси киймаси солинади. Аралашма 10 дақиқа давомида муз хаммомида шиша таёкча билан аралаштириб турилади. Бу вақтда фосфотриозалар ажралади. Сўнг аралашмага 5 мл дистилланган сув солиниб, қоғоз филтрдан ўтказилади.

2. Биринчи текширув пробиркасига 1 мл оксилсиз филтрат, 1 мл натрий гидроксид эритмаси солиб аралаштирилади ва 20 дақиқа хона ҳароратида қолдирилади. Бир оздан сўнг эритма 1 мл хлорид кислота эритмаси билан нейтралланади. Иккинчи — назорат пробиркасига эса 1 мл натрий гидроксид эритмаси ва 1 мл водород хлорид кислота эритмаси солиб аралаштирилади. Сўнгра унинг устига оксилсиз филтрат солинади.

3. Иккала пробиркага аммоний молибдат эритмасидан 0,5 мл, аскорбин кислотадан 0,5 мл солиб, эритма-

ларнинг ҳажми дистилланган сув билан 10 мл га етказилади ва 10 дақиқа хона ҳароратида қолдирилади. Ҳосил бўлган рангнинг зичлиги 670 нм (қизил ранг) тўлқин узунлигида 1 см қалинликка эга бўлган кюветаларда колориметрланади. Текширилувчи эритма назорат эритмаси қаршисида кўрилади. Фосфотриозаларнинг миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади. Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш учун фосфотриозаларнинг доимий — стандарт эритмасининг турли миқдордаги эритмаларидан фойдаланилади.

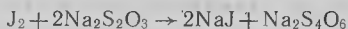
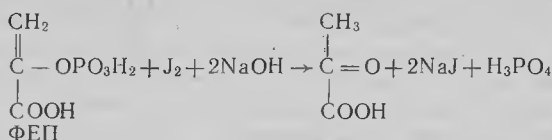
Натижаларни расмийлаштириш. Фосфотриозаларни аниқлашнинг асоси, олинган натижалар ҳисоби дафтарга ёзилади. Фосфотриозаларнинг миқдори 100 г тўқима учун топилади. Суялтириш даражаси ҳисобга олинади.

89- и ш. МУШАҚ ТЎҚИМАЛАРИДАГИ ФОСФОЕНОЛ ПИРОУЗУМ КИСЛОТА МИҚДОРИНИ АНИҚЛАШ

Мушак тўқималарида кечадиган гликолиз жараёнида оралиқ маҳсулот — фосфоенолпируват ҳосил бўлади.

Усулнинг асоси. Фосфоенолпируватни ишқорий шароитда йод билан оксидлаганда аорганик фосфат ажралади. Ажралган йод гипосульфит билан титрлаб аниқланади.

Усулнинг кимёвий тенгламаси куйидагича:



Ажралган йод ва фосфат кислота миқдори тенг бўлганлиги учун фосфоенолпируват миқдорига ҳам тўғри келади.

Текширилувчи материал: мушак тўқимаси қиймаси.

Реактивлар. УХСК нинг 2,5% ли, йоднинг 0,1 моль/л, гипосульфитнинг 0,05 моль/л эритмаси, аммоний молибдатнинг 0,025 моль/л сульфат кислотада тайёрланган 1% ли эритмаси, водород хлориднинг 2 моль/л эритмаси.

Керакли анжомлар. Штатив ва пробиркалар, пипеткалар, ўлчов цилиндрлар, воронкалар филтър қоғоз, шиша таёкчалар, муз хаммони, ФЭК ва 1 см қалинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Муз хаммомига жойлаштирилган 5 мл УХСК тутувчи пробиркага 0,5 г мушак тўқимаси қиймасидан солиб 10 дақиқа давомида

шиша таёкча билан аралаштириб турилади. Сўнгра пробиркага 5 мл сув солиб, бошка пробиркага фильтр қоғоз орқали ўтказилади.

2. Текширув пробиркага 2 мл фильтрат, 1 мл натрий гидроксид эритмаси ва 1 мл йод эритмасидан навбатманавбат солинади. Эритмалар аралаштирилиб, хона ҳароратида 15 дақиқа қолдирилади. Пробиркага қўнғир ранг ҳосил бўлгунча водород хлорид эритмасидан томчилаб 1—2 мл солинади. Реакцияга киришмаган йоднинг ортиқча миқдори натрий гипосульфит эритмаси билан қўнғир ранг рангсизлангунча титрланади. Бунинг учун 0,2—0,3 мл гипосульфит эритмаси етарли. Эритманинг умумий ҳажми дистилланган сув билан 10 мл гача етказилади. Пробиркадаги эритма яхшилаб аралаштирилади.

3. Назорат пробиркасига 2 мл фильтрат, 1 мл HCl эритмаси солиб унинг умумий ҳажми дистилланган сув билан 10 га етказилади. Эритма яхшилаб аралаштирилади. Тўқимадаги анорганик фосфатни ҳисобга олиш учун юқоридаги текшириш яна қайта ўтказилади.

4. Текширув ва назорат пробиркаларидаги 2 мл эритма бошка пробиркаларга ўтказилади ва ҳар қайси пробиркага 0,5 мл аммоний молибдат эритмаси, 0,5 мл аскорбин кислота солиб, эритмаларнинг умумий ҳажми дистилланган сув билан 10 мл га етказилади. Пробиркалар хона ҳароратида 10 дақиқа сақланади. Бир оздан сўнг пробиркадаги эритмаларнинг оптик зичлиги аниқланади. ФЭК нинг 670 нм тўлқин узунлиги (қизил ранг) ишлатилади. Текширув назорат эритмаси қаршисида 1 см қалинликдаги кюветада колориметрланади. Фосфорнинг миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизиги кўрсаткичларига мувофиқ аниқланади.

Натижаларни расмийлаштириш. Фосфоенолпируватни аниқлаш усулининг асоси ва суюлтирилишини ҳисобга олган ҳолда топилган фосфор миқдори 100 г тўқима учун ҳисобланади. Натижалар дафтарга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

90- и ш. БИЖҒИШ ЖАРАЁНИДА АНОРГАНИК ФОСФАТНИНГ ИШЛАТИЛИШINI АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси. Глюкозанинг оксидланиш жараёнида оралик маҳсулотлар — гексоза ва триозаларнинг фосфорланган бирикмалари ҳамда АТФ ҳосил бўлади. Фосфорланиш анорганик фосфатнинг боғланиши билан боғлиқ бўлгани туфайли унинг эритмадаги миқдори камаяди. Анорганик фосфор миқдорини фосфор молибдат комплек-

си ҳосил бўлиши ва уни молибден тузигача қайтариш йўли билан аниқлаш мумкин.

Текширилувчи материал: фосфатлардан тозаланган ва қуритилган ҳамиртуруш.

Реактивлар: сахароза ёки глюкоза, фосфат эритмаси (6 г натрий гидрофосфатнинг 2 молекулали кристалланган тузи ва 2 г калий дигидрофосфат тузи 1 л сувда эритилади). УХСК нинг 10% ли эритмаси 2,5 моль л сульфат кислотада тайёрланган аммоний молибдатнинг 5% ли эритмаси; аскорбин кислотанинг 0,5% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, чинни ҳовонча, ўлчовли пипеткалар, воронкалар, қоғоз фильтрлар, тарози ва кадоқлар, 37°C ли термостат.

Бажариладиган иш тартиби. 1 г ювилган ва қуритилган ҳамиртуруш 1 г сахароза ёки глюкоза, 5 мл сув билан аралаштирилиб, майдаланади. Майдаланган аралашма пробиркага олинади ва унга 5 мл фосфат эритмасидан солиб яна аралаштирилади. Аралашмадан 1 мл олиб 1 мл УХСК эритмаси солинган пробиркага ўтказилади (бу текширув пробирка ҳисобланади). Қолган аралашма 37°C ли термостатга қўйилади. Алоҳида учта пробиркага 1 мл дан УХСК эритмаси солиб, унга термостатдаги ачитки аралашмадан вақти-вақти билан солинади. Биринчи пробиркага 30, иккинчисига 60, учинчисига эса 90 дақиқадан сўнг 1 мл ачитки солинади. Тўртинчи пробиркага ҳам 1 мл ачитки солинади. Ачитки оксиллари чўкмага тушгач ҳар қайси пробиркадаги эритма фильтр қоғоздан ўтказилади. Оксилсиз фильтрат таркибидаги аорганик фосфат аниқланади.

АНОРГАНИК ФОСФАТНИ АНИҚЛАШ

Юқоридаги оксилсиз фильтратнинг ҳар қайсисидан 0,5 мл дан тоза пробиркаларга олинади ва унга 1 мл аммоний молибдат эритмасидан 1 мл солинади. Эритмалар устига 8 мл дистилланган сув солиб, яхшилаб аралаштирилади ва хона ҳароратида ранг ҳосил бўлгунча 15 дақиқа сақланади. Пробиркадаги эритмаларнинг ранги бир-бири билан солиштирилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар жадвалга ёзилиб расмийлаштирилади. Тегишли хулоса чиқарилади.

Субстрат	Ачитқи ферментлар манбаи	Анорганик фосфат манбаи	Рагларнинг оч-тўқлиги			
			пробиркалар			
			I	II	III	IV

Билимни мустаҳкамлаш учун саволлар

1. Нима учун сулак амилазаси меъда шираси иштирокида таъсир этмайди.
2. Овқат таркибидаги карбонсувларнинг қайсилари меъда-ичак системасида парчаланмайди.
3. Гликогенни эритмадан чўктириб олишда унинг қандай хусусиятидан фойдаланилади.
4. Гликолиз жараёни оралиқ ва охири маҳсулотларининг номини айтинг.
5. Анорганик фосфат қандай жараёнларда ишлатилади.
6. Гликолиз жараёнида ҳосил буладиган фосфорли бирикмаларни айтинг.

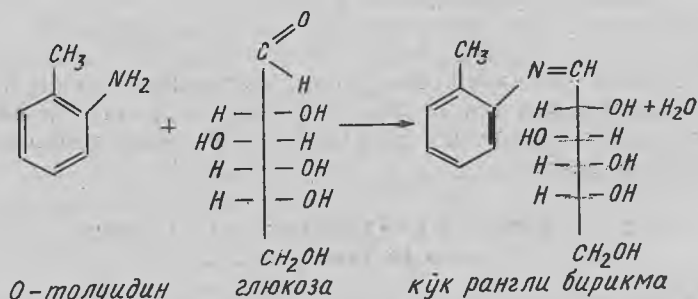
2. КАРБОНСУВЛАР АЛМАШИНУВИ МАҲСУЛОТЛАРИ МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

Тўқима ва ҳужайраларда глюкозанинг доимо сарфланиб туришига ва озиклангандан сўнг ичаклардан сўрилишига қарамай қон таркибида глюкозанинг миқдори бир меъёردа сақланади (3,3—5,5 моль/л, 60—100 мг/дл). Қон таркибидаги қанд миқдорининг деярли ўзгармас миқдорда сақланиши мураккаб бошқариш механизмларига асосланган. Бу механизмлар марказий нерв (МНС) ва эндокрин системаси томонидан амалга оширилади. Бу ўринда жигарнинг фаолияти муҳим аҳамиятга эга. Айрим касалликларда (қандли диабет) қондаги қанд миқдори меъёридан 2—3 баробар ортади. Бундай ҳолатни гиперглюкоземия дейилади. Қанд миқдорининг меъёридан камайиши гипогликемия ҳолати дейилади. Қанд миқдори ўзгарганини билиш касалликни аниқлашда амалий аҳамиятга эга.

91-и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРНИ О-ТОЛУИДИН РАНГЛИ
РЕАКЦИЯСИ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси глюкозанинг сирка кислота иштирокида о-толуидин билан рангли эритма ҳосил қилиши ва унинг оптик зичлиги ўлчанишига асосланган. Рангнинг зичлиги глюкоза миқдорига тўғри келади. Глюкозани аниқлаш учун қон оксиллардан тозаланиши керак. Ушбу усул билан фақат ҳақиқий глюкоза миқдори аниқланади, чунки о-толуидин глюкозага ўхшаш моддалар билан (глютатион, глюкурон, аскорбин кислоталар) рангли бирикма ҳосил қилмайди.

Усулнинг кимёвий тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: янги олинган қон.

Реактивлар: о-толуидин реактиви, УХСК нинг 3% ли эритмаси, глюкозанинг 5,5 моль/л ли доимий эритмаси (27,75 ммоль/л). Ишчи эритма суюлтириш билан тайёрланади.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, микропипеткалар, пипеткалар, воронкалар, филтр коғозлар, шиша таёқчалар, центрифуга тарозиси, ФЭК, кюветалар ва зар коғоз.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Битта центрифуга пробиркаси ва иккита оддий пробиркага 1,8 мл 3% ли УХСК эритмаси солинади. Биринчи пробиркага 0,2 мл қон, иккинчисига 0,2 мл глюкозанинг доимий эритмаси, учинчисига 0,2 мл сув солиб аралаштирилади. Қон солинган пробирка 10 дақиқа давомида дақиқасига 2500—3000 марта айланадиган центрифугада айлантирилади. Чўкма юқорисидаги суюқлик бошқа пробиркага олинади. Оксил чўкмасини филтрлаш ҳам мумкин. Шунингдек иккинчи ва учинчи пробиркалардаги суюқлик ҳам тоза пробиркаларга олинади.

2. 0,5 мл оксилсиз суюқлик солинган пробиркаларга 4,5 мл о-толуидин эритмаси солинади ва пробиркалар зар

қоғоз билан беркитилиб қайнаб турган сув хаммомига 8 дақиқага жойлаштирилади. Қайнаш жараёнида эритмалар рангли тус олади. Бир оз вақт ўтгач пробиркалар сув хаммомидан олиниб, сув окимида совитилади. Кўк рангли эритмалар 670 нм тўлқин узунлигида фотоэлектроколориметрланади. 1 см қалинликдаги кюветалар ишлатилади. Текширувчи эритма назорат эритма қаршисида кўрилади. ФЭК кўрсаткичлари куйидаги тенгламага кўйилиб, глюкоза миқдори топилади:

$$C_{\text{кон}} = C_{\text{доим}} \cdot \frac{E_{\text{кон}}}{E_{\text{доим}}}$$

$C_{\text{кон}}$ — қондаги қанд миқдори моль/л бирлигида

$C_{\text{доим}}$ — доимий эритмадаги глюкоза миқдори

$E_{\text{кон}}$ — текширувчи (қон) эритманинг оптик зичлиги

$E_{\text{доим}}$ — доимий эритма зичлиги

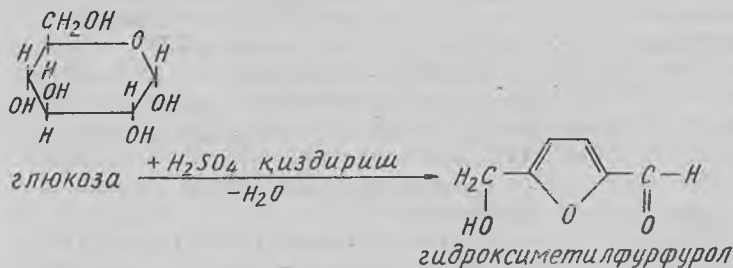
Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, кимёвий тенгламани, ФЭК кўрсаткичларини ва ҳисобланган натижани дафтарингизга ёзиб тегишли хулоса чиқаринг.

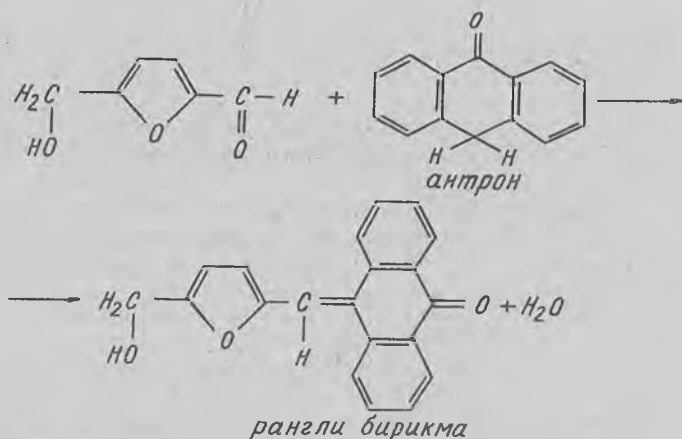
9 2 - и ш . ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРНИ АНТРОН УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Антрон усули билан қон таркибидаги «ҳақиқий қандларни» ва полиглюкозидларни аниқлаш мумкин. Бу усул 60—100 мг/дл, 3,3—5,5 ммоль/л га тенг бўлган қанд миқдорини аниқлашга имкон беради.

Усулнинг асоси. Глюкоза концентранган сульфат кислота таъсирида ҳосил бўлган гидроксиметилфурфурол антрон билан кислотали шароитда қиздирилганда енгил конденсацияланади ва кўкимтир-яшил рангли бирикма ҳосил қилади. Рангнинг зичлиги глюкоза миқдорига тўғри келади.

Усулнинг кимёвий тенгламаси куйидагича:





Текширилувчи материал: янги олинган коп.

Реактивлар: УХСК нинг 5% ли эритмаси, концентрланган сульфат кислота, антрон реактиви, йоднинг спиртли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, микролипеткалар, бюреткалар, 10 мл сизимли ўлчов цилиндр, сув хаммони, ФЭК ва 0,5 см ли кюветалар, центрифуга пробиркалари, центрифуга тарозиси, центрифуга, зар коғоз.

Бажариладиган иш тартиби. 1. 1,8 мл УХСК эритмаси солинган тўртта пробирканинг иккитасига 0,2 мл кон (текширувчи), иккитасига 0,2 мл дистилланган сув (назорат) солинади.

2. Текширув пробиркалари оксилни чуқтириш учун дақиқасига 3000 марта айланадиган центрифугага жойлаштирилиб, 10 дақиқа айлантиради. Сўнгра чўкма юкорисидаги суюқлик бошқа пробиркаларга олинади. Оксилларни филтрлаш йўли билан ҳам олиб ташлаш мумкин.

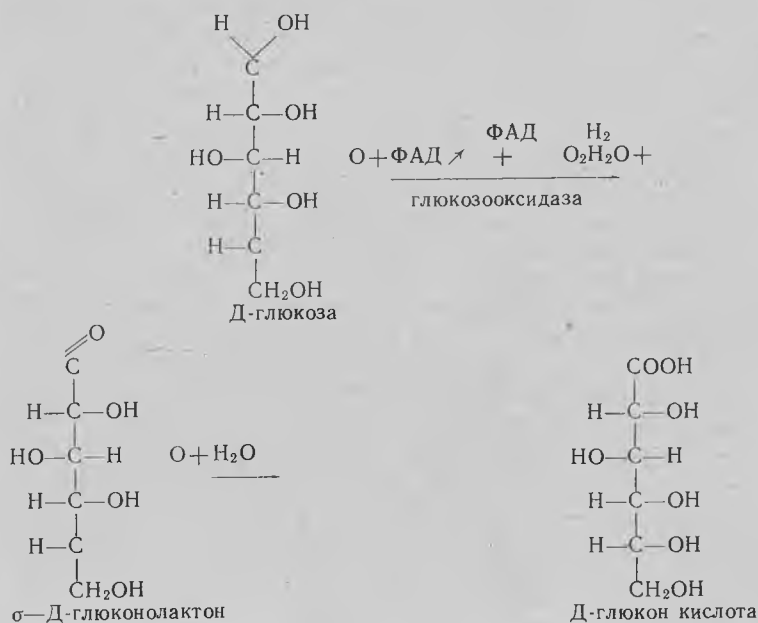
3. Иккита пробиркага текширув эритмасидан 0,5 мл, иккитасига назорат эритмасидан 0,5 мл олиниб, устига аста-секин 1 мл концентрланган сульфат кислота ва 2 мл антрон реактиви солинади. Эритмалар аста-секин аралаштиради. Эритмалар қизийди. Сўнг пробиркалар зар билан беркитилиб, қайнаб турган сув хаммонида 10 дақиқа қиздирилади.

4. Пробиркалар сув хаммонидан олиниб, совитилади. Сўнг текширув эритмалар назорат эритмалар қаршисида ФЭК нинг 670 нм тўлқин узунлигида (қизил ранг) колориметрланади. Глюкозанинг ммоль/л бирлигидаги миқдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асоси, топилган глюкоза миқдори дафтарга ёзилади. Натижа глюкозанинг меъёр миқдори билан солиштирилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

93-и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРНИ ФЕРМЕНТ ЁРДАМИДА АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси. Глюкозооксидаза ферменти таъсирида глюкоза ўзига хос ҳолда оксидланади. Ушбу фермент Д-глюкозага нисбатан юқори танланувчанлик хоссасини намоён қилади. Глюкозооксидаза (КФ 1. 1.3.4) — мураккаб икки қисмли фермент бўлиб, унинг фаол маркази вазифасини ФАД кофермент ўтайди. У ФАД глюкозанинг биринчи углерод атомидан иккита водородни олиб, кислородга узатади ва глюкозага эквимолекуляр миқдорда водород пероксидни ҳосил қилади. Натижада глюкоза Д-глюконолактонга айланади. Ҳосил бўлган H_2O_2 эса ўсимлик пероксидазаси иштирокида о-толуидинни оксидлаб, ўзи қайтарилади ва икки молекула сувга парчаланadi. Қайтарилган о-толуидин рангсиз, оксидлангани эса оч-кўкимтир рангли бўлади. Демак, ҳосил бўлган рангнинг зичлиги глюкоза миқдорига тўғри келади. Рангнинг зичлиги ФЭК да ўлчанади.



Текширилувчи материал: Янги олинган қон.

Реактивлар. Натрий хлориднинг 0,9% ли эритмаси, рух сульфатнинг 5% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 0,3 ммоль/л эритмаси, о-толуидиннинг 80°C да иситилган 96% ли этил спиртда тайёрланган 1% ли эритмаси, рН и 8,0 бўлган ацетат-сирка буфер эритмасининг 0,25 ммоль/л микдори, глюкозани аниқлайдиган ишчи реактив: рНи — 4,8 бўлган 80 мл 0,25 н сирка буфер эритмасига 2 мг глюкозооксидаза, 1 мг куруқ пероксидаза солинигач, 1 мл абсолют этил спиртида эритилган 1% ли о-толуидин куйилади ва унинг ҳажми сирка буфери билан 100 мл га етказилади. Эритма қора идишда музлатгичда сақланади. Ферментлар иш бошланганда қўшилади. Реактив хона ҳароратигача келтирилади.

Глюкозанинг 0,5; 1,0; 1,5 г/л (50, 100, 150 мг) микдорли доимий эритмалари тайёрланади. Эритмалар тўйинган бензой кислотада тайёрланади (тўйинган бензой кислота 100 мг бензой кислотани 100 мл сувда эритиш билан тайёрланади).

Керакли анжомлар. 0,1 мл ли микропипеткалар, 1, 2, 5 мл ли пипеткалар, штатив ва пробиркалар, ФЭК ва 1,0 см ли кюветалар центрифуга ёки фильтр қоғозлари, сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Қон оксилани чўктириш. Иккита центрифуга пробиркасига 0,9% ли натрий хлорид эритмасидан 1,0 мл, рух сульфатнинг 5% ли эритмасидан 1,0 мл, натрий гидроксид эритмасидан 0,4 мл солиб аралаштирилади ва устига 0,1 мл қон қўйилади. Эритмалар яхшилаб чайқатилади. 10 дақиқадан сўнг оксиллар дақиқасига 2500—3000 марта айланадиган центрифугада чўктирилади. Чўктириш жараёни 10 дақиқа давом этади.

2. Тоза ва куруқ пробирканинг биринчисига (текширув) 1,0 мл оксилсиз қон эритмаси, иккинчисига 1,0 мл дистилланган сув (назорат) солинади. Унга хона ҳароратигача иситилган ишчи реактивдан 3,0 мл солиб пробиркалар хона ҳароратида 15 дақиқа сақланади. Бу вақтда реакция натижасида эритмалар рангли тусга киришади. Эритма рангларининг зичлиги 670 нм тўлқин узунлигида ФЭК да ўлчанади. Текширув эритма назорат эритмаси каршисида кўрилади. Глюкозанинг микдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигидан топилади.

Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш. 37°C да куритилган кимёвий тоза (тўйинтирилган бензой кислотада 500 мг глюкоза эритилади) 1,0 мл доимий эритма таркибида 5 мг глюкоза бўлади. Турли микдордаги глюкоза эритмаларини тайёрлаш учун қатор пробиркаларга 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 мл асосий глюкоза эритмаси солинади. Уларнинг ҳажми дистилланган сув билан тенглаштирилади. Глюкоза микдорини аниқлаш юқорида берилган иш тартиби асосида олиб борилади. Сўнгра ҳар бир глюкоза эритмаси учун оптик зичлик аниқланади. Оптик зичлик «Е» ордината ўқиға, глюкозанинг микдори абсцисса ўқиға ёзилади.

Туташган нукталар бўйича чизик ўтказилади. Шу чизик ўлчов эгри чизиғи ҳисобланади.

Ушбу усул қондаги қанд миқдорини 3,1—5,2 ммоль/л (56—94 мг) қон зардоби ва плазмасини 3,05—5,55 ммоль/л (55—100 мг), орқа мия суюқлигидаги қанд миқдорини, 2,77—3,88 ммоль/л (50—70 мг) гача аниқлашга имкон беради.

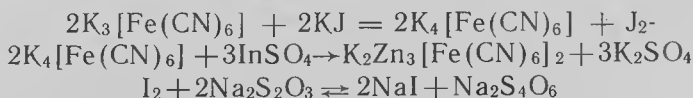
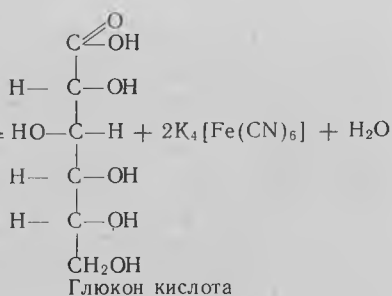
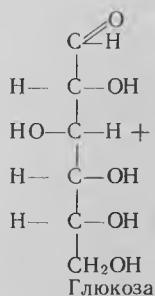
Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, ўлчов эгри чизиғи тайёрлашни ва ўлчов эгри чизиғи ҳамда топилган глюкоза миқдорини дафтарингизга ёзинг. Усулнинг устуңлиги нимадан иборат эканлигини айтинг.

94- и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРНИ ТИТРЛАШ (ХАГЕДОРН — ЙЕНСЕН) УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Хагедорн-Йенсен усули бирмунча камчиликларга эга бўлсада, ушбу усул айрим биохимия лабораторияларида ҳамон ишлатилмоқда. Усулнинг камчилиги шундаки, қон таркибидаги карбонсув бўлмаган моддалар ҳам глюкоза каби қайтарилиши мумкин, шунинг билан бирга глюкозанинг ҳақиқий миқдорини ошириб кўрсатиши мумкин. Аммо аниқланган глюкоза миқдорининг ҳақиқий глюкоза миқдоридан фарқи шундаки, қанд касаллиги билан оғриган беморда глюкоза кўрсаткичи ўзгариб туради, шунинг учун бу усулдан фойдаланиш мумкин.

Усулнинг асоси: оксилдан тозаланган, карбонсув тутувчи қон эритмасига ишкорий шароитда қизил қон тузи таъсир эттирилганда глюкозанинг биринчи альдегид гуруҳи оксидланади ва қизил қон тузи сариқ қон тузига айланади. Реакцияга киришмаган қизил қон тузи ортикча миқдорининг калий йод билан ўзаро таъсирланишидан йод ажралади. Ажралган йод миқдори глюкоза миқдорига тўғри келади. Йод эса гипосульфат ёрдамида титрланади.

Усулнинг кимёвий тенгламаси қуйидагича:



Қондаги қанд миқдори йод билан титрлаш натижасида олдиндан худди шу шароитда турли қанд миқдорлари билан ўтказилган тажрибалар асосида тузилган жадвалдан топилади.

Текширилувчи материал: қон.

Реактивлар: 0,45% ли рух сульфат эритмаси; 0,1 моль/л натрий ишқори; 0,005 моль/л қизил қон тузининг ишқорий эритмаси; (1,65 г), кимёвий тоза қизил қон тузи дистилланган сувда эритилиб 1 л ли ўлчов қолбасига ўтказилади ва 10,6 г олдиндан қиздирилган натрий карбонат тузидан солинади ва дистилланган сув билан бир ўлчовгача етказилади. Эритма қора идишда сақланади, хлор-рух-йодли учламчи эритма; 50 г рух сульфат; тахминан 250 г натрий хлоридда эритилиб, 1 л ли ўлчов қолбасига ўтказилади ва дистилланган сув билан ўлчовгача етказилади. Сўнгра эритма филтрланади. Эритма ишлатилишидан олдин шу эритмада 2,5% ли калий йод эритилади; 3% ли сирқа кислота эритмаси; крахмалнинг тўйинган натрий хлориддаги 1% ли эритмаси; 0,005 моль/л гипосульфат эритмаси, этил спирти.

Керакли анжомлар: 0,1 мл ли микропипеткалар, 1, 2, 5 мл ли пипеткалар, стаканчалар, қолбачалар, 3—4 см ли воронкалар, микробюретка, қайнатилган ниналар, пахта, сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Тўртта пробиркага 5 мл дан рух сульфат эритмаси, 1 мл натрий гидроксид эритмаси солинади. Унинг иккитасига янги олинган қондан 0,1 мл (текширув тажриба) дан солинади. Пробиркалар яхшилаб чайкатилади-да сув ҳаммомига 3 дақиқага қайнатиш учун қўйилади. Пробиркалар сув ҳаммомидан олиниб, тоза, қуруқ пробиркаларга ҳўлланган пахта солинган воронкалар орқали филтрланади. Ҳар қайси пробирка дистилланган сув билан бир неча марта чайкатиб ювилади. Шунда пробиркаларда қанд қолмайди.

2. Оксилсиз карбон сув тутувчи пробиркаларнинг ҳар қайсисига 2 мл дан титри аниқ бўлган қизил қон тузи эритмаси солинади ва қайнаб турган сув ҳаммомида роса 15 дақиқа давомида қайнатилади. Шунда қанднинг альдегид гуруҳи оксидланади.

3. Пробиркалар сув ҳаммомидан олиниб, совитилади. Тўртта стаканча ва қолбача тайёрланади. Уларга 3 мл дан учламчи эритма, 2 мл сирка кислота ва 2 томчи крахмал эритмаси солинади. Устига пробиркалардаги оксилсиз, оксидланган карбон сув эритмасидан солиниб, ҳар қайси стакан оқ қоғоз устида кўк ранг йўқолгунча натрий гипосульфит эритмаси билан титрланади. Олинган натижалар жадвалга мувофиқ ҳисобланади.

57- жадвал

Хагедорн-Йенсен усули бўйича қанд миқдорини аниқлаш

Ги- по- суль- фит	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,258	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

95- и ш. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ СИАЛ КИСЛОТА МИҚДОРНИ ЯНГИЧА УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

N — ацетил нейрамин кислота унуми бўлган сиал кислота организмда муҳим аҳамиятга эга бўлиб, у полисахаридларнинг таркибий қисми ҳисобланади. Сиал кислота гликопротеинлар таркибига кирувчи полисахаридларнинг охирги қисмига жойлашган. Гликопротеинлар организмда ҳимоя ва қопловчи восита сифатида қўлланилади. Айрим касалликларда, жумладан яллиғланиш жараёнларида бириктирувчи тўқималарни емирилишга олиб келувчи касалликларда (ревматизм, айрим ўсма касалликларида) қон зардоби таркибида ва тўқималарда сиал кислота миқдори ўзгаради. Шу боис қон зардоби таркибидаги сиал кислота миқдори аниқлаш касалликнинг кечишини аниқловчи кўрсаткич бўла олади. Соғлом одам қон зардобида сиал кислота миқдорининг ўртача кўрсаткичи 0,62—0,73 г/л. (62—73 мг/дл) ни ташкил қилади.

Усулнинг асоси. Қон зардобидаги учхлорсирка кислота таъсир эттирилганда (полисахаридлар гидролизланади) нейрамин кислота ажралади. Ажралган нейрамин кислота сирка-сульфат билан ўзаро таъсирланиб, рангли бирикма ҳосил қилади. Ҳосил бўлган қўнғир пушти рангнинг оч-тўқлиги сиал кислота миқдorigа тўғри пропорционалдир.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: сирка-сульфат реактиви (95 г сирка кислота ва 5 г концентранган сульфат кислота аралашмаси), 10% ли сирка сульфат кислота эритмаси; N — ацетил нейрамин кислотанинг доимий эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, центрифуга пробиркалари, 1,2 мл ли пипеткалар, 10 мл ли ўлчов цилиндрлари, сув ҳаммоми, центрифуга.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Куруқ центрифуга пробиркасига 1 мл қон зардоби, 1 мл УХСК солинади ва аралаштирилади, пробирка усти зар қоғоз билан берки-тиб қайнаб турган сув ҳаммомига роса 5 дақиқага нейрамин кислотани ажратиш учун қўйилади. Пробиркалар сув ҳаммомидан олингач, аралашма центрифугаланади ёки эҳтиётлик билан филтрланади.

2. Биринчи (текширув) пробиркага 0,4 мл центрифугаланган ёки филтрланган эритма, иккинчисига (назорат) эса 0,4 мл дистилланган сув солинади. Ҳар иккала пробиркага сирка сульфат реактивидан 5 мл дан солиб усти зар қоғоз билан беркитиладида қайнаб турган сув ҳаммомида роса 30 дақиқа қайнатилади. Пробиркалар сув ҳаммомидан олиниб совитилади ва ҳосил бўлган рангли

эритма яшил рангли фильтр қаршисида (540 нм тўлқин узунлигида), 1 см қалинликдаги кюветаларда, текширув ва назорат эритмалари фотоэлектроколориметрда солиштирилади. Эритмаларнинг зичлигини билган ҳолда ўлчов эгри чизиғи бўйича сиал кислота миқдори аниқланади.

3. Сиал кислоталарни аниқлаш учун ўлчов эгри чизиғини тайёрлаш. 0,5 мг 1 мл ли доимий эритмадан 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 мл тутувчи эритмаларнинг умумий ҳажмини дистилланган сув билан 0,4 гача етказилади. Барча пробиркаларга сульфат — сирка кислота реактивидан 5 мл дан солиниб, юкорида айтилган йўл билан сиал кислотанинг доимий эритмаларидаги миқдори аниқланади ва кўрсаткичларга мувофиқ ўлчов эгри чизиғи тузилади. Ордината ўқига оптик зичлик, абсцисса ўқига доимий эритмалардаги сиал кислотанинг миқдори қўйилади. Қесишган нуқталар бўйича чизик ўтказилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Сиал кислота миқдори ҳисобланади ва соғлом одам қон зардоби таркиби билан солиштирилади. Сиал кислота миқдорини аниқлашнинг аҳамиятини ёритинг.

Ўтказилган тажрибаларга асосланиб қуйидаги саволларга жавоб беринг

1. Қон ва қон зардобидаги оксил қайси реактивлар билан ажратилади? Қондаги қанд миқдорини аниқлаш учун уни оксилдан тозалашнинг сабабини айтинг.

2. Қондаги қанд миқдорини антрон, о-толуидин, ферментатив ва Хагедорн — Йенсен усуллари бўйича аниқлашнинг асосланишини айтинг. Нима учун антрон ва о-толуидин усули бўйича «ҳақиқий глюкоза» аниқланади деб ҳисобланади?

3. Қондаги қанд миқдорини аниқлашнинг диагностик аҳамиятини айтинг.

4. Қондаги қанд миқдорини аниқлаш усулларининг камчиликларини ва устунликларини, усулнинг қўлланилишидаги қулайликлар нимадан иборат эканлигини айтинг?

5. Сиал кислота миқдорини аниқлашнинг аҳамияти нимадан иборат?

3. КАРБОНСУВ АЛМАШИНУВИГА ГОРМОНЛАРНИНГ ТАЪСИРИ

Қондаги қанд миқдори марказий нерв системаси (МНС) ва эндокрин системаси томонидан бошқарилади. Қондаги қанд миқдори вақтинча ўзгариб турсада, унинг миқдори меъёрида сақланади. Қисқа вақт қанд миқдорининг ортиши — гиперглюкоземия ҳаяжонланиш, кучли оғрик натижасида рўй беради. Қанд миқдорининг ортиши қайд қилинган ҳолатларда қонга, адреналин ва кортикотропин гормонлари ажралиши билан боғлиқ. Карбон-

сувларга бой бўлган маҳсулотлар истеъмол қилинганда ҳам вақтинча физиологик гиперглюкоземия кузатилади. Турғун гиперглюкоземия ҳолати меъда ости безининг Лангерганс оролчаларининг β -хужайралари шикастланиши туфайли ҳосил бўлган инсулин етишмовчилигининг натижасидир. Қондаги қанд миқдорининг меъёридан камайиши гипоглюкоземия ҳолати дейилади. Бундай ҳолат инсулиннинг меъёридан кўпроқ ажралиши (гиперинсулинемия), буйрак усти пўстлоқ қисмининг вазифаси (глюкокортикоид гормонларнинг ажралиш) бузилиши натижасида, Аддисон касаллигида ва миянинг қанд маркази жойлашган қисмида бўлган ўсма натижасида рўй беради.

96- и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРИГА ИНСУЛИННИНГ ТАЪСИРИ

Лангерганс оролчаларидан ишлаб чиқариладиган инсулин гормони моддалар алмашинувида катта ўрин тутаяди. Инсулин хужайра мембранасининг глюкоза ва аминокислоталар учун ўтказувчанлигини оширади. Глюкозанинг хужайрада, мушакларда, ёғ тўқимасида, жигарда ўзлаштирилишини амалга оширади. Инсулин қондаги қанд миқдорини меъёрга солиб туради. Қандни глюкогенга айланишини тезлаштириб, гликоген парчаланишини сусайтиради. Глюкозадан ёғ ҳосил бўлишини кучайтиради. Ёғ кислоталарининг парчаланишини ва аминокислоталардан глюкоза ҳосил бўлишини сусайтиради. Тажриба ҳайвонларига инсулин юборилганда қон таркибида қанд миқдори камайганлиги кузатилади.

Текширилувчи материал: инсулин юборилишидан олдин ва юборилгандан кейин олинган қуён қони.

Реактивлар: тиббиётда ишлатиладиган инсулин (1 мл эритмада 40 ТБ инсулин бўлиши керак), стерилланган физиологик эритма, глюкозанинг 40% ли эритмаси, натрий оксалат тузи, глюкозани аниқлаш учун танланган усуллардан бирига реактивлар.

Керакли анжомлар. 1,0; 10,0 мл ли шприцлар, қон йиғиш учун идишлар, пахта, қайчи, глюкозани аниқлаш учун танланган усул бўйича керакли анжомлар.

Бажариладиган иш тартиби. Қон олиш. Қуён сочққа ўралади ва қон олинадиган қулоғи туқлардан тозаланади. Нина санчиладиган жой этил спирти билан дезинфекцияланади. Қонни ивишдан сақлаш учун 100 мл конга 0,1 мл натрий оксалат тузи ишлатилади. Венада қон кўпроқ тўпланиши учун қон олинадиган жойнинг юкориси сиқиб турилади ва нина венага киритилиб қон тортиб олинади ёки нина шприцдан ажратилади. Томчилаб оққан қон оксалат тузи солинган пробиркага йиғилади. Ҳаммаси бўлиб

4—5 мл қон йиғилади. Қон натрий оксалат тузи эритмаси билан ажратиб турилади. Қон олиш тугатилгач, нина ўрни спирт билан артилади.

Инсулин юбориш. Қуён вазнининг 1 кг сига 1,5 халқаро бирликда (МЕ) инсулин эритмаси тайёрланади. Одатда 1 мл инсулин таркибида 20—40 бирлик инсулин бўлади. Агар қуённинг вазни ортиқча бўлса, 1,5 МЕ қуён оғирлигига кўпайтирилади (масалан, қуённинг оғирлиги 2,5 кг бўлса, $1,5 \times 2,5$ (яъни тахминан 0,1 мл инсулин юборилади).

Инсулин солинган идишнинг қопқоғи спирт билан артилгандан сўнг инсулин стерил шприцга тортиб олинади. Инсулин қуён ҳолатда берилса, у стерил физиологик эритмада эритилади. Шприцдаги ҳаво чиқарилгандан кейин ва туклардан тозалаб дезинфекциялангандан кейин инсулин керакли жойга юборилади. Бунинг учун тери чап қўл билан кўтарилади ва тери остига астагина препарат юборилади. Инсулин юборилган жой албатта спирт билан артиб ташланади.

Қондаги қанд миқдори аниқлаш учун тажрибага олинган қуён бир соатга ўз катагида қолдирилади. Бу вақтда инсулин юборилгунча олинган қон таркибидаги қанд миқдори аниқланади. Қанд миқдори аниқлаш учун иккита текширув ва иккита назорат пробиркаси олинади. Бир оздан сўнг қуёнга инсулин юбориб сўнгра қони олинади ва таркибидаги қанд миқдори аниқланади. Инсулин юборилгунча ва инсулин юборилгандан кейинги қанд миқдори бир-бири билан солиштирилади.

Қуёндан иккинчи марта қон олингандан кейин 10 мл 40% ли глюкоза эритмаси унинг териси остига юборилади ва шунча эритма резина найча орқали ичирилади. Инсулин керагидан ортиқча юборилган бўлса «инсулин шоки» (кучли тиришиш аломати) юзага келади. Бу вақда қуён венасига 1 мл адреналин (1:1000) ёки 40% ли глюкоза эритмасидан 10 мл юборилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзиб расмийлаштирилади. Натижалар солиштирилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

58- жадвал

Қуённинг вазни	Юборилган инсулин миқдори, мл	Қондаги қанд миқдори, ммоль/л	
		Гармон юборилгунча	Гармон юборилгандан кейин

97- и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРИГА АДРЕНАЛИННИНГ
ТАЪСИРИ

Адреналин буйрак усти безидан ажраладиган гормон. Адреналин гликогеннинг парчаланишини тезлатади ва ҳосил бўлган глюкоза қонга ўтиб, қон таркибидаги қанд миқдорини кўнайтиради. Адреналин жигардаги фаол бўлмаган фосфорилаза «в» ни фаол фосфорилаза «а» га айланишини ва гликогеннинг парчаланишини тезлатади. Адреналин гликоген синтезини сусайтиради.

Текширилувчи материал: гормон юборилгунча ва юборилгандан кейин олинган қуён қони.

Реактивлар: адреналиннинг 0,1% ли стерил эритмаси, стерил физиологик эритма, этил спирти, натрий оксалат, танланган усул бўйича глюкозани аниқлаш учун керакли барча реактивлар.

Керакли анжомлар: қайчи, 2 мл ли шприц, қон йиғиш учун пробирка, микропипеткалар, пахта, қандни аниқлаш учун керакли асбоблар.

Бажариладиган иш тартиби. Ишнинг бориши инсулин билан ўтказилган тажрибадаги каби. Қуённинг 1 кг вазнига 0,37 мл 1:1000 адреналин юборилади. Қон адреналин юборилгунча ва адреналин юборилгандан 30 дақиқа ўтгач олинади ва унинг таркибидаги қанд миқдори аниқланади.

Натижаларни расмийлаштириш. Натижалар жадвалга ёзилади ва гормон юборилгунча ҳамда юборилгандан кейинги қанд миқдори бир-бири билан солиштирилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

59- жадвал

Қуённинг вазни	Адреналин миқдори, мл	Қондаги қанд миқдори, ммоль/л	
		Гормон юборилгунча	Гормон юборилгандан кейин

98- и ш. ҚОНДАГИ ҚАНД МИҚДОРИНИ ҚУШИМЧА
ҚАНД БЕРГАНДА ЎЗГАРИШИНИ
КУЗАТИШ

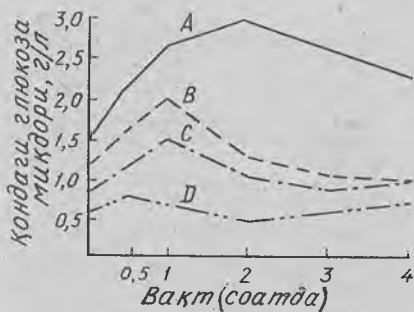
Карбонсувлар алмашинуви бузилишини аниқлашда қушимча қанд таъсирини ўрганиш катта аҳамиятга эга. Соғлом организмга 50—100 г глюкоза юбориш натижасида

16- расм. Ортиқча қанд берилганда қанд эгри чизиғи.

А — қандли диабет; Б — гипертиреоз; С — меъёр; D — Аддисон касаллиги, гипотиреоз ёки гипериусулинемия.

қондаги қанд микдори ортади. Аммо вақт ўтиши билан қон таркибидаги қанд яна ўз ҳолига қайтади.

Қандли диабетнинг яшириш турида қўшимча қанд юборилгандан кейинги гиперглюкоземия ҳолати анча вақтгача юқорилигича туради. Бунга сабаб глюкозанинг гликогенга айланишга улгурмаганлигидир. Демак, глюкозанинг қондаги микдори ортишига жавобан инсулин гормони ишлаб чиқарилиши бузилади. Одатда глюкозанинг қондаги ортиқча микдори 90—120 дақиқа ичида ўз ҳолига келади. Лекин айрим касалликларда, масалан қандли диабетда, акромегалия, гипертиреоз, гепатит, жигар циррози ва гликоген касалликларида қондаги қанд микдори кескин кўтарилган бўлса (22,2 ммоль/л) унинг асли ҳолига қайтиши анча сусаяди.



Текширилувчи материал: қўшимча қанд бермасдан ва қанд берилгандан 30, 60, 90, 120 дақиқа ўтгач олинган қон.

Реактивлар: танланган глюкозани аниқлаш усулига реактивлар.

