

Чучкова Н.Н.¹, Соловьев А.А.¹, Канунникова О.М.², Сметанина М.В.¹, DOI 10.25694/URMJ.2018.12.18
Аксенова В.В.², Тукмачева К.А.², Ладьянов В.И.²

Влияние механоактивации креатина и креатинина на электрокинетическую активность клеток буккального эпителия и эритроцитов

1-ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (ФГБОУ ВО ИГМА МЗ РФ), Ижевск; 2-Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН (УдмФИЦ УрО РАН), Ижевск

Chuchkova N.N., Solovyev A.A., Kanunnikova O.M., Smetanina M.V., Aksenova V.V.,
Tukmacheva K.A., Ladyanov V.I.

Effect of mechanoactivation of creatine and creatinine on buccal epithelium cells and erythrocytes electrokinetic activity

Резюме

Исследовано влияние механоактивации в шаровой планетарной мельнице на структуру и биологическую активность креатина и креатинина по отношению к бук-кальным эпителиоцитам и эритроцитам. Механоактивация креатина и креатинина не изменяет тип кристаллической решетки, при этом изменяются параметры решетки. При механоактивации креатина происходит изменение стерического положения азот-содержащей части молекулы. Механоактивация приводит к таутомерному превращению молекулы креатинина. Выявлена взаимосвязь микроэлектрофоретической подвижности с:

1) химической структурой молекул: молекулы с –N= и OH- группами и большим числом двойных связей проявляли несколько большую активность по сравнению с таутомерами с группами –NH и C=O; 2) зарядовым состоянием азота и кислорода в молекулах: повышение заряда на атоме азота и понижение заряда на атоме кислорода сопровождается повышением активности клеток в водных растворах веществ; 3) повышение гидрофобности, а, следовательно, и липофильности молекул растворенного вещества приводит к повышению активности клеток в растворе; 4) возможно, что наибольшую активность клетки проявляют в растворах, имеющих электропроводность в области 80-90; в растворах с более низкой (25) и более высокой (120) электропроводностью активность клеток ниже; возможно, что данный эффект связан с особенностями взаимодействия заряженных функциональных групп разной природы с мембраной клеток.

Ключевые слова: креатин, креатинин, механоактивация, микроэлектрофорез, эритроциты, эпителиоциты

Summary

The influence of ball milling on the structure and biological activity of creatine and creatinine in relation to buccal epithelial cells and erythrocytes was studied. Mechanoactivation of creatine and creatinine does not change the type of crystal lattice, thus changing the lattice parameters. When creatine is mechanically activated, the steric position of the nitrogen-containing part of the molecule changes. The new structural state of the creatine molecule is unstable and breaks down after a few days in the powder sample, and the aqueous solution after 15 minutes. Ball milling leads to tautomeric transformation of a molecule of creatinine. It is revealed the interrelation of microelectrophoretic mobility with: 1) chemical structure of molecules: molecules with –N= and OH - groups and a large number of double bonds showed a slightly higher activity compared to tautomers with –NH and C=O groups; 2) charge state of nitrogen and oxygen atoms in molecules: increasing the charge on the nitrogen atom and lowering the charge on the oxygen atom is accompanied by an increase in the activity of cells in aqueous solutions of substances; 3) increased hydrophobicity and, consequently, lipophilicity of molecules of the dissolved substance leads to an increase the cells activity in the solution; 4) it is possible that the greatest activity of cells is shown in solutions having electrical conductivity in the region of ~80-90 Cm; in solutions with lower (~25Cm) and higher (~120Cm) electrical conductivity the activity of cells is lower; it is possible that this effect is associated with the peculiarities of the interaction of charged functional groups of different nature with the cell membrane.

