

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ, ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ, ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

НОРМАХАМАТОВ НОДИРАЛИ СОХОБАТАЛИЕВИЧ

**СУЛЬФАТЛАНГАН ПОЛИСАХАРИДЛАР АСОСИДА
АНТИБАКТЕРИАЛ ВА АНТИВИРУС ФАОЛЛИККА ЭГА
БИОСЕЛЕКТИВ МАКРОМОЛЕКУЛЯР ТИЗИМЛАР**

02.00.10 – Биоорганик кимё

**КИМЁ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

**Кимё фанлари бўйича фан доктори (DSc) диссертацияси автореферати
мундарижаси**

**Оглавление автореферата диссертации доктора наук (DSc)
по химическим наукам**

**Content of the abstract of doctoral dissertation (DSc)
on chemical science**

Нормахаматов Нодирали Сохобаталиевич

Сульфатланган полисахаридлар асосида антибактериал ва антивирус
фаолликка эга биоселектив макромолекуляр тизимлар..... 3

Нормахаматов Нодирали Сохобаталиевич

Биоселективные макромолекулярные системы антибактериального и
противовирусного действия на основе сульфатпроизводных
полисахаридов..... 29

Normakhamatov Nodirali Sokhobataliyevich

Bioselective macromolecular systems on basis of sulfated polysaccharides
having antibacterial and antiviral activities..... 57

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ
List of published works 61

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ, ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ, ЎСИМЛИК МОДДАЛАРИ КИМЁСИ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.27.06.2017.К/В/Т.37.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ

НОРМАХАМАТОВ НОДИРАЛИ СОХОБАТАЛИЕВИЧ

**СУЛЬФАТЛАНГАН ПОЛИСАХАРИДЛАР АСОСИДА
АНТИБАКТЕРИАЛ ВА АНТИВИРУС ФАОЛЛИККА ЭГА
БИОСЕЛЕКТИВ МАКРОМОЛЕКУЛЯР ТИЗИМЛАР**

02.00.10 – Биоорганик кимё

**КИМЁ ФАНЛАРИ ДОКТОРИ (DSc)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент – 2017

Фан доктори (DSc) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2017.1.DSc/K14 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация Биоорганик кимё институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.biochem.uz) ва «Ziynet» Ахборот таълим порталида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи:	Тураев Аббасхан Сабирханович кимё фанлари доктори, профессор
Расмий оппонентлар:	Раҳманбердиев Гаппар кимё фанлари доктори, профессор Азизов Умархон Мухторович кимё фанлари доктори, профессор Мавлянов Саидмухтор Мақсудович кимё фанлари доктори, профессор
Етакчи ташкилот:	Тошкент фармацевтика институти

Диссертация химояси Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон Миллий университети, Ўсимлик модалари кимёси институти ҳузуридаги DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2017 йил _____ соат _____ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63).

Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (_____ рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100125, Тошкент ш., Мирзо Улуғбек кўч., 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Диссертация автореферати 2017 йил _____ куни тарқатилди.
(2017 йил _____ даги _____ рақамли реестр баённомаси).

Ш.И.Салихов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
раиси, б.ф.д., академик

М.И.Асраров
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, б.ф.д., профессор

А.А.Ахунов
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фан доктори (DSc)лик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Дунёда инфекцион касалликларга қарши курашда патогенларнинг қуйи молекуляр биологик фаол моддаларга нисбатан тез ва осон чидамлилиқ (резистентлик) ҳосил қилиши долзарб муаммолардан биридир. Бугунги кунда биоорганик кимё, биокимё, микробиология экспериментал усуллариининг ривожланиши дори препаратларининг патоген микроблар, вирусларга таъсирини молекуляр даражада ўрганиш ва самарадор биологик фаолликнинг юзага келиш механизмларини очиш имконини бермоқда.

Ўзбекистон мустақилликка эришгандан сўнг республикамизда аҳолини юқумли инфекцион касалликлардан химоя қилиш, уларнинг олдини олишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Мазкур йўналишда амалга оширилган дастурий чора-тадбирлар асосида, муайян натижаларга, жумладан, янги ёндашувларга асосланган, юқори самарадор, импорт ўрнини босувчи антибактериал ва антивирус препаратлар яратиш борасида натижаларга эришилди. Сўнги йилларда бактерия ва вирусларнинг ингибирланишида протеогликанларнинг роли ҳақидаги маълумотларнинг пайдо бўлиши протеогликансимон структурага эга бўлган полианион табиатли полисахаридлар, жумладан гликозаминогликанлар асосида патоген микробларни ингибирловчи хоссага эга янги авлод препаратлар яратиш учун тurtки берди. Бу борадаги ишларни амалга оширишда Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида кўрсатилган фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари билан таъминлашни яхшилаш бўйича белгиланган вазифалар дастуруламал бўлиб хизмат қилади.

Бугунги кунда жаҳонда патоген гликопротеинларини комплементар блокловчи полисахаридлар ва уларнинг полианион ҳосилалари (сульфатланган, фосфатланган ва ҳ.к.) асосида протеогликансимон структуралар олиш антибактериал ва антивирус фаолликларга эга макромолекуляр системалар яратиш ва патогенлар чидамлилиги (резистентлиги)ни енгувчи дори препаратлари ишлаб-чиқирилиши имконини беради. Диссертация иши натижаларининг долзарблиги ва зарурати патоген рецепторлари (гликопротеинлари) билан комплементар таъсирлашувчи ва организм соғлом хужайраларининг зарарланиши жараёнида уларнинг блокланишига олиб борувчи протеогликансимон полисахарид структуралар яратиш имконини берувчи юқорида таъкидлаб ўтилган макромолекуляр системаларни яратишдан, полианион полисахаридлар структуралари билан уларнинг антимикроб ва антивирус фаолликлари ўзаро боғлиқликларини аниқлашдан иборатдир.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2006 йил 14 июлдаги ПҚ-416-сон «Маҳаллий дори-дармон ва тиббиёт буюмлари ишлаб чиқарувчиларни қўллаб-қувватлаш чора тадбирлари тўғрисида»ги Қарори, 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «Ўзбекистон Республикасини янада

ривожлантириш бўйича Харакатлар стратегияси тўғрисида»ги Фармонида ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот Республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI. «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи¹.

Полианион структурага эга полисахаридлар ва уларнинг патогенлар билан ўзаро таъсирлашувларини ўрганишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Ягеллон университети, (Польша); Токио университетининг саноат фанлари институти; марказий илмий текшириш лабораторияси (Япония); Эрланген-Нюрнберг университети клиник ва молекуляр вирусология институти (Германия); Онтариодаги Polydex Pharmaceuticals Limited Канада фармацевтика компанияси (Канада); Биоорганик кимё институти, Ўзбекистон Миллий университети Полимерлар кимёси ва физикаси институтларида олиб борилмоқда.

Модификацияланган полианион структурали полисахаридлар ва уларнинг биологик фаолликларига оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: сульфатланган полиаллиламин гидрохлорид ва N-сульфатланган хитозан ҳосилалар синтез қилинган ва уларнинг А ва В типдаги грипп вирусларига таъсири аниқланган (Ягеллон университети, Польша); орттирилган иммун танқислиги синдроми вируси (ОИВ) га қарши фаолликка эга алкил олигосахаридлар, мальтогексозидлар октадецили, ламинаринпентозид додецилсульфати ва додеилламинарин олигомерлар синтезланган, ҳамда уларнинг вирусни 50% ингибирлаш самараси 0,4-0,7 мкг/мл диапазонда эканлиги аниқланган (Токио университети, Япония); табиий сульфатланган полисахаридлар жинсий йўл билан юқувчи касалликларни олдини олиш учун дори препаратлари ишлаб чиқишда муҳим объектлар эканлиги аниқланган (Эрланген-Нюрнберг университети, Германия); целлюлоза сульфати асосида «Ushercell» дори препаратининг III-фаза кенг доирадаги клиник олди синовлари ўтказилиб, *Neisseria gonorrhoeae* ва *Chlamydia trachomatis* га қарши кенг доирада антимикроб фаолликка эга бўлган контрацептив ва жинсий йўл билан юқувчи инфекцияларга қарши антибактериал препарат ишлаб чиқилган (Polydex Pharmaceuticals Limited, Канада).

Дунёда полианион структурага эга полисахаридларнинг антимикроб ва антивирус фаолликларини аниқлаш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: турли этерификациялаш реакциялари орқали полисахаридлардан полианион

¹ Диссертациянинг мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи www.sciencedirect.com, <https://www.researchgate.net>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles> ва бошқа манбаалар асосида ишлаб чиқилган.

ҳосилаларни синтез қилиш; полисахарид асосларни танлаш ва реакция шароитларини бошқариш; полианион ҳосилалар асосида антибактериал ва антивирус хоссага эга препаратлар ишлаб чиқиш; полианион табиатли полисахаридлар асосида чидамли мутант патогенларга қарши самарали препаратлар олиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Модификацияланган макромолекуляр системалар, жумладан полианион структурали полисахаридлар асосида антибактериал ва антивирус препаратлар яратиш, биоорганик кимёнинг янги йўналиши ҳисобланади ва у патоген сиртидаги гликопротеинларнинг «кулф-калит» принципи бўйича ингибирланиши (блокировкаси) га асосланади.

Хорижда, шу кунгача, турли илмий марказларда полианион табиатли табиий ва синтетик полимерларни ажратиш, уларни тавсифлаш ва биологик фаолликларини аниқлаш ишлари олиб борилган бўлсада ҳар бир муаллиф ўзи ўрганган ва маълум бир молекуляр катталиikka эга индивидуал намуналарига асосланган ҳолда ёндашуви кузатилади. Шу боис, макромолекуляр занжир кимёвий табиатининг, макромолекула узунлиги (молекуляр масса), анион гуруҳ таркиби, хусусан сульфат гуруҳ, уларнинг ангидрогексоза звеносида жойлашган ўрни (иккинчи C-2, учинчи C-3 ва олтинчи C-6 углерод атомларидаги) ва бошқа катталикларнинг антимиқроб ва антивирус фаолликларга таъсири қонуниятларини ўрнатиш имконини берувчи систематик изланишлар мавжуд эмас. Шунга кўра, патоген қобиғида жойлашган рецепторлар-гликопротеинларга комплементар, олдиндан белгиланган структурали, модификацияланган полисахаридларнинг мақсадли синтези муҳим масала ҳисобланади.

Ўзбекистонда полисахаридларнинг полианион ҳосилаларини тадқиқ этиш, бўйича тадқиқотлар академик Х.Усмонов, проф. Ш.Наджимутдинов, проф. А.С.Тураев, проф. Г.Раҳманбердиев ва проф. А.А.Саримсоқовлар раҳбарликлари остида амалга оширилган. Карбоксиметилцеллюлоза ва унинг доривор препаратлар билан комплексларини олиш, унинг ҳосилалари асосида самарали, кенг терапевтик таъсирга эга бўлган дори воситалари яратиш бўйича Биоорганик кимё институти, Полимерлар кимёси ва физикаси институти, Тошкент кимё-технология институтида изланишлар олиб борилмоқда. Биоорганик кимё институтида қатор йиллардан бери турли конформация ва молекуляр катталикларга эга полисахарид полианион ҳосилалар мақсадли синтези, шунингдек *in vitro* ва *in vivo* шароитида биологик (антибактериал ва антивирус) фаолликларининг уларнинг структураларига боғлиқликларини систематик аниқлаш амалга ошириб келинади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг илмий-тадқиқот ишлари режасининг ФА-ФЗ-Т054 «Полисахаридларнинг алмашинган сульфат ҳосилалари синтези, молекуляр характеристикаларини аниқлаш, антимиқроб фаолликларини структурага боғлиқлигини аниқлаш» (2007-

2011), ФА-Ф6-Т097 «Нишон-органлар учун янги доривор воситалар олиш мақсадида модификацияланган полисахаридлар синтези ва уларнинг биологик функциялари» (2012-2016) мавзуларидаги фундаментал лойиҳалари доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади патогенлар специфик рецепторлари билан комплементар таъсирлашувчи анион табиатли (сульфат, фосфат ва карбоксил) ўринбосарлар тутган модификацияланган полисахаридларнинг мақсадли синтези, улар асосида йўналтирилган антибактериал ва антивирус таъсирли терапевтик тизимлар яратиш ҳамда уларнинг биологик функцияларини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Ўсимлик хом-ашёларидан белгиланган структурали полисахаридлар (галактоманнан, целлюлоза, пектин, амилоза) ажратиш усулларини ишлаб чиқиш. Кимёвий гидролитик ва ферментатив гидролиз йўли билан чизиқли ва тармоқланган структурали полисахаридлар олиш. Уларнинг физик-кимёвий хоссалари: молекуляр оғирликлари, алмашилиш даражалари, функционал гуруҳларнинг тақсимланиши, структураларини аниқлаш;

полисахаридлар модификацияси, полианион структурали целлюлоза, пектин, галактоманнан, амилозаларнинг функционал (сульфат, фосфат, карбоксил, метил) ҳосилаларини олиш. Модификацияланган полисахаридлар молекуляр катталиклари ва структураларини аниқлаш;

E.coli, *P.aeruginosa*, гепатит С ва лейкомия вируси гликопротеинлари структуралари ва хоссаларини таҳлил қилиш, аниқланган структуралар (патогенлар гликопротеинлари)нинг анион табиатли турлича функционал гуруҳлар тутган модификацияланган полисахаридлар билан таъсирлашувларини компьютер моделлаш;

модификацияланган полисахаридларнинг антимикроб (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli-lactose positive*, *Escherichia coli-lactose negative*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Pseudomonas aureginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Candida albicans* га қарши) ва антивирус (Молони сичқон лейкомия вируси (Mo-MuLV-Moloney murine leukemia virus га қарши), ОИВ-1 ва гепатит С (ГСВ)) фаолликларини *in vitro* шароитида аниқлаш;

модификацияланган полисахаридларнинг молекуляр катталиклари, структуралари ва конформацион ўзига хосликларини мақсадли бошқариш. Олдиндан белгиланган структурали полианион табиатга эга (моноалмашинган (С-2; С-3 ва С-6), иккиалмашинган (С-2,3 ва С-2,6), учалмашинган (С-2,3,6) сульфат ҳосилали) модификацияланган полисахаридларни олиш. Уларнинг молекуляр катталиклари, структуралари, физик-кимёвий хоссаларини ҳамда уларнинг *in vitro* ва *in vivo* шароитида антимикроб ва антивирус фаолликларини аниқлаш;

модификацияланган полисахаридларнинг антимикроб ва антивирус фаолликларининг ўзаро боғлиқликларини белгилаш ва уларнинг *E.coli*, *P.aeruginosa* бактериялари ҳамда ГСВ ва Мо-MuLV вирусларига энг

комплементар бўлган оптимал молекуляр, конформацион структураларини аниқлаш;

E.coli, *P. aeruginosa* бактериялари ҳамда ГСВ ва Мо-MuLV вирусларига энг комплементар бўлган модификацияланган полисахаридларни фармакологик аниқлаш, фармакологик таъсир доираси ва терапевтик самарадорлигини белгилаш;

полианион табиатли модификацияланган полисахаридлар асосида янги оригинал антимикроб ва антивирус препаратлар яратиш ва улар асосида қонни суюлтирувчи (Сульфогель), антивирус ҳамда антимикроб препаратлар (Бактоцел) ларни ишлаб чиқиш учун тавсиялар бериш.

Тадқиқотнинг объекти пахта линтидан ажратилган целлюлоза, цитрус ва олма пектини, *Gleditsia triacanthos* ва *Styphnolóbium jarónicum* уруғларидан ажратилган галактоманнан, целлюлозадан олинган моно-алмашинган (С-2; С-3 ва С-6), икки-алмашинган (С-2,3 ва С-2,6), уч-алмашинган (С-2,3,6) сульфат ҳосилалар, фосфат ҳосилалар, иммун хужайралари, грам-манфий ва грам-мусбат бактериялар, сичқон эмбрионал фибробластлари хужайра линиялари SC-1 ва NIH 3Т3, Huh7.5.1 хужайралари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг предмети патогенлар фаоллигини ингибирланиши натижасида уларнинг организм соғлом хужайраларига юқиши, улар ичида кўпайиш қобилятларини йўқолишига олиб келувчи, патогенлар қобик гликопротеинлари билан полианион табиатли модификацияланган полисахаридларнинг комплементар ўзаро таъсирлашувларини аниқлаш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот ишида биоорганик кимё усуллари (ўсимлик хом-ашёсидан биологик фаол полисахаридларни ажратиш, гидролиз ва кимёвий модификациялаш), бирикмаларнинг кимёвий структураларини аниқлаш (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия, рентгеноструктур таҳлил, реология, гел ўтказувчи хроматография, газ хроматография, термик таҳлил усуллари - ТГ/ДСК, вискозиметрия, элемент таҳлил, кондуктометрик титрлаш, спектрофотометрия) ва антивирус активликни – потенциал ингибиторлар скрининг системаси мавжуд флюорометр, антибактериал фаолликни – диско-диффузион усуллар ёрдамида аниқлаш усуллари қўлланилган.

Диссертация тадқиқотининг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

алмашинган гуруҳлари макромолекула бўйлаб бир текис тақсимланган, молекуляр массаси (ММ) 10,5- 120,4 кДа ва алмашиниш даражаси (АД) 0,30-2,92 оралиғида сульфат ва ММ 6,2-72 кДа ва АД 0,15-2,45 бўлган фосфат ҳосилалар олиш имконини берувчи усуллар ишлаб чиқилган ҳамда улар асосида анион антибактериал ва антивирус дори препаратлар яратиш потенциал имкониятлари асосланган;

анион ҳосилали полисахаридлар молекуляр оғирликлари, макромолекула бўйлаб сульфат, фосфат, карбоксил алмашинган

гурухларининг ангидрогексоза звеносида жойлашувини бактерицид ва вирулицид фаолликларга таъсири исботланган;

патоген бактерияларнинг сезгирлиги модификацияланган полисахаридлар табиати ва молекуляр катталикларга боғлиқлиги, хусусан, намуналарда АДнинг ошиб бориши антибактериал фаолликнинг ошишига, фаолликнинг кескин ортиши эса АД си 1,9 дан 2,1 гача кузатилган ва бунда нисбатан ёрқин антимикроб фаоллик сульфатланган α -гексозанлар (амилоза, полигалактурон кислота, декстран)га нисбатан β -гексозанлар (целлюлоза, галактоманнан)да аниқланган;

анион ҳосилали полисахаридлар лейкомия, гепатит С ва ОИВ вирусларига қарши препаратлар яратиш учун потенциал объектлар эканлиги аниқланиб, ярим максимал ингибирлаш концентрацияси (IC_{50}) бўйича лейкомия вирусига қарши фаоллик 0,02-0,45 мкг/мл оралиғида ва АД си ортиши билан антивирус фаоллик ошиб бориши, β -структурали бириклар α -структуралиларига қараганда ёрқин антивирус фаолликка эгаллиги исботланган;

энг кичик антикоагуляцион фаолликка эга анион ҳосилали полисахаридлар синтез қилинган. Бунга ангидрогексоза звеносидаги С-2 ва С-6 углерод атомларида сульфат гуруҳи тутган сульфат полисахаридлар синтези орқали эришилган;

илк бор компьютер моделлаши орқали анион ҳосилали полисахаридларнинг организм соғлом хужайраларига патогенлар таъсирини ингибирловчи, уларнинг рецептор участкаларига блокловчи таъсирлари исботланиб, мультирезистент бактериялар (*P. Aeruginosa*, *E.coli*), вируслар (гепатит С, лейкомия, ОИВ-1) гликопротеинлари модель структуралари ва сульфатланган моносахарид (гексозалар) ҳамда модификацияланган полисахаридлар орасида интерполимер комплекслар ҳосил бўлиши имкониятлари аниқланган ва амалда бу натижалар *in vitro* ва *in vivo* шаротидаги тажрибаларда исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

анион ҳосилали полисахаридлар асосида илк бора янги самарадор ва кам захарли антивирус (герпес, гепатит С, ОИВ га қарши) ва антибактериал (уропатоген ва жарроҳлик амалиётидан кейинги жароҳатлар инфекцион бактерияларига қарши) ва антитромботик ҳамда шамоллашга қарши таъсирга эга гепаринсимон препаратлар олиш имкониятлари аниқланган. Сульфат ҳосилали полисахаридлар асосида юзага қўлланиладиган антибактериал ва антивирус препаратлар ишлаб чиқиш учун тавсиялар берилган;

таркибида сульфатланган полисахарид тутган «Бактоцел» гели олинган ва унинг антибактериал ва яра битказувчи таъсири аниқланган. «Бактоцел» гели яра битказувчи таъсирга эгаллиги ва инфекцияланган жароҳатларни тозаланиш ва битиш муддатларини 6-12 кунга қисқартириши кўрсатилган. «Левомеколь» мази билан солиштирма таҳлилда «Бактоцел» гели стафилококка (*S. aureus*) га нисбатан юқори антибактериал ва жароҳат битказувчи таъсирга эгаллиги аниқланган;

