

МАЛЫГИНА ДАРИНА СЕРГЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ФОСФАТСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Белюсов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой;

Коркодинова Любовь Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Казань.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 г. в __.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего 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/scientists/science/referats/2019/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Производные бетулина – бетулиновая и бетулоновая кислоты, сукцинаты, ацетаты и другие эфиры органических кислот, проявляют комплекс биологически активных свойств, таких как противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные, противовирусные и другие [Falamas A., 2011; Król S.K., 2015]. Недостатками производных бетулина как потенциальных компонентов средств является их плохая растворимость (от 1 до 100 мкг/л) и, соответственно, низкая биодоступность.

Одним из путей решения этой проблемы является синтез их производных, содержащих сульфатные, сульфонатные, фосфатные и фосфонатные группы [9-14]. Производные фосфорной кислоты имеют преимущества, поскольку в организме человека они легко подвергаются биотрансформации под действием эндогенных фосфатаз, фосфорилаз и киназ плазмы крови и печени [Pradere U., 2014, Falamas A., 2011]. Органические фосфаты и фосфонаты, способные превращаться в лекарственные вещества в органе-мишени и выполнять функцию пролекарств, привлекают все большее внимание специалистов в области фармацевтической и медицинской химии [Pradere U., 2014]. Кроме того, эти соединения в виде солей существенно улучшают растворимость и, соответственно, биодоступность лекарственных веществ в организме человека. Так, например, дексаметазона фосфата натриевая соль, в отличие от исходного стероида, хорошо растворима в воде и в инъекционной форме проявляет более широкий спектр действия [Нао Н.Х., 2004].

Степень разработанности темы. В исследованиях *in vitro* фосфонаты бетулина - продукты модификации природного бетулина, выделенного из бересты березы, показали высокую эффективность по отношению к опухолям молочной железы (протоковая карцинома человека) и мозга (глиобластома человека), меланомы и пр. [Chrobak E., 2016].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* продемонстрировано антибактериальное, антифунгальное, противовоспалительное, противовирусное действие 3,28-дифосфата бетулина ДФБ [Красутский П.А., 2004]. Каплун А.П. и авторы показали способность ДФБ выступать ингибитором комплемента, регулирующим фактором многих системных заболеваний [Каплун А.П., 2004].

Несмотря на то, что методика получения ДФБ была модифицирована в работе Лебедевой Р.А., 2015 г., однако серьезные исследования растворимости и других свойств этого соединения не проводились. Наиболее перспективным путем улучшения растворимости является получение водорастворимых солей и солевых комплексов, в том числе комплексов с аминоспиртами. В качестве гидрофильных аминоспиртов – компонентов солевых комплексов, были выбраны ЛВ с антиацидозным действием (трисамин и меглумин), а также репарант с антиоксидантной активностью – ксимедон.

Цель исследования: Получение и исследование солей и солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с улучшенной растворимостью.

Задачи исследования:

1. Получение и исследование свойств (растворимость, ИК, ЯМР, кристалличность структуры, теплофизическая характеристика) натриевой соли **ДФБ (Na-ДФБ)**.
2. Исследование физико-химических и теплофизических свойств структурных модификаций **ДФБ**.
3. Разработка методов идентификации, количественного определения и стандартизация натриевой соли **ДФБ**.
4. Исследование взаимодействия **ДФБ** с трисамином в воде и изучение полученных комплексов в растворе.
5. Разработка методов улучшения растворимости **ДФБ** в воде за счет образования его солевых комплексов с меглумином и ксимедоном.
6. Оценка влияния биологической активности водорастворимых **Na-ДФБ** и солевых комплексов **ДФБ** с меглумином на процессы перекисного окисления липидов и на активность редокс-ферментов, а также на энергетический метаболизм в экспериментах *in vitro* на крови крыс.
7. Исследование противоопухолевого действия **Na-ДФБ** в комбинации с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом с использованием привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей.

Научная новизна.

- Впервые выявлены показатели подлинности структурных модификаций **ДФБ**, отличающиеся по растворимости, температуре плавления, Фурье-ИК-спектрам и теплофизическим характеристикам.
- Впервые получена и охарактеризована структура кристаллической формы **Na-ДФБ** и разработаны методики его стандартизации.
- Впервые получены и исследованы солевые комплексы **ДФБ** с трисамином, меглумином и ксимедоном в воде. Показано улучшение растворимости в воде комплексов **ДФБ** с меглумином состава 1:4 до 59 г/л.
- Разработана фармацевтическая композиция **Na-ДФБ** и токсичных лекарственных веществ – гидразина сульфата и 5-фторурацила, проявляющая противоопухолевое действие по отношению к асцитной карциноме Эрлиха.

Новизна исследований подтверждена патентом Российской Федерации на изобретение № 2660649 «Способ получения соли 3,28-дифосфата бетулина».

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные методики анализа структурных модификаций 3,28-дифосфата бетулина и его натриевой соли используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической

химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 02.04.2018 г.), на фармацевтическом отделении государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж» (акт внедрения от 16.04.2018 г.). Результаты по стандартизации фосфатсодержащих биологически активных веществ тритерпенового ряда, в том числе бетулиновых производных, используются в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (акт внедрения от 18.04.2018 г.). Разработан проект фармакопейной статьи на фармацевтическую субстанцию 3,28-дифосфата бетулина.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина», РИД «Лекарственные препараты на основе природных тритерпенов и их производных».

Методология и методы исследования. При проведении исследования методологическую основу составили изучение и анализ работ отечественных и зарубежных ученых в области получения солей и солевых комплексов тритерпеноидов. При выполнении работ использованы современные методы органического синтеза, выделения и очистки полученных веществ. Строение и чистота полученных соединений установлены с помощью спектральных методов анализа: ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, ВЭЖ хроматографии, ТГ и ДСК термоаналитического анализа, порошковой рентгеновской дифрактометрии. Биологическую активность (противоопухолевую, антиоксидантную и воздействие на энергетический метаболизм) исследовали в *in vitro* и *in vivo* экспериментах на мышах и крысах. Квантовохимические расчеты выполнены с использованием программы HyperChem (версия 8.0) полуэмпирическим методом AM1.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методики получения, идентификации, количественного определения и стандартизации натриевой соли **ДФБ**.
2. Результаты получения и исследования солевого комплекса **ДФБ** бетулина с трисамином.
3. Результаты по исследованию взаимодействия **ДФБ** с меглумином и ксимедоном и выявлению условий достижения максимальной растворимости солевых комплексов в воде.

4. Результаты по исследованию антиоксидантной активности и энергетического метаболизма **ДФБ** и его солей в экспериментах *in vitro* на крови крыс.

5. Результаты экспериментального исследования противоопухолевого действия **ДФБ** в комбинации с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом на модели привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей.

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

Соответствие паспорту специальности. Работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» по следующим пунктам: 1 – «Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ»; 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на региональной конференции «XXII Нижегородская сессия молодых ученых» (г. Княгинино, 23 мая 2017 г.); XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 22 января 2016 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (г. Уфа, 24 января 2015 г.).

Публикации. По материалам диссертации получен 1 патент, опубликованы 5 статей в ведущих рецензируемых отечественных и международных журналах, опубликованы доклады 3 конференций в форме тезисов.

Внедрение результатов исследования. Описанные в работе методы анализа фосфатсодержащих тритерпенов и обработки их результатов используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России, в ГБПОУ НО «Нижегородский медицинский колледж», в ГАУЗ НОЦККСЛС.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований 3,28-дифосфата бетулина и его натриевой соли в комбинации с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом в фармацевтической композиции. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на субстанцию натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 30 таблиц, 35 рисунков, 6 схем. Список литературы включает 148 работ, из которых 127 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика объектов и методов исследования

Материалы и реактивы: трисамин («Sigma-Aldrich»), ксимедон (НПП ФГУП «Кристалл», г. Дзержинск Нижегородской области), меглумин («Merck»), пиридин (ЧДА, АО «Реахим»), хлорокись фосфора. Бетулин ($C_{30}H_{50}O_2$), чистота 99,5% (ВЭЖХ), получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth*.

