

**TURLI MANBALARDAN GIALURON KISLOTANI AJRATIB OLISH****ВЫДЕЛЕНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ****ISOLATION OF HYALURONIC ACID FROM VARIOUS SOURCES***Ibragimova D.SH., Tilavoldiyeva D.H.**E-mail: [dilnoza.ahmedova.1991@gmail.com](mailto:dilnoza.ahmedova.1991@gmail.com)*

Ibragimova D.SH., Tilavoldiyeva D.H. (2023). TURLI MANBALARDAN GIALURON KISLOTANI AJRATIB OLISH. Actacamu, 3(3), 279. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10398933>

**Annotatsiya.** *Gialuron kislotasi (GK) umurtqali hayvonlarning, shuningdek, odamlarning turli to'qimalari va suyuqliklarida mavjud bo'lgan eng keng tarqalgan polimerdir. Ma'lumki, gialuron kislotasi glikozaminoglikanlar sinfiga kiradi. So'nggi paytlarda umurtqali hayvonlarning to'qimalaridan yoki polisaxaridlardan himoya qobig'ini yaratadigan bakteriyalardan ham ekstraktsiya qilishga ko'proq e'tibor qaratilmoqda. Ammo hozirgacha asosan xo'roz tojlaridan GK ajratib olinadi. Shuning uchun bu tadqiqot ishining asosiy maqsadi qoramol, tuxum qobig'i va to'qimalaridan GK ajratib olish va olingan moddalarning IQ spektrini tahlil qilish.*

**Kalit so'zlar va iboralar:** *gialuron kislotasi, ekstraktsiya, IQ spektr, xo'roz toji, buqa terisi, polisaxaridlar, glikozaminglikan.*

**Аннотация.** *Гиалуроно́вая кислота (ГК) – наиболее распространенный полимер, присутствующий в различных тканях и жидкостях позвонков животных, а также человека. Известно, что гиалуроно́вая кислота относится к классу гликозаминогликанов. Из слизи выделены мукополисахариды, которым они придают вязко-смазочные свойства. Эти свойства, в свою очередь, связаны со способностью гликозаминогликанов связывать значительное количество воды. В последнее время повышенное внимание уделяется извлечению ГК из тканей позвоночных животных или из бактерий, создающих защитную капсулу из полисахаридов. Но до сих пор ГК добывали преимущественно из петушиных гребней. Таким образом, основной целью данной исследовательской работы является извлечение ГК из яичной скорлупы и тканей крупного рогатого скота; провести обзор полученных веществ с помощью ИК-анализа.*

**Ключевые слова и выражения:** *гиалуроно́вая кислота, экстракция, ИК-спектр, петушинный гребень, бычья ткань, полисахариды, гликозамингликан.*

**Annotation.** *Hyaluronic acid (HA) is the most abundant polymer present in various tissues and fluids of the spinal cord of animals as well as humans. Hyaluronic acid belongs to the class of glycosaminoglycans. Mucopolysaccharides are isolated from the mucus, which gives it a viscous-lubricating property. These properties, in turn, are associated with the ability of glycosaminoglycans to bind a significant amount of water. Recently, more attention HA has been paid to the extraction of HA from*

*vertebrate tissues or from bacteria that create a protective capsule of polysaccharides. But until now, HA mainly been extracted from rooster combs. Therefore, the main objective of this research work is to extract HA from eggshells and tissues of cattle; examine the resulting substances using IR analysis.*

**Key words and expressions:** *hyaluronic acid, extraction, IR spectrum, rooster comb, bovine tissue, polysaccharides, glycosaminoglycan.*