Key words: creatine, creatinine, mechanoactivation, microelectrophoresis, erythrocytes, epithelial cells

Введение

Креатин считается относительно безвредной, широко используемой биодобавкой у спортсменов. Имеются публикации, указывающие на положительное действие креатина при лечении депрессивных и когнитивных расстройств [1], болезни Паркинсона [2]. Однако длительный прием креатина, превышение дозы препарата вызывают ряд побочных действий, как-то: желудочно-кишечные расстройства, судороги, увеличение массы тела [3], изменения в работе печени и почек [4]. Креатинин – конечный продукт креатин-фосфатной реакции, повышение которого в крови является диагностическим маркером нарушения белкового обмена, функции печени и почек. В то же время производные креатинина, получаемые путем замещения амидов и оснований Шиффа на креатинин, проявляли антимикробные и антиоксидантные свойства [5].

Идея о наличии связи между химической структурой органических соединений и их биологической активностью была впервые высказана еще в 1869 г. Однако, несмотря на большое число исследований в этой области, выявленные закономерности не позволяют заранее прогнозировать взаимосвязь между фармакологической активностью и стереохимией молекул органических соединений. Данная работа является частью наших исследований по выявлению связи между структурным состоянием азотсодержащих гетероциклических соединений и их биологическими свойствами.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись креатин и его циклическое производное – креатинин.

Для модификации структуры креатина и креатинина использовали метод механоактивации (МА) в шаровой планетарной мельнице АГО-2. Для анализа размеров и формы частиц порошков использовали метод атомной силовой микроскопии. Структурно-фазовый анализ проводился на рентгеновском дифрактометре Bruker D8 Advance с использованием $\text{CuK}\alpha$ -излучения. Обработка дифракционных данных и уточнение структуры методом Ритвелда проведены с использованием TOPAS 4.2. ИК-спектры получены на ИК Фурье спектрометре ФСМ 1202 (Россия).

Истинную плотность полученных порошков креатина и креатинина определяли пикнометрическим методом. В качестве вспомогательной жидкости использовали н-гептан.

Электропроводность водных растворов измерена с помощью кондуктометра Эксперт-002.

Константы гидрофобности $\lg P$ (π -константы Ханша) рассчитаны по методу К.Ханша [6] с учетом общих констант фрагментов и геометрических факторов. В расчетах использовались следующие значения констант фрагментов: $f_{\text{CH}_3} = 0.87$, $f_{\text{CH}_2\text{цикл}} = 0.63$, $f_{\text{CH}} = 0.43$, $f_{\text{NH}_2} = -1.54$, $f_{\text{NH}} = -2.15$, $f_{\text{O}} = -2.18$, $f_{\text{N}} = -1.82$ и геометрических факторов E , характеризующих связи: $F_{\text{кольцо}} = -0.12$, $F_{\text{изолированная}} = -0.09$, $F_{\text{амин}} = -0.55$, а также факторы близости гетероатомов в цепи (или кольце).

Оценка заряда на атомах азота проведена Федоровой Н.С. (С-Петербург, ООО Нефтехим) по методу CNDO/2 без оптимизации по заряду с использованием стандартных углов и длин связей.

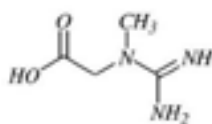
Исследования действия водных растворов на живые изолированные клетки человека (эритроциты и эпителиоциты) проводились на приборе «Цито-эксперт».

Клетки буккального эпителия получали путем соскоба с внутренней поверхности слизистой оболочки щеки от здоровых доноров (№ 12). Манипуляция производилась с добровольного информированного согласия каждого из участвующих в эксперименте, одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России. Для изучения эритроцитов использовалась человеческая эритроцитарная масса. Для эксперимента 1 каплю эритроцитарной массы, либо материал соскоба погружали в 1 мл исследуемой жидкости (физраствор + препарат). Активность клеток (мкм) определяли по возвратно-поступательным движениям клетки в целом, цитолеммы, карилолеммы у ядросодержащих эпителиоцитов. Для оценки амплитуды колебаний использовали окулярную линейку, цену деления которой определяли в зависимости от кратности увеличений объективов и окуляров.

