

Изучение взаимодействия белков с биологически активными азотсодержащими гетероциклическими соединениями при различных значениях рН

© Чухно⁺ Александр Сергеевич, Дмитриева* Ирина Борисовна,
Банкина Анастасия Николаевна и Бриллиантова Елизавета Юрьевна

Кафедра физической и коллоидной химии. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. Ул. Профессора Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 197376. Россия.
Тел.: (812) 234-11-38. E-mail: alex-chuhno@yandex.ru, amylee2208@mail.ru

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: азотсодержащие гетероциклические соединения, сорбция, изоэлектрическая точка.

Аннотация

В работе для исследования был выбран ряд азотсодержащих гетероциклических соединений. В качестве белков были использованы сывороточный альбумин, казеин, желатина. Исследования проводили в водных дисперсиях.

В присутствии гетероциклических соединений наблюдалось смещение значений изоэлектрической точки (ИЭТ), что говорит об их специфической сорбции на белках. При этом катионная форма азотсодержащего гетероциклических соединений смещает ИЭТ в основную область, а анионная – в кислую область. В некоторых случаях имело место появление двух ИЭТ, одной более кислой, другой более щелочной. По величине изменения значения ИЭТ оценивалась способность конкретного азотсодержащего гетероциклического соединения к взаимодействию с белками. Появление комплекса отражалось на спектрах.

Введение

В связи, с развитием в последнее время различных «химических моделей» специфической сорбции ионов, особый интерес представляют работы, посвященные специфической сорбции азотсодержащих гетероциклических соединений.

Исследования процессов взаимодействия между белками и азотсодержащими гетероциклическими соединениями имеют большое значение для медицины и фармации.

Выявление закономерностей взаимодействия этих веществ даст полную картину процессов, происходящих в организме при действии лекарственных препаратов гетероциклической природы.

После того, как препарат попадает в системный кровоток, он доставляется к месту своего действия, метаболизма и экскреции. В крови многие препараты обратимо соединяются с белками плазмы крови.

Уровень и характер связывания препарата с белками плазмы имеет важное фармакокинетическое и фармакодинамическое значение, поскольку свободная часть препарата, которая диффундирует через биологические мембраны и достигает места расположения рецептора, вызывает фармакологический эффект, связываясь с белком.

Работа имеет значение для практической медицины и фармации, так как в основе многих лекарственных препаратов лежат гетероциклические соединения. Таким образом, более детальное изучение их взаимодействия с белками поможет нам в дальнейшем лучше предсказать их действие на организм человека.

Ранее были изучены закономерности адсорбции азолов (тетразола, имидазола и триазолов) на оксидах переходных металлов [1-5], закономерности адсорбции простых неорганических ионов на белке коллагене [6] и других полиамфолитах [7-8], влияние азолов на ИЭТ

Полная исследовательская публикация Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н. и Бриллиантова Е.Ю. белков [9-10]. Данная работа продолжает цикл работ по исследованию коллоидных свойств дисперсных систем, содержащих белок, как в виде дисперсной фазы, так и входящий в состав дисперсионной среды. Важность исследования сорбции азолов очевидна и в публикациях других авторов [11]. Об актуальности наших исследований свидетельствуют появившиеся в последнее время публикации о синтезе новых биологически активных производных азолов [12, 13], что говорит о необходимости выявления общих закономерностей взаимодействия азотсодержащих гетероциклов с полиамфолитами.

Экспериментальная часть

Целью данной работы является исследование влияния азотсодержащих гетероциклических соединений на физико-химические свойства и изоэлектрическую точку (ИЭТ) белков и изучение механизма этого влияния, а также исследование образования комплекса между белком и азотсодержащими гетероциклическими соединениями.

В качестве объектов исследования были взяты производные азолов (2-метилимидазол, далее метилимидазол, дибазол, этиразол, метронидазол, проксифеин, фенилметил-пиразолон, анальгин, изониазид) в качестве шестичленного азотсодержащего гетероцикла использовалась барбитуровая кислота. Исследования проводились в водных растворах. рН создавалась с помощью растворов кислоты соляной и гидроксида калия.

В ряду азолов в зависимости от числа атомов азота, происходит изменение полярности, увеличение ароматичности гетероциклов, увеличение кислотных и уменьшение основных свойств и изменение донорно-акцепторных свойств, что определяет их комплексообразующие и адсорбционные свойства.

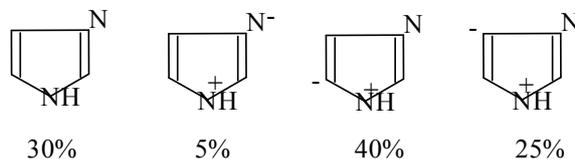
В водных растворах азолов одновременно могут находиться катионы, анионы и недиссоциированные молекулы. Преобладание той или иной формы определяется, прежде всего, видом азола и значением рН раствора.

