ЯДРО ФИЗИКАСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЯДРО ФИЗИКАСИ ИНСТИТУТИ

ЯРМАТОВ БАХРОМ ХАЙДАРОВИЧ

ИНСОН ҚОНИ ТРАНСПОРТ ОҚСИЛИ БОҒЛОВЧИЛИК ҚОБИЛИЯТИНИ БАҲОЛАШНИНГ РАДИОКИМЁВИЙ УСУЛИНИ ИШЛАБ ЧИҚИШ

01.04.01 – Экспериментал физиканинг асбоблари ва усуллари

Техника фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси

АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент– 2020

УДК 546.11.027*3

Техника фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси

Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD) по техническим наукам

Content of the dissertation abstract of the doctor of philosophy (PhD) on technical sciences

Ярматов Бахром Хайдарович 5
Инсон қони транспорт оқсили боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш

Ярматов Бахром Хайдарович 24
Разработка радиохимического метода оценки связывающей способности транспортных белков крови человека

Yarmatov Bakhrom Khaydarovich 45
Development of a radiochemical method for assessing the binding ability of human blood transport proteins

Эълон қилинган ишлар рўйхати 50
Список опубликованных работ
List of published works

ЯДРО ФИЗИКАСИ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЯДРО ФИЗИКАСИ ИНСТИТУТИ

ЯРМАТОВ БАХРОМ ХАЙДАРОВИЧ

ИНСОН ҚОНИ ТРАНСПОРТ ОҚСИЛИ БОҒЛОВЧИЛИК ҚОБИЛИЯТИНИ БАҲОЛАШНИНГ РАДИОКИМЁВИЙ УСУЛИ ИШЛАБ ЧИҚИШ

01.04.01 – Экспериментал физиканинг асбоблари ва усуллари

Техника фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2020

Техника фанлари бўйичафалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида № B2019.4.PhD/T1391 рақами билан рўйхатга олинган.

Диссертация Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси Ядро физикаси институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз (резюме)) Илмий кенгашнинг веб-саҳифасида (www.inp.uz) ва «Ziyonet» Ахборот-таълим порталида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар: **Ким Андрей Алексеевич**
биология фанлари номзоди, катта илмий ходим

Расмий оппонентлар: **Бозоров Эркин Хожиевич**
физика-математика фанлари доктори, профессор

Нишонов Шерзоджон Жуманазарович
техника фанлари буйича фалсафа доктори

Етакчи ташкилот: **Ўзбекистон миллий университети**

Диссертация ҳимояси Ядро физикаси институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил "**18**" **июн** соат **12-00** даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Улуғбек қўрғони, Ядро физикаси институти. Тел. (+99871) 289-31-18; факс (+99871) 289-36-65; e-mail: info@inp.uz).

Диссертация билан Ядро физикаси институтининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (**32-** рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100214, Тошкент шаҳри, Улуғбек қўрғони, ЯФИ. Тел. (+99871) 289-31-19).

Диссертация автореферати 2020 йил «**13**» **июн** куни тарқатилди.
(2020 йил "**13**" **июн** даги **32-** рақамли реестр баённомаси)

М. Ю. Ташметов
Илмий даражалар берувчи
илмий кенгаш раиси, ф.-м.ф.д., профессор

С.Б.Игамов
Илмий даражалар берувчи илмий
кенгаш илмий котиби, ф.-м.ф.д., катта илмий ходим

И. Нуритдинов
Илмий даражалар берувчи илмий
кенгаш ҳузуридагиилмий семинар раиси
ф.-м.ф.д., профессор

КИРИШ (фалсафа доктори (PhD) диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Бугунги кунда радиокимёвий таҳлил усуллари юқори сезгирлик ва аниқликни талаб қиладиган илмий биологик ва тиббий тадқиқотларни ўтказишда катта аҳамиятга эга. Ушбу усуллар, катта молиявий имкониятларга эга йирик илмий марказлардагина қўлланиладиган “элита” усулларга киради. Нишонланган бирикмалардан фойдаланган ҳолда тиббий тадқиқотлар ўтказиш ушбу тиббий-биологик тадқиқотлар рейтингини ва натижаларининг халқаро миқёсида тан олинишини сезиларли даражада оширади.

Дунёда бир ёки иккита нишонланган препаратлардан фойдаланган ҳолда инсон қонидаги оқсилларнинг боғловчанлик қобилиятини ўрганиш борасида кўплаб тадқиқотлар ўтказилган, аммо бир нечта нишонланган препаратлар ёрдамида комплекс тадқиқотлар ўтказилмаган. Турли синфдаги бешта фармакологик препаратлардан фойдаланган ҳолда бундай комплекс ёндашув маълумотлар ҳажмини сезиларли даражада оширади ва инсон зардобидаги оқсилларни боғлаш қобилиятларини аниқроқ баҳолашга имкон беради. Умуман олганда, инсон зардобидаги оқсилларнинг боғлаш хусусиятлари улар ташиб борадиган фармакологик препаратларнинг самарадорлигини белгилайди. Ушбу хусусиятларни ўрганиш оғир ва сурункали касалликларда, беморгабериладиган дорининг мақбул миқдорини аниқлаш қийин бўлган холларда айниқса муҳим аҳамиятга эга. Қон оқсилини боғлаб туриш қобилиятини индивидуал баҳолаш турли хил жиддий касалликларга чалинган беморни даволашда хар бир касал учун алоҳида ёндашиш имконини беради. Шу сабабли тритий билан нишонланган фармакологик бирикмалар ёрдамида оқсилларнинг боғлаб туриш қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш долзарб вазифадир. Ушбу муаммони ҳал қилиш, нишонланган препаратларнинг қимматбаҳо валюта импортидан воз кечиш ва тадқиқот харажатларини камайтириш имконини беради.

Мамлакатимизда Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг Ядро физикаси институти 40 йилдан кўпроқ вақт давомида турли касалликларни ташхис қилиш ва даволашда қўлланиладиган реактор ва циклотрон радионуклидларини ишлаб чиқариш, нишонланган препаратларни синтез қилиш, уларни тиббий−биологик тадқиқотларда қўллашусулларини ишлаб чиқиш ва такомиллаштириш бўйича экспериментал тадқиқотлар олиб боради. Ўзбекистон Республикасини 2017–2021 йилларда янада ривожлантиришининг бўйича Ҳаракатлар стратегияси[1] дастурида ядро тиббиётида ишлатиладиган радионуклидлар ва радиофармпрепаратлар олиш технологиясини ишлаб чиқиш ва жорий этиш дастурини амалга ошириш вазифалари белгилаб берилган. Ушбу диссертация тритий билан фармакологик бирикмаларни нишонлаш усулларини ишлаб чиқиш ва улар асосида инсон қони оқсилларининг боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқишга бағишланган. Инсон қони

[1]2017 йил 07 февралдаги ПФ-4947-сонли “Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича ҳаракатлар стратегияси тўғрисида” Ўзбекистон Республикаси Президентининг Фармони

оқсилларининг боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш зарурати шундан иборатки, дориларнинг дозалари, уларнинг фойдаланиш усуллари ва организмдан чиқиб кетиш вақти айнан оқсилларнинг боғловчилик қобилияти билан белгиланади.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон “Ўзбекистон Республикасини 2017–2021 йилларда янада ривожлантиришбўйичаҲаракатлар стратегияси тўғрисида”ги Фармони, 2017 йил 7 ноябрдаги ПФ-5229-сон “Фармацевтика саноатини бошқариш тизимини тубдан такомиллаштириш чора тадбирлари тўғрисида”ги, 2010 йил 15 декабрдаги ПҚ-1442-сон “2011-2015 йилларда Ўзбекистон Республикаси саноатини ривожлантиришнинг устувор йўналишлари тўғрисида”ги, 2017 йил 17 февралдаги ПФ-2789-сон “Фанлар академия фаолиятини янада такомиллаштириш, илмий тадқиқот фаолиятини ташкил этиш, бошқариш ва молиялаштириш сора-тадбирлари тўғрисида”ги Қарорлари ҳамда ушбу соҳадаги бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда ушбу диссертацияда олиб борилган тадқиқотлар муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республикада фан ва технологияларни ривожлантиришнинг VI. “Тиббиёт ва фармакология” ҳамда VII. “Кимё технологиялари ва нанотехнологиялар” устувор йўналишлари доирасида бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирги кунда бутун дунё бўйлаб албуминнинг боғловчилик қобилиятларини таҳлил қилиш учун кўплаб клиник ва тадқиқот усуллари ишлаб чиқилган. Россиялик (Ю.И. Миллер, Г.Е. Добретцов, Э.Г.Юшко, Б.М.Красовицкий) ва америкалик (A.A. Spector, K.M. John) олимлар флюоресцент зондлардан фойдаланиб оқсилнинг боғловчилик қобилиятини аниқлашган, америкалик, германиялиева белоруссиялик олимларидан иборат қўшма гуруҳ (S.C. Kazmierczak, A. Gurachevsky, G. Matthes, V. Muravsky) бу мақсадда биомаркерлардан фойдаланган (ЭПР ва ЯМР зондлар). Ушбу тадқиқотлар натижалари саратон касаллигини ташхислаш ва назорат қилиш учун ишлатилган. “Билвосита усуллар” деб аталадиган ушбу усуллар физик-кимёвий параметрларнинг ўзгаришини қайд этишга асосланган бўлиб, улар бирор ўзига хос лиганд ёки тест лигандининг албумин билан ўзаро таъсирини акс эттиради. Билвосита усуллар, албуминнинг боғлаш қобилиятидан ташқари, оқсил молекуласи, унинг тузилиши ва боғланиш марказларининг физик-кимёвий ҳолати тўғрисида хулоса чиқаришга имкон беради.

Иккинчи гурух усуллар, − «бевосита усуллар»(диализнинг барча турлари, электрофорез, ултрацентрифуга ва хроматография),эркин ва оқсил билан боғланган лигандлар концентрациясини бевосита аниқлай оладиган усулларни ўз ичига олади. Улар масалан, албумин билан боғланган ва боғланмаган дори шаклини ажратишга имкон беради.

Ўзбекистонлик олимлар (А.А. Ким, Ж.А. Дадаханов, Г.Т. Джураева, Б.В. Шукуров, И.Р. Мавлянов) қон оқсилларнинг боғловчилик қобилиятини

ўрганиш учун тритий билан нишонланган турли хил фармакологик воситалар ва гель-фильтрация усулидан фойдаланган.