Gialuron kislotasi (-GlcNAc-GlcUA-) n turidagi tabiiy polisaxarid glikozaminoglikan bo'lib, bu erda GlcNAc N-Asetil-D-glyukozamin va GlcUA D-glyukuron kislotasidir. Ushbu polimer turli xil biriktiruvchi to'qimalarning tarkibiy qismi bo'lib, doimo oqsil bilan bog'liq bo'ladi. Gialuron kislotasi (gialuronan, gialuronat), boshqa glikozaminoglikanlar (GAG) singari, D-glyukuronid- $\beta$ (1,3)-N-asetil-D-glyukozamindan iborat,  $\beta$  (1,4)-glikozid bog'lar bilan bog'langan takrorlanadigan disaxarid bo'lagidan qurilgan tarmoqlanmagan chiziqli polimerdir. Karboksil, gidroksil va asetamid guruhlari ushbu polianion geteropolisaxarid molekulasiga gidrofil xususiyatlarini beradi. Boshqa GAG lardan farqli o'laroq, gialuronan proteoglikan makromolekulalarining qurilishida ishlatilmaydi, biosintezdan so'ng kimyoviy modifikatsiyaga uchramaydi, yuqori molekulyar og'irlikka ega va biriktiruvchi to'qimalarning hujayradan tashqari matritsada erkin holatda bo'ladi [1].

Gialuronan (GU) ning molekulyar og'irligi 105 dan 107 daltongacha, bu 10 000 va undan ortiq takrorlanadigan disaxarid birliklariga to'g'ri keladi. Boshqa GAG larning molekulyar og'irligi pastroq va ular, odatda, sulfat guruhlarning joylashuvi va ularning molekulalarini yig'uvchi fermentlar (glikoziltransferazalar, sulfotransferazalar) funksiyasini muvofiqlashtirish bilan bog'liq ko'plab izomerlar bilan ifodalanadi [2]. Eritmada molekulyar og'irligi 2 500 000 Da bo'lgan GU makromolekulasining o'rtacha bo'ylama kattaligi 10 mkm dan oshadi, bu taxminan inson eritrotsitining diametriga teng va bakterial hujayraning o'rtacha kattaligidan sezilarli darajada katta. GU makromolekulasining uzunligi va egiluvchanligi asosan o'zgaruvchan va S.M.Bichkova va boshqalar (1982) ma'lumotlariga ko'ra, kation tabiati uning makromolekulasi konformatsiyasiga dominant ta'sir ko'rsatadi va bu borada  $\text{Ca}^{2+}$  va  $\text{Mg}^{2+}$  ayniqsa faoldir. Qattiq holatdagi GU zanjiri (natriyli tuzi) chap

tomon yo'nalishga buralgan, 4 ta disaxarid birligidan tashkil topgan spiralni tashkil etadi. Yadro magnit-rezonans usuli bilan GU ning donor va akseptor guruhlarining sterik joylashuviga ega ekanligi ko'rsatildi, bu esa asetamid va karboksilat guruhlari o'rtasida barqaror vodorod aloqalarini hosil qilish uchun zarurdir [3]. GU 1934 yilda Karl Meyer tomonidan sigir ko'zining shishasimon tanasidan (GUalos - shishasimon) topilgan va ajratilgan, keyinchalik GU turli to'qimalardan va umurtqali hayvonlarning ko'pgina biologik suyuqliklaridan ajratilgan. Kindik ichakchasidagi GU miqdori 4100 mkg/g, sinovial suyuqlikda - 1400-3600 mkg/ml, shishasimon tanada - 140-340 mkg/ml, dermada - 200-500 mkg/g, epidermisda - 100 mg/g va undan yuqori, qon zardobida 0,01-0,1 mg/ml [4]. GU hasharotlar, o'simliklar va qo'ziqorinlarda yo'q, ammo bakteriyalar tomonidan faol ravishda sintezlanadi.

