

**Раздел 5. «Химия»**

МРНТИ 31.21.27.

Фазылов С. Д.<sup>1</sup>, Нуркенов О. А.<sup>1,3</sup>, Бакирова Р. Е.<sup>2</sup>, Кабиева С. К.<sup>3</sup>, Мендибаева А. Ж.<sup>2</sup><sup>1</sup> *Институт органического синтеза и углекислотной химии РК, Караганда, Казахстан*<sup>2</sup> *Медицинский университет Караганды, Казахстан*<sup>3</sup> *Карагандинский индустриальный университет, Темиртау, Казахстан  
(E-mail.ru: kabieva.s@mail.ru)***Некоторые механизмы ингибирующей активности N'-замещенных гидразонов 2(4)-гидроксибензойной и изоникотиновой кислот в отношении эластазы нейтрофилов человека**

В результате исследований *in vitro* на противовоспалительную и цитотоксическую активности на культурах человеческих моноцитарных линий клеток *MonoMac-6* и *THP-1Blue* установлено, что среди новых N'-замещенных гидразонов, синтезированных на основе 2(4)-гидроксибензойной и изоникотиновой кислот, выявлены соединения, способные подавлять липополисахарид (ЛПС)-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF в клетках *MonoMac-6*. По способности гидролизовать синтетический субстрат *N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin (Calbiochem)* установлена ингибирующая активность в отношении эластазы нейтрофилов человека N'-замещенных гидразонов на основе 2(4)-гидроксибензойной кислоты.

*Ключевые слова:* N'-замещенные гидразоны, 2- и 4-гидроксибензойная, N-морфолилуксусная и изоникотиновая кислоты, противовоспалительная активность, цитотоксичность.

*Введение*

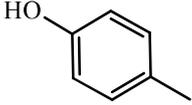
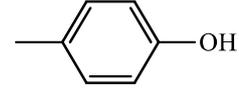
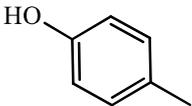
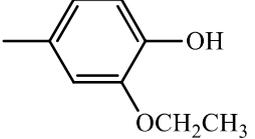
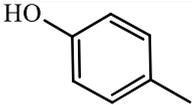
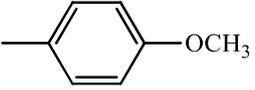
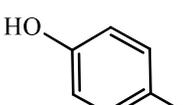
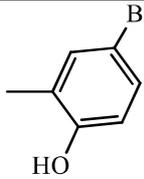
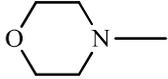
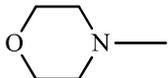
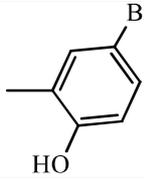
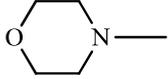
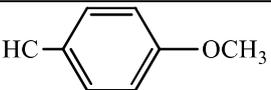
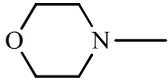
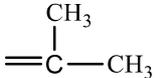
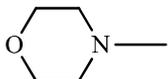
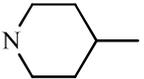
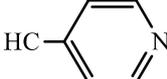
Одним из методов создания новых биологически активных соединений является модификация известных лекарственных препаратов. Среди лекарственных средств имеются гидразиды изоникотиновой кислоты и ее производные, нашедшие применение в медицине в качестве противотуберкулезных препаратов и антидепрессантов [1]. Высокоэффективные биологически активные соединения найдены среди производных гидразидов 2-аминобензойной [2], никотиновой [3], цинхониновой кислот [4], проявляющие антимикробную, противовоспалительную, противосудорожную активность. В связи с этим дальнейший поиск фармакологически активных соединений среди гидразидов пиридин- и хинолинкарбоновых кислот и/или близких им по структуре соединений, является актуальным. Оценка противовоспалительных и цитотоксических эффектов потенциально биоактивных субстанций является необходимым этапом исследования их на доклиническом этапе в рамках системы GLP [5, 6].

