

На правах рукописи

Тимошников Виктор Александрович

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ДЕФЕРИПРОНА В РЕАКЦИЯХ С УЧАСТИЕМ ПЕРЕХОДНЫХ
МЕТАЛЛОВ

1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук

Научный

Поляков Николай Эдуардович

руководитель

доктор химических наук, заведующий лабораторией Магнитных явлений ИХКГ СО РАН, г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты**

Бердинский Виталий Львович

Доктор физико-математических наук, доцент, заведующий кафедрой биофизики и физики конденсированного состояния Физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Оренбургский государственный университет”, г. Оренбург

Бабайлов Сергей Павлович

Доктор химических наук, г.н.с. лаборатории химии полиядерных металл-органических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института неорганической химии им. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, г.Новосибирск

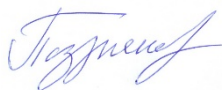
Защита диссертации состоится “16” октября 2024 года в 16-45 часа на заседании Диссертационного совета Д 003.014.02 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета ; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ ” _____ 2024 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Существуют различные заболевания, связанные с избытком переходных металлов в организме, таких как железо и медь. Течение подобных заболеваний сопровождается неконтролируемой генерацией активных кислородных радикалов, способных окислять, повреждать и разрушать большинство биомолекул в организме, вызывая окислительный стресс. Помимо этого, окислительно восстановительные процессы с участием ионов железа и меди являются важным элементом в работе многих жизненно важных систем организма, включая энергетическую, перенос кислорода, а также процессы воспаления и запрограммированной гибели клеток. Поэтому медики и ученые ищут эффективные и оптимальные инструменты для регулирования окислительно-восстановительных процессов, связанных с ионами металлов в организме.

Хелаторы – вещества, способные связываться с ионами металлов и выводить их из организма. Деферипрон, принадлежащий группе гидроксипиридинов, является одним из самых эффективных препаратов для лечения заболеваний, связанных с избытком железа. Его отличительной особенностью является низкая токсичность, высокая водорастворимость и антиоксидантная активность, что позволяет применять этот препарат перорально и с меньшими терапевтическими дозами по сравнению с другими лекарствами той же направленности. Хотя эффективность хелатора подтверждена, точный механизм его антиоксидантного действия в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов железа остаётся неизвестным. Поэтому изучение антиоксидантных свойств деферипрона в реакциях с ионами переходных металлов в гомогенных и организованных средах актуально в различных областях координационной химии и медицины.

Еще одним немаловажным свойством, присущим многим хелатным комплексам является фототоксичность. В результате комплексообразования фотохимические и фотофизические свойства закомплексованного лиганда меняются. Поэтому информация о фотохимической активности деферипрона и его хелатных комплексах с ионами металлов является актуальной с точки зрения хранения, транспортировки деферипрона и других препаратов группы гидроксипиридинов, а также его применения в регионах с высокой солнечной активностью.

Разработанность темы

В настоящий момент фотохимия молекул группы гидроксипиридинов изучена крайне слабо. В работе для исследования фотохимической активности деферипрона применяется метод химической

поляризации ядер (ХПЯ), который является мощным инструментом для изучения радикальных реакций, однако на данный момент подобная методика для изучения препаратов группы гидроксипиридинов не применялась. Помимо этого, в литературе описано, что деферипрон обладает антиоксидантной активностью, однако механизм действия не описан. Для изучения данного вопроса был использован комплексный методологический подход, включающий в себя оптическую спектрофотометрию, ЯМР и ЭПР спектроскопию со спиновыми ловушками. Кроме того, для полноценного исследования редокс активности деферипрона были взяты различные модельные системы, такие как реакция Фентона с ионами железа и меди в отсутствии и присутствии аскорбиновой кислоты, а также перекисное окисление мицелл линолевой кислоты.

Цели и задачи исследования:

Целью работы является исследование фотохимической, а также антиоксидантной активности деферипрона и его комплексов с ионами металлов с использованием различных физико-химических методов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать координационные свойства деферипрона и его хелатных комплексов с ионами переходных и непереходных металлов;
2. Установить механизм фотохимического взаимодействия деферипрона и его комплексов с ионами металлов в реакциях переноса электрона;
3. Исследовать антиоксидантные свойства деферипрона в окислительно-восстановительных реакциях с образованием активных кислородных радикалов с участием ионов переходных металлов в гомогенных растворах и организованных средах;

Научная новизна

Рассчитаны константы равновесия, экстинкции и стехиометрии хелатных комплексов деферипрона с ионами меди, кальция, цинка и алюминия в различных условиях. Установлен механизм взаимодействия деферипрона с ионами Fe(II). Выяснены основные пути фотодегградации деферипрона в реакции с донорами и акцепторами электрона в отсутствии и присутствии ионов металлов. Определен механизм антиоксидантной активности деферипрона в темновых и фотоиндуцированных реакциях с участием ионов Fe и Cu в гомогенных и гетерогенных растворах. Исследовано взаимодействие хелатных комплексов деферипрона с аскорбиновой кислотой. Проведен сравнительный анализ влияния хелаторов деферипрона и деферазирокса на перекисное окисление липидов.

Теоретическая и практическая значимость

Количественные и качественные данные, полученные по стехиометрии, константам равновесия и экстинкциям хелатных комплексов могут быть использованы в дальнейшем для изучения структур хелатных комплексов с участием пиридинпроизводных лигандов. Установленные механизмы фотодеградации, антиоксидантной активности деферипрона и его хелатных комплексов с ионами переходных металлов в гомогенных и гетерогенных растворах имеют как фундаментальное, так и прикладное значение: уточнение модели влияния антиоксидантных хелаторов на окислительные процессы в клетках, такие как ферроптоз, создание более эффективных лекарств для лечения заболеваний, связанных с избытком переходных металлов в организме. Кроме того, данные о взаимодействии аскорбиновой кислоты с ионами металлов и ее разложении в окислительно-восстановительных реакциях с участием ионов железа и меди также могут внести вклад в установление механизма действия витамина С в организме.

Методология и методы исследования

В работе использовался ряд физико-химических методов, включающий в себя ^1H ЯМР спектроскопию, спектрофотометрию в УФ и видимом диапазоне, ЭПР со спиновыми ловушками, масс-спектрометрию и химическую поляризацию ядер (ХПЯ), в том числе с временным разрешением (ВР-ХПЯ). Константы равновесия и экстинкции комплексов деферипрона с ионами металлов, а также эффективные константы скорости окисления аскорбиновой кислоты с участием ионов железа и меди в присутствии деферипрона были получены с использованием метода оптической спектрофотометрии.