«Сульфогель» гели асосида антикоагулянт таъсирга эга юмшоқ дори шакли ишлаб чиқилган. Трисульфата целлюлоза субстанцияси ва «Сульфогель» дори шаклининг клиник олган синовлари ўтказилган. Сульфат целлюлозалар физик-кимёвий ва биологик хоссалари (антимикроб, антивирус, захарлилик, *in vitro* ва *in vivo* шароитда антикоагулянт фаоллик) аниқланиб, субстанция ва тайёр дори шаклларининг стандартизация усуллари ишлаб чиқилган. Трисульфат целлюлоза қон ивиш вақтини 3-15 марта узайтириши аниқланган. «Сульфогель»нинг антикоагулянт фаоллиги гепаринли маз билан солиштирилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги уларнинг замонавий физик-кимёвий тадқиқот усуллари қўллаш орқали олинганлиги билан тасдиқланади. Олинган маълумотларни статистик қайта ишлаш Студент критерияси ёрдамида ўртача қийматнинг ишончлилиги интервали оралиқ қийматларини ҳисоблаган ҳолда олиб борилди. Олинган натижаларнинг исботи мутахассисларнинг эксперт баҳолари, тадқиқот натижаларининг амалга оширилиши, уларнинг республика ва халқаро конференциялардаги муҳокамаси бўлиб, натижаларнинг юқори импакт факторли рецензияланган илмий нашрларда чоп этилиши ва патент олинishi билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти белгиланган структурали анион ҳосилали полисахаридлар (сульфат, фосфат, карбоксил ва бошқа) мақсадли синтези ва уларнинг кенг кимёвий ва медико-биологик тадқиқ қилинганлиги, шунингдек, улар асосида патогенларнинг рецептор участкаларига бевосита таъсир этувчи ва шу орқали уларнинг соғлом хужайраларга давомли таъсирини ингибирловчи антибактериал ва антивирус препаратлар яратиш имкониятларини кўрсатилганлиги ҳисобланади. Сувда ва ишқорда эрувчан полисахаридларни ажратиш усуллари, уларни модификациялаш, физик-кимёвий усуллар орқали структураларини белгилаш биоорганик кимёнинг мазкур йўналишини ривожлантириш ва полисахаридлар асосида антибактериал ва антивирус фаолликлар намоён этувчи макромолекуляр системалар яратиш бўйича аниқ муаммоларни ечиш имконини берди. Диссертация иши натижалари Ўзбекистон Республикаси олий таълим муассасаларида полисахаридлар кимёси соҳасида янги изланишлар олиб боришда илмий аҳамиятга эга.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти сиртга қўлланилувчи оригинал антибактериал ва антивирус препаратлар «Бактоцел» (яра битказувчи ва антибактериал восита), «Сульфогель» (веналар варикоз кенгайиши ва шишларни даволаш учун), шунингдек келажакда системали антибактериал ва антивирус препаратлар яратиш имконияти ҳисобланади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Сульфатланган полисахаридлар асосида антибактериал ва антивирус фаолликка эга биоселектив макромолекуляр тизимлар бўйича олинган илмий натижалар асосида:

ўсимлик баргларидаги тамаки мозаикаси вируси ингибиторига Ўзбекистон Республикаси интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патенти

олинган (12.10.2010, № IAP 04603). Илмий тадқиқот натижасида қишлоқ хўжалиги ва медицинада патогенларга қарши препаратлар ишлаб чиқиш имконини берган;

полисахаридларнинг систематик модификациясини Тулейн университетининг «Полимерланиш реакцияларини автоматик узлуксиз назорати» (АСОМР- Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization reactions) тизимида олиб бориш давомида ишлаб чиқилган шароитлар илк бор АСОМР тизимининг табиий бирикмалар модификацияси реакцияларини узлуксиз мониторинг қилиш жараёни учун муваффақиятли қўллаш имконини берган, шунингдек рециркуляцион АСОМР конфигурациясида ҳажмий қовушқоқлик, молекуляр оғирлик ва ион-концентрацион катталиклар (электр ўтказувчанлик ва рН қиймат)ни бир вақтнинг ўзида назорат қилиш имконини берувчи янги тизим амалиётга жорий этилган (Америка Қўшма Штатлари Тулейн университетининг 2016 йил 3 ноябрдаги маълумотномаси). Бу дунё миқёсида салмоқли ютуқ бўлиб, полисахаридларни модификациялаш реакцияларининг мониторинги, бу табиий маҳсулотлар - биополимерларнинг модификацияси жараёнини назорат қилиш имконини беради;

ишлаб чиқилган модификациялаш усулларида селектив алмашинган сульфат полисахарид ҳосилалар олишда фойдаланилган (Кумамото университетининг (Япония) 2016 йил 15 ноябрдаги маълумотномаси). Антибиотикларга нисбатан мультирезистент бактериялар *St. aureus*, *St. epidermides*, *E. coli* (LN) ва *Klebsiella* га қарши полимер антибактериал композициялар яратиш имконини берган;

полисахарид ҳосилаларнинг надмолекуляр тузилишлари ва антикоагуляцион фаолликлари маълумотларидан 80 дан ортиқ хориждаги импакт-фактори (JIF) юқори илмий журналларда намуналарнинг физик-кимёвий ва фармакологик таҳлили учун фойдаланилган (*Acta biomaterialia*, 2010, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 6,32; *Bioresource Technology*, 2009, V.4, №2, Journal Impact Factor, IF 5,65; *Biomacromolecules*, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 5,25; *Carbohydrate polymers*, 2012, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 4,81; *Food Hydrocolloids*, 2014, V.35, №2, Journal Impact Factor, IF 4,75; *Langmuir*, 2013, V.12, №2, Journal Impact Factor, IF 3,83; *Polymer*, 2011, V.1, №2, Journal Impact Factor, IF 3,68; *Phytomedicine*, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 3,53; *Cellulose*, 2010, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 3,42). Илмий натижаларнинг қўлланилиши полисахарид эфирларининг молекуляр ва фармакологик тавсифлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Диссертация иши тадқиқот натижалари 12 та халқаро ва 16 та республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Диссертация мавзуси бўйича жами 76 та илмий иш чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 14 та мақола, жумладан, 10 таси республика ва 4 таси хорижий журналларда нашр этилган, шунингдек, 1 патент олинган ва 1 та патент учун ариза берилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 191 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурияти асослаб берилган, мақсад ва вазифалар, шунингдек тадқиқотнинг объект ва предмети ифодаланган, тадқиқотнинг Ўзбекистон Республикаси фан ва технологияларни ривожлантириш йўналишига мувофиқлиги келтирилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг ишончлилиги асосланган, натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларининг амалиётга жорий этиш рўйхати келтирилган, чоп этилган ишлар ва диссертациянинг тузилиши бўйича маълумотлар берилган.

Диссертациянинг **«Протеогликансимон структурали биологик актив полисахаридларнинг антимикроб ва антивирус фаолликлари»** деб номланган биринчи бобида полианион структураларга эга полисахаридлар, уларнинг патогенлар билан ўзаро таъсирлашувларини аниқлаш бўйича дунёнинг кўплаб етакчи илмий марказлари томонидан олиб борилаётган изланишлар ҳақида адабиёт маълумотлари таҳлили келтирилган. Бу натижалар асосида, полисахарид сульфат ҳосилалар антибактериал ва антивирус, жумладан ОИВ га қарши фаолликларга эгалиги аниқланган. Протеогликансимон моддалар ёрдамида вирус ва микробларнинг ингибирланишини аниқлашга доир адабиёт манбалари (асосан фирма ва компания патентлари) мультирезистент патогенларга қарши юқори самарадорликка эга антивирус ва антибактериал препаратлар яратилишида мазкур соҳада потенциал истиқболга эгалиги кўрилди.

Жаҳон адабиётида макромолекуляр асос кимёвий табиатининг, макромолекула узунлиги (молекуляр масса), анион гуруҳ таркиби, хусусан сульфат группа, уларнинг ангидрогексоза звеносида жойлашган ўрни (иккинчи, учинчи ва олтинчи углерод атомларидаги) ва бошқа катталикларнинг антимикроб ва антивирус фаолликларга таъсири қонуниятларини ўрнатиш бўйича систематик изланишлар мавжуд эмас.

Шуларни ҳисобга олган ҳолда патогенлар қобиғидаги специфик гликопротеинларга комплементар, олдиндан белгиланган структурали, анион ҳосилали модификацияланган полисахаридларнинг мақсадли синтези ва уларнинг специфик фаолликларини аниқлаш муҳим масала ҳисобланади. Шарҳ асосида ушбу иш учун объект танлаш тўғрисида хулоса қилинган.

Диссертациянинг **«Полианион структуралар олиш мақадида полисахаридларни ажратиш ва модификациялаш»** деб номланган иккинчи бобида полианион табиатли модификацияланган полисахаридларнинг йўналтирилган синтези, сульфатлаш ва фосфатлашнинг тўғридан-тўғри ва танлаб модификациялаш усуллари, олинган намуналарнинг физик-кимёвий хоссалари ва молекуляр катталикларини

аниқлаш, макромолекула барқарорлигига алмашинган гуруҳларнинг АГБда жойлашган ўринлари таъсирини аниқлаш натижалари муҳокама қилинган.

Тадқиқот объекти сифатида целлюлоза, амилоза, полигалактурон кислотаси, галактоманнанлар танлаб олинган. Мазкур полисахаридларнинг танланиши бевосита уларнинг тузилишларига боғлиқ. Бу полисахаридлар ўсимликлардан олинадиган чизиксимон полимерларга мансуб бўлиб, бу ўз навбатида тармоқланган полисахаридларга солиштирганда уларнинг таҳлил қилишни енгиллаштиради, шунингдек, сульфат ҳосилалар синтези учун хом-ашёнинг мухайёлигини таъминлайди. Шунингдек, намоён этадиган хоссаларига уларнинг молекуляр структуралари ва гликозид боғ конфигурацияларининг таъсирини кўриш ҳам қизиқарли объект саналади.

Япон софоаси (лат. *Styphnolobium japonicum*) ва *Оддий гледичия* (лат. *Gleditsia triacanthos*) уруғларидан совуқ ва иссиқ экстракция усуллари орқали галактоманнанлар ажратилди (тегишлича SJ ва GT), уларнинг физик-кимёвий хоссалари аниқланди (1-жадвал). Олинган намуналарнинг нисбий қовушқоқликлари ва молекуляр оғирликлари аниқланди.

Галактоманнанлар ферментатив гидролизга учратилди. Ферментатив гидролиз рН 7.5 ва 40°C ҳароратда β-галактозидаза ферменти иштирокида олиб борилди. Дастлабки ва гидролизланган полигалактоманнанлар характеристик қовушқоқликлари мос равишда 4,85 дл/г ва 3,80 дл/г ни ташкил этди. Полигалактоманнанларнинг фермент билан ишловидан сўнг молекуляр оғирликлари 95600-26200 оралиғида.

1-жадвал

Галактоманнан намуналарнинг физик-кимёвий хоссалари

Галактоманнан	Унум, %	Ман:Гал нисбати	[η], дл/г	Молекуляр оғирлик, Да
SJ-1	9,8	1,82:1	9,46	840786
SJ-2	35,2	2,3:1	11,09	1048516
GT-1	7,5	2,1:1	8,78	758037
GT-2	43,6	2,5:1	9,23	812529

Галактоманнанлар ММ қийматлари Марк-Хаувинк тенгламаси бўйича аниқланди, $K = 5.13 \times 10^{-4}$; $\alpha = 0.72$

Бошланғич ва гидролизланган полигалактоманнанлар ¹³C-ЯМР спектроскопия таҳлили галактоза:манноза нисбатларининг жиддий ўзгарганлиги, мос равишда 1:2,82 ва 1:5 ни ташкил этганлигини кўрсатди. d 5.01 ва 4.73 областдаги аномер протон сигналлари тегишлича H-1 α-D-галактоза (G) ва β-D-манноза (M) ларга хос деб олинди. M:G нисбатлари бевосита аномер сигналлари нисбий областларидан олиниши мумкин ва M:G қиймати 1,82 га тенглиги ҳисобланди. Бу қиймат эса SJ-1 намунаси учун ГХ усулида олинган қиймат (1,84) билан анча мос келади. ¹³C-ЯМР-таҳлили белгилашни осонликча идентификациялаш учун яхши сифатдаги спектр беради. ¹³C-ЯМР (d 90-110) аномер областда d 99,59 соҳасида C-1 α-D - галактоза ва d 100,7 соҳасида C-1 β-D –манноза иккита сигнални кўрсатади.

Шунингдек гуар ширасидан кислотали гидролиз орқали сувда эрувчан галактоманнан олинди. 2-жадвалда гуар ширасини кислотали гидролизи шароитлари келтирилган. Жадвалдан кўриш мумкинки, кислота

концентрациясини ошириш ва гидролиз вақтини ошириш билан ГМ ларнинг молекуляр оғирликлари кичрайиб боради. Дастлабки босқичларда гидролиз вақти юқори бўлиб, кейин пасайиб боради. Буни шу билан тушинтириш мумкинки, дастлабки босқичларда ГМ макромолекуласининг нисбатан мақбул бўлган участкалари реакцияга киришади. Шунингдек, аниқландики, олинган ГМ катталиклариға реакция муҳити таъсир қилади, хусусан гидролизни этанолли муҳитда олиб боришда, олинган ГМ ММ си нисбатан бир хиллашиб боради, яъни қисқа молекуляр массавий тақсимланиш (ММТ) га эгаллиги кўринди, бу эса макромолекуляр дори воситалари учун муҳим кўрсаткич ҳисобланади.

Полисахаридлар (целлюлоза, галактоманнан) макромолекуллари модификацияси этерификация жараёнида β -D –гексоза звеноларида сульфогруппаларнинг жойлашувини бошқариш имкони бўлган турлича сульфатлаш усуллари орқали олиб борилди, бу эса оқибатда белгиланган комплекс хоссали моддалар олиш имконини берди.

2-жадвал

ГМ нинг ММ сини реагентлар нисбати ва гидролиз давомийлигига боғлиқлиги
($t=82^{\circ}\text{C}$, система модули 1:11, $[\eta]$ -қиймати $20\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ да ўлчанган)

Гидролиз вақти, мин.	Моль нисбат ГМ:НСІ	$[\eta]$ (дл/г)	ММ*	ММТ, Mw/Mn	Унум, %
Сувли муҳитдаги гидролиз					
ГВС-15	1:1,5	3,427	253031	1,491	83
ГВС-30	1:1,5	1,431	76766	1,502	64,4
ГВС-60	1:1,5	1,170	58256	1,816	48,86
ГВС-90	1:1,5	0,886	39877	1,664	33,36
ГВС-120	1:1,5	0,545	20534	2,035	17,18
Этанол муҳитдаги гидролиз					
ГОС-15	1:1,5	2,125	131744	1,54	88
ГОС-30	1:1,5	1,909	113789	1,589	76,3
ГОС-60	1:1,5	1,717	98441	1,517	62
ГОС-90	1:1,5	1,506	82273	1,379	46,5
ГОС-120	1:1,5	1,213	61217	1,380	34,8

* Галактоманнанлар ММ қийматлари Марк-Хаувинк тенгламаси бўйича аниқланди: $K = 3.8 \times 10^{-4}$; $\alpha = 0.732$.

Целлюлозанинг сульфатлаш реакциялари сульфат кислотанинг этил спирти билан аралашмаси 2:1-3:1 нисбатларда (бинар система)да ва тўйинган углеводородлар муҳитида (суспензион усул, реакция модули 4-5 мл/гр), тўғридан тўғри ва олдиндан 2 босқичли активлаш – дастлаб, сувда, кейин эса этил спиртида аниқланди.

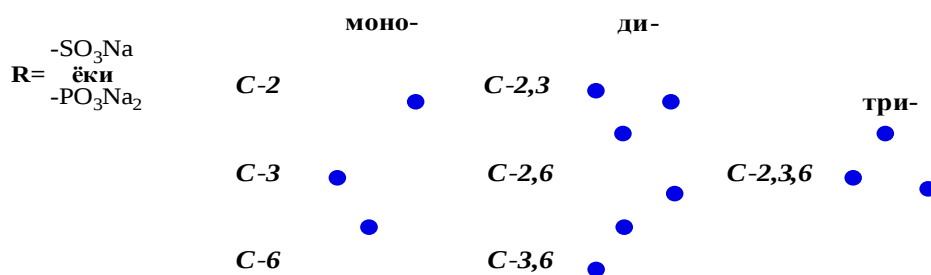
Сульфат кислота:этил спирти аралашмасида олдиндан активлаш орқали реакция ўтказилганда намуналарнинг полимерланиш даража (ПД) си (АД си 0,23) 1400 дан (дастлабки пахта целлюлозаси) 110 гача тушиш кузатилди. Реакцияни тўйинган углеводородлар муҳитида олиб бориш СЦ ПД сини (АД=0,24) 440 гача тушишига олиб келган. Буни шу билан изохлаш мумкинки, тўйинган углеводородлар – инерт суюқлик сульфатловчи

агентнинг полисахарид материали ички қисмларга чуқур кириб бориши (структур изланишлар кўрсатишича) имконини беради ва сульфатловчи агент тўғри реакция учун сарфланади.

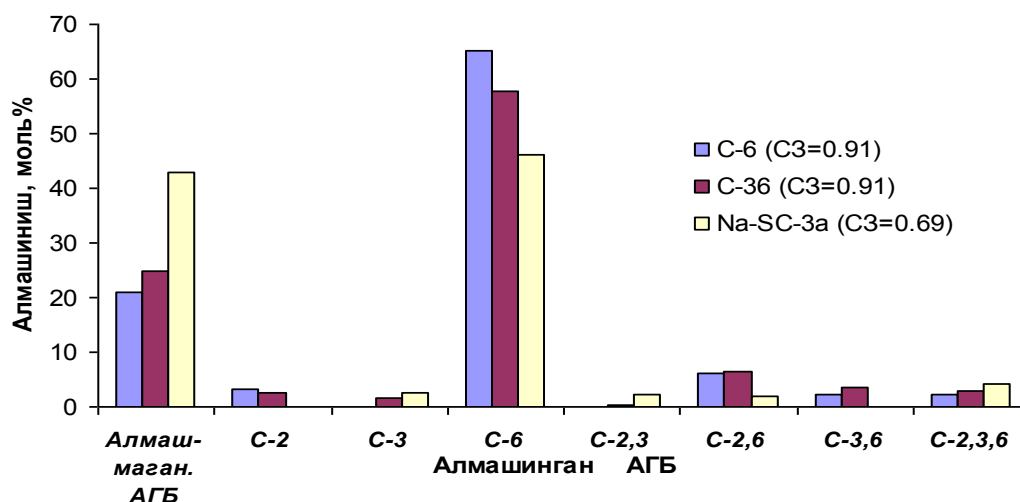
Инерт суюлтирувчи муҳитида 2 босқичли активлаш йўли билан сульфатлашда целлюлоза сульфат эфирлари ПД сини АД си ўзгаришига боғлиқлиги аниқланди. Бунда юқори ПД си пахта линтини сульфатлашда кузатилди. Кутилганидек, энг кичик ПД си МКЦ ни сульфатлашда кузатилди. Пахта линти мисолида ПДсини АД сига мувофиқ ўзгариши ундаги катта миқдорда аморф қисмлар мавжудлиги билан тушунтирилади. Турлича асосдаги целлюлозаларни сульфатлаш реакциясидаги бундай фарқ уларнинг структуравий ўзига хосликларидан келиб чиқади. Маълум бўлдики, целлюлозаларни сульфат кислота иштирокида сульфатлашда хатто целлюлозани дастлабки активлашда ҳам ПД 25-600 ва АД си 0,10-1,10 СЦ олиш мумкин холос.

Юқори АД ва ПД ли намуналар синтез қилиш мақсадида пахта целлюлозасини сульфатлаш хлорсульфон кислота (ХСК): пиридин комплекси билан олиб борилди. Бунда пиридин обеспечивает целлюлозани активлайди, пиридин-ХСК комплекси синтез давомида сульфатлавчи агентни ажратган ҳолда СЦнинг кислотали формасини нейтраллайди, ажралаётган водород хлоридни боғлаб, нейтралайди. Сульфатлашни ХСК пиридин комплекси билан олиб бориш ПД 150-800 ва АД 1,0-2,8 оралиғида намуналар олиш имконини беради. Бундай самарага эришилиши сульфатлавчи агент табиати билан тушунтирилади. ХСК пиридин комплекси билан сульфатлашда пиридин HSO_3Cl ни алмаштиради ва ажралган водород хлорид бир зумда пиридин билан боғланади ва қўшимча деструкция реакцияси деярли тормозланади.

Сульфатлашнинг қўлланилган усулларида тартибсиз тарқалган сульфат группали, таркибида сульфатланган ва сульфатланмаган ангидрогексозали бирликлар (АГБ) тутган композицион – бир хил булмаган макромолекулалар ҳосил бўлади. Полисахарид эфирлари, алмашинган АГБ лар ичида турлича алмашинган (моно-, ди-, три-) бирликлар бўлиши мумкин:



Газ хроматография усули билан Na-СЦ макромолекуляр матрицаси АГБ ларида сульфат гуруҳларнинг тарқалиши аниқланди. Бинар системасида олдиндан активлаб сульфатлашда афзал алмашиниш 6- углерод атомида кетиши кўрсатилди (Расм 1), алмашинишнинг тарқалиши қўйидаги схема асосида кетади $\text{C-6} \gg \text{C-2,6} \gg \text{C-3,6} = \text{C-2,3,6} = \text{C-2,3}$ (тегишлича 65%, 10%, 4%).



1 –расм. Бинар системали синтез орқали активланмаган целлюлозадан олинган СЦ нинг газ-хроматография таҳлили

Бинар системасида олдиндан активламасдан сульфатлашда алмашинишнинг тарқалиши қўйидаги схема асосида кетади $C-6 > C-2,6 > C-3,6 > C-2,3,6$ (тегишлича 62%, 15%, 5%, 6%). Сульфат ҳосилали намуналар олишнинг суспензион усули қўйидагича алмашиниш тақсимланишига олиб келади: $C-6 > C-2,6 = C-2,3,6 = C-3,6$, а при целлюлозани ХСК-пиридин комплекси билан сульфатлашда АДси 1.5 бўлган уч-алмашинган намуналар ҳосил бўлади. Олдиндан активлаганда АД си ортади. Алмашинишнинг тарқалиши қўйидаги схема асосида кетади: $C-2,3,6 > C-2 > C-6 = C-2,6 = C-3,6$.

