

## АЙРИМ ЎСИМЛИКЛАРДАН АЖРАТИБ ОЛИНГАН ТАББИЙ МОДДАЛАРНИНГ БИОЛОГИК ФАОЛЛИГИНИ *IN VITRO* ШАРОИТИДА АНИҚЛАШ

Муҳаммаджон Абдувалиевич Мустафакулов

Гулшода Озат қизи Қаландарова

Шерали Насуруллаевич Қўзиёев

Абдуманнон Искандарович Ўралов

Рахматилла Нуриллаевич Рахимов

Биофизика ва биокимё институти

[mmustafakulov@bk.ru](mailto:mmustafakulov@bk.ru)

### АННОТАЦИЯ

Антиоксидантлар организмни эркин радикаллардан ва кислородни фаол шаклларида химоя қиладиган моддалардир. Эркин радикаллар органик молекулаларни кислород билан чала оксидланишида, яъни перекисли оксидланишида ҳосил бўлади.

**Калит сўзлар:** НАДН, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДППГ), Рутан, Провидин, Бехи, Антиоксидант.

### КИРИШ

Маълумки, жигар митохондрияси икки оксидланиш тизимига эга НАД орқали оксидланувчи субстратлар ва сукцинат оксидланишининг ички фосфорланувчи йўли ва қўшилган НАДН эркин оксидланишини ташқи йўли; ушбу йўлнинг нафас олиш занжирининг бошланғич қисми  $V_5$ -редуктазининг НАДН<sub>2</sub>-цитохроми ҳисобланади. Умумий НАДН – оксидаза фаоллигидан РС НАДН оксидаза фаолигини ҳисоблаб чиқарилди. Энзимли антиоксидант тизими супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазалардан ташкил топган. Бу тизим НАДН фонди манбаси бўлиб хизмат қиладиган эркин радикал протон оқимлари тизимини ўчиради [1,2]. Антиоксидантлар эркин радикалли оксидланиш реакциясига тўсқинлик қилади ва бузилган бирикмаларни қайта тиклайди. Уни ўзини ишга ярайдиган ҳолатга ўтиши учун уни яна қайта тиклаши керак бўлади. Шу сабабдан антиоксидантлар тезлик билан икки ёки гуруҳ бўлиб ишлайди, яъни оксидланган шеригини химоя қилади ва тезда уни қайта тиклайди. Ана шундай антиоксидантлардан бири ионол (2,6-дитретбутил-4-метилфенол) ҳисобланади [3]. Антиоксидантларни организмга таъсирини кўрадиган бўлсак,

кўплаб адабиёт маълумотларига кўра флавоноид моддалар табиий антиоксидантлар ҳисобланади. Антиоксидантлар митохондрия мембранасидаги липидларни перекисли оксидланишида ингибирловчи таъсир этиши ва супероксиддисмутаза, каталаза ферментларининг фаолликлари билан изоҳланади. Бундай флавоноидларга рутин, пуликарин, кверцетин, апигенин ва шу каби кўплаб моддалар тажрибаларда антиоксидант хоссаларини намоён қилади. Антиоксидантлар митохондриялар дисфункциясида нафас занжирларида эркин радикалларни ҳосил бўлишини камайтириш, яъни антирадикал механизми иштирокида таъсир этади. Бундан ташқари прооксидант моддалар ҳам бор. Бундай моддалар митохондрияларда эркин радикалларни ортишига олиб келади, натижада мембрана липидларида перекисли оксидланиш жараёни бошланиб кетишига сабабчи бўлади. Бизнинг организмимиз учун кислород миқдорининг меъерий даражадан ортиб кетиши ҳам яхши оқибатларга олиб келмайди. Бу кўринишдаги ҳолат юз берганда эркин радикалларнинг ҳосил бўлиши натижасида хужайра структуралари емирила бошлайди. Организмда эркин радикалларнинг ҳосил бўлиши ва липидларнинг перекисли оксидланиш жараёни кучайиши (баъзан бу жараён оксидатив стресс деб аталади) нафақат кислород миқдори ортиб кетган ҳолатларда, балки бир қатор бошқа сабаблар асосида ҳам юзага келиши мумкинлиги таъкидланган. Шундай қилиб, оксидатив стресс таъсирида биологик мембраналар хусусиятлари ва хужайра функциясида бузилиши юз беради. Липидларнинг перекисли оксидланиши нисбатан учта бевосита таъсир натижасида юз бериш ҳолатларидаги натижалари бўйича кўпроқ ўрганилган [4, 5].