Методы исследования и приборы: ИК-спектрофотометр с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan); ВЭЖ-хроматограф «LC-20Avp» (Shimadzu, Japan), колонка Discovery C18 (25 см x 4,6 мм, 5 мкм, Supelco). Подвижная фаза: ацетонитрил – буферный раствор KH_2PO_4 с pH 6,36 (90 : 10, об.%), скорость потока – 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл; ЯМР-спектрометр «Jeol JNM-ECX400» (Jeol Ltd., Japan); Спектрофотометр «UV-1800» (Shimadzu, Japan); калориметрические измерения (ДСК) осуществляли на приборе DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch–Gerätebau, Germany), Al тигли, аргон, 25.0 мл/мин, 20–300°C при скорости 5°C/мин; термографические исследования (ТГ) проводили на приборе TG 209 F1 Iris (Netzsch–Gerätebau, Germany), Pt тигли, аргон, 20–500°C при скорости 5°C/мин; порошковые рентгеновские дифрактограммы были получены на рентгеновском дифрактометре «XRD-6000» (Shimadzu, Japan).

Исследования антиоксидантной активности *in vitro* проводили на эритроцитах и плазме крови крыс. Интенсивность ПОЛ определяли по уровню МДА. Активность СОД определяли по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина. Каталитические свойства ЛДГ в прямой и обратной реакции (ЛДГ_{пр} и ЛДГ_{обр}) определяли по методике Соловьевой А.Г. (2012). Расчет удельной активности ферментов осуществляли по методике Лоури. Активность каталазы и глутатионредуктазы определяли спектрофотометрическим методом. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы определяли по методу Г.А. Кочетова (1980).

Медико-биологические исследования противоопухолевой активности комплексов ДФБ с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом *in vivo* проводили на белых мышях (самцах) с привитой асцитной карциномой Эрлиха АКЭ (0,8 мл, 10^7 кл./мл на мышь).

Белые мыши были разделены на 6 групп по 10 животных в каждой: интактные животные, мыши с привитой АКЭ без лечения, мыши с привитой АКЭ, которых лечили только 5-ФУ или ГС, либо комбинацией Na-ДФБ с 5-ФУ или ГС. Объем введения ЛС составлял 0,2 мл, содержащего 1,5 мг Na-ДФБ. Доза 5-ФУ и ГС составляла 0,32 мг на

мышь. На 11-й день все мыши были умерщвлены путем декапитации под наркозом (Золетил $60 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1}$, Ксила $6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$), асцитическая жидкость была проанализирована.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7,0.

В **главе 1** представлен литературный обзор, посвященный свойствам производных бетулина как потенциальных ЛВ. В главе рассмотрены физико-химические свойства и биологическая активность бетулина и его производных, полиморфизм и особенности структурных модификаций производных бетулина. В разделе 1.3 главы 1 сосредоточено внимание на фосфатсодержащих производных бетулина с улучшенной растворимостью.

Глава 2 содержит материалы и методы исследования.

Основные результаты собственных исследований представлены в **главах 3, 4 и 5**.

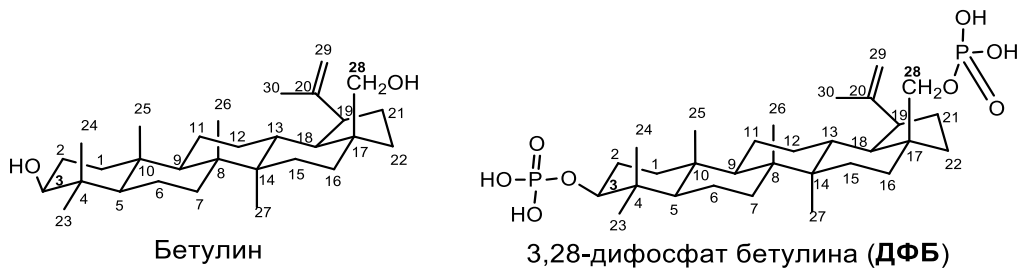
РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и исследование физико-химических свойств натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Для улучшения растворимости производных бетулина в воде проведена модификация фосфатными группами с последующим переводом в соли натрия.

1.1. Свойства структурных модификации 3,28-дифосфата бетулина

Дифосфаты бетулина получали фосфорилированием бетулина оксихлоридом фосфора с пиридином в качестве акцептора HCl в среде диоксана. Продукт реакции представлял собой белый порошок в виде гидрата ДФБ, общей формулой $\text{ДФБ} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, где $x = 1-9$ в двух структурных модификациях, различающихся по растворимости в этаноле. Первый тип ДФБ-1 хорошо растворялся в этаноле (до 100 г/л), имел $T_{\text{пл}}$ $147-148^\circ\text{C}$, тогда как ДФБ-2 был плохо растворим в этаноле, его $T_{\text{пл}}$ соответствовала $156-160^\circ\text{C}$.



ИК-спектры образцов ДФБ-1 и ДФБ-2 также отличались не только в области «отпечатков пальцев», а также в области, отвечающей валентным колебаниям фосфорильных – P=O comb ($2331, 2342 \text{ см}^{-1}$ широкая слабая полоса), P-O st , P=O st ($1216-1196; 1100-940 \text{ см}^{-1}$), и гидроксильных групп – $3400-3300 \text{ см}^{-1}$. Кроме того, образцы ДФБ подвергались старению при хранении на воздухе.

Структурные модификации **ДФБ-1** и **ДФБ-2** имели разные теплофизические характеристики (рисунок 1, таблица 1).

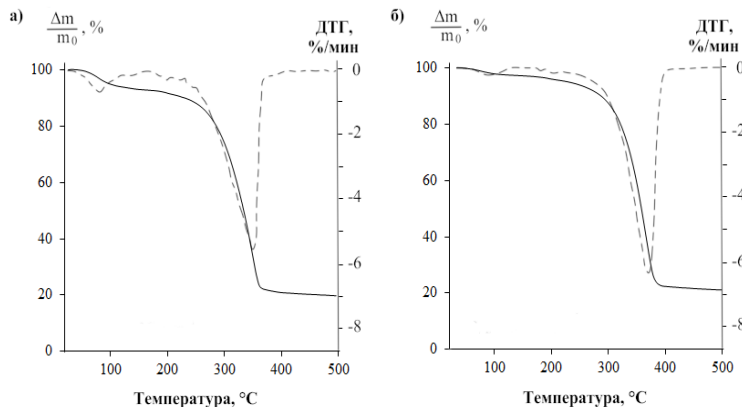


Рис. 1. ТГ-кривые **ДФБ-1** (а) и **ДФБ-2** (б)

Таблица 1

Данные ТГ-анализа образцов 3,28-дифосфатов бетулина¹

Рисунок	ДФБ	Растворимость в этаноле	Начало ступени, °С	Конец ступени, °С	Δm, %
а	1	до 100 г/л	72,3	175,8	5,31
			219,1	475,8	70,71
б	2	до 10 г/л	97,4	458,6	70,39

Примечания:

¹ Стандартная неопределенность температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$

² **ДФБ** получен обработкой **Na-ДФБ** 0,1М водным раствором HCl

Для хорошо растворимого в этаноле образца **ДФБ-1**, в отличие от **ДФБ-2** ТГ-кривая имеет ступень, характеризующую потерю массы 7% в интервале 72-150°C. ДСК-кривая **ДФБ-1** имеет два экзо-эффекта в интервалах 151,2-155,9°C ($\Delta H_1 = 15,5$ кДж/моль) и 183,5-200,8°C ($\Delta H_2 = 19,7$ кДж/моль) (рисунок 2, таблица 2).