При проведении скрининга новых биологически активных соединений в последние годы все чаще обосновываются предложения о разумном сочетании экспериментов *in vivo*, *in vitro* и *in silico* (компьютерное моделирование) для оптимизации оценки биологической активности веществ. Следует отметить важность исследований *in vitro* с этической точки зрения, так как это позволяет уменьшить количество используемых животных для биологического тестирования. В настоящее время существует тысячи различных тест-систем для исследований *in vitro*: 1) изолированные перфузируемые органы; 2) тканевые срезы; 3) клеточные культуры/суспензии; 4) изолированные органеллы/мембраны/ферменты; 5) системы беспозвоночных; 6) non-living системы; 7) компьютерные модели. Наиболее простыми и доступными системами являются монослойные клеточные культуры [7, 8].

В работе представлены результаты изучения *in vitro* новых N'-замещенных гидразонов, синтезированных на основе 2(4)-гидроксибензойной, N-морфолилуксусной и изоникотиновой кислот на



## Раздел 5. «Химия»

Ik	4-гидрокси-N'-(4-гидрокси-бензилиден)бензогидразид		
Im	N'-(3-этокси-4-гидроксибензилиден)-4-гидроксибензогидразид		
In	4-гидрокси-N'-(4-метокси-бензилиден)бензогидразид		
Ip	N'-(5-бром-2-гидроксибензилиден)-4-гидроксибензогидразид		
Па	N'-(4-фторбензилиден)-2-морфолиноацетогидразид		
Пб	N'-(5-бром-2-гидрокси-бензилиден)-2-морфолино-ацетогидразид		
Пс	N'-(4-метоксибензилиден)-2-морфолиноацетогидразид		
Пд	2-морфолино-N'-(пропан-2-илиден)ацетогидразид		
Пе	N'-циклогексилиден-2-морфолиноацетогидразид		
Пж	N'-(пиридин-4-ил-метил)-изоникотиногидразид		

## Экспериментальная биологическая часть

Соединения Ia-e, Па-е и Пж были исследованы на противовоспалительную и цитотоксическую активности (*in vitro*) на культурах человеческих моноцитарных линий клеток *MonoMac-6* и *THP-1Blue*, соединения Ia-d, f-p и Па-с – на ингибирующую активность в отношении фермента эластазы нейтрофилов (ЕС 3.4.21.37) по методам, описанным в работе [13]. Противовоспалительный эффект был оценен по способности соединений подавлять липополисахарид (ЛПС)-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли (TNF) в клетках *MonoMac-6*, а также *NF-κB*-зависимой продукции щелочной фосфатазы (ЩФ) в трансфицированных клетках *THP-1Blue*. Клетки были обработаны соединением в течение 30 мин, затем в культуру клеток был добавлен ЛПС в количестве 0,5 мкг/мл. Цитокины были измерены в супернатантах клеток при помощи иммуноферментного метода (ELISA). Уровень цитокинов или ЩФ были оценены после 24-часовой инкубации (препарат сравнения - хемилуминесцентный набор CellTiter-Glo). Продукция ЩФ была измерена при помощи специфического субстрата Quanti-Blue™. Активность эластазы нейтрофилов человека (ЕС 3.4.21.37) была оценена по способности соединений гидролизовать синтетический субстрат *N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin* (*Calbiochem*) (препарат сравнения). Образование флуоресцирующего продукта измерялось при возбуждении 355 нм и испускании 460 нм на приборе FluoroskanAscent FL.