Ўсимликлардан ажратиб олинган айрим препаратларнинг антиоксидантлик ва антирадикаллик хусусиятларини аниқлашдан иборат.

## АДАБИЁТЛАР ТАҲЛИЛИ МЕТОДОЛОГИЯ

а) ДФПГ (радикал)нинг эркин радикалининг оптик зичлиги ўзгаришини қайд этиш орқали кверцетин ва дигидрокверцетиннинг антирадикал фаоллиги аниқланди; б). Руч услубига асосланган усул бўйича водород пероксидга нисбатан бирикмалар (кверцетин ва дигидрокверцетин)нинг антирадикал ва антиоксидант фаоллиги аниқланди; ДППГ усули: Кверцетин ва дигидрокверцетин флавоноидларининг антиоксидант ва антирадикал хусусиятларини ДФПГ (радикал) эркин радикалининг оптик зичлиги ўзгаришини қайд этиш орқали амалга оширилди. Ушбу ишда АРА ни аниқлаш учун биз барқарор радикал 2,2-

дифенил-1-пикрилгидразил (ДППГ) молекулаларининг антиоксидантлар билан қайтарилиш кинетикасини спектрофотометрик ўлчов техникасидан фойдаландик. Синов аралашмалари сувда 1 мг/мл концентрациясида эритилди. ДППГ усули. Ушбу ишда АРФни баҳолаш учун биз антиоксидантлар томонидан барқарор радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДППГ) молекулаларини камайтириш кинетикасини спектрофотометрик ўлчаш усулидан фойдаландик [6]. Усул антиоксидантларнинг барқарор хромогенрадикали 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДППГ) билан ўзаро таъсирга асосланган. Сирка кислотаси билан кислоталанган этанолдаги ДППГ ( $5 \times 10^{-4} \text{M}$ ) стандарт эритмаси иш эритмасини олиш учун 1:10 нисбатда этанол билан суюлтирилди. Олинган эритма 517 нмда 0,9 дан юқори бўлмаган оптик зичликка эга бўлиши керак. 5 мл ДППГ ишчи эритмасига 50 мкл ўрганилаётган ўсимликлардан олинган экстрактлар қўшилди, аралаштирилди ва эритманинг оптик зичлиги пасайиш кинетикаси 30 дақиқа давомида 517 нм тўлқин узунлигида қайд этилди. Назорат намунаси сифатида ДППГ ишчи эритмаси ишлатилган. Антирадикал фаоллик қуйидаги формула бўйича аниқланади:

$$\% \text{ингибирлаш} = \frac{A_{\text{контр}} - A_x}{A_{\text{контр}}} \times 100\%$$

Бу эрда  $A_x$  – синов эритмасининг оптик зичлиги, ҳисоблагич – синов намунасининг оптик зичлиги.

$\text{H}_2\text{O}_2$  усули: Водород пероксидга нисбатан бирикмаларнинг антирадикаллик фаоллигини аниқлаш учун Руч услубига асосланган усул ишлатилган. 2 мл 20 М фосфат тампони, 1 мл 43 М водород пероксид эритмаси ва 1 мл дистилланган сувни ўз ичига олган ҳар бир найчага намуналар алоҳида қўшилди. Назорат сифатида фосфат тампони эритмаси ва фосфат тампонсиз водород пероксид эритмасини қабул қилиш ишлатилган. Хона ҳароратида 10 дақиқа инкубациядан сўнг, намуналарнинг оптик зичлиги фосфат тампонининг назорат эритмасига нисбатан 230 нм да ўлчанди. Водород пероксидни қабул қилиш фоизи қуйидаги формуладан фойдаланиб ҳисоблаб чиқилган:

$$\text{H}_2\text{O}_2\% = [(A_c - A_e) / A_c \times 100]$$

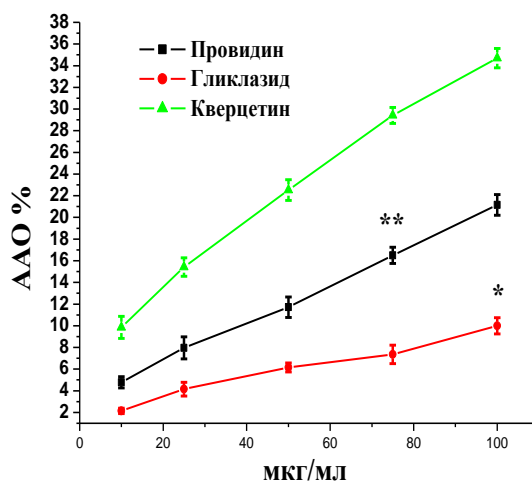
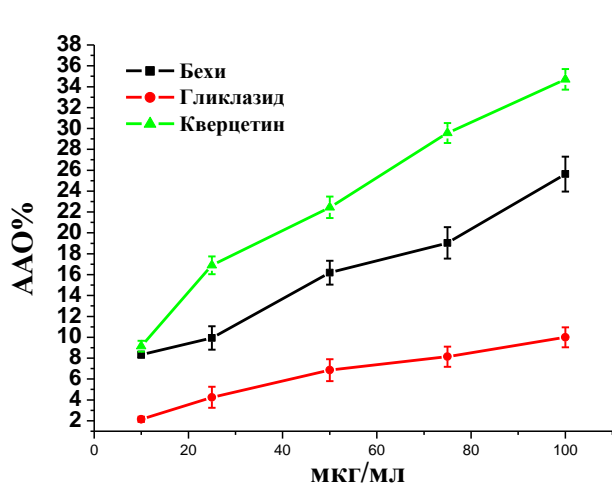
бу ерда  $A_c$  - водород пероксид эритмасининг фосфат тампонсиз оптик зичлиги ва  $A_e$  - намуналарнинг оптик зичлиги.

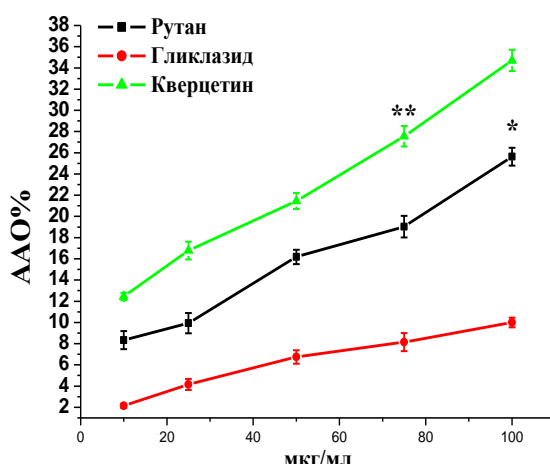
Метод адреналиннинг аутооксидланиш реакциясининг ингибирланишига асосланган, препаратларнинг *in vitro* шароитида адреналинни вақт давомида КФШни ҳосил бўлиши ва аутооксидланиши ҳисобига (%) фоизларда ифодаланади. Бунинг учун 0,2 М

натрий-карбонат ( $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ ) pH=10,65 ли буферидан 2,0 мл, адреналин (эпинефрин) гидрохлориднинг 0,18% эритмасидан 56 мкл олинади, 30 мкл антиоксидант препарат солинади ҳамда тез аралаштириб 30 сониядан 10 дақиқа мобайнида 347 нм тўлқин узунлигида 10 мм кюветада Cary 60 UV-Vis Agilet Technologies спектрофотометрида текширилди. Тадқиқ қилинаётган (экстрактнинг 1 мл даги концентрацияси 1 мг) миқдори стандартсифатида ишлатилади. Назорат намуна сифатида 0,2 М 2,0 мл буфер, 0,18% 56 мкл (5,46 мМ) адреналин ишлатилади [7].