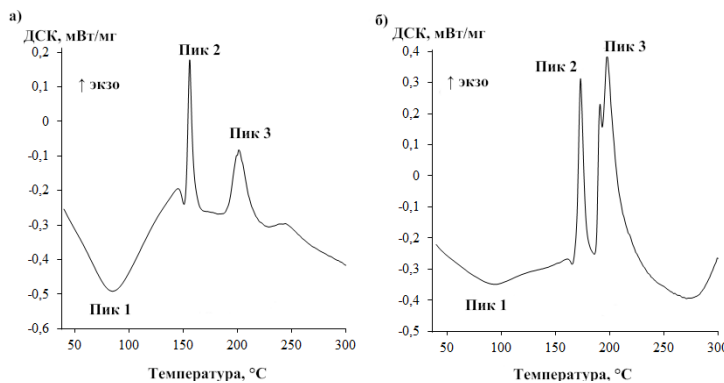


Рис. 2. ДСК-кривые **ДФБ-1** (а) и **ДФБ-2** (б)

Для **ДФБ-2** экзо-эффекты проявляются в интервалах 161,3-172,8°C, $\Delta H_1 = 23,5$ кДж/моль; и 185,9-197,3°C, $\Delta H_2 = 70,5$ кДж/моль (рисунок 2б, таблица 2).

Таблица 2

Термоаналитические свойства 3,28-дифосфата бетулина ¹

ДФБ		Растворимость в этаноле	Пик 1		Пик 2		Пик 3		
			T _{peak} , °C	T _{onset} , °C	T _{peak} , °C	Экзо-эффект ΔH, кДж/моль	T _{onset} , °C	T _{peak} , °C	Экзо-эффект ΔH, кДж/моль
1	а	до 100 г/л	85,3 ± 0,5	151,2 ± 0,5	155,9 ± 0,5	15,5 ± 0,2	183,5 ± 0,5	200,8 ± 0,5	19,7 ± 0,2
2	б	до 10 г/л	77,0 ± 0,5	161,3 ± 0,5	172,8 ± 0,5	23,5 ± 0,2	185,9 ± 0,5	197,3 ± 0,5	70,5 ± 0,7

Примечания:

¹ Стандартная неопределенность температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$. Комбинированная расширенная неопределенность для энтальпий переходов $U_{c,r}(\Delta H^\circ_{tr})$ равна 0,01² ДФБ получен обработкой Na-ДФБ 0,1M водным раствором HCl

Таким образом, при дальнейшей модификации ДФБ следует учитывать различные структурные формы ДФБ, отличающиеся растворимостью в этаноле, температурой плавления, Фурье-ИК-спектрами и величинами экзо-эффектов при $193 \pm 8^\circ\text{C}$.

1.2. Получение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Потенциометрическое титрование этанольного $1 \cdot 10^{-2}\text{M}$ раствора ДФБ 0,2-4,0M растворами щелочей показало, что взаимодействие ДФБ с NaOH происходит в две степени, а стехиометрия титрования 1:2 и 1:4 (рисунок 3).

³¹P-ЯМР спектр (D₂O) Na-ДФБ (рисунок 4) в виде белого кристаллического порошка содержал сигналы: δ, м.д.: 4,25, 4,31 (при C-3, дублет без развязки от протонов), 5,47 (при C-28). В ¹³C-ЯМР спектре наблюдалось смещение сигналов при C-3 (с 60 до 63 м.д.) и C-28 (с 78 до 81 м.д.). Свежеприготовленный осадок Na-ДФБ растворяется в воде до 10 г/л, что в 10⁶ раз превышает растворимость бетулина и в 10⁴ раз растворимость ДФБ. Содержание фосфора (7,05-7,45%) и воды (16,80-17,27%) позволяют предположить брутто-формулу гидрата – Na-ДФБ · 8H₂O.

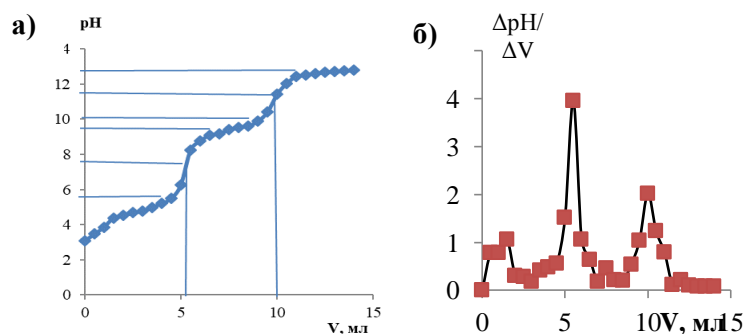


Рис. 3. Потенциометрическое титрование ДФБ 0,2M водным раствором NaOH. а) pH = f(V); б) Дифференциальная кривая $\Delta\text{pH}/\Delta V = f(V)$

ИК-спектры **Na-ДФБ**, выделенных при различных рН, различались. **Na-ДФБ-1** (рН 9) был получен в виде игольчатых кристаллов в отличие от слабо кристаллического **Na-ДФБ-2** (рисунок 5).

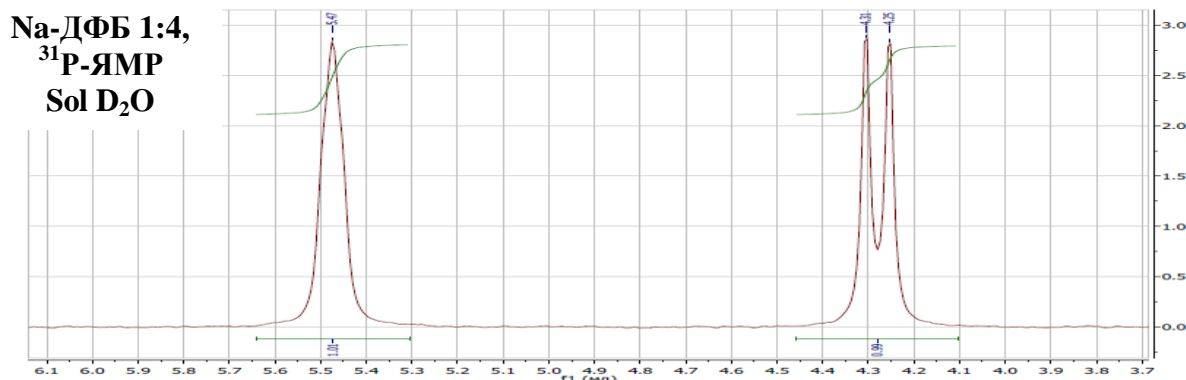


Рис. 4. ³¹P-ЯМР-спектр натриевой соли ДФБ.

