

На правах рукописи

ФАЙЗУЛЛОЕВА МУКАРРАМА МАХМУДЖОНОВНА

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДОВ И ИХ КООРДИНАЦИОННЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С БИОАКТИВНЫМИ МЕТАЛЛАМИ НА
БИОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Душанбе - 2018

Работа выполнена на кафедре органической и биологической химии государственного образовательного учреждения «Таджикский государственный педагогический университет» им. С. Айни

Научный руководитель:

Бобизода Гуломкодир Муккамол
доктор биологических наук,
профессор, президент Академии
образования Таджикистана

Официальные оппоненты:

Халиков Ширинбек Халикович
доктор химических наук,
профессор кафедры органической химии
Таджикского национального
университета;
Шамсудинов Шабон Нажмудинович
кандидат биологических наук,
заведующий печеночно-панкреальным
отделом ГУ «Института
гастроэнтерологии» Министерства
здравоохранения и социальной защиты
населения Республики Таджикистан

Ведущая организация:

Таджикский государственный
медицинский университет имени Абуали
ибни Сино, кафедра биохимии

Защита состоится «29» июня 2018 г. в 14⁰⁰ на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.096.02 на базе Таджикского национального университета, Института ботаники, физиологии и генетики растений АН РТ по адресу 734025, г. Душанбе, пр. Рудаки, 17

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Таджикского национального университета и на сайте www.tnu.tj.

Автореферат разослан ___ _____ 2018 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

Хамрабаева З.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние десятилетия значительно увеличилось количество лекарственных препаратов, представляющих собой синтетические аналоги природных биологически активных веществ. Значительно безопасными из них являются препараты на базе синтетических пептидов, поскольку последние не чужеродны живому организму и поэтому вызывают наименьшее количество побочных реакций. Значительную часть из этих препаратов составляют иммуномодулирующие препараты, в частности, на основе пептидов тимусного происхождения. Обнаружено, что имеющиеся в тимусных экстрактах дипептиды Н-Ile-Trp-OH, Н-Lys-Glu-OH, Н-Glu-Trp-OH обладают иммуномодулирующими свойствами. Указанные пептиды оказывали наиболее выраженное стимулирующее воздействие на экспрессию CD4⁺ рецепторов лимфоцитов крови, но не влияют на CD 8⁺, за исключением дипептида Н-Ile-Trp-OH. С использованием указанных дипептидов были разработаны высокоэффективные иммуномодулирующие препараты тимоген (Н-Glu-Trp-OH), вилон (Н-Lys-Glu-OH), тимогар (Н-Ile-Trp-OH). Кроме этих пептидов важное участие в работе иммунной системы принимают определенные микроэлементы, одним из которых является цинк. Несомненно, цинк активно участвует в действиях клеточного и гуморального иммунитета против бактерий, вирусов, паразитов и опухолевых клеток. Показано, что при формировании координационных соединений ионов различных биоактивных металлов с иммуноактивными пептидами происходит увеличение специфической и расширение спектра биологической активности последних [Бобиев Г.М. и др., 2003, 2009].

Считается общепринятым, что биологическая активность пептидов обусловлена биологической активностью входящих в их состав аминокислот. Определенная группа аминокислот выступает в качестве автономных регуляторов, в том числе деятельности мозга и иммунной системы. К примеру, на хорошем уровне исследованы глутамат- и аспартатергические нейротрансмиттерные мозговые системы, их разделение, механизмы рецепции и функциональные свойства [Раевский К.С., 1989].

Поэтому исследование процессов комплексообразования лизина, триптофана и глутаминовой кислоты с ионами биоактивных металлов, как по отдельности, так и в смеси, и изучение влияния образованных комплексов на

биохимические и иммунологические процессы является весьма актуальным, поскольку может привести к разработке новых препаратов с высокой терапевтической эффективностью.

Степень разработанности темы.

Большое количество работ посвящено синтезу пептидных соединений, которые находят различные применения в разных областях медицины. Для увеличения эффективности диапазона биологической активности пептидных препаратов, в основном, в этих работах [Акат'ева М.Е., 2004; Евсеев А.В., 2006; Кочергина Л.А., 2008; Молодкин А.К., 2008; Singh M., Singh D.P., 2009 и др.] используются их модифицированные аналоги путем замены аминокислотных остатков. Вместе с тем модификацию природных пептидов можно производить не только изменением их аминокислотной последовательности, но и образованием координационных соединений с ионами металлов, в том числе и биологически активных. Установлено, что иммуномодулирующими свойствами обладают аминокислоты глицин, лизин, триптофан, глутаминовая кислота и их смеси [Морозов В.Г. и др., 1996; Бобиев Г.М. и др., 2000; Северянова Л.А. и др., 2007]. Лизин и триптофан, кроме этого, проявляют также и некоторую нейротропную активность.

Однако в литературе все ещё недостаточно сведений о комплексообразовании этих аминокислот с биоактивными металлами в растворе, смешаннолигандном комплексообразовании их с ионами цинка и железа и биологической активности образующихся при этом комплексных форм.

Цель исследования - получение новых иммуномодулирующих пептидных соединений, исследование процессов комплексообразования триптофана и пептидов, имеющих остатки триптофана, с ионами железа и цинка, изучение их биологической активности.

Чтобы достигнуть обозначенную цель, целесообразно было решить нижеследующие задачи:

- синтезировать новые иммуноактивные пептиды;
- исследовать процессы комплексообразования триптофана с ионами железа и цинка;
- установить биологическую активность полученных координационных соединений;
- изучить фармакологические свойства полученных соединений.

Предмет и объект исследования. Предметом исследования были тимусные иммуноактивные пептиды, образованные в результате их синтеза

новые полипептидные лизинсодержащие соединения, процессы комплексообразования триптофана с ионами железа и цинка, биологическая активность дипептида изолейцил-триптофан и его комплекса с ионами биоактивных металлов (цинк, железо) при терапии разных болезней, новых синтезированных пептидов и их координационных соединений. Объектами исследования биологической активности были кролики, молодняк крупного рогатого скота, пациенты.

Методологическая, теоретическая и эмпирическая база исследования

При получении потенциально иммуноактивных лизинсодержащих низкомолекулярных пептидов применялся метод тактики максимальной защиты; при получении дипептидов - выполнение конденсации методом смешанных ангидридов; при синтезе больших пептидов - как ступенчатое пополнение пептидной цепи с участием пентафторфениловых эфиров, как активированных эфиров, образующихся при применении дипентафторфенилкарбоната, так и проведение блочной конденсации с применением метода смешанных ангидридов.