Керакли анжомлар: танланган усулга оид асбоб-ускуналар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Қон бармоқдан наҳорга олинади. Сўнгра 100 г шакар эритилиб беморга ичирилади ёки 1 кг вазнига 1,0—1,5 г ҳисобидан глюкоза эритмаси венага юборилади. Қўшимча қанд юборилгандан сўнг қон ҳар 30, 60, 90, 120 дақиқада аниқланади. Олинган натижа асосида эгри чизиқ чизилади. Бунинг учун абсцисса ўқига қон олинган вақт, ордината ўқига эса топилган қанд микдори ммоль/л ҳисобида ёзилади. Туташган нукталар орасидан чизиқ ўтказилади. Бу чизиқ «қанд эгри чизиғи» дейилади. Қанд эгри чизиғини анализ қилишда а) бошланғич қанд микдори; б) қон таркибидаги қанд микдорининг ошиш тезлиги; в) унинг максимал кўтарилиш даражаси; г) гиперглюкоземиянинг давомийлиги ва пасайиш тезликлари эътиборга олинади.

Натижаларни расмийлаштириш. Олинган натижалар асосида «қанд эгри чизиғи» ни чизинг. Айтилган ўзгаришларга тегишли хулоса чиқаринг. Қитобда берилган қанд эгри чизиғига эътибор беринг (16- расм).

Тажрибаларга асосланиб қўйидаги саволларга жавоб беринг

1. Қанд эгри чизиги қандай тузилади?
2. Нима учун қанд микдорини аниқлаш учун параллел тажрибалар ўтказилади?
3. Соғлом ва бемор одамдаги «қанд эгри чизиги» қандай фарқланади?
4. Инсулин юборилгандан кейинги қон таркибидаги қанд микдорининг қамайиши қандай тушунтирилади?
5. Адреналин юборилгандан кейинги қондаги қанд микдорининг ортиши қандай тушунтирилади.

4. ҚАРБОНСУВЛАР АЛМАШИНУВИНИНГ ОХИРГИ МАҲСУЛОТЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Қарбонсувлар юқорида қайд этилганидек анаэроб шароитда сут кислотагача парчаланади. Аэроб шароитда эса тўлиқ парчаланади. Бунда глюкоза иккита триозага парчалангани учун бу йўл дихотомик парчалануш дейилади. Дихотомик йўл асосан уч босқичда амалга ошади. 1-босқичда глюкоза фосфорлангандан сўнг триозаларга ва нироузум кислотагача парчаланади. 2-босқичда ҳосил бўлган нироузум кислота ва фаол сирка кислота ацетил-КоА ($\text{CH}_3\text{CO} - \text{S CoA}$) га айланади. 3-босқичда эса ацетил КоА Кребс халқасида CO_2 , H_2O ва нафас олиш занжири учун субстратларни ҳосил қилади. 3-босқич ҳужайра митохондриясида амалга оширилади. Айрим касалликларда оралиқ маҳсулот — ПУК нинг микдори кескин ортиши кузатилади. Бу ҳолат ПУК ни ацетил-КоА га айланишида коферментлик вазифасини ўтовчи витаминлар етишмовчилигида кузатилади. ПУК айниқса мия тўқима ва ҳужайраларида кўп тўпланиб, МНС га заҳарли таъсир кўрсатади. Шунингдек, ПУК микдори қандли диабет касаллигида, юрак фаолияти сусайишида (бери-бери) полиневритда, гипофиз — адреналин системаси фаоллиги ортишида (гиперфункция) кузатилади. Айрим дорилар таъсирида ҳам ПУК нинг қондаги микдори кескин ортади. Масалан, камфора ва стрихнин шундай таъсир кўрсатади. Наркоз таъсирида эса аксинча, қон таркибидаги ПУК микдори камаяди. ПУК нинг қондаги микдорининг ортиши сийдик билан ажраладиган ПУК микдори ортиши билан бирга кечиши мумкин. Бир кунлик сийдик таркибида 113,7—283, 9 мкмоль/л (10—25 мг) ПУК ажралади. ПУК нинг қон ва сийдик таркибидаги микдорини аниқлаш амалий ва назарий аҳамиятга эга.

Қуйдаги саволларга жавоб беринг

1. Пироузум кислота микдорини аниқлаш учун қандай усуллардан фойдаланиш мумкин?

2. Усулларнинг асосини ва кимёвий тенгламасини ёзинг.

3. Пироузум кислота микдорини ўлчаш қандай аҳамиятга эга эканлигини тушунтиринг?

4. Пироузум кислотанинг ацетил-КоА га айланишида қандай фермент ва коферментлар иштирок этади. Реакцияларнинг кетма-кетлигини ёзинг.

5. Коферментлар таркибига кирувчи витаминларни айтинг. Витаминларга бўлган бир кунлик эҳтиёж қанча? Уларнинг етишмовчилиги қандай асоратларга олиб келишини айтинг.

Қуйдаги вазият масалаларни ечинг

1. Қандли диабет касаллигини аниқлаш учун 6—7 ёшдаги бола қони таркибидаги қанд микдорини ўлчанг. Қон олишдан олдин бола жуда безовталаниб, йиғлайди. Текширилганда бола қонидаги қанд микдори меъёридан ортик экан. Ушбу кўрсаткичга асосланиб бола қандли диабет билан оғриган деган хулоса чиқариш мумкинми? Хулосангизни изоҳлаб беринг.

2. Яққол ифодаланган қандли диабет билан оғриган кекса ёшдаги одам тўсатдан хушидан кетди (диабет комаси вужудга келган). Лаборатория кўрсаткичисиз шифокор қандай таърифлаши мумкин?

3. Қандли диабет билан оғриган беморга карбонсувларга бой маҳсулотларни камроқ истеъмол қилиш тайинланади. Маълум вақт ўтгач унинг қонидаги қанд микдори меъёрига келгани аниқланди. Карбонсувлар кам микдорда истеъмол қилинганда қандай қилиб қон таркибидаги қанд микдори меъёрида сақланади?

4. Семиришга мойил бўлган одамга карбонсувларни камроқ истеъмол қилиш ва жисмоний машғулот билан шуғулланиш тавсия қилинди. Бунинг сабабини тушунтиринг.

5. Беморнинг қонидан фруктоза-1-фосфат альдолаза ферменти топилди. а) қон таркибида фруктоза-1-фосфат альдолаза топилиши жигарнинг қандай касаллик билан оғриганлигини билдириши мумкин; б) фруктоза-1,6-дифосфат-альдолаза ва фруктоза-V-фосфат альдолаза ферментлари таъсирининг фарқи қандай?

6. Шифохонага даволаниш учун жойлаштирилган бола кўз катарактаси билан оғриган. Унда овқатланиш тартиби бузилган ва у етарлича овқатланмаган. Сут истеъмол қила олмайди. Ақлий жиҳатдан заифлиги аниқланди. Қон ва сийдиги таркибида галактоза борлиги, сийдик билан аминокислоталар ва оксил ажралиши кузатилди.

а) бундай ўзгаришларни қандай тушунтириш мумкин?

б) беморга қандай ёрдам кўрсатиш мумкин?

7. Бирламчи ревматизм билан оғриган бола шифохонага ётқизилди. Биокимёвий анализ унинг қон зардобидаги глюкоза-6-фосфатаза ферменти фаоллиги бирмунча ортганлигини кўрсатди.

а) соғлом одамда бу фермент қандай фаолликка эга?

б) қайси аъзоларда бу ферментнинг фаоллиги юқори даражада булади? в) нима учун боланинг қонида бу фермент пайдо бўлди?

8. Беморнинг сийдигида пироузум кислота микдори ортганлиги аниқланди. а) Бемор қандай касал билан оғриган? б) нима учун унинг сийдиги таркибида пироузум кислота микдори ортди? в) ПУЖ микдори ортишига сабаб нима?

г) ПУК нинг ацетил-КоА га айланишида қандай коферментлар иштирок этади? Бу коферментлар таркибига қандай ферментлар киради?

д) Витамин В₁ қўлланилишига сабаб нима?

9. Шифохонага ётқизилган беморнинг қонида сиал кислота меъёридан ортганлиги аниқланди. Бунинг сабабини қандай тушунтириш мумкин ва қандай касаллик ҳақида фикр юритиш керак?

10. Шифохонага жойлаштирилган бемор оғир камқонлик ҳолатида эди. Унинг қони таркибидаги глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа ферментининг фаоллиги бирмунча камайганлиги аниқланди.

а) Бу фермент қандай реакцияни катализлайди. б) беморда камқонлик ривожланишига сабаб нима?

VIII БЎЛИМ

ЁҒ АЛМАШИНУВИ

Ёғлар (липидлар) одам организмнинг зарур таркибий қисми ҳисобланади. Уларга нейтрал ёғлар — триацилглицеридлар ва ёғсимон моддалар (липоидлар), фосфолипидлар, гликолипидлар, стероидлар, простагландинлар киради.

Ёғлар организмда жуда кўп муҳим вазифаларни бажаради. Энг оддий тузилишга эга бўлган ёғ кислоталар организмда ёғлар парчаланиши ва синтезида иштирок этувчи оралик маҳсулотдир. Улар асосий энергия манбаи ҳисобланади. Нейтрал ёғлар асосий энергия манбаи бўлибгина қолмай, балки ҳимоя вазифасини ҳам бажаради.

Фосфолипидлар ва гликолипидлар ҳужайра мембранаси таркибига киради. Улар рецепторлик вазифасини бажаради. Нерв импульсларини ўтказишда катнашади ва иммунитет ҳолатини таъминлайди.

Стероидлар вакили ҳисобланган холестерин ҳужайра мембранаси таркибига киради. Улардан ўт кислоталар, стероид гормонлар, витамин D₃ ҳосил бўлади. Простагландинлар ёғ кислота маҳсулоти бўлиб, моддалар алмашинувини бошқаришда иштирок этади.

Ёғлар айрим витаминларни (А, D, E, K) организмга етказиб беради. Ёғлар таркибидаги ўрнини алмаштириб бўлмайдиган ёғ кислоталар (линол, линолен ва арахидон) витаминлик хоссасини намоён қилади. Улар витамин «F» поми билан юритилади.

Катта ёшдаги одам бир кунда 80—100 г ҳайвон ёки ўсимлик ёғи истеъмол қилиши керак. Кекса ва камҳаракат одамларнинг ёғга бўлган эҳтиёжи бирмунча кам. Муддатидан олдин туғилган чақалоқларнинг ёғга бўлган эҳтиёжи ўз вақтида туғилган болаларники билан бир хил (5,0—

6,5), лекин уларнинг тўйинган ёғларга бўлган талаби чекланган. Бу меъда ости беши ва жигар ташқи секретор функциясининг нисбий етишмовчилигига боғлиқ. Боланинг ёғга бўлган эҳтиёжи 100 г вазнига 0,80—1,50 г ни ташкил қилади.

Узоқ муддат оч қолганда, қандли диабет касаллигида ёғ алмашинувининг бузилиши кузатилади. Шу туфайли ёғлар ва уларнинг оралиқ маҳсулотларини ўрганиш катта амалий ва назарий аҳамиятга эга.

Бўлимнинг мақсади

1. Ёғларнинг организмда бажарадиган вазифаси, ўзига хос хусусиятини тушуниш учун уларнинг тузилиши ва хоссаларини ўрганиш.

2. Жигар ва ўт йўллари касалликларининг келиб чиқиш сабабларини аниқлаш учун ёғларнинг организмга сингишини ўрганиш.

3. Айрим касалликларни аниқлаш мақсадида ёғ алмашинуви, қондаги ёғ миқдорини ўлчаш усуллари билан таништириш.

ЁҒЛАРНИНГ ТУЗИЛИШИ, ПАРЧАЛАНИШИ ВА СЎРИЛИШИ

Ёғлар сувда эримайдиган, аммо органик моддаларда яхши эрийдиган бирикмадир. Ёғларнинг сингишида ўт кислоталарнинг натрийли тузи муҳим аҳамиятга эга. Улар ёғ ва сув орасидаги сирт таранглигини камайтиради ва уларни майда заррачаларга айланишини амалга оширади. Фаол бўлмаган липазани фаол липазага айлантиради. Узун занжирли, юқори ёғ кислоталари сўрилишини осонлаштиради.

Ўт кислоталар икки турга бўлинади. 1. Тоқ ўт кислоталар. Улар ҳолат, дезоксихолат, хенодезоксихолат кислоталардир.

2. Жуфт ўт кислоталар — гликохолат, гликодезоксихолат, гликохенодезоксихолат, таурохолат, тауродезоксихолат ва таурохенодезоксихолат кислоталардир.

99-и ш. ЎТ КИСЛОТАЛАРГА СИФАТ РЕАКЦИЯ

Реактивлар: олтингугурт кукуни, сульфат кислотанинг концентранган эритмаси, янги тайёрланган сахарозанинг 10% ли эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пилеткалар, штативлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Сувнинг сирт таранглигига ўтнинг таъсири. 1—2 мл сув солинган пробиркага бир чимдим олтингургурт кукуни солинади. Кукун сув билан аралашмай, сув юзасида қолади. Иккинчи пробиркадаги 1—2 мл сувга 5—10 томчи ўт суюқлиги томизилади, аралаштирилади ва бир чимдим олтингургурт кукуни солинса, у чўқади. Бу ўт суюқлиги таркибидаги ўт кислота тузларининг сув таранглиги сусайганлигини кўрсатади. Демак, ўт кислоталари ёғ-сув орасидаги сирт таранглигини камайтиради ва ёғларнинг сувда эришини осонлаштиради. Ўт суюқлигига ҳўлланган филтър қоғоздан ёғ яхши ўтади, ўт кислоталарига ҳўлланмаган қоғоздан эса ёғ ўта олмайди.

2. Ўт кислоталарига Петен — Кофер реакцияси. Пробиркага солинган 10—20 томчи концентрланган сульфат кислотага ўт суюқлиги (бир томчи янги тайёрланган шакар эритмаси билан ўт аралаштириб олинади) солинади. Эритмалар оралиғида (бу ўлиниш чегарасида) қизил бинафша ҳалқа ҳосил бўлади (бу ўт кислота чўкмасидир).

Иккала суюқлик аста-секин (эритмалар ўз-ўзидан қизийди, унинг 70°C дан ортиқ қизишига йўл қўймаслик керак) аралаштирилганида олча-қизил рангга киради. Кузатилган ранг сахарозанинг сульфат кислота билан таъсирланиб оксиметилфурфуролга айланиши ва ҳолат кислота билан ўзаро таъсирланиши натижасидир.

Э с л а т м а. 70°C дан ортиқ қиздирилганда кўмирланиш ҳодисаси рўй беради ва эритманинг ранги қораяди.

100-и ш. ТУХУМ САРИҒИДАН ЛЕЦИТИН ВА КЕФАЛИННИ АЖРАТИБ ОЛИШ ВА УЛАРНИНГ ТАРКИБИЙ ҚИСМЛАРИГА СИФАТ РЕАКЦИЯЛАРИ ЎТҚАЗИШ

Фосфатидилхолин ва фосфатидилэтанолламинлар тухум сариғидан спирт ёрдамида эритиб олинади. Сўнг улар гидролизланади. Гидролизат таркибидаги муҳсулотлар сифат реакция ёрдамида аниқланади.

Реактивлар: курук тухум сариғи (кукуни), этил спирти, ацетоннинг 10% ли эритмаси, калий йод эритмасида эритилган йод, сирка кислотанинг концентрланган эритмаси, темир (II) сульфат тузи, водород пероксиднинг 15% ли эритмаси, нитрат кислотага тайёрланган аммоний молибдат эритмаси.

Керакли анжомлар. Қайтар советгич ўрнатилган пробиркалар, пипеткалар, буюм ва коплагич ойначалар, чинни идишчалар, тарози ва микроскоп.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Лецитин ва кефалинларни тухум сариғидан ажратиш. Ҳавода қуритилган

1г тухум сариғи қайтар совитгич ўрнатилган пробиркага солинади. Унинг устига 5 мл этил спирти қуйиб 70—75°C гача иситилган сув ҳаммомига жойлаштирилади. Пробиркадаги суюқлик қайнагандан бошлаб, вақти-вақти билан 10 дақиқа давомида чайқатиб турилади. Бу жараёнда тухум сариғи лецитинлари, кефалинлари ва қисман пигментлари эриган ҳолатга ўтади. Спиртли эритма сарик рангга бўялади, тухум сариғи эса рангсизланади (спиртнинг буғланган қисми тўлдириб турилади. Яъни ҳажм бир меъёردа сакланади. Пробиркадаги эритма букланган қоғоз фильтри орқали тоза пробиркага ўтказилади. Фильтрат тиниқ бўлиши керак.

2. Лецитин ва кефалинларни парчалаш (гидролизлаш) ҳамда уларнинг таркибий қисмларига сифат реакциялари ўтказиш 1—2 мл спиртли экстрактга шунча микдорда сульфат кислота эритмаси қуйиб, 10—15 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилади. Лецитин таркибий қисмларга парчаланади. Бунда эркин холин, ёғ кислота, фосфат кислота ва глицерин ҳосил бўлади. Вақт ўтгач пробирка сув ҳаммомидан олиниб, совитилади. Унинг юзасида ёғ томчилари қалқиб юради. Булар ёғ кислоталардир.

а) гидролизат таркибидаги холинни аниқлаш учун шиша ойначага кичик гидролизат томчиси олинади ва устига калий йод эритмасида эритилган йоддан кичик томчи томизилади. Томчилар қоплагич ойнача билан қопланади. Микроскоп остида кўнғир рангли холин кристаллари ҳосил бўлади.

б) қолган экстракт чинни косачага солиниб, сув ҳаммомида буғлатилади. Қолган қуруқ қисми концентранган сирка кислотанинг бир неча томчисида эритилади. Унинг устига темир (II) сульфат кристаллари қўшилади. Эритмага 1 мл водород пероксид солиб, озгина қиздирилади. Бунда фосфат кислота ажралади. Экстракт филтрланади. Фосфат кислотани аниқлаш учун бир томчи филтратга 1 мл концентранган нитрат кислота ва ортиқча микдордаги (5—6 мл) аммоний молибдатнинг нитрат кислотада тайёрланган эритмасидан солиб қиздирилади. Бунда аммоний фосфомолибдатнинг сарик рангли чўкмаси ҳосил бўлади.

Натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга ўт кислотанинг номини, бажарадиган вазифасини ҳамда реакция натижасини ёзинг.

Лецитинни ажратиш усули ва таркибий қисмларга сифат реакциялар жадвалга мувофиқ расмийлаштирилади.

Гидролиз маҳсулотлари	Ишлатилган реактивлар	Реакция маҳсулоти	Реакциянинг асоси

101-и ш. МИЯ ХОЛЕСТЕРИНИНИ АЖРАТИШ ВА УНГА СИФАТ РЕАКЦИЯЛАРИ УТҚАЗИШ

Вазни 70 кг бўлган одам организмда 140 г холестерин бўлади, яъни у 0,2% ни ташкил қилади. Холестерин хужайра ва тўқималарнинг муҳим таркибий қисмидир. Тўқималарда эркин холестерин ва унинг ёғ кислоталар билан ҳосил қилган эфирлари — олеилхолестерин учрайди. Бир кунда одам озиқ-овқат маҳсулотлари билан ўртача 0,4—0,5 г холестерин истеъмол қилади. Аммо холестериннинг кўпроқ қисми организмда синтезланади (кунига 0,7—1,0 г). Айниқса мия тўқималари холестеринга бой бўлади.

Холестерин асосан хужайра мембранаси таркибига киради ва мембрананинг қаттиқ-юмшоқлигини таъминлайди. Хужайра мембраналарининг органик эритмалар билан ишлов берилиши натижасида холестерин эритмага ўтади, яъни экстракцияланади. Холестеринни аниқлаш учун концентрланган сульфат кислотадан фойдаланилади, яъни уларни тўйинмаган углеводородга айлантирилади. Ҳосилалар сульфат кислота ва сирка ангидрид билан рангли бирикма ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: мия тўқимаси.

Реактивлар: Мис (II) сульфат тузи, хлороформ, концентрланган сульфат кислота, концентрланган сирка кислота, сирка ангидриди.

Керакли анжомлар: курук пробиркалар ва штативлар, воронкалар, пипеткалар, шиша таёқчалар, шиша ойначалар, фильтрлар, скальпель, фильтрлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1 г мия тўқимаси 2—3 г мис (II)-сульфат билан чинни ховончада куюқ қийма ҳосил бўлгунча эзилади. Ҳосил бўлган қийма скальпель ёрдамида шиша ойнача устига ингичка қатлам қилиб ёйилади ва 60°C да қуритилади. Шиша ойнача алангадан анча юқорида тутилиши керак. Мис сульфат билан қуритилган мия тўқимаси скальпель билан аста-

секин кириб олинади ва пробиркага солинади. Унинг устига 5 мл хлороформ куйилади. Холестерин хона хароратида 5 дақиқа экстракцияланади. Экстракт курук пробиркага филтрланади ва икки қисмга бўлинади, уларга сифат реакциялар ўтказилади.

Зальков реакцияси. 1 мл мия экстрактига шунча миқдорда концентрланган сульфат кислота солиб аралаштирилади. Эритма бир оз тингандан кейин суюкликларнинг юқориги хлороформли қавати қизил рангга, пастки сульфат кислота қавати эса сарик қизғиш, яшил флюоресценцияловчи рангга бўялганлиги кузатилади. Суюкликнинг юқори қисми олиб ташлангач, пастки қисмига концентрланган сульфат кислота куйилса, эритма пушти-қизил рангга бўялади, флюоресценция ҳосил бўлади.

Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини ва олинган натижани жадвалга мувофиқ расмийлаштиринг.

61- жадвал

Сифат реакция	Ишлатилган реактив	Кузатилган ранг	Хулоса

102- и ш. МЕЪДА ОСТИ ЛИПАЗАСИ ТАЪСИРИНИ ТЕКШИРИШ. ЛИПАЗА ФАОЛИЯТИНИНГ ЎТ СУЮҚЛИГИГА БОҒЛИҚЛИГИ

Ёғларнинг парчаланиши асосан ингичка ичакда, меъда ости безидан ажралган липолитик ферментлар таъсирида амалга оширилади. Липазаларнинг турлари бир неча хил. Уларнинг бири триацилглицериднинг альфа ҳолатидаги эфир боғларига боғлиқ, қолганлари эса бета ҳолатидаги эфир боғларининг парчаланишини тезлатади. Триацилглицеридларнинг парчаланиши босқичма-босқич боради: аввало фермент альфа₁ ва альфа боғларини, сўнгра анча секинлик билан бета моноацил глицерин боғларини парчалайди. Ҳосил бўлган маҳсулотлар: моноацил, диацилглицеридлар, глицерин ва ёғ кислоталари ингичка ичак деворларига сўрилади.

Ёғларнинг сингишида ва сўрилишида ўт кислоталар муҳим аҳамиятга эга. Улар ёғларни эмульсия ҳолатига, фаол бўлмаган липазани фаол ҳолатга ўтказди, сўрилмайдиган ёғ кислоталарининг сўрилишини осонлаштирилади.

Липаза таъсирини кузатиш учун янги музлатилган меъда ости безининг сувли ёки глицеринли эритмаси ишлатилади. Липаза таъсирини текшириш учун липазанинг ёғли аралашмаси тайёрланади. Тажриба давомида ёғнинг парчаланиши натижасида ҳосил бўлган ёғ кислота миқдори аниқланади. Ёғ кислота миқдори фенолфталеин иштирокида 0,01 моль/л натрий гидроксид эритмаси билан нейтралланган (титрлаш)да аниқланади.

Текширилувчи материал: меъда ости безидан олинган липазанинг глицеринли экстракти ёки майдаланган меъда ости беги.

Реактивлар: ўн марта (1:10) суюлтирилган сут ёки ўсимлик ёғи, ўт суюқлиғи, фенолфталеин, 0,01 моль/л натрий гидроксид эритмаси, дистилланган сув.

Керакли анжомлар. 25 мл ли қолбалар, 10 мл ли ўлчов цилиндрлари, пробиркалар, пипеткалар, стаканчалар, бюреткалар, микробюреткалар, 38—40°C ли термостат ёки сув ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби. 3 та пробирка тайёрланади. Уларнинг 2 таси текширув, 1 таси назорат тажриба учун ишлатилади. Иш тартиби жадвалга биноан ўтказилади.

62- жадвал

Суюқлик аралашмалари	1- тажриба	2- тажриба	Назорат
1:10 суюлтирилган сут, мл	10,0	10,0	10,0
Меъда ости безининг глицеринли эритмаси, мл	1,0	1,0	1,0
Ўт суюқлиғи, мл	—	1,0	1,0
Дистилланган сув, мл	1,0	—	1,0

2. Тайёрланган инкубацион аралашма суюқликлари яхшилаб аралаштирилади. Сўнгра ҳар қайси пробиркадан 2 мл аралашма титрлаш учун стаканчаларга олинади. Уларга 1—2 томчи фенолфталеин эритмаси қўшиб оч пушти ранг ҳосил бўлгунча натрий гидроксид эритмасида титрланади.

3. Пробиркада қолган аралашма 38—40°C ли термостатга жойлаштирилади ва ҳар 15, 30, 90 дақиқада аралашмалардан 2 мл стаканга олиниб, натрий гидроксид эритмаси билан титрланади. Титрлаш вақти ва сарфланган натрий гидроксид миқдори жадвалга ёзилади.

Липазанинг таъсири бошланишидан олдин олинган биринчи титрлашнинг натижаси кейинги титрлаш натижасидан айирилади.

4. Олинган натижалар асосида эгри чизик чизилади,

Инкубацион вақти, дақиқаларда	Титрлаш учун сарфланган натрий гидроксид, мл		
	1- текширув ўт суюқлигисиз	2- текширув ўт суюқлиги билан	Назорат
15			
30			
90			

абсцисса ўқига вақт (дақиқа), ордината ўқига эса сарфланган натрий гидроксид миқдори билан ифодаланган липаза фаоллиги келтирилади. Ўт иштирокида ва ўт суюқлигисиз аниқланган липаза фаолликлари солиштирилади.

Натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга усулнинг асосини, эгри чизиқни ва хулосангизни ёзинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Ёғларнинг организмда бажарадиган вазифаси ва аҳамиятини айтинг.
2. Ёғларнинг сингиши учун қандай шарт-шароитлар талаб қилинади.
3. Ўт кислоталарнинг ёғларнинг сингишидаги ва сўрилишидаги иштироки, қандай ўт кислоталарни биласиз.
4. Ўт кислоталарнинг организмда айланишини тушунтиринг.
5. Қайси касалликларда ёғларнинг парчаланиши ва сўрилиши бузилади, бунга сабаб нима?
6. Ёғларнинг сингишида қайси ферментлар иштирок этади.
7. Ёғларнинг сўрилиши ва ичак деворида қайта синтезланиши.
8. Холестериннинг организмдаги вазифаси.

ЁҒЛАРНИНГ ОРАЛИҚ АЛМАШИНУВИ

103- и ш. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ ЭРКИН ЁҒ ҚИСЛОТАЛАРНИ АНИҚЛАШ

Қон таркибида 640—880 ммоль/л (640—880 мкг экв/л) эркин ёғ кислоталари бўлади. Янги тузилган чақалоқлар организмдаги ёғлар (триацилглицерид) таркибида кўпинча пальмитин ва пальмитолеин кислота бўлади, линолен кислота эса камроқ бўлади. Шу билан катта ёшдаги одам ёғларидан фарқланади. Чақалоқлар қон зардобидида бир ёшдан ошган болалар ва катталарга нисбатан эркин ёғ кислоталар миқдори кўпроқ бўлади. Бу эса улардаги ёғларнинг парчаланиши ва организмнинг энергияга бўлган эҳтиёжини қондиради.

Чақалоқлар ва катта ёшдаги одам организмдаги ёғларнинг таркиби ва хусусияти

Ёғ таркиби	Чақалоқларда	Катталарда
Олеин кислота	68,0	90,0
Пальмитин кислота	29,0	8,0
Стеарин кислота	3,0	2,0
Ёғларнинг эриш нуқтаси °С	43	17,5
Йод миқдори	43,4	65,0

Қандли диабет касаллигида, организмга адреналин юборилгандан кейин ва узоқ муддат оч қолганда эркин ёғ кислоталар миқдори меъёридан ортиқ бўлиши кузатилади. Эркин ёғ кислоталар альбуминлар билан боғланган ҳолда ташилади. Қонда глюкоза ва инсулин миқдори ортганда у камаяди.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: пальмитин кислотанинг доимий эритмаси (25,6 мл пальмитин кислота хлороформда эритилиб, ҳажми 100 мл гача етказилади. 1 мл эритма таркибида 0,256 мг пальмитин кислота бўлади) хлороформ, мис реактиви (реактивларнинг тайёрланишига қаранг) натрий диэтилтиокарбоматнинг (бутанолда ҳайдалган) 0,1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: центрифуга, ФЭК ва кюветалар, копқоғи зич беркиладиган пробиркалар, центрифуга пробиркалари, 1 ва 5 мл ли ўлчов липеткалари, шиша таёқчалар.

Бажариладиган иш тартиби. Қопқоғи зич беркиладиган пробиркаларнинг бирига 0,5 мл қон зардоби, иккинчисига 1 мл хлороформда эритилган пальмитин кислота солинади. Текширув пробиркасига 5 мл, доимий стандарт эритма солинган пробиркага эса 4,5 мл хлороформ солиб, барча пробиркаларга 2,5 мл дан мис реактиви қўйилади. Бир йўла назорат тажриба пробиркалари тайёрланади: 5 мл хлороформга 2,5 мл мис реактиви солинади. Пробиркалар беркитилиб 3 дақиқа чайқатилади. Сўнгра эритмалар центрифуга пробиркаларига ўтказилади ва дақиқасига 3000 марта айланадиган центрифугада 15 дақиқа айлантирилади. Пробиркалардаги суюқликлар 3 қаватга ажралади: хлороформ, оксил ва сув. Юқоридаги сув қават (фаза) мис реактивининг ортиқча миқдорини тутади. Бу қават аста-секин олиб ташланади. Оксил парда девор томон сурилади, хлороформ қисми эса бошқа пробиркаларга олинади. Шу хлороформ қаватида ёғ кислоталар эриган бўлади. Хлороформ тутган пробирка-

ларга 0,5 мл 0,1% ли диэтилтиокарбоматнинг натрийли тузидан ва бутанолдаги эритмасидан куйилади ва ара-лаштирилади. Текширув ва доимий-стандарт эритмалар яшил нур фильтри каршисида 5 мм ли кюветеларда назо-рат эритмалар билан солиштирилган ҳолда колориметр-ланади.

Эркин ёғ кислота миқдори куйидаги тенгламага биноан ҳисобланади.

$$\frac{E_{\text{текширув}} \cdot 1000}{E_{\text{доний}} \cdot 0,5} \text{ мкмоль/л}$$

Натижаларни расмийлаштириш. Натижалар дафтарга ёзилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

104-и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ТАРҚИБИДАГИ ЁГЛАРНИ АНИҚЛАШ

Баъзи касалликларда ёғ алмашинувининг бузилишига хос бўлган хусусиятларни аниқлашда ёғларнинг оралик махсулотлари миқдорини ўрганиш ва билиш катта аҳамиятга эга. Тўқималарда учрайдиган барча ёғ фракци-ялари қонда ҳам бўлади. Қўшимча лаборатория диагнос-тикаси учун қон таркибидаги умумий ёғлар, триацилгли-церидлар, ёғ кислоталар, холестерин ва унинг эфирлари ва бошқа кўрсаткичлар аниқланади.

Болаларнинг қон зардоби таркибидаги ёғлар катта-ларникидан сифати ва миқдори билан фарқ қилади.

65- жадвал

Қон зардобидаги ёғларнинг ёшга қараб ўзгариши

Ёғ фракциялари	Янги туғилган болаларда	Кичик ёш-даги бола-ларда	Катта ёш-даги бола-ларда
Умумий ёғлар г/л	2700—4700	4000—6000	4500—7000
Нейтрал ёғлар г/л	900—1500	1700	500—3000
Эркин ёғ кислоталар мэкв/л	1,2	0,6	0,6
Фосфатидларнинг фосфори г/л	30—50	50—75	65—900
Фосфатидлар г/л	750—1250	1250—1900	1600—2250
Лецитин г/л	600—1000	1000—1500	1300—1800
Умумий холестерин, мг	40—130	100—180	120—200
Холестерин эфири % ҳисобида	35—60	65	70
Эркин холестерин % ҳисобида	65—40	35	30
холестерин фосфатидлар нисбати	0,7—1,0	Тахмин, 1,0	Тахмин, 1,0

Қатта ёшдаги соғлом одам қон зардобида умумий ёғ микдори 400—800 мг/дл орасида бўлади. Қон плазмасидаги ёғлар асосан липопротеинлар кўринишида (яъни оксиллар билан бириккан ҳолда) учрайди. Қон зардобида липопротеинлар микдорининг ортиши гиперлипопротеинемия дейилади. Гиперлипопротеинемия ҳолати овқат истеъмол қилингандан (4—5 соат ўтгач) кейин кузатилади. Бу физиологик ҳолат (алиментар гиперлипопротеинемия) 12—16 соат ўтгач рўй беради ва липопротеинларнинг ўртача ҳолатга етиши билан яқунланади. Доимий гиперлипопротеинемия механик ва паренхиматоз сариқ касаллигида, диабетда, буйрак касалликларида, ичкиликбозликда ва бошқа касалликларда кузатилади. Ирсий гиперлипопротеинемия ҳолатлари ҳам маълум. Қандли диабет касаллигида ёғнинг жигарга ташилиши билан боғлиқ.

Усулнинг асоси. Ёғларни аниқлаш учун қон зардобига концентрланган сульфат кислота қўшилади. Сульфат кислота ёғларни гидролизлайди. Парчаланишдан ҳосил бўлган маҳсулот сульфаниламид реактиви билан рангли бирикма ҳосил қилади. Ҳосил бўлган ранг зичлигидан ёғ микдори ҳисоблаб топилади. Ранг зичлиги колориметрда ўлчанади.

Текширилувчи материал: қон зардоби (музлатилган ҳолда 5—6 кун сақланиши мумкин).

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота, фосфорванилин аралашмаси (4 қисм концентрланган фосфор қислота ва 1 қисм 0,6% ли ванилин қислота).

Керакли анжомлар. Курук пробиркалар, липеткалар, сув ҳаммоми, ФЭК, 0,5 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Текширув ва назорат тажриба пробиркалари жадвалга биноан тайёрланади (бутун гуруҳ учун битта назорат тажрибаси етарли бўлади). Сульфат кислота цилиндра ўлчанади.

66- жадвал

Пробиркалар	Қон зардоби, мл	Дистилланган сув, мл	Сульфат кислота, мл
Текширув	0,1	—	5,0
Назорат	—	0,1	5,0

1. Пробиркалардаги суюкликлар яхшилаб аралаштирилади ва гидролизлаш учун қайнаб турган сув ҳаммомига 10 дақиқага жойлаштирилади. Тажриба пробиркалари оқиб турган сув тагида хона ҳароратигача совитилади.

Сўнгра 0,2 мл гидролизат курук пробиркага олинади ва устига 3 мл фосфорванилин аралашмасидан солиб аралаштириладида 45 дақиқа хона ҳароратида қолдирилади.

2. Ҳосил бўлган рангли эритманинг зичлиги назорат эритмаси қаршисида яшил нур фильтрида калориметрланади.

3. Ёғларнинг умумий миқдори ўлчов эгри чизиги бўйича ҳисобланади. Натижа бирлиги қилиб 100 мл қон таркибидаги ёғ миқдори (мг да) олинади.

Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, берилган ўлчов эгри чизигини ва топилган умумий ёғ миқдорини дафтарингизга ёзиб, тегишли хулоса чиқаринг.

105- и ш. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ ФОСФОЛИПИДЛАРНИ АНИҚЛАШ

Фосфолипидлар ёғлар гуруҳига кириб, таркибида фосфор бўлади. Фосфолипидлар таркибига кўп атомли спирт — сфингозин ёки глицерин, ёғ кислоталари, фосфор кислота, шунингдек холин, этаноламин, серин ёки бошқа азот тутувчи бирикмалар қиради. Қон таркибидаги фосфолипидлар липопротеинлар комплексида учрайди. Соғлом одам қон зардобининг 100 мл да 150—380 мг фосфолипид бўлади. Янги туғилган болаларнинг қон зардобидида фосфолипид кўрсаткичи камроқ бўлади.

Усулнинг асоси. Фосфолипидларнинг умумий миқдори ёғлардаги фосфор миқдорига қараб аниқланади. Маълумки, фосфолипиднинг тахминан 4% ини фосфор ташкил қилади. Шу сабабли тажрибадан топилган ёғ таркибидаги фосфор миқдори 25 га кўпайтирилади. Фосфолипидлар қон зардобидидаги оксилларнинг учхлорсирка кислота билан ҳосил қилган чўкмасида аниқланади. Чўкмадаги фосфорни колориметрик йўл билан, фосфор молибдатни эса аммоний ва аскорбин кислота билан ҳосил қилган рангли реакциясидан фойдаланган ҳолда аниқланади.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Керакли реактивлар: учхлорсирка кислотанинг 10% ли эритмаси, хлорат кислотанинг (HClO_4) 56% ли эритмаси, аскорбин кислотанинг (янги тайёрланган), 0,5% ли эритмаси, аммоний молибдатнинг 2,5 моль/л сульфат кислотада тайёрланган эритмаси, натрий гидроксиднинг 50% ли эритмаси, калий дигидрофосфатнинг доимий эритмаси (1 мл эритма таркибида 1 мг фосфор бўлиши керак. Ишчи эритма доимий эритмани 100 марта суюлтириш билан тайёрланади).

Керакли анжомлар. Пробиркалар, пипеткалар, шиша таёқчалар, қум ҳаммони, центрифуга, ФЭК ва 1 см калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Текширув, доимий ва назорат тажрибалар учун 3 та пробирка тайёрланади (битта гуруҳ талабалари учун 1 ёки 2 та доимий ва назорат тажриба етарли бўлади).

1. Текширув тажриба пробиркасига 0,2 мл қон зардоби ва 3 мл 10% ли УХСК эритмаси томизилади (суюқликлар аралаштириб турилади). Пробиркадаги суюқликлар дақиқасига 3000 марта айланадиган центрифугада 5 дақиқа айлантирилади. Чўкма устидаги суюқлик олиб ташланади. Чўкмага 1 мл 56% ли хлорат кислота солинади ва 50—60 дақиқа давомида кум ҳаммомида рангсизлангунча қиздирилади. Сўнгра эритма совитилади ва унга 6 мл дистилланган сув ва 12 томчи натрий гидроксид эритмаси (нейтраллаш учун), 1 мл аммоний молибдат, 1 мл аскорбин кислота солинади.

2. Назорат тажриба пробиркасига 1 мл хлорат кислота, 6 мл дистилланган сув, 12 томчи натрий гидроксид эритмаси, 1 мл аммоний молибдат, 1 мл аскорбин кислота эритмаси солинади.

3. Доимий эритма солинган пробиркага 1 мл хлорат кислота, 2 мл калий дигидрофосфатнинг ишчи эритмаси, 4 мл дистилланган сув, 12 томчи натрий гидроксид эритмаси, 1 мл аммоний молибдат ва 1 мл аскорбин кислота солинади.

4. 20—30 дақиқа ўтгач, текширув ва доимий эритма солинган тажриба пробиркаларида ҳосил бўлган ранг зичлиги назорат эритма қаршида, қизил нур фильтри остида, 630 нм тўлқин узунлигидаги ФЭҚ да колориметрланади. Ёғ таркибидаги фосфор миқдори (х, мг/дл) қуйидаги тенгламадан ҳисобланади.

$$X = \frac{E_{\text{текширув}} \cdot 0,02 \cdot 100}{E_{\text{доимий}} \cdot 0,2} = \frac{E_{\text{текш.}}}{E_{\text{доим.}}} \cdot 10$$

бунда 0,02— доимий эритмадаги фосфор миқдори, мг
0,2— текшириш учун олинган қон зардоби миқдори, мл
100 — фосфорнинг мг/дл га ўтказиш коэффициенти.

Соғлом одам қон зардобидаги фосфор одатда 6,1—14,5 мг/дл гача бўлади. Умумий фосфолипидларни аниқлаш учун ёғ таркибидаги фосфорни 25 га кўпайтириш керак.

Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, колориметрлаш натижасини, ҳисоблаш натижасини дафттарингизга ёзиб, хулоса чиқаринг.

106-и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ТАРКИБИДАГИ УМУМИЙ
ХОЛЕСТЕРИННИ ИЛҶКА УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Соғлом одам қон зардоби таркибидаги умумий холестерин миқдори 150—250 мл/дл — 200 мг/дл атрофида. Холестерин эфирлари ва ёғ кислоталар умумий холестериннинг 50—70 фоизини, эркин холестерин 30—40 фоизини ташкил қилади. Эркин холестериннинг эфирланган холестеринга бўлган нисбати доимий катталиқдир. Янги туғилган болаларда холестерин ва унинг боғланган шакли кам миқдорда бўлади. Бола ўсган сари бу кўрсаткичлар катталарниқига яқинлашади (67-жадвалга қаранг). Қон плазмаси таркибидаги холестерин миқдорининг ортиши (гиперхолестеринемия) микседема, менингит, диабет, атеросклероз ва жигарнинг айрим касалликларида кузатилади. Оилавий гиперхолестеринемия ҳолатлари ҳақида ҳам маълумотлар бор.

67- жадвал

Реактивлар	Эритмалар				
	А	Б	В	Г	Д
НСІ, мл	48	—	—	—	—
Трис, мл	36,6	—	—	—	—
ТЕМЕД, мл	0,23	—	—	—	—
Акриламид, г	—	28	10	—	—
МБА, г	—	0,735	2,5	—	—
Аммоний пероксосульфат	—	—	—	0,14	—
Сахароза, г	—	—	—	—	40
H ₂ O	Жаъми	10 мл гача			

Қон плазмасидаги холестерин миқдорининг камайиши (гипохолестеринемия) сурункали юрак етишмовчилиги ҳолатларида, ўткир юкумли касалликларда, ўткир полиартритларда ва гипертиреозларда кузатилади.

Усулнинг асоси. Холестерин сирка ангидрид иштирокида сирка ва сульфат аралашмалари билан рангли маҳсулот ҳосил қилади. Ранг зичлиги колориметрда ўлчанади.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: ишчи реактив (тажриба ўтказилишидан олдин 1 қисм концентрланган сирка кислота, 5 қисм сирка ангидрид ва 1 қисм концентрланган сульфат кислота эҳтиётлик билан исишига йўл қўймаган ҳолда аралаштириб турилади.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, термостат, ФЭҚ ва кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби. Куруқ ва тоза пробиркага 2 мл ишчи реактив ва 0,1 мл гемолизланган қон зардоби солинади. Қон зардоби девор бўйлаб солиниши керак. Пробиркадаги суюқлик 10—12 марта чайқатилади ва 37°C ли термостатга 20 дақиқага жойлаштирилади.

Назорат тажрибасини тайёрлаш учун (битта гуруҳдаги талабалар учун 1—2 назорат тажриба етарли) куруқ пробиркага 2 мл ишчи реактив солинади. Қолган иш тартиби юқоридагидек. Эритманинг ранг зичлиги назорат тажриба қаршисида, қизил нур филтър тўлқин узунлигидаги ФЭК да кўрилади.

Холестерин миқдори ўлчов эгри чизигига биноан аниқланади.

Натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, колориметр кўрсаткичини, ҳисоб натижасини ва хулосангизни дафтарингизга ёзинг.

107-и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ЛИПОПРОТЕИНЛАРИНИ ПОЛИАКРИЛАМИД ГЕЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗИ УСУЛИ БИЛАН АЖРАТИШ

Липопротеинлар (ЛП) оксил ва ёғлардан ташкил топган мураккаб заррачалардир. Қон зардобидаги липопротеинлар таркиби эркин ва эфирланган холестерин, фосфолипидлар, триацилглицеринлардан иборат. Липопротеинларнинг 4 тури тафовут қилинади. Юқори зичликка эга бўлган липопротеинлар (ЮЗЛП) ёки альфа липопротеинлар оксил ва фосфолипидларга бой, соғлом одам қон зардобида бўлади. Паст зичликка эга бўлган липопротеинлар ёки бета липопротеинлар кўп миқдордаги холестеринни ташийдди. Жуда паст зичликка эга бўлган липопротеинлар ёки пребета липопротеинлар жигарда ҳосил бўлиб, эндоген триглицеридларни ташийдди.

Хиломикронлар ХМ ичак деворида экзоген озуқа триглицеринларнинг қайта синтезланишидан ва холестериндан ҳосил бўлади. ХМ жуда кўп миқдорда триглицеридларни ва кам миқдорда оксилларни тутганлиги туфайли электрофорезлашда стартда қолади. Эфирланмаган ёғ кислоталар (эркин ёғ кислоталар), қон плазмасида альбуминлар билан боғланган бўлади. Улар умумий ёғ кислоталарининг кам миқдорини ташкил қилади.

Янги туғилган болаларнинг липопротеинлари ўзига хос. Альфа липопротеинлар миқдори бета-ва гамма-липопротеинларга нисбатан ортиқроқ бўлади. Бола 4 ойлик бўлганда бу нисбат ўзгариб, катталарникига яқинлашади.

Усулнинг асоси. Олдиндан қора судан бўёғи билан

бўялган қон зардоби липопротеинлари электр майдонида, уларнинг зарядларига ва массасига боғлиқ ҳолда фракцияларга ажралади. Липопротеинларнинг алоҳида фракциялари % ини аниқлаш қатор касалликларда диагностика кўрсаткич бўла олади. Масалан, диабет, семириб кетиш атеросклероз, қон томирларнинг торайиши (ишемия) ва бошқа касалликларда кузатилади. Электрофорез усули билан олинган липопротеинограммалар барча касалликларга хос кўрсаткич ҳисобланади. Полиакриламид гель электрофорези липопроteid фракцияларни аниқлаш учун замонавий, бирдан-бир қулай усулдир.