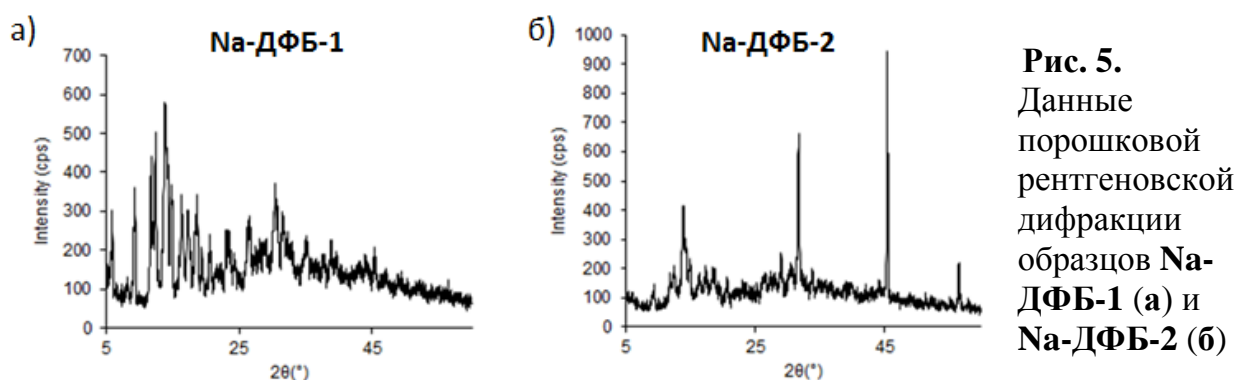


Рис. 5. Данные порошковой рентгеновской дифракции образцов **Na-ДФБ-1** (а) и **Na-ДФБ-2** (б)

ДСК-кривые **Na-ДФБ** характеризуют эндо-эффект при 95,7-111,7°C (рисунок 6), вероятно, обусловленный удалением гидратной воды **Na-ДФБ**.

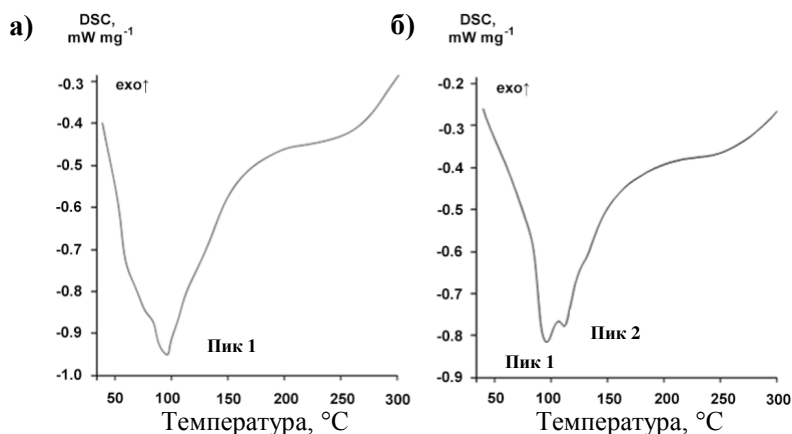


Рис. 6. ДСК-кривые натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина: (а) **Na-ДФБ-1**; (б) **Na-ДФБ-2**.

На ТГ-кривой **Na-ДФБ** (рисунок 7) видны две ступени, первая из которых также соответствует потере воды – 16,40-16,55% от всей массы, что характерно для **Na-ДФБ · 8H₂O**.

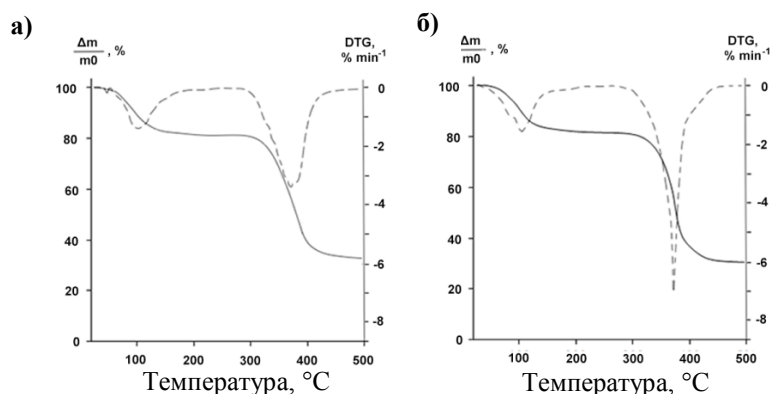


Рис. 7. ТГ (сплошная линия) и ДТГ (пунктирная линия) кривые натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина: (а) Na-ДФБ-1; (б) Na-ДФБ-2.

Таким образом, растворимость, теплофизические свойства, ИК и ЯМР характеристики, а также данные порошковой рентгеновской дифракции для ДФБ и Na-ДФБ являются важными показателями подлинности.

2. Получение и свойства солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами (трисамин, ксимедон, меглумин)

Анализ УФ-спектров ДФБ в 95% этаноле, водно-спиртовой смеси (1:1), этанольном растворе H_2SO_4 или водном растворе NaOH позволил установить, что в 95% этаноле, как и в водном растворе NaOH, ДФБ преимущественно существует как моноосновная кислота по каждой фосфатной группе, а в этанольном растворе H_2SO_4 , либо в водно-этанольной среде (1:1) доминирующей является неионизованная форма ДФБ (таблица 3).

Таблица 3

Влияние природы среды на УФ-спектры ДФБ

Условия	$C, \cdot 10^4, M$	A	$\epsilon, л/моль \cdot см$
95% этанол	9,8	0,430	439
95% этанол, $LiClO_4$	9,8	0,410	418
$4 \cdot 10^{-3} M$ водный раствор NaOH	9,8	0,410	418
95% этанол – вода (1:1)	4,9	0,294	588
95% этанол – вода (1:1), $LiClO_4$	4,9	0,373	761
0,02M этанольный раствор H_2SO_4	9,8	0,650	663

2.1. Свойства солевых комплексов ДФБ с трисамином

Интенсивность поглощения полосы, характерной для ДФБ, A_{256} в спектрах реакционных смесей растворов ДФБ и Трис зависит от молярного отношения Трис и ДФБ $\alpha = n_{Трис}/n_{ДФБ}$ при постоянной концентрации ДФБ (рисунок 8). Межмолекулярное взаимодействие Трис и ДФБ исследовано методом Остромысленского-Жоба (рисунок 9). Из зависимости $\Delta A = f(x_{Трис})$, где $x_{Трис}$ – мольная доля Трис, следует, что стехиометрия

солевого комплекса **Трис** и **ДФБ** равна 1:1. Насыщение слабой кислоты – **ДФБ** трисамином (участок III) достигается при значениях α , близком к полутора (рисунок 8б).

Солевой характер комплекса подтвержден потенциометрическим титрованием спиртового раствора **ДФБ** водным раствором 0,5М **Трис** (рисунок 10). Кривая титрования **ДФБ** $\text{pH} = f(V)$ имеет типичный вид кривой титрования одноосновной кислоты.

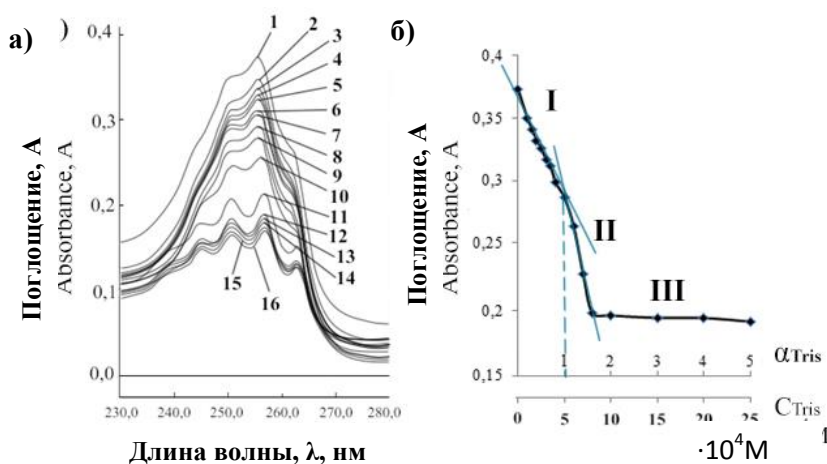


Рис. 8. УФ-спектры смесей **ДФБ** и **Трис** при $C_{\text{ДФБ}} = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{LiClO}_4} 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$: а) $A = f(\lambda)$; б) $A = f(\alpha)$, где $\alpha = n_{\text{Трис}}/n_{\text{ДФБ}}$, $A = f(C_{\text{Трис}})$.