Очистку промежуточных защищенных ди-, три- и тетрапептидов проводили стандартным методом путем промывания их этилацетатных растворов кислыми и основными реагентами.

Производные аминокислот были получены по стандартным методикам [Гершкович А.А. и др., 1992; Гринштейн Дж. И др., 1965].

Изучение процесса формирования координационных соединений триптофана с ионами цинка и железа (II) проводилось методом УФ - спектрофотометрического анализа с применением растворов изомолярной серии и рН-метрического титрования. Использовался спектрофотометр СФ-46 с кюветами длиной поглощающего слоя 10 мм с участием в качестве контрольного раствора дистиллированной воды.

Оценку биологических и иммунологических свойств проводили по результатам анализов биохимических, гематологических и иммунологических показателей крови.

Основные результаты, выносимые на защиту:

1. Методика синтеза новых соединений пептидов.
2. Получение и биологические свойства биокоординационных соединений триптофана с ионами железа и цинка совместно с 1-(хлорметил)силатраном;
3. Схемы получения лизинсодержащих пептидов;

4. Схемы применения и результаты биологических исследований биокоординационных соединений триптофана с ионом железа совместно с 1-(хлорметил)силатраном при экспериментальном авитаминозе кроликов;
5. Влияние изолейцил-триптофана и его комплекса с ионом железа на различные биохимические и иммунологические показатели крови.

Научная новизна.

1. Впервые получены новые иммуноактивные лизинсодержащие пептиды H-Pro-Lys-Lys-Gly-OH, H-Pro-Ala-Lys-Val-OH, H-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-OH и H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH.

2. Исследованы процессы комплексообразования при взаимодействии триптофана с ионами цинка и железа в растворе методом изомолярной серии с использованием вторых производных УФ-спектров.

3. Установлено, что применение биокоординационных соединений триптофана с ионом железа совместно с 1-(хлорметил)силатраном способствует нормализации биохимических показателей крови и ускорению роста шерсти при экспериментальном авитаминозе. Комплекс изолейцил-триптофан с ионом железа, представляющий собой биокоординационное соединение низкомолекулярного иммуноактивного пептида, обладающего активностью тимозина α_1 с ионом железа, нормализует содержание ОЖСС и биохимические показатели крови при железодефицитной анемии.

4. Доказано, что применение комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа у больных сосудистыми заболеваниями – болезнью Рейно способствует нормализации биохимических и иммунологических показателей.

Теоретическая и практическая ценность работы.

- изложенная методология синтеза соединений пептидов, процессов их комплексообразования с ионами железа и цинка и оценка их биологических свойств может быть полезна для получения других соединений пептидов и разработки новых препаратов;

- составлены оптимальные схемы биотехнологии получения лизинсодержащих тетра- и пентапептидов;

- разработаны технологические схемы получения лизинсодержащих пентапептидов H-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-OH и H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH, а также получения комплексов триптофана с ионами железа и цинка совместно с (1-хлорметил)силатраном).

- доказана биологическая эффективность полученных новых соединений низкомолекулярных пептидов, а также их координационных соединений с ионами железа и цинка.

Степень достоверности и апробация работы. Научные положения и выводы обоснованы и обусловлены воспроизводимыми экспериментальными данными, степень достоверности которых доказана путем статистической обработки с использованием программы «Statistica 6.0» и приложения Excel, проведенными обследованиями больных, достоверностью и объективностью методов исследований, качеством проведения лабораторных анализов.

Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на республиканской конференции «Природные ресурсы Таджикистана: рациональное использование и охрана окружающей среды» (Душанбе, 2001), научном симпозиуме «Актуальные проблемы спектроскопии водородной связи» (Душанбе, 2001), Международной научно-практической конференции, посв. 60-летию ТаджНИВИ «Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях» (Душанбе, 2003), Третьей республиканской научной конференции биохимиков РТ «Вклад биохимиков в развитие биологической науки» (Душанбе, 2003), научно-теоретической конференции «Современные проблемы физики и астрофизики» (Душанбе, 2005), научно-практической конференции «Основные достижения и перспективы развития фармацевтического сектора Таджикистана» с международным участием, посвященной 25-летию фармацевтического факультета ТГМУ им.Абуали ибн Сино (Душанбе, 2006), Материалы республиканской научно-практической конференции «Проблемы дифференцированного обучения (Душанбе, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи в журналах, включенных в перечень ВАК РФ.

Личный вклад автора состоит в постановке задач исследований выборе способов получения пептидов, в разработке методологии и проведении биологических экспериментов, в получении и обработке экспериментальных данных, в обобщении результатов эксперимента, в формулировке выводов и положений диссертации. Основная часть работ выполнена в 2003 -2004 годах в период обучения в очной аспирантуре при кафедре органической и биологической химии ТГПУ им. С. Айни. Подготовка к печати научных работ, отражающих результаты диссертационного исследования, осуществлена автором самостоятельно или при участии соавторов.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, трех глав основного текста, заключения, выводов, списка использованной литературы из 136 наименований. Данные проиллюстрированы 12 таблицами и 14 рисунком. Диссертационная работа изложена на 145 страницах компьютерного набора.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 03.01.04 – Биохимия: пункты 5 и 7.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность научного исследования, сформулированы цель работы, её научная новизна, практическая значимость, изложены положения, перечислены научные конференции, на которых проходила апробация основных результатов исследования.

В **первой главе** дается литературный обзор по пептидам, их структурам и биологической активности, более подробно - по активным тимусным пептидам, их получению, биологическим свойствам и практическому применению, обоснован выбор направления исследований.

Во **второй главе** излагаются использованные материалы и методы получения новых соединений пептидов. Подробно приводятся методики получения тетрапептидов H-Pro-Lys-Lys-Gly-OH, H-Pro-Ala-Lys-Val-OH, пентапептида H-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-OH (методом ПСА и активированных эфиров), пентапептида H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH методами блочной конденсации с применением активированных эфиров ступенчатого наращивания пептидной цепи, активированных эфиров (дипептид Z-Ser(OBzl)-Pro-OH), смешанных ангидридов и карбодиимидного метода (трипептид HCl·H-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OBzl). При этом были использованы аминокислоты L-ряда и производные аминокислот («Reanal», Венгрия).