Gialuron kislota organizmdagi hujayralar differentsiatsiyasi, to'qimalarning hidratsiyasi va yog'lanishi va ozuqa moddalarining tarqalishi kabi bir qator muhim rollarda rol o'ynash uchun javobgardir. gazlamalarning elastikligi esa uning strukturaviy xususiyatlari va xossalari bilan belgilanadi. Bunday xossalar polielektrolit tabiati, suvni yuqori ushlab turish qobiliyati, suvda eruvchialuron kislotanligi, yuqori yopishqoqligi va gellanish qobiliyatidir [5]. Og'irligi 70 kg bo'lgan odam tanasida 15 g GA mavjud. Uni ishqalanish sodir bo'lgan joylarda gialuron kislotam topish mumkin: bo'g'inlar, tendonlar, qobiqlar, plevra va perikard. Yuqorida aytib o'tilganidek, gialuron kislota ko'p suvni saqlaydi. Shu tufayli terining yosh va sog'lom ko'rinishiga yordam beradi. Teri gialuron kislotasini yo'qotganda, u namlikni saqlab qolish qobiliyatini yo'qotadi. Gialuron kislotasining viskoelastik tabiati, shuningdek, uning biologik mosligi va immunogen emasligi uni artritda bo'g'imlarga suyuqlik qo'shish, to'qimalarni tiklash va jarohatni davolashni tezlashtirish kabi bir qator tibbiy maqsadlarda qo'llashga imkon berdi [6]. gialuron kislotani sopolimerlar bilan o'zaro bog'lash gidrogel yoki nanogel tarmoqlarini hosil qilish qobiliyatini ta'minlaydi [7]. Gialuron kislota kontsentratsiyasi va molekulyar og'irligiga qarab, bu biopolimer hujayralar, to'qimalar va organlarning fiziologik funksiyalarini, suvni bog'lash, ion almashinuvi, molekula hajmiga bog'liq diffuziya va yirik molekulalar va hujayralarga o'tkazmaslik funksiyalarini belgilaydi. Natijada, u yuqori molekulyar og'irlikdagi

toksinlar va mikrobiologik invaziyalardan himoya qiladi. Gialuron kislotasi yallig'lanish darajasini tartibga solib, shikastlangan sohalarda ko'proq qon ivishini tezlatish uchun tanaga signal berib, yaralarni tezroq davolashga yordam beradi. Chunki jarohatlangan joylarda GA ning konsentratsiyasi ortadi [8]. Bundan tashqari, gialuron kislotaning tibbiyotda qo'llanilishi va funksiyasi ham ko'p. Masalan, u ko'z jarrohligida, shox pardani ko'chirib o'tkazishda, osteoartritda, suyak kuchini saqlashda, suyaklarni yaxshi moylashda bo'g'imlarning og'rig'ini yengillashtirishda qo'llaniladi.

So'nggi bir necha o'n yilliklarda gialuronanning urug'lantirishdagi roli (ko'plab in vitro urug'lantirish dasturlarini ishlab chiqish bilan to'g'ridan-to'g'ri bog'liqlik), hujayralar bo'linishi va migratsiyasi, angiogenez, yaralarni davolash va to'qimalarning yangilanishi bo'yicigialuron kislotasi nashrlar soni ortib borayotganiga guvoh bo'ldi. Bugungi kunda GK organizm rivojlanishining yoki ontogenezining barcha bosqichlarida hujayra bo'linishi, migratsiya, differentsiatsiya va to'qima va organlarning yangilanishini tartibga solishda faol ishtirok etishi ma'lum [10].

Gialuronan ko'plab biologik jarayonlarda ishtirok etadi va umurtqali hayvonlarning deyarli barcha tana to'qimalarida mavjud bo'lib, u hujayra faoliyatini tartibga solishda rol o'ynaydi. Gialuronan yadroda, sitoplazmada va hujayralararo suyuqliklarida uchraydi, u yerda hujayra yuzasidagi retseptorlar va oqsillari bilan o'zaro ta'sirlashadi [11]. Gialuron kislotasi va uning tuzlari xo'roz toji (1), buqa ko'zining shox pardasi kabi manbalardan olingan. Bundan tashqari, A va C guruhlari streptokokklarida mavjudligi ma'lum, ular gialuron kislotaning ko'pligi tufayli gialuron kislotasi biosintezi uchun juda mos keladi.