Для катионных форм азолов характерна локализация заряда на первом и третьем атомах азота в цикле, а для анионных образование единой π -системы. Вследствие различного распределения заряда в катионах и анионах, процесс ассоциации для них различен.

Катионы в растворе ассоциируются с образованием протяженных цепочек, а анионы практически неассоциируются [14-15]. В качестве простейшего азола в работе использовался метилимидазол, вещество производное от имидазола.

В молекуле имидазола имеются две сопряжённые двойные связи. Эти связи с 4 π -электронами дополняются не связывающими электронными парами атомов азота, и возникает единая 6π -электронная ароматическая система. В π -электронном сопряжении атомы азота принимают неодинаковое участие: один атом азота (под номером 3) обладает свободной электронной парой и является нуклеофильным центром.

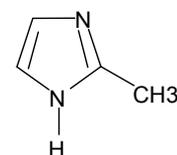
Он называется имидазольным атомом азота. Другой атом азота (под номером 1) отдаёт 2 электрона и характеризуется дефицитом электронов. Он называется пиррольным атомом азота. Двойные связи неравномерно распределяются по кольцу. Ниже приведены резонансные структуры имидазола:



Молекулы имидазола образуют между собой водородные связи, и агрегируются в цепочки, у замещенных азолов данный эффект менее выражен, катионные и нейтральные формы замещенных азолов в растворе существуют как правило в виде димеров [16-17].

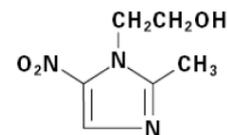
Природным производным имидазола является аминокислота гистидин, которая при декарбоксилировании превращается в гистамин. Гистамин токсичен. К простейшим производным имидазола относят: мерказолил или 1-метил-2-меркаптоимидазол. Он вызывает уменьшение синтеза тироксина в щитовидной железе, благодаря чему оказывает специфическое лечебное действие при её гиперфункции [18].

К более сложным производным имидазола относятся: нафазолин (нафтизин) или 2-(α -нафтилметил)-имидазолина нитрат; нафтизин – прекрасное сосудосуживающее средство; клофелин или 2-(2,6-дихлорфениламино)-имидазолина гидрохлорид. Клофелин является хорошим α -адреноблокирующим средством. Этимизол или бис-(метиламид)-1-этилимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты. Относится к

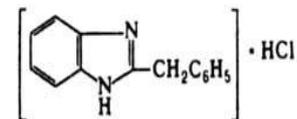


2-метилимидазол

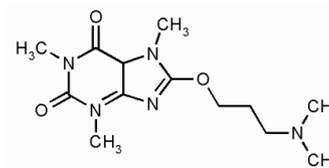
Метронидазол – применяется при противозойных инфекциях, гастрите или язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, алкоголизме, венерических заболеваниях, для наружного применения в стоматологии, а также как радиосенсибилизирующее средство [18]. К одному из важнейших конденсированных производных имидазола относится бензимидазол. Бензимидазол – гетероцикл, в котором имидазольное кольцо конденсировано с бензольным. Бензимидазольная система входит в состав ряда природных веществ, а также лекарственных препаратов.



Метронидазол



Дибазол



Проксифеин

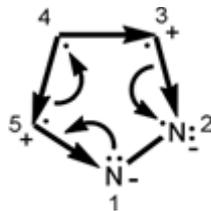
Дибазол или 2-бензилбенимидазола гидрохлорид. Обладает сосудорасширяющим, спазмолитическим и гипотензивным действием.

Проксифеин – применяется при опухолях, лимфогранулематозе.

Этиразол – улучшает кратковременную память [18].

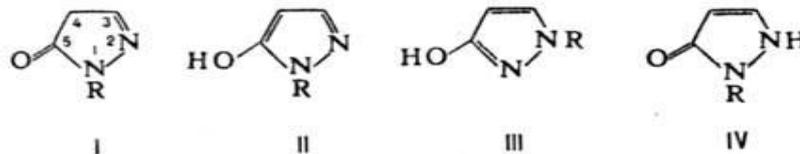
Пиразолон является производным пиразола. В составе пиразолонов имеется два атома азота, несущих различную функцию. Один из них имеет «пиррольную» функцию, другой — «пиридиновую».

