

СИДОРОВА МАРТА ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ
ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ
АМИНАМИ КАК КОМПОНЕНТОВ ГИДРОФИЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2015

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор **Мельникова Нина Борисовна**

Официальные оппоненты:

Шорманов Владимир Камбулатович – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, профессор кафедры.

Сысоева Мария Александровна – доктор химических наук, профессор, Федеральное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», кафедра пищевой биотехнологии, профессор, заведующая кафедрой.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 5 июня 2015 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фитиновая кислота, содержащаяся в зерновых и бобовых культурах (до 85% от общего содержания фосфора), семенах масличных культур, пыльце, клубнях, орехах, представляет интерес как компонент новых лекарственных средств (ЛС), поскольку проявляет свойства регулятора многих метаболических процессов, в том числе нормализации кальций-фосфорного и ионного баланса, а также является экзогенным антиоксидантом (P.T.Hawkins, 1993; K.-M.Lee, 2012). Доказана антиоксидантная и противоопухолевая активность фитиновой кислоты в эксперименте на животных при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, молочной и предстательной желез (A.M.Shamsuddin, 1995,1996), а также ингибирование перекисного окисления липидов при поражении клеток кишечника и печени (S.Muraoka, 2004; A.Zajdel, 2013) и регулирование действия ксантиноксидазы (S.Muraoka, 2004).

Фитиновая кислота – 1,2,3,4,5,6-гексакис(дигидрофосфат) мио-инозита ($\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, I), характеризуется 12 ионизируемыми протонами и может взаимодействовать как с многовалентными катионами (замещение и хелатирование с такими ионами металлов, как Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ba^+ и др. (C.De Stefano, 2002; A.V.F.Nielsen, 2013), протонированными аминами, так и с белками (C.De Stefano, 2004; S.Yu, 2012).

Природные фитаты являются производными кислоты I, а кальциево-магниевые соли I называют фитином (E.Graf, 1987). Плохая растворимость фитатов является причиной ухудшения биодоступности I как компонента пищи (S.Yu, 2012).

Для повышения биодоступности фитатов их можно применять в виде комплексных соединений с аминами, образующимися в результате донорно-акцепторного и нековалентного взаимодействий. Стабильность фитатов аминов является довольно высокой и они способны защищать I от взаимодействия с кальцием в организме человека.

Представляло интерес получить новые лекарственные средства на основе комплексов фитиновой кислоты и аминов-метаболических широкого спектра действия. Были выбраны: ксимедон (1-(β -оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин) из классов оксопиримидинов, проявляющий антиоксидантные, противовоспалительные и репаративные свойства; глюкозамин (гидрохлорид 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкопиранозы), относящийся к аminosахарам и способствующий уменьшению деградации коллагена хряща, развивающейся в результате избыточной перекисной окисления липидов и окисления белков (M.L.Tiku, 2007); трисамин (трис-оксиметил-аминометан), изоосмотичный плазме крови и обладающий буферными свойствами (М.Д.Машковский, 2012).

Следует ожидать, что фитаты аминов способны не только обуславливать синергетическое антиоксидантное действие фитиновой кислоты, но и обеспечивать более полную коррекцию оксидативного стресса и метаболических процессов при различных заболеваниях, в том числе коллаген-ассоциированных, а также способны выполнять роль вектора доставки ЛВ и обуславливать хорошую биодоступность при сохранении других ценных свойств фитиновой кислоты.

Степень разработанности темы. В настоящее время, исследования, посвященные изучению комплексообразования фитиновой кислоты с органическими лигандами, рассматривают только процессы взаимодействия фитиновой кислоты и её солей с веществами, входящими в состав продуктов питания, а также органическими соединениями организма человека и животных (Carli L.D., 2009; Midorikawa K., 2001; Nielsen A.V.F., 2013; Thompson D.B., 1982; Veiga N., 2006; Yu S., 2012). Фитиновая кислота образует комплексы с белками, прочность которых зависит от pH (Lönnerdal B., 2002). В работах Stefano C. De (2002, 2004) изучено взаимодействие биогенных аминов с фитат анионом в широком интервале pH и показана возможность образования прочно связанных комплексов. Свободная энергия Гиббса ($-\Delta G_0$), рассчитанная на одну протонированную аминогруппу равна $4,0 \pm 0,2$ кДж/моль, что характеризует, главным образом, нековалентное взаимодействие фитиновой кислоты с биогенными аминами. Авторами обсуждается вклад электростатических взаимодействий, водородных связей при образовании комплексов и прогнозируются зависимость прочности комплексов от заряда аниона.

Целью настоящей работы является исследование физико-химических и антиоксидантных свойств комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами и разработка состава гидрофильного геля комплексов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

1. Изучение физико-химических свойств комплексов фитиновой кислоты и биологически активных аминов – ксимедона, глюкозамина, трисамина в водной среде и в твёрдом состоянии.
2. Разработка методов идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты и аминов.
3. Оценка антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты глюкозамина, ксимедона и трисамина по показателям липопероксидации, общей антиоксидантной активности и активности супероксиддисмутазы в исследованиях *in vitro* в норме и при окислительном стрессе.

4. Разработка состава и лабораторной методики приготовления гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты и амина, обладающего наибольшей антиоксидантной активностью, исследование физико-химических и фармакологических свойств геля в эксперименте на крысах.

5. Разработка методов анализа компонентов геля комплекса фитиновой кислоты и амина.

6. Разработка проекта фармакопейной статьи на новый противоожоговый гель «Ксифит».

Научная новизна.

• Впервые получены и изучены физико-химические свойства комплексов фитиновой кислоты с биологически активными аминами – ксимедоном, трисамином и с глюкозамина гидрохлоридом. Установлено, что катионоидной частью комплексов являются протонированные амины, а инозитольный цикл фитиновой кислоты сохраняет свою структуру при стехиометрии амин:фитиновая кислота в комплексах от 5:1 до 10:1. Экспериментально доказана высокая антиоксидантная активность комплексов *in vitro* в плазме крови человека.

• Впервые разработан состав нового противоожогового гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты и ксимедона на основе натрия гиалуроната, эффективность которого доказана в эксперименте на крысах.

• Разработаны методики анализа (идентификация и количественное определение) компонентов геля.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные методики анализа компонентов противоожогового гидрофильного геля комплексов фитиновой кислоты и ксимедона внедрены в ООО «Созидатель». Разработан проект фармакопейной статьи на новый противоожоговый гель (акт внедрения от 15.01.2015 г.).

Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акты внедрения от 23.12.2014 г.), Государственном бюджетном образовательном учреждении среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж» (акт внедрения от 19.12.2014 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе природных и синтетических веществ».

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты физико-химических исследований (ИК- УФ- ^1H - ^{13}C - ^{31}P - ЯМР спектроскопия, потенциометрическое титрование, элементный анализ на С, N, H, P) по доказательству состава комплексов фитиновой кислоты и аминов – ксимедона, глюкозамина, трисамина.

2. Результаты по установлению идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты и ксимедона в растворе.

3. Оценка антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты и аминов (ксимедона, глюкозамина, трисамина) *in vitro* на плазме крови человека.

4. Экспериментальное обоснование оптимального состава гидрофильного противоожогового геля.

5. Методика анализа компонентов гидрофильного геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном.

6. Результаты по разработке норм качества противоожогового гидрофильного геля.

7. Оценка репаратных свойств противоожогового геля комплекса фитиновой кислоты с ксимедоном.