## Раздел 5. «Химия»

## Результаты и обсуждения

Эффективная концентрация соединений, вызывающая подавление ответа на 50% ( $IC_{50}$ ) была найдена при помощи регрессионного анализа с использованием дозо-зависимых кривых (не менее 5-ти концентраций). Статическую обработку данных проводили по  $t$ -критерию Стьюдента [14]. Эффект считали достоверным при  $p \leq 0,05$ . Результаты опытов статистически обработаны и приведены в табл. 2

Экспериментальные исследования по изучению противовоспалительной, цитотоксической и ингибирующей активности в отношении эластазы нейтрофилов человека новых гидразонов проведены в Department of Immunology and Infectious Diseases, Montana State University, Bozeman, Montana 59717, United States. Авторы выражают благодарность доктору PhD Шепеткину И.А. за помощь в проведении скрининговых исследований.

Таблица 2. Влияние соединений Ia-e, Pa-e и III на ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов (TNF и IL-6) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в культуре клеток и оценка их цитотоксичности. Ингибирующая активность гидразонов Ia-d, f-p и Pa-c в отношении эластазы нейтрофилов человека (EC 3.4.21.37)

Соединение	MonoMac-6 cells			THP-1Blue cells		EC 3.4.21.37
	TNF	IL-6	Токсичность	ЩФ	Токсичность	
	$IC_{50}$ , $\mu$ M					
Ia	35,5	N.A. <sup>a</sup>	N.T. <sup>a</sup>	N.A.	N.T.	N.A. <sup>a</sup>
Ib	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	N.A.
Ic	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	N.A. <sup>b</sup>
Id	N.A.	0,11	N.T.	N.A.	N.T.	33,3
Ie	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	...
If	...	...	...	...	...	N.A.
Ig	...	...	...	...	...	97,8
Ih	...	...	...	...	...	78,8
Ii	...	...	...	...	...	N.A.
Ij	...	...	...	...	...	N.A.
Ik	...	...	...	...	...	N.A.
Im	...	...	...	...	...	64,0
In	...	...	...	...	...	N.A.
Ip	...	...	...	...	...	N.A.
Pa	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	N.A.
Pb	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	N.A. <sup>c</sup>
Pc	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	N.A.
Pd	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	...
Pe	N.A.	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	...
III	49,3	N.A.	N.T.	N.A.	N.T.	...

<sup>a</sup> – N.A. и N.T. - нет подавления продукции или цитотоксичности, активности фермента при концентрациях  $<100 \mu$ M; <sup>b</sup> – соединение быстро гидролизуетея, что сопровождается либо снижением, либо увеличением собственной флюоресценции при 460 нм; <sup>c</sup> – соединение имеет высокий уровень собственной флюоресценции.

Воспалительный процесс может быть задействован различными путями, в том числе инфекцией, повреждением ткани, аутоиммунными реакциями и др. На уровне организма характер и механизм действия лекарственного агента на воспалительный процесс очень сложен, поскольку конечный эффект цитотоксического действия агента на клетки может зависеть от процессов его транспорта в крови или лимфе, трансмембранного переноса, особенностей организации тканей и органов, характера рецепторного и неспецифического связывания с молекулами-мишенями, степени адекватности систем защиты клетки [15, 16].

## Раздел 5. «Химия»

В зависимости от силы и мишени воздействия агента возможна широкая гамма изменений, ограниченная с одной стороны цитостатическим эффектом, нарушающим прохождение клетки по клеточному циклу, а с другой стороны – цитоцидным эффектом, ведущим клетку к гибели [17]. Если рассматривать клеточную гибель как конечный результат цитотоксического действия агентов, то под цитотоксичностью понимают разнообразные нарушения, имеющие на одном фланге запуск механизмов апоптоза, а на противоположном – включение процессов некроза [18-20].

Из данных, представленных в табл. 2 следует, что испытанные соединения Ia-e, IIa-e и III, проявили противовоспалительный эффект только по отношению провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли (TNF) в клетках *MonoMac-6*. Соединение Id не обладает цитотоксичностью, но в низких концентрациях ( $IC_{50}$  0,11  $\mu$ M) способно подавлять продукцию IL-6, но не TNF. Это свойство представляется очень интересным, так как продукция IL-6 и TNF в клетках регулируется различными механизмами. Соединения Ia и III также не имеют цитотоксического эффекта, но обладают слабой активностью ( $IC_{50}$  35,5 и 49,3  $\mu$ M), проявляющейся в подавлении продукции провоспалительного цитокина TNF. Аналоги соединений Ia и III могут быть рекомендованы для изучения их активности в противовоспалительных тестах.

