

**САМАРҚАНД ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ PhD.03/30.12.2019.К.02.05  
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДА БИР МАРТАЛИК  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**ШАРОФ РАШИДОВ НОМИДАГИ САМАРҚАНД ДАВЛАТ  
УНИВЕРСИТЕТИ**

**ТАГИРОВА МАШХУРА АМИРИДДИНОВНА**

**НАНО- ВА МИКРОҚОБИҚЛАРДА АНТИОКСИДАНТ  
ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ**

**02.00.04 – Физик кимё**

**02.00.12 – Нанокимё, нанофизика ва нанотехнология (кимё фанлари)**

**КИМЁ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)**

**Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)**

**Тагирова Машхура Амиридиновна**

Нано- ва микроқобикларда антиоксидант ферментларни имобиллаш ..... 3

**Тагирова Машхура Амиридиновна**

Иммобилизация антиоксидантных ферментов в нано- и микросферы ..... 21

**Tagirova Mashkhura Amiriddinovna**

Immobilization of antioxidant enzymes in nano- and microspheres ..... 39

**Эълон қилинган ишлар рўйхати**

Список опубликованных работ

List of published works ..... 43

**САМАРҚАНД ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ  
ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ PhD.03/30.12.2019.К.02.05  
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ АСОСИДА БИР МАРТАЛИК  
ИЛМИЙ КЕНГАШ**

---

**ШАРОФ РАШИДОВ НОМИДАГИ САМАРҚАНД ДАВЛАТ  
УНИВЕРСИТЕТИ**

**ТАГИРОВА МАШХУРА АМИРИДИНОВНА**

**НАНО- ВА МИКРОҚОБИҚЛАРДА АНТИОКСИДАНТ  
ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ**

**02.00.04 – Физик кимё**

**02.00.12 – Нанокимё, нанофизика ва нанотехнология (кимё фанлари)**

**КИМЁ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)  
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси хузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2022.3.PhD/K451 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Ш.Рашидов номидаги Самарқанд давлат университетида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (Ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-сahифасида (www.samdu.uz) va «ZiyoNET» ахборот-таълим порталида (www.ziyounet.uz) жойлаштирилган.

**Илмий раҳбарлар:** Муҳаммадиев Нуралӣ Қурбоналиевич  
кимё фанлари доктори, профессор  
Клячко Наталья Львовна  
кимё фанлари доктори, профессор

**Расмий оппонентлар:** Сидиков Абдужалол Сидикович  
кимё фанлари доктори, профессор  
Ишанкулов Алишер Фармонович  
кимё фанлари бўйича фалсафа доктори

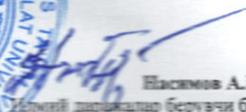
**Ётақчи ташкилот:** Ўзбекистон миллий университети

Диссертация ҳимояси Ш. Рашидов номидаги Самарқанд давлат университети хузуридаги PhD.03/30.12.2019.K.02.05 рақамли илмий кенгаш асосидаги бир марталик илмий кенгашнинг 2022 йил «16» 11 соат 11<sup>00</sup> даги мажлисида бўлиб ўтди. (Манзил: 140104, Самарқанд ш., Университет хибони, 15-уй, кимё факультети биноси, 1-қavat, 107 хона. Тел.: (+99866) 239-11-40, факс: (+99866) 239-11-40; E-mail: devonxona@samdu.uz).

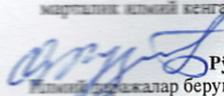
Диссертация билан Ш. Рашидов номидаги Самарқанд давлат университетининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (184 рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 140104, Самарқанд ш., Университет хибони, 15-уй, Ахборот-ресурс маркази. Тел.: (+99866) 239-11-51, E-mail: m\_nasrullaeva@mail.ru.

Диссертация автореферати 2022 йил «18» 11 ойи 18 куниндаги  
(2022 йил «16» 11 даги 16<sup>00</sup> рақамли олий кенгашнинг мажлисида).



  
Насимов А.М.  
Илмий даражалар берувчи бир марталик илмий кенгаш раиси,  
т.ф.д., профессор

  
Сайиткулов Ш.М.  
Илмий даражалар берувчи бир марталик илмий кенгаш илмий котиби,  
к.ф.н., доцент

  
Рўзимуродов О.Н.  
Илмий даражалар берувчи бир марталик илмий кенгаш қошидаги бир марталик илмий семинар раиси,  
к.ф.д., профессор

## КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳонда ферментлар ва уларнинг иммобилланган системалари кимё ва биотехнологияда катализатор, тиббиётда дори воситаларини мақсадли ташувчи, озик-овқат саноатида буёқ, озик-овқат қўшимчаси, вазнини назорат қилиш воситаси ҳамда кир ювишда сирт фаол модда сифатида кенг қўлланилишига қарамасдан уларнинг наноўлчамли заррачаларини олиш усулларини ишлаб чиқиш ва қўлланилиш имкониятларини аниқлаш, шу билан бир қаторда магнитли наноаррачаларни олишнинг термодинамикаси ва кинетикаси ҳамда уларни тиббиётда дори воситаларини мақсадли етказишда қўлланилиши муҳим аҳамиятга эга ҳисобланади.

Жаҳонда иммобилланган ферментларни олиш, уларнинг термодинамик, кинетик, ферментатив хоссаларини ҳамда уларнинг тузилишини аниқлаш бўйича илмий изланишлар олиб борилмоқда. Бу борада оксидланиш натижасидаги қўрқин ҳолатини бартараф этишга хизмат қиладиган катализа ва супероксиддисмутазаининг сорбентлар сиртида иммобилланиш механизми, олинган системанинг физик-кимёвий ва каталитик хоссаларини ҳамда магнитли нанозаррачаларни олиш ва уларга паст частотали ўзгарувчан магнит майдонининг таъсирини аниқлашга алоҳида тибор берилмоқда.

Мамлакатимизда ферментларни инактивациядан ҳимоя қилиш мақсадида нано- ва микросфераларда оқсилли антиоксидантлар тизимини яратиш ҳамда юқори оқсил унумдорлиги ва фаоллигига эга бўлган нанозаррачаларни олиш усулларини ишлаб чиқиш, антиоксидант ферментларини иммобиллаш, уларнинг магнитли нанозаррачали комплексларини олиш, ферментатив барқарорлиги ва фаоллигини сақлаш бўйича илмий тадқиқотлар олиб борилиб, муайян натижаларга эришилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида<sup>1</sup> «маҳаллий хомашё ресурсларини чуқур қайта ишлаш асосида юқори қўшимча қийматли тайёр маҳсулот ишлаб чиқариш, принципаал жиҳатдан янги маҳсулот ва технология турларини ўзлаштириш, шу асосда ички ва ташқи бозорларда миллий товарларнинг рақобатбардошлигини таъминлаш» бўйича муҳим вазифалар белгилаб берилган. Бу борада ферментларни иммобиллашнинг янги усулларини яратиш, амалдагиларини такомиллаштириш, спенсерлар ва ташувчиларни излаш, улар асосида нанотизимларни яратиш, физик-кимёвий ва каталитик хоссаларини тадқиқ этиш, барқарорлигини таъминлаш ҳамда қўлланилиш имкониятларини кенгайтириш муҳим аҳамият касб этади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” ги Фармони, 2022 йил 10 октябрдаги ПҚ-388-сон “Кимё ва газ-кимё саноатини стратегик ривожлантиришнинг мақсадли дастурини тасдиқлаш тўғрисида”, 2018 йил 25 октябрдаги ПҚ-

<sup>1</sup>Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” ги Фармони;

3983-сон “Ўзбекистон Республикасида кимё саноатини жадал ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида” ва 2020 йил 12 августдаги ПҚ-4805-сон “Кимё ва биология йўналишларида узлуксиз таълим сифатини ва илм-фан натижадорлигини ошириш чора-тадбирлари тўғрисида” қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги.** Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VII. “Кимё технологиялари ва нанотехнологиялар” устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** Иммубиллаш усулларини янада такомиллаштириш, яъни фермент молекулаларини қаттиқ сувда эрмайдиган ташувчилар юзасига маҳкамлаш ёки уларни геллар таркибига киритиш орқали сўнгги ўн йилликда мазкур соҳада сезиларли ютуқларга эришилмоқда. Иммубиллаш жараёни иккита асосий муаммони ҳал қилади: у ферментни гетероген катализаторга айлантиради, унинг оқим тизимларида кўп ишлатилишини таъминлайди ва биокатализни амалиётга жорий этишни белгиловчи асосий омил бўлган иш барқарорлигини оширади.

Бу йўналишда Кабанов А.В., Клячко Н.Л., Головин Ю.И., Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г., Трушина Д.В., Углонова С.В., Тюкел С.С., Маниккам Д.С., Шелдон Р.А., Зхао Й., Стоокей Л.Л., Талекар С., Счоеваарт Р., Лопез-Серрано П. ва бошқа олимларнинг хизматлари салмокли бўлиб, натижада юқори селективлик ва самарадорликни характерловчи яхшиланган саноат биокатализаторлари ва наносистемаларни олиш имкони яратилган.

Ўзбекистонда мазкур йўналиш ривожига ҳисса қўшган ўзбек олимларидан академиклар Рашидова С.Ш., Ибрагимов Б.Т., Тўраев А.С., профессорлар Саримсоқов А.А., Рўзимуродов О.Н., Атаханов А.А., Холмуминов А.А., Воҳидова Н.Р. ва бошқалар нанотехнологик жараёнлар ва нано- ва микротизимларнинг биокимёдаги ролини ўрганиш бўйича бир қатор тадқиқотлар олиб боришган.

Саноатда ферментлардан тўғридан-тўғри фойдаланишда кўпинча уларда узоқ муддатли барқарорликнинг йўқлиги ва фермент фаоллигининг қайта тикланишининг қийинлиги шунингдек, уларни қайта ишлатишнинг мураккаблиги каби муаммоларга дуч келинади. Бироқ, ушбу қимматли биокатализаторларнинг иқтисодий ва экологик ҳаётийлигини таъминлаш учун иммубиллаш технологияларини қўллаш уларнинг самарали регенерацияланишини ва қайта ишлатиш имкониятини беради. Шунинг учун фермент фаоллигини барқарорлаштириш ва уни узоқроқ муддатга сақлаш имкониятларини ўрганиш ҳам назарий, ҳам амалий жиҳатдан долзарб вазифалардан бири ҳисобланади.

**Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги.**

Диссертация тадқиқоти Федерал давлат бюджети олий таълим муассасаси “М.В. Ломоносов номидаги Москва давлат университети”нинг гранти доирасида (Давлат рўйхатидан ўтказиш мавзуси АААА-А21-121011290089-4) ва Самарқанд давлат университети нинг илмий-тадқиқотлар режаси асосида бажарилган.

**Тадқиқотнинг мақсади** иммобилланган антиоксидант ферментлар билан каталазининг CLEAs микросфералари ҳамда нано ўлчамли заррачаларнинг олиниш усулларини ишлаб чиқиш ва уларнинг физик-кимёвий хоссаларини аниқлашдан иборат.

**Тадқиқотнинг вазифалари:**

ватерит матрицаси асосида каталаза CLEAs микроразрараларининг олиниш усулини ишлаб чиқиш, ушбу усулни фермент барқарорлигини ошириш мақсадида оптималлаштириш;

олинган CLEAs каталаза микроразрараларининг физик-кимёвий тавсифи ва ферментатив хусусиятларини ўрганиш;

ватеритда магнит нанозаррачалар иштирокида иммобилизацияланган фермент молекулалари билан микроразрарчалар олиш техникасини ишлаб чиқиш ва уларнинг физик-кимёвий хоссаларини ўрганиш;

қўш қаватли полимер матрица асосида биферментли нанозаррачалар (супероксид дисмутаза ва каталаза) олиш усулини ишлаб чиқиш ва оптималлаштириш.

**Тадқиқотнинг объекти** сифатида микро- ва наносфераларда иммобилланган сигир жигаридан олинган каталаза ҳамда рекомбинант супероксиддисмутаза ферментлари олинган.

**Тадқиқотнинг предмети** заррачалар ҳажми ва морфологияси,  $\xi$ -потенциал ва Михаэлис-Ментен константаларини аниқлаш, микро- ва наносфераларда иммобилланган каталаза ва супероксиддисмутазанинги антиоксидант ферментларининг умумий ва хусусий фаоллиги каби заррачаларнинг физик-кимёвий параметрларини ўрганиш ва уларнинг барқарорлигини оптималлаштиришдан иборат.

**Тадқиқот усуллари.** Тадқиқотда ферментларнинг фаоллигини аниқлашнинг спектрофотометрик усуллари, ёруғлик, трансмиссия ва сканерлаш электрон микроскопия, динамик лазерли ёруғлик сочувчи қурилмада (“Zetasizer Nano ZS”, Малверн Инструмент, Буюк Британия) заррачалар ҳажмини аниқлаш усулларидан фойдаланилган.