Қон оқсилларининг боғлаб туриш қобилиятини ўрганиш бўйича олиб борилган ишларнинг таҳлили шуни кўрсатдики, уларнинг қобилиятини тавсифлайдиган барқарор қонуният йўқ ва оқсиллар турли хил препаратлар билан турлича боғловчилик қобилиятини намоён қилади. Шу муносабат билан ҳар бир препаратнинг оқсил билан боғловчилик қобилиятларини ўрганиш учун алоҳида батафсил тадқиқотлар ўтказиш керак. Оқсилнинг бу хоссалари дориларни қўллаш усулини ва дозасини аниқлаганлиги сабабли, ушбу тадқиқотларни ўтказиш долзарб муаммо ҳисобланади.

Диссертация тадқиқотининг диссертация бажарилган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси Ядро физикаси институтининг ФА-А14-Ф065 «Биологик фаол органик бирикмаларни тритий билан нишонлаш усулларини ва улар асосида тиббий-биологик тадқиқотлар учун радиокимевий таҳлил усулларини ишлаб чиқиш» (2009-2011) илмий-тадқиқот лойиҳаси доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади термик активлангантритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид фармакологик препаратлардан фойдаланиб, инсон қон оқсилининг боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

изониазид, этамбутол ва преднизолон фармакологик препаратларни термик активланган тритий билан нишонлаш усулини ишлаб чиқиш, ишлаб чиқилган усуллардан фойдаланиб келгуси тадқиқотлар учун етарли миқдордаги дротаверин ва фуросемиднинг тритий билан нишонланган препаратларини олиш;

тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон дротаверин ва фуросемид фармакологик препаратларидан фойдаланиб, инсон қони оқсилининг боғловчилик қобилиятини аниқлашнинг радиокимёвий аналитик усулини ишлаб чиқиш;

in vitro усулида турли касалликларга чалинган беморлар қон оқсилининг боғловчилик қобилиятини тадқиқ қилишда ишлаб чиқилган усулдан фойдаланиш;

инсон қон зардоби оқсилларини боғловчилик қобилятига эпииссиқ нейтронлар оқими билан нурлатишнинг таъсирини ўрганишда ишлаб чиқилган усулдан фойдаланиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида тритий радионуклиди, изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин, фуросемид фармакологик препаратлари, инсон қони зардоби олинган.

Тадқиқотнинг предметибўлибқон зардоби оқсилларини боғловчилик қобилияти ва унинг турли касалликлар ва радиация таъсирида характеристикалари ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Эксприментал ядро физикаси, радиокимё ва аналитик кимё усуллари: термик активланган тритий билан нишонлаш усули,

юпқа қатламли хроматография, гель-фильтрация, УФ-спектрофотометрия, ҳамда ВВР-СМ реакторнинг горизонтал каналида эпииссиқ нейтронлар оқимиданурлантириш.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

изониазид, этамбутол ва преднизолон фармакологик препаратларини термик активланган тритий билан нишонлаш ва юпқа қатламли хроматографияусулида препаратларни тозалаш услублари ишлаб чиқилган;

тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид фармакологик препаратларидан фойдаланиб, инсон қони оқсилининг боғловчилик қобилиятини аниқлаш учун радиокимёвий аналитик усул ишлаб чиқилган;

гипертония, подагра ва юрак касаллиги билан оғриган беморларнинг қон оқсилларини боғловчилик қобилиятини индивидуал баҳолаш шароитлари аниқланган;

“in vitro” усулида қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятига эпииссиқ нейтронлар оқими билан нурлатиш таъсир даражаси аниқланган;

биринчи маротаба инсон қон зардоби оқсилининг реакторканалида эпииссиқ нейтронлар оқими билан 0,133 Гр дан 9,436 Гр гача ютилиш дозаси билан нурлатилганда транспорт оқсилининг боғловчилик қобилиятига ҳалокатли таъсир кўрсатмаслиги исботланган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид препаратларининг соғлом инсонлар, гипертония, юрак ишемик касаллиги ва подагра билан оғриган беморларни қон зардоби оқсиллари билан боғловчилик қобилияти тўғрисида аниқ маълумотлар олинган;

биринчи марта эпииссиқ нейтронлар ва бор нейтрон қамраш реакциясидаги заррачалар инсон қон зардоби оқсилларнинг боғловчилик қобилиятига ҳалокатли таъсир кўрсатмаслиги аниқланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемиднинг нишонланган фармакологик бирикмаларининг айнийлигини турли мустақил усуллари ёрдамида экспериментал исботлангани ваолинган натижаларни турли тадқиқотчилар натижаларига таққосланганибилан асосланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти, турли хил касалликларда ва эпииссиқ нейтрон нурланишига дучор бўлганда, инсон қон зардобидаги оқсилларнинг боғланиш қобилиятидаги ўзгаришлар тўғрисидаги маълумотлар билан аниқланади, бу эса беморларга фармакологик препаратларнинг мақбул индивидуал дозаларини аниқлаш ва эпииссиқ нейтрон нурланишининг битта дозасини инсон қон зардобидаги оқсилларнинг транспорт функцияларига таъсирини баҳолаш имконини беради.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, ишлаб чиқилган радиокимёвий аналитик усул клиник тадқиқотларда турли касалликларга чалинган беморлар қон зардоби оқсилини боғловчилик қобилиятини баҳолаш учун ишлатилиши мумкин.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Инсон қони оқсилининг боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш бўйича олинган натижалар асосида:

изониазид, этамбутол ва преднизолон фармакологик препаратларини термик активланган тритий билан нишонлаш ва юпқа қатламли хроматография усулида препаратларни тозалаш услублари, нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид фармакалогик бирикмалар ёрдамида қон зардоби оқсилини боғловчилик қобилиятини аниқлаш учун ишлаб чиқилган радиокимёвий аналитик усуллари ФА-А14-Ф068 “ЎзР ФА ЯФИ ВВР-СМ реакторида нейтрон қамраш терапиясини ривожлантириш учун илмий техник баъзани яратиш” (2009-2011) амалий лойиҳа доирасида турли касалликка чалинган қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятини аниқлаш учун ўтказилган тажрибаларда фойдаланилган. (ЎзР Фанлар академиясининг 2020 йил 20 февралдаги 2/1255-546-сонли хати). Илмий натижаларнинг қўлланилиши гипертония, юрак қон томир ва подагра билан оғриган беморларнинг қон зардобидаги оқсилларни боғловчилик қобилиятини индивидуал баҳолаш шартларини танлаш имконини берган;

in vitro усулидан фойдаланиб, қон зардоби оқсилини боғловчилик қобилятига эпииссиқ нейтронлар оқими билан нурлатишнинг таъсир даражасини аниқлаш натижалари ФА-А14-Ф068 “ЎзР ФА ЯФИ ВВР-СМ реакторида нейтрон қамраш терапиясини ривожлантириш учун илмий техник баъзани яратиш” (2009-2011) амалий лойиҳа доирасида олинган фармакологик препаратлар қон зардоби оқсили билан боғланиш даражасини аниқлаш учун ўзида бор тутган ва борат буфери қўшиб нейтронлар билан нурлатилганда ишлатилган (ЎзР Фанлар академиясининг 2020 йил 20 февралдаги 2/1255-546-сонли хати). Илмий натижаларнинг қўлланилиши эпииссиқ нейтронлар ва бор нейтрон қамраш реакцияси заррачалари билан нурлантирилганда инсон қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилятига халокатли таъсир кўрсатмаслигини аниқлаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Мазкур тадқиқот натижалари 10 та халқаро ва республика илмий-амалий анжуманларида муҳокамадан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.Диссертация мавзуси бўйича жами 17 та илмий иш эълон қилинган, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 7 та мақола, шулардан 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация кириш, тўртта боб, хулоса, адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертация ҳажми 129 бетни ташкил этади.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида олиб борилган тадқиқотнинг долзарблиги ва унга бўлган талаб, тадқиқот мақсади ва вазифалари асосланади, тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларининг амалиётда қўлланилиши, нашр қилинган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

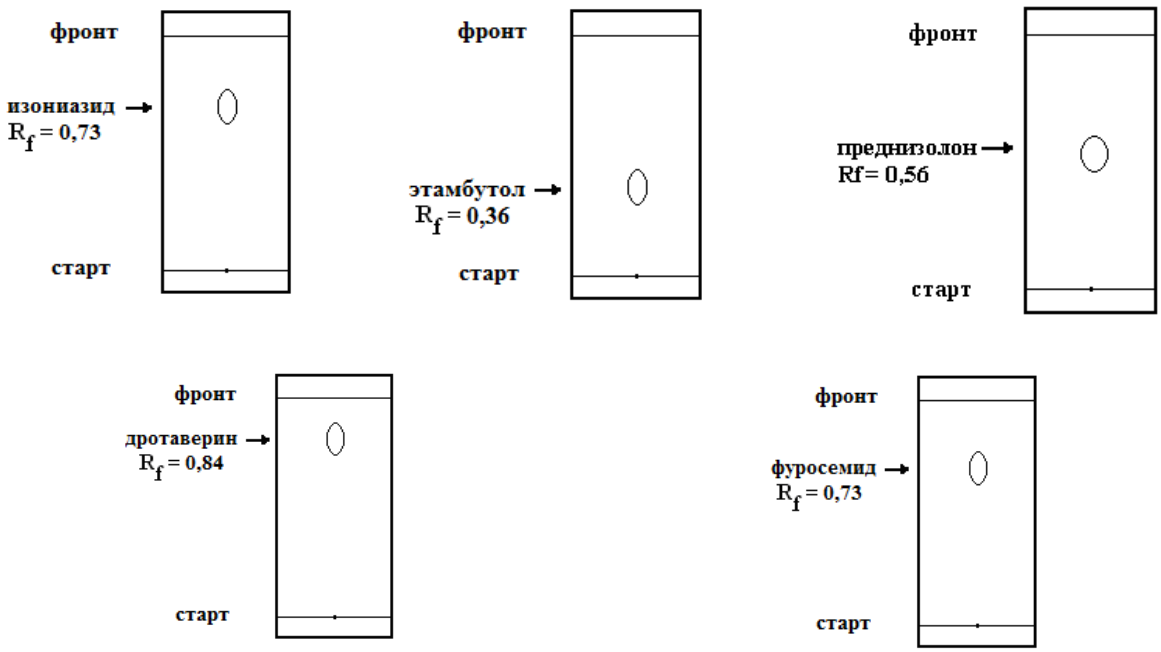
Диссертациянинг **“Нишонланган бирикмаларнинг фойдаланиш соҳалари ва олиш улуларининг замонавий ҳолати”** деб номланган биринчи бобида органик бирикмаларни турли хил радионуклидлар билан нишонлаш усуллари бўйича адабиётлар таҳлил қилинган, шу жумладан термик фаол тритий билан нишонланган бирикмаларни тозалаш усуллари бўйича ва уларни аниқлаш, инсон қони оқсили билан фармакологик препаратларни боғловчилиги бўйича адабиётларни шархлаш, инсон қони оқсили билан изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемидларнинг боғловчилигини баҳолаш усуллари, шунингдек турли хил касалликларга чалинган беморларнинг қон зардоби оқсилларини боғловчилик қобилиятини ўрганиш ва in vitro усулида инсон қони оқсилларини боғловчилик қобилиятига эпииссиқ нейтронлар таъсирини ўрганишга боғлиқ адабиётлар шархи келтирилган.