Изучение ингибирующей активности соединений Ia-d, f-r и IIa-c в отношении фермента эластазы нейтрофилов (ЕС 3.4.21.37) показало, что только гидразон Id проявил небольшую активность с  $IC_{50}$  около 30  $\mu$ M. Гидразоны Ig, IIh и IIm были менее активны ( $IC_{50}$  от 60 до 100  $\mu$ M). Что касается исследований по ингибированию фермента эластазы гидразонами Ic и IIb, быстрый их гидролиз не позволяет сделать корректную регистрацию кинетики реакции гидролиза флуоресцентного субстрата *N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin* ферментом эластазы при тех же параметрах флуоресценции ( $\lambda_{ex}$ =355 нм,  $\lambda_{em}$ =460 нм).

Гидролиз гидразонов протекает с различной скоростью и сопровождается изменением спектров флуоресценции растворов. Некоторые гидразоны имеют достаточно сильную флуоресценцию, которая исчезает с различной скоростью (в зависимости от соединения) за счет спонтанного гидролиза гидразонов. Хотя гидразон IIb достаточно стабилен в течение 5 мин, необходимых для регистрации ферментативной реакции, но он имеет высокую базовую аутофлуоресценцию, что также негативно влияет на корректную регистрацию кинетики реакции. Кинетика спектров флуоресценции гидразонов Ic и IIb, которые выше отмечены как соединения с высоким уровнем собственной флуоресценции, были записаны на приборе Perkin Elmer LS50B при  $\lambda_{ex}$ =355 нм.

Гидразон Ic имеет специфический пик флуоресценции при  $\lambda_{em}$ =475 нм, в водной среде Ic практически полностью гидролизует за 60 мин, что сопровождается снижением флуоресценции в области 460-475 нм (рис. 1А). Гидразон IIb имеет специфический пик флуоресценции при  $\lambda_{em}$ =489 нм. В водной среде IIb гидролизует медленно, что также сопровождается снижением флуоресценции (рис. 1В).