**Tajriba qismi. Qoramol to'qimalaridan GK ajratib olish.** Qoramol to'qimalaridan GK ni ajratib olish quyidagi bosqichlarni o'z ichiga oladi. Hayvonlarning maydalangan to'qimalari 95% etanol bilan ishlanib, 24 soat davomida xloroform bilan denaturatsiya qilinadi. Jarayon eritma rangsiz va shaffof bo'lib qolguncha bir necha marta takrorlanadi. Keyin 20:1 nisbatda suv va xloroform aralashmasi bilan ekstraksiya qilinadi. Aralashma aralastiriladi va 25 ° C haroratda 24 soat davomida aralastirmasdan qoldiriladi, aralash filtrlanadi va ekstraksiya ikki marta takrorlanadi. Birlashtirilgan ekstraktlarga 1: 1 nisbatda natriy xlorid va

xloroformning suvli eritmasi qo'shildi va aralashma 25 ° C da 3-5 soat davomida aralashtiriladi. Keyin aralashma to'liq fraksiyalar ajralguncha saqlanadi. Suvli fraksiya pH 4-5 ga qadar xlorid kislotasi bilan ishlov berildi va yana bir xil hajmdagi xloroform qo'shildi. Xloroform qatlami shaffof bo'lguncha jarayon takrorlanadi. Gialuronan eritmasining pH qiymati HCl qo'shilishi bilan 4,0-5,0 ga keltiriladi. Va nihoyat, eritmaga 3:1 nisbatda etanol qo'shildi va kolba tubida oq GK cho'kmasi hosil bo'ldi.

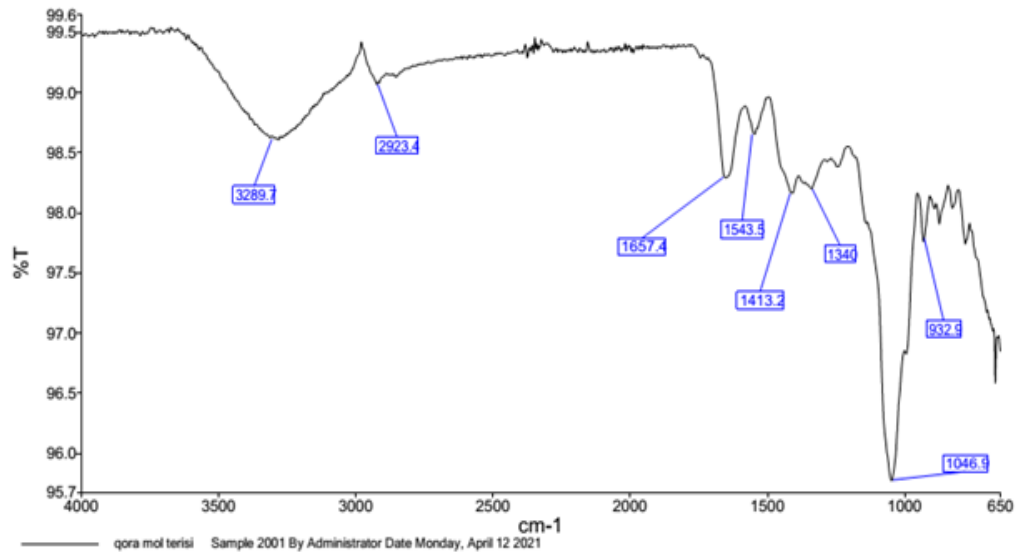
**Natriy sitrat yordamida qoramol to'qimalaridan gialuron kislot ekstraksiyasi.** Birinchidan, qoramol to'qimalari sovuq suv bilan yuviladi. Keyin u quritiladi va 10 g qoramol terisi olinib elektr maydalagichda, so'ngra teridan yog'ni olib tashlash uchun unga 30 ml aseton quyib muzlatgichda joylashtiriladi. Bu ikki marta takrorlandi. Oxirgi ekstraksiya va drenajdan so'ng, qolgan aseton havo oqimida bug'langan. Yog'sizlangan va quritilgan qoramol to'qimalari 1:6 nisbatda 5% natriy sitrat bilan ikki marta 24 soat davomida ekstraksiya qilinadi. Ekstraksiyadan so'ng, qoramol terisi filtrlanib olib tashlandi. Keyin ekstraktlar birlashtiriladi va polisaxarid ikki hajmli metanol va 1 ml 10% HCl bilan cho'ktiriladi. Keyin cho'kma ajratib olinadi.