Электрофорез учун ишлатиладиган полиакриламид гель акриламид ва метилен-бис-акриламид (МБА) мономерларини катализатор иштирокида полимерлаш йўли билан олинади. Катализатор аммоний персульфат ва N, N, N¹, N¹-тетраметилэтилендиамин эритмалари аралашмасидан иборат. Бунда полиакриламиднинг чизикли занжирлари метилен кўприкчалари билан ташилади.

Гельнинг тузилишида тўғри навбатлашган амид гуруҳлари бўлганлиги туфайли, яққол ифодаланган гидрофиллик хоссасини намоён қилади.

Монометр эритмалар ва катализаторлар (рН —8,9) буфер эритмада тайёрланиб, шиша найчаларда полимерланади.

Қон зардоби липопротеинларини ажратиш учун 3 қават акриламидли дифференциал электрофорез қўлланилади.

Текширилувчи материал: қон зардоби (уни 5—6 кунгача совитгичда сақлаш мумкин).

Реактивлар. Трис (триоксиметиленамнметанхлоргидрат), N, N¹ — метилен-бис-акриламид (МБА), N, N, N¹, N¹ тетраметилендиамин (ТЕМЕД), хлорид кислотанинг 1 моль/л эритмаси, аммоний пероксидисульфатнинг 140 мг/дл эритмаси, сахароза, қора судан «В» нинг этил спиртда тайёрланган тўйинган эритмаси (100 мг қора судан «В» 5 мл спиртда эритилади). рН и 8,8 бўлган трис-глицин буфер эритмаси.

Керакли анжомлар. Электрофорез учун асбоб, шиша найчалар, пастер пипеткалари, шприцлар.

Бажариладиган иш тартиби. 1. Электрофорез ўтказишга тайёрланиш. Ўтказувчанлиги билан фарқланадиган 3 қаватли гель тайёрланади. 1. Ушбу эритмаларни ишлатишдан олдин совитгичдан олинади ва ҳона ҳароратигача иситилади. Тозалаб ювилган шиша найчалар вертикал ҳолда штативга ўрнатилади. Шиша найчаларнинг пастки қисми резина қопқоқ билан беркитилади.

2. Пастки 10% ли гель эритмаси, 1 ҳажм А; 2,8 ҳажм Б, 0,2 ҳажм Н₂О ва 4 ҳажм аммоний пероксосульфат эритмаларини аралаштириш йўли билан тайёрланади.

Тайёрланган эритма Пастер пипеткаси ёрдамида аста-секил шиша найнинг 200 мл баландлигигача (найчанинг пастки ўлчов белгисигача) солинади. Сўнгра ҳар қайси найчанинг гелъ юқорисига икки гелъ орасида белги ҳосил бўлмаслиги учун девор бўйлаб дистилланган сув қаватланади (гелъ аралашмаслиги керак). Геллар полимерланиши учун найчалар хона ҳароратида 15—20 дақиқа сақланади.

3. Навбатдаги (5%) гелъни тайёрлаш учун, 1 ҳажм А; 1,36 ҳажм Б; 1,64 ҳажм сув ва 4 ҳажм аммоний пероксосульфат аралаштирилади. Бу эритма найчага Пастер пипеткаси ёрдамида 15 мл баландликда солинади (найчанинг иккинчи ўлчов белгиси). Унинг устига девор бўйлаб сув солинади. Гелънинг иккала қавати хона ҳароратида 30 дақиқа давомида полимерланади. Сўнгра сув чайқатиш йўли билан олиб ташланади. Иккала гелъ кичик тешикчали бўлади.

4. 3% ли гелъ қаватланади. Бунинг учун 1 ҳажм А; 2 ҳажм В; 1 ҳажм Д; 4 ҳажм Г эритмалари аралаштирилади. Бу эритма шиша найчага солинади. Бу қаватнинг баландлиги 20 мм. Гелъ юқорисидан сув қаватланади. Гелъ хона ҳароратида 30 дақиқа полимерланади. Сув юқоридагидек чайқатиш йўли билан олиб ташланади.

Қон зардобини тайёрлаш ва гелъга қуйиш. Зардоб тахминан этил спиртида тўйинтирилган қора судан билан бўялади. Бунинг учун 0,3 мл қон зардобига 0,15 мл қора судан В эритмаси ва 0,5 мл Е эритма қўшилади. Эритмалар хона ҳароратида бўлиши керак.

Тайёрланган тажриба хона ҳароратида, қоронғи жойда бир соатга қолдирилади. Сўнгра 0,05 мл (икки томчи) бўялган қон зардобини гелъ юқорисига қўйилади.

Электрофорез. 1. Электрофорез асбоби икки камерадан иборат бўлиб, улар бир-бирининг устига жойлаштирилган. Камеранинг юқори қисмига гелъ солинган найчалар жойлаштирилади. Найчаларнинг пастки қисми пастки камерага тушиб туриши керак. Найчанинг резина тикини олиб ташланади ва шприц ёрдамида электрод буфер билан хўлланади. Найчалар буфер эритмага 1—2 см чуқиб турадиган қилиб пастки камерага қўйилади. Найчаларнинг юқориги кириш қисмида ҳаво пуфакчалари бўлмаслиги керак. Шундан сўнг найчаларнинг усти бекилгунча буфер эритма билан тўлдирилади. Камера марказига электродлар ўрнатилади: юқорига (—) катод, пастки қисмига (+) анод.

2. Асбоб токка уланади, электродлар (ЭОБ — электродларнинг озика блоки) тўғри уланиши зарур.

3. Электрофорез» ЭОБ четки чап ҳолатга келтирилади, «Сеть» тумблери ўчирилади.

4. ЭОБ 220 В кучланишли токка уланади.

5. Электрофорез — таъминловчи «ЭОБ электрофорез» ҳолатига киритилади. «Ишлаш тартиби» 25—50 мА га қўйилади. «Ўлчаш» эса 1 мА га қўйилади.

6. Асбобнинг «Сеть» тумблери ишга туширилади. ЭОБ да сигнал тугмачаси ёнади.

7. «Электрофорез» қўд соати стрелкаси бўйлаб, ўлчов асбоби ток 2 мА га етгунча буралади (10 та найчага 20 мА берилади), 5 дақиқа ўтгач ток кучи ҳар бир найчага 5—6 мА гача оширилади ва электрофорез жараёни тугагунча шундай ҳолатда ушланади.

8. Электрофорез коронгилаштирилган хонада 60—75 дақиқа давомида ўтказилади. Шу вақт давомида қон зардоби липопротеинлари маълум фракцияларга ажралади.

9. Камеранинг юқори қисмидаги буфер бир идишга, пастки қисмидагиси эса қолбага солинади. Ушбу буферлар 10 мартагача ишлатилиши мумкин.

10. Электрофорез тугагач, «Сеть» тумблери ўчирилади. Камера ЭОБ дан ажратилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарга усулнинг асоси ёзилади, ажралган фракцияларнинг расмини чизиб, турли зардобларнинг бўялган липопротеин фракциялари солиштирилади. Қўйдаги расмда соғлом ва атеросклероз билан оғриган беморлар қон зардоби липопротеинларининг фракцияларга ажралиши кўрсатилган.

17-расм. Қон зардоби липопротеинларининг ажралган фракциялари.

1) Соғлом одамларда.

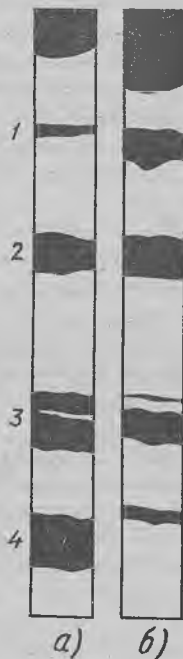
2) Атеросклероз касаллигида.

а) пре-бета-липопротеинлар;

б) бета-липопротеинлар;

в) альфа-липопротеинлар;

г) альбуминлар — эфирланмаган ёғ кислоталар.



17-расм. Соғлом одам (а) ва атеросклероз билан оғриган бемор (б) нинг қон зардоби липопротеинлари спектри.

1-пре — В — липопротеинлар; 2-В — липопротеинлар; 3 — α -липопротеинлар; 4-эфирланмаган ёғ кислоталар билан боғланган альбуминлар.

108-и ш. ҚОН ЗАРДОБИНИНГ ПАСТ ЗИЧЛИҚКА ЭГА БЎЛГАН ЛИПОПРОТЕИНЛАРИНИ (ПЗЛ) АНИҚЛАШ

ПЗЛ — (бета-липопротеинлар) нинг қондаги миқдори ёшга қараб 3—4,5 г л орасида бўлади. ЛНП миқдорининг ортиши атеросклерозда, механик сариқ касаллигида, ўткир гепатитларда, диабет, гликоген касаллигида, ксантомотоз ва семириш ҳолатларида кузатилади. ЛНП миқдорининг камайиши эса плазмоцитомادا аниқланган.

Усулнинг асоси: ПЗЛ — кальций хлорид таъсирида гепарин билан комплекс бирикма ҳосил қилиб, чўкмага тушади. Эритманинг хираланиш даражасига кўра қон зардобидаги ПЗЛ миқдори ўлчанади.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: қон зардоби (гепаринли қон зардоби ишлатилмайди), кальций хлориднинг 0,27% ли эритмаси, гепариннинг 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, микропипеткалар, ФЭК, 0,5 см ли кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Пробиркага 2 мл кальций хлорид эритмаси, 0,2 мл қон зардоби солинади ва аралаштирилади.

2. Эритманинг (E_1) оптик зичлиги ФЭКнинг 630 нм тўлқин узунлигидаги қизил нурида, 0,27% ли кальций хлорид эритмаси қаршисида ўлчанади.

3. Кюветадаги эритма пробиркага қўйилиб, микропипетка билан 0,04 мл 1% гепарин эритмаси солинади. 4 дақиқа ўтгач, қайтадан эритманинг оптик зичлиги (E_2) юқоридагидек шароитда ўлчанади.

4. Тенгламага биноан ЛНП нинг миқдори (с, г/л) ҳисобланади.

$$c = (E_2 - E_1) \cdot 10$$

10 — эмпирик коэффицент.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Дафтарга усулнинг асосини, натижасини ёзинг. Олинган натижалар соғлом кўрсаткичлар билан солиштирилади ва тегишли хулоса чиқарилади.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Қон зардобидаги умумий ёғ миқдори қандай аниқланади?
2. Қон зардобидаги умумий ёғ миқдорини аниқлашнинг диагностика аҳамияти нимадан иборат?
3. Гиперлиппротеинемия нима ва у қандай касалликларда келиб чиқади?
4. Ёғ алмашинувида фосфатидларнинг аҳамияти нимадан иборат?

5. Қон зардобидаги фосфатидларни аниклаш усулининг асоси нимадан иборат?
6. Қон зардобидаги фосфатидлар миқдорини аниклаш қандай диагностик аҳамиятга эга?
7. Қон зардобида холестерин миқдорини аниклаш усулининг асоси нимадан иборат?
8. Холестерин миқдорини аниклашнинг диагностик аҳамияти.
9. Қон зардобида қандай липопротеинлар бор?
10. Қон зардобидаги липопротеинларни қандай усул билан фракцияларга ажратиш мумкин? Бу усулнинг асоси нимадан иборат?
11. Липопротеин фракцияларининг ёғ алмашинувидаги аҳамияти қандай?
12. Қон зардобидаги липопротеин фракциялари миқдорини аниклаш қандай диагностик аҳамиятга эга?
13. Организмда ёғ алмашинувини аниқлайдиган қандай замонавий усулларни биласиз?

Қуйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Нима сабабдан ўт пуфаги яллиғланган беморга ёғсиз овқат истеъмол қилиш тавсия қилинади?
2. Ўт пуфагида ва ўт йўлларида тош ҳосил бўлишига сабаб нима? Бундай беморларга қандай дори-дармонлар тавсия қилинади?
3. Қандай ҳолатларда бемор ахлати билан ёғ ажралади? Бундай жараёни қандай изоҳлаш мумкин?
4. Ёғли овқат истеъмол қилингандан 1—2 соат ўтгач қон зардобининг хиралашгани кузатилади. Аммо бир оз вақт ўтгач, қон қайтадан тиниклашади. Бундай жараёнда қандай фермент иштирок этади?
5. Ёғнинг парчаланиши ва сўрилишининг бузилиши билан витамин E, K, D, A лар етишмовчилиги орасида қандай боғлиқлик бор?
6. Атеросклероз касаллиги бор деб гумон қилаётган врач бемор қонида қандай кўрсаткичларни аниқламоғи лозим? Жавобингизни изоҳланг.
7. Онлавий атеросклероз касаллигининг келиб чиқишига сабаб нима?
8. Лецитинхолестеринацилтрансфераза (ЛХАТ) ферментининг касалликни аниқлашдаги аҳамияти қандай? Жавобингизни изоҳланг.
9. Беморнинг қонидаги эркин, эфирланган ва умумий холестеринни аниқлашдан мақсад нима? Холестериннинг организмда тутган ўрни қандай?
10. Қон таркибидаги умумий липопротеидлар, фосфолипидларни аниқлаш сабабини тушунтириб беринг.
11. Бола овқат таркибидаги ёғ миқдорини ўзгартирмаган ҳолда углеводлар миқдори камайтиради. Бундай тадбир қандай ўзгаришларга олиб келиши мумкин?
12. Углевод ва ёғ балансининг бузилиши уларнинг алмашинуви бузилишига олиб келади. Бундай ҳолатда кетонемия ва ацидоз кузатилади. Бундай биокимёвий ўзгаришларни тушунтиринг ва изоҳланг.
13. Атеросклероз билан оғриган беморга паст калорияли парҳез тавсия қилинади. Бунда углеводлар ва ҳайвон ёғлари миқдори камайтиради, аммо витамин ва клетчатка миқдори орттиради. Бунга сабаб нима? Жавобингизни изоҳланг.
14. Атеросклероз касаллигида организмдан холестеринни чиқариш тадбирлари кўрилади. Бунинг сабабини тушунтиринг.
15. Ёш улғайган сари одам семиришга мойил бўлади. Нима учун, сабабини тушунтиринг.

16. Холестерин, юкори зичликка эга бўлган липопротеинлар ва жинсий гормонлар орасида қандай боғлиқлик бор? Жавобингизни изоҳланг.

17. Ацетил-SКоА карбонсув алмашинуви ва холестерин синтезининг оралиқ маҳсулотидир. Энергияга эҳтиёж пасайганда ва ортганда қандай ўзгаришлар кузатилади?

18. Нима сабабдан атеросклероз касаллигида врачни альфа- ва бета липопротеинлар микдори қизиқтиради?

IX БЎЛИМ

ҚОН БИОХИМИЯСИ

Қон организмнинг асосий ички муҳити ва эритмаси бўлиб ҳисобланади. Ташқи муҳитдаги моддалар, хужайра, тўқиманинг алмашинув маҳсулотлари доимо қонга тушиб туради. Қон қизил рангли, ёпишқоқ, кучсиз ишқорий муҳитга эга. Катталарда унинг рН и 7,36—7,4, янги туғилган болаларда эса 7,2—7,3, солиштирма оғирлиги 1,050—1,060, чақалоқларда 1,060—1,080 га тенг гетероген модда.

Янги туғилган бола қонининг умумий микдори 0,7 л ни ташкил қилса, 5 ёшга етганда 1,3, 10 ёшда 2,5, 15 ёшда 4,5 ва катталарда 5,0—5,5 л ни ташкил қилади. Қатта ёшдагиларда қон тана вазнининг 7% ини ташкил қилса, кичик ёшдаги болаларда бу кўрсаткич 2—3 марта ортқ.

Қон центрифугаланганда унинг таначалари (эритроцитлар, лейкоцитлар, тромбоцитлар) чўкмага тушади. Чўкма юқорисида оч-сарғиш тиник суюқлик — қон плазмаси қолади. Плазма таркибида 7% га яқин оқсил ҳамда турли молекулали моддалар бўлади. Плазма бир неча дақиқа ичида ивийди, яъни қуйқа ҳосил бўлади. Шу ивик қисқариши натижасида қон зардоби ажралади. Қон зардоби таркибида фибриноген оқсили бўлмаслиги билан плазмадан фарқланади. Плазма ивиганда фибриноген эримайдиган фибринга айланади. Ивикни айнан фибрин ҳосил қилади. Қон моддалар алмашинуви жараёни билан ҳамбарчас боғлиқ ҳолда муҳим вазифаларни бажаради.

1. Қон ўпкадаги кислородни тўқималарга ва аксинча тўқималарда ҳосил бўлган углерод (IV) оксид (CO_2) ни ўпкага ташиш билан нафас олиш ва нафас чиқариш вазифаларини бажаради. Шу вазифаси билан қон тўқималарда оксидланиш-қайтарилиш жараёнларини ва энергия алмашинувини бошқаради.

2. Меъда-ичак системасида овқат ҳазм бўлиши натижасида ҳосил бўлган маҳсулотларни турли аъзоларга етказиб бериши, глюкоза, кетон таначаларининг жигардан

мускулларга, ёғларни жигардан ёғ тўқималарига, сут кислотани мускуллардан жигарга, ёғ кислотани ёғ тўқималаридан турли аъзоларга ўтказиб бериш билан озиклантириш вазифасини бажаради.

3. Тўқималарда ҳосил бўлган заҳарли моддалар (аммиак, билирубин ва ҳоказо), қон орқали жигарга келтирилган ва у ерда заҳарсизлантирилган бирикмалар буйрак орқали ташқарига чиқарилади. Шу билан қон ажратиш вазифасини бажаради.

4. Қон орқали кимёвий сигналлар — гормонлар ва бошқа организм учун зарур бирикмалар тўқима хужайраларига етказилиб моддалар алмашинуви жараёнини бажаришда қатнашади.

5. Қон лейкоцитлар ва антителалар ёрдамида ҳимоя вазифасини бажаради. Сув-туз, кислота-ишқор мувозанатларини бир меъёردа сақлайди, тана ҳарорати сақланиши каби қатор муҳим вазифаларни бажаради.

Қон таркибига қон хужайралари — эритроцитлар, лейкоцитлар, тромбоцитлардан ташқари, органик ва аорганик бирикмалар ҳам киради. Органик бирикмалардан энг муҳими оксиллар, ёғлар, карбонсувлар, гормонлар, ферментлар, витаминлардир. Қон таркибида шунингдек моддалар алмашинуви жараёнларининг оралик ва охирги маҳсулотлари ҳамда минерал тузлар учрайди.

Турли моддаларнинг тинимсиз қонга тушиб туриши ва ундан чиқиб кетишига қарамай қоннинг меъёрдаги морфологик ва кимёвий таркибининг доимийлиги нисбатан ўзгармайди. Соғлом одам қонидаги вақтинчалик ўзгаришлар тезда тўғриланади. Аммо кўпчилик касалликларда, айниқса жигар, юрак, буйрак, меъда ости бези, ўпка касалликларида функционал ҳолатнинг бузилиши натижасида қоннинг кимёвий таркиби ўзгарганлигини кузатиш мумкин.

Қон одам организми ҳолати ўзгарганлигининг асосий кўрсаткичидир. Қоннинг биокимёвий кўрсаткичларини ўрганиш, одам организмнинг моддалар алмашинуви даражасини билиш касалликни аниқлашда ва уни даволашда муҳим аҳамиятга эга.

Бўлимнинг мақсади

1. Қоннинг кислород ташиши бузилиши билан боғлиқ бўлган касалликлар сабабини тушуниш мақсадида қон таркибидаги гемоглобин унумларини топиш усуллари билан таништириш.

2. Келажақда касалликларни аниқлаш мақсадида қонни биокимёвий анализ қила олиш учун қон таркибидаги маҳсулотларнинг миқдорини ўлчаш усуллари билан таништириш.

3. Қон таркибидаги айрим ферментлар фаоллигини ўлчаш усуллари- ни ўрганиш ва ундан келажакда касалликларни аниқлаш ва уни даволашда фойдалана олиш.

4. Айрим касалликларнинг келиб чиқиш сабабларини тушуниш мақсадида қоннинг минерал таркибини ўрганиш усуллари билан таништириш.

1. ҚОННИНГ ОҚСИЛЛИ ВА ОҚСИЛСИЗ ҚИСМЛАРИ ТАРҚИБИНИ АНИҚЛАШ

Қоннинг оксигени бўлмаган қисми азот тутувчи ва азотсиз моддаларга бўлинади.

Азотсиз моддаларга глюкоза, ёғлар, ёғ кислоталари- нинг алмашинув маҳсулотлари, пирозум ва сут кислота- лари киради.

Азот тутувчи моддаларга эса азот қолдиқларининг фракциялари (оддий ва мураккаб оксиллар алмашинуви- нинг ораллиқ ва охириги маҳсулотлари, сийдикчил, сийдик кислота, креатин, креатинин, аммиак, индикан, билирубин, полипептидлар, аминокислоталар ва ҳоказо киради. Ушбу моддаларнинг азоти азот қолдиқлари дейилади, чунки улар оксил чўқтирилгач филтратда қолади. Шунингдек, қон таркибида макро- ва микроэлементлар ҳам бўлади.

109- и ш. ҚОН ГЕМОГЛОБИНИНИ АНИҚЛАШ

Қонга ранг берувчи танача — эритроцитларнинг окси- ли гемоглобиндир. Гемоглобин мураккаб оксиллар — хромопротеидлар вакили ҳисобланади. У глобин оксигени ва оксил бўлмаган қисм — гемдан иборат.

Янги туғилган болалар қонидаги гемоглобин миқдори катталарникига нисбатан бирмунча юқорирак (170— 180 г/л) бўлади. Яшаш даврининг биринчи соатларида бу кўрсаткич 200—250 г/л гача ортади. Ҳаётининг 2—3-кунидан бошлаб эса гемоглобиннинг миқдори секин пасая боради ва биринчи ойнинг охирига келиб катталар қонининг гемоглобини билан тенглашади (160 г/л). Гемог- лобин миқдорининг пасайиши гўдак бир ёшга етгунча давом этади ва бу кўрсаткич 105—110 г/л га етади. Икки ёшдан бошлаб бу кўрсаткич янада орта боради ва вояга етиш даврида катталар гемоглобинига ўхшаш бўлади.

Одамнинг гемоглобини фақат миқдор ўзгариши билан фарқланиб қолмай, балки сифати билан ҳам фарқланади. Ҳомила ривожланишининг 7 ва 14- хафталаарида эмбрион қонида жуда оддий — примитив гемоглобин топилади, у 2 та фракциядан тузилган бўлиб, тезда ҳомила гемоглобини (фетал гемоглобин) билан алмашинади. Бу

гемоглобин одатда туғилиш даврига келиб йўқолади. Фетал Нб ҳомиланинг 3- ойида ривожланади ва туғилиш даврига келиб унинг миқдори барча гемоглобиннинг 80—90% ини ташкил қилади.

Бола ривожланишининг биринчи йилида фетал Нб кескин камаяди ва у бир ёшга етганда 1—4% ни ташкил қилади. Катталар гемоглобини эса ҳомиланинг дастлабки тараққиёти даврида пайдо бўлади ва кейинчалик асосий гемоглобин бўлиб қолади.

Катталар ва ҳомила гемоглобини миқдорининг турли даврлардаги ўзгариши қуйидаги жадвалда берилган.

68- жадвал

Катталар ва ҳомила гемоглобини миқдорининг турли ёшдаги ўзгариши

Боланинг ёши	ҳомила Нб	катталар Еб	A ₂ гемоглобин
Янги туғилган болада	75,0	25,0	0,00
1—7 кунлик	71,0	29,0	0,00
8—21 кунлик	65,0	34,6	0,00
22—30 кунлик	60,0	40,0	0,00
1—2 ойлик	56,1	43,4	0,50
2—3 ойлик	38,3	60,9	0,80
3—5 ойлик	22,5	75,3	2,20
6—9 ойлик	9,1	88,2	2,7
9—12 ойлик	4,3	92,8	2,9
1—3 ёшда	1,6	94,9	3,5
3—7 ёшда	0,8	94,9	4,3
7—14 ёшда	0,7	94,9	4,4

Катталар ва ҳомила гемоглобини тузилиши билан биридан фарқланади. Катталар гемоглобини 2 альфа, 2 бетта полипептид занжирдан иборат, ҳомила гемоглобини эса 2 альфа, 2 гамма занжирдан ташкил топган. Ушбу гемоглобинлар эрувчанлиги билан фарқланади. Бу уларнинг фаолиятида ахамиятга эга. Кўпинча болалар касаллигида гемоглобин биосинтези бузилиши кузатилади. Бундай ўзгариш, гемоглобин компонентлари мувозанатининг ўзгариши кўпинча ҳомила гемоглобинининг ортиши (ёки эмбрионал гемоглобин синтези томонга сўрилиши) га олиб келади. Бутунлай ўзгарган аномаль — гомотетрамер гемоглобин (бета) ва Барта гемоглобини (гамма₄) бўлиши мумкин.

**Карбоксигемоглобин ва метгемоглобин миқдорининг ёшига қараб
ўзгариши (умумий гемоглобинга нисбатан процент ҳисобида)**

Боланинг ёши	Карбоксигемоглобин	Метгемоглобин
Янги туғилган болаларда	1,50	6,22
1—7 кунлик	1,65	2,93
8—21 кунлик	1,60	2,86
1—3 ойлик	1,50	2,21
3—6 ойлик	1,38	1,47
1—3 ёшда	1,27	1,13
3—7 ёшда	1,21	1,10
7—14 ёшда	1,17	1,08

Гемоглобин унумлари (мет Нb, Нb — CO₂) боланинг ёшига қараб турлича бўлиши мумкин.

110-и ш. БЕНЗИДИН РЕАКЦИЯСИ

Реакциянинг асосланиши. Қон гемоглобини водород пероксидни сув ва атомар кислородга парчалаш хоссасига эга. Атомар кислород эса оксидловчидир. Шу кислород таъсирида бензидин оксидланади ва кўкимтир-яшил тусга киради.

Ушбу реакциянинг кимёвий тенгламаси ... бетда келтирилган.

Текширилувчи материал: фибридан тозаланган ва сувда суюлтирилган қон.

Реактивлар: концентрланган сирка кислотада янги тайёрланган бензидиннинг 5% ли эритмаси, водород пероксиднинг 3% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби: пробиркага фибридан тозаланган ва суюлтирилган қон, бензидин эритмаси ва H₂O₂ дан 5 томчи солинади. Суюқликнинг кўкимтир-яшил тусга кириши кузатилади.

111-и ш. ГВОЯК РЕАКЦИЯСИ.

Реакциянинг асосланиши. Водород пероксид қон гемоглобини (каталазаси) таъсирида сув ва атомар кислородгача парчаланнади. Кислород эса Гвояк мумини озонидгача оксидлайди. Натижада кўкимтир ранг ҳосил бўлади. Ушбу усул қон 1:10000 суюлтирилганда ҳам жуда сезгир. Шифохоналарда, адлия табиётида шу усулдан фойдаланиш жуда қулайлик туғдиради.

Текширилувчи материал: фибридан тозаланган ва суюлтирилган қон.

Реактивлар. Гвояк мум кислотасининг спиртли эритмаси (1—2 гвояк муми 100 мл 95% ли этил спиртда суюлтирилади), H_2O_2 нинг 3% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: Пробиркалар, штативлар ва томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби: Пробиркадаги фибридан тозаланган ва суюлтирилган бир томчи қонга 5 мл сув солиб аралаштирилади. Унинг устига бир мл гвояк мумининг спиртдаги эритмаси ва бир томчи водород пероксиднинг 3% ли эритмасидан солинади. Пайдо бўлган кўкимтир ранг Гвояк муми озониди ҳосил бўлганини кўрсатади.

112-иш. ҚОН ГЕМОГЛОБИНИНИНГ СПЕКТРАЛ АНАЛИЗИ

Гемоглобин ҳаво кислороди билан осон бирикиб оксигемоглобинга айланади. Қон таркибидаги гемоглобиннинг асосий қисми шундай бириккан ҳолда учрайди. Исгази (СО) билан нафас олганда қонда оксигемоглобиндан ҳам мустаҳкамроқ боғланган заҳарли карбоксигемоглобин ($Hb-CO$) ҳосил бўлади. Қонга турли оксидловчилар таъсир этганда гемоглобин гемининг икки валентли темири уч валентликкача оксидланади ва гемоглобин карбоксигемоглобинга ўхшаш кислородни бириктира олмайдиган метгемоглобинга (мет— Hb) айланади. Гемоглобин ва унинг ҳосилалари турли тўлқин узунликдаги нурларни ютиш қобилиятига эга ва ўзига хос ютиш спектрларини ҳосил қилади. Гемоглобин ҳосилаларининг ютиш спектрларини аниқлаш турли касалликларда, организм заҳарланганда, корхонанинг зарарли даражасини белгилашда, адлия тиббиётида катта аҳамиятга эга.

Текширилувчи материал: қон.

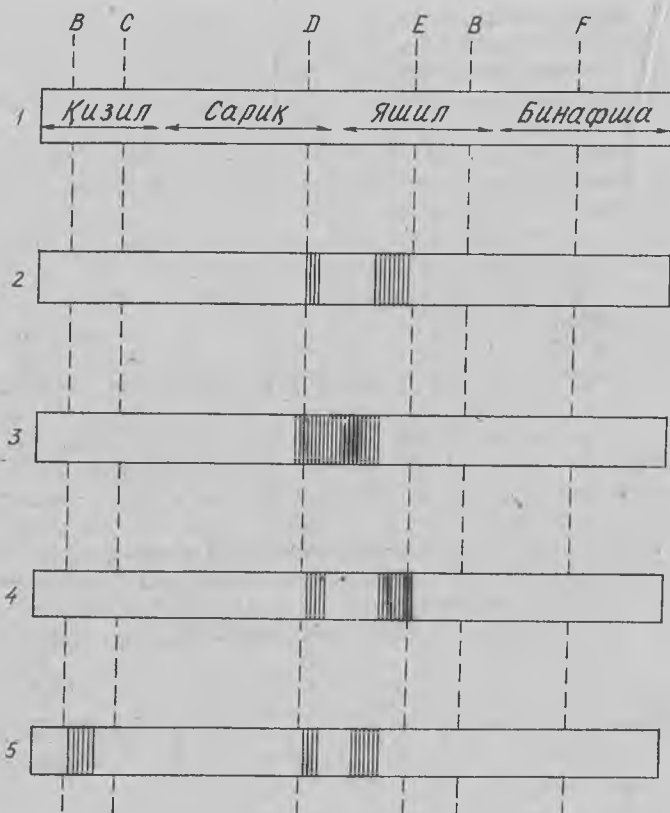
Реактивлар: Стокс реактиви: кизил қон тузининг янги тайёрланган эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, томизгичлар, спектроскоп.

Усулнинг асосланиши. Нур манбаи билан спектроскоп орасига гемоглобин ёки унинг ҳосилаларининг сувли эритмалари жойлаштирилса ушбу эритмалар муайян узунликдаги нурларнинг бир қисмини ютиши натижасида шу жойда қора доғлар ҳосил бўлади (18-расм).

Қон пигментларининг спектрал анализи чўнтак спектроскопи ёрдамида ўлчанади.

1. **$Hb-O_2$ нинг спектрал анализи:** пробиркадаги бир томчи қонга 2 мл дистилланган сув қуйилади ва олинган



18-расм. Нур ютиш спектрлари:

1-Куёш спектри; 2-оксигемоглобин; 3-гемоглобин; 4-карбоксихемоглобин; 5-метгемоглобин.

сарғиш-пушти тусли эритма нур манбаи ва спектроскоп орасига жойлаштирилади. Оксигемоглобин эритмаси сарғиш-яшил спектр Д ва Е фраунгофер, яъни 578,1 ва 541,7 нм тўлқин узунликдаги қисмида иккита ингичка қора доғларни ҳосил қилади.

2. Гемоглобиннинг спектр ютиши: оксигемоглобин эритмасига 5—8 томчи янги тайёрланган Стокс эритмаси (вино кислотанинг темирли тузининг аммиакда тайёрланган эритмаси) томизилади. Стокс реактиви таркибидagi икки валентли темир бу шароитда оксидланади, яъни уч валентли темирга айланади ва оксигемоглобиндан гемоглобин ҳосил бўлишига имкон яратади. Оч пушти рангли эритма қорайиб тўқ бинафша тусга киради. Д ва

Е чизиклар орасида кенг йўлли доғ пайдо бўлади. Унинг тўқроқ қисми 555—558 нм га тўғри келади.

3. **Мет — НЬ** нинг спектр ютиши. Оксигемоглобин эритмасига 5—7 томчи янги тайёрланган қизил қон тузининг 5% ли эритмасидан солиб чайқатилади. Эритма кўнғир рангга киради. Спектрда учта ютиш йўли кўринади: иккитаси Д ва Е чизикларнинг сарғиш-яшил қисми орасидаги ингичка йўл, учинчиси эса С ва Д чизиклар орасидаги спектрнинг қизил қисмида, яъни 630 нм тўлқин узунлигида кўринади.

4. **НЬ — СО** нинг спектр ютиши. Суюлтирилган қон солинган пробиркага газ горелкасига уланган резина най билан бириктирилган пипетка туширилади ва ҳаво тортувчи шкафта (ишлаб турган ҳолатида) 5—10 дақиқа газ юборилади. Газ таркибидаги ис гази таъсирида эритмада карбоксигемоглобин (HbCO) ҳосил бўлади. Унинг спектри икки йўлдан иборат бўлиб, улар Д ва Е (572, 537 нм тўлқин узунлигида) чизикларнинг бинафша қисмида кўринади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: олинган натижаларни куйидаги жадвалга мувофиқ расмийлаштиринг ва тегишли хулоса чиқаринг. НЬ га ўтказилган сифат реакцияларнинг асосини ҳам дафтарга ёзинг.

70- ж а д в а л

Текширилган бирикмалар	Спектр ҳосил қилиш йўллари	Спектрдаги ютиш йўллари

113- и ш. ҚОН ЗАРДОБИ БИЛИРУБИНИНИ ЙЕНДРАШЕК ВА КЛЕГГОРН УСУЛИ БЎЙИЧА АНИҚЛАШ

Эритроцит гемоглобинининг яшаш даври 110—130 кунни ташкил қилади. Вақт ўтгач суяк илиги, жигар, қора талокнинг ретикулоэндотелиал системасида гемоглобин парчаланади. Унинг парчаланиш жараёнида ундан темир ва глобин оксиди ажралади ва яшил рангли ўт пигменти (биливердин) ҳосил бўлади. Биливердин қайтарилиб сариқ-қизғиш рангли билирубинга айланади. Билирубин гемнинг парчаланиш маҳсулотидир. Билирубин қонга куйилади ва қон альбуминлари билан боғланиб жигарга етказилади. Қон зардоби таркибида икки хил билирубин мавжуд:

1. Эркин билирубин. Сувда эримади, захарли, буйрак

фильтридан ўта олмайди, ўт ва сийдик орқали чиқа олмайди. Эркин билирубин хлороформ ва бошқа органик эритмаларда эритилгандан кейин diaзореактив билан ўзаро таъсирлашади (тўғри бўлмаган diaзореакция). Шунинг учун бундай билирубин тўғри бўлмаган билирубин деб номланади.

Захарли, эркин, тўғри бўлмаган билирубин жигарда глюкурон кислота билан боғланиб захарсизлантирилади. Глюкурон кислота фаол УДФ глюкурон кислота ҳолида учрайди. Глюкурон кислота билирубинга глюкурон трансфераза ферменти орқали ўтказилади. Бундай боғланган билирубин диглюкуронид анча захарсиз, сувда яхши эрийди. У буйрак фильтридан, хужайра мембранасидан ўт капиллярларига, ундан ингичка ичакка ўта олади. Ичакдаги қайтарилиш жараёни натижасида боғланган билирубин мезобилирубин, уробилиноген, стеркобилиногенларга айланади. Стеркобилиногеннинг оксидланишидан стеркобилин ҳосил бўлади. Одам ахлати билан бир суткада 300 мг стеркобилин ажратади. Стеркобилиногеннинг бир қисми гемороидал веналар орқали умумий қон оқимиغا тушиб, сийдик орқали ажралади. Уробилиноген ингичка ичакдан дарвоза веналар орқали жигарга ўтади. У ерда уробилиноген циррол бирикмаларгача парчаланаяди ва қисман ўт таркибига киради. Жигар фаолиятининг бузилиши натижасида уробилиноген умумий қон оқимиغا тушади ва сийдик билан унинг патологик элементи сифатида чиқарилади.

Янги туғилган, айниқса чала туғилган болалар қонда билирубин миқдори юқори бўлиши кузатилади. Физиологик сариқ касаллигида билирубин миқдори эркин билирубин ҳисобига бир неча марта ортганлиги кузатилади (71-жадвал).

71- жадвал

Қон билирубинининг ёшга қараб ўзгариши

Ёши	Умумий билирубин, мг %	Боғланган билирубин (глюкуронид), мг %	Эркин билирубин, мг %
Янги туғилган болаларда	1,35	0,51	0,84
иккинчи кун	3,17	0,51	2,66
тўртинчи кун	5,27	0,46	4,81
олтинчи кун	4,21	0,51	3,70
тўққизинчи кун	3,1	0,51	2,59
Биринчи ойда	0,65	0,15	0,50
Катталарда	0,65	0,15	0,50

Бу жигар УДФ-глюкуронилтрансфераза ферментининг етарли эмаслигидан, билирубин боғланган диглюкуро-нидга айлана олмаслигидан дарак беради.

Соғлом одамлар сийдигида билирубин бўлмайди. Билирубин алмашинувининг бузилиши кўпинча сарик касаллигининг ривожланиши билан боғлиқ. Шу жиҳатдан кон зардоби билирубиннинг тури ва миқдори аниқлаш сарик касаллигини фарқлашда муҳим аҳамиятга эга.

Соғлом одамлар кон зардобидаги умумий билирубин миқдори 1,7—20,5 мк моль/л (0,1—1,2 мг 100 мл), эркин билирубин 1,7—17,1 мк моль/л (0,1—1,0 мг 100 мл), боғланган билирубин 0,86—4,3 мк моль/л (0,05—0,25 мг 100 мл). Еш болалардаги билирубин миқдори жадвалда келтирилган.

Усул: билирубиннинг diaзореактив билан ҳосил қилган рангли маҳсулотини колориметрлашга асосланган. Бу маҳсулот тўқ қизил рангга бўялган. Диглюкуронидбилирубин diaзореактив билан тўғридан-тўғри таъсирланади. Эркин оксиллар билан боғланган билирубин эса оксили диссоцилангандан сўнггина diaзоаралашма билан реакцияга киришади. Оксилни диссоцилаш кон зардобига кофеин реактиви қўшиш билан амалга оширилади.

Текширилувчи материал: кон зардоби.

Реактивлар: Сульфанил кислотанинг 0,5% ли эритмаси, натрий нитратнинг 0,5% ли эритмаси, кофеин реактиви, натрий гидроксиднинг 30% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пилеткалар, бюреткалар, ФЭК, 1 см қалинликдаги кюветалар.

Баजारиладиган иш тартиби: Битта текширув, битта назорат пробиркалари тайёрланади. Жадвалга биноан реакция аралашмаси тайёрланади.

72- жадвал

Боланинг ёши	Карбоксигемоглобин	Метгемоглобин
Янги туғилган болаларда	1,50	6,22
1—7 кунлик	1,65	2,93
8—21 кунлик	1,60	2,86
1—3 ойлик	1,50	2,21
3—6 ойлик	1,38	1,47
1—3 ёшда	1,27	1,13
3—7 ёшда	1,21	1,10
7—14 ёшда	1,17	1,08

Diaзоаралашма (гуруҳдаги талабаларга етарли миқдорда тайёрланади) сульфанил кислотанинг 5% ли эритмасидан 10 мл олиб 0,3 мл 0,5% ли натрий нитрат эритмаси билан аралаштирилади.

Текширув ва назорат эритмалари яхшилаб аралаштириладида 20 дақиқа коронғи жойга қўйилади. Сўнг яшил нур фильтри (500—560 нм тўлқин узунлигидаги) қаршисида колориметрланади. Агар ҳосил бўлган ранг оч бўлса, колориметрлашдан олдин иккала пробиркага 3 томчи 30% ли натрий гидроксид эритмаси солинади. Бу ҳолда ранг яшил тусга, билирубин микдори жуда кўп бўлса кўк тусга киради, кўпинча эритма тиниклашади. Бу вақтда эритма ФЭК нинг кизил нур фильтрида колориметрланади. Унинг микдори ўлчов эгри чизиғи бўйича ҳисобланади.

Натижаларни расмийлаштириш: Дафтарингизга усулнинг асосланишини, колориметр кўрсаткичи ва ҳисоб натижаларини ёзинг. Билирубиннинг ўртача кўрсаткичини кўрсатинг ва тегишли хулоса чиқаринг.

Ўлчов эгри чизиғини тайёрлаш. Билирубиннинг 8 марта суюлтирилган доимий (80 мг 100 мл) эритмасидан 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мл дан қилиб катор пробиркаларга солинади ва натрий хлориднинг изотоник эритмаси билан пробиркалардаги эритмаларнинг ҳажми 0,5 мл га етказилади. Ушбу пробиркалардаги билирубиннинг микдори (мг) 0,5 мл дан 0,005; 0,01; 0,015; 0,020 ва 0,025 ни ташкил қилади. Унинг концентрацияси эса (100 мг/мл) 1, 2, 3, 4, 5 га тенг. Иш тартиби тажрибага ўхшаш.

2. ҚОН ПЛАЗМАСИ ОКСИЛЛАРИ

9—10% қондаги қуруқ плазманинг 6,5—8,5% и оксилларга тўғри келади. Қон плазмаси оксилларини 3 гуруҳга бўлиш мумкин: альбуминлар, глобулинлар, фибриноген. Қон плазмасида альбуминлар ўртача 40—50 г/л, глобулинлар 20—30 г/л, фибриноген 2—4 г/л ни ташкил қилади. Янги туғилганларда бу кўрсаткич катталарниқидан пастрок. Бола ҳаётининг биринчи ойида оксил микдори янада камаяди (45—55 г/л гача) кейинчалик эса секин-аста кўтарила бошлайди ва 7 ёшдан ўтганда катталар оксили билан тенглашади.

Қон плазмасининг оксиллари кўпроқ жигарда ва ретикулоэндотелиал системада синтезланади. Қон плазмаси оксилларининг физиологик аҳамияти жуда катта.

1. Оксиллар қон ёпишқоқлигини таъминлайди, қоннинг ёпишқоқлиги эритроцитларни бир меъёрда тақсимланиши, лейкоцитларнинг ҳаракатланиши, қоннинг қон томирлари бўйлаб оқишини ва капилляр деворларидан ўтишини бир меъёрга солиб туради.

2. Оксиллар, гидрофил, коллоид бўлганлиги учун маълум микдордаги сувни боғлаб, қон оқимида уларни саклаб туради. Шу хоссасига кўра оксил коллоид-осмотик

(онкотик) босимни созлаб туради ва қон ҳажмини ўзгартирмайди. Бу жиҳатдан айниқса альбуминларнинг аҳамияти катта.

3. Оксиллар турли моддаларни (ионлар, ёғлар, пигментлар, витаминлар, гормонлар, дорилар ва ҳоказо) ташишда иштирок этади. Улар шу моддалар билан қайтар комплекс ҳосил қилиб, уларни тўқималарга етказади. Бу жараёни бошқаришда альбуминларнинг аҳамияти катта. Аммо плазмада шундай оксиллар борки, улар фақат танланган бирикмаларни таший олади.

Масалан, трансферин — темир ташувчи, церулоплазмин — мис ташувчи, гаптоглобулинлар фақат гемоглобинлар билан бирикади.

4. Плазма оксиллари оксил буфер системаларини ҳосил қилиб, қоннинг доимий муҳитини сақлашда иштирок этади.

5. Ионлар билан нисбий боғланиб, қондаги катионлар доимийлигини ушлайди. Темир, мис, магнийнинг кўп қисми ва 40—50% кальций қон плазмаси оксиллари билан боғланган.

6. Плазманинг айрим оксиллари — (фибриноген, протромбин ва бошқалар) қон ивишида қатнашади ва иммун таначалар (иммуноглобулинлар) ни ташийди. Шу билан у ҳимоя вазифасини бажаради.

7. Оксиллар аминокислота резервлари бўлиб ҳисобланади.

73-жадвал

Турли ёшдаги болаларнинг қон плазма оксиллари

Ёш	Оқсил миқдори	
	г %	г/л
Янги туғилганларда	5,6 (4,7—6,5)	56,0
Чала туғилганларда	5,1 (4,4—5,8)	51,0
1 ойлик	4,8 (4,1—5,5)	48,0
2 ойлик	5,3 (4,7—5,9)	53,0
6 ойлик	6,1 (6,4—6,8)	61,0
1 ёшда	6,5 (5,7—7,3)	65,0
3—4 ёшда	6,9 (5,9—7,9)	69,0
7 ёшда	7,0 (6,2—7,8)	70,0
12 ёшда	7,4 (6,8—8,0)	74,0

Оксиллар ишқорий муҳитда ўтказилган қоғоз электрофорезда беш фракцияга бўлинади: альбуминлар, α , α_2 , β ва γ -глобулинлар. Бу фракцияларнинг нисбати ривожланиш жараёнида ўзгаради.

Янги туғилган болалар қон плазмаси γ -глобулинларнинг юқори миқдори билан ифодаланади. Кейинчалик бу миқдор пасая боради ва бола уч ёшга етганда катталар γ -глобулини билан тенглашади. α ва β -глобулинлар миқдори эса бирмунча паст бўлиб, бола ёшига етганда катталар кўрсаткичига тенглашади. Шунингдек, янги туғилган болаларда фибриноген оксиди катталарникига нисбатан бирмунча паст бўлиб, бола бир ойлик бўлганда у меъёрига 2,0—4,0 г/л га етади.