3-жадвал

Турли эфирлаш усуллари ёрдамида олинган бир қатор целлюлоза сульфат ҳосилаларнинг молекуляр катталиклари

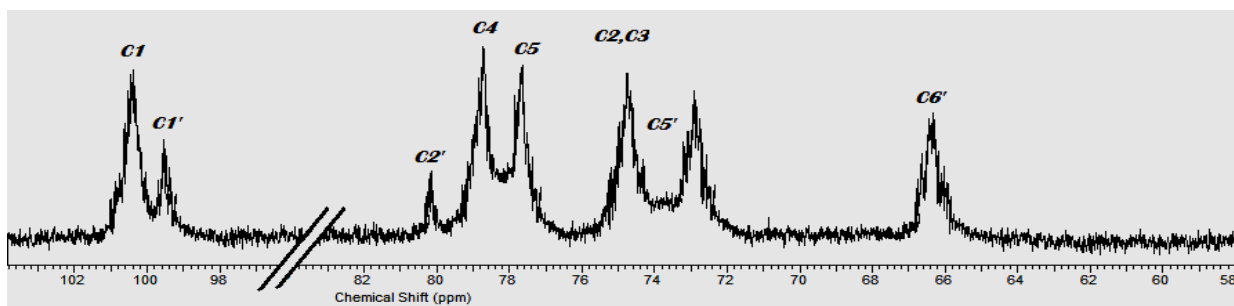
Ҳосилалар	Модификациялаш	АД	ПД	ММ	Шифр
Моносουλфатлар	тўғридан тўғри	0,58	230	50830	МСЦ-1
	тўғридан тўғри	0,90	197	50176	МСЦ-2
	селектив	0,78	65	15700	СЦ-О(3)
	селектив	0,86	86	21476	СЦ-О(2)
	селектив	0,98	128	33550	СЦ-О(6)
Дисульфатлар	тўғридан тўғри	1,50	216	68364	ДСЦ-1
	тўғридан тўғри	1,80	225	78165	ДСЦ-2
	тўғридан тўғри	2,00	75	25760	ДСЦ-3
	селектив	1,33	147	43756	СЦ-О(2,3)
Трисулфатлар	тўғридан тўғри	2,10	228	86184	ТСЦ-1
	тўғридан тўғри	2,12	400	152000	ТСЦ-2
	тўғридан тўғри	2,15	571	216000	ТСЦ-3
	тўғридан тўғри	2,23	40	16000	ТСЦ-4
	тўғридан тўғри	2,24	340	133280	ТСЦ-5
	тўғридан тўғри	2,25	124	48732	ТСЦ-6
	тўғридан тўғри	2,27	220	87120	ТСЦ-7
	тўғридан тўғри	2,37	496	201376	ТСЦ-8
	тўғридан тўғри	2,98	211	98895	ТСЦ-9
	тўғридан тўғри	2,90	230	105300	ТСЦ-10
	тўғридан тўғри	2,98	360	167750	ТСЦ-11

Селектив сульфатлашда АГБ лар ОН-гурухлари трифторацетат гурухлар билан химояланди. Бунда афзал алмашилиш 3- углерод атомида (87,2%) кетиши кўрилди. Гидроксил гурухларнинг алмашилиши кўйидаги схема асосида кетади: $C-3 \gg C-6 > C-2 > C-3,6 > C-2,3 = C-2,6 > C-2,3,6$.

Селектив C-6 алмашилишли сульфатлаш учун сульфоацетат целлюлозанинг аралаш мураккаб эфиридан фойдаланилди, бунда АД си 0,91 га эришиш учун эфирланиш давомийлиги 8 соатдан ошиқ муддатни ташкил этди ва бунда асосан АГБнинг 6-углерод атомида алмашилиш кетди (89,2%).

Полисахаридларни фосфатлаш жараёни анион табиатли янги биологик фаол бирикмалар олинишига олиб келади. Пахта ва микрокристаллик целлюлоза (кристаллик даражаси тегишлича 0,62 ва 0,75) ни фосфатлаш 35%-ли H_3PO_4 эритмаси билан 24 соат давомида амалга оширилди. Шунингдек, фосфатлаш H_3PO_4 нинг (20,5%) эритмасини мочевиная билан (1:6,5 моль нисбатларда) ва охирида 120 минутли термоишлов ҳамда ювиш ва куритиш орқали олинади. АД лари махсулотнинг элемент таркиби С,Н,Р,О ва N бўйича аниқланди. Полисахаридларни фосфатлашда фосфор (V) ҳосилалари гетероген шароитда олиб борилганда қисман АД ли намуналар ҳосил бўлади ($AD_p = 0,25-0,75$); фосфор (III) ҳосилаларнинг фосфора (V) ҳосилаларига нисбатан реакция фаолликлари юқорилиги сабаб фосфит кислота (H_3PO_3) иштирокида дастлабки полисахарид (целлюлоза)ни олдиндан изопропил спирт ва сув иштирокида фаоллаш билан нисбатан юқори АД ($AD_p = 1,1$ ва $2,42$)ли намуналар олинди. Муқобил сифатида, МКЦни фосфатлаш Anton Parr monowave 300 микротўлқинли реактори (автосамплерли, 30 бар босимни ушлаб турувчи, 20 мл герметик миниреактор)да олиб борилди. МКЦ (0,583 г, 3,6 ммоль) мочевиная (3,48 г, 58,0 ммоль)/фосфит кислота (2,88 г, 35,2 ммоль) аралашмасида магнит аралаштиргич билан аралаштирилди. Микротўлқинли режим автоматик циклга ўрнатилди, а) керакли ҳарорат ва босимгача (одатда 1 мин) 450 айл / мин. тезликда , б) реакцияни (0,5 - 120 мин, 450 айл / мин тезликда) в) тугаллашда сиқилган азот билан тез совутиш (< 2 мин.). Олинган махсулот NaOH нинг этанолдаги тўйинган эритмасида нейтраллаб, 96 % ли этанол билан 3 карра ювилди. Ананавий усулда фосфат целлюлоза олишда, этерификацияни 3 марта қайтаришда ҳам, фосфор микдори 4,0 оғир. % бўлиб, целлюлозанинг эримаслигига ва фосфат кислотада чегарали бўкишига олиб келади.

Синтез қилинган полисахарид намуналар D_2O муҳитида ^{13}C -ЯМР-спектроскопия усули билан аниқланди. Спектрограммада C1-C6 га тегишли кимёвий силжишлар 102, 73,2, 74,6, 79,2, 77,3, ва 61,0 м.д., кузатилади. Na-СЦ нинг C6 ютилиши 61,0 дан 67,0 га силжиши юзага келади, ва бу олтинчи углерод атоми (C6 ') даги ОН-группанинг алмашилишини кўрсатади. Кўриниб турибдики, юқори алмашинган Na-СЦ намуналардаги деярли барча C6 да жойлашган ОН-гурухлари этерификацияга учраган (C6'). 81,5 ва 77,1 м.д. даги кимёвий силжишлар C2' ва C3' позицияларда алмашилиш кетганлигини кўрсатади. (2-расм).



2-расм. АДСи 2.6 бўлган СЦ нинг ЯМР-спектрскопияси

АГБ ларида сульфат гуруҳлари жойлашувининг макромолекула барқарорлигига таъсири бўйича изланишлар кўрсатадики, нисбатан юқори барқарорлик моноалмашинган намуналар ичида таркибида асосан С-2 алмашинган гуруҳлари мавжуд, икки-алмашинган намуналар ичида эса С-2,6 алмашинган ҳосилали эфирларга тўғри келади. Энг беқарор намуналар эса асосан сульфат гуруҳлари С-3 позицияда турган моноалмашинган намуналарга тўғри келади. Натижалар кўрсатишича, интер ва интрамолекуляр водород боғлар ҳосил бўлишида иштирок этадиган эркин гидроксил гуруҳлари алмашилиши намуналарнинг барқарорлигини оширади. Масалан, С-3 ва С-6 ОН-гуруҳлари водород боғлар ҳосил бўлишида иштирок этади, уларнинг сульфат гуруҳларига тўла алмашилиши эса (С-2,3,6) макромолекулани нисбатан стабиллайди. Аксинча гидроксил гуруҳларининг қисман алмашилиши кўшни эркин (алмашинмаган) транс гидроксил гуруҳлари (С-3 ва С-6: С-3, С-6 ва С-2,3) иштирокида эфир гуруҳларининг бузилиб кетишига олиб келади. Бунинг исботи сифатида, 3 та ОН гидроксил гуруҳидан фақат биттасининг эфирланишида алмашинган гуруҳларнинг АГБ даги жойлашган ўрнига қарамай беқарор бўлиши ғояси қанчалик ҳақиқатга мос келишини текшириш учун синтез қилинган Na-СЦ лар стабиллиги синтезланган дисульфат полигалактуронат (С-2,3-СПГК) барқарорлиги билан солиштирилди (С-6 табиатан –COOH гуруҳи билан банд). Натижалар кўрсатадики, сульфатланган полигалактуронат барқарорлиги С-2,3 сульфатланган целлюлозаларники билан бир хил бўлиб, улар бир алмашинган сульфат ҳосилаларга нисбатан барқарор экан.

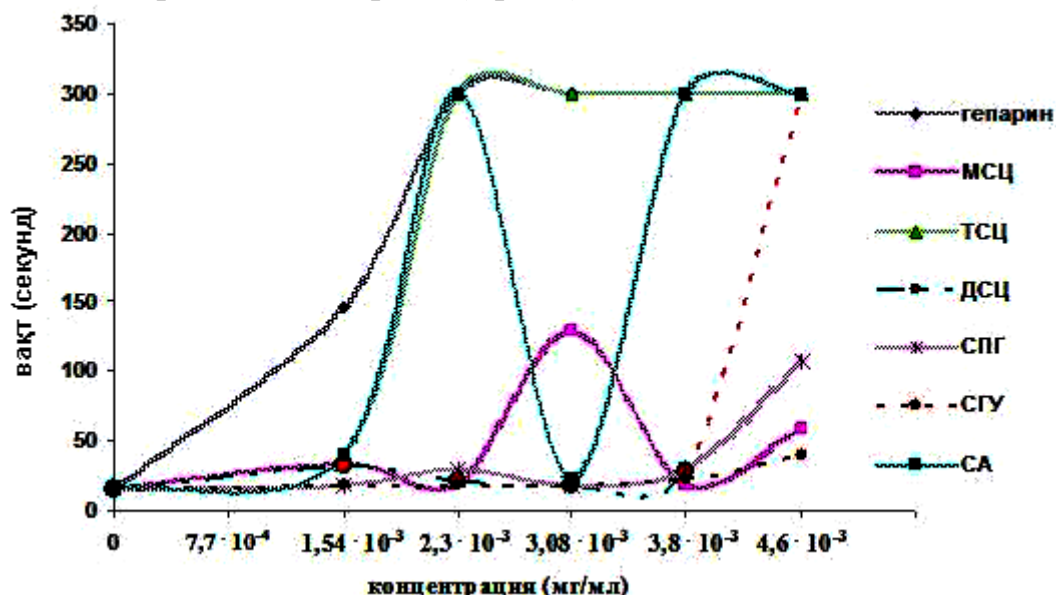
Диссертациянинг «**Полианион табиатли модификацияланган полисахаридларнинг медико-биологик хоссалари**» деб номланган учинчи бобида синтезланган полисахарид мураккаб эфирларининг специфик фаолликларини аниқлаш бўйича натижалар муҳокама қилинган.

Анион ҳосилали полисахаридларнинг токсикологик синовлари ЎЗР ФА биоорганик кимё институти фармакология лабораториясида олиб борилди. Тажрибалар оқ сичқонлар ва каламушларда олиб борилди; ўткир захарлилик, маҳаллий ва тери- таъсирлантириш, аллергия ва кумулятив хоссалари аниқланди. Намуналарнинг ЛД₅₀ қийматлари сичқонларда >2000 мг/кг, каламушларда >4000 мг/кг, бўлиб, кам захарли моддалар синфига кириши аниқланди (ГОСТ 12.1007-76). СЦ намуналарининг ПД си ва АД лари ошиб бориши билан захарлиликлари ошиши кўрсатилди. СЦнинг аллергия таъсирларини аниқлаш аллергия характердаги тошма ва яллиғланиш

белгиларини чақирмайди. Демак, СЦ алергик таъсирга эмас. Тажрибалар СЦ ларнинг кумулятив таъсирга эга эмаслиги ҳақида хулосалаш имконини беради.

Сульфатланган полисахаридларнинг антикоагулянт фаолликлари ва уларнинг макромолекулалари табиати ҳамда молекуляр катталикларини намоён этаётган фаолликларига таъсири аниқланди. Сульфатланган полисахаридларнинг антикоагулянт фаолликлари *in vitro* шароитда аниқланди. Синов антикоагулянтнинг паст $1,54 \cdot 10^{-4}$ - $7,7 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (0,02-0,10 ЕД) ва юқори $7,7 \cdot 10^{-4}$ - $4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (0,1-0,6 ЕД) даражаси бўйича калибровкали эгри чизикқа нисбатан аниқланди. Мазкур концентрацияда нисбатан юқори самара гепарин ва ТСЦ намунасида кўринди, қайсики, қоннинг қуйилиши назорат (0,9% физ. эритма) га нисбатан 4 ва ундан кўп маротаба ортгани кўрилди.

Тромбин вақти тести натижаларидан кўринадикки, гепарин, намуналар ТСЦ, ДСЦ ва СА максимал самарага эришиши концентрация $4,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (более 300 сек)да, қолган намуналар ҳам тромбин вақтини (ТВ) назоратга нисбатан 2-4 маротабага оширади (3 расм).



3- расм. Сульфатланган полисахарид намуналарининг турли концентрацияларда *in vitro* шароитда қуён қони ТВ га таъсири

Чизиксимон тузилишли полимерларнинг активланган қисман тромбопластин вақти (АЧТВ) тести чизикли полисахарид сульфат ҳосилалар тармоқланганларига қараганда икки ва ундан ортиқ марта юқори фаоллик кўрсатиши аниқланди. Сульфат целлюлоза намуналари ичида алмашинган гуруҳлари 2- ва 3- углерод атомларида жойлашган АД си 2,0 дисульфат ва АД=2,84 бўлган трисульфат намуналар эканлиги аниқланди. Шу билан бирга, (1→4) гликозид боғли полисахарид ҳосилаларида С-6 алмашиниш бор ёки йўқлиги намоён этилаётган фаолликка деярли таъсир кўрсатмади.

Сульфатланган полисахаридларнинг иммуномодуловчи хоссалари аниқланди: молекуляр массаси 550 кДа, 2,98 бўлган сульфат целлюлоза (Na-СЦ) ва сульфат сахароза (Na-СС)лар 25,0 мг/кг дозада ошқозон ичига қўй

эритроцити (ЭБ) иммунизацияси билан бир вақтда кунда бир маҳал берилди.

Na-CC препаратини қабул қилган жониворларда ЭБ га иммун жавоб 1,60 марта, талокдаги антитана ҳосил қилувчи хужайралар (АОК) миқдори $20200,0 \pm 1797,0$ га ишончли ортган. Na-СЦ қабул қилган сичқонлар талоғида $17183,3 \pm 1067,2$ АОК ҳосил бўлган ва бу назоратга нисбатан 1,36 марта ишончли ошган.

Препаратларнинг сичқонларда нейтрал ва периферик иммунитет органларида хужайралар умумий миқдорига таъсири аниқланди (4-жадвал).

4-жадвал

Сичқонларда нейтрал ва периферик иммунитет органларида хужайралар сонига препаратларнинг таъсири ($M \pm m$, $n=6$)

Группа	Препарат дозаси, мг/кг	Тимус хужайралари $\times 10^6$	ИС	Суяк кўмиги хужайралари $\times 10^6$	ИС	Лимфа тугун хужайра $\times 10^6$	ИС
Назорат	-	$34,3 \pm 2,0$	-	$12,7 \pm 0,6$	-	$27,7 \pm 2,5$	
Na-CC	25,0	$44,3 \pm 2,6^*$	+1,29	$15,5 \pm 0,6^*$	+1,22	$36,6 \pm 3,3$	+1,32
Na-СЦ	25,0	$42,9 \pm 2,5^*$	+1,25	$15,3 \pm 0,4^*$	+1,20	$35,2 \pm 3,2$	+1,27

Na-CC препаратини қабул қилган жониворларда, число суяк кўмиги хужайралари 1,22 марта ишончли ошган ($15,5-0,6 \times 10^6$), препарат Na-СЦ да 1,20 марта ($15,3 \pm 0,4 \times 10^6$). Олинган натижалардан хулоса қилиш мумкинки, сульфатланган полисахаридлар марказий иммунитет органлари (тимус, суяк кўмиги)га стимуловчи таъсир кўрсатади.

Сульфат полисахаридларнинг турли патоген микробларга қарши антимиқроб фаолликлари аниқланди. Микробларнинг намуналарга нисбатан сезгирликлари қоғоз дискли усул ёрдамида аниқланди. Натижалар кўрсатишича, ТСЦ-7 намунаси ҳам граммусбат коккларга ҳам грамманфий таёқчаларга нисбатан юқори бактерицид таъсир кўрсатади. ТСЦ-2 намунаси *Klebsiella*, *E.coli*, *Streptococcus* ларга юқори антибактериал фаоллик кўрсатади, гарчи юқори концентрацияларда *Staphylococcus* ва *Proteus mirabilis* га фаоллик кўрсатади. Шунга асосланиб, айтиш мумкинки, ушбу параметрли намуналар йирингли яллиғланиш инфекциялари ва эширихиозни даволаш учун самарали ҳисобланади. ТСЦ-8 эса клебсиелла, ҳамма коккларга, эширихии ва *Proteus mirabilis* га муҳим таъсир кўрсатади. Шуни ҳам таъкидлаш мумкинки, намуна кандиди ва *P.aeruginosa* ларга ҳам таъсир этади. Таъкидлаш лозим, ТСЦ-9 намунасига ҳам граммусбат ҳам грамманфий микроорганизмлар сезгирлик кўрсатади. Бундан хулоса қилиш мумкинки, бу намунадан йирингли яллиғланиш ва эширихиозни даволаш учун фойдаланиш мумкин. Бу айниқса клебсиеллезли касалликларни даволашда самарали ҳисобланади.

Ўз навбатида, тадқиқ қилинаётган СЦ молекуляр катталиклари ва антибактериал фаоллик асосида «структура – ҳосса» ўзаро боғлиқликлари аниқланди. Бунда аниқландики, АД си 2.0 гача ва деярли яқин ПД ли намуналар микроблар ўсишига сезиларсиз таъсир этади. АД си 2,0 атрофида бу намуналарнинг фаолликларини кескин ортишини кўриш мумкин. АД си 2.2 дан юқори ҳолда эса бу ўсиш сезиларсиз давом этади. Бу маълумотлар

ҳақиқатда тасдиқлайдики, сульфатланган полисахаридлар АГБ ларидаги С-2 ва С-3 лардаги ОН- гуруҳларининг алмашилиши биологик фаолликнинг пайдо бўлишига олиб келади. Шунингдек, намуналарнинг молекуляр-массовий катталиклари (ПД) таъсир ҳам аниқланганда, ўхшаш ҳолат кузатилди, яъни ПД си 320 - 340 гача биологик фаолликнинг бир хилда ортиб бориши, ундан кейинги ПД ошиши фаолликнинг деярли ошмаслигига ёки сезиларсиз ўзгаришига сабаб бўлиши аниқланди.

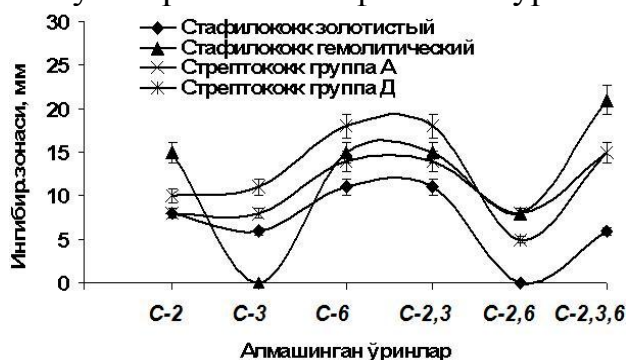
СЦ намуналарига микробларнинг сезгирлигини тадқиқ этиш натижалари асосида хулоса қилиш мумкинки, уларнинг молекуляр катталиклари биологик фаолликларини аниқлашда муҳим роль ўйнайди. Юқори ММ ли (> 200000) СЦ намуналари нисбатан паст ММ ли намуналарга қараганда паст биологик фаолликка эга. Шунингдек, фаоллик микроорганизмларнинг структуравий ўзига хосликларига боғлиқ бўлиши мумкинлиги аниқланди. Масалан, юқори ва қуйи молекуляр массали намуналар (ТСЦ-8 ва ТСЦ-9) нисбатан қуйи молекуляр СЦ намунаси (ТСЦ-6) га қараганда *E-coli* ва бошқа коккларга юқори фаоллик кўрсатган. СЦ намунаси *Proteus mirabilis* га нисбатан фаоллиги маълум ММ гача ошиб боради ва маълум ММ қийматларида (ТСЦ-1, СП=228) эса фаоллик ўзгармайди.

Бу ҳолатларни асослаш учун селектив сульфатланган намуналар ҳам антимикроб фаолликларига аниқланди.

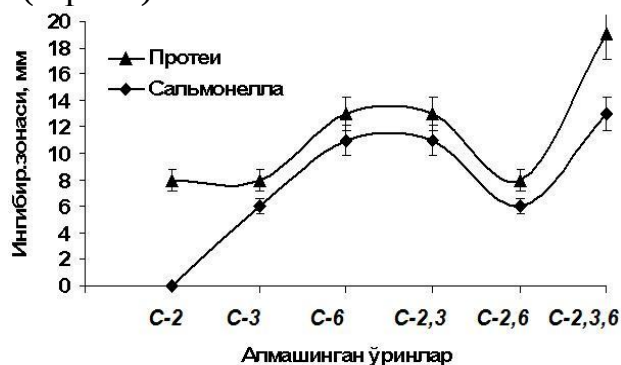
Натижалар кўрсатишича, алмашилиш асосан 2- ва 3- углерод атомларида кетган СЦ намунаси (СЦ-С(2,3)), эшерихий ва клебсиеллага нисбатан яққол антимикроб фаоллик кўрсатган. Юқори концентрацияларда, у деярли барча тадқиқ этилган микробларга антимикроб таъсир кўрсатади. С-6 намуна деярли барча бактерияларга юқори концентрацияларда ҳам қуйи концентрацияларда ҳам юқори фаолликка эга. СЦ-С(3) намунаси кичик концентрацияларда эшерихий, протей, стрептококк штамmlарига пасив таъсир этади. СЦ-С(2) намунаси кўплаб турдаги бактерияларга нисбатан кучсиз, аммо таъкидлаш лозимки, ҳаттоки кичик концентрацияларда стафилококк ва эшерихий га нисбатан фаоллик кўрсатади. СПГМ намуна ҳамма тадқиқ этилган микроорганизмларга таъсир қилади, гарчи клебсиеллага фақат юқори концентрацияларда таъсир қилади. СГК намунаси бошқа намуналар сингари ҳамма патогенларга яққол бактерицид таъсир кўрсатади. Сульфат амилаза (СА) намунаси микроб штамmlарига ҳеч қандай таъсир кўрсатмайди. Юқори концентрацияларда у эшерихий ЛН ва протеиларга сезиларсиз таъсир кўрсатади. ПЕК намунаси фақат эшерехий, протей ва псевдомонасларга сезиларсиз таъсир қилади, бошқа штамmlарга таъсир кўрсатмайди. СЦ-ТАЦ намунаси ҳамма гурппадаги микробларга сезиларсиз таъсир кўрсатади, стрептококк ва дифтероидларга нисбатан эса умуман таъсирга эга эмас.