**Тадқиқотнинг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

ватерит матрицаси асосида каталаза CLEAs олиниш усуллари ишлаб чиқилди ва микроразрарчаларнинг барқарорлигини таъминлашнинг мақбул шароитлари аниқланган;

mCat-CLEAs микросфераларига ва нанозаррача юзасида ковалент иммобилиланган фермент молекуласининг конформацияси ва фаоллигига қуйи частотали ўзгарувчан магнит майдонининг таъсири аниқланган;

ватерит, каталаза, CC-Cat, Cat-CLEAs, mCat-CLEAs тизимлар ҳосил қилган қўш электрик қаватларнинг  $\xi$ -потенциаллар қиймати мос равишда

+9,16±0,42, -8,04±0,31, -20,50±0,86, -13,01±0,50 ва -9,50±0,22 мВ га тенглиги топилган;

водород пероксиднинг каталаза билан парчаланиш реакцияси Михаэлис-Ментен тенгласига бўйсунishi ва реакция учун  $KM=3,338$ ,  $\Delta_{\max}=1719$  мол/(л·с) га тенглиги асосланган;

синтез қилинган бифермент наноэррачаларнинг гидродинамик диаметрига буфер табиати ва концентрацияси, рН ва ферментларнинг бошланғич моляр нисбатининг таъсири аниқланган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

каталаза молекулаларини глутар альдегид билан ўзаро боғлаш орқали CLEAs олинишининг методикаси ишлаб чиқилган;

иммобилланган ферментлар фаоллиги ва барқарорлигига таъсир этувчи омиллар ҳамда комплекслар синтезининг мақбул шароитлари аниқланган;

сферик ватерит матрицасида магнитли наноэррачалар ва каталазанинг mCat-CLEAs комплекси синтез қилинган;

бионаносистемаларнинг В ва РР витаминлари билан ҳосил қилган комплекслари дори препаратларини мақсадли етказилишининг механизми аниқланган.

**Тадқиқот натижаларининг ишончилиги.** Асосий илмий ҳолатлар, хулосалар, ўлчовлар ва ўлчов воситаларининг бир хиллигини таъминлаш халқаро стандартларга мувофиқ текширилган ва илмий асбоб-ускуналар ёрдамида олинган натижалар билан асосланган.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.** Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти шундан иборатки, нано- ва микросфераларда антиоксидант ферментларни иммобиллаш услубияти ишлаб чиқилган ҳамда олинган Cat-CLEAs, mCat-CLEAs ва биферментли комплексларнинг кинетик, ўлчам, физик-кимёвий характеристикалари аниқланган. Олинган натижалар нано ўлчамли иммобиллашган ферментли тизимларни олиш ва уларнинг физик-кимёси ҳақидаги билимларни бойитиш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти нано- ва микросфераларда иммобилланган Cat-CLEAs, mCat-CLEAs ва биферментли комплексларни синтез қилиш методикаси бошқа шу каби комплексларни олишга хизмат қилади.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Нано- ва микросфераларда антиоксидант ферментларни иммобиллаш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

Cat-CLEAs ва mCat-CLEAs ватерит микросфералари Москва давлат университетининг “Наноматериаллар кимёвий дизайни” лабораториясида доривор препаратларни етказишда қўлланилган (Москва давлат университети ҳузурдаги “Нанозим” МЧЖнинг 2022 йил 12-октябрдаги 221012-сон маълумотномаси). Натижада, дори воситаларини мақсадли етказиб бериш имконини берган;

супероксиддисмутаза ва каталазанинг бизнзим комплекси “Директ Квант Технолоджи” МЧЖда амалиётга жорий этилган (“Директ Квант

Технолоджи” МЧЖ,нинг 2022 йил 18 октябрдаги 22-10-18/ДҚТ-сон маълумотномаси). Натижада куёнларда куруқ кўз синдроми даволашнинг имконияти яратилган;

СОД1+каталаза комплекси ва каталаза билан магнитли нанозаррачалар комплексини олиш усуллари “Integra DD” Ўзбекистон-Болгария кўшма корхонасида амалиётга жорий этилган (“Integra DD” Ўзбекистон-Болгария кўшма корхонасининг 2022 йил 11 апрелдаги 75-сон маълумотномаси). Натижада, В витаминларининг нанокомплексларини олиш имконини берган.

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Мазкур тадқиқот натижалари 16 та, жумладан, 14 та халқаро ва 2 та республика илмий-амалий анжуманларида маъруза қилинган ва муҳокамадан ўтказилган.

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги.** Диссертация мавзуси бўйича жами 20 та илмий мақола чоп этилган, шулардан Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг диссертациялар асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 4 та мақола, жумладан, 3 та мақола хорижий журналда нашр этилган.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Диссертация иши кириш, 4 та боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 97 бетни ташкил этади.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш** қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари ҳамда объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

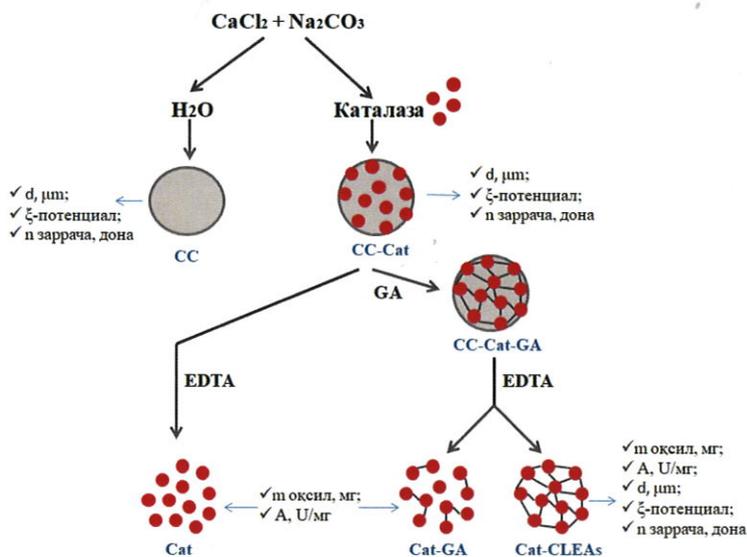
Диссертациянинг **“Нано- ва микросфераларда ферментларни иммобилизация қилишнинг физик-кимёсининг замонавий ютуқлари ва муаммолари”** деб номланган I бобида нано- ва микросфераларда антиоксидант ферментларни иммобилизация қилишнинг ютуқлари ва муаммоларига бағишланган ишларга адабиётлар шарҳи берилган. Кальций карбонатнинг полиморф шакллари кўриб чиқилган. Кальций карбонатнинг полиморф шакллари қиёсий физик-кимёвий хоссалари келтирилган. СОД1 ва каталаза ўз ичига олган биэнзим комплекслардан полиелектролитларни қўллаш билан фойдаланишнинг долзарблиги ўрганилган.

Диссертациянинг II бобида материаллар, жиҳозлар ва тадқиқот усуллари баён этилган.

Диссертациянинг **“Ватерит матричасида биргаликда чўктириш натижасида олинган CLEAs микросфералари”** деб номланган III бобида

каталаза ҳамда магнит наноаррачалар билан каталаза CLEAs системаларнинг олиниш келтирилган.

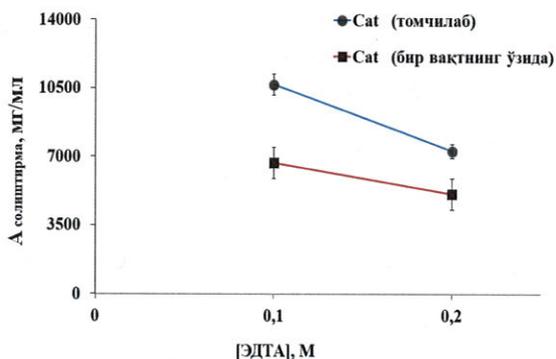
Cat-CLEAs микрофералари 1-расмда кўрсатилган схема бўйича тайёрланган.  $\text{CaCl}_2$  ва  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  тузларининг эритмаларини фермент иштирокида қуйиш йўли билан бирга чўктирилган каталаза (маҳсулот CC-Cat) бўлган ватерит микрофералари олинган. Глутар алдегиднинг микрофералар тузилишига таъсирини ўрганиш учун карбонат матричасини ЭДТА эритмаси билан эритиб, қиёсий синтез амалга оширилди. GA нинг микрофера тузилишига таъсири CC-Cat ни глутар алдегид эритмаси билан иммобиллаш, сўнгра карбонат матричасини ЭДТА эритмаси билан эритиш орқали амалга оширилди. Синтез натижасида эриш шартларига қараб Cat-GA ёки Cat-CLEAs маҳсулотлари ҳосил бўлади.



1-расм. CLEAs каталазанинг синтез қилиниш схемаси

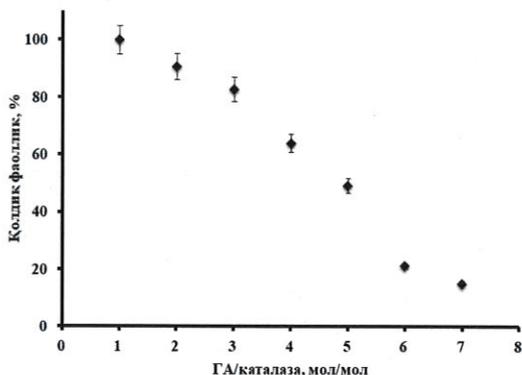
Синтез натижасида биринчи босқичда CC-Cat-GA агрегати ҳосил бўлади, бу ватерит ва каталазадан иборат матрицадир. Ватерит ва каталаза эритмаси чегарасида электрохимёвий потенциалларнинг тенгсизлиги туфайли қўш электр қатлами (ҚЕҚ) пайдо бўлади. ҚЕҚ тузилиши бўйича ўтказилган тадқиқотлар шуни кўрсатдики, каталаза қўшилиши микроаррачаларнинг  $\xi$ -потенциалини сезиларли даражада пасайтиради, чунки биз танлаган синтез шароитида каталаза молекулалари манфий зарядга эга. Карбонат матричаси 0,2 М ЭДТА эритмаси билан эритилгандан сўнг синтезнинг иккинчи босқичида ҳосил бўлган реакция аралашмасининг таҳлили шуни кўрсатдики, биргаликда чўкма оксиди таркибига  $54 \pm 8$  мг/г ташувчи, ва ферментнинг хусусий фаоллиги Cat-GA таркибига  $4200 \pm 600$

бирлик/мг бўлиб, бу кўрсаткич каталаза фаоллигининг дастлабки ҳолатидан 70% га пасайганини кўрсатади. Шу билан бирга, реакция аралашмасида CLEAsларнинг мавжудлиги визуал тарзда аниқланмади. Шу муносабат билан ватерит матрицасининг эриш шартларининг каталазанинг функционал хусусиятларига таъсири ўрганилди. Адабиёт маълумотларига асосланиб, эритувчи сифатида этилендиаминтетраамин кислота (ЭДТА) дан фойдаланишни мақбул деб топдик.



**2-расм. Cat солиштирма фаоллигининг кальций карбонат матрицасининг эриш шартларига боғлиқлиги**

2-расмда Cat нинг хусусий фаоллиги ва калций карбонат матрицасининг эриш шартлари ўргасидаги муносабат келтирилган. ЭДТА нинг (фракционал), яъни томчилаб куйишга ўтиш билан биргаликда каталазанинг хусусий фаоллиги ферментнинг бошланғич фаоллигининг 60% гача кўтарилиши ва хелатлаштирувчи воситанинг бирданига қуйилишидаги фаоллигига нисбатан юқори бўлишлигига эришилди. Кўриниб турибдики, калсий карбонатнинг эриши пайтида каталаза қайтарилмас тарзда инактивланади ва ватеритнинг юқори эриш тезлиги ферментнинг кучлироқ инактивациясига сабаб бўлади.



**3-расм. GA нинг Cat-GA нинг қолдиқ фаоллигига таъсири**

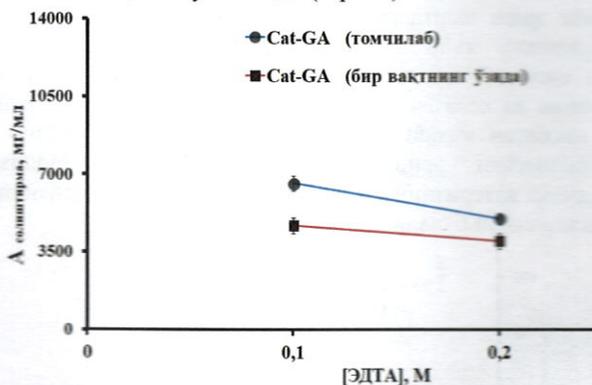
Тахмин қилиш мумкинки, СС-Cat нинг эриши шайтида  $\text{Ca}^{2+}$  ва  $\text{CO}_3^{2-}$  ионларининг юкори маҳаллий концентрацияси юкори ион кучи туфайли ферментнинг фаоллигига таъсир қилиши мумкин, бу эса ферментнинг қисман денатурациясига олиб келади. Шу муносабат билан, фракционал кўшилган ЭДТА концентрациясини 0,1 М га камайтириш орқали эриш шартлари "юмшатишган". Бирок, 0,2 М ЭДТА нинг фракционал кўшилиши билан ватеритнинг тўлиқ эриши 30-40 дақиқа давом этган бўлса, 0,1 М ЭДТА билан эса 60-80 дақиқа вақт сарфланди.

Сферик микросфераларни олишда глутар алдегид бифункциял восита сифатида қўлланилди. GA/каталазининг моляр нисбатининг Cat-GA нинг қолдиқ фаоллигига таъсири 0,1 М ЭДТА эритмасининг фракционал кўшилиши билан ўрганилди. Олинган маълумотлар 3-расмда кўрсатилган.

Шу билан бирга, ўзаро боғловчи агент концентрациясининг ошиши билан ферментнинг қолдиқ фаоллигининг сезиларли пасайиши кузатилди. Шубҳасиз, бу факт бифункционал агент томонидан фермент глобулиннинг ковалент модификацияси билан боғлиқ.

1/1 дан 100/1 гача бўлган GA/оқсил моляр нисбати оралиғида эритмада Cat-CLEAs микросфераларининг шаклланиши кузатилмади. Оптимал моляр нисбат 200/1 ни ташкил қилади.

Cat ва Cat-GA нинг ўзига хос фаоллигини қиёсий баҳолашни ўтказиш учун ЭДТА концентрациясининг ферментнинг хусусий фаоллигига таъсирининг боғлиқлиги ўрганилди. Cat ва Cat-GA нинг ўзига хос фаоллигини қиёсий баҳолаш ўтказилди (4-расм).