Айрим оксиллар — гаптоглобулинлар янги туғилган болалар қонида одатда учрамайди. У бола бир ойликка етганда пайдо бўлади ва 6 ойга етганда катталарникига ўхшаш бўлади, 6 ойдан ошганда 100—120 мг % га етади.

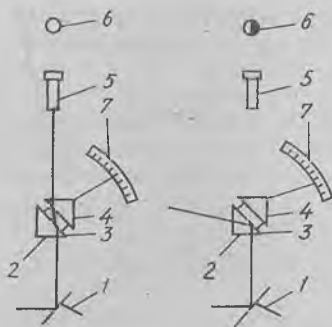
74-жадвал

Ёш	Альбумин	Глобулинлар			
		α_1	α_2	β	γ
Янги туғилганларда	65,6	5,2	7,1	7,5	14,6
3 ойгача	61,5	6,1	11,5	10,3	10,6
6 ойгача	62,7	5,5	11,9	9,8	10,2
9 ойгача	60,7	5,7	11,9	10,9	10,8
1 ёшгача	62,1	5,3	11,5	10,2	10,9
1,5 ёшгача	62,4	5,2	11,8	10,1	10,7
3 ёшгача	62,4	5,2	10,8	9,5	12,3
6 ёшгача	61,9	5,0	8,9	9,9	14,3
7 ёшдан 14 ёшгача	63,3	5,6	6,7	9,4	15,1

Болаларнинг айрим касалликларида оксилнинг кўпайиши (гиперпротеинемия) ёки камайиши (гипопротеинемия) кузатилади. Гиперпротеинемия кўпинча болаларни нотўғри овқатлантирганда, суюқликни кам ичганда, ич кетганда ва бошқалар натижасида юзага келади.

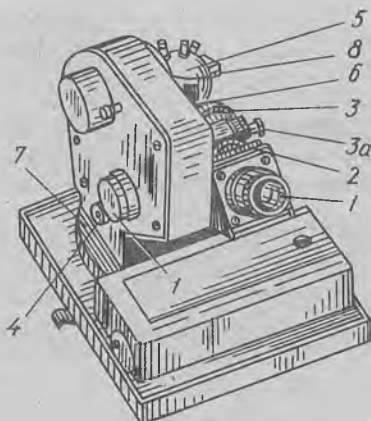
Қон плазмаси фракцияларининг бирмунча ўзгариши, аномаль оксилларнинг пайдо бўлиши парапротеинемия дейилади. Парапротеинемия миелома касаллигида кузатилиб, бунда битта ёки бир нечта глобулин фракциялари кескин ошади.

Умумий оксил миқдори 100—160 г/л га етади. Патологик макроглобулинлар Вальденштрем касаллигида учрайди. Айрим ҳолатларда ёш болалар плазмасида оксилларнинг камайиши ёки бутунлай бўлмаслиги кузатилади. Оксил фракцияларидан бирининг жуда камайиши дефектопротеинемия деб аталади. Буларга анальбунемия, афибриногенемия, агамма-ва гипогаммаглобулинемия киради.



19-расм. Рефрактометр схемаси.

1-ойна; 2—4 призмалар; 3-қои зардоб; 5-қузғу; 6-қузғудаги оқ ва қора майдон; 7-ҳисоблаш шкаласи.



20-расм. ИРФ-22 маркали рефрактометрнинг умумий кўриниши.

1-кўриш найи қузғуси; 2-қуриш найи; 3-дисперс лимб; 3 а-дисперс лимб винти; 4-қрималера; 5-пиша призмали камера; 6-қузғу; 7-стойка; 8-бурама ҳарорат ўлчагич.

Гипопротеинемия — оксил микдорининг камайиши буйрак касаллиги — нефрит, хавфли ўсмалар, алиментар дистрофияларда кузатилади.

Ревматизмнинг сурункали босқичида альфа, бета-глобулинлар микдори ортади. Юқумли касалликларда гаммаглобулинларнинг ортанлиги, жигар циррозида альбуминлар микдорининг кескин пасайиши ва гаммаглобулинлар ортанлиги, буйрак касалликларида (нефрит, ёғли нефронларда, ҳомиладорлик токсикози ва бошқаларда) альбумин фракцияларининг камайиши, альфа₂ беттаглобулинларнинг кўпайиши кузатилади. Юқоридаги турли патологик ҳолатларда қон плазмаси оксил фракцияларининг ўзгариш даражаси ва хусусиятини ўрганиш касалликларни аниқлашда катта аҳамиятга эга.

114- и ш. УМУМИЙ ОҚСИЛ МИҚДОРИНИ РЕФРОМЕТРИК УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: рефрактометрик усулнинг асосини моддаларнинг нур ўтказиш ва синдириш хусусияти ташкил қилади.

Нур синдириш кўрсаткичи (коэффициенти) бурчак тушиш синусининг синдириш бурчаги синусига бўлган нисбати ҳисобланади. Нур синдириш коэффициентини

аниклаш учун махсус асбоб — рефрактометрдан фойдаланилади. Рефрактометрнинг тузилиш схемаси ва кўриниши 19, 20- расмларда кўрсатилган.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактив: сув.

Керакли анжомлар: ИРФ — 22 рефрактометри, филтър қоғози.

Ҳисоблаш. Нур синдириш кўрсаткичи аниқлангач жадвалдан аниқланувчи оқсилнинг % миқдори топилади.

Изоҳ. 1. Асбобнинг сезгирлиги унча юқори эмас (0,5—1%)

2. Усулнинг хатоси 10% атрофида.

75- ж а д в а л

Оқсилнинг % миқдорини нур синдириш кўрсаткичига биноан ҳисоблаш

Нур синдириш кўрсаткичи (рефракция)	Қон зардоби оқсили, %	Нур синдириш кўрсаткичи (рефракция)	Қон зардоби оқсили, %
1,33705	0,63	1,34575	3,68
1,33743	0,86	1,34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33853	1,52	1,34724	6,55
1,33896	1,74	1,34761	6,77
1,33934	1,96	1,34798	6,98
1,33972	2,18	1,34876	7,20
1,34000	2,40	1,34870	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34162	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34350	4,38	1,35205	9,35
1,34388	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

115-иш. ҚОН ЗАРДОБИ ОҚСИЛЛАРИНИ ҚОҒОЗДА
ЎТКАЗИЛАДИГАН ЭЛЕКТРОФОРЕЗ УСУЛИ БИЛАН
ФРАКЦИЯЛАРГА АЖРАТИШ

Усулнинг асоси: оксилларнинг электр майдонида ҳаракатланиши рН муҳитга боғлиқ. Оксиллар амфотер электролитлар бўлиб, кислотали муҳитда мусбат зарядланиб катод томон ҳаракатланади, ишқорий муҳитда эса манфий зарядланиб анод томон ҳаракатланади. Қон зардоби оксиллари рН и 8,6—8,9 бўлган буфер эритмада ажратилади. Электр зарядига эга бўлган оксиллар доимий электр майдони таъсирида буфер эритма билан намланган хроматографик қоғозда анод томон ҳаракатланади.

Ҳаракатланиш тезлиги оксил зарядининг катталиги ва заррачаларнинг нисбий молекуляр массасига боғлиқ бўлади. Бунда кўпроқ тезлик билан альбуминлар, альфа₁, альфа₂, бетта ва ниҳоят гамма-глобулинлар ҳаракатланади.

Ушбу қоғоз электрофорез ёрдамида қон зардоби оксилларини 5—9 фракцияга (айрим оксилларга) ажратиш, уларнинг ҳар қайсиси нисбий миқдорини ўлчаш мумкин.

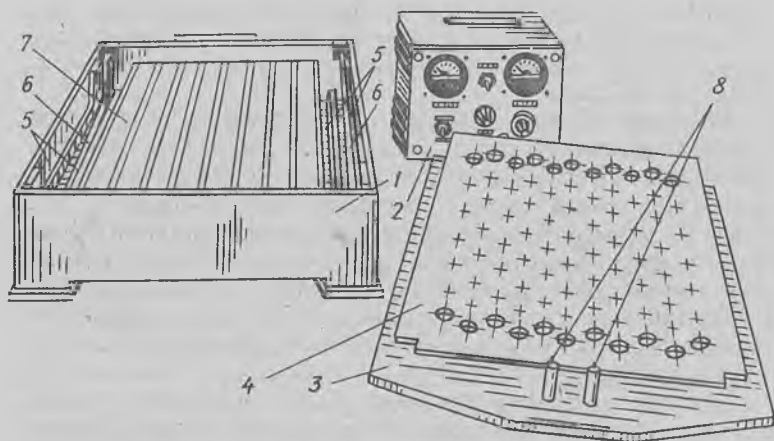
Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: рН и 8,6, барбитал буфер эритмаси, рН и 8,9 трис буфер (60,5 г трис, 6 г этилендиамин тетрасирка ва 4,6 г борат кислота 1 л дистилланган сувда эритилади), электрофореграммаларни бўяш учун бўёқ (бромфенол кўк ва қора амид бўёқлар), сирка кислотанинг 2% ли эритмаси, натрий ацетатнинг 10% ли сирка кислотада тайёрланган 2% ли эритмаси, натрий ишқорининг 0,01 м эритмаси (1 л эритмада янги тайёрланган).

Керакли анжомлар: 40×3,5 см ли хроматография қоғози сусти ҳаракатланувчи Ленинград тури одатдаги фильтр қоғозларининг варақлари, электрофорез асбоби, микропипеткалар, ФЭК ва 5 мл ли кювета, қуритгич шкаф, пипеткалар, томизгичлар, сифон, бўёқ учун идиш (кювета), электрофореграммаларни қуритиш учун ёғоч рамка, қайчилар.

Бажариладиган иш тартиби: Горизонталь электрофорез асбоби, камера ва стабилизатордан (камерага доимий керакли кучланишда) ток бериб турувчи тўғрилагич (21-расм).

1. **Камерани тайёрлаш.** Электрофорез камераси горизонталь ҳолда жойлаштирилади. Камера кюветаларига жойлаштирилган электрод пластинкалари ундан ажратилади ва кювета (рН и 8,6—8,9) буфер эритма билан бир хил ҳажмда тўлдирилади (1 л дан). Эритма кювета девори чегарасидан пастрокда бўлиши керак. Сўнг кюветага электродлар жойлаштирилади. 3,5×40 см ёки 4×45 см ли қоғоз тасманинг катод тарафидан 12 см масофада оддий



21-расм. Горизонтал электрофорез учун мослама.

1-камера; 2-стабилизатор; 3-пластмасса копқок; 4-фильтр қоғоз билан пластинка; 5-түсік билан ажратилган камера; 6-камеранинг ташқи қисмидаги электрод учлари; 7-пластмасса рамка; 8-электродларни ишга туширивчи клемма.

қора қалам билан қон зардоби томизиладиган жой мўлжалланади.

2. **Электрофорез ўтказиш.** Электрофорез учун олинган қоғоз тасма буфер эритма билан ҳўлланади ва қуруқ фильтр қоғозда нам ҳолатгача қуритилади. Сўнг қоғоз тасманинг икки учи электрод солинган қюветаларга тегиб турадиган даражада жойлаштирилади. Уларнинг учи буфер эритмада бўлиши керак. Шундан кейин қалам билан мўлжалланган жойга аста-секин ($0,01—0,015$) $0,005$ мл янги олинган гемолизланмаган қон зардобидан кичик томчилар томизилади. Қон зардоби микропипетка билан қоғоз тасманинг эни бўйлаб чегарадан берирокқа томизилади. Агар бир нечта қоғоз тасма қюветага жойлаштирилган бўлса, улар бир-бирига тегмаслиги керак. Камерага думалок тешикчали пластмасса пластинка жойлаштирилади, унинг устига ванна ҳажмида фильтр қоғози қўйилади. Камера зич беркиладиган копқок билан беркитилади. Электродларнинг клеммалари тўғрилагич билан уланади ва стабилизатор 220 В ли токка уланади. Ҳар бир қоғоз тасманинг 1 см узунлигига ($40—45$ см) $3—8$ В ҳисобида, $200—300$ В кучланишда электрофорез ўтказилади. Қоғоз тасманинг ҳар 1 см сига ток кучи $0,1—0,3$ мА дан ошмаслиги керак (эни 4 см бўлган тасмага $0,4—1,2$ мА тўғри келади).

Электрофорез учун одатда $0,05$ ион кучига эга бўлган

барбитал буфер ишлатилади; агар ион кучи 0,1 га эга бўлган буфер ишлатилса қоғоз тасманинг эни 5 см гача қирқилади ва электрофорез бирмунча кам вақтда (6 соатда) ўтказилади.

180—200 В кучланишда электрофорез 18—20 соат, 320 В да эса 6 соат давом этади. Электрофорез тугатилгач стабилизатор токдан ўчирилади, камера копкиғи олиниб, пинцет ёрдамида электрофореграммалар олинади.

3. Электрофореграммаларни турғунлантириш ва бўяш. Электрофорездан сўнг қоғоз тасманинг учи кесиб ташланади ва уларни горизонтал ҳолатда, бир текисда ёғоч рамкаларга тортилади-да 100—105°C даги қурутгич шкафига 20 дақиқага оксилларнинг турғунлиги ошиши учун қўйилади.

Қурилган электрофореграммалар бўёқ билан тўлдирилган эмалланган кюветаларнинг тубига ёйиқ ҳолда жойлаштирилиб, 30 дақиқа давомида бўялади. Сўнгра бўёқ ишлатиш учун бошқа идишга олинади; электрофореграммалар 3—4 марта 2% ли сирка кислота эритмаси билан 5—10 дақиқа давомида ювилади. Оксилдан ҳоли бўлган қоғоз қисмлари рангсизланади. Электрофореграммаларнинг бўялган маҳсулотларини қоғозга янада ўрнашиши учун 2 дақиқа 2% ли натрий ацетат эритмасига солинади. Шундан сўнг электрофореграммалар ҳаво тортгич остида, қоронғиликда, хона ҳароратида қури-тилади.

4. Айрим оксил фракцияларининг нисбатини аниқлаш. Электрофореграммада ҳосил бўлган 5 та бўялган йўллар алоҳида бўлакларга бўлинади, ҳар қайсиси 3—5 мм ли майда бўлакчаларга қирқилади ва шу онда алоҳида тартибланган пробиркаларга солинади: альбуминлар, альфа₁, альфа₂, бета, гаммаглобулинлар ва назорат пробиркаси қоғоз тасманинг бўялмаган қисми 3—10 мм килиб майдалаб солинади.

Оксиллар билан боғланган бўёқларни ажратиш учун ҳар қайси пробиркага, жумладан назорат пробиркасига 0,01 М натрий гидроксид эритмасидан 3 мл дан, альбуминли пробиркага эса 9 мл дан солинади. Пробиркадаги эритмалар аралаштирилади ва бўёқларни оксиллардан ажратиш учун 30 дақиқа қолдирилади. Ишқор эритмаси ФЭҚ нинг яшил нур фильтри (500—560 нм тўлқин узунлигидаги) да 5 мм ли кюветада назорат учун олинган эритма қаршисида қўрилади. Агар (— 500 нм) 2-нур фильтрли фотоколориметрдан фойдаланилса ҳар қайси оксил фракцияси ва назорат пробиркасининг нур ўтказиш коэффициенти топилади. Жадвалдан Е-оптик

зичлик аниқланади. $E_{\text{тажр}} - E_{\text{текш}} = E$. («Ферментлар»га қаранг).

Ҳисоблаш: Оксил фракцияларининг миқдори абсолют ва нисбий катталикларда ҳисобланади. Бир нисбий миқдорнинг % ини топиш учун альбуминларнинг оптик зичлиги учга кўпайтирилади ва қолган глобулинлар миқдорининг йиғиндиси қўшилади. Барча фракциялар кўрсаткичининг умумий йиғиндиси 100% деб олинади, ҳар қайси фракция учун фоиз миқдори ҳисобланади.

Масалан, агар барча фракциялар учун оптик зичлик йиғиндиси 0,84, альбуминлар учун эса 0,52 бўлса, ушбу фракцияларнинг нисбий миқдори қуйидаги пропорция ёрдамида ҳисобланади:

$$\begin{array}{l} 0,84 \text{ ————— } 100\% \\ 0,52 \text{ ————— } X \quad X=61,9\% \end{array}$$

Қолган оксил фракцияларининг нисбий миқдори шу йўл билан ҳисобланади.

2) қон зардоби оксилнинг умумий миқдори рефрактометрлик ёки биуретик усул билан топилгач, ҳар қайси фракция учун мл/моль/1 л (грамм-процент) ҳисобида аниқланади.

Масалан, қон зардоби таркибида 70 г/л (7,0 г %) оксил бўлса, альбуминнинг миқдори қуйидагича:

$$\begin{array}{l} 7,0 \text{ ————— } 100\% \\ X \text{ ————— } 61,0 \quad X=43,3 \text{ г/л (4,33 г \%)} \end{array}$$

61,9% — текширилатган қон зардоби таркибидаги альбуминнинг нисбий миқдори.

Олинган натижаларни м/моль/л ҳисобига ўтказиш учун грамм-процентни 0,154 ҳисоблаш коэффициентига кўчириш керак;

3) альбуминларнинг ва глобулинларнинг умумий миқдорини билган ҳолда альбумин-глобулин коэффициенти (А/Г) ҳисобланади. Ўртача миқдор А/Г 1,3—2,0 га тенг.

Соғлом одам қон зардобининг қоғоз электрофорез ёрдамида аниқланган оксил фракциялари миқдори қуйидагича:

Альбуминлар — 52,65,0% ёки 3,2—5,6 г/100 мл, 0,49—0,86 ммоль/л альфа₁ глобулинлар — 2,5—5,0% ёки 0,1—0,4 г/100 мл, 1,0—4,0 г/л альфа₂ глобулинлар — 7,1—13,0% ёки 0,4—1,2 г/100 мл, 4,0—12,0 г/л бета-глобулинлар — 8,0—4,0% ёки 0,5—1,1 г/100 мл, 5,0—11,0 г/л гамма-глобулинлар — 12—22,0% ёки 0,5—1,6 г/100 мл, 5,0—16,0 г/л.

22-расм. Қон зардоби оксилларининг денситограммаси.

а-соғлом одам қон зардоби; б-плазмацитома; в-нефроз; г-жигар циррози.

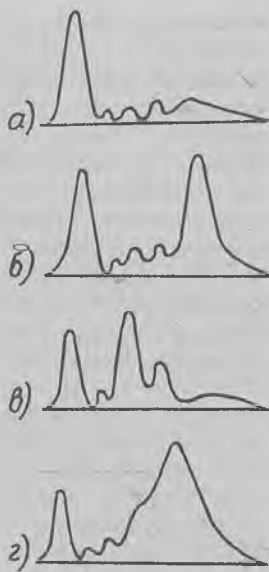
Денситометрдан фойдаланган ҳолда оксил фракцияларининг нисбати денситограмма орқали топилади. Денситометрда электрофореграмма орқали нур тўплами ўтказилади, уларнинг ютилиши бўялган оксил фракцияларининг зичлигига боғлиқ бўлади.

Электрофореграммадан ўтган нур фотозэлементда тутилади ва электр токига айланади. Ҳосил бўлган ток тўлқинлари қоғоз тасмага эгри чизиқлар ҳолида ёзилади. Ҳосил бўлган ҳар қандай чўққили чизиқ оксил фракциясини ифодалайди, — альбуминлар, альфа₁, альфа₂, бетта ва гамма-глобулинлар (22- расмга қаранг). Ушбу оксил реакцияларининг микдорий нисбатлари чўққи майдонига боғлиқ бўлади. Бу чўққиларни алоҳида 5 бўлакка бўлиб, ҳар қайсисини тарозида тортиш йўли билан микдори аниқланади ёки бўлмаса махсус асбоб — планиметрда аниқланади. Оксил фракцияларининг микдорий нисбатлари турли касалликларда турлича ўзгаради ва касалликни аниқлаш, уларни фарқлаш, даволаш, назорат қилишда катта аҳамиятга эга.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Усулнинг асосланиши, уни аниқлаш йўллари, қон зардоби оксилларининг микдорий нисбатлари ва уларнинг касалликларда ўзгаришини, фракциялари кўрсаткичини дафтарингизга ёзинг ва хулоса чиқаринг.

116-и ш. АЗОТ ҚОЛДИГИ МИҚДОРИНИ ЎЛЧАШ

Қоннинг азот қолдиқлари асосини 50% сийдикчил, 25% аминокислота азоти ва бошқа азот тутувчи бирикмалар ташкил қилади. Соғлом одам қонида азот қолдиғи 14,3—25,0 ммоль/л (20—40 мг/100 мл), янги туғилганларда 42,84—71,40 ммоль/л (60—100 мг/100 мл) бўлади. Чақалоқ 10—12 кунлик бўлганда бу кўрсаткич катталарниқига яқинлашади. Қон таркибидаги азот қолдиғи ва унинг фракцияларини аниқлаш амалий аҳамиятга эга,



айниқса у буйракнинг ажратувчанлик фаолияти бузилишини аниқлашда яхши кўрсаткич ҳисобланади.

Қон таркибидаги азот қолдиқлари микдорининг ошиши «азотемия» деб аталади. Азотемия икки хил бўлади: абсолют (азот қолдиқлари компонентларининг қонда йиғилиши ва нисбий (қусиш ёки ич кетиши натижасида организмнинг сувсизланиши, бу айниқса ёш болаларда кузатилади). Абсолют азотемиянинг сабаблари икки хил: ретенцион (буйрак билан боғлиқ) ва продукцион (буйрак билан боғлиқ бўлмаган). Ретенцион азотемия ўртача микдордаги азот чиқиндилари йиғилиши натижаси бўлиб, буйрак ажратувчанлик фаолияти бузилишидан, масалан ўткир ва сурункали буйрак яллиғланиши ва қондаги сийдикчил микдорининг кўпайишидан келиб чиқади. Сурункали нефритларда турғун азотемия буйрак етишмовчилигидан далолат беради. Продукцион азотемия эса оксилларнинг парчаланиши ортиши ва аминокислоталар микдорининг кўпайиши билан боғлиқ. Хавфли ўсма касалликларида кузатилади. Гиперазотемия ўсмага боғлиқ бўлмаган ҳолда хаддан ташқари озиш (кахексия), сил, диабет, жигар циррози, ўпканинг крупоз яллиғланиши, жигар атрофияси, юрак фаолиятининг сусайиши, буйрак усти беши гипофункцияси, айрим юқумли касалликларда, скарлатина, дифтерияларда кузатилади. Чала туғилган болаларда азотемия яққол намоён бўлади, бу уларнинг буйраги тўлиқ ривожланмаганлиги ва тўқима оксилларининг шиддатли парчаланиши натижасидир.

Азот қолдиқлари микдорининг камайиши вақтида тўйиб овқат емаслик ва ҳомиладорликда кузатилади.

Усулнинг асоси: Қоннинг азот қолдиқлари қон оксиллари турли чўктирувчилар ёрдамида (учхлорсирка филтратни концентрланган сульфат кислота билан минераллаштириш йўли билан аниқланади. Барча ўрганилаётган фракциялардаги азот аммиак ҳолатида сульфат кислота билан боғланади ва ҳосил бўлган аммоний сульфат Несслер реактиви билан сариқ-қизғиш рангли бирикма ҳосил қилади. Унинг оч-тўқлиги аммиак микдори га тўғри келади, демак азот микдори га пропорционалдир. Азот микдори олдиндан тайёрланган ўлчов эгри чизигига биноан топилади.

Текширилувчи материал: қон.

Реактивлар: натрий вольфрамат ёки учхлорсирка кислотанинг 10 % ли эритмаси, концентрланган сульфат кислотанинг 0,23 М эритмаси, пергидроль, натрий ишқорининг 50 % ли эритмаси, Несслер реактиви (10 г калий йодид 15 мл сувда эритилади ва унга 15 г симоб йодид

(HCl₂) кўшиб яхшилаб аралаштирилади. Сўнг натрий гидроксиднинг 50% ли эритмасидан 80 мл кушилади «карбонатлар бўлмаслиги керак»). Эритманинг умумий ҳажми 500 мл га етказилади. Орадан 24 соат утгач шиша филтрдан ўтказилади. Эритма тиник бўлиши керак. Бу эритма қора идишда (яхши беркитилган ҳолда) сақланади, аммоний сульфатнинг доимий эритмаси.

Керакли анжомлар: Микропипеткалар, ФЕК, Қьелдаль колбаси ёки иссиқликка чидамли пробиркалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. **Оксилсиз филтратни олиш.** Куруқ пробиркага 1,8 мл сув, устига эса 0,2 мл қон солинади. Пипеткада қолган қон сув билан ювилади. Пробиркага 0,3 мл натрий вольфрамат эритмаси ва 0,23 М ли сульфат кислота эритмасидан 0,2 мл солинади. Аралашма яхшилаб аралаштирилади ва 15 дақиқага қолдирилади. Бир оздан сўнг аралашма куруқ пробиркага филтрланади. Агар учхлорсирка кислота эритмаси ишлатилган бўлса, 1,8 мл сув қуйилади (0,2 мл қонга 1 мл учхлорсирка кислотанинг 10% ли эритмасидан солинади).

2. **Куйдириш.** Иссиқликка чидамли пробиркага ёки Қьелдаль колбасига 1 мл оксилсиз филтрат солинади, устига 3 мл концентрланган сульфат кислота ва 3 томчи водород пероксид солиб қиздирилади. Суюқлик секин-аста буғлатилади ва рангсиз минерал ҳолга келгунча қиздириб куйдирилади.

3. **Фотометрлаш:** Олинган минерал ҳолдаги маҳсулот совитилгач унга 10 мл сув солинади, кислотани нейтраллаш учун 6 томчи 50% ли натрий гидроксид эритмаси қўшилади (лакмус ранги ўзгаришига қараб) ва 0,5 мл Несслер реактиви солинади. Текширув ва назорат тажриба эритмалари тайёрланади: бунинг учун 10 мл сувга 6 томчи 50% ли натрий гидроксид эритмаси, бир томчи концентрланган сульфат кислота ва 0,5 мл Несслер реактиви аралаштирилади.

Назорат тажриба эритмаси қаршисида, 5 мм ли кюветлада ФЕК нинг кўк рангли нур филтрида фотометрланади. Тайёр ўлчов эгри чизиғидан азотнинг микдори топилади ва куйидаги тенглама бўйича ҳисобланади:

$$\text{Қоннинг азот қолдиғи} = \frac{a \cdot y \cdot 100}{1,0,2} \text{ мг/100 мл}$$

a — азот микдори, аниқланаётган эритманинг мг/мл ўлчов эгри чизиғидан топилган.

y — оксил чўктирилгандан сўнг олинган қоннинг умумий ҳажми (2,5 мл га тенг).

0,2 — анализ учун олинган қон микдори, мл. Ҳалқаро ўлчов

бирлигига ўтказиш коэффициенти СИ (ммоль/л) 0,714 га тенг.

Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш. Аммоний сульфатнинг доимий (асосий эритмаси 1 мл да 0,1 мг тутуди) каторидан 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 м ёки 10 дан 100 мкг гача 10 мл да азот тутувчи эритма тайёрланади. Бунинг учун бир мл аммоний сульфатнинг асосий эритмасига 9 мл сув, 6 томчи 50% ли натрий гидроксид эритмаси, 1 томчи концентрланган сульфат кислота ва 0,5 мл Несслер реактиви аралаштирилади. Унга 8 мл сув кўшилган 2 мл аммоний сульфатнинг доимий эритмаси, 6 томчи 50% ли натрий гидроксид эритмаси, 1 томчи концентрланган сульфат кислота ва 0,5 мл Несслер реактиви аралаштирилади. Ҳар бир эритма учун оптик зичлик аниқланади. Шундан сўнг ўлчов эгри чизигини тайёрлашга киришилади.

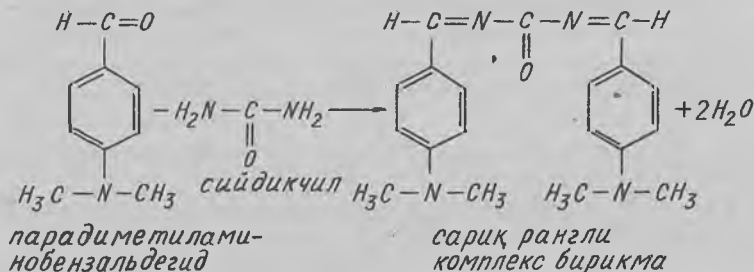
117-и ш. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ СИЙДИКЧИЛНИ ҚОЛОРИМЕТРИҚ УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

Соғлом одам қон зардобиди 3,33—8,32 ммол/л (20—50 мг%) сийдикчил бўлади. У оксилсиз азот қолдиғининг 50% ини ташкил қилади.

Усулнинг асоси: Сийдикчил кучли кислотали муҳитда диацетилмонооксим билан тиосемикарбозид ва темир тузлари иштирокида қиздирилганда пушти-қизил рангли комплекс бирикма ҳосил қилади. Рангининг оч-тўқлиги қон зардобидидаги сийдикчил миқдорига тўғри келади.

Текширилувчи материал: қон зардобиди.

Керакли реактивлар: учхлорсирка кислотанинг 10% ли эритмаси, сийдикчилнинг доимий стандарт эритмаси, 100 мг/100 мл да (эритма сувда ёки 0,2% ли бензой кислота эритмасида тайёрланади), темир (III) хлориднинг 5% ли эритмаси асосий эритма: 5 г темир (III) хлоридга ҳажми 100 мл га етгунча сув кўшиб эритилади, шундан кейин 1 мл



концентрланган сульфат кислота билан кислотали муҳитга ўтказилади, ишчи эритма асосий эритмадан тайёрланади, 1 мл асосий эритма ҳажми дистилланган сув қўшиб 100 мл га етказилади, 8 мл концентрланган сульфат кислота ва 1 мл 85% и ортофосфат кислота солинади. Эритма кора идишда сақланади. Диацетилмоноосимнинг 2,5% ли сувли эритмаси, тиосемикарбомиднинг 0,25% ли эритмаси (ёки 0,32% ли тиосемикарбозиднинг сувли эритмаси кора идишда сақланади), хлориднинг рангли эритмаси (тажриба олдидан тайёрланади; темир хлориднинг 30 мл ишчи реактивига 20 мл дистилланган сув, 1 мл 2,5% ли диацетилмоноосим эритмасидан ва 0,25 мл 0,25% ли тиосемикарбозид эритмасидан солинади).

Керакли анжомлар: центрифуга пробиркалари.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Оксилларни чўктириш.

Центрифуга пробиркасига 0,8 мл сув, 0,2 мл кон зардоби ва 1 мл 10% ли учхлорсирка кислота солиб аралаштирилади. Иккинчи пробиркага кон зардоби ўрнига сийдикчилнинг доимий стандарт эритмаси солинади. 15 дақиқа ўтгач кон зардоби солинган пробирка 10 дақиқа давомида центрифугаланади ёки филтрланади (дақиқасига 1500 марта айланадиган центрифуга). Шундан сўнг биринчи пробиркага 0,5 мл чўкинди устидаги эритмадан, иккинчисига эса 0,5 мл сийдикчилнинг доимий стандарт эритмасидан солинади. Ҳар қайси пробиркага 5 мл рангли эритма солиб аралаштирилади. Пробиркалар қайнаб турган сув ҳаммомига 20 дақиқага қўйилади, сўнгра оқиб турган сув тагида 2—3 дақиқа совитилади.

Тажриба ва стандарт тажрибалар яшил нур филтрида назорат эритма қаршисида 10 мм ли кюветада фотометрланади. Назорат тажриба ҳақиқий тажрибадагидек ўтказилади, фақат чўкинди устидаги эритма ўрнига 0,5 мл дистилланган сув олинади.

Сийдикчил миқдори қўйидаги тенгламага биноан ҳисобланади:

$$X = \frac{E_{\text{текш.}}}{E_{\text{доим.ст.}}} \cdot 100$$

x — сийдикчил миқдори мг/100 мл.

$E_{\text{текш.}}$ — тажрибанинг оптик зичлиги.

$E_{\text{доим.}}$ — доимий стандарт эритманинг оптик зичлиги.

100 — сийдикчилнинг доимий эритмадаги миқдори, мг/100 мл СИ системаси бирлигига ўтказиш коэффициенти (ммоль/л 0,1665 га тенг).

Сийдикчил миқдорининг камайиши, паренхиматоз гепатит, жигар циррози (жигарнинг сийдикчил ҳосил қилиш фаолияти кескин камайдган ҳолатларда, ҳомилдорликда, эклампсия вақтида кузатилади).

Сийдикчил миқдорининг ортиши нефрит, иситма, сепсис, буйрак сили хасталикларидан кузатилади.

3. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ ФЕРМЕНТЛАР ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Қон зардоби таркибидаги қатор ферментлар фаоллигини ўлчаш (лактатдегидрогеназа, аминотрансфераза, ишқорий фосфатаза ва ҳоказо) касалликларни аниқлашда муҳим аҳамиятга эга. Қон таркибида 50 га яқин фермент бўлиб, айримларининг фаоллиги қон таркибида бирмунча паст, аммо касалликларда бу ферментларнинг фаоллиги юқори даражага кўтарилади (гиперферментемия), баъзан жуда пасаяди (гипоферментемия). Айрим аъзолар ҳужайра мембранаси ўтказувчанлигининг бузилиши билан ўтадиган касалликлар кўпинча қондаги у ёки бу фермент фаоллигининг тасодифан кўтарилишига олиб келади.

Жигар (яллиғланиши) касаллигида аланин аминотрансфераза ферменти фаоллиги кескин кўтарилгани кузатилади. Юрак мускули шикастланганда аспартатаминотрансфераза фаоллиги ва лактатдегидрогеназа ферменти фаоллиги ошгани кузатилади.

Янги туғилган болаларда қон зардобининг ишқорий фосфатаза ферменти фаоллиги катталарникига нисбатан икки баробар ортиқ. Бу ферментнинг ўртача фаоллиги (Бодянский бирлигида) янги туғилганларда 4,5 ТБ, эмизукли болаларда 9,5 ТБ, 2—14 яшар болаларда 7,5 ТБ, катталарда эса 3,5 ТБ га тенг. Рахитнинг клиник кўринишлари юзага чиқишидан олдин ишқорий фосфатаза ферменти фаоллиги 30 дан 150 ТБ га кўтарилгани кузатилади.

76- ж а д в а л

Қон зардоби айрим ферментлари фаоллигининг ёшга қараб ўзгариши (халқаро бирликда)

Ёш	Аспартатаминотрансфераза	Аланинаминотрансфераза	Альдолаза
Янги туғилганларда	32	15	7,5
1 ойлик	31	19	8,0
12 ойлик	29	15	4,7
2 яшар	29	13	4,3
5 яшар	23	12	3,6
14 яшар	15	12	3,4
Катталарда	22	20	2,0

Ёш	Фосфогек- соизмераза	Малатде- гидрогена- за	Изоцитрат- дегидроге- наза	Глютати- онредукта- за
Янги туғилганларда	105	110	8,1	39
1 ойлик	80	76	7,7	53
12 ойлик	95	74	5,5	57
2 яшар	64	72	5,3	59
5 яшар	66	71	4,4	58
14 яшар	67	63	5,5	59
Катталарда	63	43	5,2	52

118-и ш . ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ФЕРМЕНТИ ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: сут кислотанинг пирозум кислотага айланиш реакцияси тезлигини ўлчаш, рН 10 да реакция мувозанати лактатни пирозум кислотага айланиши томон сурилади. Фермент фаоллиги ўлчови 340 нм да Е тезлиги ошишига боғлиқ, чунки оксидланган ва қайтарилган НАД⁺ нинг спектр ютиши турлича бўлади. Лактатдегидрогеназа фаоллиги бирлиги қилиб (ДЕ) оптик зичликнинг 0,001 га нисбатан ошганлиги олинади.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Керакли реактивлар: инкубацион аралашма: 0,1 мл қон зардоби, 0,1 мл НАД⁺, 0,02 М; 2 мл глицин буфери 0,1 М (РН и 10,0), 0,5 мл 0,5 М Д1 — лактат эритмаси ва 1 мл дистилланган сув.

Керакли анжомлар: СФ — 6 маркали спектрофотометр.

Бажариладиган иш тартиби: пробиркага инкубацион аралашма солиб 30 дақиқа давомда 37°C да сақланади. Пробиркаларнинг қайнаб турган сувга 3 дақиқага қўйиш билан реакция тугатилади. Текширув пробиркаси билан бир қаторда назорат пробиркаси ҳам қўйилади. Бунда 0,1 мл қон зардоби ўрнига 0,1 мл сув олинади. 340 нм да тажриба ва текширув пробиркаларни солиштириш билан спектрофотометрланади. Секундомер бўйича реакциянинг бошланиши ҳисобга олинади ва ҳар 30 секундда 3 дақиқа давомда Е зичлиги ва НАДН (Н⁺) ҳосил бўлиши натижасида унинг оптик зичлиги ошиб бориши ёзиб борилади.

Фермент фаоллиги қуйидаги тенглама асосида ҳисобланади.

$$E = \frac{E \times 100}{T}$$



23-расм. Лактатдегидрогеназа изофермент спектрлари (Ф. Ш. Комаров, Б. Ф. Коровкин, В. В. Меньшиковлар).

а-меъёр; б-миокард инфарктида; в-сарик касаллиги (Боткин касаллигида).

Е — зичликнинг нисбий бирликда ифодаланган фермент фаоллиги.

Е — оптик зичликнинг 5 дақиқа ичидаги йиғиндис, назорат пробиркасига нисбатан ҳар 1 дақиқада ўлчанади.

Т — инкубацияланган вақт.

1000—100 мл қон зардобига ўтказиш коэффициентини.

Соғлом одамларда лактатдегидрогеназа фаоллиги 80—250 га, ўрта ҳисобда 180 ТБ га тенг. Фермент фаоллиги ҳосил бўлган НАДН (H^+) ни ммоль/100 мл қон зардобига ҳисоблаш мумкин.

Лактатдегидрогеназа фаоллиги миокард жароҳатланганда, лейкозларда, буйрак касалликларида, гемолитик ўроксимон ҳужайра анемиясида, тромбоцитопенияларда, юқумли мононуклеозларда, шиддатли мушак дистрофияларида ортади. Тўқима некрозига учраган барча касалликлар (миокард инфаркти, буйракнинг некрозланиши, сарик касаллиги — гепатит, панкреатит (меъда ости безининг яллиғланиши), ўсмалар одатда қон зардобига лактатдегидрогеназасининг фаоллиги ошишига олиб келади. Кузатишлар шуни кўрсатадики, миокард инфаркти хуружи бошлангандан 8—10 соат ўтгач ЛДГ₁ фаоллиги ортади ва 24—48 соат ўтгач у максимал даражага етади. Юқори даражага кўтарилган фермент биринчи ҳафта давомида сақланади, касалликнинг саккизинчи кунига келиб эса у меъёрига келади. Ўткир сарик касаллигининг биринчи ҳафтасида лактатдегидрогеназа фаоллиги ортади. Унинг фаоллиги касалликнинг кечишига боғлиқ. Ушбу фермент фракцияларини ўлчаш, касалликни аниқлаш, уларни фарқлаш касалликнинг даражасини аниқлашда катта аҳамиятга эга.

119-и ш. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗОШАҚЛЛАРИНИ АГАР ГЕЛЬДА ЎТҚАЗИЛГАН ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БИЛАН АЖРАТИШ

Усулнинг асоси: қон зардоби ферментларини изошаклларга ажратиш пластинкалардаги 1% ли агар эритмаси ва рН и 8,6, ион кучланиши 0,06 бўлган барбитал буферда ўтказилади. Электрофорез сув буғланмаслиги учун олдиндан совитилган буфер эритмада ва паст ҳароратда амалга оширилади. Электрофорез камераси мустақкам беркитилган бўлиши, сув томчилари агар гелига тушмаслиги керак.

Текширилувчи материал: қон зардоби.

Реактивлар: агарнинг 1% ли эритмаси, барбитал буфери, қора амидацетат 10 — Б, қора амид 10 — Б, Б 0,5 г, симоб ацетати 5,8 г, концентранган сирка кислота 5 мл, дистилланган сув 100 мл (қора идишда сақланади), сирка кислотанинг 5 ва 7% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: электрофоретик камера стабилизатори (тўғрилагичи) билан агар пластинкасида тешикчалар ҳосил қилиш учун штамп, уч қайрилган найли ва мундштукли Пастер томизгичи.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Электрофорез.

Қон зардоби томизиш учун агар пластинкасининг ўртасида кўндаланг тешикча ҳосил қилинади. Буюм ойнасида тайёрланган агар пластинкалар 0,5 н. рН и 6 бўлган барбитал буфери билан тўлдирилган электрофоретик камерага жойлаштирилади. Икки томондаги буфер эритма фильтр қоғоздан тайёрланган кўприкча билан боғланади. Агар пластинка ўймачаларига (0,01 мл) қон зардобининг буфер эритмаси билан 2—4 марта суюлтирилган эритма томизилади. Электрофореграммага 100—300 мкг оксил томизилади). Гельга оксил томизилгач электрофорез кучланиши 200—300 В бўлган токка уланади (1 см ва 7—10 В кучланиш берилади). Электрофорез 2—3 ёки 4 соат давомида ўтказилади.

2. Электрофорез токдан ўчирилади. Гелли агар пластинка тезда олиниб, у 5—10 дақиқа 7% ли сирка кислота эритмасида қолдирилади. Бўлинган оксил фракцияларининг оқ доғлари пайдо бўлади.

3. Оксилларни бўйаш учун пластинкалар 5% ли сирка кислота эритмасида 30 дақиқа давомида қолдирилади, сўнг ҳар қайси пластинка фильтр қоғоз билан беркитилади (у 5% ли сирка кислотада ҳўлланган бўлиши керак). Ушбу пластинкалар хона ҳароратида ёки 37°C ли термостатда бир кеча-кундуз, яъни қуригунча сақланади. Сўнгра фильтр қоғоз секин сувга ҳўллаб олинади. Бўйашдан олдин агар майдони батамом

куритилган ва тиниқ бўлиши керак. Куритилган агар ёпишган шиша пластинка бўёк берувчи қора амид 10 — Б эритмасига солинади. Оксил билан боғланмаган бўёк электрофореграммада 5 % ли сирка кислота эритмаси ёрдамида 30 дақиқа давомида ювилади. Сирка кислота эритмаси 5—6 марта, то тиниқ ранг ҳосил бўлгунча аралаштирилади. Ювилган электрофореграммалар 37°C да куритилади. Электрофореграммалар расмга туширилади ёки сурати олинади.

Жигар ва юрак мушакларининг лактатдегидрогеназа изоферментлари (ЛДГ₁—ЛДГ₅) 23-расмда кўрсатилган. Лактатдегидрогеназа изоферментлари 4 та суббирлик полипептиддан тузилган (полипептиднинг икки тури Н ва М дан ташкил топган): Юрак мушаклари 4 «Н» суббирликдан тузилган ЛДГ₁ изошакл фаоллигини намён қилади. Скелет мушаклари эса 4 «М» суббирликдан тузилган ЛДГ₅ кўпроқ фаолликка эга. Изоферментларнинг комбинацияланган шакллари ҳам мавжуд ЛДГ₂ (Н₃М), ЛДГ₃ (Н₂М₂), ЛДГ₄ (НМ₃). Миокард инфарктида ЛДГ₁ ва ЛДГ₂, Боткин касаллигида ЛДГ₄ ва ЛДГ₅ изошаклларнинг фаоллиги ортади. ЛДГ₂ изоферментнинг фаоллиги аксинча камаяди. Олинган натижаларни расмийлаштиринг. Усулнинг асосини, натижаларини дафтарингизга ёзиб, хулоса чиқаринг.

120-и ш. АМИНОТРАНСФЕРАЗА ФАОЛЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Аминотрансферазалар ёки трансферазалар мураккаб фермент бўлиб, таркибида кофермент сифатида витамин В₆нинг фаол ҳолати бўлмиш фосфопиридоксал ва фосфопиридоксамин бўлади. Бу фермент аминокислоталардаги аминогрухларни қайтар равишда α -аминокислоталарга ўтказади.

Трансаминаза фаоллигини аниқлаш аминокислоталарни трансаминланишидан ҳосил бўлган α -кетокислоталар миқдорини ўлчашга асосланган. Қон зардоби — аминотрансфераза фаоллиги икки усул билан аниқланади: 1) спектрофотометрик; 2) колориметрик.

Спектрофотометрик усулда Варбургнинг оптик тестидан фойдаланилади. Колориметрик усул трансаминлаш реакцияси маҳсули бўлган пироузум кислотанинг динитрофенилгидрозин билан рангли бирикма ҳосил қилиши натижасида амалга оширилади. Иккита фермент — аспартатаминотрансфераза (АсАТ) ва аланинаминотрансфераза (АлАТ) лар фаоллигини ўлчаш му-

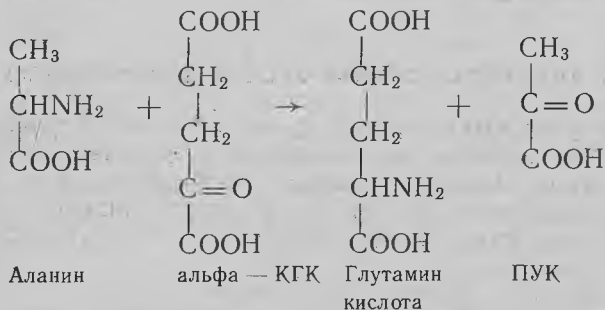
хим аҳамиятга эга, чунки бу ферментлар катта каталитик фаолликни намоён қилади.