Диссертациянинг **“Термик фаол тритий ёрдамида нишонланган фармакологик препаратлар олиш”** деб номланган иккинчи бобида изониазид, этамбутол ва преднизолонларни термик фаол тритий билан нишонлаш усулларини ишлаб чиқиш бўйича тажриба маълумотлари келтирилган. Ядро физикаси институтида ишлаб чиқарилган махсус мосламаларда термик фаол тритий билан нишонлашнинг мақбул режими танланди ва нишонланган препаратларни тозалаш системаси ишлаб чиқилди. Юқорида келтирилган учта препаратнинг ҳар бири учун энг мақбул нишонлаш шароити ва юпқа қатламли хроматография ёрдамида самарали тозалаш тизимлари танланди. Дротаверин ва фуросемид препаратларини тритий билан нишонлаш учун илгари ЎзР ФА Ядро физикаси институтида ишлаб чиқилган термик фаол тритий ёрдамида нишонлаш услубларидан фойдаланилди. Ушбу усуллар оптималлаштирилди ва тритий билан нишонланган дротаверин ва фуросемид ишлаб чиқариш учун ишлатилди. Изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемидни нишонлаш органик эритувчиларда эритмалар тайёрлашни ўз ичига олади. Кейин ҳар бир препаратнинг (50 мг) эритмаси реакция колбасининг силикагел билан қопланган ички қисмига суртилди, хона ҳароратида эритувчи учиб кетгунча қуритилди. Кейин реакция колбаси суюқ азотда музлатилди ва $5x10^{-3}$мм симоб устунивакуум ҳосил қилинди. Нишонлаш циклида системани газсимон тритий билан босими $1x10^{-1}$ мм симоб устинигача тўлдирилди ва тритийни активлаш учун волфрам спирали 20 секунд давомида 1 минутли танаффус

билан қиздирилди. Цикллар орасида реакцион колба муздан туширилди, препаратлар эритувчида эритилди, ҳамда аликвотлар олиниб радиоактивлиги ўлчанди ва қайтадан қуритилди. Нишонлашдан сўнг реакцион колба деворларида қолган препаратлар эритувчи ёрдамида қайта-қайта ювиб олинди. Олинган эритма эритувчи тўлиқ учиб кетгунча қуритилди, сўнгра эритувчида эриган лекин препаратлар билан боғланмаган ва лабил ҳолатдаги тритийдан халос бўлиш учун эритувчида яъна эритилди сўнг қайтадан қуритилди. Толуолли сцинтиллятор (1 литрда толуол 4г PPO ва 0,05 г POPOP)РЖС-05 ҳисоблагичида нишонлаш вақтида олинган аликвотни радиоактивлиги ўлчанди.

Цикллар сонининг оширилиши билан препаратларнинг умумий активлиги ошиши кўрсатилди. Шунингдек, изониазид препарати 5 маротаба нишонлангандан сўнг рангини ўзгариши кузатилди, бу холат изониазид препарати деструкцияга учираётганлигидан далолат беради.

Тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол ва преднизолон препаратларини тозалаш учун ЮҚХ усули ёрдамида тозалаш услублари ишлаб чиқилди. Дротаверин ва фуросемид препаратларини тозалаш учун ЮҚХ усули ёрдамида ЎзР ФА Ядро физикаси институтида олдин ишлаб чиқилган, услублардан фойдаланилди. Нишонланган препаратлар қўшимча махсулотлардан ЮҚХ усули билан Silufol пластинкасида (Чехия) тозаланди. 1-расмда ЮҚХ усулида нишонланган препаратлар хроматограммалари келтирилган.



1-расм. Нишонланган препаратларнинг ЮҚХ усулида тозалаш хроматограммалари

Препаратларнинг доғи бор қисми пластинкадан силикагели билан қириб олинди ва эритувчи ёрдамида силикагелдан ювиб олинди. Ювиб олинган эритувчи қуритилиб сўнгра тортилади. Толуолли сцинтиллятор (1

литрда толуол 4г PPO ва 0,05 г POPOP)РЖС-05 ҳисоблагичида препаратлар радиоактивлиги ўлчанди. Маълумотлар 1- жадвалда келтирилган.

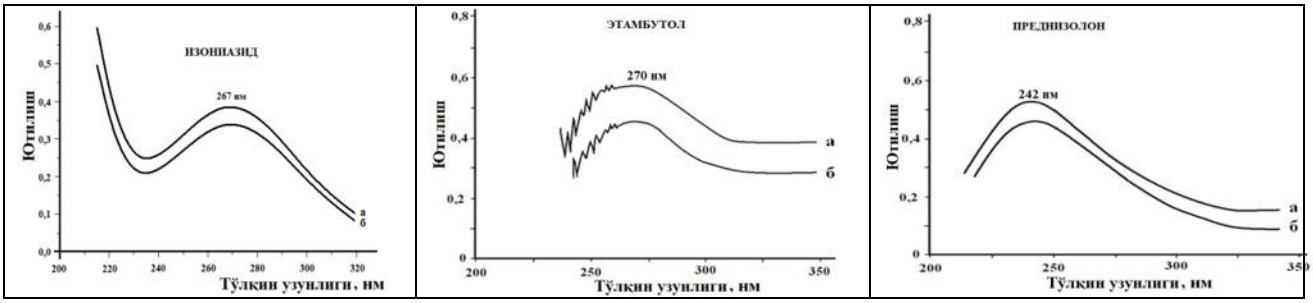
1-жадвал

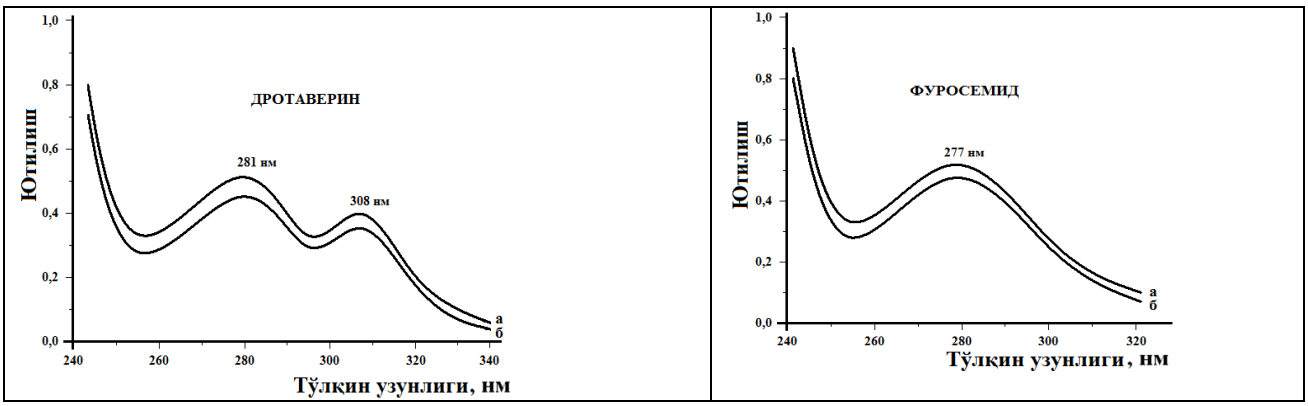
Нишонланган препаратлар ЮҚХ усулида ажратилгандан кейинги фракцияларининг радиоактивлик даражаси

Препаратлар номи	Фракциямассаси, мг	Нишонланган препаратнинг уними в %	Солиштирма активлик МБк/ мг	Солиштирма молляр активлик МБк/ммоль
Изониазид	20,7 мг	41,4%	3,41	468,5
Этамбутол	11,8 мг	23,6%	5,85	1 621,85
Преднизолон	20,1 мг	40,2 %	0,83	299,13
Дротаверин	18,3 мг	36,7%	18,9	8 155,3
Фуросемид	18,0 мг	36,0%	0,25	82,6

Нишонланган ва нишонланмаган фармакологик препаратлар учта бир бирига боғлиқ бўлмаган усуллар ёрдамида уч хил кўрсаткич бўйича аниқланди: 1) юпқа қатламли хроматографияда Rf қиймати, 2) нишонланган ва нишонланмаган моддаларнинг УБ спектрлари, 3) нишонланган ва нишонланмаган бирикмаларнинг қон зардоби оқсиллари билан боғланишидаги рақобатдошлиги.

Нишонланган препаратларни спектрофотометрия усулининг ультрабинафша сохасида таҳлил қилинди. Нишонланган ва нишонланмаган фармацевтик препаратларни эритувчиларда эритилди ва таққослаш эритмаси сифатида эритувчидан фойдаланиб, қалинлиги 1 сантиметрли кюветада 220-350 нм тўлқин узунлиги сохасида SPECORD 210 (фирма SPECORD, Германия) спектрофотометрда УБ спектрлари ўлчанди. Этамбутолнинг УБ спектрини аниқлаш учун этамбутолнинг мис ацетат билан реакцияси ишлатилди. Олинган 5та УБ-спектрлари маълумотнома ва адабиётларга мос келди. УБ-спектрлари 2-расмда келтирилган.





2-расм. Изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид препаратларини УБ-спектрлари: (а) –нишонланмаган, (б) – тритий билан нишонланган

Диссертациянинг «**Инсон қон зардоби оқсили тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон дротаверин ва фуросемид препаратлари ёрдамида боғловчанлигини аниқлашнинг радиокимёвий аналитик усули ишлаб чиқиш**» деб номланган учинчи бобида ушбу усулни ривожлантириш бўйича экспериментал тадқиқотлар келтирилган.

Тошкент тиббиёт академиясининг (ТТА) клиник фармакология кафедрасида қон намуналари, қон зардобини тайёрлаш,оқсиллар ва албуминларнинг умумий миқдорини аниқлаш ишлари олиб борилди. Тадқиқот учун қон намуналари 20 дан 39 ёшгача бўлган соғлом одамлардан олинди. Қонни оч қоринга венадан стерилланган шприц билан олиб, пробиркага қуйилди. Қон ивишидан сўнг намуналар 20 минут давомида 6000 об/минут центрифуга қилинди ва қон зардоби ажратилди. Зардоб намуналарида оқсил ва албумин таркибини стандарт лаборатория биокимёвий усулида аниқланди. Қон зардобидаги намуналар -20°С да музлатгичда музлатилди ва тадқиқот ўтказилгунга қадар шу шароитда сақланди. Тажрибадан олдин зардоб намуналари эритилди ва тадқиқот учун аликвот олинди. Беморларнинг қон зардоби намуналарида оқсил ва албуминни умумий миқдорини аниқлаш ТошТАда стандарт клиник лаборатория усулида ўтказилди.