Положения, выносимые на защиту

1. Подход к расчетам констант равновесия, экстинкций и стехиометрии комплексов деферипрона с ионами Zn(II) , Ca(II) , Cu(II) и Al(III) в различных средах на основании оптических спектров поглощения хелатных комплексов металлов.
2. Механизм радикальной фотохимической активности L1 в реакции с донорами и акцепторами электрона, а также структуры радикальных интермедиатов и основных продуктов деферипрона, основанные на данных ЯМР и ХПЯ.
3. Комплексный подход к изучению антиоксидантных свойств хелатных комплексов деферипрона с ионами железа и меди в гомогенных растворах с использованием методов оптической спектрофотометрии, ЯМР и ЭПР со спиновыми ловушками.

4. Наблюдаемые зависимости изменения ЭПР сигнала ОН спиновых аддуктов от соотношения концентраций деферипрон-ион металла как средство доказательства стерического фактора антиоксидантной активности деферипрона.
5. Влияние соотношения концентраций деферипрон-ион металла на окислительно-восстановительную активность аскорбиновой кислоты в реакции Фентона и Габера-Вейса.
6. Результаты сравнения эффективности деферипрона и деферазирокса в ингибировании реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов Fe(III) и Cu(II) .

Достоверность работы

Достоверность представленных в диссертационной работе результатов и заключений обусловлена использованием современных экспериментальных подходов, воспроизводимостью научных результатов и их согласием с литературными данными. Полученные результаты были продемонстрированы на российских и международных конференциях, а также опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Связь темы диссертации с плановыми исследованиями

Работа выполнена в лаборатории магнитных явлений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук, в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук «Исследование молекулярных механизмов физико-химических и биологических процессов методами магнитного резонанса и спиновой химии» (номер государственной регистрации 224021500612-1) при поддержке гранта РФФИ: № 18-34-00343 «Исследование влияния соединений-хелаторов на перекисное окисление липидов, индуцированное ионами железа и меди методами химической радиоспектроскопии».

Апробация работы

Результаты, представленные в работе, были апробированы на следующих российских и международных конференциях:

1. **Timoshnikov V. A., Polyakov N. E.** UV light induced Photodegradation of Deferiprone Chelate Complexes. NMR and CIDNP Study // *Сборник статей XVII International Youth Scientific School «Actual problems of magnetic Resonance and its application»*, 2014. Казань, Россия. Р. 150-153.

2. **Timoshnikov V. A.**, Selyutina O. Yu., Polyakov N. E. NMR and CIDNP Study of Phototransformation of Iron Chelator Deferiprone in the Presence of Metal Ions // *Сборник тезисов III International Youth Scientific School, "Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics"*, 2014. Новосибирск, Россия. Р. 90.
3. **Тимошников В. А.** Исследование окислительно-восстановительных процессов с участием деферипрона и его комплексов с ионами металлов // *МНСК*, 2014. Новосибирск, Россия. Р. 87.
4. **Тимошников В. А.**, Кобзева Т. В. Исследование ингибирования гидроксильных радикалов в реакциях, индуцированных ионами железа с участием деферипрона // *МНСК*, 2015. Новосибирск, Россия. Р. 86.
5. **Тимошников В. А.**, Кобзева Т. В. Исследование ингибирования образования гидроксильных радикалов в реакциях, индуцированных ионами меди с участием деферипрона // *МНСК*, 2016. Новосибирск, Россия. Р. 59.
6. **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Selyutina O.Yu., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Effective Inhibition of Copper Catalyzed Production of Reactive Oxygen Species by Deferiprone // *Proceedings of 2016 Mogan Mountain International Conference on Green Pharmaceuticals*, 2016. Deqing, China. P. 7-14.
7. **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. EPR spin trapping study of redox reactions of deferiprone chelating complexes // *IV Молодежная школа с международным участием «Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике»*, 2016. Новосибирск, Россия. Р. 46.
8. **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Influence of deferiprone on redox reactions with Fe and Cu ions // *The 26th International Conference on Chelation*, 2017. Paphos, Cyprus, P. 16.
9. **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Inhibition of copper and iron induced hydroxyl radical formation by metal chelator deferiprone // *2-nd Russian Conference on Medicinal Chemistry*, 2015, Новосибирск, Россия. Р. 291.
10. **Timoshnikov V. A.**, Selyutina O. Yu., Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant and pro-oxidant activity of chelators in lipid membranes peroxidation // *V School for young scientists "Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics"*, 2018. Санкт-Петербург, P. 50.
11. Selyutina O. Yu., **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E. The influence of chelators on lipid oxidation // *III International Conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology (SPCT-2018)"*, 2018. Новосибирск, Россия. Р. 119.

12. **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Kontoghiorghes G. J. Investigation of photoinduced redox reactions involving deferiprone and its complexes with metal ions // *III International Conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology (SPCT-2018)"*, 2018. Новосибирск, Россия. P. 124.
13. **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Antioxidant and redox activity of deferiprone and its chelate complexes with iron and copper ion // *International Symposium on Metal Complexes (ISMEC-2018)*, 2018. Florence, Italy. P. 205-206.
14. **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kobzeva T. V., Kontoghiorghes G. J. Investigation of the effect of chelating compounds on lipid peroxidation induced by iron and copper ions // *International Conference Recent Advances in Health and Medical Sciences (10th RAHMS)*, 2019. Paphos, Cyprus. P. 27.
15. **Timoshnikov V. A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N. E., Selyutina O. Yu., Kontoghiorghes G. J. Investigation of Deferiprone Influence on Generation Oxygen Species in Redox Reactions with Iron and Copper Ions using EPR Spectroscopy with Spin Traps // *XXI Youth Scientific School: Actual problems of magnetic resonance and its application*, 2019. Казань, Россия. P. 199.
16. Selyutina O. Yu., **Timoshnikov V. A.**, Polyakov N. E. The influence of chelators on lipid oxidation // *XXI Youth Scientific School: Actual problems of magnetic resonance and its application*, 2019. Казань, Россия. P. 195.

Личный вклад соискателя

Практически все экспериментальные данные были либо получены лично, либо при непосредственном участии соискателя. Автор также участвовал в составлении плана исследований, обсуждении результатов, формулировке выводов и написании статей по теме диссертационной работы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Timoshnikov V.A.**, Klimentiev V.I., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Photoinduced transformation of iron chelator deferiprone: Possible implications in drug metabolism and toxicity // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2014. Vol. 289. P. 14–21.
2. **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T. V., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Inhibition of Fe²⁺- and Fe³⁺- induced hydroxyl radical production by

the iron-chelating drug deferiprone // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 78. P. 118–122.