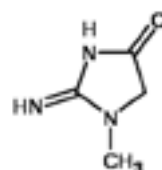
Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6.1. Различия между показателями считали статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Креатин. Камневидные частицы исходного порошка креатина имеют микронные размеры. После 1 ч МА порошок креатина состоит из агрегатов частиц размером от 300 до 2 мкм. Размеры агрегатов 1-5 мкм. Средний размер частиц составляет 1,1 мкм. Агрегаты слабо связаны и разрушаются под воздействием иглы кантилевера при сканировании. Средний размер частиц 330 нм. Частицы пластинчатые. Толщина пластин порядка 25 нм. При увеличении времени механоактивации до 6 ч начинают



креатин



креатинин

Таблица 1. Параметры кристаллической решетки моногидрата креатина

Обработка	ОКР, нм	$\langle c^2 \rangle^{1/2}$, %	параметры решетки
исходный	452 ± 50,1	0,32 ± 0,01	a = 12,5132 ± 0,0012 Å b = 5,0483 ± 0,0005 Å c = 12,1694 ± 0,0007 Å β = ± °
МА (6 ч)	106,2 ± 2,8	0,43 ± 0,01	a = 12,5116 ± 0,0011 Å b = 5,0482 ± 0,0004 Å c = 12,1659 ± 0,0009 Å β = 108,8798 ± 0,0063 °

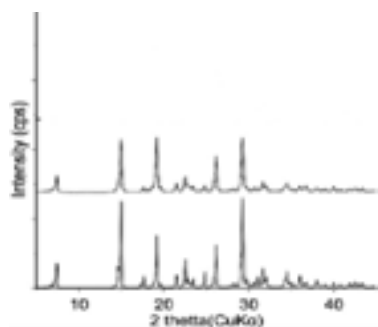


Рис. 1. Рентгеновские диффрактограммы креатина в исходном состоянии (1) и после механоактивации (2).

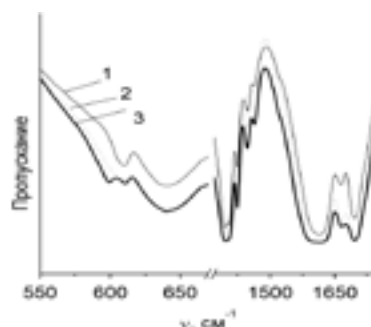


Рис. 2. ИК-спектры креатина до и после механоактивации: исходный (1), после 3 ч механоактивации (2) и после 6 ч механоактивации (3).

Таблица 2. Влияние механоактивации на истинную плотность креатина и креатинина

Время механоактивации	Истинная плотность, г/см ³ (±0.002)	
	креатин	креатинин
0	1.387	1.090
30 мин.	1.413	1.090
1 ч	1.424	1.091
3 ч	1.424	1.093
6 ч	1.424	1.110

Таблица 3. Электропроводность водных растворов креатина и креатинина (1.3 вес. %)

Растворенное вещество	Обработка	Электропроводность, См
креатин	исходный	26,5
	МА	25,3
креатинин	исходный	121,0
	МИ	88,5

ся процессы агрегирования, приводящие к уплотнению агрегатов.

В исходном состоянии и после механоактивации исследованные образцы представляли собой моногидрат креатина. Тип кристаллической структуры креатина после механоактивации не изменяется. Однако меняются основные параметры элементарной ячейки (рис.1, табл.1). Размер кристаллитов снижается, растет уровень микронапряжений (табл.1).

ИК-спектр моногидрата креатина в таблетке с КВг представлен на рис. 2. Широкая и интенсивная полоса между 3500 и 2800 см⁻¹ относится к валентным колебаниям О-Н и N-Н связей кристаллогидратной воды. Полоса при 2787 см⁻¹ относится к валентным колебаниям С-Н связей метильной группы, а интенсивная полоса между 1700 и 1600 см⁻¹ относится к валентным колебаниям С=О связей карбоксильной группы и С-N связей. На рис. 2 представлены ИК-спектры исходного и механоактивированного креатина. Анализ спектров свидетельствует, что как исходный, так и механоактивированный порошки представляли собой моногидрат креатина.