Диссертация ишиниг мақсади кенг қамровли, қуйи молекуляр кимёвий бирикмаларнинг ҳар хил синфлари: 5та нишонланган фармакологик препаратлар изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемидлар ёрдамида инсон қони транспорт оқсилининг боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш эди.

Ишлаб чиқилган усулнинг схемаси қуйидагича эди:

1. Бемордан қон намунаси олинади.
2. Қондан зардоби ажратиб олинади.
3. Тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон дротаверин ва фуросемид препаратлар қон зардоби билан инкубацияда қолдирилади.

4. Қон зардоби оқсили билан боғланмаган тритий ёрдамида нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон дротаверин ва фуросемид препаратлари ажратилади.
5. Қон оқсили билан боғланган тритийнинг радиоактивлиги ўлчанади.

Ишлаб чиқилган усул учун қон зардоби намунасининг минимал мумкин бўлган ҳажми танланди – 20мкл. Ўлчаш учун тритий билан нишонланган дориларнинг мақбул миқдори танланди – ҳар бир намунага 1мкг. Қон зардобидаги оқсилларни тритий билан нишонланган препаратлардан ажратиш учун Sefadex G-25 микро колонкаларда иш ҳажми 300мкл, 10мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4 билан мувозанатланган микрокалонкаларда фильтрланган. Ўлчаш учун намунадаги реакция аралашмасининг қуйидаги оптимал ҳажми танланди:

20мкл зардоб +10мкл (1 мкл) тритий билан нишонланган препарат + 270 мкл 10мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4

Биологик намуналарда тритийнинг радиоактивлигини ўлчаш сцинтилацияни суниш эффекти туфайли жуда қийинлашади. Қон зардобида тритийнинг радиоактивлигини ўлчашда, сцинтилация суниш эффектининг таъсири ўрганилди. Тритийнинг радиоактивлигини ўлчаш учун толуол сцинтилятор (4г пара-терфенил ва 0,05 г POPOP 1л толуолда) ишлатилди. Маълумки, сув ва қуйи молекуляр органик моддалар кучли сцинтиляцион сўндириш хусусиятига эга. Бизнинг тажрибамизда сувли эритма ишлатилганлиги ва зардоб намуналарида кўп миқдордаги қуйи молекуляр органик бирикмалар мавжудлиги сабабли, сцинтилацион суниш эффектини аниқлаш керак эди. Зардобнинг индивидуал намуналарини ўлчашда тритийни хисоблаш самарадорлиги жуда катта фарқ қилиши аниқланди. Шубҳасиз, бу бир нечта оқсил намуналарида биттадан ёки бир нечта сцинтиляция нурини сўндирувчи омилларнинг мавжудлиги билан боғлиқ. Усулимизни ишлаб чиқиш учун қон зардобини намуналарини Sephadex G-25 колонкасида гел-фильтрация усули ёрдамида фильтрлаш орқали ажратиш пайтида алоҳида намуналарида синтилляцион сўниш таъсирининг қанча ўзгаришини текшириш зарур эди.

Кўнгиллилардан 6тасининг қон оқсили намуналари таҳлил қилинди. Нишонланган препаратлар учун 6та ҳар хил қон зардобидан 2тадан намуна тайёрланди:

1) назорат: 20 мкл зардоб + 10 мкл (1 мкг) нишонланган изониазид + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4;

2) гель-фильтрация: 20 мкл зардоб + 10 мкл (1 мкг) нишонланган изониазид + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4.

Намуналарга нишонланган препаратларни қўшгандан сўнг, намуналар хона ҳароратида 30 дақиқа давомида инкубация қилинди. Шундан сўнг, 6та қон зардобидан, биттадан намуна олиниб, Sephadex G-25 микро колонкаларига қуйилди ва 300 мкл буфер ёрдамида фракциялар ювиб олинди. Гель-фильтрациядан 3тадан фракция олинди: биринчи фракция оқсил билан боғланган препаратлар, иккинчи фракция қуйи молекуляр оқсил, а учунчи фракциялар эса қуйи молекуляр боғланмаган препаратлар. РЖС-

05ҳисоблагич толуол сцинтилляторида хар бир фракцияларни ва назорат намуналар активлиги ўлчанди. Нишонлаб олинган препаратлар миқдори 2-жадвалда келтирилган.

2-жадвал

Тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид препаратларини Sephadex G-25 ли микроколонкаларда гель-фильтрациядан кейинги ўлчаш аниқлиги

Препаратлар	Ўртача % аниқлиги	P=0,05 %RSD
Изониазид	99,90 ± 0,91	0,91
Этамбутол	99,69±1,19	1,19
Преднизолон	99,53±0,92	0,92
Дротаверин	99,84±1,51	1,51
Фуросемид	99,33±0,64	0,64

Олинган маълумотлар одам зардобининг турли хил намуналарда сцинтиллятор ҳисоблашнинг “сўниш” таъсири борлигини кўрсатади. Олинган маълумотлар шуни кўрсатдики, оқсилларнинг бир қисмини зардобдан ажратишда сўниш таъсири барча фракцияларда ўзгаришсиз қолади. Ушбу натижаларга асосланиб, шуни айтиш мумкинки, ички стандартдан фойдаланиш (фракциясиз қўшимча назорат намунасини ишлатиш) зардоб оқсиллари билан боғланган нишонланган препаратларни миқдорини аниқлашга имкон беради.

Кейинчалик, боғланган нишонланган препаратлар учун қуйидаги ҳисоблаш схемаси ишлатилган – назорат намунасида сцинтиляцион сони 100% деб қабул қилинган ва препарат таркибини назорат намунасининг фоизига қараб ҳисоблаб чиқилган.

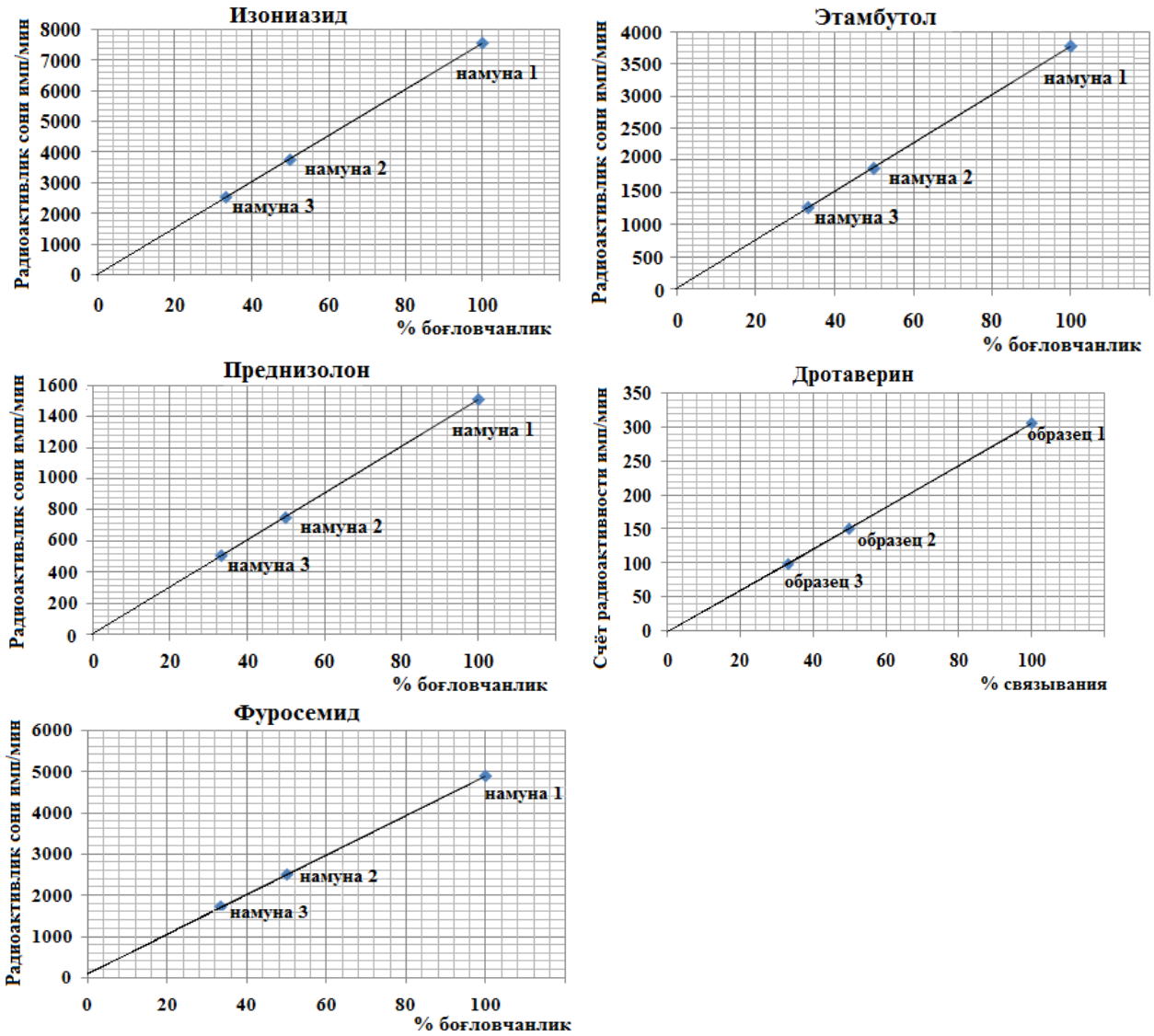
Тритий билан нишонланган препаратлар қон зардоби оқсили билан боғланишидаги рақобатдошлигини аниқлаш

Қон зардоби оқсилларининг боғловчилик қобилиятини аниқлаш учун тритий билан нишонланган препаратлар ва турли концентрацияларда нишонланмаган дастлабки препаратларини рақобатдош боғланиши ўрганилди. Бундай синов, нишонланган ва нишонланмаган яъни дастлабки препаратларни бир хил эканлигига қўшимча далил ҳисобланади.

Бундан ташқари, бундай тажриба натижалари дори концентрациясининг ўлчанадиган диапазонида ушбу усулнинг чизиқли эканлигини тасдиқлайди.