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской молодежной научной школе «Биоматериалы и нано-биоматериалы: актуальные проблемы и вопросы безопасности» (Казань, 2012); X Всероссийской сессии молодых учёных и студентов (Нижний Новгород, 2013); Восьмой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2014); VI Международной научной конференции «Наука в современном обществе» (Ставрополь, 2014); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (Уфа, 2015).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 4 статьях в отечественных журналах и в форме тезисов докладов 5 конференций.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований комплексов фитиновой кислоты с аминами в растворах, в твёрдом состоянии и в лекарственной форме. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на предложенный состав геля.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 184 наименования отечественных и зарубежных авторов и приложения. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 48 рисунков, 5 схем.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов и методов исследования

Материалы и реактивы: «Инозит гексафосфорная кислота» (40-50 wt%; «Acros organics», New Jersey, USA); Ксимедон (НПП ФГУП «Кристалл», г. Дзержинск Нижегородской области); Глюкозамина гидрохлорид (98+%; «Acros organics», New Jersey, USA); Трис-(оксиметил)-аминометан (Trometamol; «Merck KGaA», Darmstadt, Germany); Натрия гиалуронат (порошок из стекловидного тела быка, 99,8%, 1,63 MDa; CPN Spol.s.r.o, The Czech Republic; «Sigma», Product Number: H7630); Метилпарабен (метил-4-гидроксибензоат, $\geq 99.0\%$ (GC); Ueno Fine Chemicals Industry, India; «Sigma-Aldrich», Product Number: 54750); спирт этиловый (медицинский, 95%; ООО «Гиппократ», г. Самара); пропанол-2 («ХЧ»; ТУ 2632-015-11291058-95, ЗАО «Экос-1», г. Москва); вода очищенная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 $\mu\text{См}$.

Общая методика получения комплексов фитиновой кислоты и аминов. Комплексы получали последовательным высаливанием спиртами (пропанол-2, этанол) из смесей концентрированных растворов фитиновой кислоты и концентрированных растворов аминов на ледяной бане при 0°C. Продукты представляли собой легкие белые аморфные порошки, плавящиеся с разложением при температурах выше 100°C. Максимальный выход продукта $\approx 50\%$.

Состав гидрофильных гелей комплексов фитиновой кислоты и ксимедона (%):

2,5-6,0 фитиновой кислоты; 1,0-10,0 ксимедона; 0,8-1,0 натрия гиалуроната ($M_r=1,63$ MDa); 0,1 метилпарабена; 1,0 этанола (95%); вода – остальное до 100.

Методы исследования и приборы: Электронные спектры поглощения были получены на приборе «Bio line Specord S-100» (Analytik Jena, Germany) в области 190-600 нм, толщина кварцевой кюветы 10 мм; ИК-спектры были сняты на ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) в области $4000-500\text{ см}^{-1}$ в виде смесей с KBr; ВЭЖ-хроматограммы были получены на ВЭЖ-хроматографе «LC-10Avp» (Shimadzu, Japan) в обращено-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки и UV-Vis-детектированием, колонка Discovery C18 (25 см x 4.6 мм, 5 μm , Supelco); потенциометрическое титрование проводили на электронном стационарном pH-метре «pH-150M» фирмы РУП (Гомель, Белоруссия); спектры ЯМР ^{13}C и ^1H регистрировались на ЯМР-спектрометре «Agilent DD2 400» (Agilent Technologies, USA) в D_2O на рабочей частоте 101 и 400 МГц соответственно; спектры ^{31}P -ЯМР регистрировались на импульсном ЯМР-спектрометре «Bruker AM500» (Bruker Daltonik GmbH, Germany) в D_2O на рабочей частоте 202,46 МГц; элементный анализ на содержание С, Н, N , проводили на анализаторе «VarioMICRO» (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany); осмотическую активность гелей (кинетику выделения действующих веществ из гидрогеля) изучали методом диализа через полунепроницаемую мембрану (И.М. Перцев, 1979). В качестве мембраны использовали целлофановую мембрану (45 ± 1) мкм.

Медико-биологические исследования антиоксидантной активности комплексов фитиновой кислоты и биологически активных аминов *in vitro* проводили на цельной консервированной крови в соответствии с нормативными документами (ГОСТы: Р ЕН 13641-2010; ИСО 22442-1-2011; ИСО 22442-2-2011) в норме и в условиях окислительного стресса, вызванного озоном. Для каждого эксперимента использовали кровь, полученную от 10 доноров (по 25 мл), которую разделяли на порции (интактную, на которую не оказывали воздействий, и опытные). Для моделирования окислительного стресса через опытные порции крови барботировали озono-кислородную смесь (100 мл, концентрация озона – 5000 мкг/л) в течение 5 мин., одну оставляли как контроль при окислительном стрессе, в остальные добавляли водные растворы исследуемых субстанций. Содержимое пробирок осторожно перемешивали в течение 1 мин., затем выдерживали смесь в течение 5 мин. и центрифугировали. Полученную сыворотку (плазму) анализировали хемилюминесцентным методом.

Исследования антиоксидантных свойств фитиновой кислоты и ее смесей с трисамином и ксимедоном проводились на цельной крови, полученной путём декапитации головы крысы, в соответствии с нормативными документами (А.Н. Миронов, 2012). *Уровень малонового диальдегида* (МДА) в плазме крови определяли с помощью тест-набора (ЗАО «АГАТ»). *Хемилюминесцентный анализ* проб, индуцированных по реакции Фентона, на общую антиоксидантную активность проводили на приборе БХЛ-06 (Россия). Фиксировали величины: I_{\max} (mV), характеризующий максимальную вспышку хемилюминесценции; S (mV) – суммарная хемилюминесценция за 30 сек; tga_2 , показывающий скорость нормализации процессов свободно-радикального окисления; I_{\max}/S – фактор антиоксидантной активности. *Эффективность гидрофильных гелей* исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (А.Н. Миронов, 2012) на 10 самцах крыс линии Вистар массой ($M \pm s$) $200 \pm 2,6$ г, при его наружном применении в течение 10 дней в сравнении с препаратом геля, содержащего ксимедон в дозе 10 мг/см^2 . Контроль – Декспантенол, гель для наружного применения 4%.

Термическую травму кожи III степени площадью 235 мм^2 у крыс (7% от общей поверхности тела) моделировали путем нанесения ожога (около 300°C , в течение 1 сек.) на депилированную кожу поясничного отдела крыс. Перед проведением данной процедуры крыс наркотизировали нембуталовым наркозом в дозе 35-40 мг/кг.

Статистическую обработку проводили по программе Statistica 7,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и исследование физико-химических свойств комплексов фитиновой кислоты и биологических аминов в водной среде и в твёрдом состоянии

Реакции с переносом протона фитиновой кислоты ($\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, I) как относительно сильной органической кислоты (pK_a от 0.5 до 2.0), со слабыми органическими основаниями – ксимедоном (Кси, II) и глюкозамином (ГА, III), а также с основанием средней силы – трисамином (ТА, IV) были изучены методом потенциометрического титрования, ИК-, ^{13}C - и ^1H -ЯМР спектроскопией выделенных твёрдых продуктов.

1.1. Взаимодействие $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси в водной среде и физико-химические свойства комплексов фитиновой кислоты и ксимедона

Потенциометрическое титрование 5% раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ (0,076 М, pH 2.1) показало, что зависимость $\text{pH} = f(V_{\text{кси}})$ имеет несколько неявно выраженных ступеней, аналогичных кривым титрования полифосфорных кислот.

Приближенная оценка рКа с использованием полученных данных даёт величину рКа, равную 3.25.