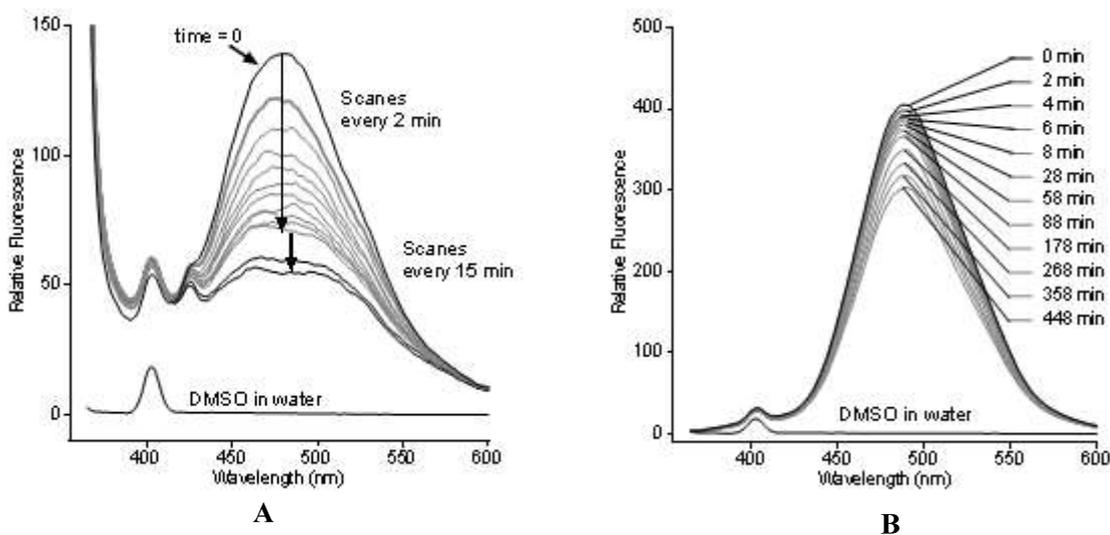


Рисунок 1. Кинетика спектров флуоресценции *N'*-замещенных гидразонов Ic и IIb (25  $\mu$ M раствор в воде с 0,25% DMSO) при  $\lambda_{ex}$ =355 нм (ширина щелей 5 нм). А. Спектры Ic снимались первые 20 мин

## Раздел 5. «Химия»

каждые 2 мин; последние 2 спектра снимались с интервалом 15 мин. В. Спектры *Шв* снимались в указанное время после добавления его в воду.

Таким образом, в ходе проведенных исследований на противовоспалительную и цитотоксическую активности на культурах человеческих моноцитарных линий клеток *MonoMac-6* и *THP-1Blue* установлено, что среди новых N'-замещенных гидразонов, синтезированных на основе 2(4)-гидроксibenзойной и изоникотиновой кислот, выявлены соединения, способные подавлять липополисахарид (ЛПС)-индуцированную продукцию противовоспалительных цитокинов IL-6 и TNF в клетках *MonoMac-6*. Это свойство представляется очень интересным, так как продукция IL-6 и TNF в клетках регулируется различными механизмами. По способности гидролизовать синтетический субстрат *N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin* (*Calbiochem*) установлена ингибирующая активность в отношении эластазы нейтрофилов человека N'-замещенных гидразонов на основе 2(4)-гидроксibenзойной кислоты. Испытанные соединения рекомендованы для изучения их активности в других противовоспалительных тестах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP14869941).

## Список литературы

- 1 О.А. Nurkenov, Zh.B. Satpaeva, S.D. Fazylov, A.M. Gazaliev, *N-Acylhydrazides and Their Derivatives*, Glacir, Karaganda, 2017, 144с. (ISBN 978-601-7836-94-8)
- 2 L. Popolek, A. Biernasik, A. Berecka, A. Gumieniczek, A. Malm, M. Wules, *New hydrazide-hydrazones of isonicotinic acid: synthesis, lipophilicity and in vitro antimicrobial screening*, *Chemical biology and drug design*, 91 (2018) 915. (<https://doi.org/10.1111/cbdd.13158>)
- 3 М.Е. Коньшин, Б.Я. Сыропятов, А.Л. Ефремов и др., *Хим.-фарм. журн.*, 45(8), 26 – 27 (2011).
- 4 М.В. Павлова, А.И. Михалев, М.Е. Коньшин и др., *Хим.-фарм. журн.*, 33(8), 18 – 19 (1999).
- 5 J.E. Sherwin, J.R. Sobenes, in: *Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation*, L.A. Kaplan, A.J. Pesce, and S.C. Kazmierczak (eds.), Mosby Year Book, St. Louis Missouri (1996), pp. 505 – 527.
- 6 А.С. Tweedale, *J. Epidemiol. Community Health.*, 65(6), 475 – 476 (2011).
- 7 М.Ю. Еропкина, Е.М. Еропкина, *Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов*, Морсар АВ, Санкт-Петербург (2003), с. 23.
- 8 С.Г. Романова, Г.А. Серебrenникова, А.А. Штиль, *Вестник МИТХТ*, 3(5), 101 – 105 (2008).
- 9 С.Д. Фазылов, О.А. Нуркенов, Т.С. Животова и др., *Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология*, № 1, 6 – 13 (2013).
- 10 Ж.Б. Сатпаева, О.А. Нуркенов, С.Д. Фазылов и др., *Тез. докл. II Межд. Казахстанско-Российской конф. по химии и хим. технологии*, Караганда (2012), 1, сс. 448 – 450.
- 11 О.А. Нуркенов, С.Д. Фазылов, Ж.Б. Сатпаева и др., *Журн. общей химии*, 84(9), 1574–1576 (2014).
- 12 С.Д. Фазылов, Д.П. Хрусталеv, Г.Т. Хамзина и др., *Вестник КазНУ*, 2, 46 – 49 (2008).
- 13 L. Crocetti, I.A. Schepetkin, A. Cilibrizzi, et al., *J. Med. Chem.*, 56, 6259-6272 (2013).
- 14 М.Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медицинская литература, Ленинград (1963).
- 15 Е.О. Данченко, *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, № 2, 22 – 31 (2012).
- 16 P.J. Johnson, in: *Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects*, W. J. Marshall and S. K. Bangert (eds.), Churchill livingstone, London (1995), pp. 237 – 256.
- 17 M.G. Sturgill and G.H. Lambert, *Clinical Chemistry*, 43(8B), 1512 – 1526 (1997).
- 18 С.В. Thompson, *Science*, 267, 1457-1462 (1995).
- 19 А.А. Ярилин, *Иммунология*, № 6, 10 – 23 (1996).
- 20 С.Е. Северин, А.В. Родина, *Успехи биологической химии*, 46, 43 – 64 (2006).