Олти нафар соғлом кўнгиллиларнинг қон зардоби намуналари таҳлил қилинди. Ҳар бир нишонланган препарат учун 6та ҳар хил зардобдан 4тагача намуна тайрланди. Нишонланган препаратларни қўшгандан сўнг, намуналар хона хароратида 30 дақиқа давомида инкубация қилинди. Шундан сўнг, намуналар Sephadex G-25 микрокалонкаларига солинди ва 300 мкл биринчи фракциялар зардоб оқсили билан боғланган препаратлар радиоактивлиги ўлчанди. Олинган натижаларга асосланиб, бешта дори учун боғловчилик

рақобатдошлиги бўйича график чизилди. Биринчи намунадаги маълумотлар 100% деб қабул қилинди, № 2 ва 3 намуналар маълумотлари мос равишда қайта ҳисоблаб чиқилган ва 3- расмда рақобатдош боғланиш графиги келтирилган.



3-расм. Тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемидни рақобатбардош боғланишини жадвали

Шундай қилиб, олинган натижалар шуни кўрсатадики, дастлабки нишонланмаган препаратлар ёрдамида нишонланган препаратларни миқдори камайтриб борилганда барча бешта нишонланган препаратларнинг боғланишга рақобатдошлиги нишонланмаган препаратларнинг концентрациясига мос равишда тўғри чизиқли график ҳосил бўлди. Олинган маълумотлар, шунингдек нишонланган ва нишонланмаган дастлабки препаратларни айнан шу эканлигини тасдиқловчи қўшимча далилдир.

Беморнинг 6та бир хил қон зардоби оқсили намуналарни тритий билан нишонланган препаратларнинг боғловчилиги натижаларининг такрорланувчанлиги аниқланди(0,7 дан 9,2%гача).

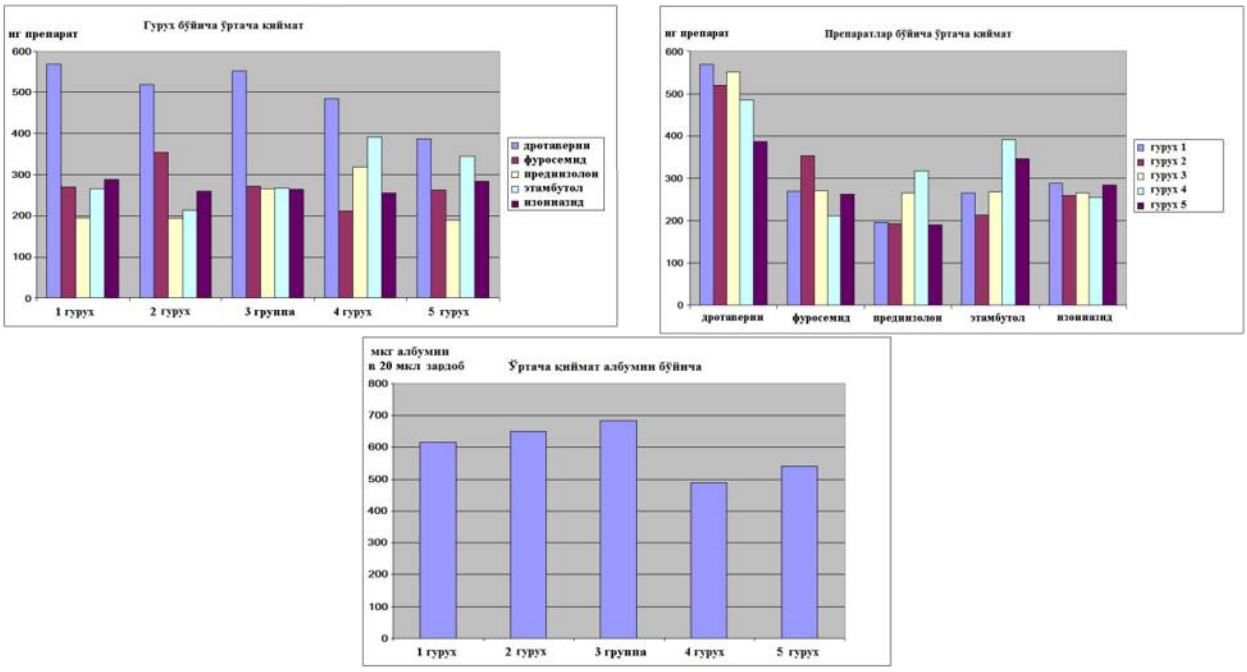
Диссертациянинг **“Тиббий биологик тадқиқотларда ишлаб чиқилган радиокимёвий аналитик усулдан фойдаланиш”** деб номланган тўртинчи бобида диссертацияда ишлаб чиқилган усулни қўллаш асосида тиббий биологик тадқиқотларнинг экспериментал маълумотлари келтирилган.

Турли касалликларга чалинган инсон қони зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятини in vitro усулида ўрганиш.

Ишлаб чиқилган комплекс радиокимёвий аналитик усул Тошкент Тиббиёт академияси билан биргаликда олиб борилган изланишларда қўлланилди. Ушбу тадқиқотнинг мақсади подагра, гипертония ва юрак томирлари билан оғриган беморларнинг қон зардобидаги боғловчилик қобилиятини баҳолаш эди. Қон намуналари, қон зардобини тайёрлаш ва оқсиллар ва албуминларнинг умумий миқдорини аниқлаш ишлари Тошкент Тиббиёт академиясида (ТТА) клиник фармакалогия кафедрасида олиб борилди. Тадқиқот учун 45 та бемор 5 гуруҳга киритилди. Биринчи гуруҳга гипертония ташхиси қўйилган 41 дан 61 ёшгача бўлган 10 бемор, иккинчи гуруҳга юрак қон томири касаллиги ташхиси қўйилган 35 дан 61 ёшгача бўлган 10 та бемор, учунчи гуруҳга подагра ташхиси қўйилган 40 дан 65 ёшгача бўлган 7 бемор киритилган, тўртинчи гуруҳда эса кўрикда ётган 14 дан 65 ёшгача бўлган 8та соғлом инсонлар ва бешинчи гуруҳда 10 та ҳар хил касаллик билан оғриган беморлар қон оқсиллари олинган. Зардоб намуналари -20^{0}С ҳароратда музлатгичда музлатилган ва тажрибаларга қадар шу шароитда сақланган. Синовдан олдин дарҳол қон зардоблари эритилди ва тадқиқот учун аликвоталар олинди.

Инсон қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятини таҳлил қилиш учун биз қуйидаги схемадан фойдаландик. Ҳар бир препарат учун 2 та такрорий, 270 мкл буфер эритма (10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4) ва 20 мкл қон зардобидан иборат инкубацион аралашмаси тайёрланди. Ҳар бир эритмага алоҳида 10мкл эритмадаги нишонланган препаратлар 1 мкг қўшилди. Барча препаратлардан 2 та параллел намуна тайёрланди, улардан бири нишонланган препарат киритиш билан ички стандарт билан дастлабки намунаси сифатида ишлатилди, иккинчи намуна эса оқсил билан препаратларнинг боғланишини ўлчаш учун ишлатилди. Намуналар таёрлангандан сўнг, бешта пробиркалар намуналар билан 30 минут инкубацияда қолдирилди, кейин бир марталик ажратиш микрокалонкасида мувозанатланган буфер эритмаси билан (10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4) гел-филтрация ёрдамида оқсиллар ажратилди, Sephadex G25 100мг ишлатилди. Битта препаратнинг реакцион аралашмасининг бутун ҳажми колонкага қуйилди, буфер эритмаси билан ювилиб, бошланғич 300 мкл қисми йиғилиб ва радиоактивлиги ўлчанди.

Қон зардоби оқсили билан боғланган нишонланган препаратларни радиоактивлиги ўлчанди. Олинган натижалар шуни кўрсатдики, препаратларни оқсиллар билан боғланган миқдори деярли барча гуруҳ тадқиқотларида жуда катта фарқ қилади. Шу билан бирга, ўртача кўрсаткичлар деярли барча гурухлардаги беморларда ўртача зардобдаги албумин концентрацияси билан мос келмади(4- расм).



4-расм. Бешта гурухдаги беморлар қон зардоби оқсилларининг нишонланган препаратлар билан боғланишнинг ўртача қиймати

Тадқиқотнинг натижасида гипертония, подагра ва юрак қон томир касаллиги билан оғриган беморларнинг қон зардобидаги оқсиллар тритий билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид препаратларини боғланишиниг аниқ миқдорий хусусиятлари аниқланди. Беморларнинг ушбу гуруҳларида оқсилларнинг боғланиш даражаси бошқа гуруҳларга қараганда анча кўп эканлиги аниқланди, аммо бу маълумотлар статистик аҳамиятга эга эмас. Шу билан бирга, дори воситаларининг боғланиш даражаси зардобнинг оқсилига боғлиқ эмас эди. Эҳтимол, боғланиш даражаси индивидуал физиологик ҳолатига ва даволаниш вақтида беморларнинг олган фармакологик миқдорига боғлиқ.

Шундай қилиб, ишлаб чиқилган усул гипертония, подагра ва юрак қон томир касалиги билан оғриган беморларнинг қон оқсиллари транспорт тизимининг индивидуал имкониятларини аниқ баҳолашга имкон беради. Ўз навбатида, бу заифлашган беморларнинг танасида ортиқча фармакологик юкни олдини олиш учун ушбу касалликларни даволашда ишлатиладиган дориларнинг дозаларини аниқроқ мослаштиришга имкон беради.

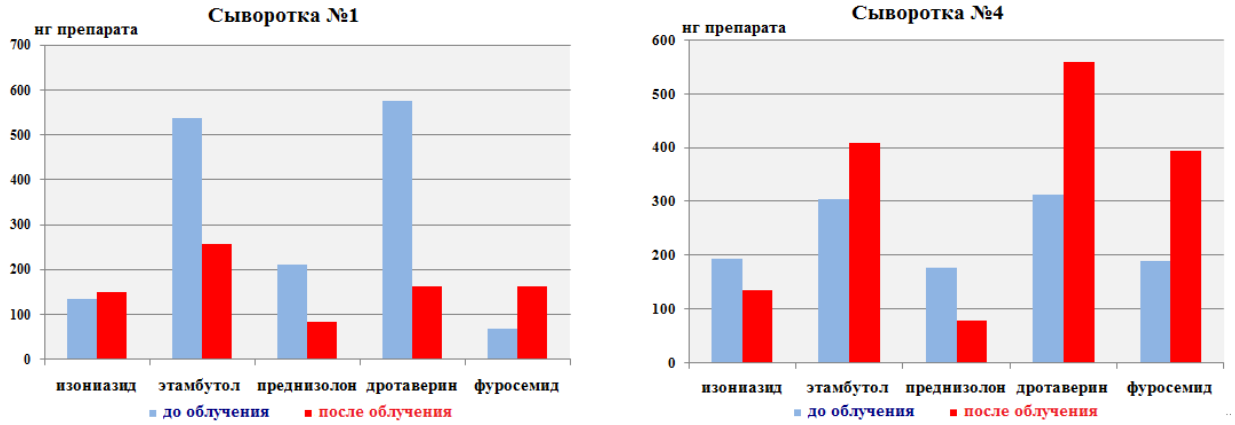
In vitro усули ёрдамида инсон қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятига эпииссиқ-нейтронлар таъсирини ўрганиш.