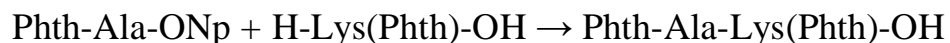
Индивидуальность и степень чистоты полученных соединений проверяли методом тонкослойной хроматографии на хроматографических пластинках «Silufol UV-254» («Chemapol», Чехия) и «Merck» (Германия») в следующих системах растворителей: А - хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота, 9:3:1:0,3, Б - хлороформ-метанол-уксусная кислота, 32:2:1, В - н-бутанол-уксусная кислота-вода, 4:1:1, Г - уксусная кислота-хлороформ-метанол, 1:3:2,2, Д - уксусная кислота-хлороформ-метанол-этилацетат, 0,1:6:1:3, Е - хлороформ-метанол-этилацетат-гексан, 6:1:3:0,3, Ж - хлороформ-метанол,

8:2. Проявление хроматограмм проводили последовательной обработкой хлором и насыщенным раствором бензидина в 2%-ной уксусной кислоте. Приведенные температуры плавления (не скорректированы) определяли на нагревательном столике «Voetius» (Германия). Растворы веществ упаривали в вакууме при температуре не выше 40°C. рН-метрические исследования проводили на рН-иономере MS-20. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-46 в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Далее изложены материалы и методы определения общего белка сыворотки крови, белковых фракций сыворотки крови и определения железа. Исследования крови проводились на биохимическом анализаторе DIRUI DR-7000D с использованием соответствующих диагностических наборов производства ЗАО "Эколаб", Россия.

Методы статистической обработки результатов исследования. Все эксперименты проводились не менее, чем в 3-х повторностях. Результаты обработаны методами статистики с применением компьютерных программ «Statistica 6.0» и Excel. Для выявления достоверности различий данных, соответствующих нормальному распределению, использовали t - критерий Стьюдента

Результаты синтезов и получения дипептида Phth-Ala-Lys(Phth)-ОН, лизинсодержащих тетрапептидов и их обсуждения приведены **в третьей главе**. Синтез защищенного дипептида Phth-Ala-Lys(Phth)-ОН был проведен методом активированных эфиров с использованием С-концевого остатка лизина со свободной карбоксильной группой по схеме:



Производные аминокислот были получены по стандартным методикам. Физико-химические характеристики синтезированных соединений приведены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические характеристики синтезированных соединений.

Соединение	Выход, %	Тпл., °С	Хроматографическая подвижность	
			А	Б
Phth-Ala-OH	87	аморфн.	0,67	0,89
Phth-Ala-ONp	84	аморфн.	0,79	0,94

Phth-Ala-Lys(Phth)-ОН	73	аморфн.	0,56	0,71
-----------------------	----	---------	------	------

А - хлороформ-метанол-уксусная кислота (18:2:1)

Б - пиридин-н-бутанол-уксусная кислота-вода (30:2:6:24).

Низкий выход ϵ -фталил-лизина объясняется плохой растворимостью в толуоле медного комплекса лизина.

При синтезе лизинсодержащих тетрапептидов H-Pro-Lys-Lys-Gly-ОН и H-Pro-Ala-Lys-Val-ОН было использовано ступенчатое наращивание пептидной цепи начиная с С-конца методом активированных эфиров с использованием тактики максимальной защиты. В качестве активированных были использованы пентахлорфениловые эфиры. Для защиты α -аминогруппы в качестве временной защиты использовали трет-бутилоксикарбонильную группу, для защиты α -аминогрупп N-концевого пролина использовали бензилоксикарбонильную группу. Последняя группа была применена для запрещения ϵ -аминогруппы лизина. Для воспрепятствования α -карбоксийных групп С-концевых аминокислот брали сложноэфирную бензильную группу. Трет-бутилоксикарбонильную группу на промежуточных этапах синтеза снимали действием 3,17 М раствором HCl в этилацетате на протяжении 30 мин. Бензилоксикарбонильную и бензильную группы удаляли с помощью каталитического гидрирования с участием 5%-ного палладия на активированном угле. Такой выбор защитных групп дал возможность проводить завершающее разблокирование за одну стадию. Выход защищенных промежуточных пептидов на стадиях конденсации составлял 68,8-80,4%.

Следовательно, изучение синтеза низкомолекулярных потенциально иммуноактивных пептидов подтвердило, что для такого синтеза одним из оптимальных способов является применение тактики максимальной защиты и ступенчатого нарастания пептидной цепи методом активированных эфиров, начиная с С-конца. Подобный подход был применен и для синтеза пентапептида H-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-ОН. Второй пентапептид H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-ОН может быть получен как аналогично первому - ступенчатым наращиванием пептидной цепи, так и методом блочной конденсации, поскольку остаток пролина находится во второй позиции и при реакциях конденсации блоков в случае С-концевого остатка пролина не наблюдается рацемизации.

Поскольку предыдущие эксперименты не выявили какого-либо преимущества у одного из методов, при синтезе пентапептида H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-ОН сравнивали тактику ступенчатого наращивания пептидной цепи

начиная с С-конца и тактику блочной конденсации. При синтезе ступенчатым наращиванием пептидной цепи использовали метод активированных (пентафторфениловых) эфиров. Выбор защитных групп был таким же, как и в предыдущих синтезах. Общий выход свободного пентапептида H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH составил 32,2%.

Во всех синтезах с использованием ступенчатого наращивания пептидной цепи промежуточные защищенные пептиды очищали промыванием их этилацетатных растворов кислыми и основными реагентами. После снятия N-защитной трет-бутилоксикарбонильной группы действием раствора HCl в этилацетате, пептиды со свободной аминогруппой вводили в реакцию конденсации сразу после упаривания реакционной смеси и удаления под вакуумом избытка хлористого водорода.

При синтезе пентапептида H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH с использованием тактики блочной конденсации аминокислотная последовательность пентапептида была разбита на два блока - H-Ser-Pro-OH и H-Lys-Lys-Ala-OH. Защищенный дипептид Z-Ser(OBzl)-Pro-OH был получен методом активированных (пентафторфениловых) эфиров. Трипептидный блок Boc-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OBzl был получен по аналогичной схеме.

Как показывают полученные результаты, все схемы синтеза приводят к получению продукта с приблизительно одинаковым выходом.

Разработаны технологические схемы получения лизинсодержащих пентапептидов. Получение пентапептида H-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-OH ПСА-методом включает 5 стадий и 84 технологические операции. Четыре стадии представляют собой стадии конденсации и пятая стадия - стадия деблокирования защищенного пентапептида. Проведенный анализ различных схем получения пентапептида H-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-OH показывает, что в данном случае наиболее технологичным оказывается получение пентапептида методом блочной конденсации при ее проведении методом смешанных ангидридов и ступенчатое наращивание пептидной цепи методом активированных эфиров с использованием в качестве последних пентафторфениловых эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната.