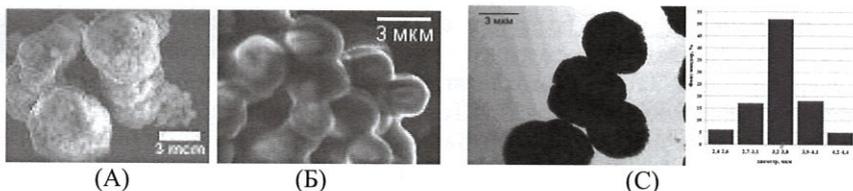


4-расм. Cat-GA хусусий фаоллигининг ЭДТА концентрациясига боғлиқлиги

Тадқиқотлар натижасида маълум бўлишича, матрица эритмасининг барча вариантларида Cat-GA фаоллигининг пасайиши Cat фаоллигининг 25-30% ни ташкил қилади, глутар алдегид билан натив каталаза инкубациясида (экспериментал шароитлар бир хил) ватерит микрозарраларида каталаза ўзаро боғланишида бўлгани каби) солиштирма фаолликни йўқотиш 60-65% ни ташкил этди. Кўринишидан, экспериментал шароитда ватерит

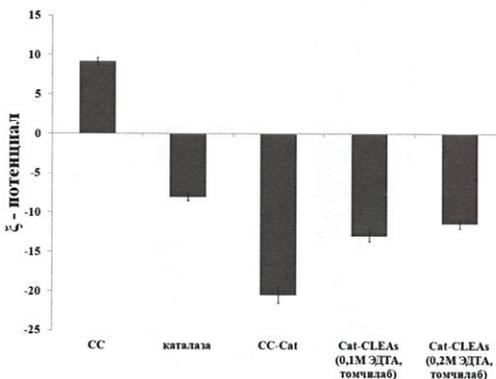
матричасига киритилган барча каталаза молекулалари бифункциял агент билан ўзаро таъсирлашиш қобилиятига эга эмас.

Оптимал синтез шароитида олинган микросфераларнинг шакли ва ўлчамлари нурланувчи ва сканерлаш микроскопияси ёрдамида аниқланди (5-расм). Кўриниб турибдики, олинган Cat-CLEAs микросфералари шарсимон шаклга эга ва уларнинг ўлчамлари CC-Cat нинг ўлчамларига яқин эканлиги аниқланди ( $3,4 \pm 1$  мкм).



**5-расм. Cat-CLEAs микрорасмлари (А ва Б - сканерлаш электрон микроскопида, С - трансмиссия электрон микроскопида)**

Олинган микрозаррачаларнинг барқарорлигини баҳолаш учун  $\xi$ -потенциалнинг қиймати аниқланди. 6-расм ўрганилаётган объектларнинг  $\xi$ -потенциал қийматларини кўрсатади. Аниқланишича, Cat-CLEAs нинг потенциалли ортиб, ЭДТА карбонат матричаси концентрациясидан қатъи назар, эритиш учун қўшилган табиий каталаза зарядига яқинлашган.



**6-расм. Cat-CLEAs заррачаларининг  $\xi$ -потенциал қийматлари**

CC, CC-Cat ва Cat-CLEAs зарраларининг миқдори оптик микроскоп ёрдамида баҳоланди. Ватерит микросфераларининг потенциал сонининг назарий ҳисоб-китоблари (заррачаларнинг ўртача диаметри, ватерит зичлиги ва синтез ҳосилдорлиги асосида) CC ва CC-Cat учун экспериментал маълумотларга яхши мос келди.

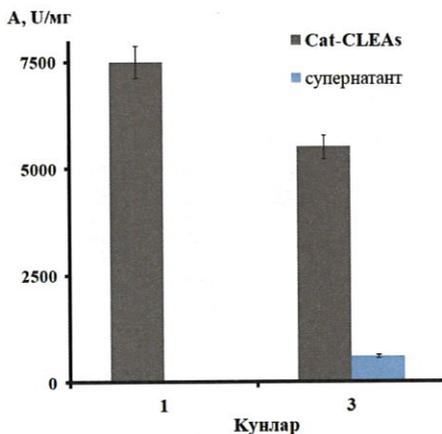
Шундай қилиб, карбонат матричасининг эриш тезлигининг ошиши нафақат матрицага киритилган ферментнинг кўпроқ инактивациясига олиб келади, балки CLEAs зарраларини кучлироқ йўқ қилишга олиб келади, деб тахмин қилиш мумкин.

**Карбонат матричасининг турли эриш шароитларида синтез  
маҳсулотларидаги заррачаларнинг умумий сони**

Назарий миқдор	СС	СС-Cat	Cat-CLEAs		
			0,2М ЭДТА, бир вақтнинг ўзида	0,2М ЭДТА, томчилаб	0,1М ЭДТА, томчилаб
$4,5 \cdot 10^9$	$(5 \pm 1) \cdot 10^9$	$(3,1 \pm 1,5) \cdot 10^9$	-	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(6,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$

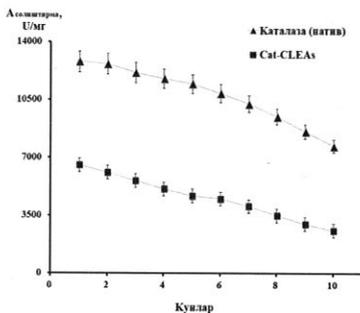
Ферментнинг ўзаро боғланиш самарадорлигини текшириш учун Cat-CLEAs суспензияси микросфералар тўлиқ жойлашгунча инкубация қилинди. Супернатантдаги каталаза фаоллигини ўлчашда фаол ферментнинг қолдиқ миқдори қайд этилган (7-расм). Шундай қилиб, экспериментал шароитда ватеритга бириктирилган барча каталаза Cat-CLEAs ларда глутар алдегид билан ўзаро боғланади. Бунга СС нинг эриши пайтида  $\text{Ca}^{2+}$  ва  $\text{CO}_3^{2-}$  ионларининг юқори маҳаллий концентрацияси туфайли "осмотик зарба" сабаб бўлиши мумкин.

Турғунликни ўрганиш учун назорат тажрибаларини ўрнатишда табиий каталаза эритмасининг хусусий фаоллиги ҳам, Cat-GA ва Cat-CLEAsларнинг фаоллиги ҳам ферментнинг дастлабки концентрациясига боғлиқлиги аниқланди.

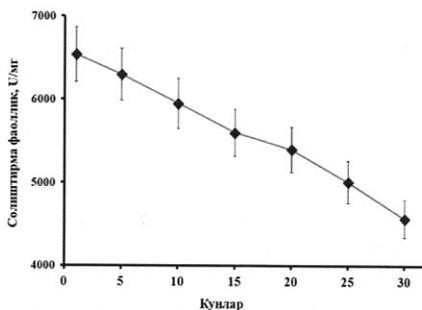


**7-расм. Солиштирма фаолликнинг инкубация вақтига боғлиқлиги**

Бу каталаза инактивациясининг диссоциатив характерини аниқ кўрсатади. Шу муносабат билан, Cat-CLEAs нинг барқарорлиги бир хил концентрацияли фермент эритмаси билан солиштирганда ўрганилди. Расмдан кўриниб турибдики, ватеритда чўктириладиган каталазанинг глутар алдегид билан ўзаро боғланиши бундай препаратлар учун ЭДТА эритмасида фермент барқарорлигининг кутилган ўсишига олиб келмади.



8-расм. Cat-CLEAs микрофераларининг саклаш барқарорлиги (4°C, ЭДТА)



9-расм. ТРИС буферида вақт ўтиши билан Cat-CLEAs микрозарраларининг солиштирма фаоллиги, 4°C

Шу билан бирга, суспензиядаги Cat-CLEAs зарралари сони деярли ўзгармади. Шу муносабат билан келажакда синтез қилинган микрофераларнинг ўзига хос фаоллигини саклаш муддатини ошириш учун ТРИС буфер эритмасидан фойдаланилди (9-расм). ТРИС буфер эритмасига ўтиш вақт ўтиши билан заррача барқарорлиги давомийлигини оширишга ёрдам бериши аниқланди.

$H_2O_2$  нинг катализатор - каталаза иштирокида парчаланиш кинетикасини ўрганиш шуни кўрсатдики, водород пероксидининг парчаланиш тезлиги кислород концентрациясига корреляция коэффициентининг квадратик қиймати 0,963 бўлган логарифмик боғлиқликка эга. Бу факт ўрганилаётган реакциянинг мунтазам йўналишини тасдиқлайди. Михаэлис-Ментен тенгламаси константасининг қийматини аниқлаш учун  $1/\vartheta$  нинг  $1/[C]$  га боғлиқлигини топдик. Бу боғлиқлик  $K_M=3,338$  ва  $\vartheta_{max} = 1719 \frac{mol}{l \cdot s}$  қийматлари қабул қилиб, катъий чизиқли характерга эга эканлигини аниқладик.

Амалга оширилган тадқиқотлар асосида ватерит матрицаси асосида каталаза микрофераларини олиш учун оптимал шароитлар асослаб берилди. Ватерит матрицасини эритиш учун хелатлаштирувчи восита сифатида 0,1 М ЭДТА дан 200/1 GA/каталазанинг ўзаро боғланиш агенти нисбатида агентни фракционал кўшиш орқали фойдаланиш тавсия этилади.

Ҳозирги кунда ферментатив нано заррачаларнинг микрофераларини олиш соҳасида ривожланаётган ёндашувлардан бири магнит нано заррачалар (МНЗ) иштирокида паст частотали ўзгарувчан майдондан фойдаланиш ҳисобланади. Магнит сезгир CLEAsларни синтез қилиш технологияси ва бундай заррачаларни паст частотали ўзгарувчан магнит майдон (ПЧ ўММ) таъсирида бошқариш қобилияти магнит нано заррачалар иштирокида ўзаро боғланишни амалга ошириш орқали CLEAs зарраларининг мураккаблиги ва долзарблигини янги даражасига кўтариш имконини беради.

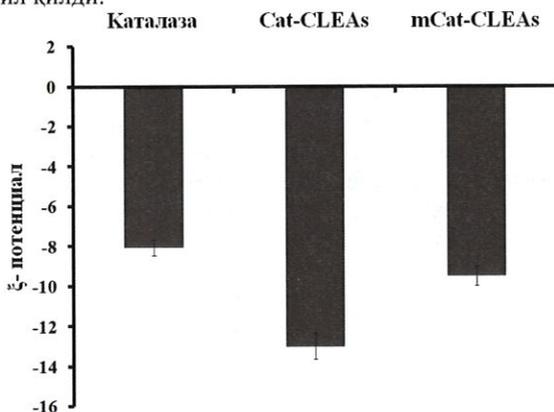
Феррозин тести ёрдамида микросфералардаги магнит нанозаррачаларнинг микдорий таркиби аниқланди ва киритилган нанозарраларнинг 50% гача mCat-CLEAs таркибига кириши аниқланди.

mCat-CLEAs заррачаларини синтез қилиш усулини ишлаб чиқишда биз темир (III) ацетиласетоннинг бензил спиртида термик парчаланиши натижасида олинган ва допамин билан қопланган темир оксиди нанозарраларидан фойдаландик.

Тажрибада ватерит микросфераларини тайёрлаш жараёнида тизимга бир вақтда каталаза ферменти қўшилиши билан ўлчами  $9 \pm 2$  нм бўлган синтезланган сфера шаклидаги МНЗлар қўлланилди. Ватеритга магнит нанозаррачалар ва каталазаларнинг бир вақтда киритилиши CLEAs синтезининг бошқа ҳолатларидаги каби mCat-CLEAs шаклининг ўзгаришига олиб келмаслиги аниқланди.

Cat-CLEAs микросфераларини синтез қилишда магнит заррачалардан фойдаланиш истиқболларини баҳолаш учун синтез қилинган mCat-CLEAs заррачаларининг асосий физик-кимёвий хусусиятлари ўрганилди. 10-расмда Cat-CLEAs ва mCat-CLEAs заррачаларининг  $\xi$ -потенциал қийматлари кўрсатилган. Магнит нанозаррачаларнинг киритилиши микрозаррачаларнинг  $\xi$ -потенциалини Cat-CLEAsларга қараганда камроқ салбий қилишини кўрсатди, бу эса магнит нанозаррачаларни синтез қилиш шартлари билан боғлиқ деб қаралади.

Карбонат матрицаси эритилгандан кейин реакция аралашмасини таҳлил қилиш шуни кўрсатдики, биргаликдаги чўктиришда оксилнинг киритилиши  $54 \pm 6$  мг/г ташувчи, mCat-CLEAs ларда ферментнинг хусусий фаоллиги ЭДТА эритмасида  $4540 \pm 470$  U/мг ни, ТРИС буфериди (pH- 8,0)  $3000 \pm 200$  U/мг ни ташкил қилди.



10-расм. mCat-CLEAs микросфераларининг  $\xi$ -потенциал қийматлари

mCat-CLEAs микросфераларида каталаза барқарорлигини баҳолаш учун препарат ЭДТА ва ТРИС буфер эритмасида  $4^\circ\text{C}$  да инкубация қилинди (2-жадвал). Шуни таъкидлаш жоизки, 10 кунлик инкубациядан сўнг ҳар иккала эритмада ҳам каталаза нисбатан юқори барқарорликни кўрсатди. Шу билан

бирга, фермент СС-mCat-GA ватерит матрицасида 10 кун давомида сақланганда янада юкори барқарорликни кўрсатди, шундан сўнг фаолликни ўлчаш учун у ЭДТАда эритилди ва ТРИС буфер эритмасига ўтказилди. Натижада каталазининг инкубациядан олдинги хусусий фаоллигига нисбатан хусусий фаоллиги 90-92% гача сақланиши кузатилди.