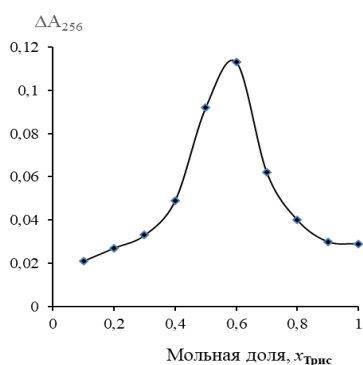


Рис. 9. $\Delta A = f(x_{\text{Трис}})$. $C_{\text{ДФБ}} = C_{\text{Трис}}$ равно $9,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $C_{\text{LiClO}_4} 1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, среда этанол-вода.

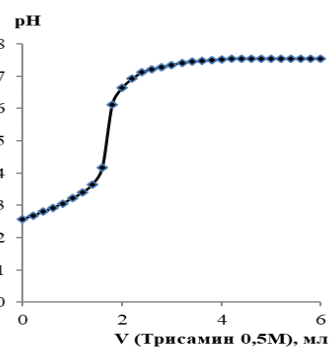


Рис. 10. Результаты титрования 10 мл 0,05М этанольного раствора **ДФБ** водным 0,5М раствором трисамина.

Комплексообразование также подтверждено данными ^{31}P -ЯМР спектров. Сигнал фосфора полученного комплекса при С-3 в **ДФБ** смещался с -0,58 м.д. до +1,10 м.д., а фосфора при С-28 – с +0,28 м.д. до +2,08 м.д.. При избытке **Трис** наибольшие изменения наблюдались для фосфора при С-28 **ДФБ**: $\delta = 3,71$ м.д. (таблица 4).

Таблица 4

Данные ^{31}P -ЯМР спектров ДФБ и его комплексов с аминами

	δ , м.д. (J, Гц)			
	ДФБ	ДФБ : Трис (1:1)	ДФБ : Трис (1:2)	ДФБ : Трис (изб. Трис)
С-28 , д	-0,58 (8,15)	1,10 (8,45)	1,07 (8,12)	1,18 (8,10)
С-3 , т	0,28	2,08	2,06	3,71

Форма и расположение полос валентных колебаний спиртовых С-О групп (ν 1041-1022 см^{-1}) и эфирных С-О групп (ν 1031-973 см^{-1}) в ДФБ изменялись, становясь широкой полосой в области 1070-970 см^{-1} . Значительно изменялись полосы валентных колебаний Р-О (ν 497 см^{-1}) и Р=О (ν 1641 см^{-1} , δ 1215 см^{-1}) в ДФБ. Индекс гидрофильности $I = T_{497-500}/T_{2948}$, равный отношению пропускания при 497 см^{-1} к пропусканию при 2948 см^{-1} (СН, СН₂, СН₃ тритерпенового скелета), изменялся от 3,0 для исходного ДФБ до 1,5-1,7 для солевого комплекса ДФБ с Трис при стехиометрии 1:1.

Данные ^{31}P -ЯМР- и ИК-спектров позволяют предположить, что взаимодействие ДФБ с Трис обусловлено не только электростатическими взаимодействиями, но и неспецифическими нековалентными взаимодействиями, характерными для солевых комплексов.

Кажущаяся константа устойчивости солевого комплекса $K'_{\text{уст}}$, равная 1130 ± 55 л/моль и молярный коэффициент поглощения комплекса, равный 324 л/моль·см, были рассчитаны графическим способом по уравнению Бенеша-Гильдебранда:

$$\frac{C_{\text{ДФБ}}^0 \cdot l}{\Delta A} = \frac{1}{\epsilon'} + \frac{1}{K'_{\text{уст}} \cdot \epsilon} \cdot \frac{1}{C_{\text{Трис}}^0}, \text{ где:}$$

$\Delta A = A_{\text{ДФБ}}^0 - A_{\text{ДФБ}}^\alpha$ (в интервале $\alpha = n_{\text{Трис}}/n_{\text{ДФБ}}$ от 0,1 до 1,0);

$C_{\text{ДФБ}}^0$ - исходная концентрация ДФБ, равная $4,9 \cdot 10^{-4}$ М.

Таким образом, Фурье-ИК-, УФ- и ^{31}P -ЯМР-исследования, подтверждают образование солевого комплекса ДФБ с Трис состава 1:1, кажущаяся константа устойчивости $K'_{\text{уст}}$ которого равна 1130 ± 55 л/моль.

2.2. Свойства солевых комплексов ДФБ с ксимедоном и меглумином

Участие ксимедона **Кси** в реакции переноса протона с **ДФБ** подтверждалось изменением поглощения карбонильного хромофора в УФ-спектрах: батохромным сдвигом с 299 нм до 304 нм и гиперхромным эффектом (ϵ от 8508 до 10441 л/моль·см). Результаты сравнивались с протонированием **Кси** в среде универсальной буферной смеси и фитиновой кислоты (рисунок 11).

Различия в полосах поглощения **Кси** в спектрах его смеси с **ДФБ** ($\lambda_{\max} = 304$ нм) и **Кси** гидрохлорида ($\lambda_{\max} = 309$ нм), а также **Кси** в растворах соляной и фитиновой кислот ($\lambda_{\max} = 309$ нм) при тех же значениях ϵ (10788 л/моль·см), вероятно, можно объяснить образованием солевых комплексов **Кси** с **ДФБ**, в которых **Кси** не полностью протонирован, в отличие от его солей с сильными кислотами.

Межмолекулярные взаимодействия в смесях **ДФБ** и **Кси** проявлялись и в ^{31}P -ЯМР-спектрах, в которых сигнал фосфора при С-3 в **ДФБ** изменялся с -0,58 м.д. (дублет без развязки от протонов) до +3,11 м.д., а сигнал фосфора при С-28 – с +0,28 м.д. до +4,44 м.д. по сравнению с **ДФБ**.

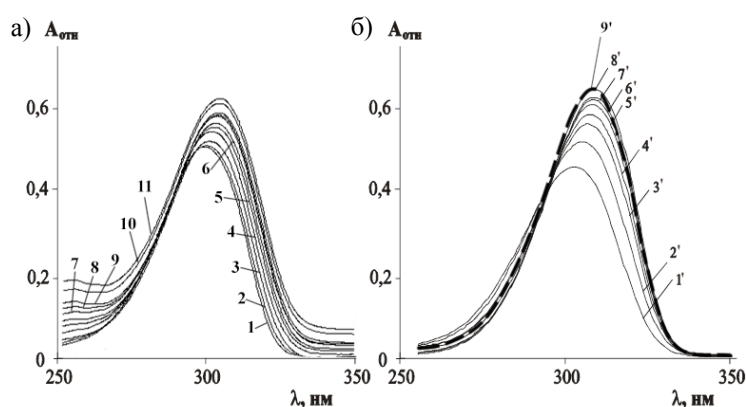


Рис. 11. УФ-спектры поглощения $5,9 \cdot 10^{-5}$ М водного раствора ксимедона и его протонированной формы, полученной: а) в смеси с **ДФБ**; $C_{\text{LiClO}_4} = 5,9 \cdot 10^{-4}$ М; б) в ацетатно-фосфатно-боратном буферном растворе и в фитиновой кислоте (жирная пунктирная линия)

Межмолекулярные взаимодействия **Мегл** и **ДФБ** подтверждались УФ-спектрами их смеси (рисунок 12), при этом A_{256} снижалось при увеличении молярного отношения меглумина к **ДФБ** при его постоянной концентрации, а интенсивность A_{256} водно-спиртового раствора **ДФБ** за 4 суток возрастала практически вдвое (рисунок 12б). Полученные результаты свидетельствуют об образовании соли **ДФБ** и меглумина в области $\alpha=2$.