Таким образом, с технологической точки зрения при получении пептидов оптимальным является использование тактики максимальной защиты, при получении дипептидов оптимальным является выполнение конденсации методом смешанных ангидридов, а при синтезе больших пептидов оптимальным способом можно считать, как ступенчатое наращивание пептидной цепи

методом активированных эфиров с использованием в качестве последних пентафторфениловых эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната, так и осуществление блочной конденсации при использовании для этого метода смешанных ангидридов.

Далее изложены результаты изучения процессов комплексообразования триптофана с ионами цинка и железа (II). Для этой цели, в первую очередь, были определены экспериментальные константы диссоциации триптофана: $K_1 = 9,66 \cdot 10^{-3}$ ($pK_1 = 2,015$), $K_2 = 3,98 \cdot 10^{-10}$ ($pK_2 = 9,4$) (по литературным данным $pK_1 = 2,38$, $pK_2 = 9,39$). Диаграмма состояния триптофана, построенная по данным рН-метрического титрования, показывает, что в области $pH < 2$ триптофан существует в виде катиона и цвиттер-иона, в области рН от 4 до 8 – в виде цвиттер-иона, в области $pH > 10$ – в виде аниона.

Координационные соединения получали смешиванием 0,01 М растворов триптофана и соли металла с эквимольным соотношением компонентов и титровали 0,05 М раствором NaOH. Отличие кривых титрования растворов с ионами металлов от кривой титрования триптофана позволяет предположить, что при их взаимодействии происходит образование координационных соединений.

Тот факт, что в начале титрования растворы триптофана с цинком и железом имели рН, равное 5,6 и 4,5, соответственно, позволяет предположить, что во взаимодействии с цинком и железом в качестве лиганда будет участвовать триптофан в цвиттер-ионной форме (HL^\pm) и можно предположить следующие возможные реакции комплексообразования:

В первоначальном растворе с цинком: В первоначальном растворе с железом (II):



По мере титрования щелочью в растворе концентрация цвиттер-иона будет уменьшаться и в качестве лиганда будет большей частью выступать анионная форма триптофана и наряду с указанными реакциями в растворе можно предположить протекание следующих реакций:



Все вышеизложенное позволяет заключить, что при расчете функции образования и взаимодействии ионов металлов с аминокислотами необходимо

учитывать большое число возможных равновесных реакций, протекающих в растворе.

На следующем этапе работы была исследована применимость метода изомолярных серий для определения состава координационных соединений.

Растворы изомолярной серии получали взаимодействием разбавленных водных растворов триптофана и ацетата цинка при 25, 70 и 100°C при $C=1,133 \cdot 10^{-4}$ моль/л и снимали УФ-спектры растворов изомолярной серии снимали на спектрофотометре СФ-46 в кюветах с длиной поглощающего слоя 10 мм с использованием в качестве контрольного раствора дистиллированную воду. Наибольшие отличия в УФ-спектрах образующихся соединений от УФ-спектра триптофана были получены при молярном соотношении лиганда и цинка, равном 1:2 и температуре реакции 100°C.

Для изучения состава образующихся координационных соединений использованы вторые производные УФ-спектров растворов изомолярной серии, которые широко используются в химии белков для разделения перекрывающихся спектров ароматических аминокислот. Вторые производные были рассчитаны по данным УФ-спектроскопии. На вторых производных УФ-спектра триптофана отмечались четыре четких пика при 231, 233, 283 и 291 нм, причем последний пик является характерным именно для остатка триптофана при его локализации в белковой молекуле. На графиках вторых производных УФ-спектров растворов изомолярной серии происходит уменьшение интенсивности пиков при 231, 233, 283 и 291 нм. Только на графике второй производной УФ-спектра изомолярного раствора с соотношением цинка и триптофана, равным 1:2, исчезал пик при 291 нм и появлялся четкий пик при 235 нм, почти равный по интенсивности пику при 233 нм триптофана, который можно с уверенностью отнести к пику образовавшегося координационного соединения с составом $[Zn(H-Trp-OH)(H_2O)_4](CH_3COO)_2$.

С использованием УФ-спектроскопии и вторых производных УФ-спектров методом изомолярных серий установлено, что при взаимодействии иона цинка и триптофана образуются координационные соединения с соотношением металла-комплексообразователя и лиганда, равным 1:2. На рис. 1 приведены УФ-спектры некоторых из полученных растворов. видно, что наибольшие отличия в УФ-спектрах образующихся соединений от УФ-спектра триптофана были получены при молярном соотношении лиганда и цинка, равном 1:2 и температуре реакции 100°C.