Фермент матрицада юкори фаолликни сақлаб қолиши маълум бўлганлиги сабабли, ферментни СС-mCat-GA матрицасида 30 кун давомида 4°C да инкубация қилиш учун тажриба ўтказилди, вақти-вақти билан алиқвотларни эритиб, каталаза фаоллиги ўлчанилди. Ватерит матрицаси эритилгандан сўнг, микросфералар ТРИС буферига ўтказилди (11-расм).

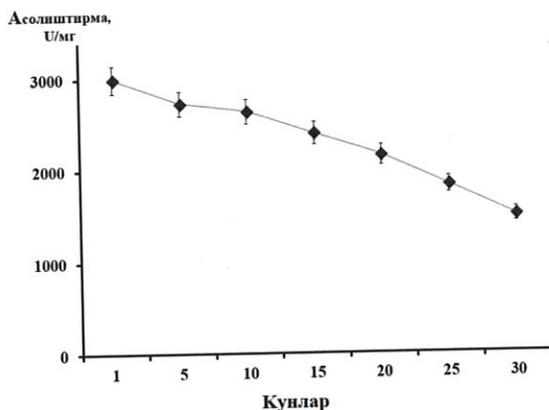
Магнит нанозаррачалар асосида бионаноматериаллардан биокимёвий реакцияларни бошқариш учун фойдаланиш имкониятларини кенгайтирувчи муҳим тадқиқотлардан бири магнит майдонларининг тизим компонентларининг физик-кимёвий хусусиятларига таъсирини ўрганиш хисобланади.

## 2-жадвал

**mCat-CLEAs заррачаларида солиштирма фаолликнинг сақланиши, (U/мг)**

	1-ден (инкубацияга қадар)	10-ден (еритмада)	10-ден (матрицада)
mCat-CLEAs (ЕДТА)	4540 ± 470	1450 ± 220	3600 ± 350
mCat- CLEAs (ТРИС-8,0)	3000 ± 200	2600 ± 250	2700 ± 280

ПЧ ЎММ таъсири паст частотали ўзгарувчан магнит майдон генератори TOR MFG 01/12 (Наноматериаллар, Россия) частотаси 50 Гц ва индуксияси 110 мТ бўлган қурилмада олиб борилди. Синов намунасига ПЧ ЎММ 30 дақиқа давомида таъсир қилди. Бу вақтдан сўнг намунада микросфераларнинг мавжуд эмаслиги кузатилди ва бу факт ТЕМ томонидан тасдиқланди. ПЧ ЎММ таъсирида микросфераларнинг микдорий таркибини хисоблаш ёруғлик микроскопи ёрдамида аниқланди.



11-расм. СС-mCat-GA матрицасида бир ой давомида фермент инкубациясида каталазининг хусусий фаоллиги, (4°C, ТРИС буфери)

Намунага ПЧ ЎММ нинг 30 дақиқа давомида таъсирдан сўнг ферментнинг хусусий фаоллиги 95-98% гача тикланди. Магнит майдон таъсир қилмаган иккинчи назорат намунасида эса mCat-CLEAs микросфераларнинг бузилмаган ҳолда чўқиши ва ферментнинг хусусий фаоллигининг сақланганлиги кузатилди.

Микросфераларнинг мавжудлигини аниқлаш учун ПЧ ЎММ таъсирининг бошида ва охирида микросфералар сони ҳисоблаб чиқилган.

Шуни таъкидлаш керакки, ПЧ ЎММ таъсирдан 30 дақиқа вақт ўтгач, оптик микроскопда "бутун" микросфералар аниқланмаган. Бу факт ҳам ТЕМ томонидан тасдиқланди.

Амалга оширилган тадқиқотлар асосида mCat-CLEAs асосидаги контейнерлар ёрдамида дори воситаларини етказиб бериш имконияти асосланди.

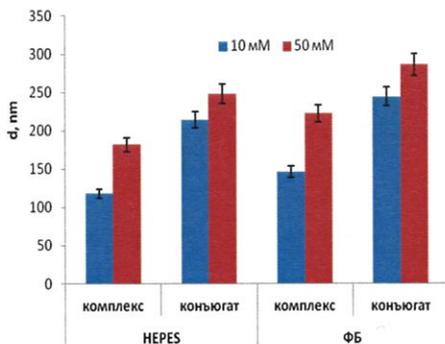
Диссертациясининг V боби "Қўш қаватли полимер матрицаси (протамин ва ПЕГ-ПГ) асосида биферментли нанозаррачаларни (супероксиддисмутаза ва каталаза) олиниш техникасини ишлаб чиқиш ва оптималлаштириш" да электростатик кучлар таъсирида оқсил комплекслари ва иономерларнинг ўз-ўзини йиғиш усули ёрдамида матрица-полимер асосидаги биферментли нанозаррачаларни олишнинг оптимал шартлари келтирилган. Олинган нанозаррачаларнинг физик-кимёвий хоссалари ҳамда каталаза ва супероксиддисмутазанинг ферментатив фаоллиги ва вақтга нисбатан барқарорлиги ўрганилган.

Минимал ўлчамдаги биферментли нанозаррачалар олишнинг оптимал шароитларни танлаш мақсадида фермент-полионли комплекслар ҳажмининг таъсири, муҳитнинг рН киймати, шунингдек, ишлатиладиган буфер эритмаларнинг табиати ва концентрацияси каби факторлар ўрганилган.

Маълумки, фермент-полионли комплексларнинг катталиги комплекс ҳосил бўлиш шароитларига, хусусан, муҳитнинг рН кийматига, фойдаланилган буфер эритмаларнинг табиати ва концентрациясига боғлиқ. Олинган экспериментал маълумотлар шуни кўрсатдики, ферментларнинг дастлабки моляр нисбати бизнзим комплексларнинг ўлчамларига ҳам таъсир қилади. Аниқланишича, СОД1/каталаза моляр нисбати 2:1 бўлганида СОД1/каталаза комплексларининг гидродинамик ўлчамлари минимал бўлиб, бу дори таъминотини яхшилаш имконини беради.

Буфер эритманинг табиати ва концентрациясининг СОД1/каталаза комплекслари ва протамин ва ПЕГ-ПГ асосидаги конюгатларнинг ўлчамларига таъсири тавсифланган (12-расм).

Кўриниб турибдики, буфер эритмалар концентрациясининг пасайиши билан заррачалар ҳажмининг пасайиши кузатилади. Буни эритмадаги ионлар концентрациясининг пасайиши билан электр қўш қаватнинг торайиши билан изохлаш мумкин. НЕРЕС буфер эритмасида заррачаларни синтез қилиш комплекслар ва конюгатлар шаклида кичикроқ ўлчамдаги препаратларни олиш имконини беради.



**12-расм. Қўш қаватли полимер матрицага асосланган СОД1/каталаза комплекслари ва конюгатларининг гидродинамик ўлчамларининг буфер табиати ва концентрациясига боғлиқлиги (рН=7,4, СОД1/каталаза 2:1).**

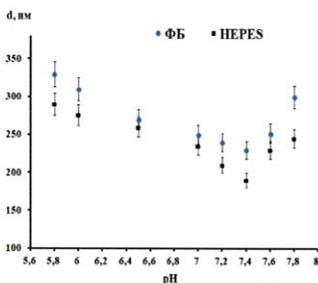
Қўш қаватли полиион биэнзим конюгатларнинг ҳосил бўлган заррачаларининг гидродинамик диаметрига рН қийматининг таъсири ўрганилди. Бу боғлиқлик, буфернинг табиатидан қатъий назар, рН 7,4 да аниқ минимал қиматга эга бўлишлиги ўз исботини топди. Бироқ, барча ўрганилган рН қийматларда фосфат буферда синтез қилинган конюгатларнинг ўлчамлари НЕРЕС буфер эритмасида синтезланган заррачаларга нисбатан сезиларли даражада каттароқдир эканлиги аниқланди (13-расм).

Олинган экспериментал маълумотлар шуни таъкидлашга имкон берадики, минимал ўлчамдаги қўш қатламли полимер матрица (протамин ва ПЕГ-ПГ) асосида қўш қатламли биэнзим СОД1/каталаза конюгатларини олиш учун оптимал шароит деб рН-7,4 да 10 мМ НЕРЕС буфер эритмасидан фойдаланиш ҳисобланади.

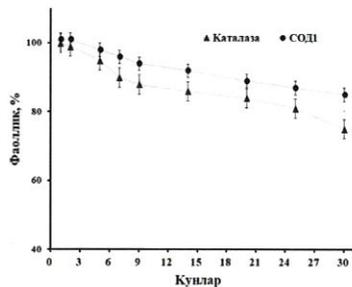
Олинган конюгатлардаги ферментларнинг барқарорлигини ўрганиш намуна олиш йўли билан амалга оширилди. 14-расмда СОД1 ва каталаза ферментлари фаолиятининг вақтга боғлиқлиги кўрсатилган.

Биэнзим конюгатдаги СОД1 ҳам, каталаза ҳам ўзларининг дастлабки фаоллигини камида 48-60 соат давомида сақлаб туриши аниқланди. Кейинчалик сақлаш билан фаолликнинг йўқолиши сезиларли бўлади ва каталаза СОД1 билан солиштирганда бироз тезроқ инактивланади. Бироқ, 25 кунлик сақлашдан кейин ҳам кузатиладиган фермент фаоллиги 75-85% ни ташкил қилди (14-расм).

Шундай қилиб, қўш қатламли полимер матрица (протамин ва ПЕГ-ПГ) асосида биэнзим нанозаррачаларни (супероксид дисмутаза ва каталаза) олиш техникасидан фойдаланиш энг паст ўлчамдаги конюгат нанозаррачаларни олиш имконини бериши кўрсатилди. СОД1/каталаза 2:1 моляр нисбатда НЕРЕС буфер эритмасининг 10 мМ, рН 7,4 да қўлланилиши минимал ўлчамдаги заррачалар синтези учун мақбул шартлар эканлиги аниқланди. Бундай шароитларда олинган конюгатлар вақт ўтиши билан ҳар иккала фермент учун ҳам нисбатан юқори сақлаш барқарорлигини таъминлашини кўрсатди.



**13-расм. Биэнзим СОД1/каталаза конюгатларининг гидродинамик диаметрининг буфер эритмаси рН қийматига боғлиқлиги**



**14-расм. 40°C да биэнзим қўш қатламли конюгат СОД1/каталазада фермент фаоллигининг сақланиши**

## ХУЛОСАЛАР

1. Ватерит матрицаси асосида каталаза CLEAs микросфераларнинг олиниш усуллари ишлаб чиқилди ва микрозаррачаларнинг барқарорлигини таъминлашнинг мақбул шароитлари аниқланди.

2. Ватерит матрицаси асосида каталаза ферменти молекулалари билан иммобилланган магнитли нанозаррачали системаларнинг физик-кимёвий хоссалари ва уларга ПЧ ЎММ нинг mCat-CLEAs микросфераларига ва нанозаррача юзасида ковалент иммобилланган фермент молекуласининг конформацияси ва фаоллигига таъсири аниқланди.

3. Ватерит, каталаза, CC-Cat, Cat-CLEAs, mCat-CLEAs тизимлар ҳосил қилган қўш электрик қаватларнинг  $\xi$ -потенциаллар қиймати мос равишда  $+9,16 \pm 0,42$ ,  $-8,04 \pm 0,31$ ,  $-20,50 \pm 0,86$ ,  $-13,01 \pm 0,50$  ва  $-9,50 \pm 0,22$  мВ га тенглиги аниқланди.

4. Водород пероксиднинг каталаза билан парчаланиш реакцияси Михаэлис-Ментен тенгламасига бўйсунуши аниқланди. Реакция учун  $K_m=3,338$ ,  $\vartheta_{max}=1719$  мол/(л·с) қийматлари аниқланди.

5. Қўш қаватли полимер матрица (протамин ва ПЕГ-ПГ) асосида биэнзим нанозаррачалар (супероксиддисмутаза ва каталаза) олиниш усуллари ишлаб чиқилди ва мақбуллаштирилди. Ҳосил бўлган нанозаррачаларнинг гидродинамик диаметри буфернинг табиати ва концентрациясига, синтез эритмасининг рН қийматига ва ферментларнинг бошланғич моляр нисбатига боғлиқлиги кўрсатилди. Минимал ўлчамдаги конюгатларни НЕРЕС буфер эритмасида (10 мМ, рН 7,4) СОД1/каталаза моляр нисбати 2:1 бўлган шароитларда олиш мумкинлиги аниқланди. Бундай шароитда олинган конюгатлар ҳар иккала ферментнинг нисбатан юқори сақлаш барқарорлигини намоён этди.

6. Олинган бионаносистемаларнинг В ва РР витаминлари билан комплекслари синтез қилиниб, амалиётга тадбиқ этилди. Шунингдек, олинган микросфералардан мақсадли дори таъминотини ўрганишда фойдаланилди.

**РАЗОВЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ НА ОСНОВЕ НАУЧНОГО СОВЕТА  
PhD.03/30.12.2019.К.02.05 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ  
ПРИ САМАРКАНДСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ**

---

**САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ ШАРОФА РАШИДОВА**

**ТАГИРОВА МАШХУРА АМИРИДДИНОВНА**

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ  
В НАНО- И МИКРОСФЕРЫ**

**02.00.04 – Физическая химия**

**02.00.12 – Нанохимия, нанофизика и нанотехнология (химические науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА  
ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО ХИМИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером В2022.3.PhD/K451.

Диссертация выполнена в Самаркандском государственном университете имени Ш.Рашидова.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Ученого совета по адресу [www.samdu.uz](http://www.samdu.uz) и информационно-образовательном портале «ZiyoNet» ([www.ziyounet.uz](http://www.ziyounet.uz)).