Навбатда, селектив сульфатланган полисахарид намуналарнинг молекуляр катталиклари асосида «структура – хосса» ўзаро боғлиқликлари аниқланди (4-5 расмлар). 4-расмдан кўриш мумкинки, селектив сульфатланган полисахаридлар грам-мусбат бактерия вакилларига сезиларли

таъсир кўрсатади. Бу бактерияларга нафақат уч алмашинган целлюлоза сульфат ҳосилалар, балки алмашинган гуруҳлари C-6 ва C-2,3 ларда жойлашган намуналар ҳам шу даражада таъсир кўрсатади, намуналарнинг энг кичик фаолликлари сульфат группалари 3- ва 2,6- углерод атомларида жойлашганларига тўғри келади. Грам-манфий бактериялар (лактоза – манфийлари) га АГБларда жойлашган сульфат гуруҳларнинг таъсири нисбатан яққолроқ ифодаланган, бу ҳолатда бактериялар уч алмашинган ҳосилаларга нисбатан ўта сезгир эканлиги кўринди. Ўз навбатида юқори фаоллик C-6 ва C-2,3 намуналарига тўғри келади, ҳолбуки, C-2, C-3 ва C-2,6 намуналари энг паст фаоллик кўрсатган (5-расм).

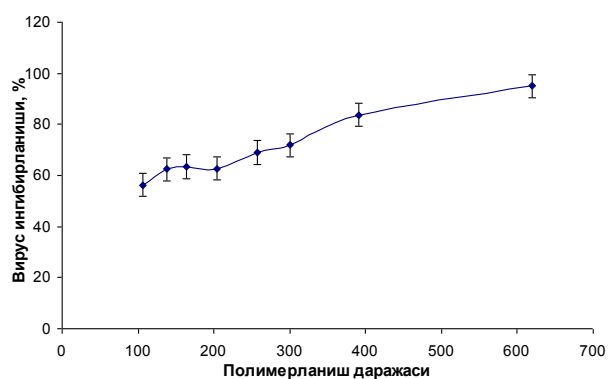


4-расм. Сульфат гуруҳларнинг АГБда жойлашувини грам-мусбат бактерияларга таъсири

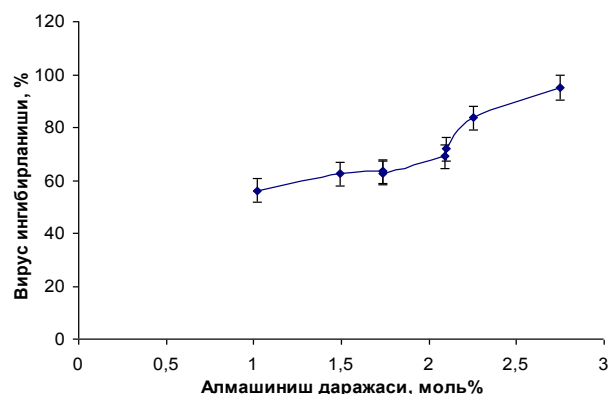


5-расм. Сульфат гуруҳларнинг АГБда жойлашувининг грам-манфий бактерияларга таъсири

Олинган маълум молекуляр катталикларга эга сульфат ҳосилали полисахаридларнинг цитотоксиклик ва гепатит С га қарши *in vitro* фаолликлари кўрилди. Юқори молекуляр ва алмашиниш даражали намуналар гепатит вирусига қарши юқори биологик фаолликка эга, гарчи фаоллик сульфат миқдоридан кўра молекуляр оғирлик катталигига боғлиқ эканлиги кўринди. Намуналар биологик фаолликлари натижаларини солиштириш уларнинг терапевтик эффективлигини (ТЭ) баҳолаш имконини беради. Юқори ММ (СП=~600)ли сульфат целлюлозалар терапевтик эффективлиги бошқаларига СП=1066 нисбатан ювори–($CC_{50}=35,17$ ва $IC_{50}=83,33\%$), гарчи бошқа, масалан госсиполнинг фаоллиги эқори бўлсада ($IC_{50}=99,22\%$), унинг ўта юқори захарлилиги сабаб терапевтик самарадорлиги фақат 3 га тенг ($CC_{50}=18,8$).



6-расм. Препаратлар ПДларини вирус ингибирланишига таъсири



7-расм. Препаратлар АДларини вирус ингибирланишига таъсири

АД си 2.0 ва ПД 370 дан ювори бўлган намуналар кенг спектрдаги антивирус таъсир кўрсатади. Бу макромолекула сиртида биологик фаол - SO_3Na гуруҳлар пайдо бўлиши ва микдорининг ортишини билдиради (6 ва 7 расмлар). Бу ангидрогексоза бирликлар C-2 ва C-3 атомларидаги ОН гуруҳларини сульфат гуруҳларига алмашилиши билан биологик фаолликларни (гепаринсимон) юзага келиши ва ортиши ҳақидаги маълумотларни тасдиқлайди, фақат C-6 атомида алмашилиш эса биологик фаолликнинг пайдо бўлишига таъсир қилмайди.

Содда ва мураккаб ретровирусларнинг зарарланувчи хужайралар сиртидаги бирламчи хужайра рецепторлари билан таъсирлашувига ҳалақит берувчи, сезгир нишон хужайраларнинг зарарланишини олдини оловчи потенциал ингибиторлар скрининги системаси ишлаб чиқилган.

Ушбу тизимнинг яратиш учун асос, кўпчилик ретровируслар, шу жумладан, инсон иммунитет танқислиги вируси ОИВ-1 ва ОИВ-2 каби вируслар учун бирламчи хужайра рецептори вазифасини ўтовчи, соғлом хужайра мембранасида жойлашган гепаран сульфатлар ҳақидаги маълумотлардир.

Биологик фаолликларни солиштириш учун турли молекуляр катталикларида (молекуляр оғирлик, АД, ва АГБ да турли позицияларда алмашилиш тутган) сульфат целлюлозалар ва сульфат амилоза (Na-CA) намуналари олинди. 5-жадвалда антивирус фаолликлари аниқланиши учун тақдим этилган намуналар молекуляр катталиклари, уларнинг цитотоксик қийматлари келтирилган.

5-жадвал

Биологик фаолликлари аниқланган сульфат полисахаридларнинг молекуляр катталиклари ва цитотоксик қийматлари

Индекс	АД	ММ кДа	IC-50 мкг/мл	IC-90 мкг/мл	Аниқланувчи боғлиқликлар
В-1	2,75	1628	0,5	0,9	ММ га боғлиқликни аниқлаш
В-4	2,55	655	0,35	0,9	
В-8	2,98	281	0,09	0,8	
В-7	2,85	274	0,35	0,9	
МСЦ	0,31	160	-	-	АД га боғлиқликни аниқлаш
C-6	1,2	140	-	-	
В-5	1,77	428	0,55	0,1	
В-4	2,55	655	0,35	0,9	
СА	2,95	285	0,35	2	Конформацияга боғлиқликни аниқлаш
В-8	2,98	281	0,09	0,8	

Экспериментлар SC-1 сичқон эмбрионал фибробласт хужайра линиясида ўтказилди. Намуналарнинг антивирус фаолликлари SC-1 хужайра линияларида аниқланиб, вирус билан зарарлашдан олдин лункага 20 мкл ҳажмда турлича концентрацияларда аниқланаётган намуналар қўшилди.

Флуоресцияланувчи хужайралар миқдори оқувчан цитофлуориметрда зарарлантиришдан 48 соат ўтиб ўлчанди.

Антивирус фаолликни қуйидаги катталикларга аниқланди: 1) молекуляр оғирлик; 2) АД; 3) конформация; 4) сульфат гуруҳларнинг жойлашган ўрни.

1) *Фаолликнинг молекуляр оғирликка боғлиқлиги.* Олинган натижалардан хулоса қилиш мумкинки, нисбатан юқори антивирус фаоллик ММ си 281 кДа, АД си 2.95 бўлган В-8 намунасига тўғри келади. Буни шу билан тушинтириш мумкинки, юқори АД ли намуналарда антивирус фаоллик кўрсатиш учун ММ сезиларли роль уйнамайди. Молекуляр оғирликка боғлиқликни аниқлаш учун АД си 1 ва 1,5 намуналар талаб этилади.

2) *Фаолликнинг АД га боғлиқлиги.* . Олинган натижалардан хулоса қилиш мумкинки, нисбатан юқори антивирус фаоллик ММ си 655 кДа, АД си 2,55 бўлган В-4 намунасига тўғри келади, ундан кейинги ўринда АД си 1,77, ММ си 428 кДа бўлган В-5 намунаси юқори фаоллика эга. С-6 ва МСЦ намуналари (тегишлича ММ 140кДа ва АД 1,2 ҳамда ММ 160кДа ва АДси 0,31) иштирокида антивирус фаоллик деярли кузатилмайди, бу ҳолатни мазкур ММ оралиғи учун АД сининг бу қиймати етарли бўлмаслиги билан изоҳлаш мумкин.

Шунингдек, β -конформацияли полисахарид ҳосилалар α -конформациялиларига қараганда юқори антивирус фаоллик кўрсатиши аниқланди.

Шундай қилиб, хулоса қилиш мумкинки, текширилган намуналар бирламчи рецепторлари хужайра гепарансульфатлари ҳисобланган вирусларнинг хужайрага киришига специфик қаршилик кўрсатади. Демак, полисахаридларда сульфат гуруҳларининг бўлиши уларнинг кенг доирадаги биологик муҳим оксиллар билан специфик ва носпецифик боғланишини ошириши мумкин. Мазкур таъсирлашувларда полисахарид макромолекуласи структураси ва уларнинг эритмадаги конформацияси ҳам муҳим роль ўйнайди.

Диссертациянинг **«Янги доривор препаратлар яратишда модификацияланган анион полисахаридларнинг устивор структуралари»** деб номланган тўртинчи бобида анион табиатли модификацияланган полисахаридларнинг биологик фаолликларини аниқлаш ва уларнинг компьютер моделлаши, анион табиатли полисахаридлар билан патогенлар гликопротеинларининг специфик интерполимер комплекс ҳосил қилиши, умумий фармакологик ва токсикологик изланишлар клиник олди синовлари, Бактоцел, Сульфогель препаратлари учун норматив-техник хужжатлари ишлаб-чиқилди.

«Биологик фаоллик – молекуляр катталиклар» ўзаро боғлиқликлари сабабини аниқлаш мақсадида тузилган лигандлар – α - ва β - боғланган D- глюкозид, галактозид, маннозид бирликлар сульфат ва фосфат эфирлари молекулалари билан Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) дан кўчириб олинган *E.coli pilus*, *P. Aeruginosa*, Mo-MuLV, ОИБ-1, HCV хужайралари сирти эпителилари молекуляр докинг ўтказилди.

Ўтказилган компьютер моделлаш изланишлари натижалари гексозан эркин гидроксил группалари эфирланиш даражаси ошиши билан уларнинг патоген эпителилари оксил қисмлари билан таъсирлашувлари ортишини кўрсатди.

Глюкозидлар конформацион структуралари «оксил-лиганд» ўзаро таъсирларига сезиларли таъсир кўрсатади. Лейкемия вируси молекуляр докинги мисолида, β -структуранинг бўлиши α -структура иштирокидагига қараганда нисбатан кўп ўзаро таъсирлашувчи кучлар (β -структурада: 26 та, жумладан 2 водород, 8 кутбли, 2 гидрофоб, 3 катион- π ва 11 бошқа боғлар) ни юзага келтиради (α -структурада: 20 та, жумладан 1 водород, 2 кутбли, 4 гидрофоб ва 13 бошқа боғлар).

Анион полисахаридлар молекуляр докинг натижалари тасдиқладики, улар кўрсатган фаоллик механизми нафақат молекуляр катталикларга, балки полисахарид АГБ сида алмашинган гуруҳларнинг тарқалишига боғлиқ.

Турбидиметрия, УФ- ва ИҚ-спектроскопия усуллари билан турли молекуляр катталик ва функционал гуруҳли модификацияланган полисахаридларнинг лизоцим ва трипсинлар ўртасида комплекс ҳосил қилиш хусусияти аниқланди. АД си ошиши билан полисахарид ҳосилаларнинг оксиллар билан боғланиши ортиб боради. Натижалар модификацияланган полисахаридлар макромолекуласи занжиридаги сульфат ёки фосфат гуруҳ ҳисобига барқарор анион заряд тутишини тасдиқлади. Сульфатланган полисахаридларнинг суқли эритмаларида оксиллар билан ўзаро таъсирлашуви манфий зарядланган сульфат (фосфат) ионлар ва мусбат зарядланган оксил аминогуруҳларининг ўзаро электростатик тортилиши ҳисобига юз беради. Структураларни солиштириш, β -гексозанлар оксиллар билан нисбатан интерполимер комплекс ҳосил қилиш қобилияти юқорилигини кўрсатди.

Ўтказилган изланишлар натижалари полианион табиатли модификацияланган полисахаридлар асосида янги оригинал антимикроб ва антивирус препаратлар яратиш ва келгусида улар асосида оригинал қон суюлтирувчи (Сульфогель), антивирус ва антимикроб препарат (Бактоцел) препаратлар ишлаб-чиқиш учун тавсиялар бериш имконини берди.

Биринчи марта таркибида сульфатланган полисахарид тутган «Бактоцел» гели ишлаб чиқилди, унинг антибактериал ва яра битказувчи таъсири аниқланди ва фаоллик «Левомеколь» мази билан солиштирилди. У инфекцияланган жароҳатларни тозаланиш ва битиш муддатларини 6-12 кунга қисқартиради. Препарат стафилококка (*S. aureus*) га қарши антибактериал таъсирга эга. «Бактоцел» гели ва «Левомеколь» мази таъсирлари солиштирилганда «Бактоцел» нисбатан юқори антибактериал ва жароҳат битказувчи таъсирга эга.

Биринчи марта антикоагуляцион таъсирли гел асосли «Сульфогель» юмшоқ дори шакли ишлаб-чиқилди. Трисульфат целлюлоза субстанцияси ва «Сульфогель» дори шакллари клиник олди синовлари ўтказилди. Трисульфат целлюлоза физик-кимёвий ва биологик хоссалари (антимикроб, антивирус, захарлилик даражаси, *in vitro* ва *in vivo* антикоагулянт фаоллик) баҳоланди,

субстанциянинг сифат ва миқдорий таҳлил усуллари ишлаб чиқилди. Трисульфат целлюлоза юқори бевосита антикоагулянт фаолликка эга, қон қуйилиш вақтини сезиларли ошириши аниқланди. «Сульфогель» дори шаклининг антикоагулянт фаоллиги машҳур аналог препарат Гепарин мази билан солиштирилди.

Диссертациянинг «**Олинган модификацияланган полисахаридлар физик-кимёвий хоссалари ва уларнинг структураларини аниқлаш**» деб номланган бешинчи бобида полисахаридларни ажратиш усуллари, уларнинг мураккаб эфирларини синтез қилиш, структураларини аниқлаш, уларнинг специфик фаолликларини белгилаш усуллари келтирилган.

ХУЛОСАЛАР

1. Полисахаридлар целлюлоза, пектин, галактоманнанларни ажратиб олиш ва уларни тозалаш усуллари ишлаб чиқилди. Олинган полисахаридлар физик-кимёвий хоссалари: молекуляр оғирлик, конформацион ўзига хосликлари (асосий макромолекуляр занжир кимёвий боғ табиати), функционал гуруҳлар таркиби (пектинда карбоксил, галактоманнанда галактоза) аниқланди. Галактоманнанларнинг асосий ва ён занжирлари кимёвий ва ферментатив (α -галактозидаза ферменти) гидролизи амалга оширилди. Дастлабки ва гидролизланган галактоманнанларда галактоза:манноза ўзаро нисбатлари тегишлича 1:2,8 ва 1:5 бўлиб, гидролиз асосан макромолекуланинг ён занжирида кетади.

2. Илк маротаба полисахаридлар (целлюлоза, пектин, амилоза, галактоманнанлар)нинг кимёвий модификацияси (сульфатлаш, фосфатлаш) систематик тадқиқ этилган, уларнинг структура, молекуляр катталиклари ва физик-кимёвий хоссалари батафсил аниқланган. Полисахаридларда алмашилиш даражалари бир хилда тақсимланган намуналар олишнинг гомоген сульфатлаш усуллари ишлаб чиқилди. Полигалактурон, целлюлоза, галактоманнан сульфатлари (ММ тегишлича 10,5- 120,4 кДа, (10,5- 120,4 кДа, 12,6 -67,3 кДа, 13,1-125 кДа) АГБ да АД тарқалиши деярли ўзаро яқин, АД си 0,30-2,92 оралиғидаги сульфат полисахаридлар, ММси 6,2-72 кДа ва АДси 0,15-2,45 бўлган фосфат ҳосилалар олинди. Полисахаридларни модификациялаш реакциясининг кинетикаси Полимерланиш реакцияларини автоматик узлуксиз назорати (АСОМР) тизимида баҳоланиб, мақсадга йўналтирилган синтезни амалга оширишга эришилди.

3. Сульфатлаш реакциясини орқали илк бор полисахаридлар АГБ гидроксил гуруҳларининг реакция фаолликлари аниқланди ва у қуйидаги қаторда камайиб бориши аниқланди: $C-6 > C-2 > C-3$. Полисахарид сульфат ҳосилалар сувли эритмаларида ярим эгилувчан конформацияга эгалиги ва намуналарнинг АД ошиши билан занжирнинг эгилувчанлиги ортиши аниқланди.

4. Илк бор анион ҳосилали полисахаридларнинг организм соғлом хужайраларига патогенларнинг таъсирини ингибирловчи, уларнинг рецептор участкаларига блокловчи таъсирлари компьютер моделлаш усули билан

аниқланди, натижалар *in vitro* ва *in vivo* шаротидаги тажрибаларда тасдиқланди. Мультирезистент бактериялар (*P. Aeruginosa*, *E.coli*), вируслар (гепатит С, лейкомия, ОИВ-1) гликопротеинлари ва сульфатланган моносахарид (гексозалар) ва модификацияланган полисахаридлар модель структуралари орасида интерполимер комплекслар ҳосил бўлиши исботланди.

5. Илк бор патоген бактерияларнинг сезгирлиги модификацияланган полисахаридлар табиати ва молекуляр катталикларга боғлиқлиги аниқланди. Намуналарнинг АД ошиб бориши билан антибактериал фаолликлари ошиши ва фаолликнинг кескин ортиши АД си 1,9 дан 2,1 гача эканлиги кўрсатилди. Сульфатланган α -гексозанлар (амилоза, полигалактурон кислота, декстран)га нисбатан β -гексозанлар (целлюлоза, галактоманнан) ёрқин фаолликка эгаллиги аниқланди. Қуйи концентрацияларда ҳам С-2,6-дисульфат полисахаридлар *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S.aureus* ларга фаол таъсир этади.

6. Анион ҳосилали полисахаридлар лейкомия, гепатит С ва ОИВ вирусларига қарши препаратлар яратиш учун потенциал объектлар сифатида тавсия этилди. Ярим максимал ингибирлаш концентрацияси (IC_{50}) бўйича лейкомия вирусига қарши фаоллик 0,02-0,45 мкг/мл оралиғида ва АД си ортиши билан антивирус фаоллик ошиб бориши, β -структурали бирликлар α -структуралиларига қараганда ёрқин антивирус фаолликка эгаллиги кўрсатилди.

7. Энг кичик антикоагуляцион фаолликка эга анион ҳосилали полисахаридлар синтез қилинди. Бунга ангидрогексоза звеносидаги С-2 ва С-6 углерод атомларида сульфат гуруҳи тутган сульфат полисахаридлар синтези орқали эришилди. Самарадорлиги бўйича ўхшаш концентрацияларда гепаринга тенг ва ундан юқори даражада фаоллик кўрсатувчи АГБларнинг 2 ва 3 углерод атомларида сульфат гуруҳи тутган намуналар олинди. Намуналарнинг LD_{50} қийматлари сичқонларда >2000 мг/кг, каламушларда >4000 мг/кг, бўлиб, кам захарли моддалар синфига кириши аниқланди.

8. Илк бор сульфатланган полисахарид тутган «Бактоцел» гели олинди ва у яра битказувчи таъсирга эгаллиги, инфекцияланган жароҳатларни тозаланиш ва битиш муддатларини 6-12 кунга қисқартириши кўрсатилди. «Левомеколь» мази билан солиштирма таҳлилда «Бактоцел» гели стафилококка (*S. aureus*) га нисбатан юқори антибактериал ва жароҳат битказувчи таъсирга эгаллиги аниқланиб, янги авлод антибактериал воситалари ишлаб чиқиш учун тавсия этилди.

9. Трисульфат целлюлоза субстанцияси ва «Сульфогель» дори шаклининг клиник олди синовлари ўтказилди. Сульфат целлюлозалар физик-кимёвий ва биологик хоссалари (антимикроб, антивирус, захарлилик, *in vitro* ва *in vivo* шароитда антикоагулянт фаоллик) аниқланиб, субстанция ва тайёр дори шакллари стандартизация усуллари ишлаб чиқилди. Трисульфат целлюлоза юқори антикоагулянт фаолликка эгаллиги, қон ивиш вақтини 3-15 марта узайтириши аниқланди. «Сульфогель» нинг антикоагулянт фаоллиги гепаринли маз билан солиштирилиб, илк бор антикоагулянт таъсирга эга юмшоқ дори шакли «Сульфогель» гели ишлаб чиқиш учун тавсия қилинди.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.27.06.2017. К/В/Т. 37.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИООРГАНИЧЕСКОЙ
ХИМИИ, НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА,
ИНСТИТУТЕ ХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ**

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

НОРМАХАМАТОВ НОДИРАЛИ СОХОБАТАЛИЕВИЧ

**БИОСЕЛЕКТИВНЫЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО И ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ НА
ОСНОВЕ СУЛЬФАТПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

02.00.10 - Биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ХИМИЧЕСКИХ НАУК (DSc)**

Ташкент – 2017

Тема диссертации доктора наук (DSc) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером B2017.1.DSc/K14

Диссертация выполнена в Институте биоорганической химии.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.biochem.uz) и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziyo.net).