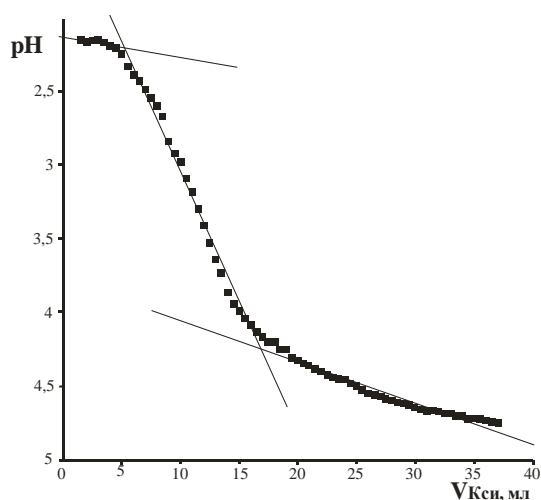


Рис. 1. Зависимость $pH=f(V_{KCl})$ при титровании 0,076 М раствора $InsP_6H_{12}$ 1,19 М раствором Кси.

Сопряженная Кси кислота может образовываться как по реакции переноса протона от диссоциированной $InsP_6H_{12}$ в исходном водном растворе (1а), так и по таким механизмам, как нековалентное связывание другого гидроксила в фосфатной группе и взаимодействие за счёт водородных связей и электростатических сил.

Реакция переноса протона для Кси была также изучена методом УФ-спектроскопии в растворах HCl и $InsP_6H_{12}$.

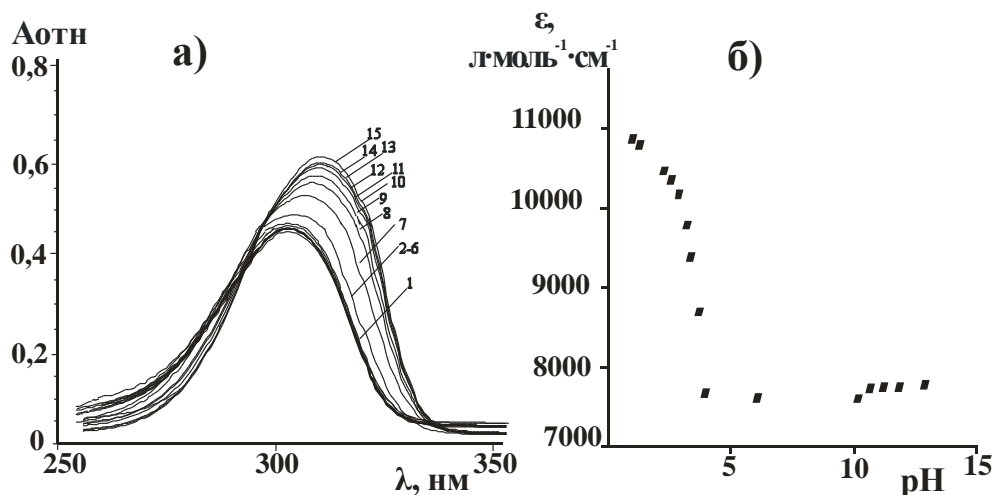


Рис. 2. Данные УФ-спектров поглощения $5,9 \cdot 10^{-5}$ М раствора Кси в водных растворах при различных рН: а) $A=f(\lambda)$; б) $\epsilon=f(pH)$.

№ кривой	1	2	3	4	5	6	7	8
рН	6,12	10,16	10,67	11,24	11,86	12,86	3,99	3,72
λ , нм	299,7	299,8	299,8	299,8	299,7	299,7	302,8	305,3
ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	7627	7605	7733	7754	7759	7780	7667	8686
№ кривой	9	10	11	12	13	14	15	
рН раствора	3,40	3,22	2,92	2,62	2,31	1,33	1,00	
λ , нм	307,0	307,6	308,1	308,5	308,7	308,8	309,0	
ϵ , л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	9391	9777	10173	10357	10469	10788	10868	

В кислых средах (HCl) наблюдается батохромный сдвиг длины волны поглощения C=O группы Кси с 299,9 нм (вода) до 309,0 нм, а в щелочных средах (NaOH) максимум положения полосы остаётся неизменным, при этом интенсивность поглощения резко увеличивается с ростом pH (рис.2 а,б).

Анализ УФ-спектров взаимодействия Кси и $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ показал, что в спектре, даже при значительном молярном избытке – Кси : $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ = 14:1, наблюдается только основная полоса с $\lambda_{\text{max}} = 309$ нм, характерная для протонированной формы Кси (рис. 3).

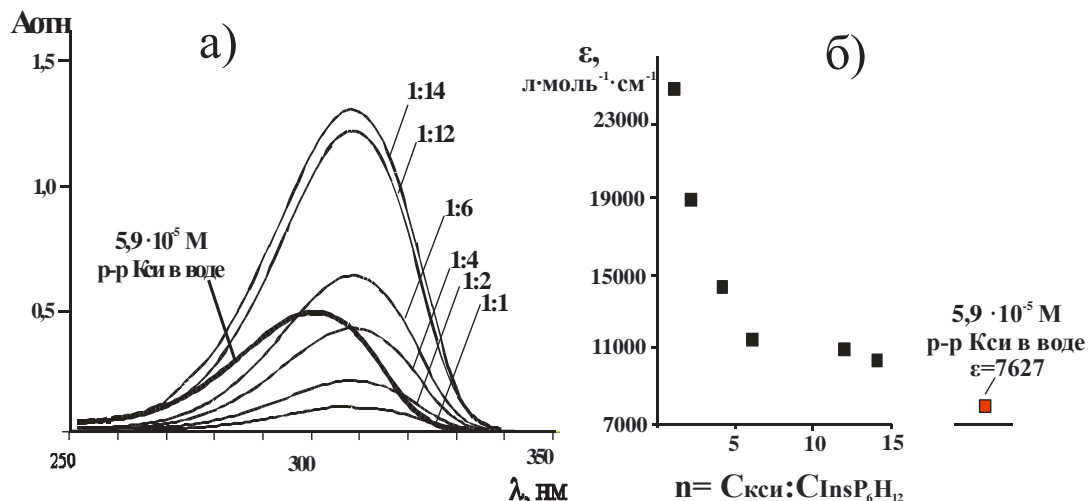


Рис. 3. УФ-спектры поглощения $1 \cdot 10^{-5}$ М растворов $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси при различных молярных соотношениях n (табл.2): а) $A=f(\lambda)$; б) $\epsilon=f(n)$.

№ кривой	$C_{\text{Кси}}, \text{M} \cdot 10^5$	$n=C_{\text{Кси}}:C_{\text{InsP}_6\text{H}_{12}}$	$A_{\text{отн.}}$	$\lambda_{\text{max}}, \text{нм}$	$\epsilon, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
1	1,10	1:1	0,2758	309,6	25073
2	2,05	2:1	0,3935	309,2	19195
3	4,03	4:1	0,5941	309,1	14742
4	6,02	6:1	0,7075	309,0	11752
5	12,01	12:1	1,3414	309,1	11169
6	14,01	14:1	1,5096	309,1	10775
7	5,90	-	0,4500	299,9	7627

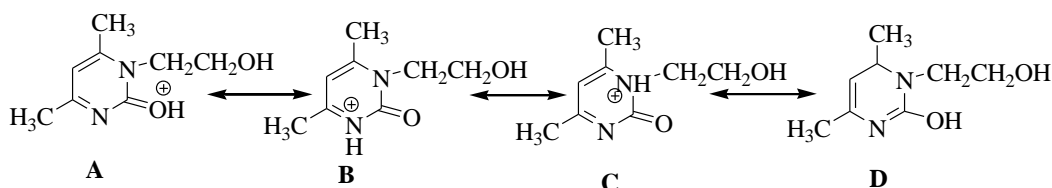
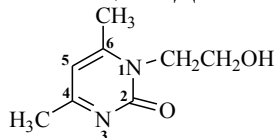


Рис. 4. Возможные структуры протонированной формы Кси.