Ушбу фермент турли аъзо ва тўқималарда: жигарда, юрак мушакларида, буйракларда, скелет мушакларида учрайди. Аммо бу ферментларнинг тўқималардаги миқдори ҳар хил. Масалан: жигардаги аланинами-нотрансфераза миқдори юрак тўқималаридагига нисбатан бирмунча ортиқ, аспартатаминотрансфераза жигарда ва юрак мушакларида кўп миқдорда учрайди.

АСАТ куйидаги реакцияни катализлайди:



АЛАТ куйидаги реакцияни катализлайди:



Усулнинг асоси: АСАТ таъсиридаги трансминланиш натижасида аспарагин аминокислота сирка ацетат кислотатага, АЛАТ таъсирида эса аланин пирозум кислотатага айланади. Сирка ацетат кислота ферментатив реакция жараёнида пирозум кислотатага айланади. Нордон 2,4-динитрофенил гидрозин тажриба пробиркаси-га куйилганда ферментатив жараён тўхтайтиди ва пирозум кислотанинг 2,4 динитрофенолгидрозини ҳосил бўлади.

Пирозум кислота гидрозини ишқорий муҳитда қизғиш-

жигаррангни ҳосил қилади, унинг оч-тўқлиги ҳосил бўлган пирозум кислота миқдорига тўғри пропорционалдир. Шундай қилиб, ҳосил бўлган пирозум кислота миқдорига қараб фермент фаоллигини аниқлаш мумкин. Аминотрансфераза фаоллиги 1 мл қон зардобининг 37°C да бир соат давомида инкубация қилинишидан ҳосил бўлган пирозум кислотанинг микромоль бирлигида ифодаланади.

Соғлом одам қон зардобининг аминотрансфераза фаоллиги унча катта эмас. У АсАТ учун 0,1—0,45 мкмоль/соат мл, АлАт учун 0,1 0,68 мкмоль/соат мл, пирозум кислотанинг бир соат инкубацияда ҳосил бўлган миқдори-дир.

Текширилувчи материал: янги қон зардоби.

Реактивлар: фосфат буфери, 0,1 М (рН 7,4) эритмада; 14,2 натрий гидрофосфат 1 л дистилланган сувда эритилади (0,1 М); 13,6 г калий дигидрофосфат 1 л дистилланган сувда эритилади (0,1 М); Буфер эритма тайёрлаш учун 840 мл 0,1 М натрий гидрофосфат ва 160 мл 0,1 М калий дигидрофосфат эритмалари аралаштирилади.

АсАТ ни аниқлаш учун субстрат аралашма: 29,2 мл альфа-кетоглутарат кислота ва 2,66 г альфа-аспарагин кислота 10 мл фосфат буферида эритилади ва у натрий гидроксид эритмаси билан рНи 7,4 га етказилади, рН бромтимол кўк ёрдамида аниқланади. Субстрат аралашма яшил рангда бўлса 1 н натрий гидроксид эритмаси томчиланади, ушбу эритма 100 мл ли ўлчов колбасига ўтказилиб, ўлчов белгигача буфер эритма қуйилади. Аралашма (холодильникда) совитгичда музланган ҳолда сақланади.

АлАТ ни аниқлаш учун субстрат аралашма: 29,2 мл альфа-кетоглутарат кислота ва 1,78 г альфа-аланин (ёки 0,89 г альфа-аланин) юқоридагидек тайёрланади.

2,4-динитрофенилгидрозин (2,4-ДФГ): 20 мг 2,4-ДФГ 1 н хлорид кислота эритмасининг оз миқдорига, сув ҳаммомида эритилади. Совитилган эритма ҳажми хлорид кислота билан 100 мл га етказалади, икки кун ўтгач эритма филтрланади, эритма совитгичда, қора идишда 1 ой сақланиши мумкин.

1 н натрий гидроксид эритмаси субстрат аралашма рНини — 7,4 га етказиш учун ишлатилади, 0,4 н натрий гидроксид эритмаси, 0,01 г ишлатилаётган индикатор 0,2 мл 0,2% ли натрий гидроксид эритмасида эритилади ва ҳажми сув билан 25 мл га етказилади.

Пирозум кислотанинг асосий стандарт эритмаси: 100 мл ли ўлчов колбасида 11 мг натрий пирозум тузи эритилиб ҳажми сув билан 100 мл га етказилади (1 мл эритмада 110 мкг натрий пируват бўлади, бу 88 мкг пирозум кислотага тўғри келади).

Керакли анжомлар: ФЭК, микропипеткалар, термостат.

Бажариладиган иш тартиби: 1. АсАТ фаоллигини аниқлаш. (КФ 2,6, 1,1). Битта назорат ва битта текширув пробиркасига 0,5 мл субстрат қуйилади (аспарагин ва альфа-КГК, янги эритилган аралашма) ва 37°C ли сув ҳаммомига 5 дақиқага қуйилади. Сўнгра тажриба пробиркасига 0,1 мл қон зардоби, текширув пробиркасига 0,1 мл дистилланган сув ва 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидрозин эритмасидан иккала пробиркага солинади. Пробиркалар 37°C ли термостатдан олинади ва тажриба пробиркасига 0,5 мл 2,4-ДФГ эритмаси солиб аралаштирилади. Реакция кетиши учун хона ҳароратида 20 дақиқа қолдирилади.

Сўнгра ҳар қайси пробиркага 0,4 н натрий гидроксид эритмасидан 5 мл дан солиниб, яхшилаб аралаштирилади ва хона ҳароратида ранг ҳосил бўлиши учун 10 дақиқа қолдирилади. Унинг оптик зичлиги 10 мл ли кюветада ФЭК нинг яшил нур фильтри (500—560 нм), текширув аралашма қаршисида ўлчанади. Фермент фаоллиги тайёр ўлчов эгри чизигига биноан ҳисобланади. Фермент фаоллиги бир мл қон зардоби учун нисбий бирликда ифодаланади.

АсАТ нинг бир бирлиги ферментнинг муайян шароитда бир мкг пирозум кислота ҳосил қила оладиган фаоллигига тўғри келади. Фермент фаоллигини ўлчашда қон зардобининг суюлтирилган даражаси ҳисобга олиниши керак:

$$x = a \cdot 10.$$

x — фермент бирлиги.

10 — бир мл ҳисобга ўтказиш. 0,1 мл қон зардобидаги ўлчов эгри чизигидан топилган пирозум кислотанинг мкг даги миқдори.

Ушбу усул билан аниқланган соғлом одам қон зардобидаги аминотрансфераза фаоллиги 8 дан 40 гача.

Бир мл қон зардобини 37°C да 1 соат давомида инкубациялаш натижасида ҳосил бўлган пирозум кислотанинг микромолда ифодаланган фермент фаоллиги қуйидаги формула бўйича ҳисобланади:

$$\text{АсАт} = \frac{x \cdot 10}{88}$$

X — 0,1 мл қон зардобининг ўлчов эгри чизигидан топилган миқдори, 88 — бир мкмоль пирозум кислотанинг оғирлиги, АсАт нинг 37°C да бир соатда аниқланган коэффиценти.

10 — бир мл қон зардобига ўтказиш учун ҳисоблаш коэффиценти.

Ўлчов эгри чизиғини тузиш. Берилган жадвалга биноан пробиркаларга натрий пируватнинг доимий эритмаси солинади. Пробиркалардаги эритмалар аралаштирилади ва 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразин солинади. 20 дақиқа ўтгач 0,4 н натрий гидроксид эритмасидан 5,0 мл солинади ва хона ҳароратида қолдирилади. Аминотрансфераза фаоллигини аниқлаш учун ўлчов эгри чизиғи чизилади.

78- ж а д в а л

Пробиркалар №	Натрий пируват, доимий эритма			Дистилланган сув, мл	1 мл қон зардобини 1 соат 37°C да сақланганда ҳосил бўлган пируозум к-та миқдори	
	Мл	Пируозум к-та миқдори			АсАТ	АлАТ
		мкг	мкмоль			
1	0,05	4,4	0,05	0,55	0,5	1,0
2	0,10	8,8	0,10	0,50	1,0	2,0
3	0,15	13,2	0,15	0,45	1,5	3,0
4	0,20	17,7	0,20	0,40	2,0	4,0
5	0,25	22,0	0,25	0,35	2,5	5,0
6	0,30	26,4	0,30	0,30	3,0	6,0

10 дақиқа ўтгач пробиркадаги эритмалар яшил нур фильтрида (530 нм) 10 мм қалинликдаги кюветаларда текширув эритмаси қаршисида фотометрланади. Текширув пробиркага пируозум эритмаси ўрнига сув қўйилади. Ўлчов эгри чизиғини чизишда ордината ўқига топилган оптик зичликлар ва абсцисса ўқига унга мос бўлган пируозум кислотанинг мкг ёки мкмольдаги миқдори қўйилади (бу ҳолда олинган натижалар 10 га кўпайтирилади).

2. АлАТ фаоллигини аниқлаш. (ҚФ 2,6, 1,2). Иккита пробиркага (текширув ва назорат) 0,5 мл дан субстрат аралашмаси (аланин ва альфа-КГК) солиб уларни 37°C ли сув ҳаммомига 5 дақиқага қўйилади. Сўнгра текширув пробиркасига 0,1 мл қон зардобини, назорат пробиркасига эса 0,1 мл сув ва 0,5 мл 2,4-ДФГ солинади. Пробиркалар 37°C ли термостатга 30 дақиқага қўйилади.

Пробиркалар термостатдан олинадиган ва текширув тажрибага 0,5 мл 2,4-ДФГ эритмаси солинади. Ҳар иккала пробирка хона ҳароратида 20 дақиқа қолдирилади. Сўнгра 0,4 н натрий гидроксид эритмасидан 5 мл дан ҳар қайси пробиркага солиниб, яхшилаб аралаштирилади ва хона ҳароратида 10 дақиқа сақланади. Шундан сўнг эритмалар

юқоридаги каби фотометрланади. Фермент фаоллиги тайёр ўлчов эгри чизигига биноан ҳисобланади. АлАТ фаоллигини ҳисоблашдан ҳосил бўлган пироузум кислотани микромолда ифодалаш учун АсАт фаоллигини топиш формуласидан фойдаланилади. Ферментнинг таъсир бирлиги тажриба ўтказилган шароитда бир мкг пироузум кислота ҳосил қилиш фаоллигига тўғри келади. Ушбу усул билан аниқланган соғлом одам қон зардобининг АлАт фаоллиги 5—30 ТБ га тенг. Олинган натижаларни расмийлаштиринг, дафтарингизга усулнинг асоси, олинган натижаларни ёзиб, хулоса чиқаринг.

121- и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ИШҚОРИЙ ФОСФАТАЗАСИ ФАОЛЛИГИНИ БЕСИЯ ВА ЛОУРИ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Ишқорий фосфатаза (фосфомоноэстераза) мавжуд эфирлардан фосфат кислота ажралишини катализлайди.

Ушбу фермент оптимал 8,6—10,1 рН да юқори фаолликка эга. Ишқорий фосфатаза кўпроқ суяк тўқималарида, ингичка ичак шиллиқ қаватида, буйрак ва жигарда учрайди.

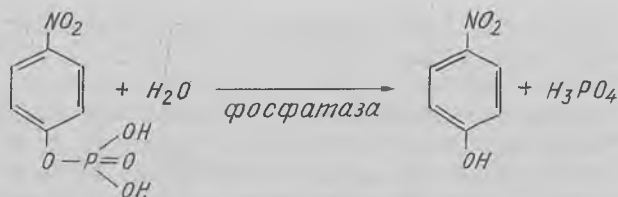
Қон зардоби ишқорий фосфатазаси рахит, остеомаляция, остеосаркома (суяк раки), жигар касалликларида (механик сариклик, билиар цирроз) юқори фаолликни кўрсатади. Айрим ҳолларда фосфатаза фаоллигининг ортиши жигарнинг хавfli ўсмаси борлигини кўрсатади. Гепатитда эса бу фермент унча фаол бўлмайди.

Усулнинг асоси: Лабораторияда ишқорий фосфатаза фаоллигини аниқлашда турли субстратлар: бетта-глицерофосфат, бетта-нафтилфосфат, *n*-нитрофенилфосфат, аденозинмонофосфат ва ҳ.к. ишлатилади. Улар *n*-нитрофосфатни бошқа субстратларга нисбатан 3 марта тезроқ парчалайди, шунинг учун лабораторияларда кўпроқ ишлатилади.

Ишқорий фосфатаза фаоллиги бирлиги қилиб, фермент таъсирида *n*-нитрофенилфосфатнинг парчаланишидан ҳосил бўлган *n*-нитрофенол олинади.

n-нитрофенол ишқорий шароитда сариқ рангга киради. Шу рангнинг оч-тўқлиги колориметрда ўлчанади.

Кимёвий реакция тенгламаси.



нитрофенилфосфат

*нитрофенол
(сарик рангли рН10,5)*

Текширилувчи материал: қон зардоби (гемолизланмаган бўлиши керак, сульфаниламид ва антибиотиклар билан даволаниш фермент фаоллигини ўлчашга ҳалакит беради).

Реактивлар: *n*-нитрофенилфосфатнинг нитрийли тузи; 0,001 моль/л хлорид кислотдаги 0,4% ли эритмаси, глицин буфери: 0,05 моль/л (10 мг/дл) хлорид магний катализаторини тутувчи эритма; 10,5 рН ли субстрат-буфер эритмаси I ва I эритмаларни баробар миқдорда аралаштириш йўли билан тайёрланади. 0,02 м/л натрий гидроксид эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, пипеткалар, термостат, ФЭЖ, 10 мм қалинликдаги кюветалар, муз ҳаммоми.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Битта текширув, битта назорат тажриба пробиркасига субстрат-буфер эритмасидан бир мл солинади ва 5 дақиқа 37°С ли термостатга қўйилади. Сўнгра текширув пробиркасига 0,1 мл гемолизланмаган қон зардоби солинади ва яхшилаб чайқатилади. Пробиркалар 37°С ли термостатда 30 дақиқа сақланади, кейин улар муз ҳаммомига ўтказилади. Совитилган назорат пробиркага 0,1 мл қон зардоби солинади ва иккала пробиркага 10 мл натрий гидроксид эритмаси қўйилади.

2. 5 дақиқа ўтгач пробиркадаги бўялган эритмалар бинафша нур фильтрида (400—420 тўлқин узунликда) ФЭЖ да кўрилади.

3. Фермент фаоллиги тайёр ўлчов эгри чизигига (графигига) асосан ҳисобланади. Фермент фаоллиги бир мл қон зардобини 37° С да бир соат давомида сақланиши натижасида ҳосил бўлган нитрофенолнинг микромолида ифодаланани (Бесия — Лоури — Брок бирлиги). Соғлом одамда қон зардобининг ишқорий фосфатаза фаоллиги 1,0—4,0 мкмоль (мл х соат) га тенг. Ушбу фермент фаоллиги 16,7 мЕ (ҳалқаро миллибирлик) га тўғри келади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Дафтарингизга усулнинг асосини, тажриба (реакциясини) схемасини ҳисоблашни ва унинг амалий аҳамиятини ёзинг.

Одам организмида икки хил холинэстераза тафовут қилинади:

1. Ацетилхолинэстераза (АХЭ), кўпинча мия, эритроцитлар, мушак, нервларда учрайди. Ушбу фермент ацетилхолинни холин ва сирка кислотага сув иштирокида парчаланишини катализлайди.

2. Холинэстераза (ХЭ) асосан жигарда, меъда ости безида, қон плазмасида учрайди. Ушбу фермент АХЭ га нисбатан кенг-қўламдаги субстратларга таъсир қилади, яъни у ацетилхолин ва холиннинг бошқа эфирлари парчаланишини катализлайди.

Амалий-ташхисий изланишларда зардобнинг ацетилхолинэстеразаси аниқланади. Зардоб холинэстеразаси юқори молекулали гликопротеин тузилишига эга. Қонда у альбумин фракциялари билан боғланган ҳолда учрайди. Бу ферментнинг бажарадиган вазифаси тўлиқ ўрганилмаган. Олимларнинг фикрича ХЭ фаоллиги қонда ҳимоя воситаси ҳисобланади, чунки бу фермент ацетилхолин кўпайиб қонга тушганда уни тўқималарга тарқалишидан саклайди. Одатда ХЭ фаоллиги кенг чегараланган: 160—340 мкмоль (мл соат). Кўпинча касаллик ҳолатларида ХЭ фаоллиги пасаяди. Фермент фаоллигининг бирмунча пасайиши гипотиреоз, бронхиал астма, бўғим ревматизми, миокард инфаркти, куйганда, турли фосфорорганик моддалардан заҳарланганда кузатилади. Заҳарланиш белгилари пайдо бўлишидан бир оз олдин ХЭ фаоллиги сусайганлигини кўриш мумкин.

Усулнинг асоси: ацетилхолин хлоридни зардоб холинэстеразаси катализлайдиган фермент иштирокидаги реакцияда ҳосил бўлган сирка кислота миқдорини аниқлашдан иборат. Сирка кислота инкубацион аралашма рН ини ўзгартиради ва бу ўзгариш индикатор ёрдамида аниқланади. Миқдори колориметрик усул билан ўлчанади.

Текширилувчи материал: қон зардоби (гемолизланмаган).

Реактивлар: 0,9 моль/л ацетилхолинхлорид эритмаси, веронал буфернинг 0,0075 моль/л эритмаси, рН и 8,4 бўлган фенол қизил индикаторини тутувчи эритма, 0,1 моль/л хлорид кислота эритмаси, 0,05 моль/л натрий гидроксид эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, термостат, ФЭК, 10,5 см, калинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби: Битта текширув, битта назорат пробирка тайёрланади. Текширув тажриба пробиркасига 5 мл индикатор тутувчи веронал буфер, 0,2 мл дистилланган сув, 0,1 мл қон зардоби солинади. Аралашма 37°C ли термостатга 5 дақиқага қуйилади. Сўнгра унга 0,2 мл ацетилхолинхлорид эритмаси солиб 37°C ли термостатда 30 дақиқа ушланади. Бу аралашмага реакцияни тўхтатиш мақсадида 0,2 мл прозерин эритмаси солинади. Назорат пробиркасига эса аввал 0,2 мл прозерин эритмаси, сўнгра қолган реактивлар тажрибадагидек кетма-кет солинади. 30 дақиқа 37°C ли доимий ҳароратда ушланган текширув ва назорат пробиркалари яшил нур филтрли ФЭК да сув қаршисида колориметрланади. Ранг турғунлиги бир соатга етади. Текширув ва назорат пробиркаларининг ФЭК кўрсаткичлари фарқи топилади, сўнгра текширув тажрибада ҳосил бўлган сирка микдори ўлчов эгри чизигига биноан топилади.

ХЭ фаоллиги бир мл зардобни субстрат билан 37°C да бир соат давомида ҳосил бўлган сирка кислотанинг микромолида ифодаланади. Формулага биноан ҳисобланади:

$$\text{ХЭ фаоллиги} = a \times 10 \times 2 \text{ мкмоль/мл соат}$$

a — ўлчов эгри чизигидан топилган тажриба сирка кислотанинг мкмольда ифодаланган микдори.

10 — бир мл қон зардобига ўтказиш сони.

2 — бир соат доимий ҳароратда ушланган ўтказиш сони (коэффициенти).

Олинган натижаларни расмийлаштириш: дафтарингизга усулнинг асосини, тажриба схемасини, ФЭК кўрсаткичини, фаоллигини ҳисоблаб, амалий аҳамиятини ёзинг.

4. ҚОН ЗАРДОБИ МИНЕРАЛЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Организмда борадиган физиологик ва биокимёвий жараёнларда минералларнинг аҳамияти катта. Ўсувчи организмда минерал моддалар суяк тўқималарининг такомиллашувида, гемоглобин, гормонлар ва ферментлар синтезида муҳим аҳамиятга эга.

Еш улғайган сари минерал моддаларга бўлган абсолют эҳтиёж ортиб боради, нисбий эҳтиёж эса камаяди (тана вазнининг бир кг си ҳисобида).

Кўкрак ёшидаги болаларда минерал моддаларга

бўлган эҳтиёж она сути орқали таъминланади. Аммо бир неча ойдан сўнг ўсувчи организмга қўшимча кальций, фосфор, калий каби моддаларни овқат билан киритиш эҳтиёжи туғилади. Бола организмда кальцийнинг 97 % и суяк тўқимаси билан боғланган ҳолда ва фақат 3 % и эркин ҳолда тўқима ва қонда учрайди. Ёш болаларда кальцийга бўлган кундалик эҳтиёж 0,15—0,18 г ни ташкил этади. Унинг кўпайиши мактаб ёшига етганда кузатилади. У 1,0 г га етади. Бола бир ёшга етгунча унинг кальцийга бўлган эҳтиёжи 2—3 яшарлигига нисбатан 8—13 марта ортиқ бўлади. Кальций тўқималарнинг ўсиши, нерв системасининг таранглиги ушлаб турилишида, қон ивишида, ферментлар фаоллигини аниқлашда жуда зарур. Кальций алмашинуви фосфор алмашинуви билан чамбарчас боғлиқ. Кальций ва фосфор нисбати 1:1,5 бўлганда улар ичакда яхши сўрилади. Фосфор скелетнинг тузилиши, макроэргик бирикмалар, нуклеин кислота, мураккаб оксиллар, фосфатидлар ҳосил бўлиши ва кислота-ишқор мувозанатини сақлашда зарур восита.

Витамин D етишмаганда рахит касаллиги ривожланади. Бу касаллик кальций ва фосфор алмашинувининг бузилиши билан ифодаланади. Шу туфайли рахитда суяк тўқимасининг ривожланиши бузилади. Шунингдек, организмнинг темир билан таъминланиши катта аҳамиятга эга. Темир глобин ва оксидланиш-қайтарилиш реакцияларида иштирок этувчи ферментлар таркибига киради. Темир етишмовчилиги алиментар камқонлик касаллигини юзага келтиради.

Минерал моддаларни ёшга қараб ўзгариши ва унга бўлган эҳтиёж жадвалда келтирилган:

79- жадвал

Овқатлантириш	Минерал моддалар		
	киритилган/г	г	%
Табийий овқатлантириш	1,07—1,52	0,37—0,70	33—48
Сунъий овқатлантириш	2,46—5,80	0,80—3,80	24—65
Аралаш овқатлантириш	2,33—3,90	1,12—1,30	33—48

Қон зардоби таркибидаги айрим минерал моддаларни (элементларни) аниқлаш касалликнинг ривожланиш механизмини аниқлаш, унинг олдини олиш, даволаш учун кўрсаткич бўла олади.

Одам организмнинг айрим минералларга бўлган эҳтиёжи, мг

Ёши	Кальций	Фосфор	Магний
Болалар			
1 ёш	1000	1500	—
1—3	1000	1500	140
4—6	1000	1500	220
7—10	1200	2000	360
11—13	1500	2500	400
14—17	1400	2000	530
Эмизадиган аёллар	800	1600	500
Ҳомиладор аёллар	1500	3000	925

Она сути билан организмга тушадиган минераллар бу катталикка кирмайди.

Болалар қони таркибидаги минерал моддалар

Минерал моддалар	Ёши	Миқдори	
		мг/	ммоль/л
Умумий (натрий, калий, кальций, магний)			150—155
натрий	2ой—14	315—330	137—143
калий	2 ой—6	16,0—21,5	4,1—5,5
	7—14	14,0—21,0	3,5—5,3
ионланган кальций	14	10,5—11,5	2,6—2,8
	1—14	5,0—5,5	1,2—1,4
Қон зардоби эритроцитлари	1—9	2,16	0,9
магний	1—9	2,0—4,0	0,5—1,0
Анорганик фосфор	1—14	2,0—5,0	0,6—1,6
Нейтрал олтинугурт	0,14	1,7—3,5	0,5—1,0
Анорганик сульфатлар	0,14	2,5—5,0	0,3—0,5
Хлор	0,14	340—380	97—108

Турли ёшдаги одам қон зардобидаги темир миқдори

Боланинг ёши	Ўртача темир миқдори (мкг/л)
Киндик қонида	1780
15—30 кунлик чақалоқда	1230
1—3 ойликда	760
4—12 ойликда	730
13—18 ойликда	1110
2—6 ёшда	1120
7—13 ёшда	1140
Эркакларда	1200
Аёлларда	800

123- и ш. ҚОН ЗАРДОБИ ТАРКИБИДАГИ КАЛЬЦИЙНИ
МОЙДИН ВА ЗАҚА УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Органик бирикмалар — комплексонлар — кальций иони билан ўзаро таъсирланишидан иборат. Комплексонлар сифатида трилон В (ЭДТА ёки этилендиаминтетраацетат) ишлатилади. Индикатор мурексиднинг тахминан боғланган кальций иони трилон В билан титрланади. Кальций иони билан трилон В нинг тўлиқ боғланган вақти мурексид ранги ўзгаришидан билинади (кальций иони билан мурексид ҳосил қилган комплекс пушти-қизғиш рангга киради, кальцийдан бўшалган мурексид эса бинафша-кўк ранг беради).

Кальцийни трилон В билан ҳосил қилган комплекси мурексид комплексига нисбатан мустаҳкамрок бўлади. Титрлашга кетган трилон В нинг ҳажми ва миқдорини билган ҳолда кальций миқдори топилади. Меъёрдаги қон зардобида кальций миқдори 9—11 мг/дл (2,25—2,64 ммоль/л ни ташкил қилади).

Гипокальциемия ҳолати D авитаминозида (рахит касаллигида) ҳомиладор аёлларда, қалқонсимон олди беши фаолияти сусайганда, буйрак касалликларида, фторидлар билан захарланганда кузатилади. Гиперкальциемия (гиперпаратиреоидизин — қалқонсимон олди без фаолияти кучайиб кетганда, ўсимталар, суяк тўқималари тузилишининг ўзгариши, лейкозларда учрайди).

Текширилувчи материал: қон зардобиди.

Реактивлар: 86% ли натрий гидроксид эритмаси, 0,1 моль/л трилон В эритмаси, индикатор (мурексиднинг натрий хлорид билан 1:100 даги аралашмаси).

Керакли анжомлар: 100 мл ли колбалар, Улчов цилиндрлари, 100 мл ли Хагедорн пробиркалари, макро- ва микро-бюреткалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Гуруҳдаги барча талабалар учун мурексид эритмаси тайёрланади. Бунинг учун колбага 0,8 мл натрий гидроксид эритмаси ва 100 мл сув солиб аралаштирилади. Олинган эритмага тиник бинафша ранг ҳосил бўлгунча мурексид аралашмаси солинади. Шу эритма билан макробюреткалар тўлдирилади.

2. Макробюретка трилон Б эритмаси билан тўлдирилади.

3. Иккита кенг Хагедорн пробиркасига (текшириш ва назорат учун) 5 мл мурексид эритмаси қўйилади. Текшириш учун 0,2 мл қон зардоби солинади (эритма пушти тусга киради). Макробюреткалардаги трилон Б эритмаси (билан тезда) пушти рангдан бинафша ранг ҳосил бўлгунча титрланади (титрланиш табиий нурда ўтказилгани маъқул), ранг назорат эритма билан солиштирилади.

Ҳисоблаш: Бир мл 0,1 моль/л трион Б эритмаси 0,12 мг кальцийга (эквивалент) тўғри келишидан ҳисобланади. Қон зардобидаги кальций микдори мг/дл да ифодаланади.

$$X = y \cdot 0,12 \cdot 100$$

y — текширувни титрлаш учун кетган трилон Б ҳажми, мл.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Дафтарга усулнинг асоси, титрлашга сарф бўлган трилон Б ҳажми, ҳисоблаш ва хулосаси ёзилади.

124-и ш. ҚОН ЗАРДОБИДАГИ ТЕМИР МИҚДОРНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: қон зардоби минерализациялангандан сўнг органик бирикмалардан ажралган темир калий тиоциониди билан нордон муҳитда пушти-қизил рангли бирикма ҳосил қилади. Рангли эритма колориметрланади. Соғлом одам қон зардоби 80—160 мг/дл темир тутади.

Пернициоз камқонликда қон плазмасида темир микдори ортади. Гипохром камқонликда эса камаяди.

Текширилувчи материал: кон зардоби.

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота, перхлорат кислота эритмаси, 8 % ли калий пероксидисульфатнинг тўйинган эритмаси (чўкма устидаги эритма ишлатилади), 25 % ли натрий тиоционат эритмаси, амил спирти.

Керакли анжомлар: юқори ҳароратга чидамли пробиркалар, пипеткалар, ФЭК, бир см калинликдаги қювета.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Текширув тажриба ва доимий эритма учун иккита ҳароратга чидамли пробирка тайёрланади. Текширишга 0,5 мл зардоб ва 0,4 мл концентрланган сульфат кислота солинади. Иккинчи пробиркага эса 0,5 мл дистилланган сув ва 0,5 мл темирнинг доимий эритмаси солинади.

2. Иккала пробирка ўртача иссиқликда қиздирилган кум ҳаммомига жойлаштирилиб, буғ чиқиши тугагунча (тахминан 10—15 дақиқа) минерал ҳолатга ўтказилади. Сўнгра пробиркаларга 0,5 мл перхлорат кислота солиниб, эритма тиниқлангунча қиздириш давом эттирилади.

3. Шундан сўнг иккала пробиркага 0,5 мл дан дистилланган сув ва 0,2 мл калий тиосульфат эритмаси солинади (бунда Fe^{2+} Fe^{3+} га айланади) ва хона ҳароратигача совитилади. Совитилган пробиркаларга бир мл 25 % ли натрий тиосульфат эритмаси солиб яхшилаб аралаштирилади.

4. Иккала пробиркага 3 мл дан тамил спирти қуйилиб, аралаштирилади. Бўялган юқори қаватдаги эритма кўк нур фильтри (490—520 нм) да ФЭК да қолориметрланади. Доимий эритма бир мгк темир тутиши сабабли текширув тажрибадаги темир миқдори ҳисобланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Дафтарга усулнинг асоси, ҳисоби, хулоса ёзилади:

Тайёрланиш учун саволлар

1. Қоннинг аҳамияти ва бажарадиган вазифалари нимадан иборат?
2. Қон плазмаси, зардоби қандай олинади?
3. Қон таркиби, органик ва аорганик бирикмаларини айтинг?
4. Қон оксиллари, уларнинг вазифалари, организмдаги ўртача миқдори, касалликларда ўзгариши, қайси усуллар ёрдамида аниқланади?
5. Электрофорез усули нимага асосланган. Бу усул ёрдамида қоннинг қандай оксил фракциялари аниқланади? Аниқлаш сабаблари.
6. Қон таркибидаги ферментлар. Индикатор ферментлар нима? Уларнинг миқдорини ўлчашдан мақсад нима? Қўлланиладиган усулларда уларнинг аҳамияти?
7. Қоннинг «азот қолдиқлари»га қандай бирикмалар киритилади. Қандай ҳолатларда уларнинг миқдори ортади? Уларни аниқлашнинг аҳамияти?

8. Билирубин нима? Унинг захарсизлантирилиши ва организмдан чиқариш йулларини айтинг. Эркин ва боғланган билирубин қандай фаркланади? Қандай касалликларда уларнинг микдори ортади? Қайси усул билан аниқлаш мумкин, уларни аниқлашдан мақсад нима?

9. Қон зардоби минераллари, уларнинг аҳамияти, касалликларда ўзгариши, уларни аниқлаш усулларини асоси ва қўлланилиши.

10. Гемоглобин спектрал анализининг қўлланилиши. Гемоглобин микдорининг турли ҳолатларда ўзгариши, гемоглобиннинг турлари.

Қуйидаги масалаларни ечинг

1. Бемор қонининг анализи, қоннинг солиштирма оғирлиги 1,052, плазмаси 1,022 ва қон плазмаси оқсили 5,2 % эканлигини кўрсатди. Шу кўрсаткичларга қўра гемоглобин микдорини аниқлаш мумкинми? Шу натижалардан фойдаланиб даволаш усулини тузиш мумкинми?

2. Бемор қонининг микдори камайган. Қасалликни аниқлашда бу натижаларга асосланиш мумкинми? Шу кўрсаткичдан фойдаланиб тўлдирувчи даво схемаси тузиш мумкинми?

3. Бемор қонида гемоглобин камайган. Унга ўроксимон ҳужайрали камқонлик деб ташхис қўйиш мумкинми?

4. Бола туғилганидан 5—10 кун ўтгач саргайиб кетган. Бунинг сабаби нима? Бола сариқ касали билан оғриди дейиш мумкинми? Буни қандай йўл билан тасдиқлаш мумкин?

5. Бемор сариқ касаллиги билан оғриган. Сариқ касаллигини биокимёвий йўл билан аниқлаш усули қандай? Бу касалликнинг келиб чиқиши, биокимёвий механизми қандай?

6. Бемор сурункали сариқлик билан касалланган. Нима учун жаҳлдор.

7. Қасалхоналардаги биокимёвий лабораторияларда бемор қон зардоби оқсилларини электрофорезда ҳаракатланиши ўрганилади. Нима учун? Унинг моҳияти нимада?

8. Беморнинг қон зардобида γ-глобулин микдори кескин камайганлиги аниқланди. У қандай касаллик билан касалланган дейиш мумкин? Бу ҳолни тузатиш мумкинми?

9. Фаол ревматизм ташхиси билан бемор шифохонага тушди. Қон зардобининг қандай оқсил фракциялари ўзгаради?

10. Беморнинг оёқлари сезиларли даражада шишган. Бемор қон зардобидаги оқсилларнинг қайси бири ўзгарган? Бундай беморга альбумин қуйиш мумкинми?

11. Беморнинг қонида азот қолдиқлари 0,8 г/л ташкил қилади. Шу кўрсаткичга асосланиб беморнинг буйраги касалланган дейиш мумкинми? Жавобингизни изоҳлаб беринг.

12. Ички касалликлар бўлимига тушган беморнинг буйраги ҳолатини билиш зарурати туғилди. Аммо лабораторияда азот қолдиқларини аниқлашга имкон йўқ. Бундай вазиятдан чиқиш учун қандай кўрсаткичдан фойдаланиш мумкин?

13. Дизентерия билан оғриган бемор шифохонада даволанаёпти. Беморнинг тез-тез қусаётгани ва ичи кетаётганини ҳисобга олган шифокор қон зардобидаги қандай кўрсаткичларни аниқламоғи керак? Нима учун?

14. Шифокор олдига келган бемор кундан-кунга кучсизланаётгани, кўнгли айнаётгани, бош оғриғи безовта қилаётганини айтади. Қандай касаллик бошланаётганлигини шифокор қайси йўл билан билиши мумкин? У қандай кўрсаткичлардан фойдаланиши мумкин?

15. Беморнинг қон зардобида аланинаминотрансфераза ферменти фаоллиги 3,2 мкмоль/соат мл бўлди. Шу кўрсаткичдан шифокор қандай хулоса чиқариши мумкин?

16. Бемор юраги санчиб оғриётгани ва оғриқ елка томонга ҳам

таркалаётганини шифокорга айтди. Шифокор электрокардиограмма килдирмай, беморнинг қон зардоби аспаратаминотрансферазасини аниқлаш учун биохимия лабораториясига юборди. Шифокор тўғри йўл тутдими? Жавобингизни тушунтириб беринг.

17. Беморнинг қон зардобида лактатдегидрогеназининг бирламчи ва иккиламчи шакли юкори даражада олинганлиги маълум бўлди. Бу кўрсаткич орқали қайси аъзо касалланган ва у қандай касаллик эканини билиш мумкинми? Шу ферментнинг 4—5-изошакли ортган бўлса-чи?

18. Боланинг тиши чикиши кечикканлиги, тана ривожланишдан орқада қолгани — вазни камайганини шифокор қандай биокимёвий усул билан аниқламоғи ва юкоридаги ҳолатларни йўқотиш учун қандай даволаш режасини қўллаши мумкин?

Х БЎЛИМ

СИЙДИК БИОХИМИЯСИ

Сийдик буйрак маҳсулидир. Буйракнинг бажарадиган вазифаси хилма-хил бўлиб, шулардан асосийси моддалар алмашинуви жараёнининг охириги маҳсулотларини ташқарига чиқариш ва қоннинг доимий таркибини сақлашдан иборат. Бир сутка давомида буйрак орқали 1000 л қон ўтказилиб, 180 л бирламчи сийдик ҳосил бўлади. Буйрак филтрлаган сийдикнинг фақат бир фоизигина ҳақиқий сийдикка айланади, қолган суюқлик эса унда эриган моддалар билан бирга буйракнинг проксимал найчалари орқали қайтадан сўрилади (реабсорбция). Бир кеча-кундузда аёллар ўртача 1200 мл ва эркеклар 1500 мл сийдик ажратади. Бир кунлик сийдик миқдори болаларда ёшига қараб ўзгаради.

83-жадвал

Тана вазнига нисбатан бир кунда ошириладиган сийдик миқдори, мл

Ёши	Тананинг ўртача вазни	Бир кеча-кундузда ажралган сийдик, мл	Бир кеча-кундузда вазнга нисбатан ажралган суткалик сийдик, мл
1 кунлик	3,0	21,0	7,0
1 ҳафталик	3,0	235,0	76,0
1 ойлик	4,0	320,0	80,0
1—2 яшар	10,0	450,0	45,0
2—5	13,0	520,0	40,0
5—8	19,0	684,0	36,0
8—11	25,0	850,0	34,0
11—15	37,0	1073,0	29,0
15—18	52,0	1144,0	22,0
Катталарда	65,0	1200,0	18,5

Жадвалдан кўриниб турибдики, бола ҳаётининг биринчи куни бир кг тана вазнига 7 мл сийдик тўғри келса, у кейинчалик бир неча баробар ортади. Бола ҳаётининг дастлабки кунларида сийдик миқдори ажралишининг ортиши (полиурия) кўпинча кўп миқдорда суюқлик ичишга боғлиқ. Полиурия шишларнинг сўрилиши ва истмалашдан кейинги тузалиш даврида ҳам кузатилади.

Бир кунда ажраладиган сийдик миқдорининг камайиши бола ҳаётининг дастлабки даврида организмга кам миқдорда суюқлик тушганда, ич кетганда, қусиш, заҳарланишда кузатилади.

Сийдик ҳосил бўлиши ва ажралиши кўпинча марказий нерв системаси, мия пўстлоғи ва импульслари томонидан ёки гипофиз гормонлари орқали бошқарилади. Гипофиз безининг орқа бўлагидан ажраладиган АДГ (антидиуретик гормон) ёки вазопрессин сийдик ажралишини сусайтиради.

Бир кунлик сийдик таркибида ўртача 40 г органик ва тахминан 20 г ноорганик модда бўлади. Сийдикдаги минерал моддалар миқдори истеъмол қилинган озуқаларга боғлиқ. Сийдик орқали 150 га яқин турли маҳсулотлар ажралади. Масалан, гормонларнинг парчаланишидан ҳосил бўлган жуфт сульфат ёки жуфт глюкурон кислоталар, доривор бирикмалар, витаминлар ва бошқалар.

Сийдик организмдан вақти-вақти билан ажралади ва бир кунда ажралган сийдик пропорцияларининг кимёвий таркиби, нисбий зичлиги ва кислоталилиги турлича бўлади. Шу туфайли сийдикнинг миқдорий анализи учун муайян вақтларда ажралган одатдаги суткалик сийдик олинади. Тез парчаланадиган моддаларни (аскорбин кислота, ацетосирка кислота, диастазда) аниқлаш учун янги сийдик ишлатилади.

Одатда сийдик соғлом ва патологик бўлиши мумкин. Сийдикни анализ қилишда унинг физик-кимёвий хоссалари: нисбий зичлиги, ранги, хиди, бир кунлик миқдори, кислоталилиги ҳамда органик ва аорганик таркибий қисмлари ўрганилади.

Ажраладиган сийдик миқдори камайган (олигурия), кўпайган (полиурия), бутунлай тўхтаган (анурия) бўлиши мумкин.

Сийдикнинг ранги одатда турлича бўлади: сарик, оч сарик, қизғиш сарик. Бу унинг таркибидаги пигментлар миқдорига боғлиқ. Урохром пигменти (тўқ сарик рангли), уробилин (оч пушти), уроэритрин (қизғиш) рангларни

беради. Овқат орқали тушадиган айрим маҳсулотлар (лавлаг), турли дориворлар (амидопирин) сийдикни пушти-қизғиш тусга киргизади.

Қон пигментлари сийдик рангини пушти ёки жигар ранггача, ўт пигментлари яшил ёки сарик-жигар ранггача ўзгартиради, сийдикда йиринг пайдо бўлиши натижасида у турланади, алкаптанурия — насл касаллигида сийдик қораяди. Бу сийдикни ишқорий муҳитга ўтиши ва гомогентизин кислотанинг алмашинув маҳсулоти бўлган меланин каби тўқ бўлиши пигментларнинг пайдо бўлишига боғлиқ. Қон, йиринг, оксил сийдикнинг тиниклиги ўзгаришига, унинг лойқаланишига олиб келади ва буйрак ҳамда сийдик йўлларида патологик ўзгариш борлигидан далолат беради.

Янги сийдик кучсиз хушбўй ҳидга эга, у қайнатма шўрва ҳидини эслатади. Туриб қолган сийдикда ёқимсиз ўткир аммиак ҳиди бўлади. Кўпчилик касалликларда сийдикнинг сифат ва миқдор таркиби ўзгариши кузатилади. Сийдик таркибини ва миқдорини билиш касалликларини аниқлашда муҳим аҳамият касб этади.

Бўлимнинг мақсади

1. Сийдикнинг физик-кимёвий хоссалари ва таркибини ўлчаш усуллари билан таништириш. Олинган натижаларни касалликларни аниқлашда қўллашни ўрганиш.

2. Сийдикнинг патологик таркибини топиш ва аниқлаш усуллари билан таништириш. Муайян модда алмашинуви жараёнлари бузилишида сийдикда турли патологик маҳсулотлар пайдо бўлишини изоҳлашни ўрганиш.

3. Шу бўлим ўрганилгандан сўнг сийдикнинг клиник анализини ўтказа олиш.

1. СИЙДИКНИНГ ФИЗИК-КИМЁВИЙ ХОССАЛАРИ

125-и ш. СИЙДИКНИНГ НИСБИЙ ЗИЧЛИГИНИ АНИҚЛАШ

Сийдикнинг нисбий зичлиги унда эриган моддаларнинг миқдорига ва ажралаётган сийдик миқдорига узвий боғлиқ.

Организмга киритилган ва ундан чиқарилган ахлат, тери орқали ажралган тер (суюқлик) миқдорига қараб сийдикнинг нисбий зичлиги ўзгаради. Одатда сийдик қанча кўп ажралса, унинг нисбий зичлиги шунча камаяди. Соғлом одам сийдигининг 15°C да ўлчанган нисбий зичлиги $1,010\text{—}1,025$ кг/л гача бўлиб, одатда $1,017\text{—}1,020$ кг/л ни ташкил қилади.

Бола ҳаётининг дастлабки кунларида сийдикнинг нисбий зичлиги катталарникига нисбатан анча кичик бўлади, чунки уларнинг таркибида қаттиқ моддалар кам (1,002—1,020 кг/л). Уч яшар бола сийдигининг нисбий зичлиги 1,020 кг/л дан ошмайди. Секин-аста бу кўрсаткич катталарникига яқинлашади.

Қандли диабет билан оғриган бемор сийдигининг нисбий зичлиги ажралган сийдик микдорига тўғри келмайди. Бу касалликда сийдик микдори бир неча бор ошганлигига қарамай унинг нисбий зичлиги юқори даражада бўлади.

Қандсиз диабет касаллигида сийдикнинг нисбий зичлиги кескин камаяди. Иситмалаш ҳолатларида, умумий веноз турғунликда сийдик кам ажралади, унинг нисбий зичлиги юқори бўлади. Кўпчилик патологик ҳолатларда сийдикнинг нисбий зичлигини ўлчаш катта амалий аҳамиятга эга.

Сийдикнинг нисбий зичлиги махсус кичик урометрларда ўлчанади. Урометрлар икки хил бўлади: биринчиси — нормал ва паст нисбий зичликни ўлчаш учун (1,000—1,030 гача бўлмаларга бўлинган), иккинчиси — юқори зичликка эга бўлган сийдикни ўлчаш учун (1,030—1,060 гача) мўлжалланган.

Текширилувчи материал: сийдик.

Керакли анжомлар: 1. 50, 100 мл ли цилиндрлар.

2. Урометрлар: а) 1,000 дан 1,030 гача бўлимли. б) 1,030 дан 1,060 гача бўлимли, 3. Термометр, 4. Сийдик учун стакан. 5. Фильтр коғози.

Баजारиладиган иш тартиби. Урометр билан сузиб юра оладиган цилиндрга аста-секин стакан девори бўйлаб сийдик солинади.

Кўпик ҳосил бўлмаслиги керак. Кўпик ҳосил бўлса уни фильтр коғоз ёрдамида олинади. Сийдик солинган цилиндрга аста урометр туширилади. Урометрда аниқланган чизикка (суюқликнинг пастки чегарасига қараб) биноан ўлчов кўрсаткич ёзиб олинади. Агар нисбий зичлик юқори бўлса, 1,030—1,060 ли урометр ишлатилади. Урометр кўрсаткичлари 15°C да ўлчанганлиги учун барча аниқлашлар шу ҳароратда ўтказилади. Сийдик ҳарорати ўзгача бўлса унинг 15°C дан ошган ҳар қайси 3°C га 0,001 сонини кўшиш, шу ҳароратдан паст бўлса 0,001 ни урометр кўрсаткичларидан олиб ташлаш керак.

Сийдикнинг кислоталилик сифими истеъмол қилинган озиқ-овқат маҳсулотлари турига боғлиқ. Ўртача овқатланадиган одамнинг сийдиги кислоталик ёки нейтрал муҳитга (рН и 5—7) эга. Овқатланганда гўшт маҳсулотларини кўпроқ истеъмол қилиш сийдик муҳитини кислота томонга, ўсимлик маҳсулотларини истеъмол қилиш эса ишқорий томонга силжитади.