**Раздел 5. «Химия»**

С.Д. Фазылов, О.А. Нуркенов, Р.Е.Бакирова, С.К. Кабиева, А.Ж. Мендибаева

**Адамның нейтрофил эластазасына қатысты N'-алмастырылған гидразондардың 2(4)-гидроксibenзой және изоникотин қышқылдарының ингибиторлық белсенділігінің кейбір механизмдері**

MonoMac-6 және THP-1Blue жасушаларының адам моноциттік желілерінің дақылдарындағы қабынуға қарсы және цитоуыттылық белсенділікке *in vitro* зерттеулер нәтижесінде 2(4)-гидроксibenзой және изоникотин қышқылдары негізінде синтезделген жаңа N'-алмастырылған гидразондар арасында липополисахаридті (ЛПС) тежеуге қабілетті қосылыстар анықталды, қабынуға қарсы препараттардың индукцияланған өндірісі MonoMac-6 жасушаларындағы IL-6 және TNF цитокиндері. N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin (Calbiochem) синтетикалық субстратын гидролиздеу қабілеті бойынша 2(4)-гидроксibenзой қышқылына негізделген N'-алмастырылған гидразондардың адам нейтрофилдерінің эластазасына қатысты тежегіш белсенділігі анықталды.

*Түйінді сөздер:* N'-алмастырылған гидразондар, 2-және 4-гидроксibenзой, N-морфолил сірке және изоникотин қышқылдары, қабынуға қарсы белсенділік, цитоуыттылық.

S. D. Fazylov, O. A. Nurkenov, R.E. Bakirova, S.K. Kabieva, A.Zh. Mendibayeva

**Inflammatory and cytotoxic effects N'-substituted hydrazone based isonicotinic, 2(4)-hydroxybenzoic and n-morfolilacetic acid**

As a result of *in vitro* studies on anti-inflammatory and cytotoxic activity on cultures of human monocytes cell lines *MonoMac-6* and *THP-1Blue*, it was found that among the new N'-substituted hydrazones synthesized on the basis of 2(4)-hydroxybenzoic and isonicotinic acids, compounds were identified, capable of inhibiting lipopolysaccharide (LPS)-induced production of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF in *MonoMac-6* cells. According to the ability to hydrolyze the synthetic substrate *N-methylsuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amino-4-methylcoumarin* (*Calbiochem*), an inhibitory activity against elastase of human neutrophils of N'-substituted hydrazones based on 2(4)-hydroxybenzoic acid was established.