Характер протонирования ксимедона $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ можно оценить по твёрдому продукту – комплексу фитиновой кислоты и Кси, полученному осаждением пропанолом-2 из реакционной смеси. Данные ПМР, ^{13}C -ЯМР и ИК-спектроскопии сопоставлены со спектрами Кси и Кси гидрохлорида $[\text{КсиH}^+]\text{Cl}^-$ (табл.1). Наиболее существенные изменения наблюдаются у атомов углерода карбонильной группы

соединений комплекса фитиновой кислоты с Кси (условно Кси фитат) и $[\text{КсиН}^+]\text{Cl}^-$ по отношению к Кси (в ^{13}C -ЯМР спектрах разница в химических сдвигах 25 м.д). Сигналы ^1H и ^{13}C -ЯМР спектров Кси фитата и гидрохлорида практически совпадают, но отличаются от исходного Кси, что свидетельствует о близкой структуре катионоидной части комплекса.

Таблица 1. Данные ЯМР спектров Кси, $[\text{КсиН}^+]\text{Cl}^-$ и Кси фитата (D_2O)



Группа	$-\text{CH}_3$ (6)	$-\text{CH}_3$ (5)	$\text{N}-\text{CH}_2$ (1)	$-\text{CH}_2-\text{OH}$	CH	$\text{C}=\text{C}$ (4)	$\text{C}=\text{C}$ (6)	$\text{C}=\text{O}$ (2)
^{13}C ЯМР, δ , м.д.								
Кси	20,1	23,1	47,9	58,4	108,3	160,6	157,9	175,5
$[\text{КсиН}^+]\text{фитат}$	19,5	23,6	49,4	57,8	108,2	171,9	168,4	148,9
$[\text{КсиН}^+]\text{Cl}^-$	19,4	21,7	49,4	57,8	108,3	172,1	168,5	149,0
^1H ЯМР, δ , м.д.								
Кси	2,29	2,47	3,89 3,86 3,84	4,16 4,14 4,11	6,48	-	-	-
$[\text{КсиН}^+]\text{фитат}$	2,55	2,71	3,91 3,92 3,93	4,30 4,31 4,32	6,82	-	-	-
$[\text{КсиН}^+]\text{Cl}^-$	2,56	2,74	3,96 3,93 3,91	4,35 4,33 4,30	6,84	-	-	-

Структуру КсиН^+ подтверждают также ИК-спектры комплекса фитиновой кислоты и Кси, содержащие все валентные колебания, характерные для его протонированной формы. В спектрах появляются полосы P-O связи 889 см^{-1} , характерные для аниона $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ ($\Delta\nu=2\text{ см}^{-1}$, относительно исходной $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$). Колебания фосфорильной группы проявлялись в виде полосы 1130 см^{-1} , а также в области 1616 см^{-1} ($\Delta\nu=27\text{ см}^{-1}$). Кроме того, в спектрах выявлены полосы валентных колебаний C-O (эфирной) связи – $1130\text{--}1030\text{ см}^{-1}$.

Доказательством сохранения структуры инозитного цикла, как носителя шести фосфатных групп в комплексах фитиновой кислоты и Кси, является селективная реакция с реактивом Вэйда – сульфосалицилатным комплексом Fe (III), в которой $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ количественно хелатирует ион Fe по типу комплексообразования «гость-хозяин». Изменение оптической плотности (A) реактива Вэйда в присутствии комплексов, полученных при различных молярных соотношениях (от 1:1 до 1:14) при $\lambda_{\text{max}} = 500 \pm 3\text{ нм}$ не изменялось и соответствовало значению A для $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$.

Полученные нами данные позволили предположить, что в водных растворах даже при избытке Кси, вероятно, могут образовываться ионные и Н-ассоциированные агрегаты, в которых катионоидная часть представлена КсиН^+ .

1.2. Комплексы фитиновой кислоты с глюкозамина гидрохлоридом и трисамином

Потенциометрическое исследование взаимодействия глюкозамина гидрохлорида ($[\text{ГАН}^+]\text{Cl}^-$) и $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в водных растворах показало, что изменение рН исходного 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ при медленном титровании 0,460 М раствором $[\text{ГАН}^+]\text{Cl}^-$ происходило ступенчато от рН 2,1 (рКа для диссоциации по первой ступени $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ равно 1,90) до рН 1,7 (рис. 6, кривая 1). Характер кривой, полученной при титровании $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ ГА гидрохлоридом равными порциями с остановками для установления равновесия, показывает, что скорость изменения рН непостоянна. Основное влияние на титрование $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, вероятно, оказывает присутствие в системе хлорид-иона в виде HCl , способствующего стабилизации депротонированной формы. О появлении в системе HCl также свидетельствует контрольный опыт добавления в раствор $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 3,5 мл 0,460 М раствора HCl и снижения рН раствора до той же самой величины – рН 1,7 (рис. 5, кривая 2).

В отличие от этого, вид кривой титрования $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ трисамином близок к кривой титрования кислоты ксимедоном, что свидетельствует об образовании сопряженной трисамину кислоты вследствие реакции переноса протона.

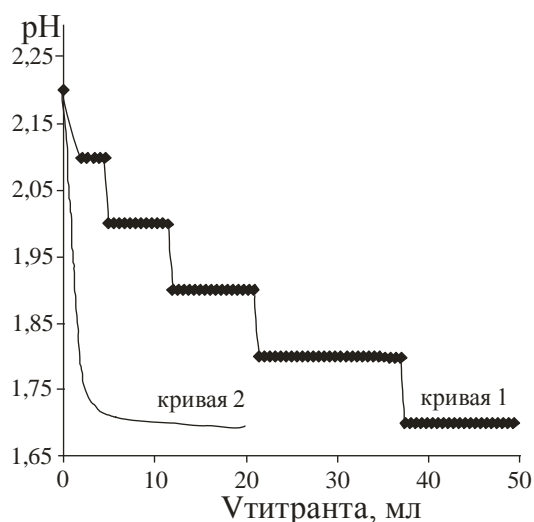


Рис. 5. $\text{pH}=\text{f}(\text{V}_{\text{титранта}})$ при титровании 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 0,460 М раствором $[\text{ГАН}^+]\text{Cl}^-$ (кривая 1) и 0,460 М HCl (кривая 2).

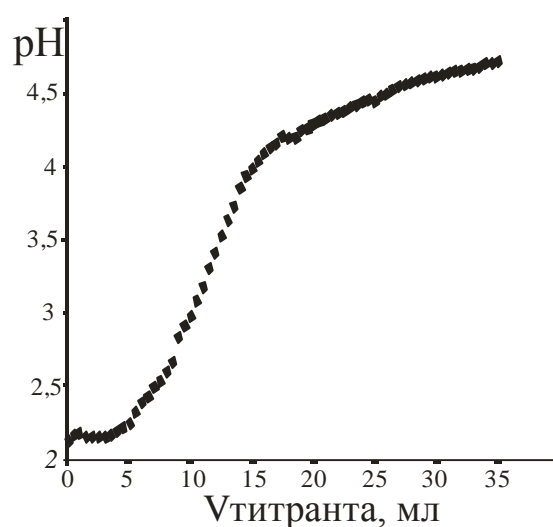


Рис. 6. $\text{pH}=\text{f}(\text{V}_{\text{титранта}})$ при титровании 0,076 М раствора $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ 0,830 М раствором ГА.

Можно предположить, что в случае комплексов фитиновой кислоты и ГА, наиболее вероятно, образуются комплексы солевого типа, стабилизированные хлорид-ионом, что согласуется с литературными данными (О.В.Труфанов, 2011), в отличие от комплексов фитиновой кислоты и ТА, в образовании которых большой вклад вносит донорно-акцепторное взаимодействие и водородное связывание. При высаливании этанолом комплексов фитиновой кислоты и ГА, комплекс имеет стехиометрию 5:1, что подтверждается элементным анализом $\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$ (табл. 2).