## МУҲОКАМА ВА НАТИЖАЛАР

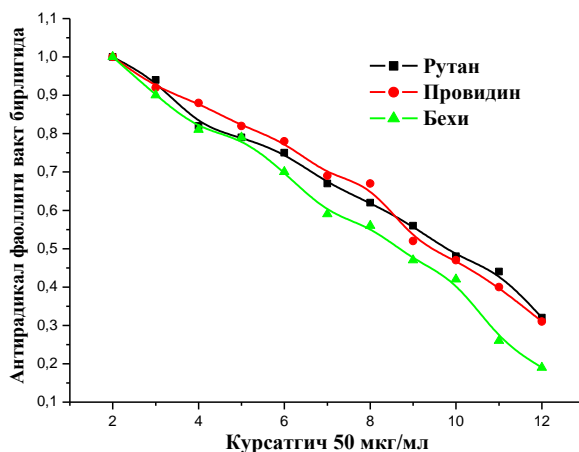
Антиоксидантлар турли хил таъсир механизмларига эга бўлиши мумкин, уларнинг фаоллигини турли усуллар ёрдамида ўрганиш тавсия этилади. Ушбу ишда АРФ экстрактлари эркин радикал ДФПГ билан боғлиқ ҳолда баҳоланди. Текширилувчи ўсимликлардан орлинган бирикмалар ДФПГ нинг сувли эритмасига кўшилганда, эркин радикал молекулалар радикал бўлмаган шаклга айланади, ДФПГ нинг интенсив бинафша рангли эритмаси эса рангсизланади. Синов намуналарининг АРФ ни солиштириш учун тақдим этилган эритмадан 50 мкл ҳар бир экстракт учун концентрация танланган. 1, 2 ва 5-рақамли намуналар жуда юқори АРФ кўрсатганлиги сабабли, биз тегишли эритувчи (сув) билан 1: 100 нисбатда суюлтирдик.





1-Расм. Танлаб олинган препаратларнинг антиоксидантлик хусусиятларини текшириш

Олинган натижаларни таҳлил қилиб, шуни хулоса қилишимиз мумкинки, текширилган 1, 4 ва 5-сонли ўсимликлардан олинган экстрактлар сувли ДФПГ эритмасига қўшилганда, ДФПГ эритмасининг оптик зичлигининг кескин пасайиши кузатилади, бу уларнинг юқори АРФ дан далолат беради (1-расм). 1, 4 ва 5 намуналар учун АРФ 100 марта суюлтирилгандан сўнг баҳоланди, бу ўсимликлардан олинган экстрактларнинг аниқ антирадикал қобилятини кўрсатади.



2- расм. Танлаб олинган препаратларнинг антирадикаллик кўрсаткичи

Эгри чизикли бўлмаган регрессияга асосланган. ДФПГнинг концентрацияси 0,1 мМ ни ташкил қилади. Ўлчовлар текширилган экстрактлар қўшилгандан сўнг дарҳол 20 °С да амалга оширилди.

2-жадвал.

50% ( $IC_{50}$ ) ингибирлаш қилувчи концентрация қийматлари ва текширилган экстрактлар билан реакцияга киришганда ДФПГ контцентрациясини 50% ( $t_{50}$ ) га камайтириш учун зарур бўлган вақт.

Ўсимликлардан олинган экстрактлар	$IC_{50}$ , мкл	$t_{50}$ , сек 50 мкл модда
Рутан	$64 \pm 4.2$	$34 \pm 3.7$
Провидин	$41 \pm 6.7$	$28 \pm 4.9$
1,2,6-три-О-галлоил- $\beta$ -D-глюкоза	$78 \pm 7.8$	$51.1 \pm 4.2$
1-О-галлоил-4,6-гексагидроксидифеноил- $\beta$ -D-глюкоза	$49.8 \pm 3.7$	$37.2 \pm 2.4$
Беги	$85.5 \pm 4.1$	$62 \pm 3.2$
Рутан (суюлтирилган)	$89 \pm 4.8$	$108.5 \pm 7.8$
Провидин (суюлтирилган)	$102 \pm 4.8$	$130.7 \pm 9.1$
1,2,6-три-О-галлоил- $\beta$ -D-глюкоза (суюлтирилган)	$124 \pm 6.7$	$142.1 \pm 8.4$
1-О-галлоил-4,6-гексагидроксидифеноил- $\beta$ -D-глюкоза (суюлтирилган)	$78.2 \pm 3.8$	$102.8 \pm 2.1$
Беги (суюлтирилган)	$115.7 \pm 3.9$	$138.5 \pm 4.9$