После механоактивации в течение 6 ч очевидны стерические изменения молекулярной структуры креатина, затрагивающие N-H и C-N групп. Наиболее чувствительны к ближайшему окружению группы в кристалле низкочастотные колебания, поэтому изменения углов и длин химических связей проявляются: ~600 см⁻¹ в области веерных колебаний δ(N-H); ~1460 см⁻¹ в области валентных колебаний ν(C-N) и 1600-1700 см⁻¹ в области деформационных колебаний δ(N-H).

Стерические изменения структуры молекул креатина после механоактивации (1÷6 ч) приводят к изменению его истинной плотности (повышение на ~2%) (табл.2).

Анализ ИК-спектров позволяет предположить, что при механоактивации происходит изменение стерического положения азотсодержащей части молекулы. В результате молекула становится «более компактной» (уменьшается истинная плотность) и увеличивается площадь гидратации в водных растворах (растет вязкость и уменьшается коэффициент расширения).

Гидрофобность молекулы креатина, рассчитанная по методу Ханша, составляет (-7.89). Рассчитанные заряды на атомах азота составляют: δ(-N<) = -1.09; δ(-NH-) =

Таблица 4. Микроэлектрофоретическая подвижность эпителиоцитов и эритроцитов в водных растворах креатина

Раствор	Эритроциты			Эпителиоциты		
	Гемолиз клеток, %	Доля активных клеток, %	Амплитуда колебаний клеток, мкм	Доля активных клеток, %	Амплитуда колебаний ядер, мкм	Амплитуда колебаний плазмолеммы, мкм
Физ. р-р	0	84,5±1,5	6,4±0,9	76,5±1,4	1,7±0,6	3,7±0,5
Исходный креатин	0	88,7±1,6	6,6±0,6	79,8±1,2	1,7±0,6	3,7±0,4
Креатин МА 30 мин	0	88,7±1,5	6,6±0,5	82,1±1,2*	1,7±0,5	4,0±0,5
Креатин МА 3 ч	0	92,4±1,5*	7,1±0,6	83,7±1,5*	1,7±0,5	3,9±0,5
Креатин МА 6 ч	0	93,4±1,5	7,2±0,6	83,7±1,4*	1,7±0,5	3,9±0,6

* – различия достоверны при $p \leq 0,05$; МА - механоактивация

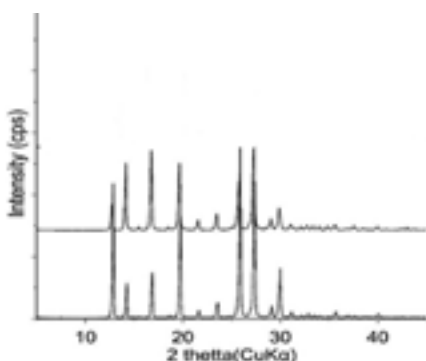


Рис.3. Рентгеновские дифрактограммы креатинина в исходном состоянии (1) и после механоактивации (2).

-1.20; $\delta(-NH_2) = -1.22$. Заряд на атомах кислорода в группах C=O и OH составляет 1.102 и 0.732, соответственно. Метильная группа имеет незначительный положительный заряд.

Неизменность зарядового состояния атомов азота и кислорода после механоактивации креатина проявляется в том, что электропроводность водных растворов исходного и механоактивированного креатина (табл.4).

В таблице 4 приведены результаты микроэлектрофоретических исследований эритроцитов и эпителиоцитов в свежеприготовленных растворах исходного и механоактивированного креатина.

Доля активных клеток (как эритроцитов, так и эпителиоцитов) в растворе с механоактивированными препаратами креатина растет в среднем на 10%, амплитуда колебаний мембран клеток либо не меняется (у эпителиоцитов), либо незначительно повышается (у эритроцитов). Ядро эпителиальных клеток щечного эпителия на воздействие механоактивированных препаратов не реагирует. Эффект воздействия оказывается кратковременным и через ~15 минут после начала микроэлектрофоретических исследований различие действия механоактивированных и исходных растворов на живые клетки исчезает.