Янги туғилган чақалоқ сийдигининг рН муҳити 5,4—5,9 га тенг. Катталарга нисбатан сийдик муҳитининг кислота томон сурилиши чақалоқ буйрагининг такомиллашмаганлигидандир. Хаётининг иккинчи, тўртинчи кунидан бошлаб сийдик рН и ортиб боради ва она сути билан озиқланиш даврида 6,9—7,8 га етади. Эмизуқли бола сийдигининг кучсиз ишқорий муҳити она сути билан ишқорий моддалар қираётганлигини кўрсатади. Бола аралаш овқатланишга ўтказилганда сийдик муҳити катталарникига яқинлашади. Сунъий овқатланадиган бола сийдигининг муҳити бирмунча кислотали бўлиб, у 5,4—6,9 га тенг бўлади.

Чала туғилганларнинг сийдик муҳити кислота томонга силжиган (рН и 4,8—5,4) бўлади.

Сийдик муҳити турли касалликларда ўзгариши мумкин. Масалан, қандли диабет, подаграда у кислота томонга силжийди. Сийдик пуфагининг яллиғланиши натижасида муҳит ишқорий томонга сурилади.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Буюм ойнасига кўк ва қизил лакмус қоғоз қўйилади. Унинг устига шиша таёқча билан кичик томчи сийдик томизилади. Ранг ўзгариши кузатилади.

2. «Рифан» индикатор қоғозига юқоридагидек сийдик томизилади. Ранг ўзгариши текширув индикатор қоғоз кесимлари билан солиштирилади ва сийдик рН и аниқланади.

Шунингдек сийдикнинг тиниқлиги, ранги, ҳиди эътиборга олинади. Олинган натижалар жадвалга ёзиб расмийлаштирилади. Сийдикнинг физик-кимёвий кўрсаткичлари ёзилади ва хулоса чиқарилади.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Сийдикни текширишнинг моҳияти нимадан иборат?
2. Қандай физик-кимёвий кўрсаткичларни аниқлаш керак? Уларни аниқлаш сабабини айтинг.
3. Олигурия, полиурия, ануриялар нима, уларга сабаб нима?
4. Соғлом одам сийдигининг ҳиди, истеъмол қилинган овқат

Ёши	Сий-дик-нинг бир кунлик миқдори, мл	Сий-дик-нинг солиш-тирма оғирлиги	Сий-дик-нинг тиниқлиги	Сий-дик-нинг ҳиди	Сий-дик-нинг ранги	Сий-дик-нинг муҳити
Эркакларда Аёлларда 1 кунлик болада 1 ҳафталик болада 1 яшар болада						

маҳсулотларига боғлиқлиги қандай ва қандай касаллик ҳолатларида сийдикнинг хиди ўзгаради?

5. Соғлом одам сийдигининг муҳити истеъмоқ қилинган овқат турига боғлиқми? Қандай касалликларда сийдик муҳити ўзгаради. Сийдик муҳитини аниқлаш учун қандай усуллардан фойдаланилади?

6. Соғлом одам бир суткада неча мл сийдик ажратади (эркаклар, аёллар, болалар)?

7. Сийдикнинг солиштирма оғирлиги (соғлом одамда, болаларда) қандай кўрсаткичларга эга. Қандай ҳолатларда соғлом кўрсаткичлар ўзгаради? Сийдикнинг солиштирма оғирлигини қандай усуллар билан аниқлаш мумкин?

8. Сийдик таркибига қандай минераллар киради, улар қандай ҳолатда бўлади?

9. Организмда хлориднинг ушланиб қолиш сабаблари қандай? Хлоридларни аниқлаш усулининг асоси нимада?

10. Қандай ҳолатларда сийдикда фосфат ажралиши (бузилиши) ўзгаради? Фосфатлар қандай усул билан аниқланади?

11. Сийдик таркибидаги кальций ва магний ионларини аниқлаш усули қандай? Қайси касалликларда уларнинг ўзгариши кузатилади?

2. СИЙДИК МИНЕРАЛЛАРИНИ АНИҚЛАШ

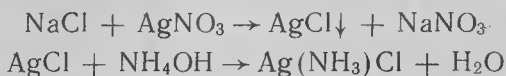
Бир кунлик сийдикда 12—25 г минерал модда бўлади. Улар анионлардан хлорид, сульфат, фосфат (дигидрофосфат, гидрофосфат) карбонат ва катионлардан калий, натрий, кальций ва ҳоказолар ҳолида бўлади. Кальций ва магний тузлари эриган ва эрмаган ҳолда учрайди. Сийдикдаги фосфор биринчи ўринни олган натрий дигидрофосфат, натрий гидрофосфат, кальций дигидрофосфат ҳолида ажратилади.

Болалар сийдигининг минерал таркиби катталарникидан деярли фарқ қилмайди. Айрим касалликларда (ҳарорат кўтарилганда, рақ касаллигида, озиб кетиш —

кахексия) хлоридларнинг организмда ушланиб қолиши ва бошқа ўзгаришлар кузатилади.

127-иш. ХЛОРИДЛАРГА СИФАТ РЕАКЦИЯ

Усулнинг асоси: Азот кислота билан нордонлаштирилган сийдикка кумуш нитрат таъсир эттирилганда ёруғликда қораядиган кумуш хлорид чўкмаси ҳосил бўлади. У аммиакда эриб, комплекс бирикма ҳосил қилади.



Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: 1 % ли кумуш нитрат эритмаси, 10 % ли нитрат кислота эритмаси.

Керакли анжомлар: томизгичлар, пробиркалар.

Бажариладиган иш тартиби: Бир мл сийдикка 2—5 томчи 1 % ли кумуш нитрат эритмаси ва 2 томчи 10 % ли азот кислота солинади. Оқ ипир-ипир чўкма ҳосил бўлади.

128-иш. СИЙДИКДАГИ СУЛЬФАТ ИОНЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Сийдик сульфатларини аниқлаш учун сийдикка озгина водород хлорид кислота солиб нордонлаштирилади ва унга барий хлорид эритмаси солинади. Кислота ва ишқорда эрмайдиган барий сульфат чўкмаси ҳосил бўлади.



Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: 10 % ли хлорид кислота эритмаси, 5 % ли барий хлорид эритмаси.

Керакли анжомлар: коғоз филтрлар, сув ҳаммоми, колбачалар.

Бажариладиган иш тартиби: 20 томчи сийдикка 5 томчи 10 % ли хлорид кислота эритмаси ва барий хлориднинг 5 % ли эритмаси томизилади. У тўлик чўкмага тушгач барий сульфат филтр коғоздан ўтказилади.

129-иш. СИЙДИК ФОСФАТЛАРИГА СИФАТ РЕАКЦИЯ

Усулнинг асоси: Молибден реактивига (ишлатишдан олдин озгина қиздирилган) сийдик қуйилганда сариқ кристалл чўкма — аммонийнинг фосфор молибденли чўкмаси ҳосил бўлади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: аммоний фосфолибден реактиви (7,5 г аммоний молибдат 100 мл сувда эритилиб, 100 мл азот кислотадан (солиштирма оғирлиги (1,2) қўшилади).

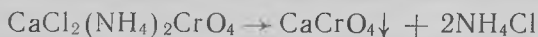
Керакли анжомлар: пробиркалар, томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби: 2—3 томчи молибден реактиви қайнагунча қиздирилади ва унга бир неча томчи сийдик томизилади, сариқ кристалл чўкма ҳосил бўлади.

130- и ш. СИЙДИК ТАРҚИБИДАГИ МАГНИЙ ВА КАЛЬЦИЙНИ СИФАТ РЕАКЦИЯ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: сийдикка аммоний оксалат эритмаси таъсир эттирилганда кальций оксалат чўкмага тушади.

Чўкма филтрланади, филтрат аммиак билан ишқорланганда йирик чўкмаган кристалл пайдо бўлади. Бу аммиак магнийнинг фосфорли бирикмасидир.



Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: 5 % ли аммоний оксалат эритмаси, 10 % ли сирка кислота эритмаси, 10 % ли аммиак эритмаси.

Керакли анжомлар: пробиркалар, томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби: а) 20 томчи (1 мл) сийдикка 1—2 томчи 10 % ли сирка кислота эритмаси ва 2—3 томчи 5 % ли аммоний оксалат эритмаси солинади. Кальций оксалат чўкмаси ҳосил бўлади.

б) эритма филтрланади. Филтратга 4—5 томчи 10 % ли аммиак эритмаси (лакмас бўйича ишқорий муҳит ҳосил бўлгунча) солинади. Бир оздан сўнг аммиак магнийнинг фосфорли кристаллари пайдо бўлади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: жадвалга биноан натижалар расмийлаштирилади:

85- ж а д в а л

Аниқланаётган материаллар	Ишлатиладиган реактивлар	Кузатишган ҳодисалар

3. АЗОТ АЛМАШИНУВИНИНГ ОХИРГИ МАҲСУЛОТЛАРИ

Ичакдан сўрилган аминокислоталар аъзо тўқималарида турли ўзгаришларга учрайди. Уларнинг бир қисми аъзо ва тўқима оксилларини, айрим гормонларни, гем, креатин ва ҳоказоларни синтезлайди ва углерод (II) оксидгача парчалайди.

Аммиакнинг асосий қисми сийдикчилга айланади, у 85—90 % ни ташкил қилади. Шунини айтиш керакки, сийдик таркибидаги азот бирикмаларининг абсолют миқдори ёшга қараб кўтарилади (86-жадвал).

Бундан ташқари аммиак, аммоний тузлари, ҳамда креатин таркибида сийдик кислота индикан ҳолида ва озгина қисми эркин аминокислоталар ҳолида сийдик билан ташқарига чиқарилади. Эркин аминокислоталардан ташқари юқорида айtilган бирикмаларнинг барчаси организмда азот алмашинувининг охириги маҳсулотлари ҳисобланади.

86-жадвал

Турли ёшдаги одамларда азот компонентларининг 1 кунлик миқдори

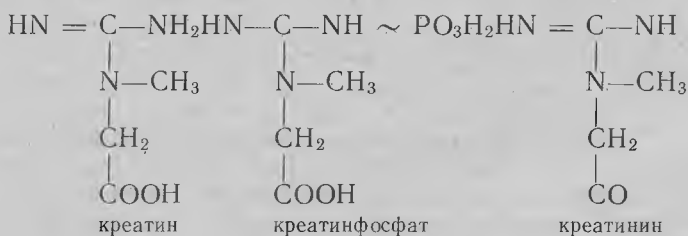
Азот компонентлари	Янги туғилганларда	1 ойлик	1 яшар	4—7 яшар	9—14 яшар	катталарда
Умумий азот	0,3	0,6	0,3	6,0	10,0	10—18
Сийдикчил	излар	1,0	5,0	14,0	20,0	20—35
Сийдик кислота	0,04	0,1	0,2	0,3	0,6	1,0
Аммиак	излар	0,1	0,2	0,6	0,6	1,0
Аминокислота	0,01	0,05	0,06	0,08	0,08	0,1
Креатинин	0,01	0,04	0,08	0,3	0,7	1,5
Креатин	излар	0,01	0,05	0,06	0,2	—

Шифохоналарда азот тутувчи бирикмалар миқдорини сийдикда ўлчаш қатор касалликларни аниқлашда катта ташхисий аҳамиятга эга, айниқса ундан буйрак, жигар қаби аъзолар функциясининг бузилиши билан боғлиқ касалликларни аниқлашда фойдаланилади.

131-и ш. СИЙДИК КРЕАТИНИНИ АНИҚЛАШ

Креатинин креатин фосфатдан ҳосил бўлиб, сийдикнинг доимий таркибини ташкил қилади. Бир суткада катталарда сийдик билан 0,5—2,0 г (4,4—17,6 ммоль/сут),

янги туғилганларда 0,01 г, бир ёшгача бўлган болаларда 0,04—0,08 г, 4—7 ёшларда 0,3 г креатинин ҳосил бўлади 9—14 ёшга келиб бу кўрсаткич катталарникига яқинлашади. Сийдик билан ажраладиган креатинин утумий азот тутувчи бирикмаларнинг 2—7% ини ташкил қилади. Ажраладиган креатинин миқдори организм тўқима оксилларининг нарчаланиш тезлигига ва истеъмол қилинган овқат таркибидаги креатин миқдорига (гўштили маҳсулотларда кўп) боғлиқ.



Ўткир юқумли касалликларда, ҳарорат кўтарилганда, қандли ва қандсиз диабетда сийдикдаги креатинин миқдори ортади. Соғлом одам сийдигида креатинин бўлмайди. Унинг сийдикда пайдо бўлиши тўғри мушаклар фаолияти бузилганини (миостения, мушак дистрофияси) кўрсатади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: 10% ли натрий гидроксид эритмаси, пикрин кислотанинг тўйинган эритмаси, натрий нитропруссид, янги тайёрланган 3% ли эритма, сирка кислотанинг 5% ли эритмаси, креатинин, хлорид кислотанинг 0,1 моль/л доимий стандарт эритмаси.

Керакли анжомлар: штативлар, пробиркалар, ўлчов колбалари, 100 мл ФЭК, қалинлиги 1 см ли кюветалар.

Креатининга сифат реакция.

1. **Вейл реакцияси.** 2 мл сийдикка 2—3 томчи янги тайёрланган натрий нитропруссид эритмаси солинади ва аралашма сариқ ранга киргунча унга 10% ли натрий гидроксид эритмаси томзилади. Эритманинг кислоталилиги сирка кислота қўшиб аниқланганда унинг сариқ ранга ўтиш вақти қисқаради. Шу хоссасига кўра бу реакция ацетонга ўтказиладиган реакциядан фарқ қилади.

2. **Яффе реакцияси.** 2 мл сийдикка бир неча томчи тўйинган пикрин кислотанинг сувли эритмасидан солиб натрий гидроксид билан ишқорланади: кизғиш ранг ҳосил бўлади. Бу пикрат креатиннинг қизил таутомери ҳосил бўлишига асосланган.

132- и ш. СИЙДИК КРЕАТИНИНИ МИҚДОРИНИ ФОЛИН
УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Бу усул пикрин кислота билан ўтказилган Яффе реакциясига асосланган бўлиб, ҳосил бўлган рангнинг оч-тўқлигини ФЭК да (яшил нур фильтрида) колориметрлашдан иборат. Креатинин миқдори ўлчов эгри чизиғидан топилади.

Бажариладиган иш тартиби: ўлчов колбасининг бирига 0,5 мл сийдик, иккинчисига 0,5 мл дистилланган сув солинади (назорат). Иккала колбага 3 мл дан тўйинган пикрин кислота эритмаси солинади. Эритма аралаштирилади ва 0,2 мл 10% ли натрий гидроксид эритмасидан солиб сув билан ҳажми 100 мл га етказилади. Колбадаги эритмалар аралаштирилади, 10 дақиқа хона ҳароратида ушланади. Тажриба қаршисида 1 см қалинликдаги кюветаларда, яшил нур фильтрида (540 нм тўлқин узунлигидаги), ФЭК да қўрилади.

Текширув эритмасининг оптик зичлигини билган ҳолда ўлчов эгри чизиғидан креатининнинг миқдори топилади ва бир кунлик сийдик билан ажралган креатинин ҳисобланади.

Ўлчов эгри чизиғини тузиш. Креатининнинг доимий стандарт (1,13 г/л) эритмасидан жадвалга биноан суюқликлар тайёрланади.

87- жадвал

Пробиркалар	Доимий эритма ҳажми, мл	Креатинин миқдори		Оптик зичлик
		мл	ммоль	
1	0,1	0,113	0,001	
2	0,2	0,226	0,002	
3	0,3	0,339	0,003	
4	0,4	0,452	0,004	
5	0,5	0,565	0,005	

Абсцисса ўқига текширувдаги креатинин миқдори (м/ммоль), ордината ўқига оптик зичлик кўрсаткичлари ёзилади.

Бир суткада сийдик билан ажралган креатинин миқдори қуйидаги тенгламага асосан ҳисобланади:

$$x = \frac{y_{\text{сут}}}{y}$$

Бунда, х — сийдик билан ўтказилган тажриба креатинининг миқдори, ўлчов эгри чизигидан топилган, м/ммоль;

У — текшириш учун олинган сийдик миқдори;

У_{сут} — бир кунлик сийдик миқдори, мл.

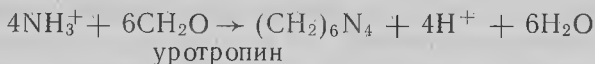
Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, ўлчов эгри чизигини ва топилган креатинин миқдорини дафтарингизга ёзиб нормал кўрсаткич билан солиштиринг, хулосангизни чиқаринг.

133- и ш. МАЛЬФАТТИ УСУЛИ БИЛАН СИЙДИҚ ТАРҚИБИДАГИ АММИАҚ МИҚДОРINI АНИҚЛАШ

Соғлом одамнинг бир кеча-кундузлик сийдиги 0,6—1,3 г аммиак бўлади, аммо айрим касалликларда, масалан қандли диабетда, аммоний тузларининг сийдикдаги миқдори кескин ортади.

Усулнинг асоси: Аммоний тузига формалин таъсир эттирилганда уротропин ва хлорид кислота ҳосил бўлади, унинг миқдори эритмадаги аммоний тузи миқдорига эквивалентдир.

Усулнинг кимёвий тенгламаси:



Ҳосил бўлган хлорид кислота 0,1 ммоль/л натрий гидроксид эритмаси билан титрланади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: Сийдик, формалин (бир қисм формалин, икки қисм сув), 0,1 ммоль/л натрий гидроксид эритмаси (фенолфталеин иштирокида оч пушти ранггача нейтралланган), фенолфталеиннинг 1% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: 100 мл ли қолбалар, бюреткалар, 10 мл ли пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Қолбага 10 мл сийдик, 50 мл дистилланган сув, 2 томчи фенолфталеин солинади. Эритма аралаштирилади. Қолба тагига оқ қоғоз қўйиб, бюреткадаги 0,1 ммоль/л натрий гидроксид эритмасидан оч пушти ранг ҳосил бўлгунча солинади. Сийдикдаги кислотали маҳсулотлар нейтралланади.

2. Қолбага 5 мл формол солиб аралаштирилади. Тузларнинг парчаланиши ва кислота ҳосил бўлиши оч пушти ранг йўқолишига сабаб бўлади. 5 дақиқа ўтгач аралашма 0,1 ммоль/л натрий гидроксид эритмаси билан оч пушти ранг ҳосил бўлгунча титрланади. Ранг 30 секундда йўқолади.

Бир суткада сийдик билан ажралган аммиак миқдори куйидаги формулага биноан ҳисобланади.

$$x = y \cdot 0,0017 \cdot 150$$

Бунда, x — бир кунлик сийдик билан ажралган аммиак миқдори, g ҳисобида.

y — титрлаш учун кетган $0,1$ ммоль/л натрий гидроксид эритмаси, мл.

1500 — бир кунлик сийдик ҳисобига ўтказиш сони, аниқлаш учун сийдик 10 мл ҳисобида олинади.

Олинган натижаларни расмийлаштиринг, усулнинг асосини, ҳисоблаш усули ва натижасини дафтарингизга ёзинг ва хулоса чиқаринг.

134-и ш. СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ УМУМИЙ АЗОТ МИҚДОРINI КОЛОРИМЕТРИК УСУЛ БИЛАН АНИҚЛАШ

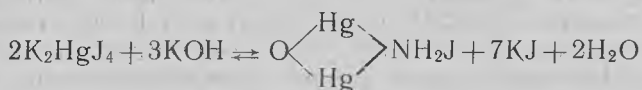
Сийдик таркибидаги умумий азот миқдорини аниқлаш ҳам назарий, ҳам амалий жиҳатдан катта аҳамиятга эга. Умумий азотни аниқлаш билан организмдаги оксил алмашинуви тезлигини ва парчаланган оксил миқдорини билиш мумкин. Бунинг учун топилган умумий азот коэффиценти $6,25$ га кўпайтирилади (оксил таркибидаги барча элементларни 100% деб олсак, шундан азот миқдори 16% ни ташкил қилади. Шу умумий элементлар таркибининг азотга бўлган нисбати $100:16=6,25$ азот коэффицентиدير).

Буйрак касалликларида буйракнинг ажратувчилик фаолияти бузилишидан сийдик таркибидаги умумий азот миқдори камаяди. Организмда азотнинг ушланиб қолиши жигар, қон-томир системаси касалликларида кузатилади ва у шиш ҳамда экссудат, трансудатлар борлиги билан боғлиқ бўлади.

Сийдикда умумий азот миқдори кўпайиши, оксиллар парчаланишининг кучайганлиги (манфий азот баланси), диабет, экссудат ва трансудатларнинг сўрилишида, фосфор билан сурункали захарланганда кўрилади. Умумий азот кўрсаткичларининг ўзгарганлигига қараб алоҳида азот тутувчи моддалар; сийдикчил (мочевина), креатинин, сийдик кислотани аниқлаш мумкин.

Усулнинг асоси: сийдик таркибидаги органик бирикмалар концентрланган сульфат кислота билан қиздирилганда (минералланганда) барча фракцияларнинг аммиак ҳолатидаги азоти сульфат кислота билан боғланиб, аммоний сульфатни ҳосил қилади. Аммоний сульфат ишқорий

мухитда (рН и 12) Несслер реактиви билан сариқ-қизғиш рангли бирикма ҳосил қилади. Бу рангли бирикма колориметрланади. Рангининг оч-тўқлиги аммиак миқдори-га ва сийдик азотига тўғри пропорционал. Ушбу реакция тенгламаси қуйидагича:



Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота, Несслер реактиви (тайёр), аммоний сульфатнинг доимий (стандарт) эритмаси, натрий гидроксиднинг 50% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: қиздириш учун иссиқликка чидамли колба, ФЭЖ.

Бажариладиган иш тартиби. 1. **Қиздириш:** 10 марта суюлтирилган сийдикнинг 1 мл си Несслер колбасига қуйилади. Назорат тажриба учун 1 мл сув олинади. Йккала колбага 1 мл дан концентрланган сульфат кислота, 1—2 томчи пергидроль (H_2O_2) солиб, оқ минерализат ҳосил бўлгунча қиздирилади. (Колба тубида оқ парда ҳосил бўлади). Минерализат совитилгач, устига лакмус бўйича нейтрал мухит ҳосил бўлгунча 6 томчи 50% ли натрий гидроксид эритмаси солинади. (Эритма шиша тайёкча билан аралаштирилади). Минерализат ўлчов цилиндрига ўтказилади, колба 2 марта 3 мл дистилланган сув билан чайилади, минерализат ҳажми дистилланган сув билан 10 мл га етказилади. 100 марта суюлтирилган сийдик минерализати олинади. Эритмаларнинг кетма-кет қуйилишига қатъий риоя қилинади. Эритма доимо шиша тайёкча билан аралаштириб турилиши шарт.

2. **Фотометрлаш.** 0,5 мл минерализатга 6,5 мл сув солиб аралаштирилади ва унга 0,5 мл Несслер реактиви қуйилади; сариқ-қизғиш ранг ҳосил бўлади. Назорат колбага 7 мл сув, 0,5 мл Несслер реактиви солиб аралаштирилади. Фотометрлаш кўк нур фильтрида назорат эритма қаршисида 3 мм ли кюветада ўтказилади.

Ўлчов эгри чизигидан азот миқдори топилиб қуйидаги тенглама асосида ҳисобланади:

$$\frac{CxVx \text{ бир кунлик сийдик}}{0,5 \times 1000}$$

Бир кунлик сийдикдаги умумий азот миқдори, г/сут.

С — ўлчов эгри чизигидан топилган азот миқдори.

В — 100 марта суюлтирилган сийдик.

0,5 — аниқлаш учун олинган минерализат миқдори.

1000 — мг ни г га айлантириш коэффициенти, СИ бирлигига ўтказиш коэффициенти (ммоль/сут) 71,39 га тенг.

Ўлчов эгри чизигини тайёрлаш. Асосий доимий (1 мл да 0,2 мг азот тутувчи) эритмадан қатор ишчи эритмалар тайёрланади: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 мг азот 1 мл эритмада. Ҳар қайси ишчи эритмадан 0,5 мл олиб, унга 6,5 мл сув ва 0,5 мл Несслер реактиви солинади ва фотометрланади. Ҳар қайси эритма учун оптик зичлик кўрсаткичлари топилади. Ордината ўқига оптик зичлик кўрсаткичлари, абсцисса ўқига 0,025; 0,05; 0,75; 0,10 мг 0,5 мл ҳажмдаги азот миқдори ёзилади. Олинган натижаларни расмийлаштиринг. Усул асосини, ўлчов эгри чизигини ва натижаларни дафтарингизга ёзинг.

135- и ш. СИЙДИК ТАРҚИБИДАГИ УМУМИЙ АЗОТНИ ҚОНВЕЙ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Сийдик қиздирилиши натижасида ҳосил бўлган аммоний сульфат кучли ишқор билан сиқиб чиқарилади ва титрланган сульфат кислота эритмаси ёрдамида ютилади. Ушбу кислота ишқор билан титрланиб (нейтралланиб), ундаги аммиак миқдори ҳисоблаб топилади.

Аммоний тузларини парчалаш мақсадида ўтказиладиган изотермик ҳайдаш ва аммиакни юттириш учун махсус асбоблар, Қонвей идишлари ишлатилади. Шакли жиҳатидан Қонвей идиши паст деворли кристаллизаторни эслатади. Унинг марказий қисмига цилиндр ўрнатилган, идиш шиша қопқоқ билан мустаҳкам беркитилади. У ташқи камерага яхшилаб шлифланган бўлиши керак. Идиш қопқоқ билан мустаҳкам шлиф ҳосил қилиши учун ланолин ёки мум аралашмаси билан мойланади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: концентрланган сульфат кислота 0,01 н, сульфат кислота эритмаси 0,01 н, натрий гидроксид эритмаси, 30% ли натрий гидроксид эритмаси, Таширо индикатори, мой.

Керакли анжомлар: Қонвей идишлари, микробюреткалар, 15 мл ли ўлчов цилиндри, скальпель, 2 мл ли пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Сийдик ва унинг таркибидаги органик моддаларни қуйдириш (минераллаш).

2. Аммонийни ҳайдаш. Аввало Қонвей косачасининг ёпиладиган қисми мойланади. Қонвей камерасига 2 мл

0,01 н сульфат кислота эритмаси ва 2 томчи Таширо индикатори солинади. Кислотали муҳит (рН и 4,4) да эритма ранги бинафша, ишқорий муҳит (рН и 6,2) да эса яшил тусли бўлади.

Қонвей идишининг ташқи қисмига 1,5 мл минерализат солинади ва қопқоқ билан беркитилади. Қопқоқ тиркишидан 1,5 мл 30% ли натрий гидроксид эритмаси солинади-да тиркиш тезда қопқоқ билан беркитилади ва унинг мустаҳкам беркитилганига ишонч ҳосил қилинган ташқи камерадаги эритмалар (идишни айлана бўйлаб ҳаракатлантириш йўли билан) аралаштирилади. Шу билан бир қаторда назорат тажрибаси ўтказилади. Минерализат ўрнига сув олинади. Қонвей идиши 37°С ли термостатга 2 соатга қўйилади ёки хона ҳароратида 24 соат қолдирилади.

Эритмалар 0,01 н. натрий гидроксид билан титрланади. Текширув ва назорат тажрибалари учун кетган ишқор микдорининг айирмасига кўра сийдикдаги аммиак микдори ҳисобланади.

1 мл 0,01 н. сульфат кислота эритмаси 0,14 мг азотни бириктириши ҳисобга олинади ва қуйидаги тенгламага биноан ҳисобланади.

Бир кунлик сийдикнинг умумий
$$\frac{(A-B) \times 0,14 \times 100 \times D}{1,5 \pm 1000}$$
 азоти г/сут ёки ммоль/сут.

A — назорат тажрибасини титрлаш учун кетган 0,01 н. ишқор эритмасининг микдори, мл.

B — текширув тажрибасини титрлаш учун кетган 0,01 н. ишқор эритмасининг микдори, мл.

D — сийдикнинг бир кунлик микдори, мл (суткалик диурез).

100 — суюлтирилган сийдик минерализати.

1,5 — тажриба учун олинган минерализат микдори, мл.

A — B — аммиак билан боғланган 0,01 н. сульфат кислота микдори.

Олинган натижаларни расмийлаштиринг. Усул асосини, ҳисоб тенгласини ва натижани дафтарингизга ёзинг.

136-н ш. СИЙДИК ТАРҚИБИДАГИ СИЙДИКЧИЛНИ (МОЧЕВИНА) АНИҚЛАШ

Бир суткада соғлом одам сийдиги билан 20—35 г ёки 333—583 ммоль/л сийдикчил ажратади. Сийдикчил жигарда аммиакни захарсизлантирилишидан ҳосил бўлган маҳсулот ҳисобланади. Нефрит, ацидоз, паренхиматоз сарикликда, жигар циррозида, уремияда сийдикчил микдори камаяди. Овқат таркибида оксил етишмаганда, хавфли анемияда, ҳарорат кўтарилганда организмда

оксилларнинг парчаланиши камайиши натижасида, салицилатлар итеъмоқ қилинганда ва фосфат билан захарланганда сийдикчил миқдори ортади.

Усулнинг асоси: Аминогуруҳ тутувчи сийдикчил парадиметиламинобензальдегид билан кислотали муҳитда сарик рангли комплекс бирикма ҳосил қилади. Рангнинг оч-тўқлиги аниқланаётган эритма таркибидаги сийдикчил миқдорига тўғри пропорционал бўлиб, у фотометрлаш билан ўлчанади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: Парадиметиламинобензальдегиднинг 2% ли эритмаси (50 мл сувга 4 парадиметиламинобензальдегид қўшилади ва эригунча 150 мл концентрланган сирка кислотадан умумий ҳажми 200 мл га егунча қуйилади, қора идишда сақланади), 2,5% ли сийдикчил (кайтадан кристалланган)нинг доимий эритмаси (2,5 г си 100 мл сувда эритилади).

Керакли анжомлар: ФЭҚ, 3 мм ли кюветалар, қуруқ пробиркалар, микропипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: пипетка ва пробиркалар албатта қуруқ бўлиши керак. Пробиркага солинган 0,2 мл сийдикка 1,2 мл 2% ли парадиметиламинобензальдегид эритмаси қуйилади ва яхшилаб аралаштирилади. 15 дақиқа ўтгач пробиркадаги эритма колориметрланади. Оптик сизим кўк нур фильтрида сув қаршисида ўлчанади (текшириш учун Е-0,08 тенг эканлиги ҳисобланади). ФЭҚ нинг ўнг барабанидаги бўялган эритма турғун. Ҳисоблашда ўлчов эгри чизигидан фойдаланилади. Сийдикчил г/сут бирлигида ҳисобланади. СИ системаси бирлигига ўтказиш учун (ммоль/сут) 16,65 коэффициентидан фойдаланилади. Ўлчов эгри чизигини тайёрлашда 100 мл да 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; г сийдикчил бўлган эритмаларнинг ҳар қайсисидан 0,2 мл олинади. Қолган иш тартиби сийдикчил билан ўтказилгандек бўлади.

137-и ш. СИЙДИК ВА ҚОН ЗАРДОБИ ТАРКИБИДАГИ СИЙДИКЧИЛНИ БИО-ТЕСТ ЁРДАМИДА АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: сийдикчил тиосемикарбозид ва Fe^{3+} ионлари иштирокида кучли кислотали муҳитда диацетилмиооксил билан қизил бирикма ҳосил қилади. Рангли эритманинг оптик зичлиги ФЭҚ да ўлчанади.

Текширилувчи материал: сийдик ва қон зардоби.

Реактивлар: реактив (заҳарли тиосемикарбозид тутади) 4-эталон эритма (мочевина 16,65 ммоль/сут) 5

Керакли анжомлар: 0,01 мл ли микропипетка, бир дона

Ишчи эритмаларни тайёрлаш: 30 мл дистилланган сув солинган 50 мл ли қолбага тиосемикарбозид солинади ва

колба аста-секин ўртача ҳароратда қиздирилади. Тиосемикарбозид эригач, эритма совитилади ва унинг ҳажми сув билан ўлчов чизигига етказилади. Оз миқдордаги чўкма аниқлашга ҳалакит бермайди. Ушбу эритма хона ҳароратида бир неча ҳафта сақланиши мумкин.

Реактивлар куруқ, ҳарорати 0, +5°C гача бўлган тоза жойда сақланади.

Сульфат кислота эритмаси. 250 мл ли ўлчов колбасига 150 мл сув солинади ва унинг 25 мл сига 96% ли сульфат кислотадан аста-секин колба девори бўйлаб кўшилади (эритма қизиб кетмаслиги керак.). Унинг миқдори сув билан 250 мл га етказилади. Эритма узоқ муддат сақлана олади.

Ишчи эритма бир қисм реактив билан бир қисм сульфат кислота эритмасини аралаштириш йўли билан тайёрланади. Ишчи эритма янги тайёрланиши керак.

Бажариладиган иш тартиби: Пробиркага 0,01 мл аниқланувчи эритма (қон зардоби ёки суюлтирилган сийдик) солинади. Унга 2,0 мл ишчи эритмаси солиб аралаштирилади. Пробирка алюмин қоғоздан тайёрланган копкақ билан беркитилади ва роса 10 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилади. Шундан сўнг 2—3 дақиқа давомида оқиб турган сув тагида совитилади. Ҳосил бўлган ранг солиштирувчи эритма қаршисида колориметрланади. Солиштира эритма аниқланувчи эритма ўрнига 2,0 мл ишчи реактив ишлатиб юқоридагидек аниқланади. Эритма совитилгач, 15 дақиқа орасида оптик зичлик 1 см қалинликдаги кюветада (490—540 нм тўлқин узунликда) ўлчанади. Шу қаторда иккита параллел пробиркаларда сийдикчилнинг 0,01 мл эталон эритмаси ва 2,0 мл ишчи реактив билан текшириш ўтказилади. Қон зардоби таркибидаги сийдикчил 23,3 ммоль/л дан ошса қон зардоби дистилланган сув билан суюлтирилади ва натижа 2 га кўпайтирилади. Оксиллар 5% ли учхлорсирка кислотанинг 1:10 (0,1 мл қон зардоби 1 мл УХСК) нисба-тида чўктирилади. Анализ учун 0,1 мл сийдикчилнинг эталон эритмаси бир хилда суюлтирилган ҳолда олинади.

Сийдикчилни аниқлаш учун сийдик 1:50 ёки 1:100 нисбатда суюлтирилган бўлиши керак. Олинган натижа суюлтирилган (коэффициентига) сийдик сонига кўпайтирилиши керак.

Иш тартиби схемаси

Текширилувчи матери- ал	Аниқланувчи эритма	Эталон	Солиштирув- чи эритма
Суюлтирилган қон зардоби			
Сийдик, мл	0,01	—	—
Ишчи эритма, мл	2,0	2,0	2,0
Эталон эритма, мл	—	0,01	—
Дистилланган сув, мл	—	—	0,1

Роса 10 дақиқа қайнаб турган сув ҳаммомида қиздирилади, совитилади, 15 дақиқа орасида аниқланувчи ва эталон эритмалар зичлиги солиштирувчи эритма каршисида 1 см ли кюветада 525 нм да ўлчанади.

Натижаларни ҳисоблаш ва ифодалаш. (А) ва (Б) эталонлар учун олинган оптик зичлик катталикларига биноан сийдикчил миқдори (х) ммоль/л да топилади.

$$X = \frac{A}{B} \times 16,65$$

ммоль/л = 0,1665 мг/100 мл, мг/100 мл — 6,006 ммоль/л. Аниқланувчи эритма суюлтирилган тақдирда шу сонга кўпайтирилади. Сийдикчилни сийдикчил азотига ўтказиш учун 0,466 га кўпайтириш керак.

Усулнинг қўлланилиши 4—5% ни ташкил қилади.

Ўртача катталиклар

Қон зардоби (2,50 — 8,32) ммоль/л

Сийдик (333—583) ммоль/24 соат

Оксиди кўп овқат истеъмол килинганда сийдикчил юқори кўрсаткичга етади.

Керакли анжомлар: 490—540 нм ли спектрофотометр ёки фотометр (2 см қалинликдаги 2—3 мл ли кюветалар билан биргаликда).

Изох: юқорида келтирилган усулда ўлчовли эритмаларнинг миқдорини ошириш ёки камайтириш мумкин. Айни эталон эритмасини 1:1 суюлтириш билан 0,5 г/л гача етказиш мумкин. Бу ҳолда суюлтирилган сийдикчил (эталон эритмаси) қон зардобининг юқори чегарадаги кўрсаткичининг оптик зичлигига тўғри келади. Демак, формуладаги 16,65 ни 8,33 га алмаштириш лозим.

Сийдикчилни аниқлаш реактивдан фойдаланишда захарли моддалар билан ишлаш қондасига риоя қилиш керак, чунки таблеткада захарли тиосемикарбозид бор.

Захарланиш содир бўлганда кўрсатиладиган биринчи ёрдам. Организмга тушган дорини чиқариш учун 0,5 л сув ичиб, томокни қитқлаш билан қайт қилиш лозим. Олинган натижаларни расмийлаштиринг. Усул асосини, олинган натижани ва унинг амалий аҳамиятини дафтарингизга ёзинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Сийдик таркибига қандай органик моддалар кирази?
2. Оксил бўлмаган азот бирикмаларига кирувчи моддаларни айтинг.
3. Турли ёшда сийдикдаги азот бирикмалари қандай ўзгаради?
4. Креатин ва креатининлар қандай бирикма? Сийдикдаги креатинини аниқлашнинг аҳамияти. Қандай ҳолатларда сийдикдаги креатинин миқдори ортади ва қачон камаяди? Буни аниқлаш учун қандай усуллардан фойдаланилади?
5. Сийдикдаги аммонийни аниқлаш қандай аҳамиятга эга ва бу қайси усул билан аниқланади?
6. Сийдикдаги умумий азот миқдори қандай усуллар билан аниқланади? Аниқлаш усуллари нимага асосланган? Қандай ҳолатлар сийдикда умумий азот миқдори кўпайишига сабаб бўлади?
7. Соғлом одамдаги сийдикчил кўрсаткичлари қандай? Қандай касаллик ҳолатларида уларнинг миқдори ўзгаради? Буни аниқлаш учун қандай усуллар қўлланилади?

СИЙДИКНИНГ ПАТОЛОГИК КОМПОНЕНТЛАРИНИ АНИҚЛАШ

Ҳар бир касалликни аниқлашда сийдикни текшириш катта ташхисий аҳамиятга эга.

Одатда соғлом одам сийдиги таркибида оксил, шакар, кетон таналари, ўт, қон бўлмайди. Бундай ҳолат бирор аъзонинг функционал ҳолати ва моддалар алмашинуви бузилиши натижасида пайдо бўлади. Шу сабабли касалликни аниқлаш ва дори-дармонлар таъсирини текшириш мақсадида сийдик текширилади.

138-и ш. ОКСИЛГА ЎТКАЗИЛАДИГАН СИФАТ РЕАКЦИЯ

Нормал сийдик таркибида оксил излари бўлиши мумкин. Аммо улар одатдаги реакциялар билан очилмайди. Нефритда — буйрак яллиғланганда, яъни уларнинг ўтказувчанлиги ортганда, юрак декомпенсациясида, артериал босим кўтарилишининг айрим турларида, гоҳо ҳомиладорликда сийдикда оксил пайдо бўлади.

Айрим касалликларда бир кунлик сийдикда сезиларли даражада оксил ажралади. Сийдикда оксилнинг пайдо бўлиши протеинурия, альбуминурия (чунки сийдикда пайдо бўлган оксилларнинг кўп қисмини қон зардобдаги

альбуминлар ва оз миқдорини глобулинлар ташкил қилади) дейилади. Чин ва сохта протеинурия тафовут қилинади. Чин ёки сохта протеинурияда оксил сийдикка буйраклар орқали ўтади.

Сохта ёки тасодифий протеинурия сийдикдаги шиллик, кон, йирингларни буйракдан ташқаридаги сийдик ўтказувчи йўллар орқали ўтганлигини кўрсатади. Сийдикдаги оксилни очиш учун азот ва сульфасалицин кислоталар ёрдамидаги чўктириш реакциясидан фойдаланилади. Сульфасалицин кислота жуда сезгир.

Текширилувчи материал: Ўртача ва оксил тутувчи сийдик.

Реактивлар: сульфасалицил кислотанинг 20% ли эритмаси, азот кислотанинг 50% ли эритмаси ёки Ларионова реактиви.

Керакли анжомлар: Пробиркалар, штативлар.

Бажариладиган иш тартиби: а) 25 г натрий хлорид 100 мл иситилган дистилланган сувда эритилади ва унинг 99 мл сига 1 мл концентрланган азот кислота қўшилади.

б) тажриба: сульфасалицил реакциясини бажариш учун пробиркага оксил тутувчи сийдикдан 3 томчи, 20% ли сульфасалицил кислотадан 5 томчи солинади (янги тайёрлангани). Сийдикда оқ чўкма ҳосил бўлиши оксил миқдорига боғлиқ бўлади.

в) Геллер реакцияси. 1 мл азот кислота солинган пробиркага 45°C ли бурчакка оғдирилган ҳолда девори бўйлаб аста-секин сийдик солинади. Иккита эритма орасида оқ ҳалқа пайдо бўлади.

Ҳалқа қалинлиги оксил миқдорига боғлиқ.

139- и ш. ОКСИЛ МИҚДОРНИ БРАНДБЕРГ — РОБЕРТС — СТОЛЬНИКОВ УСУЛИ БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Азот кислотага сийдик солинганда 2—3 дақиқа ичида икки эритма орасида ингичка оқ ҳалқа ҳосил бўлади. Бу тахминан 0,033 г/л оксил тутганлигини кўрсатади. Оксилнинг шу миқдорини топиш учун сийдик бир неча марта суюлтирилади: 2, 4, 8, 10, 20 ва ҳоказо.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: Азот кислотанинг 50% ли эритмаси ёки Ларионова реактиви, сульфасалицил кислотанинг 3% ли эритмаси, натрий хлориднинг 0,9% ли эритмаси, альбуминнинг 1% ли доимий-стандарт эритмаси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, пипеткалар, ФЭҚ, 0,5 см қалинликдаги кюветалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Суюлтирилган сийдик солинган қатор пробиркалар тайёрланади. Бунинг учун 5 та пробирка номерланади. Ҳар қайсисига 2 мл дистилланган сув солинади. Биринчи пробиркага 2 мл сийдик солиб аралаштрилади. Ундан 2 мл олиб иккинчи пробиркага, иккинчи пробиркадан 2 мл олиб учинчисига солинади ва шу тартибда давом эттирилади. Охирги пробиркадан 2 мл олиб ташланади. Шундай қилиб, сийдикнинг 2, 4, 8, 16 ва 32 марта суюлтирилган эритмалари тайёрланади.

2. Алоҳида рақамланган 5 та пробирканинг ҳар қайсисига 1 мл 50% ли азот кислота эритмаси ёки Ларионова эритмасидан солинади. Сўнгра 45° бурчакда ушланган пробиркаларга секинлик билан девор бўйлаб юқоридаги суюлтирилган сийдикдан солинади, яъни қаватланади. Ҳар қайси пробиркага икки ва уч дақиқа орасида оқ ҳалқа ҳосил бўлиши кузатилади.

3. Оксил миқдорини аниқлаш учун 2—3 дақиқа орасида ҳосил бўлган ҳалқа 0,003 г/л оксил тутганлигидан ушбу сийдик миқдори суюлтирилиш сонига кўпайтирилади.

Масалан, 8 марта суюлтирилган сийдик 2—3 дақиқа орасида ингичка оқ ҳалқа ҳосил қилади. Демак, сийдик таркибида 0,003 г/л 8-0,264 л оксил бор экан.

140- и ш. ОКСИЛ МИҚДОРИНИ СУЛЬФАСАЛИЦИЛ КИСЛОГА БИЛАН АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Оксил сульфасалицил кислота билан таъсирланганда лойқаланади, лойқаланиш даражаси оксил миқдорига пропорционал бўлади.

Бажариладиган иш тартиби: 1. Пробиркага 1,25 мл филтрланган сийдик ва унга 5 мл 3% ли сульфасалицил кислота эритмаси солиб аралаштрилади, 5 дақиқа ўтгач кўк нур филтрли (490 нм тўлқин узунлигида) ФЭҚ ва назорат эритмаси қаршисида колориметрланади.

2. Назорат эритма куйидагича тайёрланади: 1,25 мл филтрланган сийдикка 5 мл натрий хлорид эритмаси солинади. Ўлчов эгри чизигидан текширув тажрибасидаги оксил миқдори топилади, сўнгра г/л бирлигида ифодаланади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш: Усулнинг асосини, топилган оксил миқдорини ва қайси касалликларда протеинурия кузатилишини дафтарингизга ёзинг. Хулоса чиқаринг

Соғлом одам сийдигида 0,2—0,4 г/л глюкоза бўлади. Аммо бунини одатдаги реакциялар билан аниқлаб бўлмайди.

Турли сабабларга кўра қон таркибидаги қанд микдорининг кўпайиши — гиперглюкозамия сийдикда қанд микдори кўпайишига олиб келади. Қарбонсувга бой бўлган озик-овқат маҳсулотлари истеъмол қилинганда қон таркибидаги қанд микдори кескин кўтарилади — бу алиментар физиологик гиперглюкоземияда сийдик билан қанд ҳам ажралади. Бу физиологик алиментар глюкозурия дейилади. Бундай ҳолат вақтинча юз беради. Аммо сийдикда қанд микдорининг кўпайиши доимий ҳолатга ўтиши мумкин, бу қандли диабет касалигида кузатилади. Оғир кечадиган қандли диабет касалигида сийдикдаги қанд микдори 80—100 г/л га етиши мумкин. Шунингдек, глюкозурия углерод (II) оксид етишмаганда, эфир, хлороформ ва бошқа моддалар билан заҳарланганда, буйракларнинг ўтказувчанлик фаолияти бузилганда содир бўлади.