Научный консультант

Тураев Аббасхан Сабирханович
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты

Рахманбердиев Гаппар
доктор химических наук, профессор

Азизов Умархон Мухтарович
доктор химических наук, профессор

Мавлянов Саидмухтар Максудович
доктор химических наук, профессор

Ведущая организация

Ташкентский фармацевтический институт

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании Научного совета DSc.27.06.2017. К/В/Т. 37.01 при Институте биоорганической химии, Национальном университете Узбекистана, Институте химии растительных веществ Узбекистана (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии (регистрационный номер № Д-190). (Адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: 262-35-40, факс: (99871) 262-70-63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2017 года.
(реестр протокола рассылки ____ от _____ 2017 года).

Ш.И.Салихов

Председатель Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., академик

М.И.Асраров

Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученых степеней, д.б.н., профессор

А.А.Ахунов

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора наук(DSc))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В мире по борьбе с инфекционными заболеваниями образование быстрой и легкой устойчивости (резистентности) патогенов против низкомолекулярных биологически активных веществ является одной из актуальных проблем. В настоящее время развитие экспериментальных методов биоорганической химии, биохимии, микробиологии дало возможность рассмотреть на молекулярном уровне действия лекарственных препаратов на патогенные микробы, вирусы и раскрыть механизмы проявления эффективной биологической активности.

После обретения независимости в республике особое внимание уделяется защите населения от инфекционных заболеваний, их профилактике. В данном направлении на основе предпринятых запланированных мероприятий получены определенные результаты, в частности достигнуты основанные на современных подходах результаты по разработке высокоэффективных, импортозамещающих антибактериальных и противовирусных препаратов. В последние годы появился ряд сообщений о роли протеогликанов в ингибировании бактерий и вирусов, которые дали возможность создания препаратов нового поколения, проявляющие свойства, ингибирующие активность патогенов (микробов), на основе полианионных природных полисахаридов с протеогликаноподобной структурой, в частности гликозаминогликанов. Конкретные задачи для дальнейшего развития фармацевтической промышленности, а также обеспечения населения и медицинских учреждений дешевыми высококачественными лекарствами и медицинскими изделиями, поставленные в Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан, послужат руководством в реализации данной работы.

В настоящее время в мире создание протеогликаноподобной структуры на основе полисахаридов и их полианионных производных (сульфатированных, фосфорилированных и т.д.), комплементарно блокирующих гликопротеин патогена, позволит создать макромолекулярные системы антибактериального и противовирусного действия и разработать нерезистентные к патогенам лекарственные препараты. Актуальность и востребованность результатов диссертационной работы заключается в создании вышеназванных макромолекулярных систем, в установлении взаимосвязи структуры полианионных полисахаридов с их антимикробной и противовирусной активностью, позволяющих создать протеогликаноподобные полисахаридные структуры, комплементарно взаимодействующие с рецепторами (гликопротеинами) патогена, что приводит к их блокированию в инфицировании здоровой клетки организма.

Данное диссертационное исследование в определенной степени послужит выполнению задач, предусмотренных в Постановлении Президента Республики Узбекистан от 14 июля 2006 г № ПП-416 «О мерах по поддержке отечественных производителей лекарственных средств и изделий

медицинского назначения», Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 г № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий Республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики VI. «Медицина и фармакология».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации¹.

Научные исследования, направленные на изучение полисахаридов, имеющих полианионную структуру, и их взаимодействия с патогенами, проводятся многими ведущими научными центрами мира и высшими учебными заведениями, в том числе: Ягеллонский университет в Кракове (Польша); Институт промышленных наук университета Токио; центральная научно-исследовательская лаборатория (Япония); Институт клинической и молекулярной вирусологии, университет Эрлангена-Нюрнберга (Германия); Канадская фармацевтическая компания Polydex Pharmaceuticals Limited Онтарио (Канада); Институт биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан, Институт химии и физики полимеров Национального университета Узбекистана.

В результате исследований, проведенных в мире по изучению антибактериальной и противовирусной активностей модифицированных полисахаридов с полианионной структурой, получен ряд научных результатов, в том числе: синтезированы производные сульфатированного полиаллиламин гидрохлорида и N-сульфатированного хитозана, установлено их влияние на вирусы гриппа А и В (Ягеллонский университет, Польша); синтезированы алкил олигосахариды, октадецил мальтогексозидов, ламинаринпентозид додецилсульфат и олигомер додеилламинарин, обладающие анти-ВИЧ активностью; показано, что их 50% эффект ингибирования вируса находится в диапазоне 0,4-0,7 мкг/мл (Университет Токио, Япония); установлено, что природные сульфатированные полисахариды являются важными объектами при разработке лекарственных препаратов для предотвращения заболеваний, передаваемых половым путем (Университет Эрлангена-Нюрнберга, Германия); сообщается о III фазе широкого доклинического испытания лекарственного препарата на основе сульфата целлюлозы «Ushercell», разработан контрацептивный и антибактериальный препарат против инфекций, передаваемых половым путем, обладающий широким спектром антимикробной активности против *Neisseria gonorrhoeae* и *Chlamydia trachomatis* (Polydex Pharmaceuticals Limited, Канада).

В мире по определению антимикробной и антивирусной активности полисахаридов с полианионной структурой по ряду приоритетных

¹ Научно-исследовательский обзор по теме диссертационной работы разработан по приведенным данным в источниках www.sciencedirect.com, www.researchgate.net, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles и на основе других источников

направлений проводятся исследования, в том числе: синтез производных полианионных полисахаридов путем различных реакций этерификаций; выбор полисахаридной основы и контроль условий реакций; разработка лекарственных средств, обладающих антибактериальной и противовирусной активностями; получение эффективных препаратов против устойчивых мутантов патогенов на основе полисахаридов полианионной природы.

Степень изученности проблемы.

Создание антибактериальных и противовирусных препаратов на основе модифицированных макромолекулярных систем, в частности на основе полисахаридов с полианионной структурой, является новым направлением в биоорганической химии и основано на ингибировании (блокировании) гликопротеина в оболочках патогена, как «ключ - замок».

В настоящее время за рубежом в различных научных центрах, несмотря на проводимые исследования по выделению природных и синтетических полимеров полианионной природы, их охарактеризованию и определению биологической активности, наблюдается подход каждого автора, основанный на индивидуальных образцах, имеющих определенные молекулярные параметры. Таким образом, отсутствуют систематические исследования, позволяющие установить закономерности влияния химической природы макромолекулярной цепи, длины макромолекулы (молекулярная масса), состава анионной группы, в частности сульфатных групп, их расположение в ангидрогексозном звене (во втором C-2, третьем C-3 и шестом C-6 углеродных атомов) и других параметров на антимикробную и противовирусную активности. В связи с этим важной проблемой является целенаправленный синтез модифицированных полисахаридов с заранее заданной структурой, комплементарной к рецепторам – гликопротеинам, находящимся в оболочках патогена.

В Узбекистане исследования полисахаридов и получение их эффективных полианионных производных проводились под руководством академика Х.Усманова, проф. Ш.Наджимутдинова, проф. А.С. Тураева, проф. Г.Рахманбердиева и проф. А.А.Саримсакова. В Институте биоорганической химии, Институте химии и физики полимеров, Ташкентском химико-технологическом институте проводятся исследования по получению карбоксиметилцеллюлозы и ее комплексов с лекарственными препаратами, созданию на ее основе лекарственных средств широкого терапевтического действия. В Институте биоорганической химии в течение ряда лет проводится систематическое исследование целенаправленного синтеза полисахаридов различной конформации и молекулярных параметров, а также изучение зависимости биологической (антибактериальной и противовирусной) активности в условиях *in vitro* и *in vivo* от их структуры.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами исследовательского учреждения, где выполнена работа.

Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских проектов Института биоорганической химии: ФА-ФЗ-Т054 «Исследование закономерностей синтеза замещенных

сульфатпроизводных полисахаридов, определение молекулярных характеристик, установление зависимости антимикробной активности от структуры» (2007-2011), ФА-Ф6-Т097 «Синтез и исследование биологической функции модифицированных полисахаридов с целью получения новых лекарственных средств к органам-мишеням» (2012-2016).

Целью исследования является целенаправленный синтез модифицированных полисахаридов, содержащих заместители анионной природы (сульфатные, фосфатные и карбоксильные), комплементарно взаимодействующих со специфическими рецепторами патогенов, создание терапевтических систем направленного антибактериального и противовирусного действий, а также определение их биологической функции.

Задачи исследования:

разработка методов выделения полисахаридов (галактоманнана, арабиногалактана, целлюлозы, пектина, амилозы) с заданной структурой из растительного сырья. Получение полисахаридов с линейной и разветвленной структурой путем ферментативного и химического гидролитического расщепления. Определение их физико-химических свойств: молекулярной массы, степени замещения, расположения функциональных групп, установление структуры;

модификация полисахаридов, получение функциональных производных (сульфат, фосфат, карбоксил, метил) целлюлозы, пектина, галактоманнана, амилозы, имеющих полианионную структуру. Определение молекулярных параметров и структуры модифицированных полисахаридов;

анализ структуры и свойств гликопротеинов – *E.coli*, *P.aeruginosa*, вирусов гепатита С и лейкемии, компьютерное моделирование взаимодействия установленных структур (гликопротеинов патогенов) с модифицированными полисахаридами, содержащими различные функциональные группы анионной природы;

установление антимикробной (против *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli-lactose positive*, *Escherichia coli-lactose negative*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Candida albicans*) и противовирусной (против вируса лейкемии мышей Молони (Mo-MuLV-Moloney murine leukemia virus), ВИЧ-1 и гепатит С (ВГС)) активности модифицированных полисахаридов в условиях *in vitro*;

целенаправленное регулирование молекулярных параметров, структуры и конформационных особенностей модифицированных полисахаридов. Получение модифицированных полисахаридов полианионной природы с заранее заданной структурой (монозамещенные (С-2; С-3 и С-6), дизамещенные (С-2,3 и С-2,6), тризамещенные (С-2,3,6) сульфатпроизводные). Установление их молекулярных параметров, структуры, физико-химических свойств и определение антимикробной и противовирусной активностей в условиях *in vitro* и *in vivo*;

установление зависимости антимикробной и противовирусной активности и определение оптимальной молекулярной, конформационной структуры модифицированных полисахаридов, наиболее комплементарных к бактериям *E.coli*, *P.aeruginosa* и вирусам ВГС и MuLV;

фармакологическое изучение наиболее комплементарных к бактериям *E.coli*, *P. Aeruginosa* и вирусам ВГС и MuLV модифицированных полисахаридов, установление спектра фармакологического действия и терапевтической эффективности;

рекомендации по созданию новых оригинальных антимикробных и противовирусных препаратов на основе модифицированных полисахаридов полианионной природы и разработка противосвертывающих (Сульфогель), противовирусных и антимикробных препаратов (Бактоцел) на их основе.

Объектами исследования являются целлюлоза, выделенная из хлопкового линта, цитрусовый и яблочный пектин, галактоманнан, полученный из семян *Gleditsia triacanthos* и *Styphnolóbium japónicum*, монозамещенные (С-2; С-3 и С-6), дизамещенные (С-2,3 и С-2,6), тризамещенные (С-2,3,6) сульфатпроизводные, фосфорнокислые производные, иммунные клетки, грамотрицательные и грамположительные бактерии, клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши SC-1 и NIH 3Т3, Nuh7.5.1 клетки.

Предмет исследования составляет комплементарное взаимодействие модифицированных полисахаридов полианионной природы с гликопротеинами, находящимися в оболочке патогена, приводящее к ингибированию активности патогена, вследствие чего патоген теряет способность инфицирования здоровой клетки организма и размножения в ней.

Методы исследования. При выполнении диссертационной работы были использованы методы биоорганической химии (выделение, экстракция, гидролиз и модификация биологически активных полисахаридов из растительного сырья); для установления химической структуры соединений применены физико-химические методы исследований (УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурный анализ, реология, гель-проникающая хроматография, газ-хроматография, методы термического анализа - ТГ/ДСК, вискозиметрия, элементный анализ, кондуктометрическое титрование, спектрофотометрия); для исследования противовирусной активности – флуорометр с системой скрининга потенциальных ингибиторов, для исследования антибактериальной активности – диско-диффузионный метод.

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

разработаны методы, позволяющие получить сульфатпроизводные полисахаридов с молекулярной массой (ММ) 10,5-120,4 кДа и степенью замещения (СЗ) от 0,30-2,92, фосфатпроизводные с ММ 6,2-72 кДа и СЗ 0,15-2,45, с равномерным распределением вдоль цепи макромолекулы замещенных групп, а также обоснована потенциальная возможность

создания антибактериальных и противовирусных лекарственных препаратов на их основе;

установлено влияние молекулярной массы макромолекулы анионпроизводных полисахаридов, содержания сульфатных, фосфатных, карбоксильных групп вдоль макромолекулы, конформации макромолекулы, расположения замещенных групп в ангидрогексозном звене на бактерицидную и вирулицидную активности;

установлена зависимость чувствительности патогенных бактерий от природы и молекулярных параметров модифицированных полисахаридов, с увеличением СЗ образцов увеличивается антибактериальная активность, но резкое увеличение активности наблюдается при СЗ от 1,9 до 2,1, более выраженным антимикробным действием обладают сульфатированные β -гексозаны (целлюлоза, галактоманнан), по сравнению с сульфатированными α -гексозанами (амилоза, полигалактуроновая кислота, декстран);

установлено, что анионпроизводные полисахаридов являются потенциальными объектами для создания препаратов против лейкемии, гепатита С и ВИЧ и доказано, что противовирусная активность против вируса лейкемии находится в пределе 0,02-0,45 мкг/мл при концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), с увеличением СЗ возрастает противовирусная активность образцов, наиболее выраженной противовирусной активностью обладают сульфатированные единицы с β -структурами по сравнению с α -структурами;

синтезированы анионпроизводные полисахаридов, обладающие наименьшей антикоагулирующей активностью. Последнее достигнуто синтезом сульфатированных полисахаридов, которые содержат сульфатные группы во 2 и 6 углеродных атомах ангидрогексозного звена;

впервые методом компьютерного моделирования доказано действие анионпроизводных полисахаридов на рецепторные участки патогенов, приводящих к ингибированию их действия на здоровые клетки организма, между модельными

структурами гликопротеинов мультирезистентных бактерий (*P. Aeruginosa*, *E.coli*), вирусов (гепатит С, лейкемия, ВИЧ-1) и сульфатированными моносахаридами (гексозы), а также модифицированными полисахаридами установлена возможность образования интерполимерных комплексов, что доказано в эксперименте в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Практические результаты исследования состоят в следующем:

по результатам работы впервые определены возможности создания новых эффективных и малотоксичных противовирусных (против вирусов герпеса, гепатита С, ВИЧ), антибактериальных (против уропатогенных и послеоперационных раневых инфекций) и гепариноподобных препаратов, оказывающих антитромботическое и противовоспалительное действие на основе анионпроизводных полисахаридов. Были даны рекомендации по разработке антибактериальных и противовирусных препаратов наружного применения на основе сульфатпроизводных полисахаридов;

получен гель «Бактоцел», содержащий сульфатированный полисахарид, определены его антибактериальное и ранозаживляющее действия. Показано, что «Бактоцел» обладает ранозаживляющим действием и сокращает на 6-12 дней время очищения и заживления инфицированных ран. Сравнительный анализ действия с мазью «Левомеколь» показал, что наибольшее антибактериальное против стафилококка (*S. aureus*) и ранозаживляющее действие проявляется у геля «Бактоцел»;

разработана мягкая лекарственная форма на гелевой основе «Сульфогель», обладающая антикоагулянтным действием. Проведены доклинические испытания субстанции трисульфата целлюлозы и лекформы «Сульфогель». Изучены физико-химические и биологические свойства сульфат целлюлозы (антимикробные, противовирусные свойства, токсичность, антикоагулянтная активность в условиях *in vitro* и *in vivo*), разработаны методы стандартизации субстанции и готовых лекарственных форм. Установлено, что трисульфат целлюлозы увеличивает время свертывания крови в 3-15 раз. Антикоагулянтная активность «Сульфогель» изучена в сравнении с гепариновой мазью.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что они получены с применением современных физико-химических методов исследований. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи критерия Стьюдента с вычислением граничных значений доверительного интервала средних значений. Подтверждением полученных результатов служат экспертные оценки специалистов, практическая реализация результатов исследований, обсуждение результатов исследований на республиканских и международных научных конференциях, публикация результатов исследований в рецензируемых научных изданиях с высоким импакт-фактором и получение патентов.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость полученных результатов исследований заключается в целенаправленном синтезе анионпроизводных полисахаридов (сульфат, фосфат, карбоксил и других) с заданной структурой и широким их химическом и медико-биологическом исследовании, а также в установлении возможности создания на их основе антибактериальных и противовирусных препаратов, действующих непосредственно на рецепторные участки патогенов, с дальнейшим ингибированием их действия на здоровые клетки. Разработанные методы выделения водо- и щелочно-растворимых полисахаридов, их модификация, установление структуры физико-химическими методами позволили развить данное направление биоорганической химии и решать конкретные задачи по созданию макромолекулярных систем на основе полисахаридов, обладающих противовирусной и антибактериальной активностью. Результаты диссертационной работы также имеют значение в проведении новых научных исследований в области химии полисахаридов в высших учебных заведениях Республики Узбекистан.

Практическая значимость результатов исследований диссертационной работы заключается в разработке оригинальных антибактериальных препаратов наружного применения «Бактоцел» (ранозаживляющее и антибактериальное средство), «Сульфогель» (для лечения варикозного расширения вен и отеков), а также в возможности в дальнейшем создания системных антибактериальных и противовирусных препаратов.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов по биоселективные макромолекулярные системы антибактериального и противовирусного действия на основе сульфатпроизводных полисахаридов:

получен патент на изобретение агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан «Ингибитор вируса табачной мозаики на листьях растений» (12.10.2010, № IAP 04603). Результаты научных исследований дали возможность разработать препараты, применяемые против патогенов сельскохозяйственных культур и в медицине;

разработанные условия проведения систематической модификации полисахаридов в системе автоматического непрерывного контроля реакций полимеризации (АСОМР) позволили впервые успешно внедрить систему АСОМР для непрерывного мониторинга реакций модификации естественных продуктов, а также разработать и внедрить новую систему для одновременного измерения объемной вязкости, молекулярно-массовых и ионно-концентрационных параметров (электропроводность и pH значения) системы при рециркуляционной АСОМР конфигурации (справка Тулейнского университета, Новый Орлеан, США, от 3 ноября 2016 года). Это является значительным мировым достижением, поскольку мониторинг реакции модификации полисахаридов является первым шагом при контроле процесса модификации природных продуктов, биополимеров;

разработанные методы модификации использованы при получении селективно замещенных производных сульфат полисахаридов (справка Университета Кумамото от 15 ноября 2016 года, Япония). Это дало возможность разработать полимерные антибактериальные композиции против мультирезистентных бактерий *St. aureus*, *St. epidermides*, *E. coli* (LN) и *Klebsiella*;

по результатам надмолекулярной структуры и антикоагуляционной активности сульфатпроизводных полисахаридов использованы более 80 зарубежных журналов с высоким импакт-фактором (JIF) для физико-химического и фармакологического анализа образцов (*Acta biomaterialia*, 2010, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 6,32; *Bioresource Technology*, 2009, V.4, №2, Journal Impact Factor, IF 5,65; *Biomacromolecules*, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 5,25; *Carbohydrate polymers*, 2012, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 4,81; *Food Hydrocolloids*, 2014, V.35, №2, Journal Impact Factor, IF 4,75; *Langmuir*, 2013, V.12, №2, Journal Impact Factor, IF 3,83; *Polymer*, 2011, V.1, №2, Journal Impact Factor, IF 3,68; *Phytomedicine*, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 3,53; *Cellulose*, 2010, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 3,42). Применение научных результатов дало возможность

охарактеризовать молекулярные и фармакологические свойства эфиров полисахаридов.

Апробация результатов работы. Результаты исследования диссертационной работы прошли апробацию на 12 международных и 16 республиканских научно-практических конференциях.

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 76 научных работ. Из них 14 научных статей, в том числе 4 в зарубежных журналах и 10 в республиканских научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций, получен 1 патент и подана 1 заявка на патентование.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 191 страница.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность и востребованность проведенных научных исследований, соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, сформулированы цель и задачи, приведен обзор международных научных исследований по теме диссертации, определена степень изученности проблемы, ее научная новизна, обоснована достоверность полученных результатов, предложено их внедрение, а также изложены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Антимикробная и противовирусная активность биологически активных полисахаридов, с протеогликаноподобной структурой**» приведен обзор литературы, посвященной анализу литературных данных по изучению полисахаридов, имеющих полианионную структуру, и их взаимодействия с патогенами, проводимых многими ведущими научными центрами мира. По результатам этих исследований установлено, что сульфатпроизводные полисахаридов обладают антибактериальной и противовирусной, в частности против ВИЧ, активностями. Литературные источники (в основном патенты фирм и компаний) по изучению ингибирования вирусов и микробов с помощью веществ, подобно протеогликанам, показывают потенциальные перспективы данного направления в создании эффективных противовирусных и антибактериальных препаратов.

В мировой литературе отсутствуют систематические исследования, позволяющие установить закономерности влияния химической природы макромолекулярной основы, длины макромолекулы (молекулярной массы), содержания анионных групп, в частности сульфатных групп, их расположения в ангидрогексозном звене (во втором, третьем и шестом

углеродных атомах) и других параметров на антимикробную и противовирусную активности.

В связи с этим важной проблемой является целенаправленный синтез модифицированных полисахаридов с заранее заданной, наиболее комплементарной к гликопротеинам в оболочках патогена, структурой и изучение их специфической активности. На основе обзора сделан вывод о выборе объекта для данной работы.