Ривожланган радиокимёвий аналитик усул in vitro қон зардобига эпииссиқ нейтрон нурларининг таъсирини ўрганиш учун ЎзР ФА ЯФИ ядро муаммолари лабораториясида қўлланилган. Ушбу изланишнинг мақсади, қон зардобидаги оқсилларга эпииссиқ нейтрон нурланишининг фармакологик воситаларсиз ва намуналарда 50 мМ барат буфери мавжудлигида, шунингдек намуналарда ўзида бор тутган препарат борлигида ({5,10,15,20-тетракис [n-(1’-карба-клозо-додекаборан-1’-ил) тетрафторфенил] 17,18-дигидропорфирин)} натрий) бўлгандаги таъсирига баҳо беришдир.

Тадқиқот учун 20 дан 39 ёшгача бўлган соғлом одамлардан қон намуналари олинди.

Ҳар бир зардоб намунасидан 250 мкл иккита аликвот олинди, битта аликвот оқсилларнинг боғловчилик қобилиятини аниқлаш учун ишлатилди ва иккинчи аликвот нейтрон нурлари билан нурлатилди, шундан сўнг оқсилларнинг боғлаб туриш қобилияти ўлчанди.

ВВР-СМ реакторида 1 соат давомида эпииссиқ нейтрон нурлари билан нурлатилди, йиғилган доза 0,133 Гр эди. Қон зардоби оқсили билан нишонланган препартларнинг боғловчилик қобилиятига эпииссиқ нейтронлар таъсир графиги 5-расмда келтирилган.



5-расм. Қон зардоби оқсили билан нишонланган препаратларни боғловчанлигига ВВР-СМ реакторида эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишдан олдинги ва кейинги таъсири

Таъкидлаш жоизки, албуминни миқдори кам бўлган 1 ва 2-намуналарда, қон зардобидаги оқсилларнинг эпииссиқ нейтронлар билан нурланишидан сўнг боғловчилик қобилиятида кўп ўзгаришлар рўй берди, шу вақтда албумин миқдори кўп бўлганда эса нишонланган препаратлар билан боғлашда камроқ ўзгаришлар кузатилди.

Олинган натижалар асосида қуйидаги хулосалар чиқаришга имкон беради:

1) инсон қон зардоби оқсилини ВВР-СМ реакторида нейтронлар билан нурлатилганда ютилиш 0,133 Гр дозаси бўлганда, инсон қони транспорт оқсилини нишонланган препаратлар билан боғловчилик қобилияти ўзгаради.

2) инсон қони транспорт оқсилининг боғловчилик қобилияти эпииссиқ нейтронлар таъсирида индивидуал намуналарда ўзгариб туради. Натижалардаги фарқларга қарамай ишонч билан шуни айтиш мумкинки, эпииссиқ нейтронларнинг нурлари умуман одам қон зардобидаги транспорт оқсилларининг боғловчилик қобилиятига ҳалокатли таъсир кўрсатмайди.

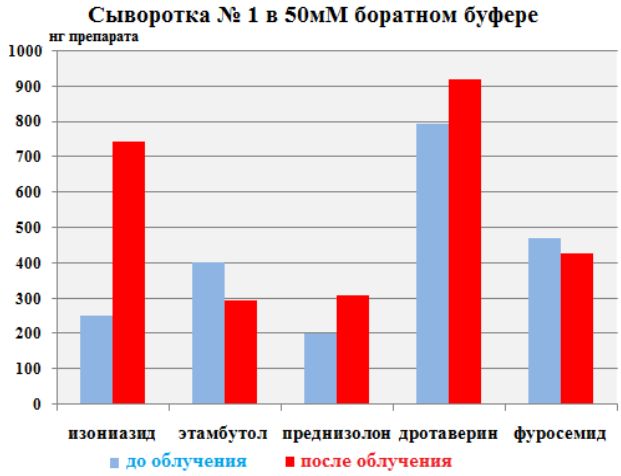
Борат буфери мавжуд бўлганда эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишнинг инсон қони зардоби оқсилларининг боғловчилик қобилиятига таъсирини ўрганиш.

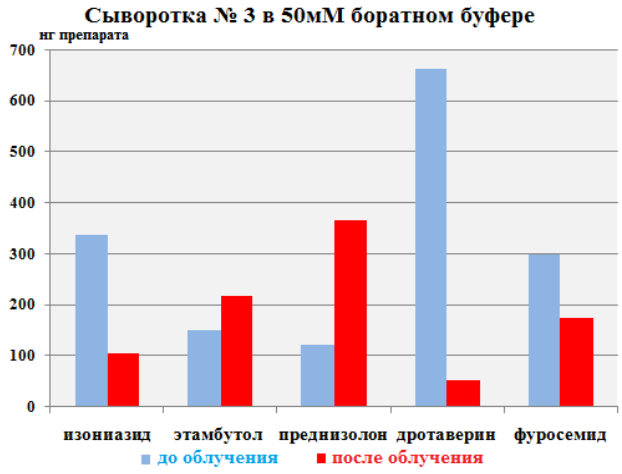
Бор манбаи сифатида pH 7,4 бўлган борат буферидан фойдаланилган. Адабиётлардаги маълумотларга кўра, нурлатиладиган ўсмада ^{10}B нинг

самарали концентрацияси тахминан 30 мкг/г ни ташкил қилади. Қон зардобидаги оқсилларга нейтрон нурланишинг таъсирини баҳолаш учун 50мМ барат концентрацияси танланган (^{10}B миқдори 3,55 баравар кўп терапевтик дозадан (106,49 мкг/мл ^{10}B). Қон зардоби оқсилининг фармакологик препаратлар билан боғловчилик қобилиятига бор манбаи бўлмиш барат буферини деярли таъсири кузатилмади. Бу ўз навбатида синов намунасидаги бор концентрациясини кенг диапазонда ўзгартиришга имкон беради.

Тадқиқот учун тайёрланган намуналар икки қисмга бўлинди, унинг биринчи қисми оқсилларнинг нурланишсиз боғловчилик қобилиятини ўлчаш учун назорат сифатида ишлатилди, бошқа қисми эса BBP-CM реакторида 1 соат давомида эпииссиқ нейтронлар билан нурлатилди. Ҳисобланган ютилиш дозаси 9.436 ГР ни ташкил этди.

Тадқиқот натижалари 6-расмда келтирилган





6-расм. Барат буферида инсон қон оқсилини нишонланган препаратлар билан боғловчанлигини эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишдан олдинги ва кейинги натижалар

Шунингдек, фон нурланиш ҳолатида бўлганидек (бор бўлмаган ҳолда), инсон қон зардоби 50 мМ барат буферида (концентрацияси ^{10}B 106,49 мкг/мл) бўлган эритмасида эпииссиқ нейтронлар билан нурлатилганда ютилиш 9,436 Гр дозасига тенг бўлди, ушбу дозада ҳар хил даражадаги инсон қон оқсилини боғловчилик қобилияти ўзгариши аниқланди. Бундай ҳолда, боғланишнинг пасайиши ва унинг ортиши кузатилади, бу эса албумин молекуласининг боғланиш жойларининг функционал фаоллигини кўрсатади.

Шунга асосланиб, ^{10}B мавжуд бўлганда эпииссиқ нейтронларнинг нурлари умуман одам қон зардобидаги транспорт оқсилларининг боғловчилик қобилиятига ҳалокатли таъсир кўрсатмайди.

Ўзида бор тутган препарат мавжуд бўлганда, инсон қон зардоби оқсилини боғловчилик қобилиятига эпииссиқ нейтронлар таъсири ўрганиш

Ушбу тажрибаларнинг мақсади қон зардоби оқсилларига таркибида бор бўлган препарат мавжуд бўлганда эпииссиқ нейтронлар билан нурлатиш таъсирини баҳолаш эди.

Қондан намуна олиш, қон зардобини тайёрлаш оқсиллар ва албуминларнинг умумий миқдорини аниқлаш аввал айтиб ўтилгандек амалга оширилди.

Таркибида бор бўлган препарат сифатида {5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий, ЎзР ФА Биоорганик кимё институти томонидан тақдим этилган. препарат нурга сезгир, сув, ацетон ва ацетонитрилда эрийди. Кимёвий формула: $C_{48}H_{60}B_{44}F_{16}N_4Na_4$. Молекуляр оғирлиги: 1564,63. Препаратнинг 6,244% ни бор ташкил этади. Қон зардобидаги оқсилларга эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишнинг фон таъсирини баҳолаш учун ^{10}B 0,3122 мкг/мл ^{10}B концентрацияси танланган, бу нурлатилган ўсмада (30 мкг/г) ^{10}B самарали концентрацияси 100 баробар кам. Минимал коцентрацияни танлаш, биринчидан максимал концентрация пайдо бўлганидан сўнг томир ичига юборилганда бошқариладиган дори концентрациясининг узок муддатли пасайиши юз беради, ^{10}B нинг кичик концентрацияларида нейтрон нурланиши билан қон зардобидаги оқсилларни парчалаш даражасини аниқлаш мухумдир. Иккинчидан, ишлаб чиқилган усулнинг ишлаш диапазони бизга оқсилларни боғлайдиган фармакологик препаратларнинг минимал концентрациясини аниқлашга имкон беради, шунинг учун намунага кўп миқдорда (>1 мкг) ўз ичига олган препаратнинг киритилиши фармакологик препаратларнинг қон зардобидаги оқсилларга боғланишни қийинлаштириши мумкин.