3. **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T., Selyutina O.Y., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Effective inhibition of copper-catalyzed production of hydroxyl radicals by deferiprone // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019. Vol. 24, № 3. P. 331–341.
4. **Timoshnikov V.A.**, Kobzeva T.V., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 11. P. 3967.
5. Kontoghiorghes G.J., Kolnagou A., Kontoghiorghes C.N., Mourouzidis L., **Timoshnikov V.A.**, Polyakov N.E. Trying to Solve the Puzzle of the Interaction of Ascorbic Acid and Iron: Redox, Chelation and Therapeutic Implications // *Medicines*. 2020. Vol. 7. P. 45.
6. **Timoshnikov V.A.**, Kichigina L.A., Selyutina O.Yu., Polyakov N.E., Kontoghiorghes G.J. Antioxidant Activity of Deferasirox and Its Metal Complexes in Model Systems of Oxidative Damage: Comparison with Deferiprone // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 16. P. 5064.
7. **Timoshnikov V.A.**, Selyutina O.Y., Polyakov N.E., Didichenko V., Kontoghiorghes G.J. Mechanistic Insights of Chelator Complexes with Essential Transition Metals: Antioxidant/Pro-Oxidant Activity and Applications in Medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, № 3. P. 1247.

Большая часть материалов диссертации изложено в опубликованных работах.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков, 18 схем и 7 таблиц. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, используемых в работе, экспериментальных результатов и их анализа, заключения, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы, состоящего из 190 пункта.

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Работа соответствует пунктам 1 «экспериментальные методы исследования химической структуры и динамики химических превращений», 2 «структура и свойства вандерваальсовых молекул, комплексов, ридберговских молекул, кластеров, ассоциатов, пленок, адсорбционных слоев, интеркалятов, межфазных границ, мицелл, дефектов», 5 «химические механизмы реакций и управление реакционной

способностью» и 6 «строение, структура, и реакционная способность интермедиатов химических реакций» паспорта специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Благодарности

Хочу выразить благодарность всем людям, которые помогали мне:

- Полякову Н.Э. – научному руководителю, вдохновителю и очень хорошему человеку;
- Селютиной О.Ю. – за консультации и помощь в проведении и анализе результатов ЯМР экспериментов с мицеллами;
- Кобзевой Т.В. – за помощь в проведении и анализе результатов ЭПР экспериментов;
- Яньшолу В.В. – за снятие масс-спектров продуктов фотохимических реакций;
- Рецензентам и оппонентам моих научных работ: Глебову Е.М., Стасю Д.В., Душкину А.В., Кирютину А.С., Бердинскому В.Л. и Бабайлову С.П. за ценные замечания.
- Своим учителям Дергунову В.В., Кравцову О.Н., Коркиной Р.А. за возвращение моего научного интереса и расширение кругозора;
- Маме, папе и бабушке за мотивацию и подталкиванию меня к оформлению этого труда;
- Моей жене и маленькой дочке за поддержку и стремление к саморазвитию, а также моим друзьям и знакомым за моральную поддержку.

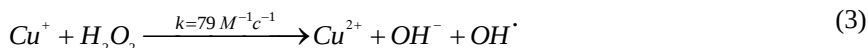
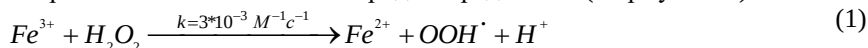
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение включает обоснование актуальности темы диссертации, формулировку цели и задач работы, описание научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, а также отражает личный вклад автора и полноту публикаций по теме диссертации.

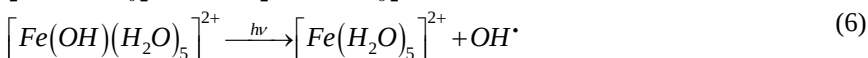
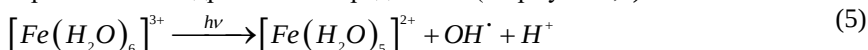
Глава 1. Литературный обзор представляет из себя структурированное описание физико-химических и биологических свойств ионов переходных металлов и их хелатных комплексов в гомогенных и организованных системах при окислительно-восстановительных процессах.

В *разделе 1.1* описываются основные функции железа и меди, их патологическая активность, а также окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гомогенных и гетерогенных реакциях. Известно, что железо и медь являются важными компонентами различных систем организма, выполняющих широкий спектр функций, включающий регуляции всасывания, транспорта, хранения и утилизации

ионов металлов, а также синтез АТФ и регулирование генерацию активных форм кислорода [1]. Тем не менее, существуют внешние и внутренние факторы, влияющие на содержание ионов переходных металлов в организме. Избыток переходных металлов, в частности железа и меди, индуцирует генерацию активных кислородных радикалов, негативно влияющих на функционирование клеток, тканей и органов организма [2]. Рассмотрены окислительно-восстановительные реакции с участием ионов железа и меди в гомогенных растворах. Основными лимитирующими реакциями являются реакции Фентона и Габера-Вейса, описывающие взаимодействие ионов железа и меди с перекисью водорода с образованием активных кислородных радикалов (Формула 1-4).



Помимо темновых реакций описана фотохимическая активность аквакомплексов железа, способных под действием света разлагаться с образованием гидроксильных радикалов (Формулы 5,6).

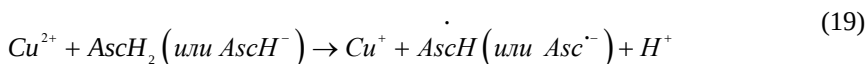
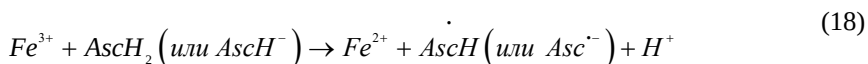
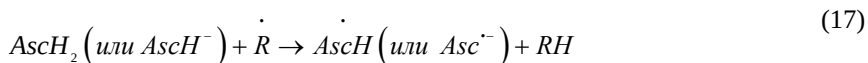


В разделе 1.1.3 обсуждается возможность исследования окислительно-восстановительных реакций с участием ионов железа и меди в гетерогенных (организованных) средах. В качестве примера приведена модель перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди, используемая в данной работе (Формула 7-16).





Раздел 1.2 посвящён описанию окислительно-восстановительной и биологической активности аскорбиновой кислоты ($AscH_2$). Известно, что $AscH_2$ является антиоксидантом и способна восстанавливать активные кислородные радикалы за счет переноса электрона с образованием стабильного радикала аскорбата (Формула 17) [3]. Однако в случае ионов железа и меди $AscH_2$ может выступать как про-оксидант, восстанавливая стабильные ионы Fe^{3+} и Cu^{2+} до активных ионов Fe^{2+} и Cu^{+} , способных инициировать каскад окислительно-восстановительных реакций с образованием активных кислородных радикалов (Формулы 18,19).