Ароматическая природа пиразолонов связана с наличием сопряженной 6-р электронной системы. Расположенные рядом два атома азота в силу своей электроотрицательности становятся причиной сильного отрицательного индуктивного эффекта. В незамещенном по атому азота пиразоле нельзя разделить «пиррольную» и «пиридиновую» функции в силу миграции протона:



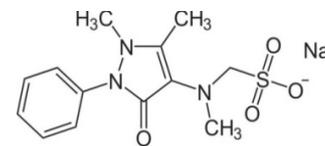
Устанавливается равновесие между электронодонорной способностью в кольце одного атома азота («пиррольного») и электроноакцепторной способностью из кольца другого атома азота («пиридинового»), сдвинутое в сторону электроноакцепторной способности, что и определяет при амфотерности пиразолонов несколько большие основные свойства [19].

Пиразолон находится в растворе в четырех таутомерных формах (R = H):



В неполярных растворителях преобладают таутомеры I и III, в полярных – III и IV [20].

Введение метильного радикала в положение 3(5), незначительно меняет электронные плотности на атомах пиразольного кольца, приводит к его новому качеству, когда электрофильные центры оказываются подавлены, при этом значительные избыточные отрицательные заряды возникают на $^1N > ^4C > ^2N$. Электрофильность цикла понижается. Метильный радикал влияет на донорные способности в кольце 1N , тем самым сдвигая равновесие в сторону акцепторности в цикле 2N , хотя и заряд на 2N уступает по своей плотности. Однако, учитывая большие потенциальные возможности 2N , выражающиеся не только в заряде, но и в степени локализованного заряда в двойной связи $^2N = ^3C$ (порядок связи), а также в реакционной способности 2N (свободная валентность), могущие реализоваться в динамике, 2N является достаточно дееспособным нуклеофильным центром для комплексообразования. Наличие кислорода в 3(5) положении в молекуле пиразолона приводит к диаметрально противоположному эффекту.



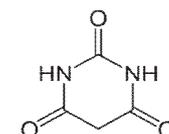
Анальгин

Среди производных пиразолона можно отдельно отметить фенилметилпиразолон – важнейший исходный продукт для синтеза целого ряда противолихорадочных и болеутоляющих средств, включая анальгин. Анальгин – применяется при головной и зубной боли, невралгии [18].

Также в исследованиях была использована барбитуровая кислота – шестичленное азотсодержащее гетероциклическое соединение. Применяется для получения рибофлавина, пиримидина, виолуровой и мочевиной кислоты, а также ее производные являются снотворными средствами.

В качестве белков были взяты сывороточный и яичный альбумин, желатин, казеин производства немецкой фирмы Merck.

Альбумины – водорастворимые глобулярные белки, входящие в состав молока, сыворотки крови, цитоплазмы клеток животных и растений. Среди транспортных систем крови важная роль принадлежит сывороточному альбумину, доля которого составляет около 60% от



Барбитуровая кислота

Полная исследовательская публикация Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н. и Бриллиантова Е.Ю. суммарного количества белков крови. Высокая тропность альбумина к разного рода лигандам в сочетании с достаточно низкой избирательностью лиганд-протеинового связывания, а также большое значение протеина для транспорта лекарств позволяют рассматривать взаимодействие экзогенных соединений с альбумином, как один из этапов реализации обобщающих закономерностей контакта организма и химических объектов окружающей среды, за счет наличия в его молекуле большого количества реакционноспособных участков (тиоловые, имидазольные, карбоксильные группы, аминокислотные группы лизина). Степень и интенсивность связывания оказывают существенное влияние на фармакокинетические, фармакодинамические и токсические свойства лекарственных средств, тканевое связывание, длительность действия лекарственных средств, концентрацию активного препарата в биологических жидкостях и на рецепторном участке, а в конечном счете – на характер фармакологического действия и терапевтический эффект.

В наше время интерес ученых к исследованию его биологической роли альбумина не ослабевает, а накопленные данные позволяют перевести изыскания на качественно новый уровень и вплотную подойти к научно обоснованному моделированию и прогнозированию лиганд-альбуминовых взаимодействий. В последние годы этот подход активно развивается, предлагаются различные прогностические модели, в основе которых лежат критерии растворимости, липофильности, кислотнo-основные свойства молекул лиганда, элементы структуры и другие параметры [21].

Казеин- основной белок молока. Он относится к запасным белкам. Представляет собой смесь нескольких фосфопротеидов (а-, б-казеинов). В фракцию казеина входит также г-казеин (2,5% от всего казеина) – продукт частичного протеолиза б-казеина, катализируемого протеиназой молока. Основные компоненты казеина имеют генетические варианты, отличающиеся несколькими аминокислотными остатками. Эти белки имеют молекулярную массу около 20 тыс. кДа, содержат повышенные количества пролина (полипептидная цепь имеет б-структуру), устойчивы к действию денатуратов [22].