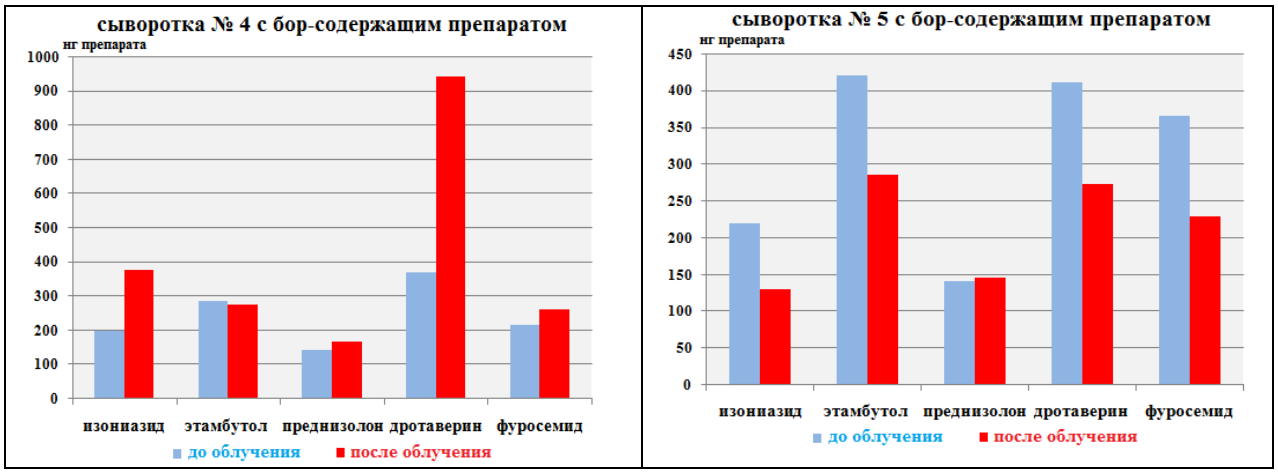
Тажрибалар қуйидаги схема бўйича ўтказилди:

6та зардоб намуналари тайёрланди. Ҳар бир оқсил намунаси икки қисмга 250мкл дан бўлинди, бунда 1,3 мкг (13мкл сувда) таркибида бор бўтган препарат қўшилди: {5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий. Таркибида бор бўлган препарат 100нг (6,244 нг ^{10}B) ҳисобида 20мкл оқсилга қўшилди. Суюлтирилмаган зардобда таркибида бор бўлган препаратининг охирги концентрацияси 5 мкг/мл (0,3122 мкг/мл) ^{10}B ни ташкил этди. Намуналарнинг бир қисми юқорида айтиб ўтганимиздек, ВВР-СМ реакторида эпииссиқ нейтронлар билан нурлатилди. Ютилган доза 0,16 Гр ташкил этди. Нурлантирилмаган оқсилларнинг боғланиш қобилиятини ўлчаш учун бошқа қисми ишлатилди.

Ўлчанган радиоактивликни қон зардоби оқсили билан боғланган нишонли препаратларнинг миқдори бўйича ҳисобланди. Нишонланган препаратларнинг эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишдан олдин ва кейин қон зардобидаги оқсиллар билан боғланишнинг умумий натижалари 7-расмда келтирилган.

Зардобда таркибида бор бўлган препарат борлиги нишонланган препаратларни албумин билан боғланишга унчалик таъсир кўрсатмаслиги аниқланди, буни препаратнинг катта молекуляр оғирлиги билан изоҳлаши

мумкин. Катта миқдордаги молекуляр оғирлик туфайли, ўз ичига олган бор препарати мавжуд албумин билан нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротоверин ва фуросемид учун рақобатлаша олмайди.



7-расм.Таркибида бор бўлган препаратда инсон қон оқсилини нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверинифуросемид препаратлари билан боғловчанлигини эпииссиқ нейтронлар билан нурлатишдан олдинги ва кейинги натижалар

Олинган натижалар асосида қуйидаги хулосаларни чиқариш мумкин:
1) BBP-CM реакторида ўзида бор тутган препарат мавжуд бўлганда 1 соат давомида нейтронлар билан нурлатилганда инсон қон оқсилини нишонланган препаратлар билан боғловчилик қобилияти ўзгаради.
2) натижалардаги кучли фарқларга қарамай, 5мкг/мл (0,3122 мкг/мл ^{10}B) ўзида бор бўлган препаратнинг охирги концентрациясида ўзида бор тутган препарат мавжудлигида эпитермал нейтронлар билан нурлатиш халокатли таъсир кўрсатмайди деган қатъий ишонч билан айтиш мумкин, инсон қони транспорт оқсилиларини боғловчилик қобилияти сақланиб

ХУЛОСА

“Инсон қони транспорт оқсили боғловчилик қобилиятини баҳолашнинг радиокимёвий усулини ишлаб чиқиш” мавзусидаги техника фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) диссертацияси бўйича ўтказилган тадқиқотлар асосида қуйидагиларни хулоса қилиш мумкин:

1. Изониазид, этамбутол ва преднизолон фармакологик препаратларининг термик активланган(фаол) тритий билан нишонлаш услублари ишлаб чиқилди ва дротаверин ва фуросемиднинг илгари ишлаб чиқилган нишонлаш усуллари такомиллаштирилди.
2. Тритий билан нишонланган препаратлар юпқа қатламли хроматография усулида тозалаш услублари ишлаб чиқилди.

3. Нишонланган изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид фармакологик бирикмаларни қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятини ўрганиш учун радиокимёвий аналитик усул ишлаб чиқилди.

4. Изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемидни қон зардоби оқсили билан боғлашда кучли индивидуал фарқлар аниқланди.

5. Подагра, гипертония ва юрак қон томир касалликлари билан оғриган беморлар қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятини in vitro ўрганиш бўйича Ташкент тиббиёт академияси ССВ билан биргаликдаги тадқиқотларда ишлаб чиқилган радиокимёвий аналитик усулдан фойдаланилди.

6. “In vitro” усулида қон зардоби оқсилининг боғловчилик қобилиятига биринчи маротаба эпииссиқ нейтронлар оқими таъсири ўрганилди.

7. Таркибида бор бўлган препарат ва борат буфери иштирокида борадиган бор нейтрон қамраб олиш реакциясида қон зардоби оқсилларини нейтронлар оқими билан нурлатишнинг изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин ва фуросемид препаратлари билан боғланиш даражасига таъсири аниқ баҳоланди.

8. Биринчи маротаба инсон қон зардоби оқсилининг реакторда эпииссиқ нейтронлари билан 0,133 Гр дан 9,436 Гр гача ютилиш дозаси билан нурлатилганда оқсилнинг боғловчанлик қобилияти (турли) даражада ўзгариши кузатилди, аммо транспорт оқсилининг боғловчилик қобилиятига ҳалокатли таъсир кўрсатмаслиги исботланди.

НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ

ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ

ЯРМАТОВ БАХРОМ ХАЙДАРОВИЧ

РАЗРАБОТКА РАДИОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО ТЕХНИЧЕСКИМ НАУКАМ

Ташкент – 2020

Тема диссертации доктора философии (PhD) по техническим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за номером № B2019.4.PhD/T1391.

Диссертация выполнена в Институте ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.inp.uz) и Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный руководитель:	**Ким Андрей Алексеевич,** кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Официальные оппоненты:	**Бозоров Эркин Хожиевич** доктор физико-математических наук, профессор
	Нишонов Шерзоджон Жуманазарович доктор философии (PhD) по техническим наукам
Ведущая организация:	**Национальный университет Узбекистана**

Защита диссертации состоится «**18**» **июня** 2020 года в **12-00** часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 при Институте ядерной физики (Адрес: 100174, г.Ташкент, пос.Улугбек, ИЯФ. Тел.: (+99871) 289-31-18; факс: (+99871)289-36-65; e-mail: info@inp.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института ядерной физики (зарегистрирована за № **32**). Адрес: 100214, г.Ташкент, поселок Улугбек, ИЯФ. Тел.: (+99871) 289-31-19).

Автореферат диссертации разослан «**13**» **июня** 2020 г.
(реестр протокола рассылки № **32** от **13 июня** 2020 г.).

М.Ю. Ташметов
председатель Научного совета по присуждению ученых степеней, д.ф.-м.н., профессор

С.Б.Игамов
ученый секретарь Научного совета по присуждению ученых степеней, д.ф.-м.н., старший научный сотрудник

И. Нуритдинов
председатель научного семинара при Научном совете по присуждению ученых степеней, д.ф.-м.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время в мире радиохимические методы анализа имеют большое значение при проведении научных биологических и медицинских исследований, требующих высокой чувствительности и точности. Эти методы скорее относятся к малодоступным «элитным» методам, используемым только в крупных научных центрах, обладающих большими финансовыми возможностями. Проведение медицинских исследований с использованием меченых соединений значительно повышает рейтинг медико-биологических исследований и международное признание полученных результатов.

В мире проведено большое количество исследований связывающей способности белков крови человека с использованием одного или двух меченных фармакологических препаратов, но при этом практически отсутствуют исследования, использующие комплексный подход с несколькими мечеными препаратами. Такой комплексный подход с использованием пяти фармакологических препаратов разных классов значительно увеличивает объем информации и дает возможность более точной оценки характеристики связывания белков сыворотки крови человека. В целом характеристики связывания белков сыворотки крови человека определяют эффективность переносимых ими фармакологических препаратов. Эти характеристики становятся чрезвычайно важными при тяжелых и хронических заболеваниях, когда достаточно трудно определить оптимальную лекарственную нагрузку на организм пациента. Использование метода индивидуальной оценки связывающей способности белков крови человека позволяет применить индивидуальный подход для медикаментозного лечения пациентов с различными тяжелыми заболеваниями. В связи с этим, разработка радиохимического метода оценки связывающей способности белков с использованием меченных тритием фармакологических соединений является актуальной задачей. Решение данной задачи позволит также отказаться от дорогостоящего импорта меченых соединений и снизить себестоимость исследований.

В Институте ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан более 40 лет развиваются экспериментальные исследования по синтезу меченных препаратов и их применению в медико-биологических исследованиях, производству радиофармпрепаратов на основе реакторных и циклотронных радионуклидов, используемых для диагностики и лечения различных заболеваний. В Стратегии[2] действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан определены задачи для выполнения программы по разработке и внедрению технологии получения радионуклидов и радиофармпрепаратов на их основе, используемых в ядерной медицине. Данная диссертационная работа посвящена разработке методов получения

[2]Указ Президента Республики Узбекистан №УП-4947 «О Стратегии действий по дальнейшему развитию РеспубликиУзбекистанна 2017–2021 годы» от 7 февраля 2017 г.

меченых тритием фармакологических соединений и на их основе разработке радиохимического метода оценки связывающей способности транспортных белков крови человека. Необходимость разработки радиохимического метода оценки связывающей способности транспортных белков крови человека обусловлена тем, что дозы и способы применения лекарственных средств, их вывод из организма, определяются именно связывающей способностью белков. В норме связывающая способность белков имеет свой диапазон связывания для различных веществ, который может сильно уменьшаться при различных заболеваниях.

Данная научно-исследовательская работа соответствует задачам, предусмотренным в Указах Президента Республики Узбекистан № УП-4947 «О стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан на 2017-2021 гг.» от 7 февраля 2017 года, № УП-5229 от 7 ноября 2017 года «О мерах по кардинальному совершенствованию системы управления фармацевтической отраслью», в Постановлениях Президента Республики Узбекистан № ПП-1442 «О приоритетах развития промышленности Республики Узбекистан в 2011-2015 гг.»от 15 декабря 2010 года, № ПП-2789 «О мерах по дальнейшему совершенствованию деятельности Академии наук, организации, управления и финансирования научно-исследовательской деятельности»от 17февраля 2017 года, а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологий в Республике Узбекистан «VI. Медицина и фармакология» и «VII. Химические технологии и нанотехнологии».