Раздел 1.3 посвящен описанию хелаторов ионов металлов, применяемых в медицине. В *разделе 1.3.1* приведено краткое описание физико-химических свойств координационных соединений, включая хелатирующие агенты. В *разделе 1.3.2* описывается влияние хелаторов на окислительно-восстановительные процессы с участием ионов переходных металлов. На данный момент существует три основных механизма воздействия хелатора на окислительно-восстановительную активность иона хелатируемого металла и исследуемой системы. Прежде всего, сам лиганд способен участвовать в окислительно-восстановительных реакциях как с закомплексованными ионами, так и с другими молекулами. Кроме того, координация лиганда с ионом металла влияет на потенциалы окисления и восстановления закомплексованных ионов. Последним значимым фактором со стороны лиганда, влияющим на окислительно-восстановительную активность металла является стерический фактор, обусловленный пространственным расположением координационных соединений вокруг иона металла. *Раздел 1.3.3* посвящен краткому описанию влияния комплексообразования на фотохимическую активность лиганда. Согласно теории Яна-Теллера, комплексообразование ведет к изменению электронных спектров и появлению дополнительных полос поглощения. Данное свойство часто используется в фотодинамической терапии, в качестве фотосенсибилизатора для лечения рака. Тем не менее, некоторые препараты, не использующиеся в фотодинамической терапии, однако обладающие хелатной активностью, также способны участвовать

фотохимических реакциях с различными биомолекулами, негативно влияя жизнеспособность организма и жизнедеятельность организма [4]. В *разделе 1.3.4* приведены основные препараты хелаторы, использующиеся для лечения заболеваний, связанных с избытком железа в организме. Существуют как экзогенные, так и эндогенные факторы, ведущие к появлению избытка металлов в организме. Большинство эндогенных факторов вызвано генетическими нарушениями в организме, поэтому прием препаратов продолжается в течение всей жизни, что накладывает

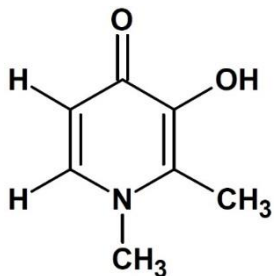


Рисунок 1. Структура молекулы деферипрона (1,2-диметил-3-гидрокси-4-пиридион, L1).

требования на данные лекарства. В случае заболеваний, связанных с избытком железа, используются такие препараты-хелаторы как деферипрон (L1), деферазирокс (DFRX) и дефероксамин. Описаны основные физико-химические свойства хелаторов, их преимущества и побочные эффекты. В *разделе 1.3.5* более подробно описана группа гидроксипиридинов, к которой принадлежит L1. Рассмотрена история развития фармакохимии на базе группы гидроксипиридинов, потенциальное применение данных веществ в различных областях медицины, том числе для лечения заболеваний, связанных с избытком металлов в

организме. *Раздел 1.3.6* посвящен подробному описанию физико-химических, биологических и медицинских свойств L1 (Рисунок 1), его хелатных комплексов с ионами металлов, включая Fe(III). Подробно описаны проявления антиоксидантных/про-оксидантных свойств L1 и его комплексов с переходными металлами на основании проанализированной литературы. Показано, что несмотря на доказанную антиоксидантную активность L1, его механизм антиоксидантного действия подробно не изучен. Также в литературе отсутствует информация о фотохимической активности L1, его хелатных комплексов и структуре его радикальных интермедиатов.

Глава 2 Экспериментальная часть посвящена детальному описанию материалов и методов, используемых в представленной работе. В *разделе 2.1.* представлен список реактивов и растворителей с указанием чистоты и названием фирм-импортеров. В *разделе 2.2.* описывается методика приготовления мицелл линолевой кислоты в буферном растворе. В *разделе 2.3.* описываются методы и оборудование, использованные в настоящем исследовании. Особое внимание уделено методу ядерного магнитного резонанса (*раздел 2.3.1*), являющегося основным в данном исследовании. Затем в *разделе 2.3.2* описан метод химической

поляризации ядер, основанный на методе ядерного магнитного резонанса, однако базирующийся на неравновесной заселенности ядерных магнитных уровней за счет фото- или термовозбуждения и синглет-триплетной конверсии ядерных спинов в радикальной паре. Приведены основные правила для анализа спектров химической поляризации ядер. Описаны основные процессы, происходящие в ион-радикальной паре. В *Разделе 2.3.3*, включающий *разделы 2.3.3.1* и *2.3.3.2* уделено внимание методу электронного парамагнитного резонанса с использованием спиновых ловушек ТМЮ (2,2,4-триметил-2Н-имидазол-1-оксид), PBN (альфа-фенил-N-бутилнитрон) и ТЕМР (2,2,6,6-тетраметил-4-пиперидон), используемых в работе для детектирования короткоживущих радикалов в темновых и фотоиндуцированных реакциях. Помимо этого, приведена схема фотохимической приставки (Рисунок 2), используемой для проведения

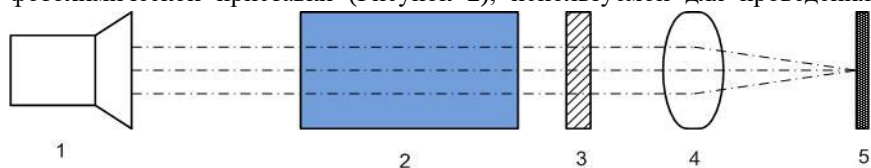


Рисунок 2. Фотохимическая приставка к ЭПР спектрометру: 1 - Ртутная лампа ДРШ-1000; 2 - Водяной фильтр; 3 - Светофильтр (Hg366 и Hg546); 4 - Линза; 5 – Образец.

фотохимических экспериментов.

Разделы 2.3.4 и *2.3.5* посвящены описанию метода оптической спектрофотометрии, и её применению для анализа образования хелатных комплексов. Одним из стандартных подходов для анализа является метод Бенези-Хилдебранда, имеющий как преимущества, так и ряд недостатков, таких как отсутствие учета кинетики образования промежуточных хелатных комплексов. Поэтому для более подробного анализа была разработана программа для расчета констант стабильности и коэффициенты экстинкций комплексов на языке Python. В *разделах 2.3.5.1* и *2.3.5.2* описаны модели расчетов хелатных комплексов 1:1 и 2:1 соответственно, используя в качестве основы кинетические модели ступенчатого комплексообразования, т.е. последовательного присоединения лигандов к иону металлов. Описание модели расчета комплексов 3:1 приведено в *разделе 2.3.5.3*. Её отличительная особенность в одномоментном присоединении трех лигандов к одному иону металла. Данное упрощение продиктовано большими погрешностями в расчетах при использовании модели последовательного комплексообразования ввиду большого набора связанных параметров по сравнению с моделями, описывающие хелатные комплексы с меньшим количеством лигандов. В

разделах 2.3.6 и 2.3.7 описано оборудование для снятия масс-спектров и измерения рН.