<b>Научные руководители:</b>	<b>Мухамадиев Нурали Курбаналиевич</b> доктор химических наук, профессор
	<b>Клячко Наталья Львовна</b> доктор химических наук, профессор
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Сидиков Абдужалол Сидикович</b> доктор химических наук, профессор
	<b>Ишанкулов Алишер Фармонович</b> доктор философии химии
<b>Ведущая организация:</b>	<b>Национальный университет Узбекистана</b>

Защита диссертации состоится «26» 11 2022 года в 11<sup>00</sup> часов на заседании разового Научного совета на основе Научного совета PhD.03/30.12.2019.K.02.05 при Самаркандском государственном университете (адрес: 140104, г. Самарканд, Бульвар “Университет”, 15, корпус химического факультета, 1-й этаж, 107 кабинет. Тел.: (99866)239-11-40; Факс: (99866)239-11-40. E-mail: [devonxona@samdu.uz](mailto:devonxona@samdu.uz)).

Диссертация зарегистрирована в Информационно-ресурсном центре Самаркандского государственного университета за № 124. С диссертацией можно ознакомиться в ИРЦ (адрес: 140104, г. Самарканд, Бульвар “Университет”, 15, ИРЦ. Тел.: (99866)239-11-51. E-mail: [m\\_nasrullaeva@mail.ru](mailto:m_nasrullaeva@mail.ru)

Автореферат диссертации разослан «18» 11 2022 года.  
(реестр протокола рассылки № 16 от «16» 11 2022 г.)



**Насимов А.М.**  
Председатель разового научного совета  
по присуждению учёной степени,  
д.т.н., профессор

**Сайиткулов Ш.М.**  
Ученый секретарь разового научного  
совета по присуждению учёной степени,  
к.х.н., доцент

**Рузимуродов О.Н.**  
Председатель разового научного  
семинара при Научном совете  
по присуждению учёной степени,  
д.х.н., профессор

## ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Несмотря на то, что в мире ферменты и их иммобилизованные системы широко используются в качестве катализаторов в химии и биотехнологии, адресных носителей лекарственных средств в медицине, наполнителя в пищевой промышленности, пищевых добавок, средств контроля веса, поверхностно-активных веществ в стирке, важным является разработка методов получения наноразмерных частиц и определить возможности их применения, а также термодинамику и кинетику получения магнитных наночастиц и их использование для адресной доставки лекарств в медицине.

В мире большое значение придается получению иммобилизованных ферментов, изучению их термодинамических, кинетических, ферментативных свойств и их строения. В частности, особое внимание уделено механизму иммобилизации каталазы и супероксиддисмутазы на поверхности сорбентов, что служит для устранения состояния страха, вызванного окислительным стрессом, изучению физико-химических и каталитических свойств полученной системы, для получения магнитных наночастиц и воздействия на них низкочастотного переменного магнитного поля.

В нашей стране для защиты ферментов от инактивации разработаны системы белковых антиоксидантов в нано- и микросферах и методы получения наночастиц с высокой белковой продуктивностью и активностью, научные исследования по решению проблем иммобилизации антиоксидантных ферментов, получения их комплексов магнитных наночастиц, поддержание ферментативной стабильности и активности имеет важное значение. В стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан<sup>2</sup> намечены важные задачи, направленные на “освоение выпуска принципиально новых видов продукции и технологий, обеспечение на этой основе конкурентоспособных отечественных товаров на внешний и внутренний рынок”. Поэтому создание новых методов иммобилизации ферментов, усовершенствование существующих, поиск спенсеров и носителей, создание на их основе наносистем, исследование их физико-химических и каталитических свойств, обеспечение их стабильности и расширение возможностей применения является одной из актуальных задач современной физики и нанохимии.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан УП-4947 от 7 февраля 2017 года «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», Постановлениях Президента Республики Узбекистан ПП-388 от 10 октября 2022 года «Об утверждении целевой программы стратегического развития химической и газохимической промышленности», ПП-3983 от 25 октября 2018 года «О

<sup>2</sup> Указ Президента Республики Узбекистан от 07.02.2017 г., N УП-4947 “О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан”.

мерах по ускоренному развитию химической промышленности Республики Узбекистан» и ПП-4805 от 12 августа 2020 года «О мерах по повышению качества непрерывного образования и результативности науки по направлениям «Химия» и «Биология»», а также других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

**Соответствие исследования приоритетных направлений развития науки и технологии в республике.** Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий Республики Узбекистан VII. «Химическая технология и нанотехнология».

**Степень изученности проблемы.** В последние десятилетия в этой области был достигнут значительный прогресс, в основном, благодаря разработке техники иммобилизации, т.е. закрепления молекул ферментов на поверхности твердых водонерастворимых носителей или включения их в структуру гелей. Процесс иммобилизации решает две основные задачи: превращает фермент в гетерогенный катализатор, обеспечивая его многократное использование в проточных системах, и увеличивает его операционную стабильность, что является основным фактором, определяющим внедрение биокатализа в практику.

В этом направлении имеются заслуги таких мировых ученых как Кабанов А.В., Клячко Н.Л., Головин Ю.И., Володкин Д.В., Балабушевич Н.Г., Трушина Д.В., Угланова С.В., Тюкель С.С., Manickam D.S., Sheldon, R.A., Zhao Y., Stookey L.L., Talekar S., Schoevaart, R., Lopez-Serrano P. и других специалистов, что исследование которых позволяет получить улучшенные промышленные биокатализаторы и наносистемы.

В развитие данного направления внесли свой вклад такие ученые Узбекистана, как академики Рашидова С.Ш., Ибрагимов Б.Т., Тураев А.С., профессора Саримсаков А.А., Рузимуродов О.Н., Атаханов А.А., Холмуминов А.А., Вохидова Н.Р. и др. своими исследованиями по изучению нанотехнологических процессов и роль нано- и микросистем в биохимии.

Непосредственное использование ферментов в промышленности часто страдает от таких проблем, как отсутствие у них долговременной стабильности и сложность восстановления активности ферментов, а также сложность их повторного использования. Однако для обеспечения экономической и экологической жизнеспособности этих ценных биокатализаторов применение технологий иммобилизации позволяет их эффективную регенерацию и повторное использование. Поэтому изучение возможностей стабилизации активности ферментов и поддержания ее в течение более длительного периода времени является одной из актуальных задач как в теоретическом, так и в практическом плане.

**Связь темы диссертации с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного учреждения, где выполнена работа.**

Диссертационное исследование выполнено в рамках гранта Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (Госрегистрационной темы АААА-А21-121011290089-4)

и по плану научно-исследовательских работ химического факультета Самаркандского государственного университета.

**Целью исследования** является разработка методов получения микросфер на основе CLEAs каталазы и наноразмерных частиц с иммобилизованными антиоксидантными ферментами и определение их физико-химических свойств.

**Задачи исследования:**

разработка методики получения микрочастиц CLEAs каталазы на основе матрицы ватерита, провести оптимизацию данную методики по стабильности микрочастиц;

исследование физико-химических и ферментативных свойств полученных частиц CLEAs каталазы;

разработка техники получения микрочастиц с иммобилизованными молекулами ферментов в присутствии магнитных наночастиц в ватерите и изучение их физико-химических свойств;

разработка и оптимизация методики получения биферментных наночастиц (супероксиддисмутаза и каталаза) на основе двухслойной полимерной матрицы.

**Объектами исследования** является ферменты каталаза, полученная из бычьей печени и супероксиддисмутаза рекомбинантная, иммобилизованная в микро- и наносферах.

**Предметом исследования** является изучение таких физико-химических параметров частиц, как размер и морфология частиц, определение  $\xi$ -потенциала и константа Михаэлиса-Ментена, суммарная и удельная активность антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутаза иммобилизованной в микро- и наносферах, оптимизация их стабильности.

**Методы исследования.** В исследовании применены спектрофотометрические методы определения активностей ферментов, световая, просвечивающая и сканирующая электронные микроскопии, метод определения размер частиц на установке динамического лазерного светорассеяния «Zetasizer Nano ZS» («Malvern Instrument», Великобритания). Полученные результаты были обработаны статистическими методами.

**Научная новизна исследования** заключается в следующем:

разработаны методы получения CLEAs включением каталазы на основе ватеритовой матрицы и определены оптимальные условия обеспечения стабильности микрочастиц;

определено влияние низкочастотного переменного магнитного поля на микросферы mCat-SLEAs, а также на конформацию и активность ковалентно иммобилизованной молекулы фермента на поверхности наночастиц;

определены значения  $\xi$ -потенциала двойных электрических слоев, образованных системами ватерит, каталаза, CC-Cat, Cat-CLEAs, mCat-CLEAs составляют  $+9,16 \pm 0,42$ ,  $-8,04 \pm 0,31$ ,  $-20,50 \pm 0,86$ ,  $-13,01 \pm 0,50$  и  $-9,50 \pm 0,22$  мВ соответственно;

установлено, что реакция разложения пероксида водорода каталазой подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментена и для реакции равна  $K_M=3,338$ ,  $\theta_{\max}=1719$  моль/(л·с);

определено влияние природы и концентрации буфера, pH и начального молярного соотношения ферментов на гидродинамический диаметр синтезированных биферментных наночастиц.

**Практические результаты исследования** заключаются в следующем:

разработана методика получения CLEAs сшивкой молекул каталазы глутаровым альдегидом;

изучены факторы, влияющие на активность и стабильность иммобилизованных ферментов, определены оптимальные условия синтеза комплексов;

синтезированы mCat-CLEAs комплекс каталазы и магнитных наночастиц в сферической матрице ватерита;

комплексы, образованные бионаносистемами с витаминами B и PP, использовали для изучения адресной доставки лекарственных средств.

**Достоверность результатов исследований.** Основные научные факты, выводы, измерения и измерительные приборы подтверждены в соответствии с международными стандартами для обеспечения единообразия и подтверждаются результатами, полученными с использованием научного оборудования.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.**

Научная значимость результатов исследований заключается в том, что разработан метод иммобилизации антиоксидантных ферментов в нано- и микросферах и определены кинетические, размерные, физико-химические характеристики полученных Cat-CLEAs, mCat-CLEAs и биферментных комплексов. Полученные результаты объясняются получением наноразмерных иммобилизованных ферментных систем и обогащением знаний об их физико-химии.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что метод синтеза Cat-CLEAs, mCat-CLEAs и биферментных комплексов, иммобилизованных в нано- и микросферы, используется для получения других подобных комплексов.

**Внедрение результатов исследования.** На основе научных результатов по изучению иммобилизации антиоксидантных ферментов в нано- и микросферах:

ватеритные микросферы Cat-CLEAs и mCat-CLEAs использованы при исследовании адресной доставки лекарственных препаратов в Лаборатории «Химического дизайна наноматериалов» Московского государственного университета (справка № 221012 от 12.10.2022 года ООО «Нанозим», МГУ). В результате была достигнута адресная доставка лекарств.

биэнзимные наночастицы супероксиддисмутазы и каталазы внедрены в практику в ООО «Директ Квант Технолоджи» (справка № 22-10-18/ДКТ от 18.10.2022 года ООО «Директ Квант Технолоджи»). В результате изучена возможность терапии при синдроме сухого глаза у кроликов.

методы получения комплекса СОД1+каталаза и комплекса магнитных наночастиц с каталазой внедрены в практику на Узбекско-Болгарском СП «Интегра ДД» (Справка №75 “Integra DD” Узбекско-Болгарского СП от 11.04.2022 г.). В результате удалось получить наноконплексы витаминов группы В.

**Апробация результатов исследования.** Результаты данного исследования были обсуждены на 16, в том числе 14 международных и 2 республиканских научно-практических конференциях.

**Опубликованность результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано всего 20 научных работ. Из них 4 статьи, в том числе 3 статья - в зарубежном журнале, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, списка литературы и приложений. Объем диссертации составляет 97 страниц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** обоснована актуальность, задачи и степень изученности проблемы, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, изложены основные положения, выносимые на защиту, указаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Во I главе диссертации “Современные достижения и проблемы физической химии иммобилизации ферментов в нано- и микросферы” приведен литературный обзор работ, посвященных достижениям и проблемам иммобилизации антиоксидантных ферментов в нано- и микросферах. Рассмотрены полиморфные формы карбоната кальция. Представлены сравнительные физико-химические свойства полиморфных форм карбоната кальция. Обосновано актуальность применения биоферментных комплексов, содержащих СОД1 и каталазу с использованием полиэлектролитов.

В II главе диссертации описаны материалы, оборудования и методы исследования.

В III главе “Микросферы CLEAs, полученные методом соосаждением в ватеритной матрице” приведены методы получения CLEAs каталазы, каталазы с магнитными наночастицами.

Микросферы Cat-CLEAs получали согласно модифицированной схеме, приведенной на рис.1. Микросферы ватерита с соосажденной каталазой (продукт CC-Cat) получены сливанием растворов солей  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в присутствии фермента. Для изучения влияния глутарового альдегида на структуру микросфер проведен сравнительный синтез путем растворения карбонатной матрицы с раствором ЭДТА влияние ГА на структуру микросферы было проведено путем обработки CC-Cat раствором глутарового альдегида с последующим растворением карбонатной матрицы раствором

ЭДТА. В результате проведенного синтеза образуется продукты Cat-GA или Cat-CLEAs в зависимости от условий растворения.