Используемая в работе желатина – продукт гидролиза белка коллагена. Коллаген фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани животных и обеспечивающий ее прочность. Коллаген, или тропоколлаген, наиболее распространенный белок животного мира. У млекопитающих во взрослом организме на его долю приходится почти 30% от всей массы белков. Характеризуется высоким содержанием глицина, низким содержанием серосодержащих аминокислот и отсутствием триптофана. Нарушение структуры и функции коллагена – ключевое звено ряда заболеваний соединительной ткани [23-25].

Белки представляют собой полипептидные цепи построенные из аминокислот, в водной среде содержат основные группы HONH_3 – и кислотные группы – COOH . В кислой среде, в результате избытка водородных ионов, подавлена ионизация карбоксильных групп. Молекула белка ведет себя как основание, приобретает положительный заряд (за счет преобладания групп – NH_3^+) и под действием внешнего электрического поля передвигается к катоду. В щелочной среде из-за большого количества OH -ионов ионизация HONH_3 -групп подавлена, и молекула белка ведет себя как кислота, приобретает отрицательный заряд (за счет групп – COO^-) и передвигается к аноду.

Между этими состояниями белка существует состояние, при котором отрицательный заряд всех анионных групп скомпенсирован положительным зарядом катионных групп, при этом наблюдается равенство числа ионизированных как кислотных, так и основных групп, то есть суммарный заряд макромолекулы равен нулю. Это равно зарядное состояние называют изоэлектрическим, а значение рН среды, отвечающее этому состоянию, – изоэлектрической точкой (ИЭТ).

В изоэлектрическом состоянии свойства растворов полиамфолитов меняются. При этом они имеют наименьшую вязкость, плохую растворимость, наименьшую степень набухания, большую летучесть, что связано с изменением формы макромолекул [26].

В работе были выбраны следующие методы исследования. ИЭТ определялась методом измерения степени набухания. В раствор HCl или KOH с предварительно измеренным рН объемом 25 мл добавляли 5 мл лекарственного вещества ($c = 0.001$ моль/л).

Растворы KOH готовили на дистиллированной воде, предварительно освобожденной от CO_2 воздуха кипячением в течение 30 минут. Брали кусочки желатины массой примерно 70-80 мг и помещали их в растворы на 1 час.

Массу желатина до и после набухания находили с помощью торсионных весов. рН растворов измеряли на рН-метре – *pH-673* с точностью измерения ± 0.05 единиц рН [27-28]. По полученным данным строили графики зависимости степени набухания от рН. Степень набухания рассчитывали по формуле:

$$\alpha = \frac{m_2 - m_1}{m_1}, \quad (1)$$

где α – степень набухания; m_2 – масса (мг) набухшего ВМВ; m_1 – масса (мг) ВМВ до набухания.

Вязкость определяли методом вискозиметрии с помощью вискозиметра Оствальда [27-28]. Для расчета относительной вязкости растворов белков (η) измеряли времена истечения раствора белка (t_2) и дистиллированной воды (t_1) через узкий капилляр вискозиметра при одинаковых давлениях. Плотность находили, как отношение массы к объему. Относительную вязкость растворов белков рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{t_2 \cdot \rho_2}{t_1 \cdot \rho_1}, \quad (2)$$

где η_2 – вязкость водного раствора белка, η_1 – вязкость растворителя – дистиллированной воды, ρ_2 и ρ_1 – плотности водного раствора белка и дистиллированной воды соответственно.

В обеих методиках измерения проводили через 1 час после приготовления водных дисперсий белков.

Образование комплекса определяли спектрофотометрически. Готовили три раствора: раствор чистого альбумина ($C = 0.1\%$), чистого лекарственного вещества ($C = 0.0001$ моль/л), смеси альбумина и лекарственного вещества в тех же концентрациях. Раствором сравнения являлась вода. Диапазон длин волн = 200-350 нм. Спектральные диаграммы получены с помощью спектрофотометров *Shimadzu uv-200* и *specord*.

Электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) определяли методом макроэлектрофореза – методом подвижной границы [27-29]. Границу раздела между водной дисперсией белка и раствором, имеющий такой же состав, как и дисперсионная среда, определяли с помощью лазера. Для макроэлектрофореза использовали 1%-ю водную дисперсию казеина. Электрокинетический потенциал белков рассчитывали по уравнению Гельмгольца–Смолуховского:

$$\zeta = \frac{K \cdot \pi \cdot \eta \cdot u_{\text{э.ф.}}}{\varepsilon}, u_{\text{э.ф.}} = \frac{S}{t \cdot H}, \quad (3)$$

где η – вязкость дисперсионной среды, $u_{\text{э.ф.}}$ – электрофоретическая подвижность, S – расстояние, на которое сместилась подвижная граница за время t при градиенте потенциала H , ε – диэлектрическая проницаемость дисперсионной среды, K – фактор, учитывающий форму частиц.