Во второй главе диссертации **«Выделение и модификация полисахаридов с целью создания полианионной структуры»** обсуждены результаты направленного синтеза модифицированных полисахаридов полианионной природы, включая сульфатирование и фосфорилирование полисахаридов прямыми и избирательными методами модификации, изучение их физико-химических свойств и молекулярных параметров, изучение влияния расположения сульфатных групп на стабильность их макромолекулы.

Объектом исследования послужили целлюлоза, амилоза, полигалактуроновая кислота, галактоманнан. Выбор этих полисахаридов связан непосредственно с их строением. Данные полисахариды относятся к линейным полимерам растительного происхождения, что, в свою очередь, обеспечивает легкость при их анализе по сравнению с разветвленными полисахаридами, а также доступность исходного сырья для синтеза сульфатпроизводных. Также интересно было посмотреть влияние их молекулярной структуры и конфигурации гликозидной связи на проявляемые свойства.

Методами холодной и горячей экстракций из *Софоры японской* (лат. *Styphnolobium japonicum*) и *Гледичии обыкновенной* (лат. *Gleditsia triacanthos*) были выделены галактоманнаны (SJ и GT, соответственно), определены их физико-химические свойства (таб. 1). Определена относительная вязкость и молекулярная масса полученных образцов.

Галактоманнаны были подвергнуты ферментативному гидролизу. Ферментативный гидролиз проводили при pH 7.5 и температуре 40°C в присутствии фермента α -галактозидазы. Характеристическая вязкость исходного и гидролизованного полигалактоманнана составила 4,85 дл/г и 3,80 дл/г, соответственно. Молекулярная масса после обработки ферментом полигалактоманнана изменилась в пределе 95600-26200.

Таблица 1

Физико-химические свойства образцов галактоманнана

Препарат галактоманнан	Выход, %	Соотношение Ман:Гал	$[\eta]$, дл/г	Молекулярная масса, Да
SJ-1	9,8	1,82:1	9,46	840786
SJ-2	35,2	2,3:1	11,09	1048516
GT-1	7,5	2,1:1	8,78	758037
GT-2	43,6	2,5:1	9,23	812529

Молекулярная масса галактоманнана определена по формуле Марка-Хаувинка, где: $K = 5.13 \times 10^{-4}$; $a = 0.72$.

^{13}C -ЯМР анализы исходного и гидролизованного полигалактоманнана показали существенное изменение в соотношении галактозы:маннозы 1:2,82 и 1:5, соответственно. Сигналы аномерных протонов при δ 5.01 и 4.73 были отнесены к H-1 α -D-галактозы (G) и β -D-маннозы (M), соответственно. Соотношение M:G может быть получено непосредственно из относительных областей аномерных сигналов; получено значение M:G, равное 1,82. Это значение соответствует полученному для образца SJ-1 показателю методом газ-хроматографии (1,84). ^{13}C -ЯМР-анализ дает хорошо разрешенный спектр, для которого присваивания были легко идентифицированы. Аномерная область ^{13}C -ЯМР (δ 90-110) показывает два сигнала, которые были назначены как C-1 α -D -галактозы при δ 99,59 и C-1 β -D -маннозы при δ 100,7.

Водорастворимый галактоманнан также был получен из гуаровой камеди путем гидролитического расщепления. В таблице 2 приведены условия гидролитического расщепления гуаровой камеди.

Как видно из таблицы 2, с увеличением концентрации кислоты и продолжительности гидролиза уменьшается ММ ГМ. Скорость гидролиза в начальной стадии реакции высокая, а далее уменьшается. Это объясняется тем, что в начальной стадии в реакцию вступают более доступные участки макромолекулы ГМ.

Таблица 2

Зависимость ММ ГМ от соотношения реагентов и продолжительности гидролиза
($t=82^\circ\text{C}$, модуль системы 1:11, $[\eta]$ -измеряли при $20\pm 0,1^\circ$)

Время гидролиза, мин.	Мольное соотношение ГМ:НСI	$[\eta]$ (дл/г)	ММ*	ММР, Mw/Mn	Выход, %
Гидролиз в водных средах					
ГВС-15	1:1,5	3,427	253031	1,491	83
ГВ С-30	1:1,5	1,431	76766	1,502	64,4
ГВ С-60	1:1,5	1,170	58256	1,816	48,86
ГВС-90	1:1,5	0,886	39877	1,664	33,36
ГВС-120	1:1,5	0,545	20534	2,035	17,18
Гидролиз в среде этанола					
ГОС-15	1:1,5	2,125	131744	1,54	88
ГО С-30	1:1,5	1,909	113789	1,589	76,3
ГО С-60	1:1,5	1,717	98441	1,517	62
ГОС-90	1:1,5	1,506	82273	1,379	46,5
ГОС-120	1:1,5	1,213	61217	1,380	34,8

*Молекулярная масса галактоманнана определена по формуле Марка-Хаувинка, где:
 $K = 3.8 \times 10^{-4}$; $\alpha = 0.732$.

Также установлено, что на характеристику получаемого ГМ влияет среда реакции, в частности, при проведении гидролиза в среде этанола полученный ГМ является более однородным, т.е. обладает узким молекулярно-массовым распределением (ММР), что имеет важное значение при получении макромолекулярных лекарственных средств. Модификация макромолекул полисахаридов (целлюлозы, галактоманнана) различными методами сульфатирования, при которых возможно регулирование

расположения сульфогрупп в β -D-гексозных циклах в процессе этерифицирования, позволит направленно формировать молекулярное строение сульфата целлюлозы, что, в конечном итоге, создаст возможность получить вещества с заданным комплексом свойств.

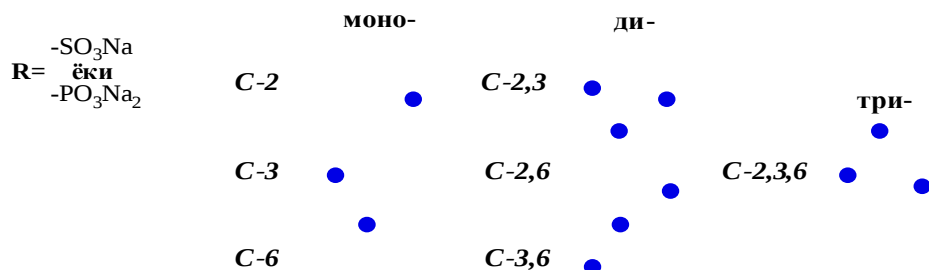
Исследована реакция сульфатирования целлюлозы в смеси серной кислоты с этиловым спиртом (бинарная система) при соотношении 2:1-3:1, в среде предельных углеводов (суспензионный метод) (модуль реакции 4-5 мл/гр) без активации и методом двухступенчатой активации – сначала в воде, а затем в этиловом спирте.

Установлено, что при проведении реакции в смеси серная кислота: этиловый спирт, степень полимеризации (СП) СЦ (СЗ равна 0,23) снижается со значения 1400 (для исходной хлопковой целлюлозы) до значения 110 при реакции с предварительной активацией целлюлозы. Тогда как, проведение реакции в среде предельных углеводов приводит к значению СП СЦ (СЗ равна 0,24) 440. Последнее обусловлено тем, что предельные углеводороды - инертный разбавитель, который обеспечивает наиболее равномерное проникновение сульфатирующего агента вглубь толщи целлюлозного материала (что доказано структурными исследованиями), при этом сульфатирующий агент расходуется для прямой реакции.

Изучена зависимость изменения СП СЦ от СЗ в реакции сульфатирования целлюлозы путем предварительной двухступенчатой активации, в среде предельных углеводов. При этом наибольшая СП наблюдается в случае сульфатирования хлопкового линта. Самая низкая СП, как и следовало ожидать, наблюдается при сульфатировании МКЦ. Уменьшение СП со СЗ в случае хлопкового линта объясняется большим содержанием в нем аморфных участков. Тогда как, в случае реакции сульфатирования хлопковой и древесной целлюлозы до СЗ 0,7 -0,9 СП изменяется незначительно, т.е. в этом пределе идет в основном реакция сульфатирования. Такое различие в реакции сульфатирования целлюлозы различного происхождения обусловлено их структурными особенностями. Установлено, что сульфатирование целлюлозы серной кислотой даже при предварительной активации целлюлозы, приводит к СЦ со СП 25-600 и СЗ 0,10-1,10.

С целью получения СЦ с более высокими значениями СЗ и СП исследовано сульфатирование хлопковой целлюлозы комплексом хлорсульфоновая кислота (ХСК) - пиридин. При этом пиридин обеспечивает активацию целлюлозы, связывает ХСК в виде комплекса, высвобождая сульфатирующий агент в ходе синтеза, и нейтрализует кислотную форму СЦ, связывает выделяющуюся соляную кислоту. Проведение реакции сульфатирования комплексом ХСК - пиридин позволяет получать СЦ со СП 150-800 и СЗ 1,0-2,8. Достижение такого эффекта обусловлено влиянием природы сульфатирующего агента. При сульфатировании целлюлозы комплексом ХСК-пиридин замещается SO_3Cl , выделяющийся хлористый водород моментально связывается с пиридином и протекание побочной реакции деструкции намного затормаживается.

При сульфатировании примененными методами формируются композиционно-неоднородные макромолекулы с неравномерно распределенными сульфатными группами, которые могут содержать и сульфатированные и несulfатированные ангидрогексозные единицы (АГЕ). Кроме этого, среди сульфатированных АГЕ могут быть различные (моно-, ди-, три-) замещенные единицы:



Методом газовой хроматографии изучено распределение сульфатных групп в АГЕ макромолекулярных матриц Na-СЦ. Показано, что при бинарном способе сульфатирования с предварительной активацией предпочтительней происходит замещение 6 атома углерода (рис.1.), распределение заместителей происходит согласно схеме: C-6 >> 2,6 >> 3,6 = 2,3,6 = 2,3 (65,10,4% соответственно).

При сульфатировании образцов бинарной системой без предварительной активации распределение заместителей происходит следующим образом: C-6 > 2,6 >> 3,6 >> 2,3,6 (62, 15, 5, 6% соответственно). Получение сульфатпроизводных образцов суспензионным способом приводит к следующему распределению заместителей: C-6 > 2,6 = 2,3,6 = 3,6, а при сульфатировании целлюлозы комплексом пиридин - HSO_3Cl получают тризамещенные образцы со СЗ больше 1.5. При предварительной активации СЗ возрастает. Распределение сернокислых групп происходит соответственно C-2,3,6 >> C-2 > C-6 = C-2,6 = C-3,6.

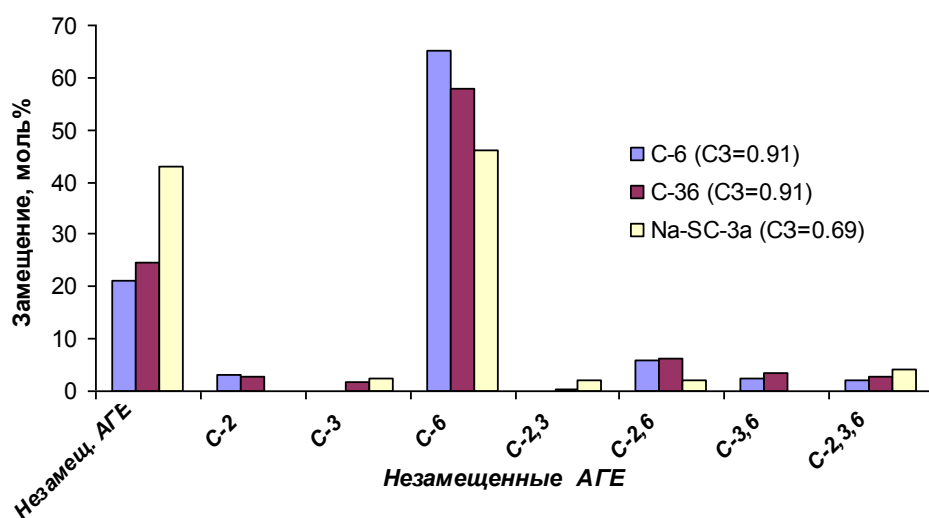


Рис. 1. Анализ СЦ, синтезируемых бинарной системой, на основе неактивированной целлюлозы методом газ-хроматографии

При избирательном сульфатировании использовали трифторацетатные группы в качестве протекторов ОН-групп. При этом замещение происходит преимущественно у 3-го углеродного атома (87,2%). Замещение гидроксильных групп происходит по схеме: C-3>> C-6> C-2> C-3,6> C-2,3> = C-2,6> C-2,3,6.

Для избирательного сульфатирования у C-6 использовали смешанный сложный эфир сульфоацетат целлюлозы, при этом продолжительность этерификации составляла более 8 часов, для получения образцов со СЗ 0,91, у которых сульфатные группы расположены в основном при 6-ом углеродном атоме АГЕ (89,2%).

Осуществление процесса фосфатирования полисахаридов приводит к получению новых биологически активных веществ анионной природы.

Фосфатирование проводили с использованием хлопковой целлюлозы и микрокристаллической целлюлозы (степень кристалличности 0,62 и 0,75, соответственно) обработкой 35%-м раствором H_3PO_4 в течение 24 часов. Также фосфатирование осуществляли разбавленным раствором H_3PO_4 (20,5%) со смесью мочевины (при мольном соотношении 1:6,5) и последующей термообработкой в течение 120 минут, промывкой и сушкой на воздухе. Степень замещения была определена по элементному составу продукта на С,Н,Р,О и N. При проведении фосфатирования полисахаридов (1) производными фосфора (V) в гетерогенных условиях были получены образцы с низкой степенью замещения ($\text{СЗ}_p = 0,25-0,75$); (2) так как реакционная способность соединений фосфора (III) выше, чем у производных фосфора (V), в присутствии фосфористой кислоты (H_3PO_3) получены образцы с наиболее высокими СЗ ($\text{СЗ}_p = 1,1$ и 2.42) путем предварительной обработки нативного полисахарида (целлюлозы) водой с изопропиловым спиртом. В качестве альтернативы фосфатирование целлюлозы проводилось с использованием микроволнового реактора Anton Parr monowave 300, снабженного автосамплером, способным загружать 20 мл герметизируемого миниреактора и выдерживать давление в пределах 30 бар. Микрокристаллическую целлюлозу (0,583 г, 3,6 ммоль) смешали со смесью мочевины (3,48 г, 58,0 ммоль) и фосфористой кислоты (2,88 г, 35,2 ммоль) магнитной мешалкой. Микроволновый режим устанавливался на автоматическом цикле, включающем: а) нагревание до желаемой температуры и давления (обычно менее 1 мин) при перемешивании 450 об/мин, б) реакцию (0,5 - 120 мин, перемешивание 450 об / мин) в) быстрое охлаждение с использованием сжатого азота (менее 2 мин). Полученный продукт нейтрализовали насыщенным раствором NaOH в этаноле и трижды промывали 96% этанолом. Остаток этанола удаляли при пониженном давлении перед анализом. Установлено, что при получении фосфата целлюлозы традиционными способами даже при трехкратном повторении процесса, содержание фосфора в ткани обычно не превышает 4,0 мас. %, что обусловлено нерастворимостью целлюлозы и ее ограниченной набухаемостью в разбавленной фосфорной кислоте.

Анализ полученных результатов показал, что содержание фосфора в модифицированной целлюлозе, прошедшей стадию активации, при прочих равных условиях этерификации, в 1,42-1,5 раза выше, чем у фосфата целлюлозы, полученного на основе целлюлозы без предварительной обработки. Максимальное содержание фосфора (13,2- 15,8 мас. % фосфора) наблюдается у образцов, синтезируемых с температурой фосфатирования 105-150°C, временем обработки 90-120 минут, что, вероятно, связано с возрастанием скорости ее реакции, уменьшением стерических препятствий при проникновении этерифицирующего агента к реакционно-активным группам полисахарида, а также с участием микроволнового воздействия.

Таблица 3

Молекулярные характеристики некоторых производных сульфатов целлюлозы, представленных на испытания их биологической активности

Образцы	Модифицирование	СЗ	СП	ММ	Шифр
Моносульфаты	прямое	0,58	230	50830	МСЦ-1
	прямое	0,90	197	50176	МСЦ-2
	селективное	0,78	65	15700	СЦ-О(3)
	селективное	0,86	86	21476	СЦ-О(2)
	селективное	0,98	128	33550	СЦ-О(6)
Дисульфаты	прямое	1,50	216	68364	ДСЦ-1
	прямое	1,80	225	78165	ДСЦ-2
	прямое	2,00	75	25760	ДСЦ-3
	селективное	1,33	147	43756	СЦ-О(2,3)
Трисульфаты	прямое	2,10	228	86184	ТСЦ-1
	прямое	2,12	400	152000	ТСЦ-2
	прямое	2,15	571	216000	ТСЦ-3
	прямое	2,23	40	16000	ТСЦ-4
	прямое	2,24	340	133280	ТСЦ-5
	прямое	2,25	124	48732	ТСЦ-6
	прямое	2,27	220	87120	ТСЦ-7
	прямое	2,37	496	201376	ТСЦ-8
	прямое	2,98	211	98895	ТСЦ-9
	прямое	2,90	230	105300	ТСЦ-10
	прямое	2,98	360	167750	ТСЦ-11

Как видно из таблицы 3, получены производные сульфатов целлюлозы, имеющие различную молекулярную массу и содержание сульфатных групп.

Структура полученных образцов изучалась методами ИК-, ЯМР-спектроскопий, элементарным анализом. При реакции сульфатирования некоторые специфические области поглощения ИК-спектроскопии макромолекул целлюлозы резко сокращаются, а другие увеличиваются, также наблюдаются новые полосы сильной интенсивности при 590-600, 800, 1220-1240 см⁻¹, которые относятся к сульфатированным эфирам.

Синтезированные образцы полисахаридов исследованы ¹³С-ЯМР-спектроскопией в D₂O. В спектрограмме наблюдаются химические сдвиги С1-С6 при 102, 73,2, 74,6, 79,2, 77,3, и 61,0 м.д., соответственно. С6 поглощение Na-СЦ появляется сдвигом относительного сигнала от 61,0 до

67,0, указывающего на замещение ОН-группы у шестого углеродного атома (С6'). Видно, что у высокозамещенных образцов Na-СЦ все ОН-группы у шестого атома углерода С6 подвергаются этерификации (С6'). Химические сдвиги при 81,5 и 77,1 м.д. показывают, что замещение сульфатными группами происходит в С2' и С3' положениях (рис.2).

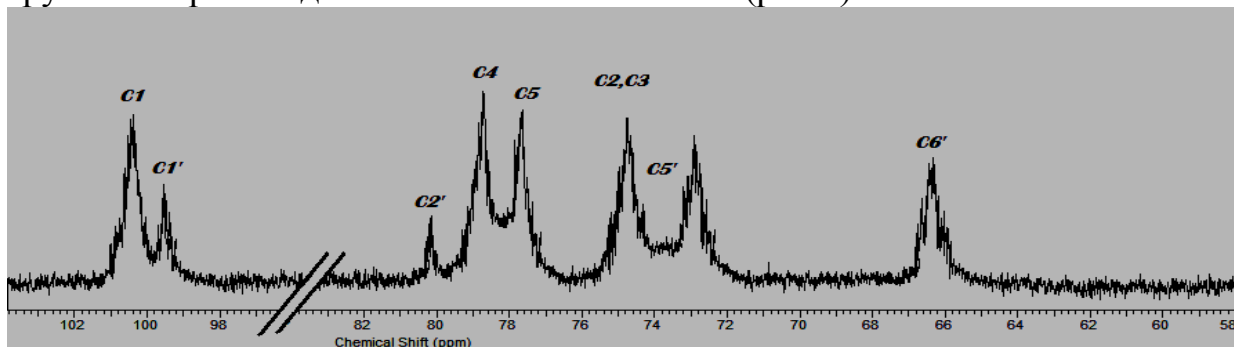


Рис. 2. ЯМР-спектроскопия полученных образцов СЦ со СЗ 2.6

Изучение влияния расположения сернокислых групп в АГЕ на стабильность макромолекулы показало, что наиболее устойчивыми были образцы, содержащие в основном С-2 замещенные группы среди монозамещенных и С-2,6 среди дизамещенных производных. И самыми нестабильными являются образцы, имеющие замещенные сульфатные группы в основном в С-3 положении. Результаты указывают на то, что замещение в свободных ОН – группах, которые принимают участие при образовании меж- и внутримолекулярных водородных связей, может увеличивать стабильность макромолекулы. Например, ОН-группы в С-3 и С-6 положениях принимают участие в создании водородных связей, и их полное замещение сернокислыми группами С-2,3,6 делает макромолекулу более стабильной. Наоборот, в случае частичного замещения гидроксильных групп происходит отщепление эфирных групп в присутствии соседних транс гидроксильных групп (при С-3 и С-6: С-3, С-6 и С-2,3). В качестве доказательства, мы сравнивали стабильность синтезированных Na-СЦ с дисульфатом полигалактуроната (С-2,3-СПГК) для того, чтобы проверить, насколько верно, что сернокислые группы являются расщепляемыми при сульфатировании одной ОН-группы из трех, несмотря на позицию заместителя в АГЕ. Результаты показали, что стабильность сульфатированных полигалактуронатов подобна С-2,3 сульфатированным целлюлозам, и они являются более устойчивыми, чем однозамещенные производные сульфата целлюлозы.

В третьей главе **«Медико-биологические свойства модифицированных полисахаридов полианионной природы»** обсуждены полученные данные по определению специфической активности синтезированных сложных эфиров полисахаридов.

Токсикологические исследования анионпроизводных полисахаридов проведены в лаборатории фармакологии Института биоорганической химии АН РУз. Опыты проводили на белых мышах, крысах; изучали острую токсичность, местно- и кожно-раздражающие, аллергизирующие и

кумулятивные свойства. Установлено, что LD_{50} во всех препаратах всегда >2000 мг/кг, для крыс - более 4000 мг/кг, что позволяет отнести их к классу малотоксичных веществ (ГОСТ 12.1007-76). Установлено, что с повышением СП и СЗ токсичность образцов СЦ понижается. Данные по изучению алергизирующего действия СЦ показали, что препарат не вызывал признаков воспаления и высыпаний аллергического характера. Следовательно, СЦ не обладает алергизирующим действием. Проведенные опыты позволяют сделать вывод об отсутствии кумулятивного действия у СЦ.