Таблица 2. Элементный анализ глюкозамина фитата

Система	С [%]		Н [%]		N [%]		Р [%]	
	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.	Рассч.	Эксп. найд.
Комплекс фитиновой кислоты и ГА ($\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$)	28,70	28,62	6,04	5,98	4,40	4,13	1,19	1,22
Абс. откл.	0,540		0,069		0,080		0,090	
Отн.откл. RSD%	1,900		1,157		1,920		1,592	

^{31}P ЯМР спектры комплексов фитиновой кислоты с ГА и ТА близки и позволяют предположить структуры с неэквивалентными фосфатными группами. На рис. 8а это наблюдение проиллюстрировано на примере комплекса с ГА. Значения химических сдвигов лежат в интервале от -1 до +1, что является типичным для фосфатных эфиров биогенных соединений (рис. 7б).

Аналогичный вид ^{31}P -ЯМР спектров имели комплексы фитиновой кислоты с Кси и ТА.

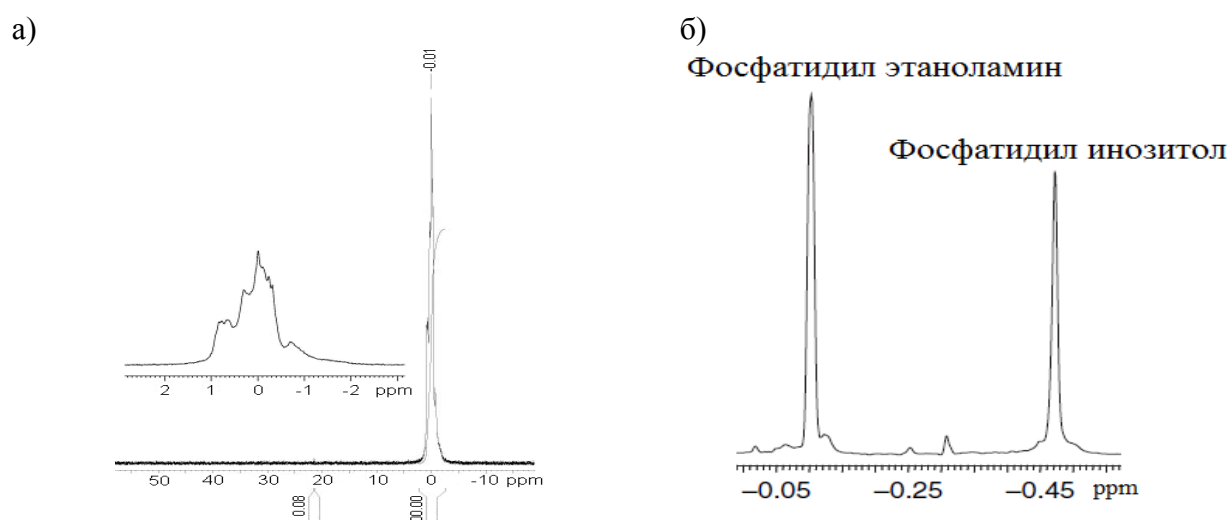


Рис. 7. ^{31}P ЯМР-спектры: а) комплексы фитиновой кислоты и глюкозамина; б) лецитиновая фракция сои (D.-L.M. Tzou, 2005).

ГА и, соответственно, его протонированные формы, выступающие в качестве лиганда в комплексах, существуют в виде α - и β -эпимеров, что находит отражение в ^{13}C ЯМР спектрах. Основные сигналы (δ , ppm) $[\text{ГАН}^+\text{Cl}^-]$ (С1 α -эпимер 92,6 и β -эпимер 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 69,7; 60,5; 60,3; 55,7; 54,3) и комплексов фитиновой кислоты с ГА (С1 α -эпимер 92,6 и β -эпимер 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 60,4; 60,2; 56,6; 54,2) практически совпадали. ПМР спектр комплекса (D_2O) содержит следующие сигналы (δ , ppm): два т. 2,85, 2,87, 2,90; два д. 3,15, 3,16, 3,17, 3,18; мультиплет 3,32, 3,33, 3,34, 3,35, 3,86, 3,38; комплекс для двух эпимеров 3,53, 3,55, 3,58, 3,59, 3,61, 3,63, 3,64, 3,66, 3,67, 3,70, 3,71, 3,74, 3,76, 3,78, 3,79; д. 4,80, 4,82; д. 5,31, 5,32, которые близки с сигналами смеси эпимеров исходного $[\text{ГАН}^+\text{Cl}^-]$ (Qiu Cui, 2007). Из данных ЯМР спектров следует, что катионоидный фрагмент комплекса имеет близкую структуру с протонированной частью $[\text{ГАН}^+\text{Cl}^-]$. Аналогичным методом доказано существование протонированных форм ТА в катионоидной части комплексов фитиновой кислоты с ТА. Из основных сигналов ^{13}C ЯМР спектров (δ , ppm) ТА (63,20; 63,00; 62,79; 62,79; 56,51; 56,32; 56,11) и комплекса фитиновой кислоты с ТА (61,46; 61,25; 61,06; 59,35; 59,17; 58,95; 58,95) наблюдалось смещение полосы C-NH₂ ТА с 63 м.д. в сторону более протонированной формы 64 м.д. Сопоставление ^{13}C -ЯМР спектров комплекса и исходного ТА показало изменения у атомов углерода карбонильной группы: разница в химических сдвигах для комплекса составила почти 5 м.д.

Анализ ИК-спектров твёрдых продуктов реакции $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ с ГА и с ТА показал образование комплексов фитиновой кислоты с аминами (табл. 3).

Таблица 3. ИК-спектральные данные фитиновой кислоты ($\text{InsP}_6\text{H}_{12}$), глюкозамина гидрохлорида ($[\text{ГАН}^+\text{Cl}^-]$) и комплекса фитиновой кислоты и глюкозамина ($\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$)

Группа	Волновое число, см ⁻¹				
	$\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	$[\text{ГАН}^+\text{Cl}^-]$	Комплекс фитиновой кислоты и ГА ($\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$)	ТА	Комплекс фитиновой кислоты и ТА
ОН, ν	3320	3319	3354 3292	3346 3331 3290	3292
С-О спирт.	-	1094 1067 1038	1094 1059 1034	1066 1036 1024	1067 (ш)
NH ₃ ⁺ , δ	-	1584 1537	1585 1539	1589	1553
P-O, ν	889	-	891	-	898
P=O, ν	1643 1130	-	1618 1138	-	1618 1140

2. Антиоксидантные свойства комплексов фитиновой кислоты и биологически активных аминов.

В условиях *in vitro* на плазме крови человека методом биохемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона показано, что интенсивность свободно радикального окисления (СРО) умеренно увеличивается при введении в систему $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и её комплексов с аминами, что должно характеризовать усиление липопероксидации (табл.4).

Таблица 4. Показатели СРО плазмы крови.

Опыт	Интенсивность СРО по Фентону (ПОЛ)			Скорость нормализации СРО (АОА)
	Свето сумма вспышки (S, мВ·с)	Интенсивность вспышки (I _{max} , мВ)	K=I _{max} /S	tg α ₂
Контроль	9,7867 ± 0,0468	1,3117 ± 0,0393	0,1340 ± 0,0110	0,4200 ± 0,0630
$\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	13,4600 ± 0,0415	1,5293 ± 0,0327	0,1136 ± 0,0367	0,5473 ± 0,0438
ГА+ $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	11,9133 ± 0,0042	1,6760 ± 0,0438	0,1406 ± 0,0356	0,5643 ± 0,0057
ГА+ $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	12,4133 ± 0,0308	1,6440 ± 0,0251	0,1324 ± 0,0068	0,5452 ± 0,0470
Кси+ $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$	11,8000 ± 0,0420	1,3777 ± 0,0301	0,1167 ± 0,0443	0,5460 ± 0,0240

Однако скорость нормализации СРО, рассчитываемая как величина отношения $\text{tg}\alpha_2$ образца/ $\text{tg}\alpha_2$ контроля (в процентах) и определяемая нами как общая антиоксидантная активность (АОА) увеличивается (табл.4, рис.8).