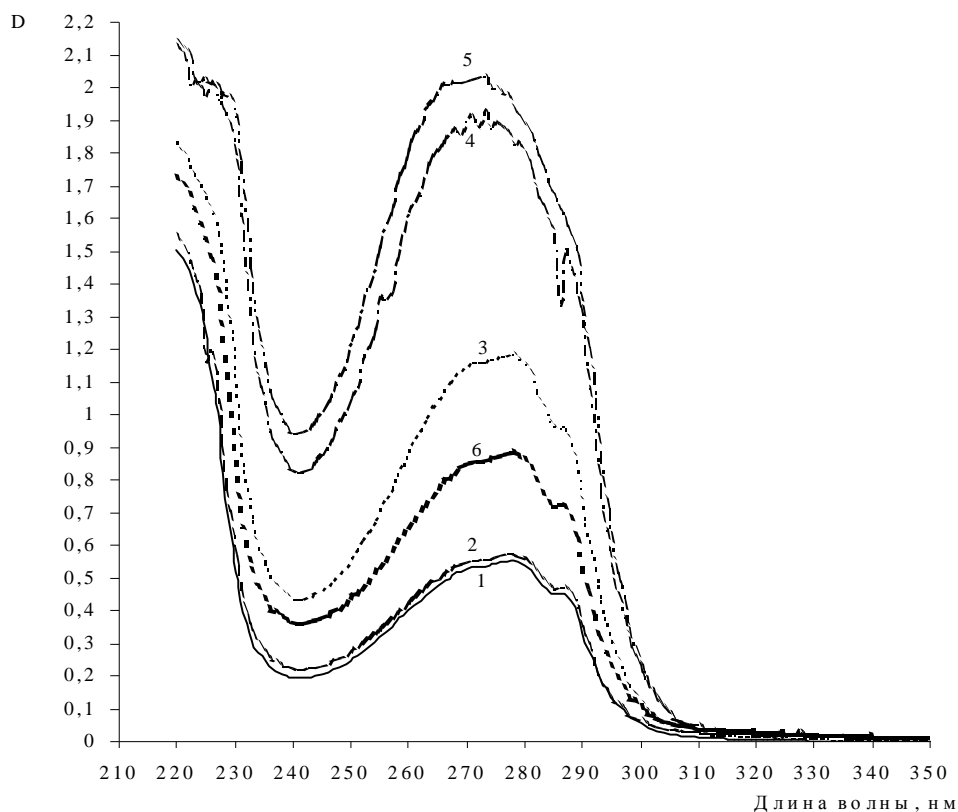


Рисунок 1 – УФ - спектры растворов изомолярной серии цинка и триптофана: 1- Trp+Zn (1:1), C=0,0001 моль/л, температура реакции 30°C; 2 – Trp C=0,0001; 3 – Trp+Zn (2:1), C = 0,0001 моль/л, температура реакции 70°C; 4 - Trp+Zn (2:1), C = 0,0001 моль/л, температура реакции 100°C; 5 - Trp+Zn (3:1), C = 0,0001 моль/л, температура реакции 70°C; 6 - Trp+Zn (1:2), C = 0,0001 моль/л, температура реакции 70°C.

На следующем этапе было изучено взаимодействие триптофана с ионом железа (II) методом рН-метрического титрования. Для определения состава образующихся координационных соединений были приготовлены растворы с соотношением иона железа и триптофана 1:2, 2:1 и 1:1 путем смешивания расчетных количеств 0,01 М растворов триптофана и сульфата железа.

рН-Метрическое титрование координационных соединений, образующихся в указанных растворах проводили 0,1 М раствором NaOH. Расположение кривых титрования координационных соединений ниже кривой титрования триптофана (рис.2) свидетельствует о наличии в системе протонированных комплексных форм. Поэтому при расчете учитывали существование в системе следующих комплексных форм: $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})]$, $[\text{Fe}(\text{HL}^{-})]$, $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})_2]$, $[\text{Fe}(\text{HL}^{-})_2]$, $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})(\text{HL}^{-})]$.

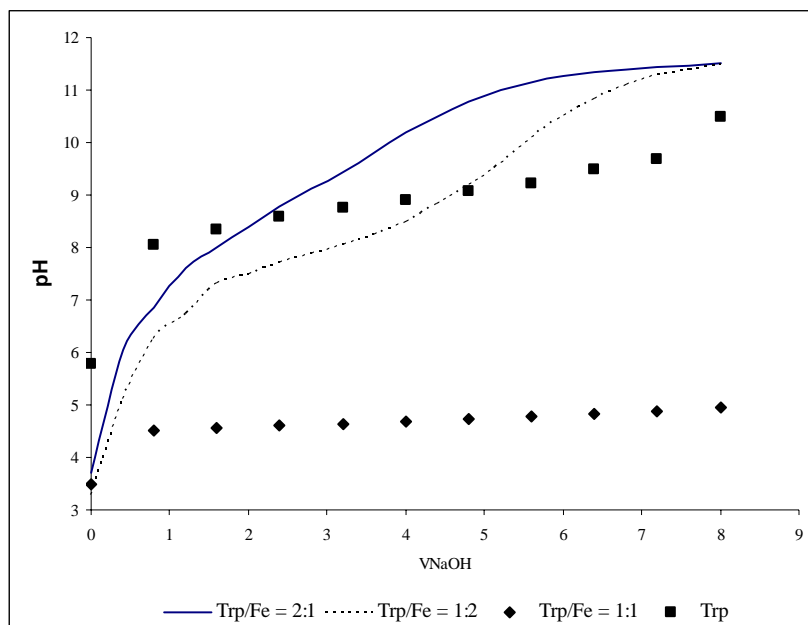


Рисунок 2- Кривые титрования триптофана и его координационных соединений с железом.

Для расчета использовали программу CLINP 2.1. Результаты расчета показали, что в растворе присутствуют следующие комплексные формы: $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)]$ ($\lg\beta = -19,355$), $[\text{Fe}(\text{HL}^-)]$ ($\lg\beta = -17,15$), $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)_2]$ ($\lg\beta = -0,53$), $[\text{Fe}(\text{HL}^-)_2]$ ($\lg\beta = 0,24$), $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)(\text{HL}^-)]$ ($\lg\beta = 19,61$).

Таким образом, установлено, что при взаимодействии триптофана и иона железа (II) в растворе присутствуют как протонированные, так и непротонированные комплексные формы.

Далее проведены биологические исследования соединений пептидов и их комплексов с ионами железа. Изучено влияние 1-(хлорметил)-силатрана, координационного соединения иона железа и иммуноактивной аминокислоты триптофана с эквимольным соотношением металла-комплексобразователя и лигандой, а также их совместного применения на биохимические показатели крови и рост шерсти у кроликов при экспериментально вызванном авитаминозе.

Авитаминоз у кроликов вызывали содержанием на безвитамином рационе. Наличие авитаминоза подтверждали данными биохимических анализов крови.

До опыта в крови кроликов всех групп отмечалось низкое содержание альбуминов, высокое содержание α -, β - и γ -глобулинов, содержание общего

белка сыворотки крови находилось в пределах физиологических норм колебания [Линева А., 2001] (табл. 2).

Таблица 2 - биохимические показатели крови кроликов при лечении экспериментального авитаминоза

Показатели крови		альбумины, %	α -глобулины, %	β -глобулины, %	γ -глобулины, %	общий белок, г/л
Первая группа	до опыта	3,21±0,18	29,4±0,21	15,86±0,14	51,5±0,32	70,9±0,19
	через 7 дней	15,02±0,34	1,88±0,03	12,44±0,12	65,96±0,33	без измен.
	через 2 месяца	58,9±0,45	14,63±0,24	6,45±0,10	20,03±0,34	72,3±0,18
Вторая группа	до опыта	18,2±0,24	22,12±0,13	19,8±0,43	39,8±0,27	74,0±0,23
	через 7 дней	10,1±0,22	15,86±0,17	12,18±0,12	61,8±0,09	без измен.
	через 2 месяца	65,97±0,78	13,46±0,31	7,14±0,22	13,45±0,13	61,8±0,94
Третья группа	до опыта	16,08±0,11	10,3±0,09	14,03±0,22	59,65±0,31	74,0±0,56
	через 7 дней	19,74±0,27	9,38±0,24	4,21±0,13	66,6±0,23	74,0±1,5
	через 2 месяца	45,8±0,44	5,47±0,12	16,42±0,15	32,29±0,55	64,7±0,21
Норма		55,0-65,0	8-12	5-12	17-23	60-82