В ^{31}P -ЯМР-спектрах солевого комплекса **ДФБ** с меглумином 1:2 отмечали изменение сигнала Р при С-3 атоме **ДФБ**, равного -0,58 м.д. (дублет без развязки от протонов), до

+0,88 м.д., а сигнал Р при С-28 атоме, равный +0,28 м.д. (триплет без развязки от протона), смещался до +2,46 м.д. (таблица 5).

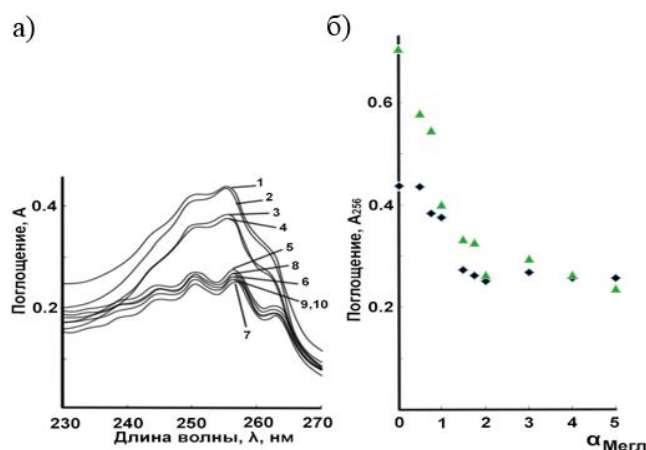


Рис. 12. УФ-спектры смеси ДФБ

и меглумина, $C_{ДФБ}=5.0 \cdot 10^{-4}M$,

$C_{LiClO_4}=1 \cdot 10^{-2}M$,

а) $A = f(\lambda)$;

б) $A = f(\alpha_{Мегл})$, $\alpha = n_{Мегл} / n_{ДФБ}$.

При составе комплекса ДФБ:меглумин 1:4 отмечались сигналы +3,39 м.д. (фосфор при С-3) и +4,60 (фосфор при С-28) (таблица 5). Увеличение доли меглумина больше чем ДФБ:меглумин 1:4 не изменяло вид спектра.

Таблица 5

Данные ^{31}P -ЯМР спектров комплексов ДФБ с меглумином (D_2O , H_3PO_4)

δ , м.д.	ДФБ:Мегл = 1:2	ДФБ:Мегл = 1:4	ДФБ:Мегл = 1:6
С-28, д	0,88	3,39	3,41
С-3, т	2,46	4,60	4,61

Межмолекулярные взаимодействия ДФБ и Мегл способствовали улучшению растворимости ДФБ в воде, которая равнялась 0,1 г/л. Свежеприготовленный образец ДФБ, полученный из спирторастворимой фракции, имел растворимость 59 г/л в водном растворе Мегл при молярном соотношении ДФБ:Мегл = 1:4, тогда как после хранения в течение 3 месяцев его растворимость в растворе Мегл уменьшалась до 30 г/л.

3. Стандартизация натриевой соли 3,28-дифосфата бегулина.

Идентификацию проводили сравнением ИК, УФ и 1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-спектров образца **Na-ДФБ** ($O_{Na-ДФБ}$) со стандартным образцом ($CO_{Na-ДФБ}$). ИК-спектр $O_{Na-ДФБ}$ должен совпадать со спектром $CO_{Na-ДФБ}$; $\Delta\nu \pm 0,1 \text{ см}^{-1}$ в области «отпечатков пальцев» ($650-1300 \text{ см}^{-1}$), а также в области валентных колебаний $POH \text{ comb}$ ($2331, 2342 \text{ см}^{-1}$ шир. сл. полоса), $P-O \text{ st}$, $P=O \text{ st}$ ($1216-1196; 1100-940 \text{ см}^{-1}$), и OH -групп – $3400-3300 \text{ см}^{-1}$ (шир. сил. полоса).

УФ-спектр $5 \cdot 10^{-4}$ М водного раствора $O_{\text{Na-ДФБ}}$ должен совпадать со спектром $CO_{\text{Na-ДФБ}}$, и иметь максимум $A_{\text{max}} = 0,530 \pm 0,005$ при 256 нм; $\Delta\lambda \pm 0,1$ нм. Специфичность УФ-спектров **Na-ДФБ** показана в таблице 6 по сравнению со спектрами **ДФБ** и бетулина – структурно близких веществ и потенциальных примесей.

Таблица 6

Специфичность УФ-спектрального метода установления подлинности **Na-ДФБ**

Среда	ДФБ		Na-ДФБ		Бетулин	
	A ₂₁₀	A ₂₅₆	A ₂₁₀	A ₂₅₆	A ₂₁₀	A ₂₅₆
95% этанол	0,011	0,504	0,008	0,012	0,012	0,011
Вода	0,015	0,010	0,056	0,505	0,011	0,013
1% раствор меглумина	0,052	0,250	0,054	0,255	0,018	0,011

Основными примесями в субстанции **Na-ДФБ** являются **ДФБ** (0,01%) и бетулин (< 0,001%) и вода (<0,5% для кристаллогидрата).

Количественное содержание воды в составе кристаллогидрата определяли по величине 1 ступени на ТГ-кривых, $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$, и по потере массы после высушивания при 160°C над осушителем. Суммарное содержание воды не должно превышать 17%.

^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-спектры в растворах DMSO- d_6 и D_2O в присутствии стандартов тетраметилсилана (^1H , ^{13}C -ЯМР) и трифенилфосфина (^{31}P -ЯМР) должны совпадать со спектрами $CO_{\text{Na-ДФБ}}$ и содержать сигналы C-3 в виде дублета ($\delta = -0,61$ м.д.) и C-28 в виде неразрешенного триплета ($\delta = 0,28$ м.д.) в DMSO- d_6 , а в D_2O сигналы C-3 ($\delta = 4,28$ м.д.) и C-28 ($\delta = 5,47$ м.д.).

Подлинность **Na-ДФБ** устанавливали с помощью ДСК, $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$. ДСК-кривые образцов **Na-ДФБ** должны совпадать с кривыми $CO_{\text{Na-ДФБ}}$ и иметь эндо-эффект при $103,7 \pm 8,0^\circ\text{C}$.

Дифрактограммы образцов **Na-ДФБ** должны совпадать с $CO_{\text{Na-ДФБ}}$ в 2θ диапазоне $5-50^\circ$ с шагом $0,026^\circ$, со скоростью сканирования $0,067335$ ($^\circ/\text{с}$).

Величина pH водных 0,5% растворов **Na-ДФБ** должна соответствовать pH 7-8.

Количественное определение **Na-ДФБ** проводили по содержанию фосфора молибдатным методом (ГФ XIII) и с использованием ОФ-ВЭЖХ анализа.

Хроматограмма **Na-ДФБ** и градуировочный график представлены на рисунке 4.1.