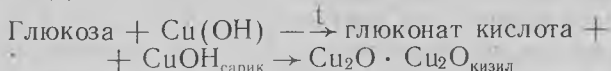
Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: Гайнес реактиви. «Глюкотест» — реактив йиғиндиси.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар, бюреткалар, ўлчовли пипеткалар.

1. МИС ТУЗЛАРИНИНГ ҚАЙТАРИЛИШИГА АСОСЛАНГАН СИФАТ РЕАКЦИЯ (ГАЙНЕС РЕАКЦИЯСИ)

Усул глюкозани ишқорий шароитда қиздирилганда мис (II) гидроксидни сарик мис (I) гидроксидгача ва қизил мис (I) оксидгача қайтариш хоссасига асосланган.



Гайнес реактивига қўшилган глицериннинг гидроксид гурухлари мис (II) гидроксидни боғлаб олади.

Баждариладиган иш тартиби: пробиркага 3 мл Гайнес реактиви солиб, устига 10—12 томчи сийдик томизилади ва аралаштирилади. Пробиркадаги суюқликнинг юқори қисми газ горелкаси алангасида қайнагунча қиздирилади. Сийдик таркибида глюкоза бўлганда эритманинг оч ҳаво ранги сарик рангга ўтади. Суюқликнинг пастки қиздирилмаган қисми юқориги қиздирилган — бўялган қисми билан солиштирилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга усулнинг асосини, кузатилган ўзгаришларни ёзинг.

2. СИЙДИКДАГИ ҚАНДНИ «ГЛЮКОТЕСТ» ИНДИКАТОРИ ЁРДАМИДА АНИҚЛАШ

Усулнинг асоси: Усул глюкозани глюкооксидаза ферменти таъсирида хусусий оксидланишига асосланган. Реакция маҳсулоти бўлмиш водород пероксид (H_2O_2) иккинчи фермент пероксидаза таъсирида сув ва кислородга парчаланади. Кислород ўз навбатида эритмадаги бўёқни оксидлайди. Ўзгарган ранг тайёр рангли шкала билан солиштирилади. Ушбу усул ёрдамида сийдикда глюкоза бор-йўқлигини ва бўлган тақдирда унинг нисбий миқдорини 1—20 г/л гача ўлчаш мумкин бўлади.

Бажариладиган иш тартиби: «Глюкотест» қоғоз бўлмачаларни сийдик солинган пробиркаларга туширилади (қоғознинг бўялган ҳамма қисми сийдикка туширилиши керак) ва қоғознинг ҳўлланган томони билан пластмасса пластинкага қўйилиб, шу ҳолатда 2 дақиқа тугилади.

Пластмасса пластинкасидаги қоғоз бўлакчалар «Глюкотест» даги тайёр рангли шкала билан солиштирилади. Сийдикдаги глюкоза шкаладаги муайян рангга мос келган рангга нисбатан аниқланади. Рангли шкалада берилган ранг сийдикдаги глюкоза миқдорига тўғри келади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини ва олинган натижаларни дафтарингизга ёзинг.

142- и ш. СИЙДИКДАГИ ГЛЮКОЗА МИҚДОРINI ПОЛЯРИМЕТРИҚ УСУЛ БИЛАН ЎЛЧАШ

Усулнинг асоси: Усул глюкозани кутбланган нур текислигини ўнгга буриш хусусиятидан фойдаланишга асосланган. Буриш бурчагини аниқлаш орқали сийдикдаги глюкоза миқдори ўлчанади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: 1% ли сирка кислота эритмаси, кўк лакмус.

Керакли анжомлар: Поляриметр, воронкалар, қоғоз филтрлар.

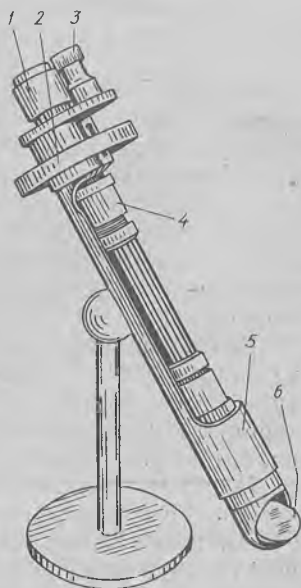
Бажариладиган иш тартиби: сийдик таркибидаги глюкозани аниқлаш учун махсус поляриметр — сахариметрлар мавжуд. Бу асбобга глюкозанинг миқдорини ўлчаш учун ўлчов «шкала» ўрнатилган. Ўрнатилган натрийли ёки шиша лампа монохром нур тарқатувчи, яъни нур билан таъминловчи восита сифатида ишлатилади. Нур махсус мослама — поляризаторда кутбланади ва сийдик солинган найчадан ўтиб, анализаторга тушади.

1. Сийдик таркибидаги глюкозани аниқлашдан олдин асбоб шкаласи нолга ўрнатилади. Бунинг учун махсус



24-расм. Поляриметр.

1-кўзгу; 2-анализатор; 3-шкала нониус билан;
4-труба; 5-поляризатор; 6-ойна.



25-расм. Поляриметр трубкаси.

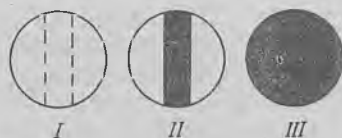
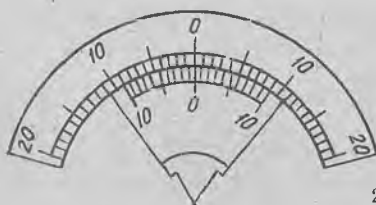
найчага дистилланган сув солинади ва асбобга ўрнатилади. Асбоб окуляри майдонни иккига ажратувчи чизик яхши кўринадиган қилиб жойлаштирилади, майдон эса бир хил ёруғлик билан таъминланган бўлиши керак.

2. Сийдик тиниқ бўлиши, унда оксиллар бўлмаслиги, кислотали муҳитга эга бўлиши керак. Бунинг учун сийдикка 1% ли сирка кислота эритмасидан лакмус қоғозига қараб кўшилади, сўнгра қайнатилади, совитилади ва филтрланади.

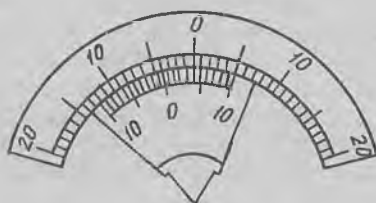
3. Поляриметр найчаси сийдик билан тўлдирилади, унинг икки томони яхшилаб артилади ва асбобга жойлаштирилади. 2—3 дақиқадан сўнг глюкоза аниқланади.

Поляриметр — сахариметр найчасининг узунлиги 18,94 см. Шу узунликдаги шкала бўйича аниқланадиган бурилиш бурчаги сон жиҳатдан қанднинг процент микдорига тўғри келади.

4. Сийдик таркибида глюкоза бўлган тақдирда айлананинг ўнг томони қораяди. Окуляр майдонининг иккала томони бир хил ёритилмагунча айлантирилади ва шкала билан нониусга қаралади. Нониус нолдан шкала бўйича қанчалик сурилгани аниқланади. Шкаладаги бўлинмалар бутун сондаги процентларни ифодалайди. Шундан кейин нониуснинг ноль ҳолати аниқ топилади; нониус бўлинма-



26-расм. Майдонни нур билан таъминлаш.



27-расм. Нониусли шкала.

ларини нолдан ўнгга томон, шкала бўлинмаси билан тўғри келган ҳолати аниқланади. Шу нониус бўлинмаларини нолдан ўнгга сурилган сони кўрсаткичи ўнли каср процентини ифодалайди.

5. Ўлчаш тугалланиши билан найчанинг икки томонидаги қопқоқлари олинади ва ҳар бир қисми тозалаб ювилиб, қуритилади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, асбоб кўрсаткичларини дафтарга ёзинг. Қандай ўзгаришлар сийдикда глюкоза ажралишига олиб келишини изоҳланг.

143- и ш. СИЙДИҚ ТАРКИБИДАГИ КЕТОН ТАНАЧАЛАРНИ АНИҚЛАШ

Кетон таначалар (β -гидрооксимой кислота, ацетосирка ва ацетон) сийдик таркибида карбонсув ва ёғларнинг алмашинуви бузилганда, жумладан диабет касаллигида ва оч қолганда пайдо бўлади. Соғлом одам сийдигидаги кетон таначалар одатдаги реакциялар билан очилмайди.

Касалликни аниқлашда, даволашни тўғри олиб борилаётганини назорат қилишда, диабет билан оғриган беморларга парҳез тайинлашда сийдик таркибидаги кетон таначаларини аниқлаш муҳим аҳамиятга эга.

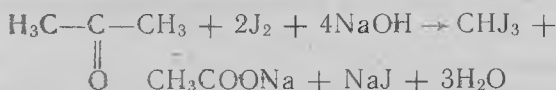
Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: янги тайёрланган натрий нитропруссиднинг 10% ли эритмаси, натрий гидроксиднинг 10% ли эритмаси, Люголь эритмаси, темир (III) хлориднинг 5% ли эритмаси, концентранган сирка кислота.

Керакли анжомлар: штатив ва пробиркалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1. **Ацетонни очиш учун Люголь реакцияси.** 2 мл сийдик солинган пробиркага 3—4 томчи натрий нитропруссид эритмаси ва 2—3 томчи гидроксид эритмаси солинади. Эритма қўнғир-кизил рангга бўялади. Концентрланган сирка кислота қўшилганда эритма оч кизил рангга айланади. Сийдик таркибида ацетон бўлмаса, кислотали муҳитда (сирка кислота қўшилганда) кизил ранг сариқ рангга айланади.

2. **Ацетонни очиш учун Либен реакцияси.** 2 мл сийдикка 2—3 томчи натрий гидроксид эритмаси ва оч сариқ ранг ҳосил бўлгунча томчилаб Люголь эритмаси солинади. Сийдик таркибида ацетон бўлган такдирда ўзига хос хидли йодоформнинг оч сариқ кристаллик чўкмаси ажралиши туфайли эритма лойкаланади.



3. **Ацетосирка кислотани очиш учун Герхард реакцияси** 5 мл сийдик солинган пробиркага темир (III) хлорид эритмасидан томчилаб солинади, шунда темир фосфат кўринишидаги фосфат чўкмаси тушади. Сийдик ацетосирка кислота тутган ҳолда темир хлорид эритмасининг ортиқча миқдордаги томчиси оч кизил ранг ҳосил бўлишига олиб келади. Эритма маълум вақт давомида ацетосирка кислотанинг ўз-ўзидан декарбоксилланиши натижасида секин-аста рангсизланади.



144-и ш. ҚОН ПИГМЕНТЛАРИНИ ОЧИШ

Сийдик йўлларидаги қон томирларнинг шикастланиши натижасида сийдикда қон пайдо бўлади. Бундай ҳолатни гематурия дейилади. Оғир юқумли касалликларда, захарланганда эритроцитлар парчаланади, гемоглобин қон зардобига, ундан сийдикка ўтади (гемоглобинурия).

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: лакмус қоғози, сирка кислотанинг 10% ли эритмаси, гвояк мумининг спиртли эритмаси.

Керакли анжомлар: штативлар, пробиркалар, пипеткалар.

1. ҚОН ПИГМЕНТЛАРИНИ ГВОЯК МУМИ ЁРДАМИДА ОЧИШ

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркага 1 мл сийдик солиб, лакмус бўйича унинг муҳити аниқланади. Агар сийдикнинг муҳити ишқорий бўлса, уни кислотали муҳитга ўтказилиб, қайнатилади (сийдик таркибида йиринг бўлган тақдирда реакция мусбат бўлади). Қайнатилган сийдикдан 1 мл олиб устига 0,5 мл Гвояк мумининг спиртли эритмаси ва бир неча томчи водород пероксид солинади. Сийдикдаги қон пигменти водород пероксидни сув ва кислородга парчалайди. Кислород ўз навбатида мум кислотасини оксидлаши натижасида кўк рангли гвояк мум кислотаси озонидини ҳосил қилади. Қон пигментларини тутмаган сийдик бундай реакцияда рангли эритма ҳосил қилмайди.

2. СИЙДИҚДАГИ ҚОН ПИГМЕНТЛАРИНИ БЕНЗИДИН РЕАКЦИЯСИ БИЛАН ОЧИШ

Усулнинг асоси: Сийдик таркибидаги қон пигменти — гемоглобин пероксидаза ферменти фаоллигига эга бўлган бўлиб, водород пероксидни сув ва атомар кислородга парчалаш қобилиятига эга. Атомар кислород эса тажриба эритмасидаги бензидинни оксидлайди.

Текширилувчи материал: қон тутувчи сийдик.

Реактивлар: 10% ли натрий ишқор эритмаси, янги тайёрланган концентрланган сирка кислотада эритилган бензидиннинг 5% ли эритмаси, 3% ли водород пероксид эритмаси.

Керакли анжомлар: томизгичлар.

Бажариладиган иш тартиби: янги, филтрланмаган сийдикдан пробиркага солиб қайнатилади ва совитилади. Сўнгра 20 томчи қайнатилган сийдикка шунча микдор сирка кислотада эритилган бензидин ва бир неча томчи водород пероксид солинади. Қон пигментини тутувчи сийдик кўк ёки яшил-кўк рангга бўялади.

145-н ш. СИЙДИҚДАГИ УТ ПИГМЕНТЛАРИНИ ОЧИШ

Ут пигментлари — билирубин, биливердин ва бошқалар сийдикда ишқорий туз кўринишида сариқ касаллигида пайдо бўлади. Ушбу пигментларни тутувчи сийдикнинг ранги сарғиш-жигар ранг ёки яшил рангга бўялган бўлади (сарик касаллиги учун хос белги).

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: Фуш реактиви, барий хлориднинг 10% ли эритмаси, йоднинг 1% ли спиртли эритмаси.

Керакли анжомлар: штативлар, пробиркалар, коғоз филтрлар, воронкалар, шиша таёқчалар.

1. Фуш реактиви билан сийдик билирубинини очиш учун сифат реакция.

Усулнинг асоси: барий хлорид ёрдамида чуқтирилган билирубин темир (III) хлорид таъсирида оксидланиб рангли маҳсулот ҳосил қилишидан иборат.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркадаги 10 мл сийдикка 5 мл 15% ли барий хлорид эритмасидан солиб аралаштирилади ва филтрланади. Воронкадан олинган филтр курук филтр коғозига ёзилади. Чўкмага 1—2 томчи Фуш реактиви томизилади. Филтрдаги билирубин кўкимтир-яшил ва ҳаво ранг доғларни ҳосил қилади. Сийдик таркибида билирубин бўлмаган тақдирда доғ ҳосил бўлмайди. Соғлом одам сийдигида билирубин жуда кам миқдорда бўлади, шунинг учун уни одатдаги реакциялар билан очиб бўлмайди.

2. Йод эритмаси ёрдамида билирубинни очиш (Розли реакцияси).

Усулнинг асоси: Ушбу усул сийдикдаги билирубинни йод таъсирида биливердингача оксидланишига асосланган.

Бажариладиган иш тартиби. Пробиркага 3—4 мл сийдик солинади ва устига секин-аста 1% ли йод эритмаси қаватланади. Билирубин бўлган тақдирда иккала эритма орасидаги чегарада яшил ҳалқа ҳосил бўлади. Соғлом одам сийдиги билан ўтказилган реакция нисбий бўлади.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, олинган натижаларни дафтарингизга ёзиб, тегишли хулоса чиқаринг.

146-и ш. СИЙДИК рН и, ОКСИЛИ ГЛЮКОЗАСИ, КЕТОН ТАНАЧАЛАРИ, УРОБИЛИНОГЕН ВА ҚОННИ АРАЛАШ ТЕСТ-БЎЛАҚЧАЛАРИ ЁРДАМИДА АНИҚЛАШ

Аралаш тест бўлақчалари ёрдамида сийдикнинг олтига асосий кўрсаткичларини: рН, оксил, глюкоза, кетон таначалар, уробилиноген, қонни аниқлаш мумкин.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: аралаш тест-бўлақчалари.

Бажариладиган иш тартиби: сийдик солинган идишга тест-бўлақча тўла туширилади ва 1 секунд тутилади.

Сийдикнинг ортикча микдори бўлмачалардан олинади. 30—60 секунд вақт ўтгач бўёқлар стандарт шкала билан солиштирилади. Индикаторнинг четида ҳосил бўлган бўёқ ёки 2 дақиқа ўтгач ҳосил бўлган бўёқ ташхисий аҳамиятга эга эмас. Сийдик 4 соат тургандан сўнг ишлатилмайди.

Оксил. Сийдикда оксил бўлган тақдирда тест-бўлакчалар сарикдан яшил ранггача ўзгаради (0,3; 1,0; 5,0; г/л); 0,25 г/л оксил тутувчи сийдик касалланган ҳисобланади.

Глюкоза 60 секунд ўтгач қизғиш рангдан жигар ранггача ўзгарса, глюкоза микдори (5,55; 16,65; 55,55 ммоль/л га тенг бўлади. Сийдик глюкозасининг микдори 2,2 ммоль/л га етганда ҳам ранг пайдо бўлади.

Кетон таначалари. Ижобий реакция пушти рангдан бинафша ранггача кузатилади. Ацетосирка кислотага тест-бўлакчаларнинг сезгирлиги ацетонга нисбатан юқори, бетта-гидроксимой кислотага нисбатан эса тест-бўлакчалар таъсирсиз. Аниқлаш чегаралари учун 400 мг/л гача; ацетосирка кислота учун — 100 мг/л гача.

Уробилиноген. Пушtidан қизил ранггача ижобий реакция (аниқлаш чегараси 4 мг/л).

Қон. Эритроцитлар ва гемоглобинни аниқлаш учун алоҳида шкала берилади. Зарарланмаган эритроцитлар алоҳида ёки зич йиғилган яшил нуқталар ҳолида кўринади (5—10, 50, 90 эрит/мкл). Бир хилдаги яшил бўёқлар эркин гемоглобин ёки зарарланган (гемолизланган) эритроцитларни ёки миоглобинни белгилайди (50, 250 эрит/мкл). Сийдик таркибида оз микдорда қон бўлса ёки тест-бўлакчалар узок муддат ҳўлланса, реакция 1—2 дақиқа орасида содир бўлади.

Бошланғич хатолар. Кўп микдорда витамин С истеъмол қилиш ва айрим дориларни қабул қилганда хато натижалар олиш мумкин.

147-и ш. ИНДИКАНГА СИФАТ РЕАКЦИЯ (ОБЕРМЕЙР ТАЖРИБАСИ)

Индикан — индоксисульфат кислотанинг калийли ёки натрийли тузи. Соғлом сийдик таркибида жуда кам микдорда, излар ҳолида учрайди. Уни одатдаги реакциялар билан аниқлаб бўлмайди. Оксилларнинг чириш жараёни кучайиши — ичакларда кўп микдорда чириувчи бактериялар бўлиши, ич қотиши, ичакларнинг буралиши натижасида сийдикда индикан микдори ортади. Уларни аниқлаш эса даволашда катта аҳамият касб этади.

Усулнинг асоси: Кучли минерал кислота таъсирида

индиканнинг эфир боғлари парчаланиб индоксилга айланади. Индоксил ўз навбатида темир (III)-хлорид билан оксидланиб, рангли бирикма ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: кўрғошин ацетатнинг 100 г/л ли эритмаси, концентранган хлорид кислота, темир (III) хлорид, Обермейер реактиви (0,4 г темир (III) хлорид 100 мл концентранган хлорид кислотада эритилади), хлороформ, 200 г/л натрий тиосульфат эритмаси.

Керакли анжомлар: Штативлар, пробиркалар.

Бажариладиган иш тартиби: ўт пигментларини, тузларни ва бошқа реакцияга ҳалақит берувчи моддаларни чўктириш учун 4 мл сийдикка 0,4 мл кўрғошин ацетат эритмаси солинади. Пробиркадаги эритма филтрланади ва 1—2 мл филтрат шунча Обермейер реактиви билан аралаштирилади. Сўнгра 0,5—1 мл хлороформ қўшиб аста-секин аралаштирилади. Хлороформ қавати (пастки қават) кўк ёки қизил рангга бўялган тақдирда уни секин суриб олиб, бошқа пробиркага ўтказилади ва устига бир неча томчи натрий тиосульфат эритмаси солинади. Агар ушбу реакция ижобий бўлса, хлороформнинг ранги натрий тиосульфат таъсирида ўзгармайди. Соғлом одам сийдиги билан ўтказилган реакция нисбий бўлади. Текширув эритмасида уротропин бўлиши индикан аниқланишига ҳалақит беради.

148- и ш. СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ СИЙДИҚ КИСЛОТА МИҚДОРИНИ АНИҚЛАШ

Мураккаб оксиллар синфининг вакили — нуклеопротеидлар таркибига кирувчи пурин асослари алмашинувининг охириги маҳсулоти соғлом одамлар сийдигида 1,6—3,54 ммол/сут (270 — 600 мг/с) га тенг. Подагра, нефрит, буйрак етишмовчилиги касаллигида сийдик кислотанинг сийдик билан аралашishi камаяди. Бу гипоурикурия дейилади. Алиментар — физиологик лейкемияда, нуклеопротеидлар парчаланишининг ортишида сийдик кислотанинг сийдикдаги миқдори ортиши кузатилади (гиперурикурия).

Катталарникига нисбатан болалар сийдигида сийдик кислота миқдори кўпроқ бўлади. Сийдикдаги сийдик кислота миқдори истеъмол қилинган овқат таркибида нуклеин кислоталарнинг — пурин асосларининг миқдорига ва уларнинг парчаланиш тезлигига боғлиқ бўлади.

Подагра касаллигида сийдик кислота тузлари (уратлар) тоғайларда, мушакларда ва бўғин шиллиқ халтала-

рида йиғилади. Қон таркибидаги сийдик кислота миқдори юқори бўлса-да сийдик билан кам миқдорда ажралади.

Усулнинг асоси: ушбу усул сийдик кислота фосфор-вольфрам реактивини фосфор-вольфрам кўккача қайтариш хоссасига асосланган. Рангнинг оч-тўқлиги сийдик кислота миқдорига тўғри пропорционал. Фосфор-вольфрам кўкининг миқдори қизил қон тузи билан титрлаш орқали аниқланади. Қизил қон тузи фосфор-вольфрам кўкини оксидлайди, натижада кўк ранг йўқолади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Керакли реактивлар: Фолин фосфор-вольфрам реактиви, натрий карбонатнинг 20% ли эритмаси, калий ферроционид (қизил қон тузи) нинг 0,01 н ли эритмаси, 0,5 мг 1 мл бўлган сийдик кислотанинг доимий стандарт эритмаси.

Керакли анжомлар: микробюреткалар, титрлаш учун стаканчалар.

Бажариладиган иш тартиби: 1,5 мл сийдикка 1 мл 20% ли натрий карбонат эритмаси ва 1 мл Фолиннинг фосфор-вольфрам реактивидан солиб аралаштирилади. Аралашма 0,01 н. қизил қон тузи эритмаси билан эритма рангсизлангунча титрланади. Сийдик кислотанинг сийдикдаги миқдорини ҳисоблаш учун 1 мл қизил қон тузи эритмасига қанча сийдик кислота тўғри келишини билиш керак. Масалан, 0,75 мг сийдик кислота тутувчи 1,5 мл доимий эритмани титрлаш учун 0,81 мл ферроционид эритмаси ишлатилади. Шундан 1 мл ферроционид (х) қуйидагича топилади.

$$x = \frac{0,75}{0,81} = 0,8 \text{ мг сийдик кислотага тўғри келади.}$$

Ҳисоблаш. Бир кунлик сийдик таркибидаги (мг) сийдик кислота миқдори қуйидаги тенглама бўйича топилади:

$$x = \frac{0,8 \text{ хахв}}{1,5} = \text{мг да ифодаланган сийдикдаги кислота миқдори}$$

Бунда 0,8 мг сийдик кислота 1 мл қизил қон тузи эритмасига тўғри келади.

а) титрлаш учун кетган қизил қон тузи эритмасининг ҳажми, мл

б) бир кунлик сийдик миқдори, мл. СИ бирлигига ўтказиш коэффиценти (ммоль/сут) 0,0059 га тенг.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Усулнинг асосини, олинган натижа ва хулосангизни чиқариб, дафтарингизга ёзинг.

149-н ш. СИЙДИК ТАРКИБИДАГИ ФЕНИЛПИРОУЗУМ КИСЛОТА МИҚДОРИНИ СИФАТ РЕАКЦИЯ УСУЛИ БИЛАН ОЧИШ

Болалар жигарида туғма 4-фенилаланингидроксилаза ферментининг бўлмаслиги фенилаланин аминокислотанинг гидроксиллаши жароғи бузилишига ва тирозинга айлана олмаслигига олиб келади. Фенилаланин ва унинг аномал (ўзгарган) маҳсулотлари, жумладан фенилпиروузум кислотанинг қонда ва тўқималарда кўпайиши миянинг ривожланиши бузилишига ва бола руҳиятида оғир ўзгаришлар содир бўлишига олиб келади. Бу ирсий касалликни тасдиқловчи кўрсаткич — қонда фенилпироузум кислотанинг кўпайиши ва сийдик билан ажралишидир. Бундай ҳолатни олигофрения (аклий заифлик) дейилади. Фелинг тажрибаси:

Усулнинг асоси: Фенилпироузум кислота уч валентли темир ионлари билан кўк-яшил рангли комплекс бирикма ҳосил қилади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: темир (III) хлориднинг 10% ли эритмаси.

Керакли анжомлар: томизгичлар, филтрлар, 5 мл ли пипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: 2 мл янги «филтрланган сийдикка 8—10 томчи 10% ли темир хлорид эритмаси солинади. Сийдикда фенилпироузум кислота бўлганда эритма 30—60 секунддан сўнг кўк-яшил рангга бўялади ва фенилпироузум кислота миқдорига қараб 5—30 дақиқадан сўнг секин-аста рангсизланади.

Бу тажрибани филтр қоғозида ёки бола чойшабида ҳам ўтказиш мумкин: филтр қоғоз бўлаги сийдик билан ҳўлланади сўнгра ҳавода куритилади ва 10% ли темир хлорид эритмаси томизилади. Юқоридаги кўк-яшил ранг пайдо бўлиши тажрибанинг ижобий эканлигидан далолат беради.

Олинган натижаларни расмийлаштириш. Дафтарингизга фенилпироузум кислотанинг кўпайиш сабабини, кузатиладиган ҳолатни, усулнинг асосини ва натижангизни ёзиб хулоса чиқаринг.

150-н ш. МУКОПОЛИСАХАРИДЛАРГА СИФАТ РЕАКЦИЯ

Соғлом одам сийдигида 2,7—7,5 мг/сут (асосан А, С, хоңдрогин сульфат ҳолидаги) мукополисахаридлар учрайди. Гаргоилизм касаллигида ва Гунтер синдромида мукополисахаридларнинг сийдик билан ажралаётган миқдори 30—80 мг/сут га етади.

Берри ва Спинаиджер тажрибаси.

Усулнинг асоси: мукополисахаридларни кислотали муҳитда толуидин кўки билан таъсирланишидан қизил ранг (метохромазия) ҳосил бўлади.

Текширилувчи материал: сийдик.

Реактивлар: толуидин кўкининг рН и 2 бўлган ацетат буфердаги 0,04% ли эритмаси, сирка кислотанинг 10% ли эритмаси,

Керакли аяжомлар: филътр қоғози бўлакчалари, микропипеткалар.

Бажариладиган иш тартиби: филътр қоғози бўлакчасига 1 см оралатиб 0,005; 0,01; 0,025 мл сийдик томизилади ва хавода қуритилади. Шундан сўнг қоғоз бўлакчани 0,04% ли толуидин кўки эритмасига солинади. Бир дақиқа ўтгач, қоғоз бўлакча бўёвчи эритмадан олиниб 10% ли сирка кислота эритмасида ювилади. Сийдик таркибида мукополисахаридларнинг миқдори 10 мг/100 мл дан ортик бўлса, томизилган сийдикнинг бирор жойида қизил ранг ҳосил бўлади. Гаргонизм касаллигида бу реакция юкори нисбий даражада бўлади. Олинган натижаларни расмийлаштиринг. Олинган натижа ва хулосангизни дафтарингизга ёзинг.

Тайёрланиш учун саволлар

1. Беморнинг сийдигида қандай патологик бирикмалар пайдо бўлиши мумкин?

2. Бемор сийдиги билан ажраладиган оксил қандай касаллик белгиси борлигини билдиради?

3. Сийдик таркибидаги оксилни аниқлаш учун қандай усуллардан фойдаланилади? Усулларнинг асосини айтинг.

4. Қандай касаллик ҳолатлари сийдик билан қанд ажралишига олиб келади? Сийдикдаги қанд қандай усуллар билан аниқланади?

5. Поляриметр-сахариметр асбобиинг ишлаш асоси нимадан иборат? «Глюкозест усулининг-чи, унинг афзаллиги нимадан иборат?

6. Сийдик кетон таниччаларига қандай бирикмалар киради? Қандай касаллик уларнинг миқдори ошишига олиб келади? Уларни қандай усуллар билан аниқлаш мумкин?

7. Қандай касалликларда сийдикда қон пайдо бўлади? Уларни аниқлашда қандай сифат реакциялар қўлланилади? Аниқлаш усулининг асоси қандай?

8. Беморнинг сийдиги билан ўт пигменти ажралса қандай касаллик ҳақида фикр юртасиз? Бу ҳолатнинг биокимёвий йўлланмасини тушунтириб беринг. Ўт пигменти қандай усуллар билан аниқланади? Усулнинг асоси қандай?

9. Аралаш тест-бўлакчалар ёрдамида қандай сийдик бирикмалари аниқланиши мумкин? Бу усулнинг афзаллиги нимадан иборат?

10. Сийдик таркибидаги сийдик кислота қандай усуллар билан аниқланади? Аниқлашнинг аҳамияти қандай?

11. Сийдик индикани нима? Қандай усуллар билан бу бирикма аниқланади, унинг аҳамияти қандай?

12. Нима учун сийдикда фенолпируоузум кислота аниқланади? Унинг бажарилишиги сабаб нима?

13. Сийдикда қандай мукополисахаридлар ажралади? Уни аниқлашнинг аҳамияти нимадан иборат?

Қўйидаги вазият масалаларни ечинг

1. Бемор боланинг сийдиги тўқ қўнғир рангга бўялганини билган шифокор қандай касаллик ёки ҳодиса ҳақида фикр юритиши лозим ва фикрни тасдиқлаш учун яна қандай қўшимча кўрсаткичларни аниқламоғи керак?

2. Беморнинг сийдиги хиралашган. Бунга қандай ўзгаришлар сабаб бўлиши мумкин? Бундай ҳолатни шифокор қандай изоҳлаши керак? Бундай ўзгариш фақат буйрак касалликларига боғлиқми?

3. Беморнинг сийдигидан мева ҳиди келади. Фақат шу белгига асосланиб шифокор қандай касаллик эканлигини билиши мумкинми? У яна қандай белгиларга эътибор бериши керак?

4. Қандли ва қандсиз диабет касалликлари «полиурия» белгилари билан ифодаланади. Бу касалликларни фарқлаш учун қандай физик-кимёвий хусусиятлар аниқланмоғи лозим, нима учун? Бу ҳодисани қандай изоҳлаш мумкин?

5. Сийдик муҳити нима учун аниқланмоғи керак? Қандай муҳит ўзгаришлари кузатилади?

6. Сийдик таркибидаги минералларни аниқлаш билан бирор касалликни билиш мумкинми? Мисол келтиринг ва изоҳланг.

7. Сийдик таркибида креатин ва креатининлар миқдори ортган. Бу қандай касаллик кўрсаткичи бўла олади?

8. Сийдик таркибида аммоний тузлари миқдори кескин ортган. Бунинг сабаби нима? Қандай касалликларда бундай ҳолат кузатилади?

9. Буйракларнинг ажратувчилик фаолияти бузилганлигини қандай йўллар билан билиш мумкин? Бунда қандай ўзгаришлар юз беради?

10. Сийдикдаги умумий азотни қандай усуллар билан аниқлаш мумкин? Қандай ҳолатларда сийдикдаги умумий азот аниқланади?

11. Бир кунлик сийдик билан 123 ммоль/л сийдикчил ажралганини билган шифокор қандай фикрга келади? Бундай ҳолат қандай касалликларга оид белги бўлиши мумкин? Унинг миқдори 725 ммоль бўлса-чи?

12. Сийдикнинг тиниклиги ўзгарган, хиралашган. Унинг таркибида оксил бор-йўқлигини лабораториясиз шароитда билиш мумкинми? Қандай тадбир қўлланади?

13. Ошқозон яраси бор, жуда дармонсиз, ранги оқарган, сийдигининг ранги ўзгарган. Бундай бемор сийдиги билан қандай текшириш ўтказиш лозим? Жавобингизни изоҳлаб беринг.

14. Бемор ахлатининг ранги оқарган, сийдиги тўқ жигар рангга бўялган. Бу қайси касаллик белгиси? Бундай ҳолатда сийдикнинг қандай патологик бирикмасини аниқлаш керак?

15. Бемор бугинлари шишганлигини ва кучли оғрик бераётганлигини шифокорга айтди. Бу шифокорнинг фикри қандай биокимёвий ўзгаришларга йўналтирилиши лозим? Бемор сийдигида қандай бирикма аниқланмоғи керак?

АЙРИМ РЕАКТИВЛАР ВА ПРЕПАРАТЛАРНИ ТАЙЁРЛАШ

(Барча реактивлар дистилланган сувда тайёрланади)

1. Рангли реактивлар учун оксил эритмасини тайёрлаш.

1) 10 г тухум оксили 100 мл сувда эритилиб 1%ли оксил эритмаси тайёрланади (10 г тухум оксили 1 г оксил тутади). Бир дона тухум оксили 250 мл сувда эритилиб, дока филтрдан ўтказилади.

2) От қон зардоби 5 марта 0,85%ли натрий хлорид эритмасида суюлтирилади. Оксил эритмалар музлатгичда сақланади.

2. Гидролиз учун оксил эритмасини тайёрлаш. 2 дона тухум оксили 1 л сувда эритилиб, дока филтрдан ўтказилади, эритма музлатгичда сақланади. Тухум оксили гидролизатини тайёрлаш учун 8 дона тухум оксили 4 л сувда эритилиб, докадан ўтказилади ва эритма ҳаволи совутгич билан бирлаштирилган думалоқ тубли қолбага солинади. Унга бир л концентрланган хлорид кислота қўшилади. Аралашма асбест тўр устида қайнагандан сўнг 45 дақиқа қайнатилади, сўнг филтрланади. Фаолланган кўмир ишлатилмайди.

3. Чўктириш реакцияси учун оксил эритмасини тайёрлаш. Саригидан ажратилган тухум оксили 19—20 баробар ҳажмдаги сув билан аралаштирилади ва бир неча қаватли дока ёки қаватланган филтёр қоғоздан ўтказилади. Тузлаш учун оксил эритма: 3 та тухум оксили 700 мл сув билан ва 300 мл тўйинган натрий хлорид эритмаси билан аралаштирилади.

4. Соғлом меъда ширасини тайёрлаш. 37 г натрий хлорид 7 мл концентрланган хлорид кислота, 2 мл концентрланган сут кислота (40%), 12 г пептон ва 1700 мл сувда эритилади ҳамда 2 қаватли докадан ўтказилади. Эритма холодильникда сақланади.

Кислоталилиги камайган меъда шираси. 1700 мл сувга 37 г натрий хлорид, 3,5 мл концентрланган хлорид кислота, 2 мл концентрланган сут кислота ва 12 г пептон солинади.

Кислоталилиги ошган меъда шираси. Юқоридагидек, фақат 20 мл хлорид кислота солиб тайёрланади.

5. Паталогик меъда ширасини тайёрлаш. Хлорид кислотасиз 1 мл меъда ширасиги 10 мл сут кислота (40%) ва 13,5 мл лимон кислота солинган қон (ҳар гал аниқлашдан олдин 10 томчидан) солинади. Ушбу эритма қора идишда, музлатгичда сақланади.

6. Сут-ацетат аралашмасини ивитиш учун пепсин. 100 мл пепсин 0,1 н хлорид кислота эритмасида эритилади

ва 10—20 томчи 2 н хлорид кислота (рН и 2,5) қўшилади. Эритма 3—4 соат тургандан сўнг унинг ҳажми 0,1 н хлорид кислота билан 100 мл га етказилади. Шунда 0,1 % ли пепсин эритмаси олинади.

7. Меъда ости бези эритмаси (панкреатин). 5 г курук панкреатин 40—50 мл 2 % ли натрий гидрокарбонат эритмасида эритилади ва 50—60 мл сувдан рН и 8,0 гача қўшилади. Фенолфталеин билан ўтказилган реакция кучсиз ишқорий бўлиши керак. Панкреатин эритмаси ҳар 2 кунда тайёрланиб, музлатгичда сақланади.

8. Меъда ости бези препаратини тайёрлаш. Қорамол ёки чўчка меъда ости бези ёғлардан тозаланади ва майдаланади, сўнгра 3 баробар ҳажмда ацетон солиб, 10—12 соат давомида ёғсизлантирилади. Ацетон тўкиб ташланади ва ацетон билан ёғсизлантириш яна 1—2 марта қайтарилади. Ацетон филтрланади, чўкма аввал спирт билан, сўнгра эфир билан ювилади ва филтр қоғозлари орасида ҳавода қуритилади. Олинган маҳсулот ҳовончада майдаланади.

9. Курук тухум сариғини тайёрлаш. Тухум сариғи ойна пластинкасига суртилиб, хона ҳароратида, ҳавода қуритилади. Қуритилган сариқлик ойна пластинкасидан қириб олинади ва ҳовончада кукун ҳолатигача майдаланади.

10. Сут-ацетат аралашмасини тайёрлаш. Янги соғилган сут (нисбий зичлиги 1,030) рН и 4,9 ацетат буфер эритмаси билан 1:1 нисбатда аралаштирилади. Бу аралашма ёпик ҳолатда музлатгичда 2 ҳафта сақланиши мумкин. Бу аралашма кенгаювчи воронкада қолдирилиб, тинган ёғ осон олиб ташланган тақдирда аралашманинг ишлатилиши янада қулай бўлади. Қуритилган сут кукунидан фойдаланилса, унинг 2,5 ош қошиғи бир стакан илик сувда эритилиб, қайнатилади ва юқоридагидек 1:1 нисбатда рН и 4,9 бўлган ацетат буфери билан аралаштирилади.

11. Кумушнинг аммиакли эритмаси. 1—3% ли кумуш нитрат эритмасига концентрланган аммиак эритмасидан чўкма эригунча қўшилади. Шунда кумуш гидроксиднинг аммиакли эритмаси ҳосил бўлади.

12. Кумуш нитратнинг 2% ли эритмаси. 2г кумуш нитратга 100 мл сув солиб кумушнинг аммиакли эритмаси тайёрланади.

13. Кумуш нитратнинг 0,1 н эритмаси. 16,988 г кумуш нитрат 1 л ли ўлчов колбасига солиниб, сув билан аралаштирилади-да, ҳажми 1 л га етказилади. 0,01 н эритма эса шу 0,1 н эритмадан ишлатиш олдидан тайёрланади. Унинг титри 0,01 н натрий хлорид (0,585 г — 1 л сув) эритмаси ёрдамида аниқланади.

14. **pH и 5 бўлган ацетат буфер эритмаси.** 45 г (ким. тоза) натрий гидроксид аввал 400—500 мл сувда эритилади. Ушбу эритма совитилгач, 1 л ли колбага ўтказилиб, 115 мл музли сирка қўшилади ва эритманинг умумий ҳажми 1 л га етказилади.

15. **pH и 4,8 бўлган ацетат эритмасини тайёрлаш.**
1) 0,2 н натрий ацетат эритмасини тайёрлаш учун ушбу туздан 27,22 г олиб 1 л ҳажмгача ўлчов колбада эритилади.

2) 0,2 н сирка кислота эритмаси (фиксанолдан) тайёрланади. Биринчи эритмадан 480 мл ва иккинчисидан 520 мл олиб аралаштирилади ва унинг pH и текширилади.

16. **Абсолют спирт.** Бунинг учун сувсиз мис (II) сульфатдан фойдаланилади. 220°C да қуритувчи шкафта сувсизлантирилади. Туз рангсизлангунча аралаштирилиб турилади. Сувсиз мис (II) сульфатга 95% ли этил спирт солинади ва яхшилаб аралаштирилади. Мис (II) сульфат кўкаради, демак, спиртдаги сувни тортиб олади, ушбу жараён мис (II) сульфат рангсиз холга келгунча бир неча бор янги туз қўшиш билан қайтарилади.

17. **Бензидиннинг 1 %ли эритмаси.** 1 г бензидин музли сирка кислотада эритилиб, ҳажми 100 мл га етказилади, қора идишда, совитгичда сақланади (асосли бензидинишлатилади).

18. **Билирубиннинг асосий эритмаси.** 8 мг билирубин 7 мл 0,1 М сувсиз натрий карбонат (1,06 г сувсиз натрий карбонат 100 мл ҳажмгача эритилади) да эритилиб ҳажми шу эритма билан 10 мл га етказилади. Билирубиннинг ишчи эритмаси 8 марта суюлтирилган асосий эритмадан тайёрланади. Бунинг учун 7 мл янги гемолизланмаган зардобга 1 мл янги тайёрланган билирубиннинг 80 %ли эритмаси ва 0,05 мл (1 томчи) 4 н сирка кислота эритмаси (22,6) мл музли сирка кислота 100 мл ҳажмга сув билан етказилади) қўшилади. Эритма яхшилаб аралаштирилади. Ишчи эритма совитгичда сақланганда бир суткагача турғун бўлади.

19. **Молибден реактиви.** 7,5 г аммоний молибдат тузи 50 мл концентрланган азот кислотада суюлтирилади.

20. **Биурет реактиви.** 1,5 г мис сульфат ва 60 г калий тартарат 300 мл 10 % ли натрий гидроксид эритмасида суюлтирилади ва реактивнинг умумий ҳажми 1 л га дистилланган сув билан етказилади.

21. **Фоли реактиви.** 1,5—2 л ли думалок тубли колбага 100 г натрий молибдат тузи солиб 700 мл дистилланган сувда эритилади. Эритмага 50 мл 80 % ли фосфат кислота

эритмаси ва 100 мл концентранган хлорид кислота солинади. Қолба қайтар совитгич билан бириктирилади ва 10 соат давомида қайнатилади, сўнгра 150 г литий сульфат, 50 мл сув ва 3—4 томчи бром қўшилади. Эритма хона ҳароратигача совитилади ва унинг ҳажми 1 л гача сув билан етказилади-да филтёрланади. Эритма тиник-сарик рангли бўлади. Ушбу эритма қора идишда сақланади ва ишлатишдан олдин 1:1 нисбатда суялтирилади.

22. Полиакриламид гелъ электрофорез усули учун реактивлар:

1-р е а к т и в. 1 моль/л хлорид кислота эритмаси — 48 мл; ТРИС (триоксиметиленаминометанхлоргидрат) — 3,6 г. ТМЕД — 0,23 мл 100 мл ҳажмга дистилланган сув билан етказилади.

2-р е а к т и в. Акриламид — 30; метилен-бис-акриламид — 0,8 г; дистилланган сув билан 100 мл га етказилади.

3-р е а к т и в. 14 г аммоний пероксидисульфат 100 мл сувда эритилади. Таҷриба олдидан тайёрланади.

23. Аргиназа фаоллигини аниқлаш учун реактив.

1) Қаламуш жигаридан фермент препаратини тайёрлаш: Муз устида турган тўқима қайчи билан обдон майдаланади-да гомогенизацияланади. Олдин совитилган ацетоннинг 10 баробар ҳажми билан, сўнгра оз микдордаги эфир билан ишлов берилиб, ацетон ва эфир филтёрдан ўтказилади. Чўкма Бюхнер воронкасида қуритилади ва майда кукун ҳолигача эзилади. Қуруқ эфир-ацетонли кукун музлатгичда сақланади. Таҷриба олдидан бу кукун 10 баробар ҳажмдаги глицин буфери (рН и 9,5) билан 20 дақиқа экстракция қилинади; 2) глицин буфери (рН и 9,5). 80 мл 0,1 моль/л глицин эритмаси 20 мл 0,01 моль/л натрий гидроксид эритмаси билан аралаштирилади. 0,1 моль/л пиродифосфат (рН и 9,5) эритмасидан фойдаланиш мумкин;

3) темир (III) хлориднинг асосий эритмаси. 5 г темир (III) хлорид сувда эритилиб ҳажми 100 мл га етказилади, унга 8 мл концентранган сульфат кислота қўшилади.

24. Фосфат буферини тайёрлаш. 11,9 г динарий гидрофосфат (моль. мас 178,01) ва 9,1 г калий дигидрофосфат (мол. мас. 136,09) тузлари яхшилаб қайнатилган дистилланган сувда алоҳида эритилади. Ҳар бир эритилган тузнинг ҳажми (1 л га сув билан етказилади. Керакли рН да буфер эритма тайёрлаш учун I ва II эритмалар жадвалга биноан аралаштирилади.