достоверность различия ($p < 0,05$)

Через 7 дней после начала применения вышеназванных соединений у животных каждой группы проводили анализ крови на содержание общего белка и белковых фракций сыворотки крови. У кроликов первой группы отмечалось повышение содержания альбуминов, γ -глобулинов, понижение содержания α -глобулинов, β -глобулинов –, содержание общего белка сыворотки крови оставалось на прежнем уровне (табл. 2). У кроликов второй группы снижалось содержание альбуминов, α -глобулинов, β -глобулинов, содержание γ -глобулинов повышалось, содержание общего белка сыворотки крови не изменялось (табл.2). У животных третьей группы отмечалось повышение содержания альбуминов, γ -глобулинов, общего белка сыворотки крови, снижение содержания α -глобулинов, β -глобулинов (табл.2). Как показывают полученные данные, после начала использования этих соединений у животных появляется перестройка биохимических процессов, проявляющаяся в трансформации процессов синтеза белка, что нашло отражение в изменении биохимических показателей крови.

Далее в течение 2 месяцев после использования исследуемых соединений у животных каждые 2 недели исследовали кровь на содержание общего белка и

белковых фракций сыворотки крови. Появилась постепенная нормализация биохимических показателей крови.

Через 2 месяца после последнего применения соединений у кроликов первой группы нормализовалось содержание альбуминов и γ -глобулинов, содержание α -глобулинов было несколько выше нормы, содержание β -глобулинов было незначительно ниже нормы, содержание общего белка находилось в норме (табл. 2). У животных второй группы нормализовалось содержание альбуминов и β -глобулинов, содержание α -глобулинов оставалось повышенным, содержание γ -глобулинов было несколько ниже нормы, содержание общего белка находилось в пределах физиологических норм колебания (табл. 2). У кроликов третьей группы ни один из изучаемых биохимических показателей кроме содержания общего белка сыворотки крови не находился в пределах физиологических норм колебания: содержание альбуминов и α -глобулинов было пониженным, содержание β - и γ -глобулинов было повышенным, содержание общего белка было в пределах нормы (табл. 2). На протяжении этого периода после начала применения соединений длина шерсти на выстриженном участке у кроликов первой группы составляла в среднем 3 см, второй – 2,8 см, третьей – 2,5 см. Дальнейшие измерения длины шерсти на этих же участках не показали ее увеличения.

Полученные результаты позволяют заключить, что большая степень нормализации изученных биохимических показателей крови отмечалась в тех группах животных, в которых применяли биокоординационное соединение иона железа и триптофана либо в отдельности, либо совместно с 1%-ной мазью 1-(хлорметил)силатрана. В той группе животных, в которой не применяли биокоординационное соединение, ни один из изученных биохимических показателей крови не находился в пределах физиологических норм колебания. Наибольший рост шерсти отмечался в группе животных, в которой совместно применяли оба соединения.

Далее было исследовано влияние комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа, представляющего собой водный раствор биокоординационное соединение низкомолекулярного иммуноактивного пептида, обладающего активностью тимозина α_1 с ионом железа, на содержание общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС), общего белка и белковых фракций в сыворотке крови животных при анемии. Для испытаний был выбран молодняк крупного рогатого скота в Опытном-экспериментальном хозяйстве НИИ ветеринарии Академии сельскохозяйственных наук РТ, который находился в

завершении зимовки в обессилленном состоянии. До начала опыта в крови животных определяли содержание ОЖСС железа, общего белка и белковых фракций сыворотки крови. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты воздействия комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа (II) на содержание ОЖСС, общего белка и белковых фракций в сыворотке крови животных

Показатели крови	ОЖСС, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Альбумины, %	α -глобулины, %	β -глобулины, %	γ -глобулины, %
До введения	100,7 $\pm 3,85^1$	57,5 $\pm 3,16$	49,9	9,55	19,3	16,35
Через 7 дней после введения	86,6 $\pm 3,12^1$	55 $\pm 1,42$	48,8	9,5	15,95	25,73
Норма	74,1	60-85	30-50	12-20	10-16	25-40

достоверность различия: ¹ – ($p < 0,1$), в остальном – ($p < 0,05$) по сравнению с данными до введения

Как видно из таблицы, у животных отмечалось повышенное содержание ОЖСС и β -глобулинов, пониженное содержание α - и γ -глобулинов. Повышенное содержание β -глобулинов свидетельствует о наличии у животных железодефицитной анемии, а пониженное содержание α - и γ -глобулинов свидетельствует о недостаточном кормлении животных. О наличии воспалительных состояний может также свидетельствовать повышенное содержание ОЖСС, которое можно объяснить тем, что при воспалительных процессах циркулирующие цитокины (ФНО- α) вызывают деградацию ТФ и индуцируют гипоферремию. Одновременно с этим, возникающий в сыворотке крови при воспалительных заболеваниях избыточный интерлейкин-2 ингибирует синтез ферритина в макрофагах, но стимулирует синтез трансферрина, что увеличивает содержание железа в крови, но не в тканях. Возникает тканевый дефицит железа.

Исходя из этого, было предположено, что применение комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа должно способствовать нормализации содержания ОЖСС вследствие установления баланса в содержании вне- и внутриклеточного железа и возможной нормализации деятельности иммунной системы.

Комплекс изолейцил-триптофан с ионом железа опытным животным вводили в виде 0,04%-ного водного раствора в дозе 100 мкг на 100 кг живого веса однократно внутримышечно. Повторно кровь на исследование брали через 7

дней. Полученные результаты показали (табл. 3), что применение этого комплекса способствовало нормализации содержания β - и γ -глобулинов и снижению содержания ОЖСС. Исходя из вышеизложенного можно предположить, что нормализация содержания β -глобулинов произошла за счет снижения содержания трансферрина, а снижение содержания ОЖСС – за счет нормализации транспорта железа из сыворотки крови в клетки.

Описаны методы лечения и их результаты от применения изолейцил-триптофана и 1-(хлорметил)силатрана при лечении гнездной алопеции. Под наблюдением находилось 40 больных (мужчин - 25, женщин - 15) в возрасте от 10 до 52 лет с различными формами гнездной алопеции (очаговой, субтотальной, тотальной) и давностью заболевания от 2 месяцев до 13 лет. В зависимости от метода лечения пациенты были разделены на 3 группы. Первую группу (12 человек, 8 - с очаговой, 3 - с тотальной и 1 - с субтотальной формами заболевания) составили больные, получавшие традиционное лечение, заключающееся в назначении витаминов группы В, никотиновой кислоты, микроэлементов (медь, железо, цинк), УФО, ионофореза, токов Д.Арсонвалья. Во вторую группу (11 человек, 8 - с очаговой, 2 - с тотальной и 1 - с субтотальной формами алопеции), которым наряду с традиционным лечением назначали терапию тимогаром и мазью, содержащей 1-(хлорметил)силатран. Третьей группе больных (17 человек, 11 мужчин и 6 женщин, 13 - с очаговой, 3 - субтотальной и 1 - тотальной) дополнительно к традиционному лечению назначали мазь, содержащую 1-(хлорметил)силатран.