Глава 3 посвящена результатам экспериментальных исследований взаимодействия L1 с ионами металлов методом оптической спектрофотометрии и их анализу.

В разделах 3.1 и 3.2. описываются исследования хелатирования L1 с ионами Ca (II), Zn(II), Al (III) и Cu (II) методом оптической спектрофотометрии. Раздел 3.1 посвящен изучению взаимодействия L1 с диамагнитными металлами Ca (II), Zn(II), Al (III). Для определения стехиометрии комплексов, констант стабильности и коэффициентов экстинкций были протитрованы растворы L1 при различных концентрациях ионов металлов. В дальнейшем были построены изменения оптической плотности раствора от концентрации ионов металлов. Данные зависимости были аппроксимированы с использованием программ для расчета констант стабильности и коэффициентов экстинкций комплексов, описанных в разделе 2.3.5. В качестве примера приведены спектры поглощения раствора L1 с ионами Zn (II) а также изменение оптической плотности раствора от концентрации ионов Zn (II)

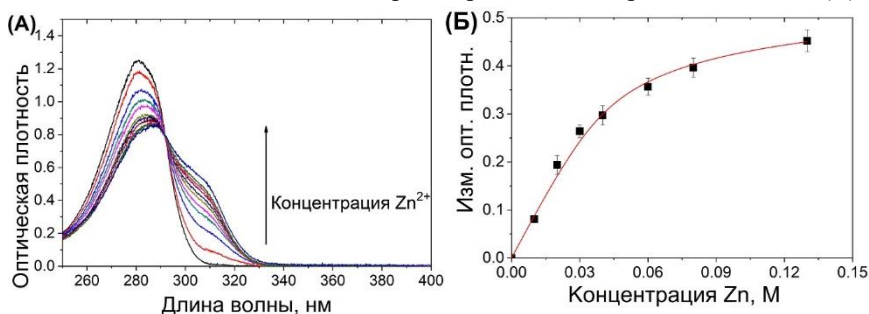


Рисунок 3. (А): Спектры поглощения растворов L1 (0,1 мМ) в растворе EtOH в зависимости от концентрации $ZnCl_2$; Эксперименты были проведены при комнатной температуре (25°C). **(Б).** Изменение оптической плотности раствора L1 относительно изменения концентрации $ZnCl_2$ на длине волны 310 нм. За нулевую точку принята оптическая плотность раствора в отсутствии соли металла в растворе. Красной линией обозначена расчетная кривая. на длине волны 310 нм (Рисунок 3).

Аналогичные эксперименты и расчеты были проведены для хелатных комплексов L1 с ионами Cu(II), описанные в разделе 3.2. В результате было показано, что в нейтральных водных и водно-спиртовых растворах L1 с ионами Ca(II), Zn(II), Cu(II) образуются хелатные комплексы со стехиометрией 2:1, в случае Al(III) – 3:1 (Таблица 1).

Таблица 1. Расчетные константы равновесия комплексов L1 (в M^{-1} для ионов Ca(II), Zn(II), Cu(II) и M^{-3} для ионов Al(III)) в различных растворителях.

	K₁	K₂
L1 + Zn(II); EtOH	$(9 \pm 2,5) \times 10^4$	$(2 \pm 1,2) \times 10^4$
L1 + Ca(II); EtOH	$(1 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1 \pm 0,2) \times 10^5$
L1 + Al(III); ФБ (pH 7.4)*	$(1.2 \pm 0,5) \times 10^{17}$	
L1 + Cu(II); H ₂ O (pH 4.5)	800±40	$2,3 \pm 0,9 \times 10^5$
L1 + Cu(II); EtOH	$(2.8 \pm 0,82) \times 10^6$	$(1,39 \pm 0,37) \times 10^7$
L1 + Cu(II); ФБ (pH 7,4)	1300±350	$(2,38 \pm 0,52) \times 10^6$

*В случае ионов Al K₁ является константой равновесия реакции $3L1 + Al(III) \longleftrightarrow [Al(III)L1_3]$.

Полученные результаты расчетов стехиометрий и коэффициентов экстинкций комплексов не противоречат литературным данным [5,6] и были использованы в дальнейшем для подбора экспериментальных параметрах в фотохимических экспериментах, описанных в *разделе 4.5*.

Глава 4 посвящена изучению фотохимических свойств L1, а также его хелатных комплексов с ионами металлов в отсутствии и присутствии доноров и акцепторов электрона методами оптической спектроскопии и ХПЯ. Помимо этого, в главе описываются основные радикальные интермедиаты и продукты фотодеградации L1, установленные в ходе исследования.

Раздел 4.1 посвящен исследованию фотодеградации L1 и его комплексов с ионами Fe (III). Показано, что чистый L1 является нестабильным и разлагается при облучении светом ртутной лампы или лазером с длиной волны 308 нм. Определена нижняя граница квантового выхода фоторазложения L1 (~0.1). В случае хелатных комплексов $[Fe^{III}L1_3]$ фотостабильность зависит от длины волны излучения. Облучение светом ниже 320 нм происходит быстрая фотодеградация закомплексованного лиганда. В диапазоне от 320 до 420 нм скорость фоторазложения значительно снижается. При облучении светом свыше 420 нм хелатный комплекс фотостабилен. Далее, в *разделах 4.2 и 4.3* описываются результаты исследования фотохимического взаимодействия L1 с акцептором электрона и донором электрона соответственно методом химической поляризации. Наличие сигналов в спектрах химической поляризации ядер смесей L1 с донорами и акцепторами указывает на радикальные механизмы фотохимических реакций, а также на электрон донорные и электрон акцепторные свойства L1. В случае фотохимического взаимодействия L1 с акцепторами электрона поляризация наблюдается как на исходном L1, так и на продуктах фотохимической реакции, что указывает на её обратимость. Отсутствие сигналов поляризованных

продуктов в спектрах ЯМР указывает на их нестабильность и короткое время жизни. На основании полученных данных и расчетных спектров ЯМР, выполненных в программе ACDLabs, была предложена схема радикальной реакции L1 с акцепторами электрона и структуру основного радикального интермедиата (Рисунок 4).