Буфер рН	Натрий гидрофосфат, мл	Калий ди-гидрофосфат, мл	Буфер рН	Натрий гидрофосфат	Калий ди-гидрофосфат
5,59	0,5	9,5	6,95	6,0	4,0
5,91	1,0	9,0	7,17	7,0	3,0
6,24	2,0	8,0	7,38	8,0	2,0
6,47	3,0	7,0	7,42	9,0	1,0
6,64	4,0	6,6	8,04	9,5	0,5
6,81	5,0	5,0			

25. рН и 8,6, 0,05 ион кучланишли веронал-барбитал буфери. 10,32 натрий барбитал 300 мл сувда эритилади, унга 1,84 г барбитал қўшилади ва сув ҳаммомида барбитал эригунча қиздирилади, сўнгра ҳажми 1 л га етказилади.

26. рН и 8,6 веронал ацетат, барбитал-ацетат буферлар. 300 мл сувда 4,3 г барбитал, 0,95 г натрий ишқори ва 3,24 г натрий ацетат эритилади. Сўнгра эритмага 30 мл 0,1 М хлорид кислота солиб умумий ҳажми 1 л га етказилади.

27. рН и 9,0 глицерофосфат буфери. 2,15 г натрий бетта-глицерофосфат ва 2,15 г барбитал-натрий сувда эритилиб, умумий ҳажми 500 мл га етказилади. Унинг рН и текширилади. Эритма толуол қатлами тагида музлатгичда сақланади.

28. Гипосульфат (тиосульфат)нинг 0,005 н эритмаси. Ишлатишдан олдин 0,1 фиксонал тайёрланади. 5 мл 0,1 н эритма 100 мл сиғимли ўлчов колбасига солиниб, ҳажми 100 мл га сув билан етказилади. Фиксанол бўлмаса 25 г натрий тиосульфат 1 л яхшилаб қайнатилган ва совитилган сувда эритилади. Эритма тайёрлангандан 10 кун ўтгач унинг титри бир неча марта титрланган KJO_3 эритмаси ёрдамида аниқланади. 0,005 н калий йод эритмаси 0,1782 г KJO_3 ни дистилланган сувда эритиш ва ҳажмини 1 л га етказиш билан тайёрланади. Натрий тиосульфат эритмасининг титрини аниқлаш учун 2 мл KJO_3 эритмасига 2 мл 3 %ли учламчи хлор-рух-йодли эритма, 2 томчи крахмал эритмаси қўшилади ва ажралган йод (J_2) тиосульфат эритмаси билан рангсизлангунча титрланади.

29. Билирубин микдорини аниқлаш учун diazoreактив. 1-д и а з о р е а к т и в. 5 г (сувсиз тоза) сульфанил кислота 300—400 мл сувда енгил қиздириш билан (водопровод тагидаги иссиқ сувда эритилади ва 15 мл концентр-

ланган хлорид кислота қўшилади. Тўлиқ эригандан ва совитилгандан сўнг ҳажми 1 л га етказилади.

2-диазореактив 0,5 % ли натрий нитрат ишла-тишдан олдин тайёрланади.

Д и а з о а р а л а ш м а. Билирубинни аниқлашдан ол-дин 10 мл 1-диазореактив ва 0,30 мл 2-диазореактив аралаштирилади.

30.2,4-динитрофенилгидрозиннинг (2,4-ДНФГ) 0,1 %ли эритмаси ва 20 мл концентрланган хлорид кислота 100 мл ҳажмга сув билан етказилади (тахминан 2 н NCI). 100 мг 2,4-ДНФГ га секин-аста тўлиқ эригунча 100 мл тайёрланган 2 н хлорид кислота эритмаси қўшилади. Сўнгра эритма филтрланиб, музлатгичда сақланади: агар 2,4-ДНФГ эритмаси ёмон эриса, эритма яна бир суткага қолдирилади, сўнгра у чайқатилиб иссик сув оқимида қиздирилади.

31. Дифениламин реактиви. 1 г дифениламин (70 %ли спирт ва петролий эфирида 2 марта қайта кристалланган) 2,75 М концентрланган сульфат кислота ва 100 мл музли сирка кислота аралашмасида эритилади.

32. 2,6-дихлорфенолиндофенол (2,6-ДХФИФ) натрий-ли тузининг 0,001 н эритмаси. Бу эритмани тайёрлаш учун буфер фосфат аралашмаси (1/15 М Серенсен бўйича) ишлатилади, чунки сувли эритмада индикатор тез парча-ланади. Бунинг учун 9,078 г калий дигидрофосфат ва 11,867 г натрий гидрофосфат 1 л сувда эритилади. Эритмалар алоҳида сақланади. Сўнгра улар 2:3 нисбатда рН и 6,9—7,0 бўлгунча аралаштирилади. 0,25 г бўёқ тортиб олинади ва унга 700 мл сув қўшилиб чайқатилади. Унга 300 мл буфер аралашма қўшилади. Кейинги куни эритма филтрланиб яхшилаб аралаштирилади. Унинг титри Мор тузи эритмаси ёрдамида аниқланади. Бунинг учун кичик қолбага 10 мл индикатор ўлчаб олинади, унга 5 мл тўйинган аммоний оксалат эритмаси солинади ва 0,01 г сарик Мор тузи эртмаси билан титрланади. 0,01 Мор тузи эритмасини тайёрлаш учун 3,92 г туз 1 л 0,02 н сульфат кислота эритмасида эритилади. Мор тузи эритмасининг титри эса калий перманганатнинг 0,01 н эритмаси ёрдамида аниқланади.

33. Глюкозани Хагедерн-Йенсен усули билан аниқлаш учун калий ферроцианиднинг (қизил қон тузи) 0,005 н ишқорий эритмаси. Тортиб олинган (кимёвий тоза) 1,65 г қизил қон тузи 1 л ли қолбадаги сувда эритилади, унга 10,6 сувсиз натрий карбонат солиб, ҳажми 1 л га сув билан етказилади. Эритма қора идишда, музлатгичда сақланади. Ушбу препарат уч валентли темир (Fe^{3+}) ва

ферроцианид бирикмалари йўқлигига текширилган бўлиши керак. Иккала бирикмага ўтказилган сифат реакциялар мафий бўлиши лозим. а) 1 мл 5 %ли қизил қон тузи эритмасига 1 томчи 1 %ли сульфат кислота ва 1 томчи 10 % ли калий ферроцианид эритмаси солинади. Темирнинг уч валентли бўлиши эритмани кўк ранга киритади. б) 1 мл 5 %ли қизил қон тузи эритмасига 2 томчи 2 %ли темир (III) хлорид ва 2 томчи хлорид кислота эритмаси солиб аралаштирилади. Калий ферроцианиднинг эритмада бўлиши кўк ранг ҳосил бўлганидан билинади.

34. **Сийдик кислотани аниқлаш учун калий ферроцианиднинг 0,01 н эритмаси.** 3,292 г қизил қон тузи ва 2 г натрий ишқори 1 л сувда эритилади. Реактивнинг титри сийдик кислотага нисбатан аниқланади. Бунинг учун 1,5 мл сийдик кислотанинг доимий эритмасига 1 мл 20 %ли натрий карбонат ва 1 мл фосфор-вольфрам реактиви қўшилади. Ҳосил бўлган кўк ранг рангсизлангунча титрланади ва 1 мл қизил қон тузига қанча сийдик кислота тўғри келиши топилади.

35. **Индигокармин эритмаси.** 1 г индигокармин чинни ховончада эзилади, 50 мл концентрланган сульфат кислотада эритилиб, аста-секин ҳажми 1 л га сув билан етказилади, сўнгра филтрланади. Реактив қора идишда сақланади. Унинг яроқлилиги 7—10 кун.

35. **Таширо индикатори (асосий эритма).** 40 мл 0,1 %ли метил-қизилнинг спиртли эритмаси ва 10 %ли метил-кўкининг спиртли эритмаси. **Ишчи эритма.** 1 ҳажм асосий эритма, 1 ҳажм спирт, 2 ҳажм сув. Кислотали муҳит (рН и 4,4) да бинафша-қизил, ишқорий муҳит (рН и 6,2) да яшил ранг кузатилади.

37. **Йоднинг асосий эритмаси.** Қон зардоби амилазасини микроэкспресс усули билан аниқлаш учун 0,25 г йод кристаллари ва 0,86 калий йодид 20 мл сувда эритилади.

38. **Йоднинг ишчи эритмаси.** Йоднинг асосий эритмаси 50 марта 0,2 н хлорид кислотада суюлтирилади. Эритма 1 соат давомида турғун; ишлатишдан олдин тайёрланади.

39. **Крахмалнинг 0,1% ли эритмаси (ишчи эритма).** Қон зардоби амилазасини аниқлаш учун 100 мг эрийдиган крахмал 1 мл совуқ сувда эритилади, сўнгра тўлик эриши учун иссиқ сувга ўтказилади. Хона хароратида совитилгач, ҳажми 100 мл га сув билан етказилади. Музлатгичда 5 кунгача сақланади.

40. **Хагедорн-Йенсен усули билан қандни аниқлаш учун крахмалнинг 1% ли эритмаси.** 1 г эрийдиган крахмалга 100 мл хлориднинг тўйинган эритмаси солинади ва

кимёвий стаканда доим аралаштириб турган ҳолда қиздирилади.

41. **Кофеин реактиви.** 5 г тоза кофеин 7,5 г натрий бензоат ва 12,5 натрий ацетат, 70 мл сувда паст ҳароратда қиздириш йўли билан (80°C гача) эритилади. Сўнгра ҳажми 100 мл га сув билан етказилади. 2 ҳафта сақлаш мумкин.

42. **Фосфорни аниқлаш учун Молибден реактиви.** Натрий бензоат ва 12,5 г натрий ацетат 70 мл сувда эритилиб, 500 мл концентрланган азот кислота қўшилади.

43. **Аммоний молибдатнинг 2,5%ли эритмаси.** Блюр усули бўйича «Р»ни аниқлаш учун 2,5 г аммоний молибдат 50 мл 10 н сульфат кислотада эритилиб, ҳажми сув билан 100 мл га етказилади.

44. **Мис реактиви.** 6,45 % ли мис нитрат учгидрат эритмасидан 10 ҳажм, 1 М триэтаноамин (нисбий массаси 149) эритмасидан 9 ҳажм ва 1 н сирка кислотадан 1 ҳажм олиб тайёрланади.

45 **Ортотолуидан реактиви.** 0,15 г тиомочевина 94 мл кимёвий тоза муз сирка кислотада эритилиб, 6 мл рангсиз О-толуидин эритмаси билан аралаштирилади. Реактив деярли турғун ҳолда музлатгичда сақланади.

46 **Пироузум кислота.** 50 мг пироузум кислота ёки 62,5 мг пироузум кислотанинг натрийли тузи 100 мл сувда эритилади. Эритманинг 1 мл сига 0,5 мг пироузум кислота тўғри келади. Ишлатишдан олдин эритма 10 марта суюлтирилади (1 мл эритма 50 мг ПУК тутуди).

47. **Глюкозани аниқлаш учун ишчи реактив.** 80 мл рН и 4,8 бўлган 0,25 н ацетат буферга 2 мг глюкооксидаза ва 1 мг куруқ кристаллик пероксидаза қўшилади. Сўнгра 1 мл 1 %ли О-толуидиннинг абсолют спиртдаги эритмасидан солиб ҳажми 100 мл га ацетат буфери билан етказилади. Эритма музлатгичда қора идишда сақланади. Барча ферментлар қўшилади. Ишлатишдан олдин эритма хона ҳароратига келтирилади.

48. **Сахарозанинг 0,25 М эритмаси.** Тажрибада 0,02 М (рН 7,4) трис-буфер тутувчи эритма. 0,2 М трис-буфер эритмаси (нисбий массаси 121,14 бўлган оксиметил-аминометанхлоргидрат тайёрланади. 24,33г трис 1 л сувда эритилади. 0,2 М эритмадан 0,02 М эритма тайёрланади. Бунинг учун 10 мл 0,2 М трисга 0,1 н натрий гидроксид эритмаси «Рифан» индикатори иштирокида рН и 7,4 бўлгунча томзилади. Сўнгра умумий ҳажми сув билан 100 мл га етказилади. Сахарозанинг (нисб. молек. массаси 339), 0,25 М эритмаси: 84,75 г сахараза 0,02 М трис-буферда эритилади.

49. Хроматография усули учун аминокислота эритмалари. Аминокислоталар (0,04) 1/25 М микдорда эритилади.

10 мл сувда эритилади:

глутамин кислота	60 мг
аланин	40 мг
лейцин	50 мг

ёки куйидаги аминокислоталарнинг аралашмасидан фойдаланиш мумкин (10 мл сувда эритилади).

1. Глутамин кислота	60 мг
глицин	40 мг
аланин	40 мг
2. Глутамин кислота	60 мг
лейцин	50 мг
3. Аспарагин кислота	60 мг
серин	40 мг
лейцин	60 мг
4. Аспарагин кислота	60 мг
глицин	40 мг
лейцин	60 мг

Аминокислоталарнинг эрувчанлигини ошириш учун уни сув ҳаммомида қиздириш мумкин.

50. Хлорид кислота билан ишланган алюминий оксид. 500 г (кимёвий тоза) алюминий оксид чинни ҳавончага солиниб, устига 2 л 2 н хлорид кислота қуйилади ва 30—40 дақиқа давомида шиша таёкча билан доимо аралаштириб турган ҳолда қиздирилади. Қиздириш тугатилгач ва хлорид кислота эритмаси чўкмага тушгач суюклик олиб ташланади. Юқоридаги ювиш реакцияси яна бир бор такрорланади. Сўнгра чўкма устидаги суюклик олиб ташланади, унинг устига 1 л бидистилланган сув қуйилади. Алюминий аралашмаси Бюхнер воронкасига ўтказилади-да, алюминий оксиди ювинди сувнинг рН и 6 бўлгунча бир неча марта ювилади. Алюминий оксид қуритувчи шкафта 200—500°C да 4 соат давомида қуритилади. Хлорид кислота билан ишлов берилган алюминий оксид хроматографиянинг иккинчи босқичи учун ишлатилиши мумкин.

51. Калий йодиддаги йоднинг 10 % ли эритмаси. 20 г ка-

лий йодид ва 10 г йод 50 мл сувда эритилиб, ҳажми 100 мл га келтирилади. Крахмалга реакция ўтказиш учун олинган эритма 10 марта суюлтирилади.

52. **Гипобромид эритмаси.** 5 мл бром 30 %ли натрий гидроксиднинг 100 мл сида, совукда ҳаво тортгич шкафта эритилади. Эритма ишлатилиши олдидан 6 марта (1:5) 10% ли натрий гидроксид эритмаси билан суюлтирилади.

53. **Милон реактиви.** 40 г симоб хона ҳароратида 60 мл концентранган азот кислотада (нисбий зичлиги 1,40) эритилади сўнгра эритма азотнинг оксидланишидан ажралган қўнғир буғлар тугагунча илик сув ҳаммомига жойлаштирилади ва эритма аралаштирилади.

54. **Фелинг реактиви.** Кимёвий тоза мис купороси иссик эритмада кристалланиб, филтр қоғозда қуритилади. Алоҳида 2 хил эритма тайёрланади: а) 200 г сегнет тузи ва 150 г ўювчи натрий ишқори ўлчов колбасида эритилади ва унинг ҳажми белгиланган чегарагача етказилади. б) 40 г мис купороси 1 л ли колбада эритилади. Ишлатишдан олдин иккала эритма тенг ҳажмда аралаштирилади.

55. **0,1 н натрий гидроксид эритмаси.** 50 г кимёвий тоза ўювчи натрий 40 мг карбонат ангидридсиз сувда эритилади ва шу заҳоти каучук пробка билан зич беркитилади ва шиша идишга солинади. Кучли ишқорда эриманган натрий бикарбонатнинг (сода) кристаллари ҳосил бўлгунча бир неча кун сақланади. 6 мл ишқор 1 л ҳажмга етгунча сув билан суюлтирилади. Эритманинг нормаллиги фиксациядан тайёрланган 0,1 н хлорид кислота билан текширилади. 0,05 н натрий гидроксид эритмаси 20 мл гача суюлтирилади.

56. **0,1 н сульфат кислота эритмаси.** 2,8 мл сульфат кислота (нисб. зичлиги 1,84) сув билан 1 л ҳажмга етказилади. Унинг титри натрий гидроксиднинг титрланган эритмаси билан аниқланади. 0,01 н сульфат кислота эритмаси 0,1 н эритмадан тайёрланади. 100 мл 0,01 н сульфат кислота билан 1 л ҳажмгача суюлтирилади.

57. **«НАДИ» реактиви (ишлатилишидан 1 соат олдин тайёрланади).** Диметилпарафенилендиаминнинг сувдаги 1 %ли эритмаси α -нафтолнинг спиртдаги 1 %ли эритмаси ва натрий карбонатнинг 1,5 %ли эритмаси билан тенг ҳажмда аралаштирилади. «НАДИ» реактиви тўқ жигар рангга бўялади, у пушти тус олмаслиги керак. НАДИ нинг янги тайёрланган эритмасидан фойдаланилади, сақланганда у тез ўзгаради.

58. **Калий перманганатнинг 1 н эритмаси.** 32 г калий

перманганат эритмаси 50 мл иссиқ сувда (70—80°C) эритилиб, ҳажми 1 л га етказилади. Унинг титри фиксоналдан тайёрланган 1 н шовул кислота билан аниқланади. 0,05 н эритмадан 200 марта суултириб тайёрланади.

59. **Шиша кранлар учун суртма.** 1) 3 қисм вазелин ва 1 қисм парафиндан (парафиннинг эриш ҳарорати 55°C), 2) 500 г вазелин ва 10 г табиий каучук (майда бўлакчалари) 100°C ли сув ҳаммомида каучук эригунча қиздирилади (тахминан 6 кун). Иссиқ қотишма қуйилиши учун унга бир чимдим мум солинади. Агар суртма суюқ бўлиб қолса унга яна бир чимдим мум солинади.

60. **Азотни аниқлаш учун стандарт эритмалар.** Аммоний сульфат эксикаторда доимий оғирликкача қуритилади. Аналитик тарозиларда тортиб олинган 0,9432 г аммоний сульфат 1 л сувда эритилади (1 мл эритма 0,2 мг азот тутати (ёки 0,4716 г си 1 л сувда эритилади) 1мл эритма 0,1 азот тутати).

61. **Креатининни аниқлаш учун стандарт эритма.** 100 мг креатинин 100 мл сувда эритилади (1 мл эритмада 1 мг креатинин бўлади).

62. **Сийдик кислотанинг стандарт эритмаси.** 0,5 г тоза эксикаторда яхшилаб қуритилган сийдик кислотага 0,5 г литий карбонат, 25 мл сув қўшиб, 50—60°C да эригунча қиздирилади. Эритма совитилгач, ҳажми сув билан 1 л га етказилади (1 мл эритмада 0,5 мг сийдик кислота бўлади).

63. **Сув билан тўйинган толуол.** 250 мл толуол 250 мл сув билан воронкада 10—15 дақиқа чайқатилиб, тиндирилади, толуол қавати эҳтиётлик билан ажратиб олинади.

64. **Учламчи хлор-йод-рух эритмаси.** 50 г рух сульфат ва 250 г натрий хлорид 1 л ли қолбага солиб эритилади. Ҳажми сув билан белгигача етказилади ва филтрланади. Фақат ишлатиш олдиан эритманинг бир қисмига 2,5 г калий йодид қўшилади ва ҳажми юқоридаги аралашма билан 100 мл га етказилади.

65. **Сув билан тўйинган фенол.** 100 мл фенол айирув воронкасига солинади (олдиндан сув ҳаммомида 45°C гача қиздирилган) ва унга 25 мл сув қўшиб чайқатилади ва етти қисмга ажралгунча қолдирилади (фенолнинг пастки қавати рангсиз бўлиши керак). Пастки қаватдаги фенол аминокислоталар қоғоз хроматография усули билан ажратиш учун ишлатилади. Фенол билан эҳтиёт бўлиб ишлаш керак.

66. **Фолликулинни аниқлаш учун Фоллин реактиви.** Қайтар музлатгич ўрнатилган қолбага 100 г натрий

вольфрамат, 20 г фосфор молибдат кислота, 50 мл фосфат кислотанинг 85 %ли эритмаси ва 750 мл сув солинади. Қайтар холодильник ўрнатилган калба пробка билан беркитилиб 10 соат давомида қайнатилади, эритма совитилгач унинг ҳажми сув билан 1 л га етказилади.

67. **Фенолфталеиннинг спиртдаги 0,5% ли эритмаси.** 1 г фенолфталеин 100 мл спиртда эритилиб, унга сув қўшилади.

68. **pH и 6,9 бўлган фосфат буфернинг 0,03 M эритмаси.** 0,1 M натрий гидрофосфат эритмаси ва 0,1 M натрий дигидрофосфат эритмаси 1:1 нисбатда аралаштирилади ва 0,1 M натрий хлорид эритмаси билан 3 марта суюлтирилади. Эритма совуқда сақланганда 5—7 кун турғун бўлади.

69. **Калий дигидрофосфат эритмаси.** Калий фосфат 120°C да доимий массагача қурилади. 1 л сувда 4,9 г калий фосфат эритилади (1 мл эритмада 1 мг фосфор бор).

70. **Натрий гидрофосфатнинг икки уратли тузи эритмаси.** 12 молекула сувли натрий фосфат шишага юпка қават қилиб сепилади ва чанг тушмайдиган қуруқ жойда 12—14 кун сақланади. Туз маълум сувни йўқотиб, натрий гидрофосфатга айланади. Натрий фосфат массасининг доимий бўлиши буғланиш тўхтаганлигини билдиради.

71. **Сийдик кислотани аниқлаш учун Фолин-фосфавольфрам реактиви.** 100 г натрий вольфраматнинг нордон тузи, 80 мл 85 %ли фосфат кислота 900 мл сув билан аралаштирилади ва 2 соат давомида қайнатилиб, совитилади. Шундан кейин ҳажми 1 л га етказилади.

72. **Фракцияловчи эритма.** Гель фильтрация учун эритма учта модда аралашмасидан иборат: рибофлавин (Вит В₂)нинг тўйинган эритмаси, гемоглобиннинг 20 %ли эритмаси, кўк декстриннинг (100 мл сувга 50 мг декстрин тўғри келади) тўйинган эритмаси, Акрилекс F-200 билан тўлдирилган колонкага 2 томчи аралашма киргизилади.

73. **Эйконогеннинг ишқорий эритмаси (альфа-1, 2, 4-аминонафтолсульфонат кислота).** 100 мл сувда 30 г натрий гидросульфит эритилади ва унга 0,5 г эйкоген қўшилади. 6 г сувсиз натрий сульфит озгина сувда алоҳида эритилади. Иккала эритма аралаштирилиб ҳажми сув билан 250 мл га етказилади. 2—3 соатдан сўнг эритма филтрланади. Ишқорий эритма (10 мл) дистилланган сув билан 2,5 марта суюлтирилади.

Орцин реактиви. 1. Концентрланган хлорид кислота темир (III) хлорид (FeCl_3)нинг 0,1 %ли эритмаси.

2. Тайёрланган 0,1 %ли темир (III) хлориднинг 10 мл сида 100 мг орцин эритилади.

74. **Акрилекс Р — 200 ёки Р — 100.** Натрий хлориднинг изотоник эритмаси билан гидратланади. Бунинг учун 25 г акрилекс 800 мл 0,85 %ли натрий хлорид эритмаси билан тулдирилади ва кейинги кунгача қолдирилади. Бўрттирилган гомоген маҳсулот ҳосил бўлади. Унинг юқорисида изотоник натрий хлорид эритмасининг қавати бўлиши керак. Бўрттирилган акрилекс ёпиқ идишда, хона ҳароратида бир неча кун, музлатгичда эса кўпроқ сақланади.

**Қон плазмаси ва қон зардоби биокимёвий кўрсаткичларининг
физиологик чегараси**

Аниқланувчи компонент	Текшири- лувчи ма- териал	Нормал катталиқлар		
		Анъанавий бир- ликда	Ҳисоб- лаш ко- эффици- енти	Тавсия қили- нувчи бир- лик (СИ)
Адреналин	Плазма	0,35—0,45	5,458	1,92—2,46 нмоль/л
Аминли азот	Зардоб ёки плазма	20—35 мкг/л	0,714	14,3—25,0 ммоль/л
Аммиакли азот	Қон	25—50 мкг/л	0,714	17,85—35,7
	Плазма	10—30 мкг/л	0,714	7,14—21,42 мкмоль/л
Қолдиқли азот	Қон	20—40 мг/100 мл	0,714	14,3—28,6 ммоль/л
Тузли фракция- ланган альбу- мин	Зардоб	3,2—4,5 г/100 мл	10,0	32—45 г/л
	Зардоб	3,2—4,6 г/100 мл	0,154	0,49—0,69 ммоль/л
Электрофорез альбумини	Зардоб	3,2—5,6 г/100 мл	0,154	0,49—0,86 ммоль/л
Альфа-аминоле- вулин кислота	Зардоб	0,01—0,03 мг/100 мл	76,0	0,76—2,28 мкмоль/л
Альфа - анти- трипсин ¹	Плазма	200—400 мг/100 мл	0,1852	37,04—74,08 мкмоль/л
цАМФ	Плазма	0,25—1,0 мкг/100 мл	30,37	7,6—30,4 нмоль/л
Ацетон	Қон	0,3 мг/100 мл	172,18	0,5—6,5 мкмоль/л
Умумий оқсил		6,0—7,8 г/100 мл	10,0	60—78 г/л
Билирубин: бевосита	Зардоб	0,05—0,25 мг /100 мл	17,104	0,86—4,3 мкмоль
билвосита	—*—	0,1—1,0 мг/100 мл	17,104	1,7—17,1 мкмоль
умумий	—*—	0,1—12 мкг/100 мл	17,104	1,7—20,5 мкмоль
Витамин А	—*—	15—60 мкг/100 мл	0,035	0,52—2,1 мкмоль
Витамин В ₁	Плазма	1,0—1,5 мкг/100 мл	0,03	0,03—0,045 мкмоль
Витамин В ₂	Қон	12 мкг/100 мл	0,275	0,033 мкмоль

Аниқланувчи компонент	Текшири- лувчи ма- териал	Нормал катталиклар		
		Анъанавий бир- ликда	Ҳисоб- лаш ко- эффици- енти	Тавсия қили- нувчи бир- лик (СИ)
Витамин В ₁₂	Қон	0,06—0,14 мкг/100 мл	7,367	0,44—1,03 нмоль
Витамин С	Плазма	0,6—1,6 мг/100 мл	56,776	34,1—90,8 мкмоль/л
	Қон	0,7—2,0 мг/100 мл	56,776	39,7—113,6 мкмоль/л
Н(биотин)	Плазма	0,9—1,8 мкг/100 мл	40,93	36,8—65,5 нмоль/л
Н(биотин) В ₆	Плазма	1—18 мкг/100 мл	0,059	0,059—1,06 мкмол/л
Галактоза	Зардоб	2—17 мг/100 мл	55,51	111—943,7 мкмл/л
Гемоглобин:	Зардоб	ë		
эркакларда	Қон			
аёлларда	Қон	13,5—18,0 г/100 мл	0,155	2,09—2,79 ммоль/л
Гемопексин	Қон	12,0—16,0 г/100 мл	0,155	1,86—2,48 ммоль/л
Гистамин	Плазма	70—130 мг/100 мл	0,125	8,75—16—25 мкмол/л
Гликоген	Қон	0,2—0,8 мкг/100 мл	89,93	17,99—71,94 нмол/л
Глибулинлар	Қон	1,62—3,87 мг/100 мл	10,0	16,2—38,7 мг/л
Глюкоза	Зардоб	ë		
Глюкозаминлар:	плазма			
катталарда	Зардоб	2,3—3,5 г/100 мл	10,0	23—35 г/л
болаларда	Зардоб	70—110 мг/100 мл	0,0555	3,88—6,105 ммоль/л
Глюкурон к-та	Зардоб	61—78 мг/100 мл	0,0558	3,4—4,35 ммоль/л
Ўт кислоталар	Зардоб	52—69 мг/100 мл	0,0558	2,9—3,85 ммоль/л
Темир	— « —	1,2—1,3 мг/100 мл	51,5066	61,81—66,96 мкмоль
	— « —	0—3,0 мг/100 мл	25,47	0,76—4 мкмоль
	— « —	65—175 мкг/100 мл	0,1791	44,8—80,6 мкмоль

Аниқланувчи компонент	Текширилувчи материал	Нормал катталиклар		
		Анъанавий бирликда	Ҳисоблаш коэффициенти	Тавсия қилинувчи бирлик (СИ)
Иммуноглобулин G	Плазма	800—1800 мг/100 мл	0,0625	50—112,5 мкмоль
Иммуноглобулинлар:				
A	Плазма	90—450 мг/100 мл	0,0625	5,62—28,12 мкмоль
M	—«—	60—250 мг/100 мл	0,01	0,6—2,5 мкмоль
D	—«—	5 мг/100 мл	0,0502	0,26 мкмоль
E	—«—	0,006—0,6 мг/100 мл	50,0	0,3—30,0 нмоль/л
Индикан	Зардоб	0,03—0,08 мг/100 мл	39,79	1,19—3,18 мкмоль/л
Йод:				
Борланган оқсид билан	Зардоб	4,0—8,0 мкг/100 мл	78,796	315,18—630,37 нмоль/л
Экстраланган бутанол	Зардоб	3,5—6,5 мкг/100 мл	78,796	275,79 — 512,17 —«—
Калий	Плазма	3,8—4,6 мг экв/л	1,0	3,8—4,6 ммоль/л
	—«—	15—18 мг/100 мл	0,256	3,8—4,6 ммоль/л
	Эритроцитлар	79,8—99,3 мг экв/л	1,0	79,8—99,3 ммоль/л
	—«—	312—388 мг/100 мл	0,256	79,7—99,3 ммоль/л
Кальций:	Зардоб	4,2—5,2 мг/100 мл	0,2495	1,05—1,30 ммоль/л
ионланган	—«—	2,1—2,6 мг экв/л	0,5	1,05—1,30 ммоль/л
умумий	—«—	9,0—10,6 мг/100 мл	0,2495	2,25—2,64 ммоль/л
умумий	—«—	4,4—5,2 мг экв/л	0,5	2,2—2,6 ммоль/л
болаларда	—«—	11,0—13,0 мг/100 мл	0,2495	2,74—3,24 ммоль/л
Кетон тавачалар	Қон	3 мг/100 мл	10,0	30 мг/л
17-кетостероидлар	Плазма	25—125 мкг/100 мл	0,0345	0,86—4,31 мк/моль

Аниқланувчи компонент	Текширилувчи материал	Нормал катталиклар		
		Аъъанавий бирликда	Ҳисоблаш коэффициенти	Тавсия қилинувчи бирлик (СИ)
Кислота-ишқор мувозанати:				
стандарт бикарбонат		21—25 мг-экв/л	1,0	21—25 ммоль/л
Водород кўрсаткичи (рН)	Артерия қони	7,36—7,42	1,0	7,36—7,42
	Вена қони	7,26—7,36	1,0	7,26—7,36
Ортиқча ишқор (ВЕ)	Плазма	(-2,4)—(+2,3) мг-экв/л	1,0	(-2,4)—(+2,3) ммол/л
СО ₂ нинг парциал босими	Артерия қони	35,8—46,6 мм с.у.	0,133	4,76—6,2 кПа
	Вена қони	46—58 мм с.у.	0,133	6,1—7,7 кПа
Кислороднинг парциал босими	Артерия қони	95—100 см с.у.	0,133	12,6—13,3 кПа
	Вена қони	40—45 мм с.у.	0,133	5,3—6,0 кПа
Умумий карбонат ангидрид	Плазма	23—33 мм/л	1,0	23—33 ммоль/л
Кортизол:				
8—10 соат	Плазма	5—25 мкг/100 мл	27,5885	137,9—689,7 нмоль/л
16—18 соат	Плазма	2—18 мкг/100 мл	27,5885	55,2—496,6 нмоль/л
Креатинин:				
эркакларда	Зардоб плазма	0,2—0,6 мг/100 мл	76,2543	15,25—45,75 мкмоль/л
аёлларда	—«—	0,6—1—2 мг/100 мл	76,2543	45,75—76,25 мкмол/л
Креатинин	—«—	0,6—1,2 мг/100 мл	88,4016	53,0—106,1 мкмол/л
Лизоцим	Плазма	0,5—1,5 мг/100 мл	0,6667	0,3—1,0 мкмоль/л
Лимон кислота	Зардоб ёки плазма	0,7—3,0 мг/100 мл	52,0481	88,5—156,1 мкмоль/л
Умумий ёғлар	Зардоб	400—800 мг/100 мл	0,01	4,0—8,0 г/л
Ёғ кислоталар:				
умумий	Зардоб	9—15 мм/л	1,0	9—16 ммоль/л
	Плазма	640—880 мкг-экв/л	1,0	640—880 мкмоль

Аниқланувчи компонент	Текширилувчи материал	Нормал катталиклар		
		Анъанавий бирликда	Ҳисоблаш коэффициенти	Тавсия қилинувчи бирлик (СИ)
овқатдангандан сунг	Плазма	640—880 мкг—экв/л	1,0	640—880 мкмоль
	Плазма	780—1180—«—	1,0	780—1180 мкмоль
Триглицеридлар:	Зардоб ёки плазма	50—150 мг/100 мл	0,0118	0,59—1,77 ммоль/л
Фосфолипидлар:				
умумий	Зардоб	152,5—362,5 мг/100 мл	0,01	1,52—3,62 г/л
Фосфорга нисбатан	Зардоб	6,1—14,5 мг/100 мл	0,3223	1,97—4,68 ммоль/л
Умумий холестерин	Плазма	115—340 мг/100 мл	0,258	2,97—8,79 ммоль/л
Альфа-липопротеидлар:				
эркакларда	Плазма	125—425 мг/100 мл	0,01	1,25—4,25 г/л
аёлларда	Плазма	250—650 мг/100 мл	0,01	2,5—6,5 г/л
Бета-липопротеидлар	Плазма	300—450 мг/100 мл	0,01	3,0—4,5 г/л
Магний	Зардоб	1,5—2,5 мг—экв/л	0,5	0,75—1,25 ммоль
Альфа ₂ -макроглобулин	Плазма	150—350 мг/100 мл	0,0122	1,83—4,27 мкмоль/л
Мис:				
эркакларда	Зардоб ёки плазма	70—140 мкг/100 мл	0,1574	11,0—22,0 мкмоль/л
аёлларда	—«—	85—155 мкг/100 мл	0,1574	13,4—24,4 мкмоль/л
Метгемоглобин	Қон	0,0—0,24 г/100 мл	155,0	0,—37,2 мкмоль/л
Сут кислотаси	Артерия қони	3—7 мг/100 мл	0,111	0,33—0,78 ммоль/л
	Вена қони	5—20 мг/100 мл	0,111	0,55—2,22 ммоль/л
Сийдик кислота:				
эркакларда	Зардоб	2,1—7,8 мг/100 мл	0,0594	0,12—0,46 ммоль/л

Аниқланувчи компонент	Текширилувчи материал	Нормал катталиклар		
		Аънавий бирликда	Ҳисоблаш коэффициенти	Тавсия қилинувчи бирлик (СИ)
аёлларда	Зардоб	2,0—6,4 мг/100 мл	0,0594	0,12—0,38 ммоль/л
Сийдикчил	Қон	20—50 мг/100 мл	0,1665	3,33—8,32 ммоль/л
Натрий	Плазма	134—169 мг-экв/л	1,0	134—169 ммоль/л
	Плазма	310—290 мг/100 мл	0,4345	134—169 ммоль/л
	Эритроцитлар	31—50 мг/100 мл	0,4345	13,4—21,7 ммоль/л
	Эритроцитлар	13,4—21,7 мг-экв/л	1,0	13,4—21,7 ммоль/л
Нейрамин кислота	Зардоб	65 мг/100 мл	32,3311	2101 ммоль/л
Норадреналин	Плазма	0,65—0,81 мкг/100 мл	59,11	38,42—47,88 нмоль/л
П-оксикортикостероидлар	Плазма	13—23 мкг/100 мл	10,0	130—230 мкг/л
17-оксикортикостероидлар эркакларда	—«—	7—19 мкг/100 мл	27,5886	193,—12—5 24,18 нмоль/л
аёлларда	—«—	9—21 мкг/100 мл	27,5886	248,3—579, 36 нмоль/л
Бетта-ёғ-оксид кислота	Қон	0,14—1,9 мкг/100 мл	96,05	13,4—182,5 мкмоль/л
Пироузум кислота	Қон	0,3—0,9 мкг/100 мл	113,56	34,07—102,2 мкмоль/л
Плазминоген	Плазма	20—40 мкг/100 мл	0,07	1,4—2,8 мкмоль/л
Преальбумин	Плазма	10—40 мкг/100 мл	0,1639	1,64—6,56 мкмоль/л
Протопорфирин	Эритроцитлар	15—50 мкг/100 мл	0,0178	0,27—0,89 мкмоль/л
Қанд	Қон	80—120 мг/100 мл	0,01	0,8—1,2 г/л
Альфа ₁ -серомукоид	Плазма	55—140 мг/100 мл	0,2267	12,47—31,74 мкмоль/л
Сиал кислота-лар	Зардоб	55—79 мг/100 мл	10,0	550—790 мл/л

Аниқланувчи компонент	Текширилувчи материал	Нормал катталиклар		
		Анъанавий бирликда	Ҳисоблаш коэффициенти	Тавсия қилинувчи бирлик (СИ)
Серотонин	Қон	5,0—30,0 мкг/100 мл	0,0568	0,3—1,7 мкмоль/л
Соматотропин	Зардоб	10 мг/мл	0,0465	0,47 нмоль/л
Тестостерон: эркакларда	Зардоб ёки плазма	400—1200 мг/100 мл	0,0347	13,8—41,6 нмоль/л
аёлларда	Зардоб ёки плазма	30—120 мг/100 мл	0,0347	1,04—4,16 нмоль/л
Тиреоглобулин	Зардоб	10—26 мкг/100 мл	10,0	100—260 мкг/л
Умумий тироксин	—«—	5—11 мкг/100 мл	12,872	64,36—141, 59 нмол/л
Трансферрин	Зардоб	170—400 мг/100 мл	0,1136	19,3—45,4 мкмоль/л
Фенилаланин: катталарда	Зардоб	3 мг/100 мл	0,0605	0,18 ммоль/л
чақалоқларда	Зардоб	1,2—3,5 мг/100 мл	0,0605	0,073—0,212 ммоль/л
Фибриноген	Плазма	200—400 мг/100 мл	0,0293	5,9—11,7 мкмоль/л
Ноорганик фосфор: катталарда	Зардоб	2—4 мг/100 мл	0,3228	0,64—1,29 ммоль/л
болаларда	Зардоб	4—7 мг/100 мл	0,3228	1,29—2,26 ммоль/л
Фруктоза	Қон	0,1—0,5 мг/100 мл	55,5	5,55—27,75 мкмол/л
Фукоза	Зардоб	7,7—0,9 мг/100 мл.	60,9156	469,05— 548,24 мкмоль/л
Хлоридлар	Қон	295 мг/100 мл	0,282	83,19 ммоль/л
	Зардоб	95—103 мг— экв/л	1,0	95—103 ммоль/л
Церулоплазмин	Зардоб	23—50 мг/—100 мл	0,0662	1,52—3,31 мкмоль/л

Эритмаларнинг нисбий зичликлари

Нитрат кислота			Хлорид кислота			Аммиак			Натрий гидроксид		
нисб. зичл.	моляр 9-мв	100 г. мик.	нисб. зичл.	моляр 9-мв	100 г. мик.	нисб. зичл.	моляр 9-мв	100 г. мик.	нисб. зичл.	моляр 9-мв	100 г. мик.
1,100	2,985	17,10	1,100	6,037	20,01	0,960	5,58	9,91	1,100	2,47	8,99
1,200	6,159	32,34	1,110	6,673	21,92	0,950	7,10	12,74	1,120	3,02	10,79
1,300	9,795	47,48	1,120	7,371	23,82	0,940	8,63	15,63	1,140	3,59	12,59
1,340	11,49	54,07	1,130	7,981	25,75	0,930	10,18	18,64	1,160	4,17	14,39
1,360	12,42	57,57	1,140	8,648	27,66	0,920	11,75	21,75	1,180	4,78	16,19
1,380	13,42	61,27	1,150	9,327	29,57	0,910	13,35	24,99	1,200	5,40	17,99
1,440	17,06	74,68	1,160	10,03	31,52	0,900	14,97	28,33	1,220	6,04	19,80
1,460	18,53	79,98	1,170	10,74	33,46	0,890	16,59	31,75	1,240	6,70	21,60
1,480	20,21	86,05	1,180	11,45	35,38	0,882	18,10	34,95	1,260	7,37	23,42
1,500	22,39	94,09	1,190	12,15	37,23				1,280	8,08	25,25
1,510	23,50	98,10	1,200	12,87	39,11				1,300	8,79	27,07
1,520	24,04	99,67									

МУНДАРИЖА

Кириш	3
I бўлим. Оксилларнинг тузилиши ва уларнинг хоссалари	5
1. Тўқима ва биологик суюқликлардан оксилларни ажратиш усуллари	7
2. Оксилларни хона ҳароратида нейтрал тузлар таъсирида чўқтириш — тузлаш	15
3. Оксил эритмасини томизиш	21
4. Оксилларнинг электрокимёвий хоссалари	21
5. Оксилларга ўтказиладиган сифат реакциялар, оксил таркибидаги аминокислоталарни аниқлаш	27
6. Оксиллар гидролизи ва аминокислоталарни формол титрлаш усули билан аниқлаш	36
7. Қон зардобдаги оксил миқдорини аниқлаш	43
II бўлим. Мураккаб оксилларнинг тузилиши (протеидлар)	48
1. Нуклеопротеидлар	48
2. Фосфопротеидлар	54
3. Гликопротеидлар	55
4. Хромопротеидлар	56
III бўлим. Ферментлар	59
Ферментларнинг умумий хусусиятини ўрганиш	61
1. Ферментлар фаоллигининг муҳитга боғлиқлиги	62
2. Ферментатив реакция тезлигига ҳароратнинг таъсири	65
3. Ферментатив реакция тезлигини ошириш ва сусайтириш	68
4. Ферментларнинг ўзига хослиги, субстратга нисбатан танланувчанлиги	73
5. Фермент миқдорининг реакция тезлигига таъсири	78
6. Субстрат миқдорининг ферментатив реакция тезлигига таъсири	81
7. Ферментлар фаоллигини ўлчаш	84
IV бўлим. Гормонлар	94
Гормонларда ўтказиладиган сифат реакциялар ва уларнинг миқдорини ўлчаш	97
1. Меъда ости бези гормони — инсулин	97
2. Қалқонсимон без гормонлари	99
3. Буйрак усти безининг мағиз кисми гормонлари, адреналин ва норадреналин	101
4. Буйрак усти безининг пўстлоқ кисми гормонлари	108
5. Жинсий без гормонлари	115
V бўлим. Модда ва энергия алмашинуви. Моддалар алмашинувининг умумий йўллари	119
VI бўлим. Оксилларнинг сингиши ва аминокислоталар алмашинуви	137
Меъда ва меъда ости бези шираси таркибини аниқлаш	138
1. Меъда шираси кислоталилигини аниқлаш	140
2. Аминокислоталар алмашинуви	148
VII бўлим. Карбонсувлар алмашинуви.	156
1. Карбонсув алмашинуви	158
Анорганик фосфатни аниқлаш	166
2. Карбонсувлар алмашинуви маҳсулотлари миқдорини аниқлаш	167
3. Карбонсув алмашинувида гормонларнинг таъсири	177
4. Карбонсувлар алмашинувининг охириги маҳсулотларини аниқлаш	182

VIII бўлим. Ёғ алмашинуви	184
Ёғларнинг тузилиши, парчаланиши ва сўрилиши	185
Ёғларнинг оралик алмашинуви	191
IX бўлим. Қон биохимияси	204
1. Қоннинг оксилли ва оксилсиз қисмлари таркибининг аниқлаш	206
2. Қон плазмаси оксиллари	214
3. Қон зардобдаги ферментлар фаоллигини аниқлаш	228
4. Қон зардоби минералларини аниқлаш	240
X бўлим. Сийдик биохимияси	247
1. Сийдикнинг физик-кимёвий хоссалари	249
2. Сийдик минералларини аниқлаш	252
3. Азот алмашинувининг охириги маҳсулотлари	255
Сийдикнинг патологик компонентларини аниқлаш	266
1. Мис тузларининг кайтарилишига асосланган сифат реакция (Гайнес реакцияси)	269
2. Сийдикдаги қандни «Глюкогест» индикатори ёрдамида аниқлаш. Айрим реактивлар ва препаратларни тайёрлаш	270

Ўқув адабиёти

Султонов Рустам Гуломович,
 тиббиёт фанлари доктори, профессор
Холмухамедова Наима Маҳмудовна,
 тиббиёт фанлари номзоди, доцент

БИОХИМИЯДАН АМАЛИЙ МАШҒУЛОТЛАР

Тошкент, 700129, Абу Али ибн Сино номидаги
 тиббиёт наъриёти, Навоий кўчаси, 30.

Мухарририят мудир *Б. Мансуров*
 Мухаррир *М. Қодирова*
 Бадний муҳаррир *Э. Валиев*
 Техник муҳаррир *В. Мешчерякова*
 Мусаххих *С. Абдунабиева*

ИБ № 2110

Босмахонага 06.03.95 да берилди. Босишга 12.06.95 да рухсат этилди. Бичими 84×108¹/₃₂. Газета қоғози. Офсет босма. Адабий гарнитура. Шартли босма табоғи 15,96. Нашр. босма табоғи 17,08. Шартли бўёк-оттиски. 16,17. 2—93-ракамли шартнома. Жами 10000 нусха. 6060-ракамли буюртма. Нархи шартнома асосида.

Ўзбекистон Республикаси Давлат матбуот қўмитаси Тошкент матбаа комбинатининг ижара қорхонаси. Тошкент, Навоий кўчаси, 30.

56 сју