Погрешность всех измерений не превышала 10%.

Результаты и их обсуждение

По полученным данным построены графики зависимостей степени набухания, относительной вязкости от значений рН растворов белка, оптической плотности от длины волны, электрокинетического потенциала (ζ -потенциал) и рН растворов белка от времени контакта фаз.

На рис. 1 представлены зависимости степени набухания (α) желатины от рН растворов. Минимум на кривых α – рН соответствует значению рН_{ИЭТ} желатины. В растворах дибазола (рис. 1, 2) наблюдается смещение ИЭТ желатины, по сравнению с ИЭТ желатины в растворах неорганических электролитов (НСІ, КОН).

Смещение рН_{ИЭТ} в щелочную область свидетельствует о специфической сорбции катионов. Смещение ИЭТ желатины в случае дибазола сопоставимо с метилимидазолом, но в случае метилимидазола оно более значительно (зависимость на рисунках не приводится, кривая аналогична кривой 2, рис. 1), что согласуется с преобладанием катионных форм у имидазола и его производных. Но при этом надо отметить, что смещение рН_{ИЭТ} значительно меньше, чем у имидазола [9]. Во всех случаях смещение ИЭТ у производных имидазола меньше, чем в системе с имидазолом.

Можно предположить, что чем сложнее строение молекул у производных имидазола, тем слабее они влияют на ИЭТ белка. Важную роль здесь может играть стерический фактор. Влияние заместителя зависит и от типа группы, например, метильная группа обладает положительным индуктивным эффектом, поэтому введение ее в молекулу имидазола увеличивает отрицательный заряд π -системы и делает реакционную способность анионов метилимидазола выше, чем анионов имидазола.

Вследствие этого, сорбция метилимидазолат-анионов становится больше, чем сорбция имидазолат-анионов, что приводит к уменьшению роли специфической сорбции катионов, следовательно, и уменьшению смещения рН_{ИЭТ}. Что подтверждается в случае метронидазола,

Полная исследовательская публикация Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкаина А.Н. и Бриллиантова Е.Ю. когда наличие и положение электродонорных групп приводит к тому, что более активной становится анионная форма.

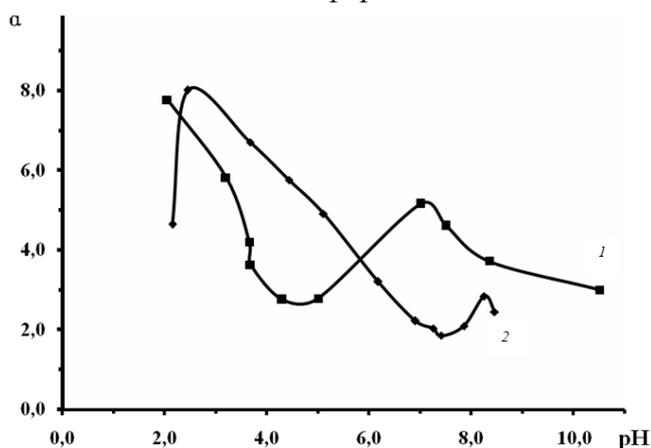


Рис. 1. Зависимость степени набухания (α) желатины от рН раствора: 1 – фоновый (не содержит азотсодержащих гетероциклических соединений); 2 – раствор дибазола, 0.001 моль/л

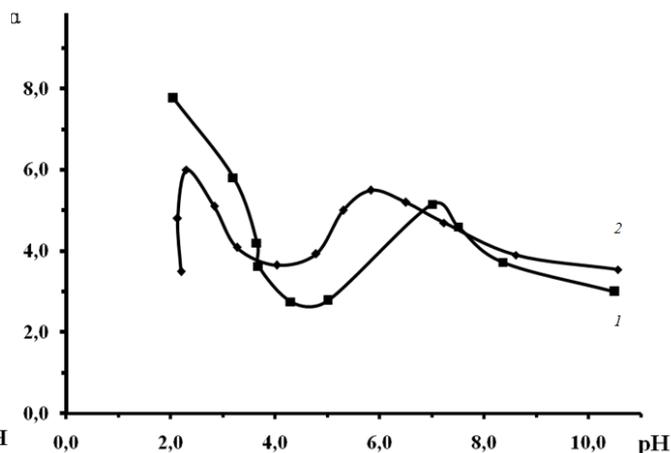


Рис. 2. Зависимость степени набухания (α) желатины от рН раствора: 1 – фоновый (не содержит азотсодержащих гетероциклических соединений); 2 – раствор метронидазола, 0.001 моль/л

На рис. 2 мы наблюдаем сдвиг в кислую область, что говорит о специфическом взаимодействии анионной формы.