Ўрганилаётган экстрактларнинг концентрацияси олдиндан берилган эритмадан 50 мкл ни ташкил қилади. 1, 2 ва 5 намуналар тегишли эритувчилар (сув) билан 100 марта суюлтирилди. 1-расм. Вақтга қараб текширилаётган ўсимлик экстрактларни қўшганда ДФПГ нинг сувли эритмасининг оптик зичлигининг назоратга нисбатан ўзгариши. Экспериментал маълумотлардан маълум бўлишича, 1, 2 ва 5-сонли экстрактлар эркин радикалларни организмдан чиқариб ташлаш учун энг юқори қобилятга эга. Антирадикал фаолликни миқдорий баҳолаш учун биз барқарор радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ), шунингдек,  $t_{50}$  кўрсаткичларидан фойдаландик, ўрганилаётган препаратлар учун радикалнинг дастлабки контцентрациясини камайтириш учун зарур бўлган вақт 50% ингибрланиш фаоллигига эга. ДФПГ нинг 20 °C да экстрактлар билан реакциясида  $t_{50}$  № 1 намуна учун -  $64 \pm 4,2$  с, № 2 намуна учун -  $41 \pm 6,7$  с (100 марта суюлтирилади), № 3 намуна учун -  $69 \pm 4,8$  с (100 марта суюлтирилади), 5-сонли намуна учун -  $254 \pm 5,9$  с (1-жадвал).

Экстрактларни ўрганишда олинган экспериментал натижаларнинг таҳлили шуни кўрсатдики, Рутан, провидин ва беги намуна бошқа намуналар билан солиштирганда эркин радикал ДФПГга нисбатан энг юқори АРФга эга.



## ХУЛОСА

Шундай қилиб, ўсимликлардан олинган экстрактларининг антирадикал фаоллиги ўрганилди. Энг юқори антирадикал фаоллик сувда топилган (Беҳи) экстракти ва (Суммах) ларнинг сувли экстракти танлаб олинган. АРФ механизмини яратиш таркибий қисмларнинг (полифеноллар, флавоноидлар, танинлар, алкалоидлар ва бошқалар) таркиби учун экстрактларнинг сифат ва миқдорий таркибини батафсил ўрганишни талаб қилади. Препаратларнинг антиоксидантлик фаоллиги адреналиннинг *in vitro* шароитида аутооксидланиш реакциясининг ингибитирланиши билан аниқланди ҳамда кислороднинг эркин шаклини ҳосил бўлишига тўсқинлик қилди. 1, 2, ва беҳи препаратлари стандарт антиоксидант кверцетин ҳамда гликлазид антиоксидантлари билан солиштирилди.

## REFERENCES

1. Ishankhodjaev T. et al. Study on Effects of Liposomal Quercetin on Biochemical Parameters of the Nigrostriatal System of Rats with Experimentally Induced Neurodegenerative Disease //Annals of the Romanian Society for Cell Biology. – 2021. – С. 6128-6143.
2. Saatov T. et al. Study on hypoglycemic effect of polyphenolic compounds isolated from the Euphorbia L. plants growing in uzbekistan //Endocrine Abstracts. – Bioscientifica, 2020. – Т. 70.
3. Борисова Г.Г., Ермошин А.А., Малева М.Г., Чукина Н.В.; Основы биохимии вторичного обмена растений: [учеб – метод. пособие, под общ. ред. Г.Г Борисовой]; М-во образования и науки Рос. Федератции, Урал. федер. Ун-т – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та – 2014. – 128 с.
4. Saatov T. et al. Correction of oxidative stress in experimental diabetes mellitus by means of natural antioxidants //Endocrine Abstracts. – Bioscientifica, 2021. – Т. 73.
5. Saatov T. et al. Antioxidant and hypoglycemic effects of gossitan //Endocrine Abstracts. – Bioscientifica, 2019. – Т. 63.
6. Mukhammadjon M. et al. The effect of ngf on indicators of the antioxidant system in rat brain tissue //Universum: химия и биология. – 2021. – №. 9 (87). – С. 82-86.
7. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. -2017; (4). Стр. 180-197.
8. Е.И. Рябина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова, Н.И. Пономарева, Т.Н. Илюшина. /Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при

исследовании процесса аутоокисления адреналина. Химия растительного сырья. 2011. №3. С. 117–121.

9. Мельничук В.А. Экспресс-метод определения антирадикальной активности лекарственных веществ // Хим. Фарм. журн. – 1985. – V.5. – С. 565-567.

10. Seyoum A. Asres K., El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids // Phytochemistry. – 2006. – V. 67. – P. 2058-2070.