Полученные результаты по СРО, вероятно, можно объяснить увеличением липопероксидации при использовании комплексов фитиновой кислоты и аминов, а также самой $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ в результате ответной реакции на интенсификацию свободнорадикального окисления (проявление проантиоксидантного эффекта). Однако, на наш взгляд, увеличение показателей интенсивности СРО, ответственных за ПОЛ, объясняется также ролью $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ как хелатора ионов железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) при инициации в реакции Фентона. Свойства $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ как хелаторов ионов железа были использованы нами при выборе доз препаратов для исследования, используя известную методику с железо-катехольным комплексом.

Более убедительно об антиоксидантных свойствах комплексов аминов свидетельствуют данные по активации активности СОД, ингибирующей образование супероксид-анион радикала, по методу Т.В. Сироты. Показано достоверное увеличение каталитической активности СОД как в присутствии $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$, так и её комплексов (рис. 8).

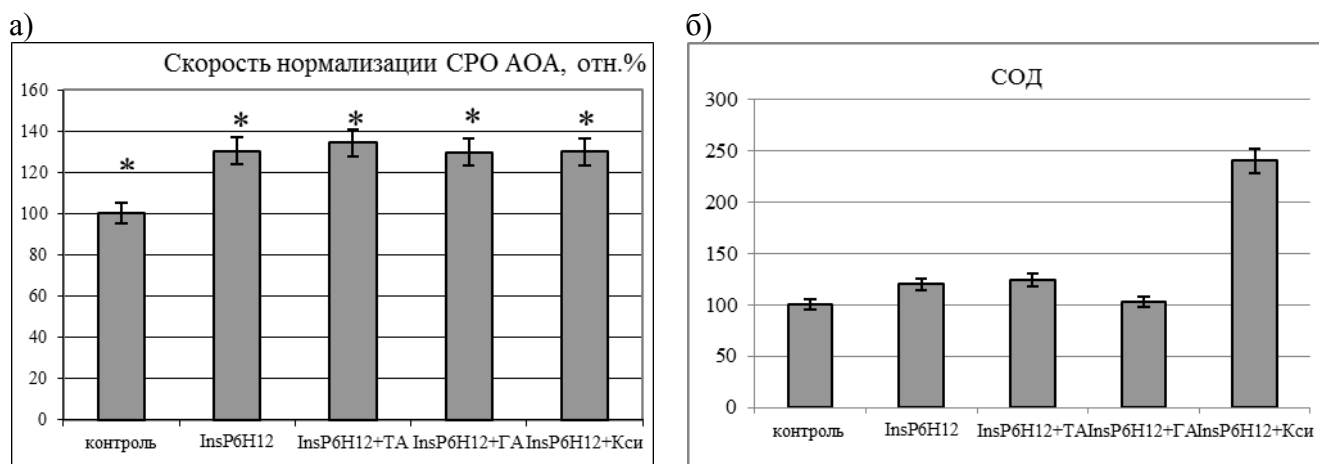


Рис. 8. Влияние исследуемых растворов на СРО и активность СОД в плазме крови в относительных процентах относительно контроля; «*» – уровень статистической значимости различий $p < 0,05$).

Таким образом, антиоксидантная активность комплексов фитиновой кислоты и Кси, ТА, ГА в исследованиях *in vitro* на плазме крови человека доказана по значительному положительному влиянию на активность СОД.

3. Разработка противоожогового геля комплекса фитиновой кислоты и ксимедона.

В работе предложены противоожоговые гидрофильные гели, составы которых приведены в табл.5.

Таблица 5. Составы и свойства гидрофильных гелей на основе, содержащей 1% натрия гиалуроната,

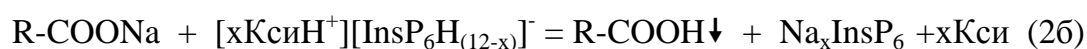
№	Состав, масс. %			Степень высвобождения ксимедона фитата* в %	Относительная осмотическая активность* в %
	Фитиновая кислота	Ксимедон	Трисамин		
1	2,5	10,0	5,0	15	150
2	5,0	10,0	2,0	30	200
3	6,0	10,0	1,0	50	250
4	6,0	-	12,0	-	250
5	-	10,0	-	30	130

* - время эксперимента – 3 часа.

Концентрация трисамина в составах соответствовала величине, при которой значение рН были близки к физиологическим (рН 6,5). Нормализация рН среды, вероятно, происходит за счёт связывания подвижных протонов фитиновой кислоты основанием – трисамином.

В дальнейшем был исследован противоожоговый гель оптимального состава, % масс.: натрия гиалуронат– 0,90; этанол (96%) – 0,80; нипагин – 0,08; фитиновая кислота (50%) – 12,00; ксимедон – 10,00; трисамин – 1, 00; вода до 100,00.

Натрия гиалуронат представляет собой высокомолекулярное соединение, создающее коллоидную систему, что препятствует проведению количественного определения фитиновой кислоты. Основной причиной сложности пробоподготовки является взаимодействие протонов фитиновой кислоты с ионами натрия, снижая при этом растворимость, поскольку образующаяся гиалуроновая кислота намного хуже растворима в воде.



Нами предложено удалять натрия гиалуронат из геля высаливанием его ацетонитрилом в солянокислой среде до образования гиалуроновой кислоты с меньшей растворимостью. Кроме того, возможны и процессы флокуляции и коагуляции гиалуроната натрия под действием сильного электролит соляной кислоты.

Способ пробоподготовки представлен на схеме 1 и включает следующие стадии:

I стадия пробоподготовки включает получение базового 1% раствора геля в 1 М хлороводородной кислоте, который в дальнейшем используется для анализа всех остальных компонентов.

II стадия включает осаждение гиалуроновой кислоты ацетонитрилом, центрифугирование и отделение осадка, его дальнейшее растворение (раствор 1) и количественный анализ гиалуроновой кислоты.

III стадия включает анализ остальных компонентов в надосадочной жидкости (раствор 2). Количественное определение фитиновой кислоты проводили спектрофотометрическим методом с реактивом Вэйда, используя аликвоту водо-ацетонитрильного кислого раствора (раствор 2).

IV стадия – Количественное определение фитиновой кислоты в растворе 2 по содержанию общего фосфора. Первоначально проводят минерализацию окислительной смесью азотной и хлорной кислот аликвоты раствора с последующим фотометрированием комплекса молибденованадатных гетерополикислот:



Качественное и количественное определение протонированной формы ксимедона определяли по ультрафиолетовые спектрам поглощения раствора 2 (максимум полосы поглощения при 308 ± 2 нм).