Были изучены антикоагулянтная активность сульфатов полисахаридов и влияние природы их макромолекулы и молекулярных параметров на проявляемую ими активность. Изучение антикоагулянтной активности препаратов сульфатов полисахаридов было проведено в опытах *in vitro*. Исследования проводили с применением калибровочной кривой на низкий уровень антикоагулянта $1,54 \cdot 10^{-4}$ - $7,7 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (0,02-0,10 ЕД) и на высокий $7,7 \cdot 10^{-4}$ - $4 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (0,1-0,6 ЕД). Наибольший эффект при этой концентрации препаратов наблюдали у гепарина и образцов ТСЦ, где время свертывания крови увеличивалось в 4 раза и более по отношению к контролю, в который добавляли 0,9% физ. раствор.

Как видно из результатов теста тромбинового времени, гепарин, образцы ТСЦ, ДСЦ и СА проявляли максимальный эффект в концентрации $4,6 \cdot 10^{-3}$ мг/мл (более 300 сек), остальные образцы также увеличивали тромбиновое время (ТВ) в 2-4 раза по отношению к контролю (рис.3).

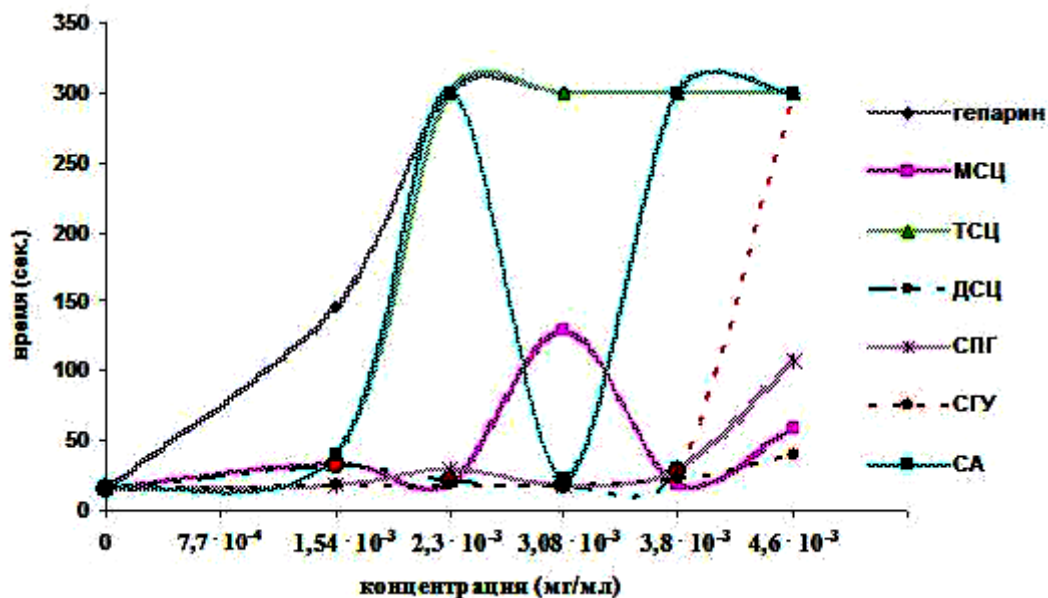


Рис. 3. Влияние образцов сульфатированных полисахаридов на ТВ в различных концентрациях на кровь кроликов *in vitro*

Показано, что в тесте АЧТВ полимеры, имеющие линейное строение, показали более чем в два раза лучшую активность по сравнению с полимером, имеющим разветвленное строение. Наиболее активными образцами среди сульфатов целлюлозы оказались дисульфат со $СЗ=2,0$ и с расположением сульфатных групп у 2-,3-го углеродных атомов и трисульфат

со СЗ=2,84. В то же время, для полисахаридов с гликозидной связью (1→4) наличие или отсутствие сульфата при С-6 никак не влияло на проявление ими активности. Следовательно, присутствие сульфатных групп в полисахаридах может увеличивать их специфическое и неспецифическое связывание с широким кругом биологически важных протеинов. Важную роль в этих взаимодействиях играет как структура макромолекулы полисахарида, так и, возможно, ее конформация в растворе.

Изучены иммуномодулирующие свойства образцов сульфатированных полисахаридов: сульфат целлюлозы с молекулярной массой 550 кДа, степенью замещения по сульфатным группам 2,98 (Na-СЦ) вводили в дозе 25,0 мг/кг внутрижелудочно однократно в день иммунизации ЭБ, сульфат сахарозы (Na-СС) вводили в дозе 25,0 мг/кг внутрижелудочно однократно в день иммунизации ЭБ.

У животных, получавших препарат Na-СС, иммунный ответ к ЭБ достоверно повышается в 1,60 раза: количество АОК в селезенках равно $20200,0 \pm 1797,0$. В селезенках мышей, получавших препарат Na-СЦ, образуется $17183,3 \pm 1067,2$ АОК, что в 1,36 раза достоверно выше контроля.

Таблица 4

Влияние препаратов на количество клеток в нейтральных и периферических органах иммунитета у мышей ($M \pm m$, $n=6$)

Группа	Доза препарата, мг/кг	Клетки тимуса $\times 10^6$	ИС	Клетки костного мозга $\times 10^6$	ИС	Клетки лимф. узлов $\times 10^6$	ИС
Контроль	-	$34,3 \pm 2,0$	-	$12,7 \pm 0,6$	-	$27,7 \pm 2,5$	-
Na-СС	25,0	$44,3 \pm 2,6^*$	+1,29	$15,5 \pm 0,6^*$	+1,22	$36,6 \pm 3,3$	+1,32
Na-СЦ	25,0	$42,9 \pm 2,5^*$	+1,25	$15,3 \pm 0,4^*$	+1,20	$35,2 \pm 3,2$	+1,27

Было изучено влияние препаратов на общее количество клеток в центральных и периферических органах иммунитета (таб. 4).

У животных, получавших препарат Na-СС, число костномозговых клеток достоверно повышается в 1,22 раза ($15,5 \pm 0,6 \times 10^6$), препарат Na-СЦ - в 1,20 раза ($15,3 \pm 0,4 \times 10^6$). На основании полученных результатов можно заключить, что сульфатированные полисахариды обладают способностью оказывать стимулирующий эффект на центральные (тимус, костный мозг) органы иммунитета.

Исследована антимикробная активность сульфат полисахаридов против различных патогенных микробов. Определение чувствительности микробов к образцам производилось методом бумажных дисков. Результаты показали, что образец ТСЦ-7 является высокобактерицидным в отношении как грамположительным коккам, так и грамотрицательным палочкам. Образец ТСЦ-2 обладает высокой антибактериальной активностью по отношению к: *Klebsiella*, *E.coli*, *Streptococcus*, хотя в повышенной концентрации действует и на *Staphylococcus* и *Proteus mirabilis*. Исходя из этого, очевидно, что образец будет эффективен для лечения гнойно-воспалительных инфекций и эшерихиозов. Образец ТСЦ-8 оказывает существенное воздействие на: клебсиеллы, все виды кокков, на эшерихии и *Proteus mirabilis*. Хотя следует

отметить, что образец действует на грибы и синегнойную палочку. Следует учесть, что к ТСЦ-9 чувствительны как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы. Из этого можно предположить, что этот образец можно широко использовать для лечения гнойно-воспалительных болезней и эшерихиозов; он особенно эффективен при клебсиеллезных заболеваниях.

Далее, исходя из молекулярных параметров исследуемых образцов СЦ, изучена взаимосвязь «структура – свойства». Установлено, что препараты со СЗ до 2.0 и почти одинаковой СП, действуют незначительно на рост микробов. При СЗ в пределе 2,0 можно увидеть значительное повышение активности этих образцов. А после СЗ 2.2 эти увеличения изменяются незначительно. Эти данные действительно подтверждают предположение о том, что биологическая активность сульфатированных полисахаридов появляется, когда замещаются гидроксильные группы в С-2 и С-3 положениях в АГЕ. Также изучено влияние молекулярно-массовых параметров (СП) образцов на их биологическую активность. Интересно, что и в этом случае наблюдается аналогичное изменение биологической активности. При увеличении СП образцов до 320 - 340 наблюдается постепенное увеличение биологической активности, а при дальнейшем увеличении СП биологическая активность СЦ практически не изменяется или изменяется незначительно.

На основании результатов изучения чувствительности микробов к производным СЦ, можно заключить, что молекулярные параметры СЦ играют важную роль в определении их активности. Образцы СЦ с высокой ММ (> 200000) показывают меньшую активность по сравнению с препаратами, обладающими более низкой ММ. Также выявлено, что активность может зависеть от особенностей структуры микроорганизма. Например, образцы СЦ (ТСЦ-8 и ТСЦ-9) со средней и высокой молекулярной массой показали большую активность против *E-coli* и кокков по сравнению с более низкомолекулярным СЦ (ТСЦ-6). Влияние СЦ на *Proteus mirabilis* показывает, что активность препаратов до определенной ММ увеличивается и при определенном значении ММ (ТСЦ-1, СП=228), активность не меняется.

Также исследовано влияние избирательно сульфатированных полисахаридов на их антимикробную активность, против различных патогенных микробов.

Результаты показали, что СЦ, замещенные во 2 и 3 углеродных атомах (СЦ-С(2,3)), оказывают более выраженное антимикробное действие против всех видов эшерихий и клебсиелл. При высоких концентрациях, препарат оказывает антимикробное действие на все виды микробов. Образец С-6 проявляет активность на все виды эшерихий, стафилококка, стрептококка, как при больших концентрациях, так и при малых. Образец СЦ-С(3) при малых концентрациях оказывает слабое влияние на штаммы эшерихий, протей, стрептококков. Образец СЦ-С(2) оказывает слабое влияние на изучаемые штаммы микробов, хотя следует отметить, что даже при малых

концентрациях оказывает воздействие на культуры стафилококков и эшерихий. Образец СПГМ обладает антимикробной активностью ко всем видам микробов, хотя на клебсиеллу действует только при высоких концентрациях. Образец SGK, так же как и предыдущий образец, обладает выраженным действием на все патогенные микробы. Образец сульфата амилозы (СА) не показал никакой активности на штаммы микробов, при высокой концентрации он оказывает незначительное влияние только на эшерихий ЛН и протеи. Образец ПЕК незначительно влияет только на эшерихий, протеи и псевдомонас, на другие виды микробов он не оказывает действия. Образец СЦ-ТАЦ оказывает незначительное влияние почти на все группы микробов, но совсем не действует на стрептококк и дифтерий.

Далее, исходя из молекулярных параметров исследуемых образцов избирательно сульфатированных СЦ, изучена взаимосвязь «структура – свойства» (рис.4 и 5). Как видно из рисунка 4, образцы избирательно сульфатированной целлюлозы оказывают заметное влияние на представителей грамположительных бактерий. На эти бактерии влияют не только тризамещенные сульфатпроизводные целлюлозы, но также на этом же уровне действуют образцы, имеющие сульфатные группы в С-6 и С-2,3 положениях, а самую низкую активность показывают образцы, имеющие сульфатные группы у 3-го и 2,6-го углеродных атомов. В случае грамотрицательных (лактоза - негативных) бактерий влияние расположения сульфатных групп в АГЕ звене более выражено, в данном случае бактерии более чувствительны на тризамещенные производные сульфатов полисахаридов. В свою очередь, наибольшую активность проявляют С-6 и С-2,3 образцы сульфатов полисахаридов, тогда как, С-2, С-3 и С-2,6 образцы проявляют самую низкую активность (рис. 5).



Рис.4. Влияние расположения сульфатных групп в АГЕ на грамположительные бактерии

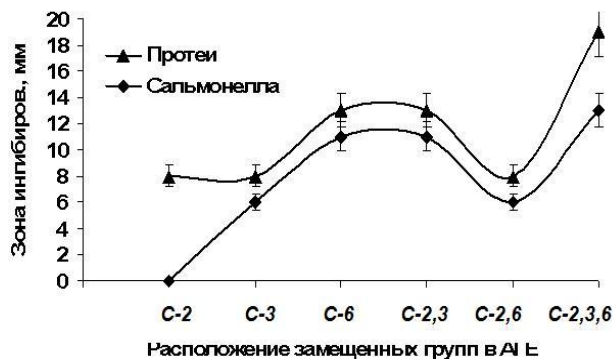


Рис.5. Влияние расположения сульфатных групп в АГЕ на грамотрицательные (лактоза - негативные) бактерии

Полученные сульфатпроизводные полисахаридов с определенными молекулярными параметрами проверены на цитотоксичность и антигепатитную активность *in vitro*. Образцы с более высокой молекулярной массой и степенью этерификации показывают высокую биологическую активность против вируса гепатита, хотя активность зависит больше от молекулярной массы образцов, чем от их сульфат содержания. Сравнение

полученных результатов биологической активности образцов позволяет оценивать их терапевтический эффект (ТЭ).

Терапевтическая эффективность сульфатов целлюлозы, имеющих высокую ММ (СП≈600), намного больше, чем других – 1066 (СС₅₀=35,17 и IC₅₀=83,33%), хотя активность, например, госсипола больше (IC₅₀=99,22%), его терапевтическая эффективность составляет только 3 из-за его очень высокой токсичности (СС₅₀=18,8).

Образцы сульфата целлюлозы со СЗ 2.0 и степенью полимеризации более 370 оказывают широкий спектр действия. Это означает появление и увеличение количества биологически активных -SO₃Na групп на поверхности макромолекулы (рис. 6 и 7). Эти данные доказывают предположение о возможном появлении и увеличении биологической активности (гепариноподобность) с замещением ОН-групп на сульфатные группы в С-2 и С-3 атомах в ангидрогексозной единице, а замещение только в С-6 атоме не влияет на проявление биологической активности.

Была разработана система скрининга потенциальных ингибиторов, препятствующих взаимодействию простых и сложных ретровирусов с первичными клеточными рецепторами на поверхности заражаемых клеток, что предотвращает заражение чувствительных клеток-мишеней. Побудительной основой для создания этой системы послужили результаты, свидетельствующие о том, что первичными клеточными рецепторами для большинства ретровирусов, в том числе и вирусов иммунодефицита человека ВИЧ-1 и ВИЧ-2, служат гепарансульфаты, находящиеся на клеточной мембране.

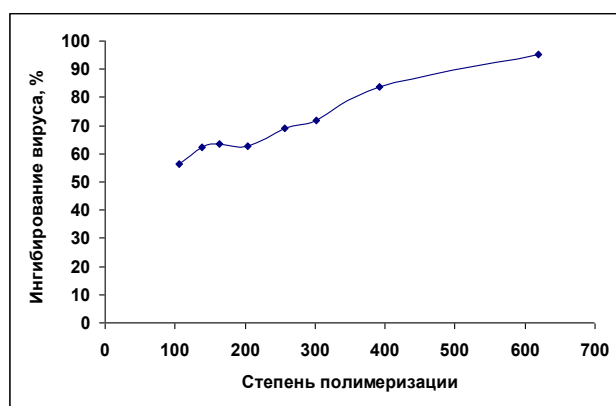


Рис. 6. Зависимость ингибирования вируса от СП препаратов

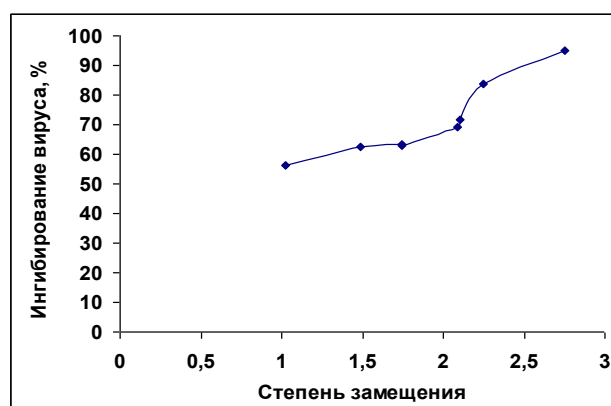


Рис. 7. Зависимость ингибирования вируса от СЗ препаратов

Для сравнения биологической активности получены образцы сульфатов целлюлозы (Na-ЦЦ) и сульфата амилозы (Na-СА) с различными молекулярными параметрами: молекулярной массой, степенями замещения и с различным расположением заместителей в АГЕ. В таблице 5 приводятся молекулярные характеристики и цитотоксичность образцов сульфатов полисахаридов, представленных для изучения антивирусной активности.

Эксперименты проводились на клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши SC-1. Противовирусную активность препаратов определяли на линии клеток SC-1, к которым добавляли различные количества исследуемых препаратов в объеме 20 мкл на лунку перед заражением вирусом. Измерения количества флуоресцирующих клеток проводились через 48 часов после заражения на проточном цитофлуориметре.

Изучалась зависимость противовирусной активности от следующих параметров: 1) молекулярного веса; 2) степени замещения; 3) конформации; 4) расположения сульфатных групп в шестом углеродном атоме.

Таблица 5

Молекулярные параметры и цитотоксичность сульфатов полисахаридов, изученных на противовирусную активность

Индекс	СЗ	ММ кДа	IC-50 мкг/мл	IC-90 мкг/мл	Предполагаемые зависимости
В-1	2,75	1628	0,5	0,9	Изучение зависимости от ММ
В-4	2,55	655	0,35	0,9	
В-8	2,98	281	0,09	0,8	
В-7	2,85	274	0,35	0,9	
МСЦ	0,31	160	-	-	Изучение зависимости от СЗ
С-6	1,2	140	-	-	
В-5	1,77	428	0,55	0,1	
В-4	2,55	655	0,35	0,9	
СА	2,95	285	0,35	2	Изучение зависимости от конформации
В-8	2,98	281	0,09	0,8	

1) *Зависимость активности от молекулярного веса.* Из полученного результата можно сделать вывод, что наибольшей противовирусной активностью обладает образец В-8 с молекулярным весом 281 кДа и степенью замещения 2.95. Это можно объяснить тем, что в области больших степеней замещения молекулярный вес не играет заметной роли в проявлении противовирусной активности. И для исследования зависимости активности от молекулярного веса нужна степень замещения порядка 1-1.5.

2) *Зависимость активности от СЗ.* Результаты показали, что наибольшей противовирусной активностью обладает образец В-4, что соответствует целлюлозе со степенью замещения 2,55 и молекулярным весом 655 кДа; затем следует образец В-5 со степенью замещения 1,77 и молекулярным весом 428 кДа. У образцов С-6 и МСЦ (ММ 140кДа СЗ 1,2 и ММ 160кДа СЗ 0,31, соответственно) противовирусная активность практически не наблюдается, это может быть связано с тем, что для данного молекулярного веса, эти степени замещения являются недостаточными.

Также установлено, что полисахариды в конформации β обладают большей противовирусной активностью, чем в конформации α .

Таким образом, можно предположить, что исследуемые образцы специфично препятствуют проникновению в клетку вирусов, первичными рецепторами которых являются клеточные гепарансульфаты.

В четвертой главе **«Приоритетные структуры модифицированных полисахаридов анионной природы для создания новых лекарственных препаратов»** приведены данные по изучению биологической активности модифицированных полисахаридов анионной природы и компьютерному ее моделированию, специфическому интерполимерному комплексообразованию полисахаридов анионной природы с гликопротеинами, результаты доклинических исследований общей фармакологии и токсикологии, разработка нормативно-технической документации препаратов «Бактоцел», «Сульфогель».

С целью определения возможных причин взаимосвязи «биологическая активность – молекулярные параметры» проведен молекулярный докинг и исследовано взаимодействие созданных лигандов – моделей молекулы из сернокислых и фосфорнокислых эфиров α - и β - связанных D- глюкозидных, галактозидных, маннозидных единиц с эпитопами клеточной поверхности патогенов *E.coli pilus*, *P. Aeruginosa*, Mo-MuLV, ВИЧ-1, HCV, скачанными из Worldwide Protein Data Bank (wwPDB).

Результаты проведенных исследований компьютерного моделирования показали, что с увеличением степени этерификации свободных гидроксильных групп глюкозидов увеличивается их взаимодействие с белковыми частями эпитопа патогенов. Конформационные структуры глюкозидов оказывают существенное влияние на взаимодействие «белок-лиганд». На примере молекулярного докинга вируса лейкемии, наличие β -структуры (в целом 26, в том числе 2 водородные, 8 полярных, 2 гидрофобные, 3 катион- π и 11 других связей) обеспечивает в большей степени взаимодействующими силами, чем α -структуры (в целом 20, в том числе 1 водородная, 2 полярные, 4 гидрофобных и 13 других связей).

Результаты молекулярного докинга анионных полисахаридов доказали, что механизм проявляемой ими активности зависит не только от молекулярных параметров, но и от распределения замещенных групп в АГЕ полисахарида.

Методами турбидиметрии и ИК-спектроскопии изучено комплексообразование модифицированных полисахаридов с различными молекулярными параметрами, функциональными группами и структурой с лизоцимом и трипсином. С повышением СЗ также увеличивается связывание полисахаридов с белками. Результаты показали, что производные полисахаридов в растворе за счет сульфатной или фосфатной групп в цепи макромолекул обладают стабильным анионным зарядом. Взаимодействие сульфатированных полисахаридов с белками в растворе происходит за счет взаимного электростатического притяжения между отрицательно заряженным сульфат-ионом (фосфат-ионом) и положительно заряженным ионом аммония белка. Сравнение структуры показало, что β -гексозаны более способны к образованию интерполимерных комплексов с белками.

Результаты проведенных исследований дали возможность создания и разработки новых оригинальных антимикробных и противовирусных препаратов, на основе модифицированных полисахаридов полианионной природы, и рекомендации для дальнейшей разработки оригинальных противосвертывающих (Сульфогель), противовирусных и антимикробных препаратов (Бактоцел) на их основе.

Впервые разработан гель «Бактоцел», содержащий сульфатированный полисахарид, изучены его антибактериальное и ранозаживляющее действия на модели экспериментальных инфицированных кожных ран у крыс в сравнении с мазью «Левомеколь». Показано, что гель «Бактоцел» обладает ранозаживляющим действием. Он на 6-12 дней сокращает время очищения и заживления инфицированных ран. Препарат обладает антибактериальным действием против стафилококка (*S. aureus*). Сравнительный анализ действия препаратов геля «Бактоцел» и мази «Левомеколь» показал, что наибольшее антибактериальное и ранозаживляющее действие проявляется у геля «Бактоцел».