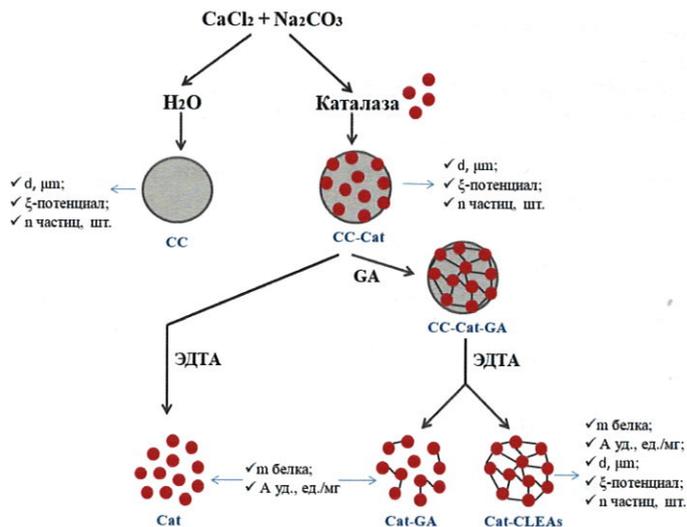
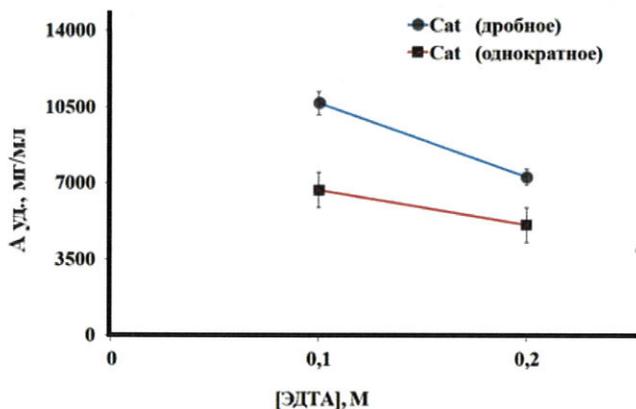


Рис. 1. Схема синтеза CLEAs каталазы

В результате проведенного синтеза на первой стадии образуется агрегат CC-Cat-GA, представляющий собой матрицу состоящую из ватерита и каталазы. На границе между ватеритом и раствором каталазы за счет неравенства электрохимических потенциалов возникает двойной электрический слой (ДЭС). Проведенные исследования по изучению строения ДЭС показали, что включение каталазы достаточно сильно понижает  $\xi$ -потенциал микрочастиц, поскольку в выбранных нами условиях синтеза молекулы каталазы имеют отрицательный заряд. Анализ реакционной смеси образующееся на второй стадии синтеза после растворения карбонатной матрицы 0,2 М раствором ЭДТА показал, что включение сосажденного белка составляет  $54 \pm 8$  мг/г носителя, а удельная активность фермента в Cat-GA составляет  $4200 \pm 600$  ед./мг белка, что приводит к падению на 70 % активности каталазы от исходной. Однако визуальное наличие CLEAs в реакционной смеси не обнаружено. В этой связи изучено влияние условий растворения ватеритной матрицы на функциональные свойства каталазы. На основании литературных данных наиболее целесообразно в качестве растворителя использовать этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

На рис. 2 проведена зависимость удельной активности Cat от условий растворения матрицы карбоната кальция. Установлено, что при переходе к дробному добавлению ЭДТА удельная активность Cat увеличивалась до 60% от исходной активности фермента и была выше, чем при однократном

добавлении хелатирующего агента. По-видимому, каталаза необратимо инактивируется в процессе растворения карбоната кальция, причем высокая скорость растворения ватерита вызывает более сильную инактивацию фермента.



**Рис. 2. Зависимость удельной активности Cat от условий растворения матрицы карбоната кальция**

Можно предположить, что высокая локальная концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{CO}_3^{2-}$  при растворении СС-Cat может влиять на активность фермента в связи с большой ионной силой, приводящей к частичной денатурации фермента. В этой связи были «смягчены» условия растворения путём уменьшения концентрации дробно добавляемой ЭДТА до 0,1 М. При этом было отмечено ещё большее увеличение остаточной удельной активности соосажденной каталазы. Однако при дробном добавлении 0,2 М ЭДТА время полного растворения ватерита составляет 30-40 мин, а при 0,1 М ЭДТА – 60-80 мин.

При получения микросфер сферической формы в качестве бифункционального агента использовали Глутаровый альдегид. Исследовано влияние мольного соотношения GA/каталаза на остаточную активность Cat-GA при дробном добавлении 0,1 М раствора ЭДТА. Полученные данные представлены на рис 3.

При этом наблюдалось существенное снижение остаточной активности фермента при увеличении концентрации сшивающего агента. Очевидно, что этот факт связан с ковалентной модификацией глобулы фермента бифункциональным агентом. В интервале мольных соотношений GA/белок от 1/1 до 100/1 образование микросферы Cat-CLEAs в растворе не наблюдалась. Оптимальным является мольное соотношение 200/1.

Для проведения сравнительной оценки удельной активности Cat и Cat-GA изучена зависимость влияния концентрации ЭДТА на удельную активность фермента. Проведена сравнительная оценка удельной активности Cat и Cat-GA (рис. 4).

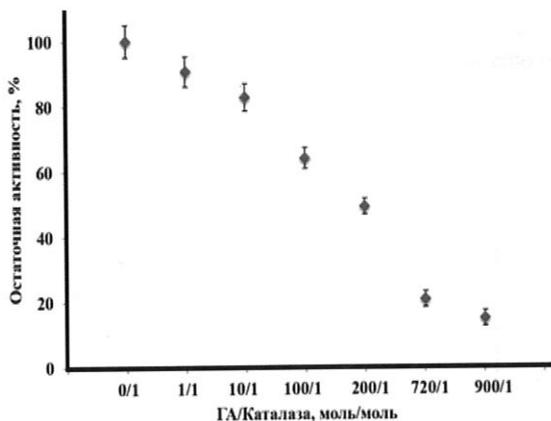


Рис. 3. Влияние GA на остаточную активность Cat-GA

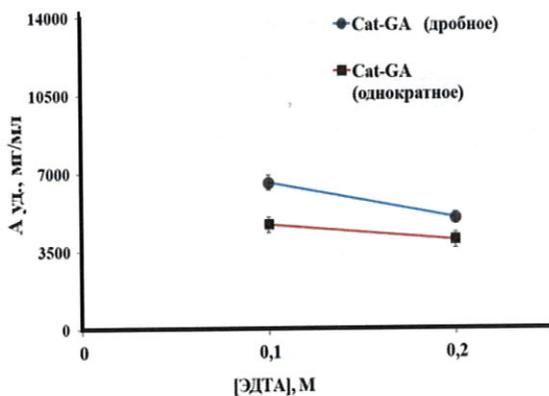
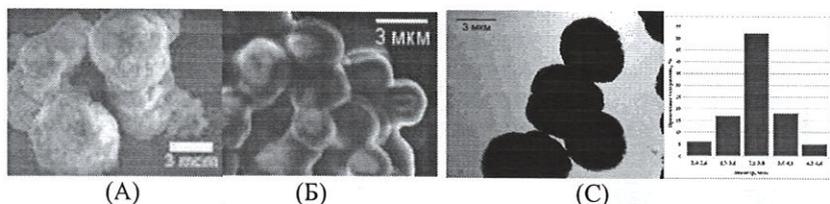


Рис. 4. Зависимость удельной активности Cat-GA от концентрации ЭДТА

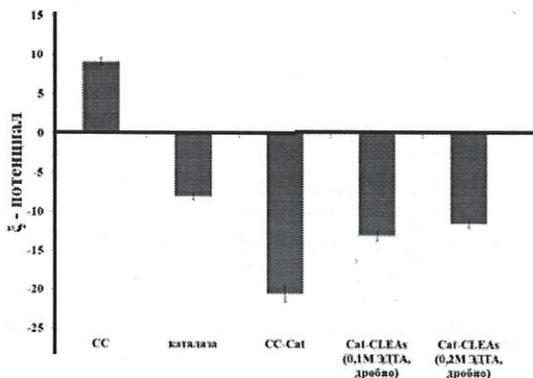
На основании проведенных исследований установлено, что падение активности Cat-GA при всех вариантах растворения матрицы составляло 25 – 30% от активности Cat, в то время как при инкубации нативной каталазы с глутаровым альдегидом (условия эксперимента те же, что и при сшивании каталазы в микрочастицах ватерита) потеря удельной активности была 60–65%. По-видимому, в условиях эксперимента не все молекулы каталазы, включенные в матрицу ватерита, доступны для взаимодействия с бифункциональным агентом.

Форма и размеры полученных микросфер при оптимальных условиях проведения синтеза определены с помощью просвечивающей и сканирующей микроскопии (рис.5). Как видно полученные микросферы Cat-CLEAs имели сферическую форму и сопоставимый с CC-Cat диаметр  $3,4 \pm 1$  мкм.



**Рис. 5.** Микрофотографии Cat-CLEAs (А и Б – в сканирующей электронной микроскопии, С– в просвечивающей электронной микроскопии)

Для оценки устойчивости полученных микрочастиц определено значение  $\xi$ -потенциала.



**Рис. 6.** Значения  $\xi$ -потенциала Cat-CLEAs

На рис. 6 показаны значения  $\xi$ -потенциала исследуемых объектов. Установлено, что  $\xi$ -потенциал Cat-CLEAs увеличивался и приближался к заряду нативной каталазы вне зависимости от концентрации дробно добавляемой для растворения карбонатной матрицы ЭДТА.

Количественное содержание частиц CC, CC-Cat и Cat-CLEAs оценивали с помощью оптической микроскопии. Теоретические расчеты потенциального количества числа микросфер ватерита (исходя из среднего диаметра частиц, плотности ватерита и выхода синтеза) достаточно хорошо совпадали с экспериментальными данными для CC и CC-Cat.

**Таблица 1**

**Общее количество частиц в продуктах синтеза при разных условиях растворения карбонатной матрицы**

Теоретич. кол-во	CC	CC-Cat	Cat-CLEAs		
			0,2 М ЭДТА, однократ.	0,2 М ЭДТА, дробное	0,1 М ЭДТА, дробное
$4,5 \cdot 10^9$	$(5 \pm 1) \cdot 10^9$	$(3,1 \pm 1,5) \cdot 10^9$	-	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(6,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$

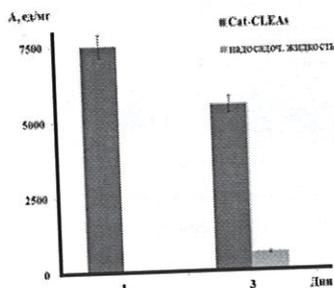


Рис. 7. Зависимость удельной активности от времени инкубации

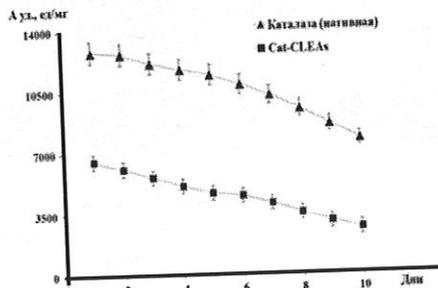


Рис. 8. Стабильность Cat-CLEAs при хранении (4°C, ЭДТА)

Таким образом, можно предположить, что увеличение скорости растворения карбонатной матрицы приводит не только к большей инактивации включенного в матрицу фермента, но и вызывает более сильное разрушение частиц CLEAs.

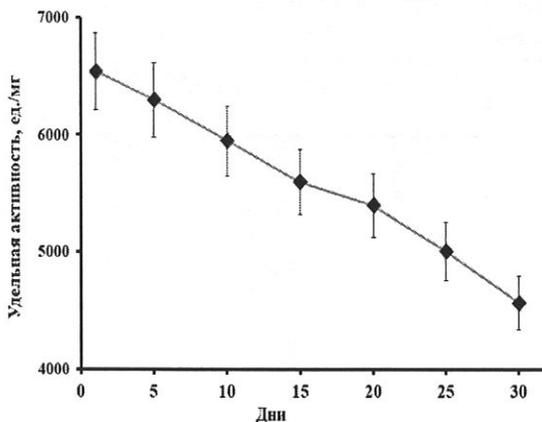
Для проверки эффективности сшивания фермента суспензия Cat-CLEAs инкубировалась до полного осаждения микросфер. При измерении активности каталазы в надосадочной жидкости зафиксированы следовые количества активного фермента (Рис.7). Таким образом, в условиях эксперимента вся сосажденная в ватерит каталаза сшивается глутаровым альдегидом в Cat-CLEAs. Это может быть вызвано «осмотическим шоком» из-за высоких локальных концентраций ионов  $Ca^{2+}$  и  $CO_3^{2-}$  при растворении СС.

При постановке контрольных экспериментов по изучению стабильности было обнаружено, что как удельная активность раствора нативной каталазы, так активность Cat-GA и Cat-CLEAs зависят от исходной концентрации фермента, что однозначно указывает на диссоциативный характер инактивации каталазы. В этой связи стабильность Cat-CLEAs изучалась в сравнении с раствором фермента той же концентрации. Как видно из рис. 8, сшивание сосажденной в ватерите каталазы глутаровым альдегидом не приводило к ожидаемому для подобных препаратов увеличению стабильности фермента в растворе ЭДТА. При этом количество частиц Cat-CLEAs в суспензии практически не менялось.

В связи с этим, в дальнейшем для увеличения продолжительности сохранности удельной активности синтезированных микросфер применяли буферный раствор TRIS (рис. 9). Установлено, что переход к буферному раствору TRIS способствует увеличению продолжительности стабильности частиц по времени.

Изучение кинетики разложения  $H_2O_2$  в присутствии катализатора – каталазы показал, что скорость разложения перекиси водорода от концентрации кислорода имеет логарифмическую зависимость с квадратическим значением коэффициента корреляции 0,963. Данный факт

подтверждает закономерного протекания изучаемой реакции. Для определения значения константу уравнения Михаэлиса-Ментен построили график зависимости  $1/\vartheta$  от  $1/[S]$ . Данная зависимость имеет строго линейный характер со значениями  $K_M=3,338$  и  $\vartheta_{max} = 1719 \frac{\text{моль}}{\text{лс}}$ .