Механизм действия молекул органических веществ обусловлен их взаимодействием с биохимическими рецепторами, при этом важным являются расстояния между реакционными центрами, которые отвечают за взаи-

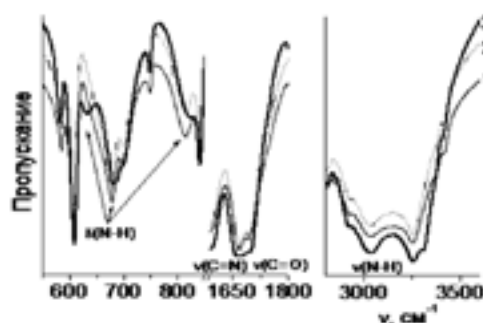


Рис. 4. ИК-спектры креатинина: исходный (1), после 3 ч (2) и 6 ч (3) механоактивации.

модействием с активными участками рецепторов. Поэтому полученные в табл.3,4 данные можно интерпретировать, основываясь на подходе, основанном на аналогиях в строении молекулы исследуемого соединения и молекул, биологическое действие которых уже охарактеризовано. В качестве молекулы вещества-сравнения используют молекулу гамма-аминоасляной кислоты (ГАМК).

У исследуемого вещества в его структуре предпочтительно иметь свободные амино- и карбоксильную группы, что связано с необходимостью создания анионного и катионного зарядов для взаимодействия с рецептором. Оптимальную длину атомной цепочки между азотом основной группы и кислородом кислой группы составляют четыре атома. Поскольку каждая из таких групп взаимодействует с противоположно заряженным центром на поверхности рецептора ГАМК, то биологическая активность ее аналогов окажется функцией расстояния между этими группами. Для проявления максимальной активности заряды катионной (N+) и анионной (O-) групп должны находиться на расстоянии порядка 6 Å. Уменьшение или увеличение этого расстояния приводит к уменьшению биологической активности вещества.

Можно предположить, что в результате механоактивации изменяется расстояние между карбоксильной и аминогруппами в молекуле креатина, что приводит к незначительному увеличению биологической активности. Однако новое структурное состояние, полученное в

Таблица 5. Микроэлектрофоретическая подвижность эпителиоцитов и эритроцитов в водных растворах креатинина

Раствор	Эритроциты			Эпителиоциты		
	Гемолиз клеток, %	Доля активных клеток, %	Амплитуда колебаний клеток, мкм	Доля активных клеток, %	Амплитуда колебаний ядер, мкм	Амплитуда колебаний плазмолеммы, мкм
Физ. р-р	0	84,5±1,5	6,4±0,9	76,5±1,4	1,7±0,6	3,7±0,5
Исходный креатин	8	93,6±1,4*	8,2±0,6*	96,3±1,7*	3,2±0,4*	3,8±0,6
Креатин МА 30 мин	0	93,8±1,3*	8,9±0,5*	97,0±1,5*	3,2±0,4*	3,9±0,5
Креатин МА 3 ч	0	98,7±1,2*	11,7±0,3*	98,8±1,5*	3,9±0,4*	4,6±0,4*
Креатин МА 6 ч	0	98,9±1,1*	11,8±0,3*	98,7±1,3*	3,9±0,5*	4,6±0,4*

* - различия достоверны при $p \leq 0,05$; МА – механоактивация

результате механоактивации, является неустойчивым и разрушается через несколько дней, а в водном растворе через несколько минут.

Креатинин. После 1 ч механоактивации частицы креатинина уменьшились до 100-200 нм. Размеры кристаллитов в частицах составляют порядка 40 нм. Частицы формируют слабо связанные агрегаты размером до 5 мкм. После 3 ч механоактивации агрегаты приобретают слоистую структуру, с толщиной слоев порядка 70-180 нм. Средний размер частиц 160 нм. С увеличением времени механоактивации до 6 ч процесс агрегации частиц порошка доминирует. Частиц размером от 300 до 1000 нм упакованы в плотные слоистые агрегаты размером порядка 1 мкм.