Действия радикалов зачастую приводят к тому, что активными становятся обе формы, как анионная, так и катионная в зависимости от преобладания той или иной формы при заданных значениях рН. В таком случае появляются две изоэлектрические точки, что наблюдается с анальгином (рис. 3).

Надо так же отметить, что другие производные пиразолона ИЭТ белка практически не смещают [9].

Аналогичные результаты были получены в случае проксифеина, изониазида, этиразола и барбитуровой кислоты. На рис. 4 приведены зависимости относительной вязкости дисперсий альбумина от рН водной фазы в присутствии (кривая 2) и отсутствии барбитуровой кислоты (кривая 1).

Как отмечено выше, в ИЭТ дисперсии белков имеют наименьшую вязкость. Графики зависимостей полученных в этом случае аналогичны графикам в случае измерения степени набухания.

При этом вязкость белковых растворов содержащих гетероциклические соединения выше, что говорит о влиянии гетероциклических соединений на пространственную структуру белка. Полученные результаты коррелируются с результатами, полученными по измерению мутности.

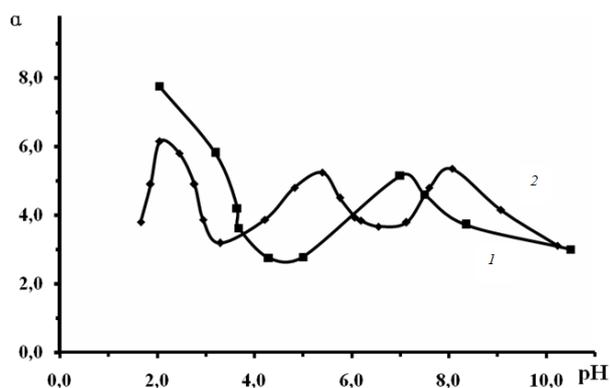


Рис. 3. Зависимость степени набухания (α) желатины от рН раствора: 1 – фоновый (не содержит азотсодержащих гетероциклических соединений); 2 – раствор анальгина, 0.001 моль/л

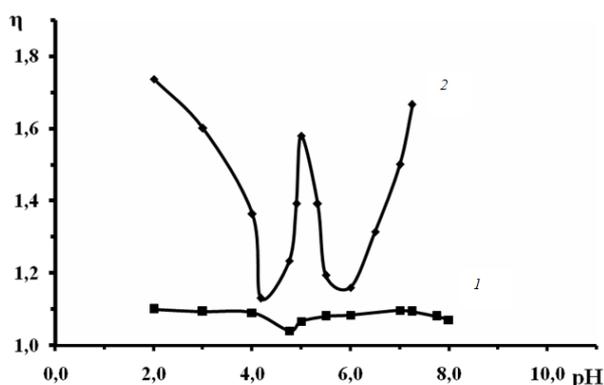


Рис. 4. Зависимость относительной вязкости дисперсий альбумина от рН водной фазы: 1 – фоновый (не содержит азотсодержащих гетероциклических соединений); 2 – раствор барбитуровой кислоты, 0.001 моль/л

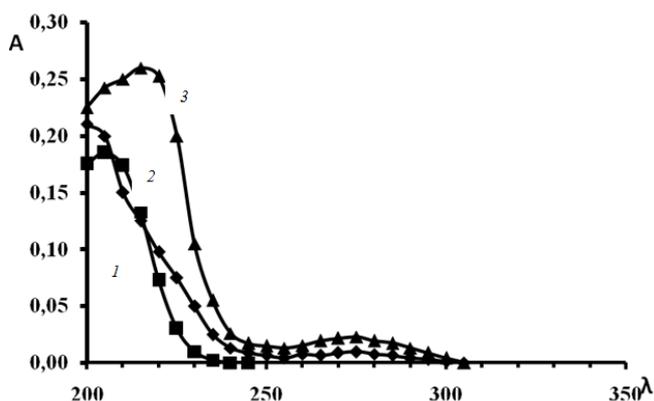


Рис. 5. Спектр растворов: 1 – альбумина, $C = 0.1\%$,
2 – метилимидазола, 0.0001 моль/л,
3 – смесь метилимидазола и альбумина
в тех же концентрациях

между альбумином и азолом подтверждается электрокинетическим методом. На рис. 6 видно, что уже на начальном этапе времени происходит смещение ИЭТ, кривая переходит из отрицательного поля в положительное. Наличие пика на начальном участке, говорит о сорбции димеров метилимидазола на поверхности белка, а дальнейшее понижение – о их разрушении и высвобождении отдельных молекул.

Процесс сопровождается высвобождением протонов, и подкислением раствора, о чем свидетельствует рис. 7.