*Keywords:* N'-substituted hydrazones, 2- and 4-hydroxybenzoic, N-morfolilacetic and isonicotinic acids, inflammatory activity, cytotoxicity.

References

- 1 O.A. Nurkenov, Zh.B. Satpaeva, S.D. Fazylov, A.M. Gazaliev, N-Acylhydrazides and Their Derivatives, Glacir, Karaganda, 2017, 144s. (ISBN 978-601-7836-94-8)
- 2 L. Popolek, A. Biernasiak, A. Berecka, A. Gumieniczek, A. Malm, M. Wules, New hydrazide-hydrazones of isonicotinic acid: synthesis, lipophilicity and *in vitro* antimicrobial screening, *Chemical biology and drug design*, 91 (2018) 915. (<https://doi.org/10.1111/cbdd.13158>)
- 3 M.E. Kon'shin, B.YA. Syropyatov, A.L. Efremov i dr., *Him.-farm. zhurn.*, 45(8), 26 – 27 (2011).
- 4 M.V. Pavlova, A.I. Mihalev, M.E. Kon'shin i dr., *Him.-farm. zhurn.*, 33(8), 18 – 19 (1999).
- 5 J.E. Sherwin, J.R. Sobenes, in: *Clinical Chemistry. Theory, analysis, and correlation*, L.A. Kaplan, A.J. Pesce, and S.C. Kazmierczak (eds.), Mosby Year Book, St. Louis Missouri (1996), rr. 505 – 527.
- 6 A.C. Tweedale, *J. Epidemiol. Community Health.*, 65(6), 475 – 476 (2011).
- 7 M.YU. Eropkin, E.M. Eropkina, *Kul'tury kletok kak model'naya sistema issledovaniya toksichnosti i skrininga citoprotekturnykh preparatov*, Morsar AV, Sankt-Peterburg (2003), s. 23.
- 8 S.G. Romanova, G.A. Serebrennikova, A.A. SHtil', *Vestnik MITHT*, 3(5), 101 – 105 (2008).

**Раздел 5. «Химия»**

- 9 S.D. Fazylov, O.A. Nurkenov, T.S. ZHivotova i dr., *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya*, № 1, 6 – 13 (2013).
- 10 ZH.B. Satpaeva, O.A. Nurkenov, S.D. Fazylov i dr., *Tez. dokl. II Mezhd. Kazahstansko-Rossijskoj konf. po himii i him. tekhnologii*, Karaganda (2012), 1, ss. 448 – 450.
- 11 O.A. Nurkenov, S.D. Fazylov, ZH.B. Satpaeva i dr., *ZHurn. obshchej himii*, 84(9), 1574 –1576 (2014).
- 12 S.D. Fazylov, D.P. Hrustalev, G.T. Hamzina i dr., *Vestnik KazNU*, 2, 46 – 49 (2008).
- 13 L. Crocetti, I.A. Schepetkin, A. Cilibrizzi, et al., *J. Med. Chem.*, 56, 6259-6272 (2013).
- 14 M.L. Belen'kij, *Elementy kolichestvennoj ocenki farmakologicheskogo effekta*, Medicinskaya literatura, Leningrad (1963).
- 15 E.O. Danchenko, *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*, № 2, 22 – 31 (2012).
- 16 P.J. Johnson, in: *Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects*, W. J. Marshall and S. K. Bangert (eds.), Churchill livingstone, London (1995), rr. 237 – 256.
- 17 M.G. Sturgill and G.H. Lambert, *Clinical Chemistry*, 43(8V), 1512 – 1526 (1997).
- 18 C.B. Thompson, *Science*, 267, 1457-1462 (1995).
- 19 A.A. YArilin, *Immunologiya*, № 6, 10 – 23 (1996).
- 20 S.E. Severin, A.V. Rodina, *Uspekhi biologicheskoy himii*, 46, 43 – 64 (2006).