Тип кристаллической структуры креатинина после механоактивации, не изменяется, однако, меняются основные параметры элементарной ячейки. Об этом свидетельствует смещение дифракционных пиков (рис.3, табл. 4).

Механоактивация креатинина приводит к заметным структурным изменениям самой молекулы, что отражается в характеристических полосах поглощения в ИК-спектре (рис. 4) после 6 ч механоактивации. Это поглощение, соответствующее вращательным колебаниям $\delta(N-H)$ – 600-800 см⁻¹; перекрывающимся валентным колебаниям $\nu(C=N)$ и $\nu(C=O)$ ~1690 см⁻¹ и валентным колебаниям $\nu(N-H)$ – 3000-3300 см⁻¹.

Истинная плотность исходного креатинина составляет 1.092±0.002 г/см³, после механоактивации незначительно повышается – до 1.110 ±0.002 г/см³. Растворимость в воде составляет 9.15 г/см³ (25°C), и не изменяется в результате механоактивации.

Анализ рентгенофотоэлектронных спектров свидетельствует, что в результате механоактивации происходит таутомерное превращение: в спектре N1s уменьшается интенсивность компоненты от протонированного азота, повышается интенсивность компоненты от третичного азота; в O1s спектре уменьшается интенсивность компоненты C=O и повышается интенсивность OH-компоненты, т.е. происходит депротонирование азота. Депротонированное состояние молекулы креа-

тинина сохраняется в водном растворе и проявляется в электропроводности раствора (табл.4). Электропроводность растворов исходного и механоактивированного креатина практически одинакова, а электропроводность механоактивированного креатинина существенно ниже, чем исходного. Электропроводность, в данном случае, зависит, от зарядового состояния гетероатомов. Заряды на протонированном и непротонированном атомах азота различаются незначительно, в то время, как заряд на атоме карбоксильного кислорода почти в 2 раза выше, чем на атоме кислорода в гидроксильной группе. Именно этот эффект, по-видимому, и является причиной снижения электропроводности раствора креатинина.

Различаются также и величины pH растворов исходного и механоактивированного креатинина, в то время как pH растворов креатина не различаются. Используя данные pH были рассчитаны соотношения протонированной и непротонированной форм водных растворах исходного и механоактивированного (6ч) креатинина по формуле $W = \lg [P/N]$, где P-протонированная форма креатинина, N – непротонированная форма креатинина). Это соотношение составляет -1.49 для исходного креатинина, -2.17 и -4.67 для механоактивированного в течении 30 минут и 6 ч креатинина, соответственно, т.е. после механоактивации доля молекул креатинина с протонированным атомом азота существенно уменьшается.

Расчитанные гидрофобности молекул исходного и механоактивированного креатинина составляют (-6.84) и (-6.21), соответственно.

В таблице 5 приведены параметры микроэлектрофоретической подвижности клеток в водных растворах креатинина.

Количество активных красных клеток крови в растворах механоактивированных и исходных порошков креатинина практически не отличается, однако с увеличением времени МА в 1,4 раза ($p \leq 0,05$) повышается амплитуда колебаний эритроцитов, что может быть обусловлено активностью транспортных процессов, идущих через эритроцитарную мембрану. Количество эпителиоцитов, совершающих активные поступательные движения в растворах механоактивированных препаратов повышается в

среднем на 28-30% и не коррелирует с длительностью механоактивации. Резко возрастает (в 2,3, $p \leq 0,05$) активность колебательных движений ядра, незначительно повышается амплитуда движения цитолеммы (на 24%, $p \leq 0,05$). Видно, что активность клеток в растворах механоактивированного креатинина выше, чем в растворе исходного креатинина. Причем активирующее действие креатинина повышается с увеличением времени механоактивации.

Таким образом, появление функциональных групп $-N=$ и $OH-$ вместо $-NH$ и $C=O$ приводит к незначительному повышению биологической активности механоактивированного креатинина по отношению к эпителиоцитам и эритроцитам. Аналогичное таутомерное превращение мы наблюдали ранее при механоактивации оротата магния. Таутомеры оротата магния с $-N=$ и $OH-$ проявляли несколько большую активность по сравнению с таутомерами с группами $-NH$ и $C=O$ [7].