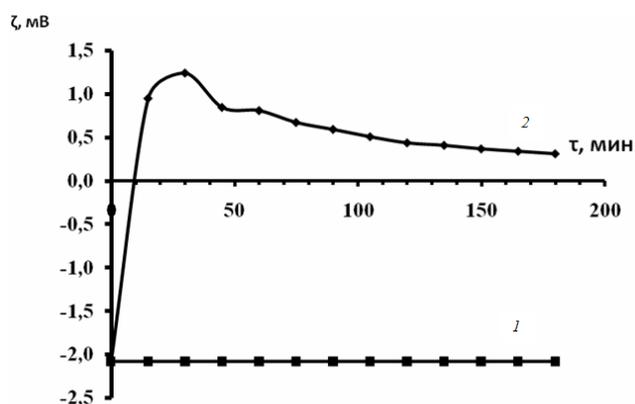


Рис. 6. Зависимость ζ -потенциала казеина $C = 1\%$ от времени: 1 – фоновый, не содержащий гетероциклических соединений, 2 – содержащий раствор метилимидазола, 0.0001 моль/л

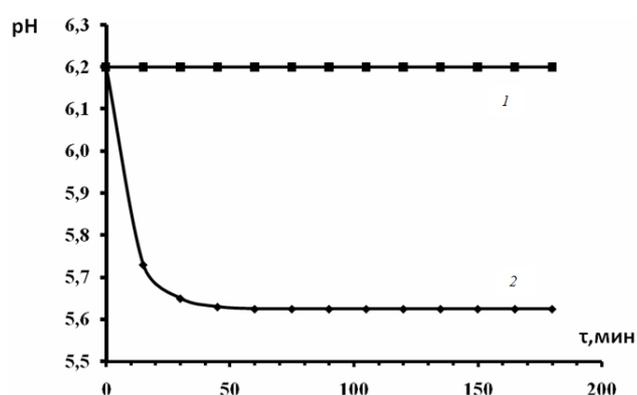


Рис. 7. Зависимость pH суспензии от времени. 1 – фоновый, не содержащий гетероциклических соединений, 2 – содержащий раствор имидазола, 0.0001 моль/л

Выводы

1. Установлено, что сложные азотсодержащие гетероциклические соединения, как и их простые предшественники смещают изоэлектрические точки желатины, казеина и альбумина. Что свидетельствует о специфическом (отличном от простого электростатического) взаимодействии азотсодержащих гетероциклических соединений с белками.
2. В растворах всех исследованных сложных азотсодержащих гетероциклических соединений, одновременно присутствуют катионные и анионные формы, которые могут сорбироваться специфически. Часть гетероциклических соединений смещают изоэлектрические точки белков по сравнению с неорганическими электролитами (HCl, KOH) в щелочную область, что свидетельствует о специфической сорбции катионных форм азотсодержащих гетероциклических соединений.

Полная исследовательская публикация Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Банкина А.Н. и Бриллиантова Е.Ю.

3. Величина смещения азолами изоэлектрических точек белков больше, чем сложными азотсодержащими гетероциклическими соединениями (их производными) в соответствии с уменьшением количества катионных форм в их растворах, а также влияния на взаимодействие стерического фактора. В некоторых случаях наблюдается смещение в кислую область, что свидетельствует о специфической сорбции анионов. В ряде случаев сорбция может приводить к появлению двух ИЭТ.