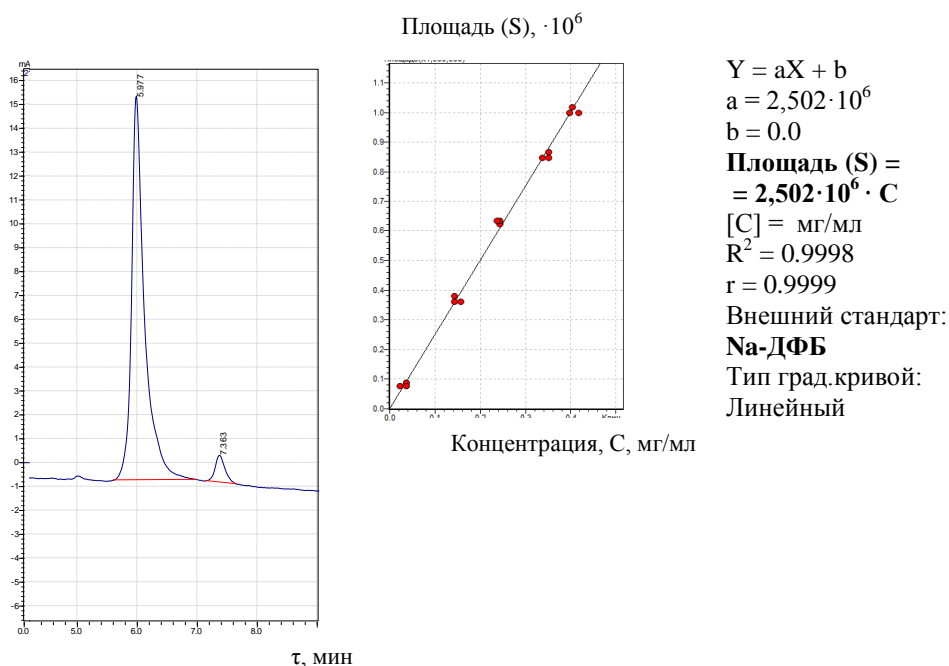


Рис. 13. Хроматограмма 0,01% водного раствора **Na-ДФБ-1** (20 мкл) и градуировочный график Площадь (S) = f(C_(мг/мл)) **Na-ДФБ** (стандарт).

Пригодность хроматографической системы подтверждалась эффективностью, выраженной числом теоретических тарелок N, равной 4693, линейным характером градуировочной прямой ($R^2 = 0,9998$) в пределах концентраций соединения 0,03-0,40 мг/мл (рисунок 13). Отношение сигнал:шум больше, чем 10:1 во всем анализируемом диапазоне концентраций, время выхода **Na-ДФБ** совпадает со временем выхода $CO_{Na-ДФБ}$. Аналитические растворы оставались стабильными в течение суток и не влияли на результаты анализа. Изменения температуры в интервале 30-50°C и скорости потока 0,8-1,2 мл/мин не влияли на результаты измерений.

Методика количественного определения **Na-ДФБ** является избирательной и селективной, наблюдается четкое разделение пиков анализируемого соединения и возможных примесей – $R_s = 4,24$ по отношению к основной примеси, имеет диапазон применения от 70 до 130%. Предел обнаружения – 0,01 мг/мл; предел количественного определения – 0,03 мг/мл.

Оценка неопределенности измерений количественного содержания **Na-ДФБ** методом ВЭЖХ анализа и спектрофотометрического определения общего фосфора была выполнена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 21748-2012 и приведены в таблице 7.

Таблица 7

Оценка неопределенности $u(x)$ количественного определения **Na-ДФБ**

Параметр	ВЭЖХ		Спектрофотометрический анализ общего фосфора	
	x	$u(x)$	x	$u(x)$
Относительное стандартное отклонение (RSD)	100%	$RSD_S_{\text{пика}} = 0,742\%$	100%	$RSD_A = 1,193\%$
Неопределенности, вносимые площадью пика (S) и поглощением (A)	$Ср.S_x = 244176$ $Ср.S_{ст} = 250180$	$u(Ср.S_x) = 2115$ $u(Ср.S_{ст}) = 2167$	$A_x = 0,530$ $A_{ст} = 0,363$	$u(A_x) = u(A_{ст}) = 0,00115$
Неопределенности, вносимые массой навесок $u(m)$	$m_x = m_{ст} = 0,05 \text{ г}$	$u(m_x) = u(m_{ст}) = 0,00008 \text{ г}$	$m_{ст} = 0,0180 \text{ г}$	$u(m_{ст}) = 0,00008 \text{ г}$
Неопределенность, вносимая чистотой $u(Ч)$ и содержанием фосфора $u(P)$	$Ч_{ст} = 1,0$	$u(Ч_{ст}) = 0,00428$	$Ч_{ст} = 1,0$ $P_{ст} = 22,00\%$	$u(Ч_{ст}) = 0,00029$ $u(P_{ст}) = 0,29\%$
Неопределенность, вносимая объемом колбы $u(V_{\text{кол}})$ и аликвоты $u(V_{\text{ал}})$	$V_{\text{кол } x} = V_{\text{кол } ст} = 100 \text{ мл}$ $V_{\text{ал } x} = V_{\text{ал } ст} = 20 \text{ мл}$	$0,041 \text{ мл}$	$V_{\text{кол } x} = V_{\text{кол } ст} = 100 \text{ мл}$ $V_{\text{ал } x} = V_{\text{ал } ст} = 15 \text{ мл}$	$0,041 \text{ мл}$
Относительная суммарная стандартная неопределенность	$\sqrt{\sum_i \left(\frac{u(\text{NaДФБ},\%) }{\text{NaДФБ},\%}\right)^2} = 0,0135$		$\sqrt{\sum_i \left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2} = 0,0150$	
Суммарная стандартная неопределенность	$u(\text{NaДФБ},\%) = \text{NaДФБ},\% \cdot \sqrt{\sum_i \left(\frac{u(\text{NaДФБ},\%)}{\text{NaДФБ},\%}\right)^2} = 1,31\%$		$u(m_x) = m_x \cdot \sqrt{\sum_i \left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2} = 0,00096 \text{ г}$	
Расширенная неопределенность	$U(\text{NaДФБ},\%) = 2,62\%$		$U(m_x) = 0,0019 \text{ г} = 2,91\%$	
Количественное содержание с учетом неопределенности	$(97,6 \pm 2,62)\%$		$(98,6 \pm 2,91)\%$	

По результатам исследований разработан проект фармакопейной статьи «Натриевая соль дифосфата бетулина».

4. Исследование биологической активности натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина и солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами.

ДФБ и солевой комплекс ДФБ с меглумином существенно увеличивали антиоксидантную активность СОД, каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) в экспериментах *in vitro*. Показан дозозависимый эффект по влиянию на антиоксидантную ферментную защиту (таблица 8).

Уровень МДА в эритроцитах снижался под действием ДФБ на $43 \pm 8\%$ в дозе 2 мкг/мл крови, а уровень МДА в плазме – на $52 \pm 12\%$ в дозе 10 мкг/мл крови.

Таблица 8

Активность СОД, каталазы, ГР и Г6ФД (% от контроля) под действием ДФБ, меглумина и ДФБ + меглумин в дозах 2, 5 и 10 мкг/мл

	Доза, мкг/мл	Активность, % от контроля			
		СОД	Каталаза	ГР	Г6ФД
ДФБ	2	335±3	299±14	215±3	132±3
	5	304±4	269±9	179±3	267±4
	10	232±1	103±7	593±2	337±2
Меглумин	2	261±6	234±4	332±3	233±2
	5	233±2	182±8	243±3	99±3
	10	173±4	91±3	185±2	110±1
ДФБ+Меглумин	2	165±2	170±3	539±3	151±3
	5	215±2	237±5	704±4	188±5
	10	157±1	197±9	185±2	99±3

Исследование противоопухолевой активности **Na-ДФБ** проведено на модели привитой асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) на мышах при лечении комбинированными препаратами с гидразина сульфатом (**ГС**) и 5-фторурацилом (**5-ФУ**). Лечение показало улучшение объективных показателей состояния животных по сравнению с контролем (таблица 9): увеличение выживаемости на 40-70%, снижение масса тела, улучшение качества шерсти и поведения; снижение кардиотоксичности, концентрации нейтрофилов и опухолевых клеток, а также объема асцитической жидкости.