Еще одна причина различия активности клеток в растворах креатинина может быть связана с различием электропроводности. Снижение электропроводности растворов сопровождается повышением активности клеток. Возможно, что причиной этого являются особенности взаимодействия отрицательно заряженных функциональных кислородсодержащих групп молекулы креатинина с мембраной клетки, в результате которого более активирующее влияние оказывают группы, имеющие меньший заряд.

Заключение

Результаты проведенных исследований могут быть коротко сформулированы следующим образом.

Механоактивация креатина и креатинина не изменяет тип кристаллической решетки, при этом изменяются

параметры решетки.

При механоактивации креатина происходит изменение стерического положения азотсодержащей части молекулы. Новое структурное состояние молекулы креатина нестабильно и разрушается через несколько дней в порошковом образце, а в водном растворе через 15 минут. Механоактивация приводит к таутомерному превращению молекулы креатинина.

Выявлена взаимосвязь микроэлектрофоретической подвижности с:

- химической структурой молекул: молекулы с $-N=$ и $OH-$ группами и большим числом двойных связей проявляли несколько большую активность по сравнению с таутомерами с группами $-NH$ и $C=O$;

- зарядовым состоянием азота и кислорода в молекулах: повышение заряда на атоме азота и понижение заряда на атоме кислорода сопровождается повышением активности клеток в водных растворах веществ;

- повышение гидрофобности, а, следовательно, и липофильности молекул растворенного вещества приводит к повышению активности клеток в растворе;

- возможно, что наибольшую активность клетки проявляют в растворах, имеющих электропроводность в области 80-90; в растворах с более низкой (25) и более высокой (120) электропроводностью активность клеток ниже; возможно, что данный эффект связан с особенностями взаимодействия заряженных функциональных групп разной природы с мембраной клеток. ■

Авторы выражают благодарность Мухгалину В.В. за проведение рентгеноструктурного анализа образцов и д.ф.-м.н. Карбань О.В. за исследование частиц механоактивированных порошков методом атомно-силовой микроскопии.

Литература:

1. Toniolo R.A., Fernandes F.B.F., Silva M., Dias R.D.S., Lafer B. Cognitive effects of creatine monohydrate adjunctive therapy in patients with bipolar depression: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Affect Disord.* 2017; 224:69-75.
2. Kiebertz K., Tilley B.C., Elm J.J., Babcock D., Hauser R., Ross G.W. et al. Effect of creatine monohydrate on clinical progression in patients with Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2015; 313(6):584-93.
3. Andres S., Ziegenhagen R., Trefflich I., Pevny S., Schultrich K., Braun H., Schänzer W., Hirsch-Ernst K.I., Schäfer B., Lampen A. Creatine and creatine forms intended for sports nutrition. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61(6).
4. Hall M., Trojian T.H. Creatine supplementation. *Curr Sports Med Rep.* 2013; 12(4):240-244.
5. Mumtaz A., Zahoor F., Zaib S., Nawaz M.A.H., Saeed A., Waseem A., Khan A., Hussain I., Iqbal J. Synthesis, Characterization and Biological Activities of Creatinine Amides and Creatinine Schiff Bases. *Med Chem.* 2017; 13(2):196-203.
6. Зефирова О.Н., Палюлин В.А. История QSAR. Ранние исследования количественной связи между структурой и биологической активностью органических соединений; В кн.: История химии: область науки и учебная дисциплина. Под ред. В.В.Лунина и В.М.Орла. М.: Изд-во МГУ, 2001, с. 60–73, 74–81.
7. Чучкова Н.Н., Канунникова М.М., Сметанина М.В., Комиссаров В.Б., Соловьев А.А. Сравнительное исследование эффективности применения таутомеров оротата магния для компенсации дефицита магния. Часть I. Влияние таутомеров магния оротата на изолированные клетки лабораторных животных и человека. *Уральский медицинский журнал.* 2018; 4(159):141-146.