В случае фотохимической реакции L1 с донорами электрона (Раздел 4.3) поляризация наблюдалась как на исходных соединениях, так и на продуктах реакции. На основании полученных данных с использованием методов ЯМР, ХПЯ и масс-спектрометрии были определены структуры основных радикальных интермедиатов L1 и его

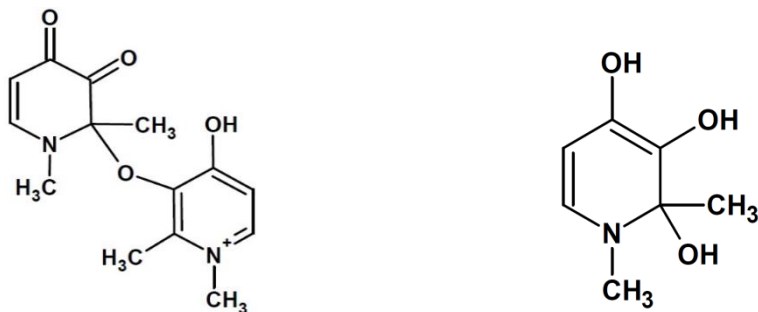


Рисунок 4. (Слева): Структура продукта первичного фотопродукта L1 в реакции с акцептором электрона. **(Справа):** Структура основного продукта фотолиза L1 с донором электрона.

основного стабильного продукта фотодегradации (Рисунок 4). Таким образом было показано, что L1 проявляет как электрон донорные, так и электрон акцепторные свойства, на основании чего были проведены исследования фотохимических свойств чистого L1 методом ЯМР и ХПЯ, описанных в разделе 4.4. Механизм фотохимической активности чистого L1 а также основной продукт фотодегradации совпадают с механизмом и продуктом в системе в присутствии донора электрона.

Было также исследовано влияние кислорода на фотохимические реакции переноса электрона с участием L1 (Рисунок 5). В случае акцептора электрона присутствие кислорода не влияет на первичные фотохимические процессы, но влияет на путь распада радикалов, вышедших из геминальной пары в раствор. Для системы с донором электрона присутствие кислорода уменьшает общую интенсивность поляризации и выход продуктов фотореакций.

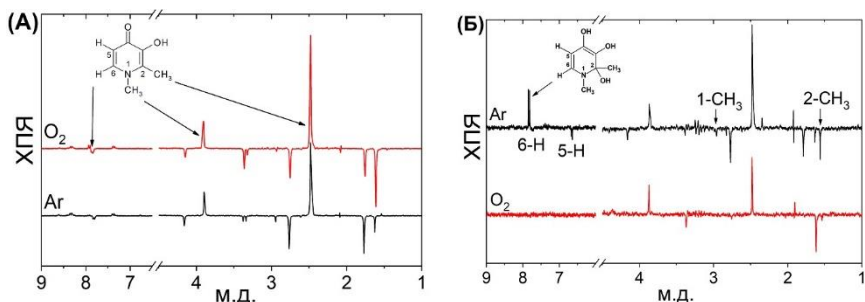


Рисунок 5. (А) Фрагменты ^1H ХПЯ спектров, зарегистрированные после лазерного облучения раствора L1 в ФБ D_2O (pH 5) в присутствии AQDS; (Б) Фрагменты ^1H спектров ХПЯ, зарегистрированные после лазерного облучения L1 в растворе ФБ D_2O (pH 5) в присутствии Тгр. Растворы предварительно продуты кислородом (красный) и аргонем (черный).

Далее, в разделе 4.5 описывалось исследование влияния комплексообразования L1 с диамагнитными металлами Al(III), Ca(II) и Zn(II) на фотохимические свойства лиганда. Было показано, что присутствие иона металла ускоряет фотодеградацию L1. В присутствии N-ацетил-L-триптофана скорость фотодеградации закомплексованного L1 замедляется, предположительно за счет обратимости переноса электрона.

Таким образом, было показано, что L1 разлагается при облучении светом с длиной волны ниже 310 нм, комплекс L1-Fe(III) разлагается при

облучении светом с длиной волны ниже 420 нм. Установлено, что L1 проявляет как донорные, так и акцепторные свойства в фотохимических реакциях. Описаны механизмы фотохимических реакций с донорами и акцепторами электрона, радикальные интермедиаты и основные продукты фотодеградации. Помимо этого, установлено, что хелатирование L1 с ионами металлов ускоряет реакцию фотодеградации L1.

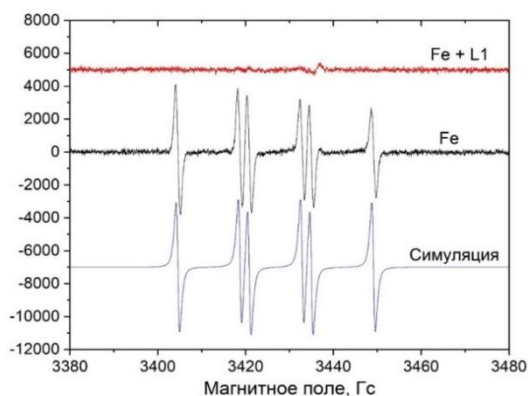


Рисунок 6. ЭПР спектры, зарегистрированные при облучении водного раствора ФБ (pH 7.4) $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ ртутной лампой с водяным фильтром с ловушкой ТМЮ в отсутствии и присутствии L1. Синим цветом обозначен модельный спектр ОН аддукта ТМЮ.

Глава 5 посвящена влиянию L1 на генерацию активных кислородных радикалов в гомогенных растворах, а именно изучение окислительно-восстановительной активности хелатных комплексов L1 с ионами Fe(III) и Cu(II) в отсутствии и присутствии AsCH₂ методом ЭПР со спиновыми ловушками. В *разделе 5.1* показано влияние L1 на фотохимическую активность аквакомплексов Fe(III). Данные комплексы способны фотодegradировать под действием света с образованием гидроксильных радикалов (Формула 5). Показано, что L1 ингибирует генерацию гидроксильных радикалов, задетектированных методом ЭПР с использованием спиновой ловушки ТМЮ (Рисунок 6).

Для подтверждения образования гидроксильных радикалов непосредственно в ходе фотохимического разложения аквакомплексов железа был проведен контрольный эксперимент с добавлением в систему ДМСО [3]. Результат экспериментов показал образование CH₃ и CH₃O аддуктов, что является доказательством образования гидроксильных радикалов в ходе фотооблучения аквакомплексов железа.

В *разделе 5.2* обсуждается редокс активность L1 в реакции Фентона с ионами железа. Как и в случае с фотоиндуцированной реакцией разложения аквакомплексов Fe(III), комплексообразование L1 с ионами железа ингибирует генерацию гидроксильных радикалов, на что указывает снижение сигнала от спиновых аддуктов ОН радикала (Рисунок 7). Видно, что увеличение концентрации лиганда относительно Fe(III) ведет к увеличению антиоксидантной эффективности L1 в системе. Наибольшая эффективность достигается при полной комплексации иона железа [Fe^{III}L1₃], что согласуется с литературой [4]. Аналогичный результат показал L1 в реакции Фентона с ионами Cu(II) (*раздел 5.3*). Комплексообразование L1 с ионами Cu(II), ингибирует реакцию Фентона, что подтверждает уменьшение ЭПР сигнала ОН спиновых аддуктов ТМЮ. Антиоксидантный эффект L1 возрастает с увеличением концентрации лиганда относительно концентрации Cu(II) (Рисунок 7). Учитывая стехиометрические исследования комплексов L1 с ионами меди, описанные в *разделе 3.2.2*, хелатный комплекс [Cu^{II}L1₂] является наиболее редокс инактивным. Дополнительный эксперимент в присутствии ДМСО показал, что АКР образуются только в реакции Фентона, а не при окислении ловушки ионами меди.