**Рис. 9. Сохранение удельной активности Cat-CLEAs по времени в буферном растворе TRIS, 4°C**

На основании проведенных исследований обоснованы оптимальные условия получения микросфер каталазы на основе ватеритной матрицы. В качестве хелатирующего агента для растворения ватеритной матрицы рекомендовано использование 0,1 М ЭДТА путём дробного добавления агента при соотношении сшивающего агента ГА/каталазе 200/1.

На сегодняшний день одним из развивающимся подходов в области получения микросфер ферментативных наночастиц является использование низкочастотного переменного поля в присутствии МНЧ. Технология получения магниточувствительных CLEAs и возможность управления такими частицами под влиянием НЧ ПМП позволяет поднять на новый уровень сложности и актуальности CLEAs путем проведения поперечной сшивки при наличие магнитных наночастиц.

С помощью феррозинового теста определено количественное содержание магнитных наночастиц в микросферах и установлено, что в структуру mCat-CLEAs включается до 50% вводимых наночастиц.

При разработке метода синтеза mCat-CLEAs использовали наночастицы оксида железа, полученные термическим разложением ацетилацетона железа (III) в бензиловом спирте и покрытые дофамином.

В эксперименте применены синтезированные МНЧ сферической формы размером  $9\pm 2$  нм с одновременным добавлением фермента каталазы в систему при получении микросфер ватерита. Установлено, что одновременное введение в ватерит магнитных наночастиц и каталазу не

привело к изменению формы mCat-CLEAs, как и в других случаях синтеза CLEAs.

Для проведения оценки перспективности использования магнитных частиц при синтезе микросфер Cat-CLEAs изучены основные физико-химические свойства синтезированных mCat-CLEAs. На рис.10 приведены значения  $\xi$ -потенциала Cat-CLEAs и mCat-CLEAs.

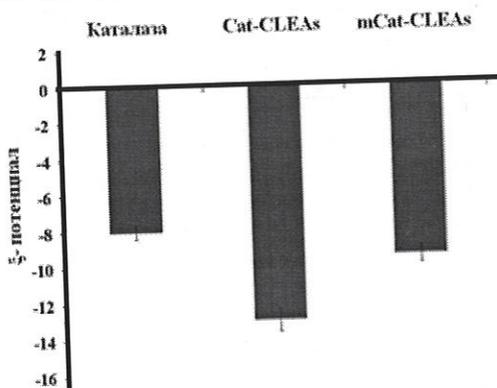


Рис. 10. Значения  $\xi$ -потенциала микросфер mCat-CLEAs

Показано, что включение магнитных наночастиц делает менее отрицательным  $\xi$ -потенциал микрочастиц по сравнению Cat-CLEAs, что связано, по всей видимости, с условиями синтеза магнитных наночастиц.

Анализ реакционной смеси после растворения карбонатной матрицы показал, что включение соосажденного белка составляет  $54 \pm 6$  мг/г носителя, а удельная активность фермента в mCat-CLEAs в растворе ЭДТА составляет  $4540 \pm 470$  ед./мг белка, а в ТРИС буфере (pH-8,0)  $3000 \pm 200$  ед./мг белка.

Для оценки стабильности каталазы в составе mCat-CLEAs препарат инкубировали в ЭДТА и буферном растворе ТРИС при  $4^\circ\text{C}$  (табл. 2). Следует заметить, что после 10 дневного инкубирования каталаза показала относительно высокую стабильность. Однако, еще более высокую стабильность фермент показал при хранении его в ватеритной матрице SS-mCat-GA в течение 10 дней, после чего для измерения активности растворяли в ЭДТА и переносили в буферный раствор ТРИС. В этом случае наблюдался до 90–92 % сохранение удельной активности каталазы по отношению к ее удельной активности до инкубирования.

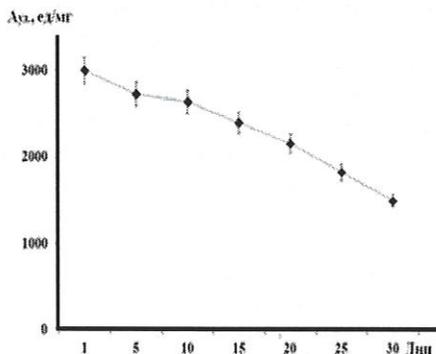
Таблица 2

Сохранение удельной активности mCat-CLEAs, (в ед./мг)

	1-день (до инкубирования)	10-день (в растворе)	10-день (в матрице)
mCat-CLEAs (ЭДТА)	$4540 \pm 470$	$1450 \pm 220$	$3600 \pm 350$
mCat-CLEAs (ТРИС-8,0)	$3000 \pm 200$	$2600 \pm 250$	$2700 \pm 280$

Поскольку выяснилось, что в матрице фермент сохраняет более высокую активность, провели эксперимент по инкубированию фермента в матрице SS-mCat-GA в течение 30 дней при 4°C, измеряя периодически активность каталазы путём растворения аликвот. После растворения ватеритной матрицы микросферы переносили в TRIS буфер (рис.11).

Важным исследованием, расширяющим возможности использования бионаноматериалов на основе магнитных наночастиц для управления биохимическими реакциями, является изучение влияния магнитных полей на физико-химические свойства компонентов системы.



**Рис. 11.** Удельная активность каталазы при инкубировании фермента в матрице SS-mCat-GA в течение месяца, (4°C, TRIS-буфер)

Воздействие НЧ ПМП проводилось на генераторе низкочастотного переменного магнитного поля TOR MFG 01/12 («Наноматериалы», Россия) с частотой 50 Hz и индукцией 110 mT. На исследуемый образец воздействовали НЧ ПМП в течение 30 мин. По истечению данного времени наблюдалось разрушение микросфер. Этот факт был подтвержден с помощью ПЭМ. Расчет количественного содержания микросфер при воздействии НЧ ПМП определяли с помощью световой микроскопии.

Удельная активность фермента после 30 мин воздействия НЧ ПМП была восстановлена на 95-98% до начальной удельной активности фермента. А в контрольном образце наблюдалось осаждение микросфер без разрушения mCat-CLEAs и сохранением удельной активности фермента.

С целью определения наличия микросфер проводился расчет количества микросфер в начале и в конце воздействия низкочастотного переменного магнитного поля.

Следует отметить, что после 30 минутного воздействия ПМП на оптическом микроскопе не обнаруживались «целые» микросферы. Этот факт также был подтвержден с помощью ПЭМ.

На основании проведенных исследований обоснована возможность доставки лекарственных препаратов с помощью контейнеров на основе mCat-CLEAs.

В V главе диссертации “Разработка и оптимизация методики получения биферментных наночастиц (супероксиддисмутаза и каталаза) на основе двухслойной полимерной матрицы (протамина и ПЭГ-ПГ)” приведены оптимальные условия получения биферментных наночастиц на основе полимерной матрицы по методику самосборки комплексов белков и иономеров под воздействием электростатических сил. Изучены физико-химические свойства полученных наночастиц и ферментативная активность и стабильность по времени каталазы и супероксиддисмутазы.

С целью выбора оптимальных условий биферментных наночастиц с минимальным размером изучено влияние размера получаемых фермент-полиионных комплексов, рН-среды, а также природа и концентрация используемых буферных растворов.

Известно, что размер фермент-полиионных комплексов зависит от условий комплексообразования, таких как рН среды, природы и концентрации используемых буферных растворов. Полученные экспериментальные данные показали, что влияние на размеры биферментных комплексов оказывает также исходное молярное соотношение СОД1/каталаза 2:1. Получено, что при молярном соотношении СОД1/каталаза 2:1 гидродинамические размеры комплексов СОД1/каталаза имеют минимальное значение, что позволяет улучшить доставку лекарственных препаратов.

Влияние природы и концентрации буферного раствора на размеры комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза на основе протамина и ПЭГ-ПГ иллюстрирует (Рис. 12).

Как видно, при уменьшении концентрации буферных растворов наблюдается уменьшение размеров частиц. Это можно объяснить тем, что с уменьшением концентрации ионов в растворе происходит сужение двойного электрического слоя. Синтез частиц в буферном растворе НЕРЕС позволяет получать препараты с меньшими размерами, как в виде комплексов, так и в виде конъюгатов.

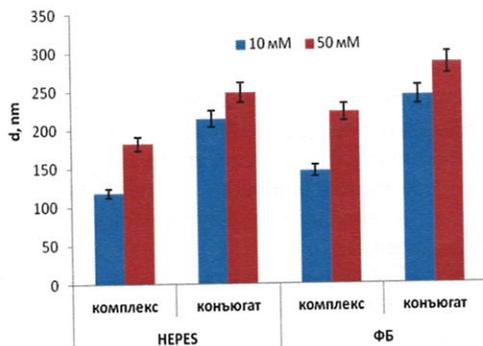


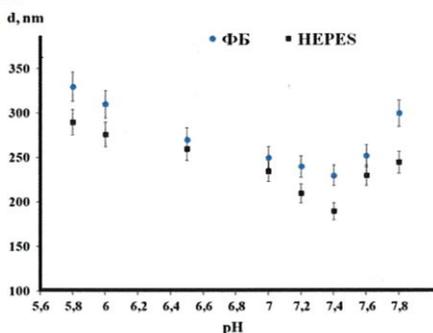
Рис. 12. Зависимость гидродинамических размеров комплексов и конъюгатов СОД1/каталаза на основе двухслойной полимерной матрицы от природы и концентрации буфера (рН=7,4, СОД1/каталаза 2:1).

Изучено влияние величины рН на гидродинамический диаметр получаемых частиц двухслойных полиионных биферментных конъюгатов. Данная зависимость имеет явно выраженный минимум при рН 7,4 вне зависимости от природы буфера. Однако при всех изученных величинах рН размеры конъюгатов, синтезированных в ФБ, достоверно больше по сравнению с частицами, синтезированными в буферном растворе HEPES (Рис.13).

Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что оптимальными условиями для получения двухслойных биферментных конъюгатов СОД1/каталаза на основе двухслойной полимерной матрицы (протамина и ПЭГ-ПП) минимального размера являются использование буферного раствора HEPES с концентрацией 10 мМ при рН 7,4.

Изучение стабильности ферментов в полученных конъюгатах проводили методом отбора проб. На рисунке 14 показана зависимость активностей ферментов СОД1 и каталазы от времени.

Показано, что как СОД1, так и каталаза в составе биферментного конъюгата сохраняют свою первоначальную активность как минимум в течение 48-60 часов.



**Рис. 13. Зависимость гидродинамического диаметра биферментных конъюгатов СОД1/каталазы от величины рН буферного раствора**

При дальнейшем хранении потеря активности становится заметной, причем каталаза инактивируется немного быстрее по сравнению с СОД1. Тем не менее, даже через 25 суток хранения наблюдаемая активность ферментов сохраняется на уровне 75-85% (Рис. 14).

Таким образом, показано, что использование методики получения биферментных наночастиц (супероксиддисмутаза и каталаза) на основе двухслойной полимерной матрицы (протамина и ПЭГ-ПП) позволяет получить наночастицы конъюгатов минимального размера при условиях синтеза буферного раствора HEPES (10 мМ, рН 7,4) при мольном соотношении СОД1/каталаза 2:1. Полученные в этих условиях конъюгаты демонстрируют относительно высокую стабильность обоих ферментов при хранении во времени.

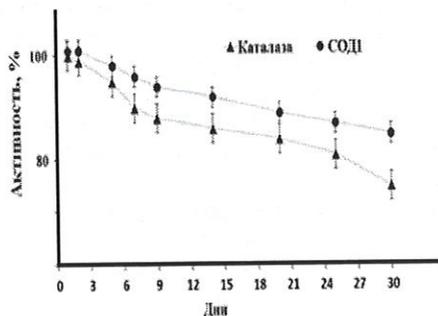


Рис. 14. Сохранение активности ферментов в составе биферментного двухслойного конъюгата СОД1/каталаза при 4°C

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики получения систем CLEAs каталазы, на основе матрицы ватерита и определены оптимальные условия обеспечения стабильности микрочастиц.
2. В системах магнитных наночастиц, иммобилизованных молекулами фермента каталазы на основе матрицы ватерита, определены физико-химические свойства и влияние НЧ ПМП на microsферы mCat-CLEAs, а также на конформацию и активность молекулы фермента, ковалентно иммобилизованной на поверхности наночастицы.
3. Установлено, что значения  $\xi$ -потенциалов двойных электрических слоев, образованных системами ватерит, каталаза, CC-Cat, Cat-CLEAs, mCat-CLEAs соответственно составляют  $+9,16 \pm 0,42$ ,  $-8,04 \pm 0,31$ ,  $-20,50 \pm 0,86$ ,  $-13,01 \pm 0,50$  и  $-9,50 \pm 0,22$  мВ.
4. Показано, что реакция разложения перекиси водорода каталазой подчиняется уравнению Михаэля-Минтана. Рассчитаны значения  $K_M$  и  $\vartheta_{max}$ , которые составляют 3,338 и 1719 моль/(л·с), соответственно.
5. Разработана и оптимизирована методика получения биферментных наночастиц (супероксиддисмутазы и каталаза) на основе двухслойной полимерной матрицы (протамина и ПЭГ-ПГ). Установлено, что гидродинамический диаметр получаемых наночастиц зависит от природы и концентрации буфера, величины pH раствора синтеза и исходного мольного соотношения ферментов. Конъюгаты минимального размера могут быть получены при следующих условиях: синтез в буферном растворе HEPES (10 мМ, pH 7,4) при мольном соотношении СОД1/каталаза 2:1. Полученные в этих условиях конъюгаты демонстрируют относительно высокую стабильность обоих ферментов при хранении.
6. Синтезированы и внедрены в практику комплексы полученных бионаносистем с витаминами группы В и РР. А также полученные microsферы были использованы при исследовании адресной доставки лекарств.