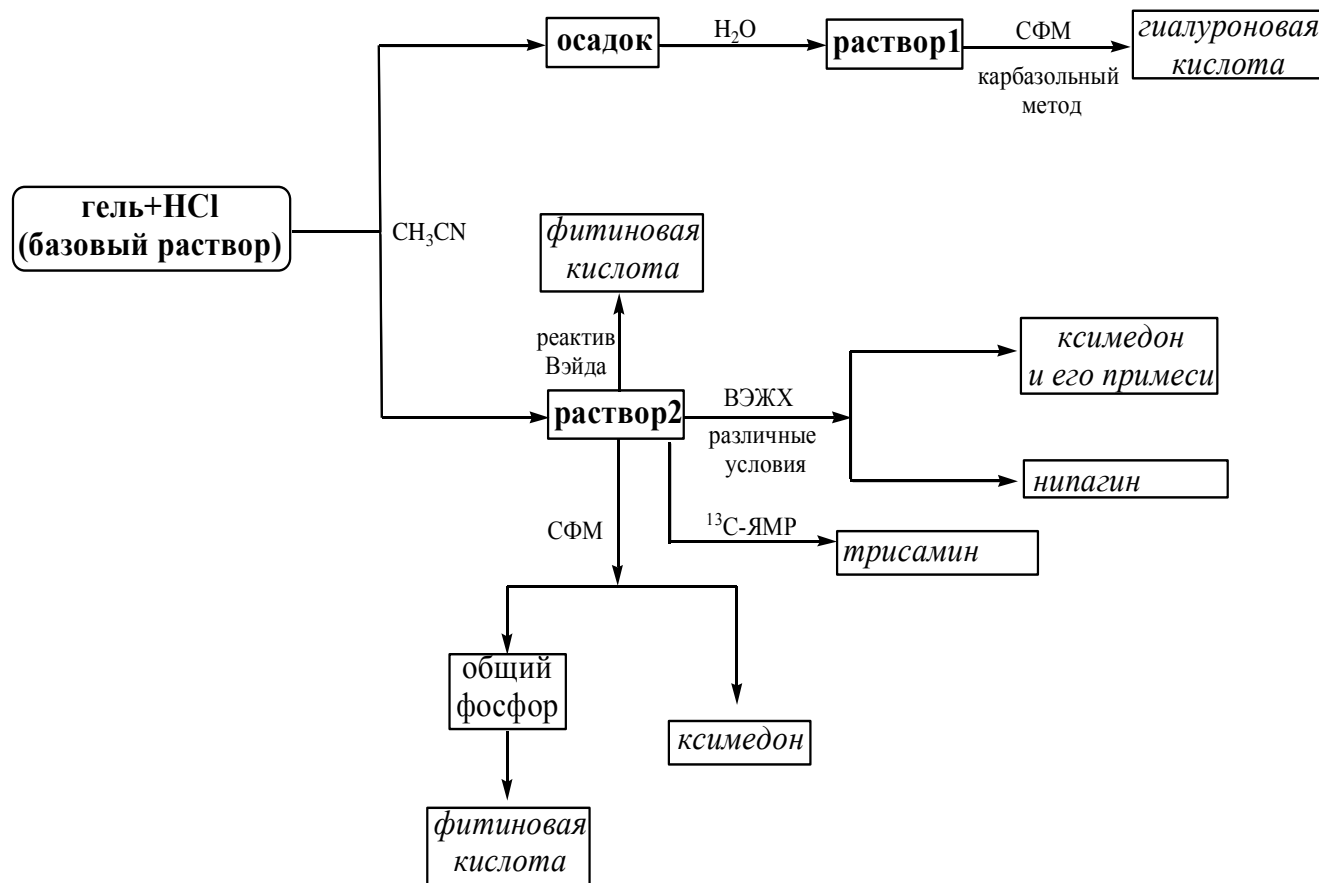


Схема 1. Общая схема установления подлинности и количественного содержания основных компонентов гидрофильного геля «Ксифит».

V стадия включает использование аликвот раствора 2 для проведения ВЭЖХ-анализов. Для количественного определения ксимедона аликвоту раствора 2 растворяли и анализировали при длине волны 309 нм, подвижная фаза – вода: ацетонитрил (79:21).

Раствор 2 используется в пробоподготовке метилпарабена для ВЭЖХ-анализа. Для этого раствор 2 смешивали с элюентом (буфер рН 7,0 – ацетонитрил = 1:1).

В результате проведенных исследований был разработан проект фармакопейной статьи на противоожоговый гель «ксифит» с комплексом $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и Кси, спецификация на который, а также статистические данные результатов по каждому разделу представлены в таблице 6.

Таблица 6. Спецификация на «Ксифит»

Показатели	Методы	Нормы	
	Описание		
	Визуальный	Прозрачный гель оранжевого цвета без включений.	
	Подлинность		
	1. Качественные химические реакции на фосфор (ГФ XI, вып.1, с. 159).	1. Препарат должен давать качественные реакции на фосфор.	
	2. Спектрофотометрия (натрия гиалуронат)	2. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения натрия гиалуроната, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения градуировочных растворов натрия гиалуроната, измеренных в этих же условиях.	
	3. Спектрофотометрия (на фитат анион с реактивом Вэйда)	3. Электронный спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения фитиновой кислоты, в области 450-600 нм должен соответствовать электронному спектру поглощения раствора СО фитиновой кислоты, измеренного в этих же условиях.	
	4. ВЭЖХ (метилпарабен)	4. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов метилпарабена	
	5. ВЭЖХ (протонированный ксимедон)	5. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме градуировочных растворов ксимедона.	
	6. ¹³ C-ЯМР (трисамин)	6. Реперная полоса (63±1м.д.) должна соответствовать положению для стандартного раствора трисамина.	
pH среды			
Потенциометрически, ГФ XII, стр. 89	От 6,4 до 6,8		
Масса содержимого			
НД	От 47,5 до 52,5 мл		
Количественное определение:			
1. Протонированный ксимедон (ВЭЖХ)	от 9,5 до 10,5 (на 100 г геля)		
2. Фитат анион (Спектрофотометрия с реактивом Вэйда)	от 11,74 до 12,36 г (на 100 г геля)		
3. Натрия гиалуронат (Спектрофотометрия)	от 0,837 до 0,963 г (на 100 г геля)		
4. Метилпарабен (ВЭЖХ)	от 0,064 до 0,096 г (на 100 г геля)		
Микробиологическая чистота			
ГФ XII, изд. №1, с. 160	Категория 2		

Упаковка	
НД	По 50 г в алюминиевые тубы.
Маркировка	
НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	
В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	
НД	В прохладном месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.
Срок годности	
3 года	

4. Исследования репаративной и антиоксидантной активности противоожогового геля на основе комплексов фитиновой кислоты и ксимедона *in vivo*

Наружное применение препаратов на основе фитиновой кислоты при лечении ожоговой раны способствует быстрой эпителизации. В целом, во всех группах у животных на 10-й день лечения почти или полностью исчезли струпы, а раны эпителизовались. Площадь ожоговой раны резко снижалась (табл. 7).

Таблица 7. Динамика заживления ожоговой раны в ходе лечения гидрофильными гелями на основе фитиновой кислоты.

Время лечения Группы	Площадь воспаления					
	исходная площадь ожога	3 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки	10 сутки
Ксимедон (состав 5)	235 мм ²	180	170	165	110	70
Фитиновая кислота (состав 4)		220	210	205	190	170
Комплекс фитиновой кислоты с ксимедоном (состав 3)		150	135	115	70	40
Препарат сравнения Декспантенол гель для наружного применения 4%.		200	185	170	110	80

Лечение гелем только с $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ (состав 4), хотя и вызывало отторжение струпных корок уже на третьи сутки, но регенерация тканей в ране не происходила. Использование гидрофильных гелей комплекса $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ с Кси (состав 3) демонстрировало наилучшие показатели заживления раны, как по скорости отторжения струпа, так и по степени эпителизации.

Исследованиями *in vivo* на плазме крови крыс доказано, что эффективность действия новых фармацевтических композиций обусловлена высоким значением общей антиоксидантной активности $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ и снижением продуктов липопероксидации в плазме крови на примере малонового диальдегида (рис.9).