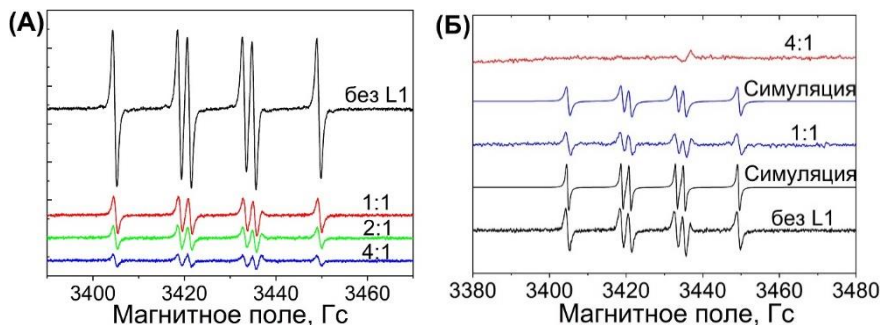


Рисунок 7 (А) ЭПР спектры спинового аддукта ТМЮ-ОН водных растворов FeCl_3 с H_2O_2 и ТМЮ в отсутствии и присутствии различных концентраций L1; (Б) Экспериментальные и расчетные ЭПР спектры спинового аддукта ТМЮ-ОН водных растворов $\text{Cu}(\text{Ac})_2$ с H_2O_2 и ТМЮ в отсутствии и присутствии различных концентраций L1. Эксперименты были проведены при комнатной температуре (25 °C) и pH 6,0.

В разделах 5.4 и 5.5 обсуждается взаимодействие AscH_2 с хелатными комплексами L1 с ионами $\text{Fe}(\text{III})$ и $\text{Cu}(\text{II})$ соответственно, исследуемое методом ЯМР, ЭПР и оптической спектрофотометрии. Результаты оптических экспериментов показали, что при добавлении AscH_2 к раствору $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$ полоса поглощения, соответствующая хелатному комплексу, претерпевает характерные временные изменения: в нейтральном pH (~7) происходит гипсохромный сдвиг; в кислой среде (pH <4) – гипсохромный сдвиг с последующим исчезновением полосы поглощения, характерной для хелатного комплекса $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$. ЭПР эксперименты со спиновой ловушкой ТМЮ в при различных соотношениях концентраций L1 и соли железа в отсутствии и присутствии AscH_2 показали, что при концентрациях $[\text{Fe}] \leq 2[\text{L}_1]$ AscH_2 действует как про-оксидант за счет появления дополнительного канала образования $\text{Fe}(\text{II})$, на что указывает увеличение выхода ОН-ТМЮ аддуктов по сравнению с системой без AscH_2 . При дальнейшем увеличении относительной концентрации лиганда добавление AscH_2 уменьшает выход спиновых аддуктов, что указывает на преобладание антиоксидантной активности над про-оксидантной витамина С. Кроме того, ЯМР эксперименты показали, что при добавлении AscH_2 к раствору $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$ происходит сужение сигналов протонов закомплексованного L1. На основании вышеперечисленных фактов было предположено, что AscH_2 способна встраиваться во внутреннюю сферу хелатного комплекса L1- $\text{Fe}(\text{III})$, образуя смешанный хелатный комплекс $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2\text{Asc}]$, являющийся более редокс стабильным, чем $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_3]$. Данный комплекс остается стабильным в нейтральной среде и разлагается в кислой. В случае ионов меди присутствие AscH_2 усиливает антиоксидантный эффект L1 даже при

малых относительных концентрациях L1. Помимо этого при добавлении AscH_2 в спектре ЭПР появляется неопознанный сигнал от ТМЮ аддукта, имеющий параметры $a(\text{N})=14.89$ Гс, $a(\text{H})=20.27$ Гс. Анализируя литературу [5,6], было сделано предположение, что данный спиновый аддукт соответствует анион-радикалу CO_2 , являющийся продуктом разложения дикетогулоновой кислоты, образующейся в результате гидратации дегидроаскорбата – результата окисления AscH_2 .

Таким образом, было показано, что L1 проявляет антиоксидантную активность и ингибирует генерацию гидроксильных радикалов в реакции Фентона с участием ионов железа и меди. Эффективность антиоксидантной активности зависит от соотношения концентраций лиганд:металл, а также pH раствора, что влияет на координацию ионов металла и возможность встраивания перекиси водорода во внутреннюю сферу комплекса с дальнейшей окислительно-восстановительной реакцией, что говорит об стерической природе антиоксидантного механизма хелатора. Кроме того, было показано, что AscH_2 проявляет как антиоксидантную, так и про-оксидантную активность в реакции Фентона с участием ионов железа и меди. На основании полученных данных был предложен механизм редокс активности AscH_2 в системе L1-Fe, основанный на возможности образования хелатных комплексов $[\text{FeL}_1\text{Asc}]$, стабильных в нейтральных растворах (pH 7) и разлагающихся в кислых (pH <4). Помимо этого, установлено, что механизм разложения вторичных продуктов окисления AscH_2 в присутствии ионов меди имеет радикальную природу.

Глава 6 посвящена сравнению антиоксидантных свойств L1 и DFRX в реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди методом ЯМР.

В разделе 6.1 обсуждаются различия в антиоксидантной активности L1 и DFRX (Рисунок 8) на модели перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди.

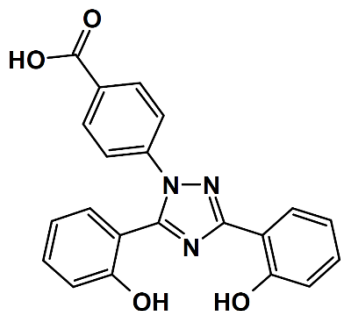


Рисунок 8. Структура хелатора деферазирокс.

Показано, что в отсутствии лигандов происходит уменьшение интегральной интенсивности сигналов протонов линолевой кислоты при двойных связях, в то время как в присутствии хелаторов интегральная интенсивность практически не изменяется. Для расчета эффективных констант скорости перекисного окисления линолевой кислоты стадии инициации с участием ионов железа и меди в отсутствии и

присутствии хелаторов были построены изменения интегральной интенсивности сигналов протонов при двойных связях от времени. Аналогичным образом были рассчитаны константы скорости обрыва цепи (Рисунок 9, Таблица 2).