**ONCE-ONLY SCIENTIFIC COUNCIL AWARDING SCIENTIFIC  
DEGREES Ph.D.03/30.12.2019.K.02.05 AT SAMARKAND  
STATE UNIVERSITY**

---

**SAMARKAND STATE UNIVERSITY NAMED AFTER Sh. RASHIDOV**

**TAGIROVA MASHKHURA AMIRIDDINOVNA**

**IMMOBILIZATION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN NANO-  
AND MICROSPHERES**

**02.00.04 – Physical chemistry**

**02.00.12- Nanochemistry, nanophysics and nanotechnology  
(chemical sciences)**

**DISSERTATION ABSTRACT OF DOCTOR OF  
PHILOSOPHY (PhD) ON CHEMICAL SCIENCES**

**Samarkand – 2022**

The theme of the dissertation for doctor of philosophy (PhD) has been registered by the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration number of B2022.3.PhD/K451.

The dissertation research has been carried out at Samarkand State University named after Sh.Rashidov.

The abstract of the dissertation is available in three languages (Uzbek, Russian, English (resume)) on the website of the Scientific Council ([www.samdu.uz](http://www.samdu.uz)) and «ZiyoNet» information-education portal ([www.ziyounet.uz](http://www.ziyounet.uz)).

<b>Scientific supervisors:</b>	<b>Mukhamadiev Nurali Qurbonalievich</b> doctor of chemical sciences, professor
	<b>Klyachko Natalia L'vovna</b> doctor of chemical sciences, professor
<b>Official opponents:</b>	<b>Sidikov Abduljalol Sidikovich</b> doctor of chemical sciences, professor
	<b>Ishankulov Alisher Farmonovich</b> doctor of philosophy on chemical sciences
<b>Leading organization:</b>	<b>National University of Uzbekistan</b>

Defense of the dissertation will be held on "26" 11 2022 at "11<sup>00</sup>" at the meeting of the once-only Scientific Council on awarding scientific degrees of PhD.03/30.12.2019.K.02.05 at Samarkand State University named after Sh.Rashidov (address: 140104, Samarkand city, University Blvd., 15, Building of the Chemistry Department, 1<sup>st</sup> floor, room 107. Ph: (99866) 239-11-40, fax; (99866) 239-11-40. e-mail: [devonxona@samdu.uz](mailto:devonxona@samdu.uz)).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Samarkand State University named after Sh.Rashidov. № 124. (Address; 140104, Samarkand city, University Blvd., 15, IRC, Ph.: (99866) 239-11-51. E-mail: [m\\_nasrullaeva@mail.ru](mailto:m_nasrullaeva@mail.ru)).

The abstract of the dissertation has been distributed on "18" 11 2022 y.  
(Protocol at the register № 16 dated "16" 11 2022 y.)



**Nasimov A.M.**  
Chairman of the Scientific Council  
awarding scientific degrees,  
doctor of technical sciences, professor

**Sayitkulov Sh.M.**  
Scientific Secretary of the Scientific  
Council awarding scientific degrees,  
candidate of chemical sciences, docent

**Ruzimurodov O.N.**  
Chairman of the Scientific Seminar under Scientific  
Council awarding scientific degrees,  
doctor of chemical sciences, professor

## INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

**Purpose of the research** is to develop and optimize methods for obtaining microspheres based on CLEAs and nanospheres based on immobilized antioxidant enzymes.

### **Objectives of the research:**

to develop a technique for synthesize CLEAs catalase microparticles based on the vaterite matrix, to optimize the technique for the stability of the microparticles;

to study the physico-chemical and enzymatic properties of the synthesized CLEAs catalase particles;

to develop a technique for the synthesis of microparticles with immobilized enzyme molecules in the presence of magnetic nanoparticles in vaterite and study their physicochemical properties;

to develop and optimize a method for the synthesis of bifermant nanoparticles (superoxide dismutase and catalase) based on a two-layer polymer matrix.

### **Scientific novelty of the research** is as follows:

a method was proposed for the preparation of CLEAs by incorporating catalase into vaterite matrix and determined optimal conditions for provision of microparticles stability;

the effect of a low-frequency alternating magnetic field was determined on the mCat-SLEAs microspheres, as well as on the conformation and activity of a covalently immobilized enzyme molecule on the surface of nanoparticles;

the values of the  $\xi$ -potential of double electric layers formed by the systems of vaterite, catalase, CC-Cat, Cat-CLEAs, mCat-CLEAs were determined to be  $+9.16 \pm 0.42$ ,  $-8.04 \pm 0.31$ ,  $-20.50 \pm 0.86$ ,  $-13.01 \pm 0.50$  and  $-9.50 \pm 0.22$  mV, respectively;

it was determined that the decomposition reaction of hydrogen peroxide with catalase obeys the Michaelis-Menten equation and for the reaction  $K_M = 3.338$ ,  $\theta_{max} = 1719$  mol/(l·s);

the influence of the nature and concentration of the buffer, pH, and the initial molar ratio of enzymes on the hydrodynamic diameter of the synthesized bienzymatic nanoparticles was determined.

**Implementation of the research results.** On the basis of scientific results on the study of the immobilization of antioxidant enzymes in nano- and microspheres:

the vaterite microspheres of Cat-CLEAs and mCat-CLEAs were used in the study of targeted drug delivery at the Laboratory of the "Chemical Design of Nanomaterials", Moscow State University (certificate No. 221012 dated October 12, 2022, LLC Nanozim, Moscow State University). As a result, targeted drug delivery was achieved;

bienzymatic superoxide dismutase and catalase nanoparticles have been put into practice at "Direct Quantum Technology" LLC (certificate No. 22-10-18/DKT dated October 18, 2022, "Direct Quant Technology" LLC). As a result, the possibility of therapy for dry eye syndrome in rabbits was studied.

the methods for the synthesis of the SOD1 + catalase complex and the complex of magnetic nanoparticles with catalase have been put into practice at the Uzbek-Bulgarian joint venture "Integra DD" (Reference No. 75 "Integra DD" of the Uzbek-Bulgarian joint venture of 11.04.2022). As a result, it was possible to prepare the nanocomplexes of B vitamins.

**The structure and volume of the dissertation.** The dissertation consists of an introduction, four chapters, conclusions, a list of references and applications. The volume of the dissertation is 97 pages.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Тагирова М.А., Еремеев Н.Л., Ванеев А.Н., Балабушевич Н.Г., Алексашкин А.Д., Зайцева Е.А., Клячко Н.Л. Получение двухслойного полиионного биферментного комплекса супероксиддисмутазы 1 и каталазы минимального размера // Вестник Московского Университета. Серия 2. – 2020. – Т.63. - С. 303-308. (<http://chemnet.ru/rus/vmgu/204/303.pdf>, Scopus, IF = 0,258).

2. Tagirova M.A., Ereemeev N.L., Vaneev A.N., Balabushevich N.G., Aleksashkin A.D., Zaitseva E.A., Klyachko N.L. Synthesis of a two-layer polyionic bienzyme complex of superoxide dismutase 1 and catalase of the smallest size // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2020. - V.75, № 4. - P. 238-242. (<https://link.springer.com/article/10.3103/S0027131420040082>, Scopus, IF = 0,8).

3. Тагирова М. А., Еремеев Н.Л., Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Клячко Н.Л. Получение поперечно-сшитых агрегатов каталазы на основе матрицы ватерита // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – №. 4. – С. 51-59 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=46502975>, Scopus, IF = 0,535).

4. Tagirova M.A., Muxamadiyev N.Q., Balabushevich N.G., Ereemeev N.L., Klyachko N.L. Ikki qatlamli bienzim poliion superoksiddismutaza 1/katalaza kompleksining sintezi va uning xossalari // Samarqand davlat universiteti ilmiy axborotnomasi. – 2022. – Т.131. - № 1. – 20-27 б. (02.00.00, 9)

**II бўлим (II часть; II part)**

5. Тагирова М.А., Веселов М.М., Ефремова М.В., Баракoвская И.А., Секундо Ф., Мажoуга А.Г., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. «Влияние ультранизкочастотного магнитного поля на фенилацетонмонооксигеназу, иммобилизованную на магнитных наночастицах типа ядро@оболочка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au». The proceedings of International forum «Biotechnology: state of the art and perspectives», LLC “RED GROUP” Moscow, 2018. P. 228-230.

6. Veselov M.M., Tagirova M.A., Efremova M.V., Barakovskaya I.A., Secundo F., Majouga A.G., Golovin Yu I., Klyachko N.L. «Effect of alternating magnetic field on the structure and catalytic activity of immobilized on the surface of core@shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles phenylacetone monooxygenase». 9th International Conference “Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances of Toxicology and Ecology Issues” 6-13 May 2018, Heraclion, Crete, Greece, P. 47-47.

7. Тагирова М.А., Веселов М.М., и др. «Влияние УН ПМП на фермент фенилацетон монооксигеназу (ФАМО), иммобилизованной на магнитных наночастицах». Сборник научно-практической конференции «Роль химии в

развитии экономики Узбекистана». 24-25 мая 2018г., Самарканд, Узбекистан. С. 13-14.

8. Тагирова М.А., Веселов М.М., Ефремова М.В., Мажуга А.Г., Клячко Н.Л. «Изучение влияния размера иммобилизованных наночастиц  $Fe_3O_4@Au$  типа магнетит@золото на ферментативную активность фермента фенилацетон монооксигеназы». VI международной научно-практической конференция «Биотехнология: наука и практика» г. Ялта. «Актуальная биотехнология» №3(26), 2018.

9. Tagirova M.A. «Multilayer polyion complex of Superoxide dismutase1 brain injury treatment». 3<sup>rd</sup> International Conference on Life and Environmental Sciences, «ICSB» г Каунас, Литва. №3, 2019, стр.292.

10. Тагирова М.А., Ванеев А.Н., Клячко Н.Л. «Многослойный полиионный комплекс супероксиддисмутазы1 и каталазы для лечений травм в медицине». II всероссийской конференции «Химия биологически активных веществ», г. Саратов, Россия, 21-25 октября 2019.с. 308-309.

11. Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Клячко Н.Л., Володькин Д. «Пористые микрочастицы каталазы, полученные на основе ватерита  $CaCO_3$ ». Актуальная биотехнология, №3 (34),2020, стр 318.

12. Астафуров М.О., Тагирова М.А., Комарова М.Ю., Клячко Н.Л., Григорьева А.В. «Анализ pH-зависимости ферментативной активности  $Cu,Zn$ -супероксиддисмутазы». XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2020", Москва, Россия, 10-27 ноября 2020.

13. Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Еремеев Н.Л., Клячко Н.Л. «Получение микрочастиц ватерита с иммобилизованным ферментом – каталазой методом совместного соосаждения». в сборнике BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART & PERSPECTIVES, место издания Moscow, 2020. с. 84-85.

14. Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Власова К.Ю., Володькин Д., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. «Включение магнитных наночастиц магнетита в белковые частицы каталазы». в сборнике BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART & PERSPECTIVES, место издания Moscow, 2020. с. 83-84.

15. М.А. Тагирова, Н.Л. Еремеев, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко. «Получение биферментных сшитых агрегатов каталазы и супероксиддисмутазы на основе ватеритной матрицы». IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика», Ялта, 2021. В сборнике журнала «Актуальная биотехнология» №1(35), 309 стр, 2021.

16. Тагирова М.А., Еремеев Н.Л., Балабушевич Н.Г., Володькин Д., Клячко Н.Л. «Получение поперечно-сшитых агрегатов каталазы на основе ватеритной матрицы». в сборнике «Biotechnology: state of the art and perspectives», Moscow, 106-108 стр., 2021.

17. Тагирова М.А., Балабушевич Н.Г., Еремеев Н.Л., Клячко Н.Л. Study of the effect of a low-frequency alternating magnetic field on the structure and

enzymative activity of catalase microparticles obtained in the presence of magnetic nanoparticles in a vaterite matrix. Материалы III-Международной научно-практической конференции «Развитие химической науки и область её использования», 15-20 стр., 10-ноября, 2021 г, г. Душанбе, Таджикистан.

18. Tagirova M.A. Preparation of biozymatic cross-linked conjugates based on a vaterite matrix. Муждународный научно-практический журнал «XIV Глобальные науки и инновации 2021: Центральная Азия. 22-27-октябрь, 2021, 83-85 стр., Нур-Султан, Казахстан.

19. Tagirova M.A. Protein-containing immobilized enzyme systems and their applications in biotechnology. «Кимё ва кимёвий технология йуналишидаги долзарб муаммолар» Республика илмий-амалий анжуманининг материаллар туплами, 20-21 декабрь, 2021 й., 243-245 бб., Тошкент, Узбекистон.

20. M.A. Tagirova, N.L. Klyachko, N.K. Mukhamadiev. Cross-linked antioxidant nanozymes: optimization of the synthesis. Материалы конференции Актуальные проблемы химии природных соединений. – 2022. – Ташкент, Узбекистан.

Автореферат Шароф Рашидов номидаги Самарқанд давлат университетининг  
“Илмий ахборотнома” журнали таҳририятида таҳрирдан ўтказилди (15.11.2022 йил).

Босмахона лицензияси:



4268

Тасдиқнома

№ 8376-525f-572d-f37b-0fd6-3529-7957

2022 йил 16 ноябрда босишга рухсат этилди:  
Қоғоз бичими 60×84<sub>1/16</sub>. “Times New Roman” гарнитураси.  
Рақамли босма усулда босилди. Ҳисоб-нашриёт т.: 2,04.  
Шартли б.т. 2,8. Адади 100 нусха. Буюртма №16/11.

---

СамДЧТИ таҳрир-нашриёт бўлимида чоп этилди.  
Манзил: 140104, Самарқанд ш., Бўстонсарой кўчаси, 93-уй.