Литература

- [1] Дмитриева И.Б., Тихомолова К.П., Чухно А.С. Особенности адсорбции 1,3 - диазола на поверхности оксидов NiO и Fe₂O₃. *Журн. прикл. химии*. **2005**. Т.78. Вып.5. С.741-746.
- [2] Дмитриева И.Б., Тихомолова К.П., Чухно А.С. Адсорбция тетразола на оксидах Ni(II) и Fe(III). *Журн. прикл. химии*. **2006**. Т.79. Вып.1. С.51-56.
- [3] I.B. Dmitrieva, K.P. Tikhomolova, A.S. Chukyno, et al. Investigation of the electro-surface properties of NiO and Fe₂O₃ in azole solutions. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2007**. Vol.241. Iss.1-3. P.45-59.
- [4] Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Тихомолова К.П., Воронкова Н.В. Электроповерхностные свойства оксидов никеля(II) и железа(III) в водных растворах 1,2,4 триазола. *Журн. прикл. химии*. **2010**. Т.83. Вып.7. С.1119-1123.
- [5] Дмитриева И.Б., Чухно А.С. Электроповерхностные свойства оксидов никеля(II) и железа(III) в водных растворах замещенных азолов (производных имидазола и 1,2,4-триазола). *Вестник СПбГУ*. **2012**. Сер.4. Вып.3. С.103-110.
- [6] Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Колодеева С.С., Мартынов Д.В. Адсорбция ионов Н⁺ и ОН⁻ на коллагене. *Вестник СПбГУ*. **2011**. Сер.4. Вып.3. С.87-96.
- [7] Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Влияние солей одно-, двух- и трехзарядных катионов металлов на сорбцию Н⁺ и ОН⁻ ионов на декстрани. *Бутлеровские сообщения*. **2011**. Т.27. №14. С.47-54.
- [8] Родионова Е.Ю., Дмитриева И.Б., Чухно А.С. Электрокинетические свойства гемоглобина в водных растворах HCl и KCl. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.30. №6. С.103-107.
- [9] Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Изоэлектрическая точка белков в водных растворах азолов. *Вестник СПбГУ*. **2011**. Сер.4. Вып.2. С.124-134.
- [10] Чухно А.С., Дмитриева И.Б., Мартынов Д.В. Взаимодействие белков с азолами и лекарственными средствами на их основе при различных значениях рН. *Вестник КазНУ, Сер. химическая*. **2010**. Т.3. №59. С.30-33.
- [11] Тырина Е.В., Прокопов С.В., Курбатова С.В. Удерживание адамантиламидразонов и триазолов в условиях квазинормально-фазовой хроматографии. *Бутлеровские сообщения*. **2011**. Т.27. №15. С.28-33.
- [12] Орлов В.Ю., Котов А.Д., Проказников М.А., Базлов Д.А., Цивов А.В. Синтез азотсодержащих гетероциклических соединений из нитроаренов. *Бутлеровские сообщения*. **2012**. Т.31. №7. С.11-14.
- [13] Ильиных Е.С., Ким Д.Г. Синтез и иодциклизация 4-метил-3-((2E{2Z})-3-хлор- 2-пропенил)тио-1,2,4-триазолов. *Бутлеровские сообщения*. **2011**. Т.26. №12. С.6-9.
- [14] Паккет Л. Основы современной химии гетероциклических соединений. *М.: Мир*. **1971**. 352с.
- [15] Иванский В.И. Химия гетероциклических соединений. *М.: Высшая школа*. **1978**. 559с.
- [16] J. Catalan, R.H. Claramund, J. Launes, et al. Basicity and acidity of Azoles: The Annelation effect in Azoles. *Journal of the American chemical Society*. **1988**. Vol.110. No.13. P.4105-4111.
- [17] M. Meotner, J.F. Liepmen, J.E.D. Bene. Proton Affinities of Azoles: Experimental and Theoretical Studies. *J. Org. Chem*. **1986**. No.51. P.1105-1110.
- [18] Машковский М.Д. Лекарственные средства: Справочное пособие. Изд. 15, перераб. *Москва: Новая волна*. **2005**. 1200с.
- [19] Эльдерфильд Р. Гетероциклические соединения. под ред. Р. Эльдерфильда, пер. с англ. под ред. Н.К. Кочткова. *М.* **1961**. Т.5. 584с.
- [20] Петров Б.И., Москвитина Т.Б. Использование реакции межфазного анионного обмена для повышения избирательности экстракции. *Журн. аналит. химии*. **1982**. Т.37. Вып.7. С.1185-1192.
- [21] M. Wood. Anesthesia and analgesia. *Vanderbilt University, Nashville, Tennessee*. **1986**. Vol.65. P.786-804.
- [22] Черников М.П. Протеолиз и биологическая ценность белков (Казеины как собственно пищевые белки). *М.* **1975**. 232с.
- [23] Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. *М.* **1981**. 1878с.

- [24] Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. М. **1974**. 248с.
- [25] T. Gutschmann, G.E. Fantner, M. Venturoni, et al. Evidence that Collagen Fibrils in Tendons Are Inhomogeneously Structured in a Tubelike. *Biophysical Journal*. **2003**. Vol. 84. P.2593-2598.
- [26] Беляев А.П., Кучук В.И. Физическая и коллоидная химия. 2-ое изд., перераб. и доп. М. **2012**. 752с.
- [27] Бугреева Е.В., Евстратова К.И., Купина Н.А., и др., под ред. проф. Евстратовой К.И. Практикум по физической и коллоидной химии. Москва: *Высшая школа*. **1990**. 255с.
- [28] Беляев А.П., Скворцов А.М., Кучук В.И., и др. Физическая и коллоидная химия. Руководство к практическим занятиям: учебное пособие. М.: *ГЭОТАР-Медиа*. **2012**. 320с.
- [29] Григоров О.Н., Карпова И.Б., Козьмина З.П. и др. Руководство к практическим работам по коллоидной химии. Л.: *Химия*. **1964**. 336с.