Впервые разработана мягкая лекарственная форма на гелевой основе «Сульфогель», обладающая антикоагулянтным действием. Проведены доклинические испытания субстанции трисульфата целлюлозы и лекформы «Сульфогель». Изучены физико-химические и биологические свойства сульфат целлюлозы (антимикробные, противовирусные свойства, токсичность, антикоагулянтная активность *in vitro* и *in vivo*), разработан качественный и количественный анализ субстанции. Показано, что трисульфат целлюлозы обладает высокой прямой антикоагулянтной активностью, увеличивает время свертывания крови. Антикоагулянтная активность лекарственной формы «Сульфогель» сравнена с широко известной аналогичной гепариновой мазью.

В пятой главе **«Определение физико-химических свойств полученных модифицированных полисахаридов и установление их структуры»** приведены методики выделения полисахаридов, синтеза их сложных эфиров, установления структуры, изучения их специфической активности.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы выделения и очистки полисахаридов: целлюлозы, пектина, галактоманнана. Определены физико-химические свойства полученных полисахаридов: молекулярная масса, конформационные особенности (природа химической связи основной макромолекулярной цепи), содержание функциональных групп (карбоксильные в пектине, галактоза в галактоманнанае). Проведено гидролитическое расщепление основной и боковой цепи галактоманнана химическим и ферментативным (фермент α -галактозидаза) гидролизом. Установлено соотношение галактоза:манноза у исходного и гидролизованного галактоманнанов, которое равно 1:2,8 и 1:5,

соответственно, что свидетельствует о преимущественном протекании гидролиза по боковой цепи макромолекулы.

2. Впервые систематически исследована химическая модификация (сульфатирование, фосфатирование) полисахаридов (целлюлоза, пектин, амилоза, галактоманнан), подробно определены их структура, молекулярные параметры и физико-химические свойства. Разработаны методы гомогенного сульфатирования полисахаридов с равномерным распределением степеней замещения. Получены сульфатпроизводные полисахаридов (целлюлозы, полигалактуроновой кислоты, галактоманнана) с ММ 10,5- 120,4 кДа (10,5-120,4 кДа, 12,6 -67,3 кДа, 13,1-125 кДа, соответственно) и СЗ от 0,30-2,92, имеющие почти одинаковое содержание сульфатных групп в ангидрогексозном звене, фосфатпроизводные с ММ 6,2-72 кДа и СЗ 0,15-2,45. Оптимизированы условия синтеза модифицированных полисахаридов с использованием метода автоматического непрерывного онлайн контроля реакций полимеризации (АСОМР), что позволило обеспечить непрерывный контроль и оценку кинетики реакции и за счет этого провести целенаправленный синтез.

3. Исследованием реакции сульфатирования полисахаридов впервые установлена реакционная активность гидроксильных групп в ангидрогексозном звене, которая уменьшается в ряду $C-6 > C-2 > C-3$. Установлено, что сульфатпроизводные полисахаридов в водных растворах обладают полугибкой конформацией, гибкость цепи увеличивается с увеличением СЗ образцов.

4. Впервые методом компьютерного моделирования установлено действие анионпроизводных полисахаридов на рецепторные участки патогенов, приводящих к ингибированию их действия на здоровые клетки организма, что подтверждено в эксперименте в условиях *in vitro* и *in vivo*. Между модельными структурами гликопротеинов мультирезистентных бактерий (*P. Aeruginosa*, *E.coli*), вирусов (гепатит С, лейкемия, ВИЧ-1) и сульфатированными моносахаридами (гексозы), а также модифицированными полисахаридами доказано образование интерполимерных комплексов.

5. Впервые установлено, что чувствительность патогенных бактерий зависит от природы и молекулярных параметров модифицированных полисахаридов. Показано, что с увеличением СЗ образцов увеличивается антибактериальная активность, резкое увеличение активности наблюдается при СЗ от 1,9 до 2,1. Более выраженным антимикробным действием обладают сульфатированные β -гексозаны (целлюлоза, галактоманнан), по сравнению с сульфатированными α -гексозанами (амилоза, полигалактуроновая кислота, декстран). При низких концентрациях $C-2,6$ -дисульфат полисахариды активно действуют на *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S.aureus*;

6. Анионпроизводные полисахариды рекомендованы в качестве потенциального объекта для создания препаратов против вирусов лейкемии, гепатита С и ВИЧ. Показано, что противовирусная активность против вируса

лейкемии находится в пределах 0,02-0,45 мкг/мл при концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), с увеличением СЗ возрастает противовирусная активность образцов, наиболее выраженной противовирусной активностью обладают сульфатированные единицы с β -структурами по сравнению с α -структурами;

7. Синтезированы анионпроизводные полисахаридов, обладающие наименьшей антикоагулирующей активностью. Последнее достигнуто синтезом сульфатированных полисахаридов, которые содержат сульфатные группы во 2 и 6 углеродных атомах ангидрогексозного звена. Получены образцы с содержанием сульфатных групп во 2 и 6 углеродных атомов ангидрогексозного звена, по эффективности не уступающие гепарину и обладающие наибольшей активностью. Установлено, что LD_{50} во всех препаратах составила >2000 мг/кг для мышей, >4000 мг/кг для крыс, модифицированные полисахариды являются малотоксичными соединениями.

8. Впервые получен гель «Бактоцел», содержащий сульфатированный полисахарид, показано, что он обладает ранозаживляющим действием, на 6-12 дней сокращает время очищения и заживления инфицированных ран. Сравнительным анализом действия с мазью «Левомеколь» определено, что наибольшее антибактериальное против стафилококка (*S. aureus*) и ранозаживляющее действие проявляется у геля «Бактоцел», даны рекомендации для разработки нового поколения антибактериальных средств;

9. Проведены доклинические испытания субстанции трисульфата целлюлозы и лекформы «Сульфогель». Определены физико-химические и биологические свойства сульфат целлюлозы (антимикробные, противовирусные свойства, токсичность, антикоагулянтная активность в условиях *in vitro* и *in vivo*), разработаны методы стандартизации субстанции и готовых лекарственных форм. Установлено, что трисульфат целлюлозы обладает наибольшей антикоагулянтной активностью, увеличивает время свертывания крови в 3-15 раз. Изучена антикоагулянтная активность «Сульфогеля» в сравнении с гепариновой мазью, рекомендована разработка мягкой лекарственной формы на гелевой основе «Сульфогель».

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 AT THE INSTITUTE OF BIOORGANIC
CHEMISTRY, THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN AND
THE INSTITUTE OF CHEMISTRY OF PLANT SUBSTANCES**

INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY

NORMAKHAMATOV NODIRALI SOKHOBATALIEVICH

**BIOSELECTIVE MACROMOLECULAR SYSTEMS ON BASIS OF
SULFATED POLYSACCHARIDES HAVING ANTIBACTERIAL AND
ANTIVIRAL ACTIVITIES**

02.00.10 – Bioorganic chemistry

**DISSERTATION ABSTRACT
FOR THE DOCTOR OF CHEMICAL SCIENCES (DSc)**

Tashkent - 2017

The title of the doctoral dissertation (DSc) has been registered by the Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with registration numbers of B2017.1.DSc/K14

The doctoral dissertation has been prepared at the Institute of Bioorganic Chemistry.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.biochem.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific consultant

Turaev Abbaskhan Sabirkhanovich
doctor of sciences in chemistry, professor

Official opponents

Rakhmanberdiev Gappar
doctor of sciences in chemistry, professor

Azizov Umardzan Muchtarovich
doctor of sciences in chemistry, professor

Mavlyanov Saidmukhtar Maqsudovich
doctor of sciences in chemistry, professor

Leading organization:

Tashkent Pharmaceuticl Institute

Defense will take place on _____ 2017 year _ _ at the meeting of the Scientific council DSc.27.06.2017.K/B/T.37.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry, the National University of Uzbekistan and the Institute of Chemistry of Plant Substances at the following address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262-35-40, Fax: (99871) 262-70-63).

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Institute of Bioorganic Chemistry (Address: 100125, Tashkent, 83 M.Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63)., e-mail: asrarov54@mail.ru).

Abstract of the dissertation is distributed on»____» _____2017.
(protocol at the register No _____ dated____ 2017).

Sh.I.Salikhov

Chairman of scientific council on award of
scientific degrees, D.B.Sc., academician

M.I.Asrarov

Scientific secretary of scientific council on award of
scientific degrees, D.B.Sc., professor

A.A.Akhunov

Chairman of scientific seminar under scientific council
on award of scientific degrees, D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of DSc thesis)

The aim of research work is purposeful synthesis of the modified polysaccharides containing substitutes of the anion nature (sulfate, phosphate and carboxyl), complementarily interacting with specific receptors of pathogens, and definition of their biological function for the purpose of the creation of therapeutic systems with directed antibacterial and antiviral actions.

The objects of the research work are the celluloses isolated from cotton lint, pectin from apple and citrus, galactomannans obtained from *Gleditsia triacanthos* and *Styphnolobium japonicum* seeds, mono- (C-2; C-3 and C-6), di- (C-2,3 and C-2,6), tri-(C-2,3,6) substituted sulfate and phosphate derivatives of the polysaccharides, gram-negative and gram-positive bacteria, cell line of mouse embryonic fibroblasts SC-1 and NIH 3T3, Huh7.5.1 cells.

Scientific novelty of the research work is as follows:

it have been developed methods to obtain sulphate derivatives of polysaccharides with a molecular mass (MM) of 10.5-120.4 kD and a degree of substitution (DS) of 0.30-2.92, phosphate derivatives with MM of 6.2-72 kDa and DS 0.15 -2.45, with a uniformly distribution of the substituted groups along the macromolecular chain, as well as, it is validated a potential possibility of the development of antibacterial and antiviral drugs based on them;

the influence of the molecular weight of the macromolecule of anion-derived polysaccharides, content of sulfate, phosphate, carboxyl groups along the macromolecule, conformation of the macromolecule, an arrangement of substituted groups in the anhydro-hexose unit on bactericidal and virucidal activity is established;

It was established that the sensitivity of pathogenic bacteria depends on the nature and molecular parameters of the modified polysaccharides, with an An increases in DS and Mw of the samples increase antibacterial activity to a certain value, but the spontaneous, sharp increases in the activity are observed at DS from 1,9 to 2,1 and, sulfate beta-hexosans (cellulose, galactomannan) have a more effective antimicrobial effect in comparison with sulfated α -hexosans (amylose, polygalacturonic acid, dextran);

it has been established that the anionic derivatives of polysaccharides are potential objects for the development of drugs against leukemia, hepatitis C and HIV and it has been proven that the antiviral activity against leukemia virus is in the range of 0.02-0.45 μ g

Implementation of the research results: On the basis of the study on bioselective macromolecular systems on basis of sulfated polysaccharides having antibacterial and antiviral activities bottom:

it is resived patent for the invention of the Agency for Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan "Tobacco Mosaic Virus Inhibitor on Plant Leafs" (12.10.2010, No. IAP 04603). The results of scientific research gave a possibility to develop the preparation, which will be used against pathogens in crops and in medicine;

the developed conditions for systematic modification of polysaccharides in the automatic continuous control of polymerization reactions (ACOMP) allowed, for the first time, successfully implement the ACOMP system for continuous monitoring of the natural products modification reactions, and to develop and implement a new device for simultaneous measurement of bulk viscosity, molecular weight and ion concentration parameters (electrical conductivity and pH values) of the system on the recirculation ACOMP configuration (reference from Tulane University, USA, on November 3, 2016). This is a significant global achievement, since monitoring the polysaccharide modification reaction is the first step in controlling the process of modifying natural products - biopolymers;

the developed modification methods have been used in the preparation of selectively substituted sulfate derivatives of polysaccharides. It gave the possibility to develop polymer antibacterial compositions against multidrug-resistant bacterias as *St. aureus*, *St. epidermides*, *E. coli* (LN) и *Klebsiella* (reference from Kumamoto University of Japan on November 15, 2016);

based on the results on the supramolecular structure and anticoagulant activity of sulfate derivatives of polysaccharides, more than 80 foreign journals with high impact factor (JIF) were used for the physicochemical and pharmacological analysis of the samples. (Acta biomaterialia, 2010, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 6,32; Bioresource Technology, 2009, V.4, №2, Journal Impact Factor, IF 5,65; Biomacromolecules, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 5,25; Carbohydrate polymers, 2012, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 4,81; Food Hydrocolloids, 2014, V.35, №2, Journal Impact Factor, IF 4,75; Langmuir, 2013, V.12, №2, Journal Impact Factor, IF 3,83; Polymer, 2011, V.1, №2, Journal Impact Factor, IF 3,68; Phytomedicine, 2011, V.6, №2, Journal Impact Factor, IF 3,53; Cellulose, 2010, V.2, №2, Journal Impact Factor, IF 3,42). Application of scientific results made it possible to characterize the molecular and pharmacological properties of polysaccharide esters.

The structure and volume of the thesis. Containing 191 pages of text, the dissertation has introduction, five chapters, conclusions, list of references and appendices.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; I part)

1. Wang Z.M., Li L., Zheng B.S., Normakhamatov N., Guo S.Y. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate // International Journal of Biological Macromolecules – 2007. – Т.41. – №. 4. – P. 376-382. (№40, ResearchGate, IF 1.62).

2. Normakhamatov N.S., Turaev A.S., Burkhanova N.D. Cellulose supramolecular structure changes during chemical activation and sulfation // Holzforschung. – 2009. – Т.63. – №. 1. – P. 40-46. (№40, ResearchGate, IF 1.33).

3. Churkina K.M., Mukhamedzhanova M.J., Normakhamatov N.S., Mukhitdinov B.I., Turaev A.S. Rheological properties of sulfate cellulose // Russian Journal of Applied Chemistry – 2011. – Т. 84. – №. 10. – P. 1836-1841 (№11, Springer, IF 0.375).

4. Churkina K.M., Normakhamatov N.S., Vipova N.L., Muhitdinov B.I., Turaev A.S. Synthesis and studying of anticoagulative properties of sulfate polysaccharides // Uzbek Biological Journal. – 2011. – № 3. – P. 12-16. (03.00.00. №5).

5. Нормакхаматов Н.С. Синтез и биологические исследования сернокислых эфиров линейных полисахаридов // Узбекский химический журнал – 2011. – С. 58-61. (02.00.00. №6) .

6. Филатова А.В., Тураев А.С., Джурабаев Д.Т., Чуркина К.М., Нормакхаматов Н.С., Зарипова Г.И. Исследование антикоагулянтной активности лекарственного средства на гелевой основе «Сульфогель». Фармацевтический вестник Узбекистана. – 2012, – №1.– С . 40-45. (02.00.00. №5).

7. Батырбеков А.А., Нормакхаматов Н.С., Шомуратов Ш.А., Алимова М.Т., Ашурова Ф.К., Ярмухамедов А.С., Тураев А.С. Иммуномодулирующие свойства новых растительных препаратов // Журнал теоретической и клинической медицины. – 2013. – №2. – С. 43-47. (03.00.00. №4).

8. Мухитдинов Б.И., Нормакхаматов Н.С., Тураев А.С. Сульфатирование хлопковой целлюлозы бинарной смесью кислоты и спирта. // Узбекский химический журнал – 2013, №3, – С. 33-37 (02.00.00. №6).

9. Батырбеков А.А., Тураев А.С., Сайдахмедова З.Т., Нормакхаматов Н.С., Шомуратов Ш.А., Алимова М.Т., Хабибуллаев Б.Б., Ярмухамедов А.С. Влияние новых растительных препаратов на иммуногенез при остром токсическом гепатите в эксперименте // Журнал теоретической и клинической медицины. - Ташкент, 2013. - №5. - С. 16-19. (03.00.00. №4).

10. Батырбеков А.А., Тураев А.С., Алимова М.Т., Нормакхаматов Н.С., Шомуратов Ш.А. Коррекция вторичного иммунодефицита растительными

препаратами при экспериментальной анемии // Журнал теоретической и клинической медицины.- 2014.- 1.- №3. - С. 287-290 (03.00.00. №4).

11. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С. Влияние расположения сульфатных групп в сульфатах целлюлозы на стабильность их макромолекулы // Химия растительного сырья, 2014, №2, стр. 61-66. (02.00.00. №30).

12. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С. Изменение молекулярно массовые параметры продуктов при сульфатирование целлюлозы. Узбекский химический журнал. – 2014. – №3. – С. 43-46 (02.00.00. №6).

13. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С. Роль химической активации при сульфатирования полисахаридов // Узбекский химический журнал. – 2014. – №4. – С. 17-21. (02.00.00. №6).

14. Патент РУз № IAP 04603. Тураев А.С., Нормакхаматов Н.С., Мухитдинов Б.И., Чуркина К.М., Кадирова З.Н. «Ингибитор вируса табачной мозаики на листьях растений». 12.10.2010. // Расмий ахборотнома. - 2011. - №1.

II бўлим (II часть; Part II)

15. Wang Z. M., Normakhamatov N.S., Li L., Guo S. Y. Functionalization of bagasse into anticoagulants using an ionic liquid as a reaction medium // 3rd CIGR – Sec. VI Symposium.-Naples. 24-27 September 2007. - Book of Abstracts,- P. 124.

16. Боймирзаев С.А., Нормакхаматов Н.С., Тураев А.С., Определение молекулярно-массовых параметров водорастворимых производных целлюлозы методом эксклюзионной хроматографии. -Второй международной форум «Аналитика и аналитики».-22-26 сентября 2008 г. Воронеж, Россия.

17. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С., Характерные особенности применения сульфатов полисахаридов в медицинской практике // Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы образования, науки и производства в фармации», -Ташкент 2008, с.434.

18. Normakhamatov N.S., Muhitdinov B.I., Churkina K.M., Turaev A.S. Synthesis and molecular characteristics of sulfated cellulose // VI Republican conference youth chemists «Problems of Bioorganic Chemistry» 20-21 November 2009,- P.17.

19. Нормакхаматов Н.С., Казанцева Д.С., Мирзаев Ю.Р., Чуркина К.М., Тураев А.С. Синтез и токсикологическое исследование серноокислых эфиров линейных полисахаридов // Материалы межд. научно-практической конференции «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства», 2009, Т.1, -С. 128-131.

20. Normakhamatov N.S., Churkina K.M., Turaev A.S., Mischnick P., Mukhamedov I.M. Structure-property relations in cellulose sulfates // 239th

American Chemical Society (ACS) National Meeting on Chemistry for a Sustainable World. San Francisco, California, USA, March 21 – 25, 2010, - P. 36.

21. Normakhamatov N.S., Churkina K.M., P. Mukhitdinov B., Mischnick P., Turaev A.S. Stability of polysaccharide sulfates dependence on their molecular parameters // Macro2010, Glasgow, United Kingdom. 11-16 July 2010, -P.853.

22. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Мухамеджанова М.Ю., Мухитдинов Б.И., Тураев А.С. Структурно-механические свойства концентрированных водных растворов сульфатов целлюлозы // Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии», 20-21 Сентябрь 2010 г., Ташкент, Узбекистан.

23. Normakhamatov N.S., Zuo Jian Ping, Yang Ye, Muhitdinov B.I., Turaev A.S. Antiviral activity of sulfated polysaccharides // Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, Urumqi, China. October 16-18, 2011, -pp.132-133.

24. Khaytmetova S.B., Normakhamatov N.S., Turaev A.S. Isolation of water-soluble polysaccharide from *Sophora japonica* seeds // 3rd International Symposium on Edible Plant Resources, Urumqi, Xinjiang, China, 27-30 July, 2012, - P.58.

25. Тураев А.С., Нормакхаматов Н.С. Синтез и исследование биологической функции модифицированных полисахаридов, комплементарных к гликопротеинам рецепторов патогенов // Обзорная статья «Развитие биоорганической химии в Узбекистане». – 2013. С. 308-331.

26. Normakhamatov N.S., Turaev A.S. Molecular interaction of polysaccharide esters and adhesin receptor binding domains by computational docking analyses for antimicrobial targeting // Conference on «Actual Problems of Development of the Bioorganic Chemistry» at Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, 15-16st November, 2013.

27. Normakhamatov N.S., Turaev A.S., Yang Ye. Molecular weight properties of sulfated sugars and their affect to the biological activities // Conference on «Actual Problems of Development of the Bioorganic Chemistry» at Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, 15-16st November, 2013.

28. Normakhamatov N.S., Turaev A.S., Alb A.M., Drenski M. F., Reed W. F., Boymirzaev A.S. Online monitoring of the chemical modification of a natural product // Conference on «Actual Problems of Development of the Bioorganic Chemistry» at Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent, 15-16st November, 2013.

29. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С. Новый подход в создании антибактериальных и противовирусных препаратов, на основе модифицированных полисахаридов // Материалы конференции молодых ученых «Актуальные проблемы химии природных соединений», посвященной памяти акад. С.Ю.Юнусова, 12 март, 2015, стр.18.

30. Нормакхаматов Н.С., Чуркина К.М., Тураев А.С. Определение степени замещения сульфатированных полисахаридов физико-химическими методами анализа // Вестник APCY имени К.Жубанова. 2015 г. №1. Стр. 30-35.

31. Normakhamatov N.S., Turaev A.S., Zuo J.P., Yang Y, Mikhailov S.N. An advanced way in creating effective antiviral means // *11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC 2015)*. October 01-04, 2015, Antalya, Turkey. Abstract book,- P. 205.

32. Normakhamatov N.S., Turaev A.S., Mukhamedov I.M., Ihara H. Polysaccharide anionic compounds as a solution against bacterial resistance // *11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC 2015)*. October 01-04, 2015, Antalya, Turkey. Abstract book,- P. 207.

33. Нормакхаматов Н.С., Мухитдинов Б.И., Чуркина К.М., Азимова Л.Б., Амонова Д.М., Тураев А.С. Исследование комплексообразования между анионными полисахаридами и белками. // Ўзбекистонда табиий бирикмалар кимёсининг ривож ва келажаги. Тошкент 2016. 18-19 май.

Автореферат « Ўзбекистон кимё журналы» тахририятида тахрирдан
ўтказилди (11.09.2017 йил)

Босишга рухсат этилди: 14.09.2017 йил
Бичими 60x45 ¹/₈, «Times New Roman»
гарнитурда рақамли босма усулида босилди.
Шартли босма табағи 4,1. Адади: 100. Буюртма: № 205.

Ўзбекистон Республикаси ИИВ Академияси,
100197, Тошкент, Интизор кўчаси, 68

«АКАДЕМИЯ НОШИРЛИК МАРКАЗИ»
Давлат унитар корхонасида чоп этилди.