**Tuxum qobig'idan GK ni fiziologik eritma yordamida ajratib olish.** Dastlab, tuxum qobig'i oq pardasidan ajratilib, IKA-WERKE M20 elektr maydalagichda yaxshilab maydalanadi. Maydalangan tuxum qobig'iga mos ravishda 3: 1 nisbatda 0,9% tuz eritmasi qo'shildi va 40-45 ° C haroratda qaynatiladi, shundan so'ng ekstrakt ajratildi. Ekstraksiya jarayoni ikki marta takrorlanadi va tuxum qobig'i filtr yordamida olib tashlanadi. Keyin ekstraktlar birlashtirildi va suvli ekstraktlarga 4 hajm etanol qo'shildi. Cho'kma sentrafuga qilinadi. Oxirgi mahsulot vakumli quritgichda quritiladi.

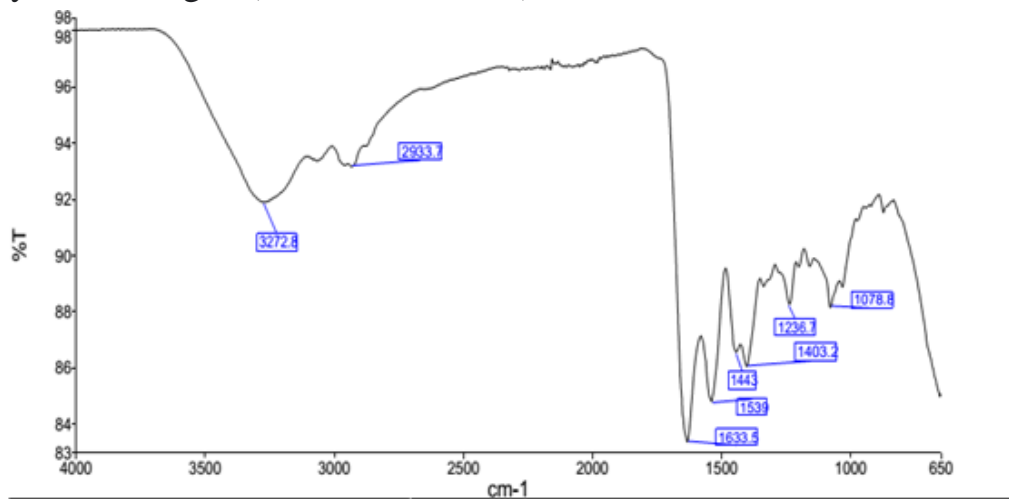
**Natriy sitrat yordamida tuxum qobig'idan GK ekstraksiyasi.** 1:10 nisbatda 5% natriy sitrat bilan maydalangan tuxum qobig'i aralashtirilib, ikki marta ekstraksiya qilinadi. Tuxum qobig'i filtr yordamida ajratib olinadi va eritmalar birlashtiriladi. Eritmalarga 2 hajm metanol va 1 ml 10% HCl qo'shiladi. Keyin aralashma 10 daqiqa davomida cho'kma hosil bo'lguncha aralashtiriladi. Oxirgi mahsulot vakumli quritgichda quritiladi.