Оценка иммунологического эффекта проводилась по оценке количества Т- и В-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-супрессоров.

Во всех группах больных до лечения отмечалось снижение содержания Т-лимфоцитов и Т-хелперов, увеличение содержания В-лимфоцитов и Т-супрессоров. После проведения традиционного лечения отмечалась некоторая нормализация этих показателей увеличилось содержание Т-лимфоцитов и Т-хелперов, понизилось содержание В-лимфоцитов и Т-супрессоров (табл. 4).

Таблица 4 - иммунологические показатели крови больных гнездной алопеции первой группы

До лечения				
Показатели	Т - лимфоциты, кл/мкл	Т - хелперы, %	В - лимфоциты, кл/мкл	Т-супрессоры, %
	1069,0±61,0	29,4±1,5	765,3±18,7	25,5±1,4
После лечения				

	1190,0±75,0	33,2±3,2	425,7±21,4	22,3±0,9
Норма	1229,0±87	36,7±2,0	390,0±24,0	21,9±1,7

Таблица 5 - иммунологические показатели крови больных гнездной алопеции второй группы

До лечения				
Показатели	Т - лимфоциты, кл/мкл	Т - хелперы, %	В - лимфоциты, кл/мкл	Т-супрессоры, %
	1074,0±41,0	29,1±1,7	741,2±24,7	26,3±1,2
После лечения				
	1198,0±34,0	32,7±1,3	438,0±17,1	21,8±1,7
Норма	1229,0±87	36,7±2,0	390,0±24,0	21,9±1,7

Таблица 6 - иммунологические показатели крови больных гнездной алопеции третьей группы

До лечения				
Показатели	Т - лимфоциты, кл/мкл	Т - хелперы, %	В - лимфоциты, кл/мкл	Т-супрессоры, %
	1123,0±24,0	29,8±1,7	727,2±24,7	25,4±1,2
После лечения				
	1158,0±27,0	31,4±1,3	429,2±15,3	22,8±1,4
Норма	1229,0±87	36,7±2,0	390,0±24,0	21,9±1,7

В второй группе больных, которых дополнительно лечили изолейцил-триптофаном и мазью, содержащей 1-(хлорметил)силатран, отмечалась большая степень нормализации измененных показателей иммунологического статуса организма: увеличилось содержание Т-лимфоцитов и Т-хелперов, уменьшилось содержание В-лимфоцитов и Т- супрессоров (табл. 5). В третьей группе больных также отмечалась положительная динамика показателей иммунологического статуса: увеличилось содержание Т-лимфоцитов и Т-хелперов, уменьшилось содержание В-лимфоцитов и Т- супрессоров(табл.6).

Продолжительность лечения во всех группах составляла 1,5-2 месяца. После завершения традиционного лечения полное восстановление волос отмечалось у 9 (75%) больных, у остальных наблюдался хороший рост волос. После проведения комбинированного лечения у 9 (81,2%) больных отмечалось полное восстановление волос, у остальных отмечался хороший рост волос. В

третьей группе у 13 (76,4%) было отмечено полное восстановление волос, у остальных - был отмечен хороший рост волос.

Таким образом, применение кремнийсодержащего препарата - мази 1-(хлорметил)силатрана и дипептида изолейцил-триптофан повысило эффективность лечения гнездной алопеции. Лучшие результаты достигнуты в той группе больных, при лечении которых совместно применяли и мазь 1-(хлорметил)силатрана и изолейцил-триптофан, что по всей вероятности, связано с иммунологическим влиянием дипептида на иммунную систему больных.

Также изложены методика применения и изучение иммунологического и биохимического действия комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа при железодефицитных анемиях и сосудистых заболеваниях.

ВЫВОДЫ

1. С применением методов смешанных ангидридов и активированных эфиров получены потенциально иммуноактивные лизинсодержащие низкомолекулярные пептиды Phth-Ala-Lys(Phth)-ОН, Pro-Lys-Lys-Gly-ОН и Н-Pro-Ala-Lys-Val-ОН. На примере синтеза лизинсодержащих пентапептидов Н-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-ОН и Н-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-ОН были разработаны технологические схемы получения лизинсодержащих пентапептидов и выявлено, что с технологической точки зрения оптимальным является: при получении пептидов - применение тактики максимальной защиты; при получении дипептидов - проведение конденсации методом смешанных ангидридов; при синтезе больших пептидов - как ступенчатое наращивание пептидной цепи с использованием пентафторфениловых эфиров, как активированных эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната, так и проведение блочной конденсации с применением метода смешанных ангидридов.

2. При взаимодействия цинка и железа (II) с триптофаном в растворе методами рН-метрического титрования и изомолярных серий выявлено, что при этом формируются координационные соединения, имеющие протонированные лиганды. Расчет констант образования координационных соединений железа и триптофана установил, что раствор включает следующие комплексные формы: $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})]$ ($\lg\beta = -19,355$), $[\text{Fe}(\text{HL}^-)]$ ($\lg\beta = -17,15$), $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})_2]$ ($\lg\beta = -0,53$), $[\text{Fe}(\text{HL}^-)_2]$ ($\lg\beta = 0,24$), $[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})(\text{HL}^-)]$ ($\lg\beta = 19,61$).

3. Исследованием биологического воздействия биокоординационных соединений триптофана и железа совместно с 1-(хлорметил)силатраном при

искусственном авитаминозе установлено, что лучший уровень нормализации проанализированных биохимических показателей крови наблюдалась в тех группах животных, где применяли биокоординационное соединение железа и триптофана либо в отдельности, либо вместе с 1%-ной мазью 1-(хлорметил)силатрана. Наибольший рост шерсти отмечался в группе животных, в которой совместно применяли оба средства.

4. Выявлено, что применение комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа (II) содействует нормализации показателя количества ОЖСС в результате установления баланса в наличии вне- и внутриклеточного железа и вероятной нормализации функционирования иммунной системы у животных, находящихся в конце зимовки в состоянии ослабления.