Таблица 9

Влияние комбинированных препаратов **Na-ДФБ+5-ФУ** и **Na-ДФБ+ГС** на биологические параметры мышей с АКЭ на 11-й день ^{1,2}

	Выживаемость	Масса тела (г)		Асцитическая жидкость (мл) на 11 день	Опухолевые клетки ³	Нейтрофилы ⁴
		день 1	день 11			
Контроль АКЭ	3/10	23.1±0.6	29.2±0.5	6.0±0.3	++	+++
АКЭ- 5-ФУ	8/10	21.8±0.7	26.3±1.1	4.0±0.5	+	++
АКЭ- ГС	6/10	22.3±0.6	27.1±0.9	4.5±0.4	+	++
АКЭ-(Na-ДФБ+5-ФУ)	10/10	22.5±0.5	25.3±0.5	2.3±0.6	-	+
АКЭ-(Na-ДФБ+ГС)	10/10	23.0±0.5	26.2±0.7	2.6±0.4	-	+
Контроль	10/10	24.5±0.4	25.1±0.3	0	-	+

Примечания:

¹ ± стандартное отклонение (n=10); ² АКЭ – Асцитная карцинома Эрлиха; ³ “-” отсутствие; “+” содержание опухолевых клеток больше, чем 5%; “++” содержание опухолевых клеток больше, чем 10%; ⁴ “+” содержание нейтрофилов здоровых животных; “++” означает содержание нейтрофилов, в два раза большее, чем у здоровых; “+++” означает содержание нейтрофилов, в три раза большее, чем у здоровых.

Таким образом, **Na-ДФБ** в сочетании с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом улучшал состояние здоровья животных, а также уменьшал дозу **ГС** и **5-ФУ** при лечении АКЭ, что может быть использовано при паллиативной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены и изучены водорастворимая натриевая соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина с трисамином, ксимедоном и меглумином с улучшенной гидрофильностью.

Предлагается использовать натриевую соль **ДФБ** как потенциальную фармацевтическую субстанцию.

Выводы

1. Впервые исследована водорастворимая натриевая соль 3,28-дифосфата бетулина и разработаны условия ее получения в устойчивой полиморфной модификации в виде игольчатых кристаллов.

2. Показано влияние структуры исходного 3,28-дифосфата бетулина на процесс получения натриевой соли. Впервые выявлены две основные структурные модификации 3,28-дифосфата бетулина, различающиеся по температуре плавления, растворимости, ИК-спектрам и по величинам экзо-эффекта при $193 \pm 8^\circ\text{C}$ ($-19,7 \pm 0,2$ кДж/моль и $-70,5 \pm 0,7$ кДж/моль, соответственно).

3. Разработаны методики идентификации и количественного определения натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и проведена ее стандартизация. Подлинность установлена данными ИК-, УФ-, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР спектров, температуры эндо-эффекта на ДСК-кривых и рентгеновской порошковой дифрактометрии. Оценка погрешностей и неопределенности количественного определения действующего вещества показала приемлемость использования методов ВЭЖХ и анализа общего фосфора.

4. Впервые получен солевой комплекс 3,28-дифосфата бетулина с трисамином состава 1:1, установленного методами Остромысленского-Жоба и молярных отношений, и рассчитана его кажущаяся константа устойчивости, равная 1130 л/моль.

5. Методами УФ, ИК и ^{31}P -ЯМР спектроскопии исследовано комплексообразование 3,28-дифосфата бетулина с меглумином и ксимедоном в воде. Показано улучшение растворимости в воде комплексов 3,28-дифосфата бетулина с меглумином до 59 г/л, что

практически в 600 раз превышает растворимость в воде исходного 3,28-дифосфата бетулина.

6. В экспериментах *in vitro* на крови крыс установлено ингибирование процессов перекисного окисления липидов, увеличение активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы, 6-фосфатдегидрогеназы, а также улучшение энергетического метаболизма в клетке под действием натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и его комплексных соединений с меглумином по сравнению с контролем.

7. Было показано снижение дозы токсичных противоопухолевых препаратов 5-фторурацила и гидразина сульфата и повышение их эффективности в комбинации с 3,28-дифосфатом бетулина при лечении привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей. ДФБ в сочетании с 5-ФУ и ГС улучшал состояние здоровья животных и их выживаемость на 40-70%, снизил объем асцитической жидкости на 50%, а также уменьшал дозу 5-ФУ и ГС при лечении привитой асцитной карциномы Эрлиха, что может быть использовано при паллиативной терапии.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Данные, полученные в результате проведенных исследований, имеют практическую значимость при поиске новых отечественных лекарственных средств на основе производных бетулина. Рекомендуется:

- использовать впервые полученную натриевую соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина в качестве компонента новых лекарственных средств, используемых в паллиативной медицине при лечении онкологических заболеваний;

- внедрить разработанные методики получения и анализа натриевую соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина в учебный процесс по фармацевтической химии и научно-исследовательскую работу вузов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в дальнейшем направленном поиске и создании новых высокоэффективных биологически активных соединений на основе производных бетулина.

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. – Том 3, №33. – С. 165-169.

2. Vorobyova, O. Betulin-3,28-diphosphate as a Component of Combination Cytostatic Drugs for the Treatment of Ehrlich Ascites Carcinoma In Vitro and In Vivo Experiments / O. Vorobyova, O. Deryabina, D. Malygina, N. Plotnikova, A. Solovyeva, K. Belyaeva, N. Melnikova // **Scientia Pharmaceutica**. – 2018. – Vol.86, №2. – P. 1-14.

3. Melnikova, N.B. Betulin-3,28-diphosphate. Physico-Chemical Properties and In Vitro Biological Activity Experiments / N.B. Melnikova, D.S. Malygina, I.N. Klabukova, D.V. Belov, V.A. Vasin, P.S. Petrov, A.V. Knyazev, A.V. Markin // **Molecules**. – 2018. – Vol.23, №5. – P. 1-13.

4. Melnikova, N.B. Betulin-3,28-diphosphate salt complexes with amines and their antioxidant activity / N.B. Melnikova, D.S. Malygina, O.N. Solovyeva, O.E. Zhiltsova, V.A. Vasin, P.S. Petrov, I.N. Klabukova // **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. – 2018. – Vol.10, №2. – P. 87-95.

5. Малыгина, Д.С. Исследование фосфатов бетулина как потенциальных компонентов лекарственных средств / Д.С. Малыгина // Сборник материалов XXII Нижегородской сессии молодых ученых (г. Нижний Новгород, 23 мая 2017 г.) – 2017. – С. 15.

6. Лебедева, Р.А. Идентификация и количественное определение диацетата бетулина как потенциальной фармацевтической субстанции / Р.А. Лебедева, Д.С. Малыгина // Сборник материалов XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 22 января 2016 г.). – 2016. – С. 155-160.

7. Сидорова, М.В. Анализ комплексов фитиновой кислоты с оксопиримидиновым спиртом – ксимедоном в растворе / М.В. Сидорова, Д.С. Малыгина // Сборник статей Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (г. Уфа, 24 января 2015 г.). – 2015. – Часть 2. – С. 28-32.

8. Воробьева, О.А. Антиоксидантные и прооксидантные свойства производных бетулина / О.А. Воробьева, Д.С. Малыгина, А.Г. Соловьева, К.Л. Беляева, Е.В. Грубова, Н.Б. Мельникова // **Биорадикалы и антиоксиданты**. – 2018. – Том 5, №4. – С. 9-20.

Патенты

1. Способ получения соли 3,28-дифосфата бетулина: пат. 2660649 РФ, МПК С07J 53/00, С07F 9/117 / Мельникова Н.Б., Малыгина Д.С., Жильцова О.Е., Клабукова И.Н., Лебедева Р.А. - № 2017136761; заявл. 18.10.2017; опубл. 09.07.2018, Бюл. № 19.