**Olingan natijalar va ularning muhokamasi.** Biz BRUKER Fourier Spektrometridan (4000-450 sm<sup>-1</sup>) foydalanib, turli manbalardan olingan GK ning

funksional guruhlari va bog'lanishlarini tavsiflash uchun umumiy aks ettiruvchi FTIR tahlili o'tkazildi va standart gialuron kislotasining infraqizil spektrlari (FT-IR) bilan solishtirildi. Qoramol to'qimalari va tuxum qobig'idan ajratib olingan GK ning IQ



spektrlari quyida keltirilgan (1-rasm va 2-rasm):



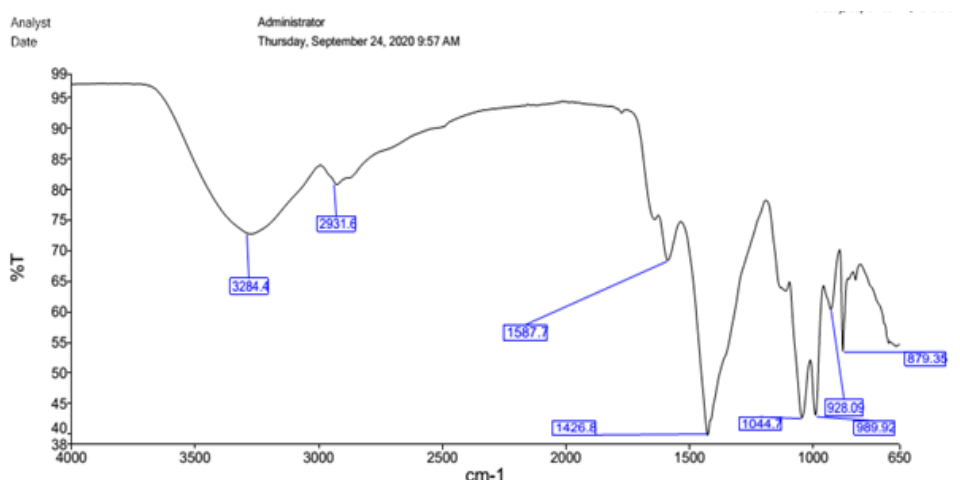
a)

b)

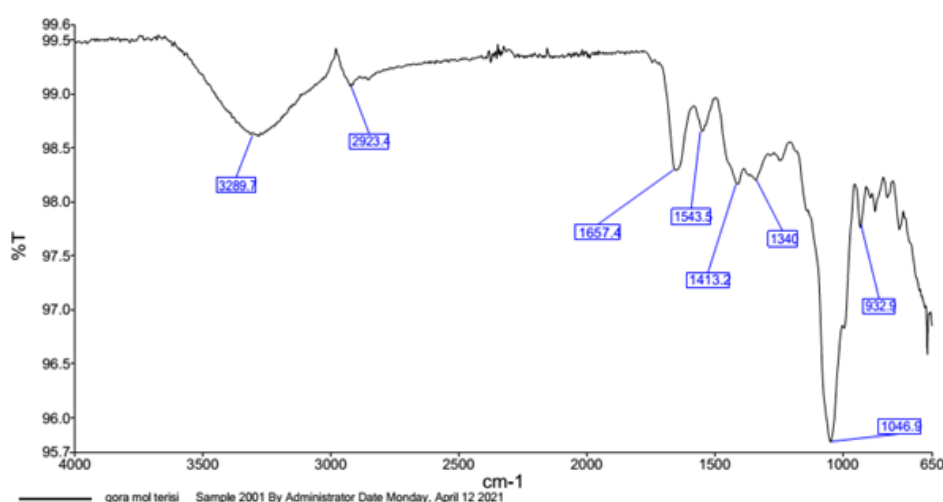
**1-rasm: Fiziologik (a) va sitrat (b) eritmasidan foydalangan holda qoramol terisidan ekstraksiya qilingan GK ning IQ spektrlari.**

Qoramol to'qimalarining IQ spektrlaridan quyidagi natijalar (1-jadval) olingan. Jadval-1. Qoramol terisidan ekstraksiya qilingan GK ning IQ spektrlari natijalari va uni standart gialuron kislotaga bilan taqqoslash.