5. Показано, что использование кремнийсодержащего препарата - мази 1-(хлорметил)силатрана и дипептида изолейцил-триптофан увеличивает эффективность лечения гнездовой алопеции. Наилучшие эффекты получены в той группе больных, при лечении которых совмещали использование и мази 1-(хлорметил)силатрана и этого дипептида, что по-видимому, происходит вследствие его иммуномодулирующего действия.

6. Выявлено, что при лечении железodefицитной анемии комплекс изолейцил-триптофан с ионом железа (II) нормализующе действует на функционирование иммунной системы организма, приводит к нормам состояние кроветворения, использование его в комплексном лечении анемии содействует нормализации биохимических показателей крови при железodefицитных состояниях.

7. Установлено, что использование комплекса изолейцил-триптофан с ионом железа (II) наряду с традиционными методами лечения содействует нормализации биохимических показателей крови больных с окклюзионными заболеваниями аорты и магистральных артерий, а также невровакулярных синдромов верхних конечностей.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные положения диссертации опубликованы в:

-статьях в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ:

1. Наботов, М. Перспектива разработки новых терапевтических агентов на основе биокоординационных соединений аминокислот и низкомолекулярных пептидов с биометаллами / М. Наботов, **М.М. Файзуллоева**, К.Х. Хайдаров [и др.]// Паёми Сино. Вестник Авиценны.- Душанбе, -2006.-№ 1-2. -С.491-503.
2. **Файзуллоева, М.М.** Влияние тимофера на биохимические процессы организма у больных с сосудистыми заболеваниями / М.М. Файзуллоева // Вестник педагогического университета.-2014.-№2(57).-С.37-40.
3. **Файзуллаева, М.М.** Результаты применения тимофера при лечении анемии у детей./ М.М. Файзуллаева, А. Хафизов, Г.М. Бобиев//Известия АН Республики Таджикистан.-2015. №1(189).-С.60-63.
4. **Файзуллоева, М.М.** Изучение комплексообразования триптофана и дипептида изолейцил-триптофан с ионом цинка методом рН-метрического титрования/ М.М. Файзуллаева, Г.М. Бобизода// Известия АН Республики Таджикистан.-2016. №4(195).-С.39-44.

-материалах научных конференций:

5. **Файзуллаева, М.М.** Удаление Nps-группы с триптофан-содержащих дипептидов со свободной индольной группой. / М.М. Файзуллаева, А.Н. Шахматов, У.З. Зубайдов // Респ. конф. «Природные ресурсы Таджикистана: рациональное использование и охрана окружающей среды»: тез. докл.-Душанбе, -2001.-С.106.
6. **Файзуллаева, М.М.** Синтез и токсические свойства дипептида лейцил-триптофан. / М.М. Файзуллаева, А.Н. Шахматов, У.З. Зубайдов // Науч. симп. «Актуальные проблемы спектроскопии водородной связи».- Душанбе,- 2001.-С. 99-101.
7. Хусайнов А.А. Применение тимогара и 1-(хлорметил)силатрана при лечении гнездной алопеции / А.А Хусайнов, М.М. Расулов, **М.М. Файзуллоева**, [и др.]// Новости дерматологии и венерологии.-Ташкент, - 2002.- № 2.-С.37-38.

8. Зоирова Н.П. Влияние 1-(хлорметил)силатрана и биокоординационных соединений триптофана с железом на рост шерсти у кроликов при экспериментальном авитаминозе / Н.П. Зоирова, **М.М. Файзуллоева**, Г.М. Бобиев, А.Н. Шахматов // Межд. научно - практ. конф., посв. 60-летию ТаджНИВИ «Актуальные проблемы болезней животных в современных условиях»: тез. докл.-Душанбе, -2003.-С.119-120.
9. **Файзуллоева, М.М.** Изучение комплексообразования триптофана и дипептида изолейцил-триптофан с ионом цинка методом рН-метрического титрования / М.М. Файзуллоева, А.Н. Шахматов, У.З. Зубайдов // Там же.- С.158-159.
10. Шахматов, А.Н. УФ-спектроскопическое определение состава биокоординационных соединений цинка и триптофана с использованием растворов изомолярной серии / А.Н. Шахматов, **М.М. Файзуллоева**, Х.Ш. Бобиев Г.М. [и др.] // Там же. -С.161-162
11. Зоирова, Н.П. Влияние 1-(хлорметил)силатрана и биокоординационных соединений триптофана с железом на рост шерсти у кроликов при экспериментальном авитаминозе / Н.П. Зоирова, **М.М. Файзуллоева**, А.Н. Шахматов // III Респ. научн. конф. «Вклад биохимиков в развитие биологической науки»: Труды. -Душанбе.-2003.-С.88-90
12. **Файзуллоева, М.М.** Изучение комплексообразования триптофана с ионом цинка/ М.М. Файзуллоева, А.Н. Шахматов, У.З. Зубайдов // Там же.-С.117-119
13. Зоирова, Н.П. Лечение гнездной алопеции 1-(хлорметил)-силатраном и тимогаром/ Н.П. Зоирова, М.М. Расулов, **М.М. Файзуллоева**, [и др.]// Здравоохранение Таджикистана.-2005.-№ 4.-С.125-130
14. **Файзуллоева, М.М.** Изучение комплексообразования цинка и железа (II) с триптофаном методом рН-метрического титрования. I. Определение экспериментальных констант диссоциации / **М.М. Файзуллоева**, А.Н. Шахматов, Г.М. Бобиев [и др.] // Вестник педагогического университета.-2005.-№ 3.-С.12-15.
15. **Файзуллоева, М.М.** Шахматов А.Н., Зубайдов У.З. Изучение взаимодействия цинка и железа (II) с триптофаном методом рН-метрического титрования / М.М. Файзуллоева, А.Н. Шахматов, У.З. Зубайдов // Научно-теорет. конф. «Современные проблемы физики и астрофизики».: тез. докл. -Душанбе, -2005,-С.52-53

16. **Файзуллаева, М.** Метод изучения взаимодействия триптофана с ионом железа / М.М. Файзуллоева, А.Н. Шахматов Г.М. Бобиев// Материалы Респ. научно - практ. конф. «Проблемаҳои таълими тафриқавӣ»- Душанбе, -2009.- С.244-247.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ОЖСС - общая железосвязывающая способность сыворотки

ПСА- вариант метода смешанных ангидридов

ТФ- трансферрин

ФНО- фактор некроза опухолей

Woc- трет-бутилоксикарбонильная группа

OBzl- сложноэфирная бензильная группа

Phtl- фталильная группа

Z - бензилоксикарбонильная группа