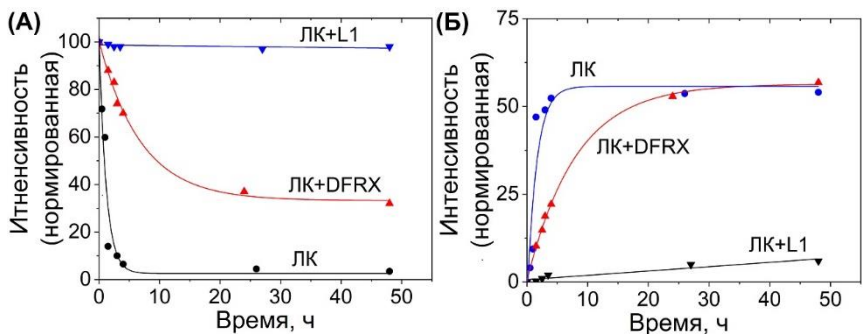


Рисунок 9. (А): Кинетика стадии инициации перекисного окисления ЛК, индуцированного FeSO₄ и H₂O₂ в присутствии и в отсутствии DFRX и L1. Графики построены по спаду интегрального сигнала интенсивности протонов ЛК при 2,7 м.д.; (Б): Кинетика стадии обрыва реакции перекисного окисления ЛК с образованием полимерных продуктов, индуцируемых FeSO₄ и H₂O₂ в отсутствие и в присутствии DFRX и L1. Графики построены согласно обратному изменению интегрального сигнала интенсивности протонов ЛК при 0,9 м.д. (I=100-I_{CH3}); Исследования проводились при комнатной температуре, в ФБ с pH 7,4.

Таблица 2. Константы скорости инициации и терминации реакций перекисного окисления ЛК, индуцированных ионами железа и меди, в отсутствие и в присутствии DFRX и L1.

Реакции с участием ионов железа	Константа скорости инициации, $\times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$	Константа скорости терминации, $\times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$
ЛК	24.0 ± 1	17.0 ± 2
ЛК + DFRX	3.8 ± 0.5	3.5 ± 0.2
ЛК + L1	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03
Реакции с участием ионов меди		
ЛК	10.0 ± 2	4.2 ± 0.8
ЛК + DFRX	3.0 ± 1.0	13.0 ± 5.0
ЛК + L1	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01

На основании рассчитанных данных было показано, что L1 эффективно ингибирует перекисное окисление мицелл линолевой кислоты. Скорость окисления уменьшается более чем в 500 раз. DFRX

также ингибирует перекисное окисление мицелл линолевой кислоты, однако скорость менее, чем в 10 раз. Причина различий в антиоксидантной активности хелаторов может заключаться в липофильности хелаторов и их хелатных комплексов с ионами металлов. DFRX и его комплексы с ионами железа и меди способны проникать внутрь липидных мембран, доставляя ионы переходных металлов ближе к реакционному центру. Таким образом сравнительный анализ антиоксидантной активности хелаторов показал более высокую эффективность L1 ингибировать перекисное окисление мицелл линолевой кислоты по сравнению с DFRX.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

На основании выполненного исследования можно сформулировать следующие основные результаты и выводы:

1. Рассчитаны стехиометрии, константы равновесия и экстинкции хелатных комплексов деферипрона с ионами Cu(II), Al(III), Zn(II) и Ca(II) в водных и спиртовых средах.
2. Установлено, что деферипрон проявляет как электрон донорные, так и электрон акцепторные свойства в фотоиндуцированных реакциях. Описаны механизмы фотохимических реакций, структуры основных радикальных интермедиатов и первичных фотопродуктов. Установлено, что хелатирование металлов ускоряет фотодегградацию деферипрона.
3. Доказано, что деферипрон проявляет антиоксидантную активность и ингибирует генерацию гидроксильных радикалов в фотоиндуцированных реакциях и реакциях Фентона с участием ионов железа и меди. Механизм антиоксидантной активности имеет как энергетическую, так и стерическую природу.
4. Установлено, что аскорбиновая кислота проявляет как антиоксидантную, так и про-оксидантную активность в реакции Фентона с участием ионов железа. На основании полученных данных была предложена структура смешанных хелатных комплексов $[\text{FeL}_1\text{L}_2\text{Asc}]$, стабильных в нейтральных растворах и разлагающихся в кислых средах.
5. Доказано, что деферипрон проявляет антиоксидантную активность в реакции перекисного окисления мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди. Рассчитаны эффективные константы скорости инициации и терминции перекисного окисления линолевой кислоты. Показано, что деферипрон эффективней деферазирокса ингибирует перекисное окисление мицелл линолевой кислоты с участием ионов железа и меди.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Steere A.N. et al. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Vol. 1820, № 3. P. 326–333.
2. Kontoghiorghe G.J., Kontoghiorghe C.N. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases // *Cells*. 2020. Vol. 9, № 6. P. 1456.
3. Bielski B.H.J. Chemistry of Ascorbic Acid Radicals // *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses*. ACS Public / ed. Seib P.A., Tolbert B.M. Washington, DC, USA: Advances in Chemistry, 1982. P. 81–100.
4. Glass B. Photostability of Drugs and Drug Products // *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*. Third / ed. Griesbeck A., Oelgemoller M., Ghetti F. CRC Press, 2012. Vol. 2016, № 0. P. 1003–1028.
5. Sheppard L.N., Kontoghiorghe G.J. Competition between deferiprone, desferrioxamine and other chelators for iron and the effect of other metals // *Arzneimittelforschung*. 1993. Vol. 43, № 6. P. 659–663.
6. Jakusch T. et al. Solution equilibrium characterization of insulin-mimetic Zn(II) complexes // *J. Inorg. Biochem*. 2006. Vol. 100, № 9. P. 1521–1526.
7. Koppenol W.H., Hider R.H. Iron and redox cycling. Do's and don'ts // *Free Radic. Biol. Med*. 2019. Vol. 133. P. 3–10.
8. Simpson G.L.W., Ortwerth B.J. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. Vol. 1501, № 1. P. 12–24.
9. Nishikawa Y., Toyoshima Y., Kurata T. Identification of 3,4-Dihydroxy-2-oxo-butanal (L-threosone) as an Intermediate Compound in Oxidative Degradation of Dehydro-L-ascorbic Acid and 2,3-Diketo-L-Gulonic Acid in a Deuterium Oxide Phosphate Buffer // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2001. Vol. 65, № 8. P. 1707–1712.