№	Standart gialuron kislotaning IQ spektrlari	Sitrat eritmasi yordamida ekstraksiya qilingan GKning IQ spektrlari	Tuzli eritma yordamida ekstraksiya qilingan GKning IQ spektrlari	Funksional guruhlar
1	3349 cm <sup>-1</sup>	3289.7 cm <sup>-1</sup>	3272.8 cm <sup>-1</sup>	-OH
2	2925 cm <sup>-1</sup>	2923.4 cm	2933.7 cm <sup>-1</sup>	-C-H
3	1638 cm <sup>-1</sup>	1543.5 cm <sup>-1</sup>	1539 cm <sup>-1</sup>	amid II
4	1409 cm <sup>-1</sup>	1413.2 cm <sup>-1</sup>	1403.2 cm <sup>-1</sup>	-N-H
5	1023 cm <sup>-1</sup>	1046.5 cm <sup>-1</sup>	1078.8 cm <sup>-1</sup>	-C-O-C



a)



b)

**2-rasm. Tuxum qobig'idan ajratib olingan GK ning IQ spektrlari tuz (a) va sitrat (b) eritmasi yordamida.**

Jadval-2. Tuxum qobig'idan ajratib olingan GK ning IQ spektr natijalari va uni standart GK bilan taqqoslash

<b>№</b>	<b>Standart gialuron kislotaning IQ spektrlari</b>	<b>Sitrat eritmasi yordamida ekstraksiya qilingan GKning IQ spektrlari</b>	<b>Tuzli eritma yordamida ekstraksiya qilingan GK ning IQ spektrlari</b>	<b>Funksional guruhlar</b>
1	3349 cm <sup>-1</sup>	3284.4 cm <sup>-1</sup>	3289.7 cm <sup>-1</sup>	-OH
2	2925 cm <sup>-1</sup>	2931.6 cm <sup>-1</sup>	2923.4 cm <sup>-1</sup>	-C-H
3	1638 cm <sup>-1</sup>	1587.7 cm <sup>-1</sup>	1657.4 cm <sup>-1</sup>	Amid II
4	1409 cm <sup>-1</sup>	1426.8 cm <sup>-1</sup>	1413.2 cm <sup>-1</sup>	-N-H
5	1023 cm <sup>-1</sup>	1044.7 cm <sup>-1</sup>	1046.9 cm <sup>-1</sup>	C-O-C

FT-IR tahlillari orqali standart gialuron kislotasi bilan solishtirganda, FT-IR ning barcha spektrlarida topilgan chiziqlar mavjudligi orqali hayvonlar to'qimalaridan ajratib olingan gialuron kislotasining tuzilishini tasdiqlash mumkin.

#### **Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati**

1. J.P. Chen. Functionalized temperature-sensitive copolymer for tissue engineering of articular cartilage and meniscus, *Colloids and Surfaces A*. 313-314 (2008) 254-259.
2. H. Tan, et al., Thermoresponsive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering, *Biomaterials* 30 (36) (2009) 6844-6853.
3. Park, S.N.; Lee, H.J.; Lee, K.H. & Suh, H., Biological characterization of EDC cross-linked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration, *Biomaterials*, Vol.24, (2003) 1631-1641.
4. Balazs, E.A. (1967) *Ber. Dtsch. Ophthalm. Ges.* 68, 536—572
5. By V. N. Khabarov, P. Y. Boykov, M. A. Selyanin. *Hyaluronic Acid: Production, Properties, Application in Biology and Medicine.*

6. Spicer, A.P., McDonald, J.A. (1988) Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family, *Journal of Biological Chemistry*.
7. Tai-Jin Kim, Yoon-Jun Lee, and Duk-Jung Kim. Separation of Hyaluronic Acid from Plant and Animal Tissues.
8. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты) [Текст] / Т.В. Сологуб [и др.]. – М., 2008. – 246 с.
9. Scott, J.E. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a <sup>13</sup>C NMR study [Text] / J.E. Scott, F. Heatley // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – Vol. 96, № 9. – P. 4850-5.
10. Костина Г., Радаева И. Использование гиалуронозойкислоты в медицине и косметологии // *Косметика и медицина*, 1999. — № 2-3. — С. 53-57.
11. Hyaluronan chain conformation and dynamics [Text] / S. Furlan [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2005. – Vol. 340, № 5. – P. 959-70.