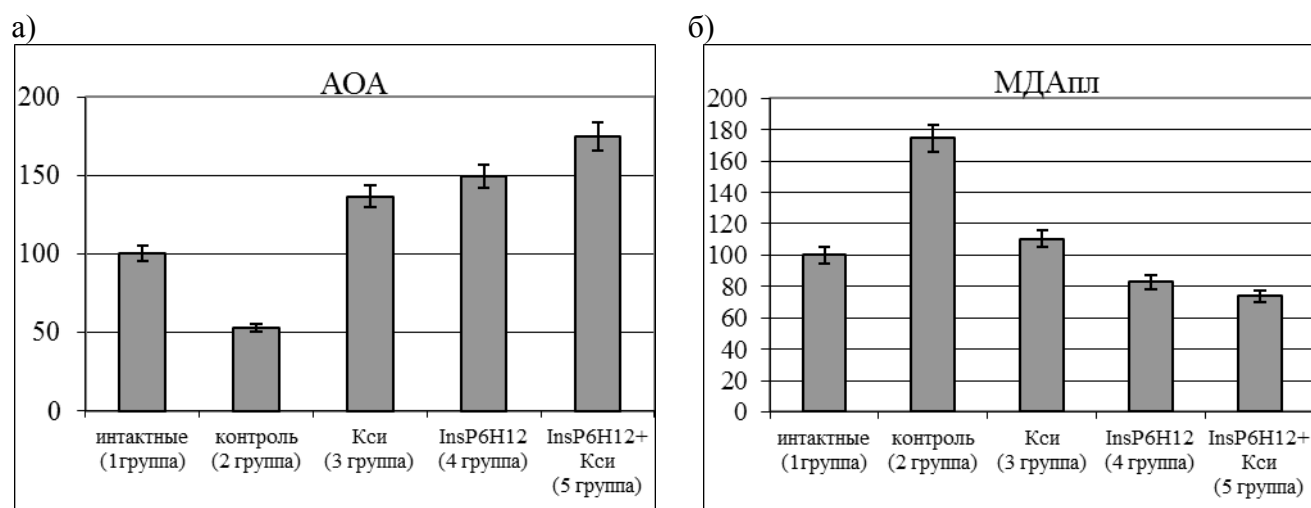


Рис. 9. Интенсивность перекисного окисления липидов (а), общая антиоксидантная активность (б), уровень малонового диальдегида (в) в плазме крови крыс под действием гелей ксимедона (Кси), фитиновой кислоты (InsP₆H₁₂) и комплекса фитиновой кислоты и ксимедона (InsP₆H₁₂ + Кси) в процентах относительно контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. Впервые получены и изучены физико-химические свойства комплексов фитиновой кислоты и ксимедона в водной среде (УФ-спектроскопия, потенциометрическое титрование) и в твёрдом состоянии (ИК-¹³C-¹H-³¹P-спектроскопия). Стехиометрия комплексов (от 5:1 до 10:1) зависит от условий приготовления. Катионоидной частью комплексов является протонированный ксимедон по атому кислорода карбонильной группы, характеризующейся $pK_{\text{КСиH}^+} = 3,25$; при этом инозитольный цикл аниона фитиновой кислоты остаётся неизменным (эксперименты с реактивом Вэйда, ³¹P-ЯМР).

2. Впервые получены солевые комплексы глюкозамина фитатов состава InsP₆H₇•5C₆H₁₃O₅N (элементный анализ по С, N, H, P), образующихся за счёт водородного связывания и электростатического взаимодействия (ИК-¹H- и ¹³C-³¹P-ЯМР спектроскопия и потенциометрическое титрование).

3. Разработаны методы идентификации и количественного определения комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном. Содержание протонированной формы ксимедона определяли УФ-спектрометрически и методом ОФ-ВЭЖ хроматографии, содержание гексафосфат инозитольного фрагмента - спектрометрически с реактивом Вэйда и по анализу на общий фосфор.

4. Доказана высокая антиоксидантная активность комплексов фитиновой кислоты с ксимедоном и глюкозамином в исследованиях *in vitro* на плазме крови

человека по отношению к процессам липопероксидации и по положительному влиянию на активность супероксиддисмутазы. Установлено, что в водной среде ксимедона фитаты проявляют более сильное антиоксидантное действие по сравнению с глюкозамина фитатами.

5. Разработаны и исследованы составы новых противоожоговых гелей ксимедона фитата на гидрофильной основе натрия гиалуроната, включающего в качестве действующих веществ ксимедон и фитиновую кислоту, а также трисамин – как компонент, регулирующий рН. Показана высокая осмотическая активность гелей. Эффективность ранозаживляющего действия гелей доказана в эксперименте на крысах при моделировании термического ожога.

6. Разработаны методики установления подлинности и количественного определения активных и вспомогательных компонентов в гидрофильном геле «Ксифит». Разработаны нормы качества и спецификация на предложенный состав.

Практические рекомендации

Разработанный проект фармакопейной статьи на новый противоожоговый гель «Ксифит» может быть внедрён в производственный процесс фармацевтических предприятий. Разработанные методики анализа компонентов противоожогового гидрофильного геля комплексов фитиновой кислоты и ксимедона могут быть внедрены в лабораторные практикумы, учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в получении комплексов фитиновой кислоты с различными аминами с широким спектром фармакологического воздействия и исследовании их медико-биологических свойств, получение новых лекарственных форм на основе предложенных комплексов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Мельникова, Н.Б. Разработка и исследование гидрофильных гелей с фитиновой кислотой и ксимедоном для лечения ожоговых ран в эксперименте на крысах / Н.Б. Мельникова, М.В. Сидорова, Д.С. Малыгина, А.К. Мартусевич, С.П. Перетягин, Л.Н. Нистратова, О.А. Медведева, А.Е. Большакова // **Медицинский Альманах**. – 2014. – №3(33). – С. 164-169.

2. Мартусевич, А.К. Влияние фитиновой кислоты и её производных на параметры перекисного окисления липидов крови *in vitro* / М.В. Сидорова, Н.Б.

Мельникова, А.Г. Соловьёва, С.П. Перетягин // **Экспериментальная и клиническая фармакология.** – 2014. – Т.77. №8. – С. 34-38.

3. Сидорова, М.В., Мартусевич А.К., Соловьёва А.Г. Влияние фитиновой кислоты на баланс про- и антиоксидантных систем крови // **Врач-аспирант.** – 2014. – № 2(63). – С. 45-50.

4. Сидорова, М.В. Кислотно-основные и антиоксидантные свойства комплексов фитиновой кислоты и ксимедона в растворе / М.В. Сидорова, А.К. Мартусевич, А.Г. Соловьёва, С.П. Перетягин, А.Р. Дорофеева, Л.Н. Нистратова, Н.Б. Мельникова // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2015. – Т.49, №1. – С. 54-61.

5. Сидорова, М.В., Большакова А.Е. Антиостеопорозные лекарственные средства на основе кластеров фитина и 3,5-фитаз, иммобилизованных на твёрдой фазе, Всероссийская молодежная научная школа «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности»: тезисы докладов (Казань, 18-22 июня 2012 г.). – Казань: Отечество, 2012. – с.48.

6. Сидорова, М.В. Разработка фармацевтической композиции для лечения и профилактики заболеваний костной ткани на основе фитина, МедиАль. – 2013. –№ 1(6). – С. 115-116.

7. Перетягин, С.П. Модель окислительного стресса *in vitro* как компонент алгоритма системной озонотерапии при выборе доз озона и антиоксиданта / А.К. Мартусевич, А.А. Мартусевич, А.Г. Соловьёва, А.А. Стручков, М.В. Сидорова, Ю.С. Винник, С.В. Якимов // Восьмая национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека»: Материалы конференции. – Смоленск, 2014. – С. 168-170.

8. Сидорова, М.В. Физико-химические свойства фитатов глюкозамина как потенциальных регуляторов метаболических процессов / М.В. Сидорова, А.Р. Сорокина // Наука в современном обществе: материалы VI Международной научной конференции. – Ставрополь: Логос, 2014. – С. 62-65.

9. Сидорова, М.В. Анализ комплексов фитиновой кислоты с оксопиримидиновым спиртом – ксимедоном в растворе / М.В. Сидорова, Д.С. Малыгина // Актуальные проблемы современной науки: сборник статей Международной научно-практической конференции в 2 ч. Ч.2. Уфа: Аэтерна, 2015. – С. 28-32.