Степень изученности проблемы. В настоящее время во всем мире разработано множество клинических и исследовательских методов анализа связывающих свойств альбумина.Так, например, российские (Ю.И. Миллер, Г.Е.Добрецов, Э.Г.Юшко, Б.М.Красовицкий) и американские ученые (A.A. Spector, K.M. John) определяли связывающую способность сывороточного альбумина с использованием флюоресцентных зондов, совместная группа американских, германских и белорусских ученых (S.C. Kazmierczak, A. Gurachevsky, G. Matthes, V. Muravsky) для этой цели применяла биомаркеры (ЭПР и ЯМР зонды). Результаты этих исследований были использованы для диагностики и мониторинга рака. Все эти методы, так называемые «непрямые методы», основаны на регистрации изменений физико-химических параметров, отражающих процесс взаимодействия специфического или тестового лиганда с альбумином. Непрямые методы помимо выводов о связывающей способности альбумина позволяют сделать выводы о самой молекуле белка, ее структуре, физико-химическом состоянии центров связывания.

К другой группе «прямых методов» относятся методы, позволяющие непосредственно определить концентрацию свободного и связанного с белком лиганда (все разновидности диализа, электрофорез,

ультрацентрифугирование, хроматография). Они позволяют, например, разделить связанную и несвязанную с альбумином форму лекарства. Узбекистанские ученые (А.А. Ким, Ж.А. Дадаханов, Г.Т. Джураева, Б.В. Шукуров, И.Р. Мавлянов) для исследования связывающей способности белков крови использовали различные меченые тритием фармакологические препараты, с последующей гель фильтрацией.

Анализ работ, выполненных по исследованию связывающей способности белков крови, показывает, что нет устойчивой закономерности, описывающей эту их способность, и белки по отношению к различным препаратам ведут себя по-разному. В связи с этим для изучения связывающих свойств белка с каждым лекарственным препаратом необходимо проводить отдельные детальные исследования. Поскольку эти свойства белка определяют способ применения и дозы лекарственных препаратов, то проведение данных исследований является актуальной проблемой.

Связь темы диссертационного исследования с научно-исследовательскими работами научно-исследовательского учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-исследовательского проекта Института ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан по теме ФА-А14-Ф065 «Разработка методов мечения тритием биологически активных органических соединений и радиохимических методов анализа на их основе для медико-биологических исследований» (2009-2011).

Целью исследования является разработка радиохимического метода оценки связывающей способности белков крови с использованием меченных термически активированным тритием фармакологических препаратов изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида и его применение в медико-биологических исследованиях.

З**адачи исследования:**

разработка методик мечения термически активированным тритием фармакологических препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона, наработка меченных тритием фармакологических препаратов дротаверина и фуросемида;

разработка радиохимической аналитической методики для определения связывающей способности белков сыворотки крови с помощью меченных фармакологических соединений изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида;

использование разработанной методики в исследованиях связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с различными заболеваниями методом in vitro;

использование разработанной методики в исследованиях влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на связывающую способность белков сыворотки крови человека.

Объектом исследования являются радионуклид тритий, фармакологические препараты изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин, фуросемид и сыворотка крови человека.

Предметом исследования являются связывающая способность белков сыворотки крови и ее характеристики при различных заболеваниях и радиационном воздействии.

Методы исследования. Методы экспериментальной ядерной физики, радиохимии и аналитической химии: метод мечения термически активированным тритием, тонкослойная хроматография, гель-фильтрация, УФ-спектрофотометрия, облучение на пучке эпитепловых нейтронов на горизонтальном канале реактора ВВР-СМ ИЯФ АН РУз.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

разработаны методики мечения термически активированным тритием изониазида, этамбутола, преднизолона и очистки полученных препаратов методом тонкослойной хроматографии;

разработан радиохимический аналитический метод для определения связывающей способности белков сыворотки крови с помощью меченых фармакологических соединений изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида;

определены условия для индивидуальной оценки связывающей способности белков сыворотки крови у пациентов при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и подагре;

установлена степень влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на связывающую способность белков сыворотки крови методом «in vitro»;

впервые установлено, что облучение сыворотки крови человека пучком эпитепловых нейтронов на канале ядерного реактора с поглощенными дозами от 0,133 Гр до 9,436 Гр не оказывает разрушающего воздействия на связывающую способность транспортных белков.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

получены точные данные по связыванию изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида белками сыворотки крови у здоровых людей и у пациентов с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца и подагрой, позволяющие индивидуально оценить эффективность фармакологической нагрузки и, при необходимости,скорректировать ее;

впервые выявлен эффект не разрушающего радиационного воздействия эпитепловых нейтронов и частиц бор-нейтрон захватной реакции на связывающую способность белков сыворотки крови человека.

Достоверность полученных результатов обеспечивается проведением экспериментальных исследований с использованием независимых методов оценки характеристик идентичности меченых фармакологических соединений изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида, сопоставлением данных различных исследователей.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследований определяется полученными данными по изменению характеристик связывающей

способности белков сыворотки крови человека при различных заболеваниях и при воздействии облучения эпитепловыми нейтронами, позволяющими определить оптимальные индивидуальные дозы фармакологических препаратов для пациентов и оценить эффекты воздействия разовых доз облучения эпитепловыми нейтронами на транспортную функцию сывороточных белков крови человека.

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что разработанный радиохимический аналитический метод может быть использован в клинических исследованиях для индивидуальной оценки связывающей способности белков сыворотки крови пациентов при различных заболеваниях.

Внедрение результатов исследования. На основе полученных результатов по разработке радиохимического метода оценки связывающей способности транспортных белков крови человека:

разработанные методы мечения термически активированным тритием изониазида, этамбутола, преднизолона и очистки полученных препаратов методом тонкослойной хроматографии, радиохимический аналитический метод определения связывающей способности белков сыворотки крови с помощью меченых фармакологических соединений изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида были использованы в экспериментах по изучению связывающей способности белков сыворотки крови in vitro при различных заболеваниях в рамках прикладного проекта ФА-А14-Ф068 «Создание научно-технической базы для развития метода нейтрон-захватной терапии на реакторе ВВР-СМ ИЯФ АН РУз» (2009-2011) (письмо Академии наук Республики Узбекистан №2/1255-546 от 20февраля 2020 г.). Использование научных результатов позволило определить условия для индивидуальной оценки связывающей способности белков сыворотки крови пациентов при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и подагре;

результаты по определению степени влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на связывающую способность белков сыворотки крови методом «in vitro» были использованы для выявления степени связывания полученных фармакологических препаратов с белками сыворотки крови при облучении пучком эпитепловых нейтронов в присутствии боратного буфера и борсодержащего препарата в рамках прикладного проекта ФА-А14-Ф068 «Создание научно-технической базы для развития метода нейтрон захватной терапии на реакторе ВВР-СМ ИЯФ АН РУз» (2009-2011) (письмо Академии наук Республики Узбекистан №2/1255-546 от 20февраля 2020 г.). Использование научных результатов позволило выявить эффект не разрушающего радиационного воздействия эпитепловых нейтронов и частиц бор-нейтрон захватной реакции на связывающую способность белков сыворотки крови человека.

Апробация работы. Результаты данных исследований прошли обсуждение на 10 международных и республиканских конференциях.

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ,в том числе 7 научных статей в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов диссертации, из них 1 статья в международном научном журнале.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы. Общий объем диссертации составляет 129 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Современное состояние методов получения и области применения меченых соединений**» проводится анализ литературных сведений по методам мечения органических соединений различными радионуклидами, и в том числе термически активированным тритием, по методам очистки меченых соединений и их детекции. Приведен обзор литературы по связыванию фармакологических препаратов с белками сыворотки крови человека, разработке аналитического метода для оценки связывания изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови, а также по исследованиям связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с различными заболеваниями и влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека методом in vitro.

Во второй главе диссертации **«Получение меченых фармакологических препаратов с термически активированным тритием»** приводятся экспериментальные данные по разработке методик мечения термически активированным тритием изониазида, этамбутола и преднизолона.

Разработка методик мечения включала в себя исследование и выбор оптимальных режимов мечения термически активированным тритием на специальной установке, разработанной в Институте ядерной физики, и разработку системы очистки меченых препаратов. Для каждого из трех вышеуказанных препаратов были подобраны оптимальный режим мечения и эффективные системы очистки методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для получения меченых тритием дротаверина и фуросемида

использовали разработанные ранее в ИЯФ АН РУз методики мечения термически активированным тритием. Эти методы были оптимизированы и использованы для наработки меченых тритием дротаверина и фуросемида.

Процедура мечения изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида включала в себя приготовление растворов препаратов в органических растворителях. Затем раствор каждого препарата (50 мг) наносили на внутреннюю поверхность реакционной колбы, покрытую силикагелем, и высушивали при комнатной температуре до полного удаления растворителя. Затем реакционную колбу охлаждали в жидком азоте и вакуумировали до $5x10^{-3}$мм рт. ст. Мечение проводили циклами, состоящими из наполнения системы газообразным тритием до давления $1x10^{-1}$ мм.рт. ст. и активации трития нагретой вольфрамовой спиралью в течение 20 секунд с минутными перерывами между разогреванием спирали. Между циклами реакционную колбу размораживали, препарат растворяли в растворителе, отбирали аликвоту на измерение и снова высушивали. После окончания мечения препараты растворяли в растворителе, снимали со стенок реакционной колбы многократным ополаскиванием колбы небольшими порциями растворителя. Полученный раствор высушивали до полного удаления растворителя, затем снова растворяли в растворителе и повторно высушивали для удаления несвязавшегося и лабильного трития. Радиоактивность аликвот, отобранных в ходе мечения определяли жидкостно-сцинтилляционным счетом на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).

Было показано, что при увеличении количества циклов увеличивается суммарная активность препаратов. Также было обнаружено, что после 5 циклов мечения у изониазида изменяется цвет, что свидетельствует о трансформации (или деструкции) исходного вещества изониазида.

Для очистки меченых тритием препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона были разработаны системы очистки с помощью ТСХ. Для очистки дротаверина и фуросемида использовали разработанные ранее в ИЯФ АН РУз системы очистки с помощью ТСХ. Очистку меченых препаратов от побочных продуктов проводили тонкослойной хроматографией на пластинах с Silufol (Чехия). На рисунке 1 представлены ТСХ хроматограммы очищенных меченых тритием препаратов.

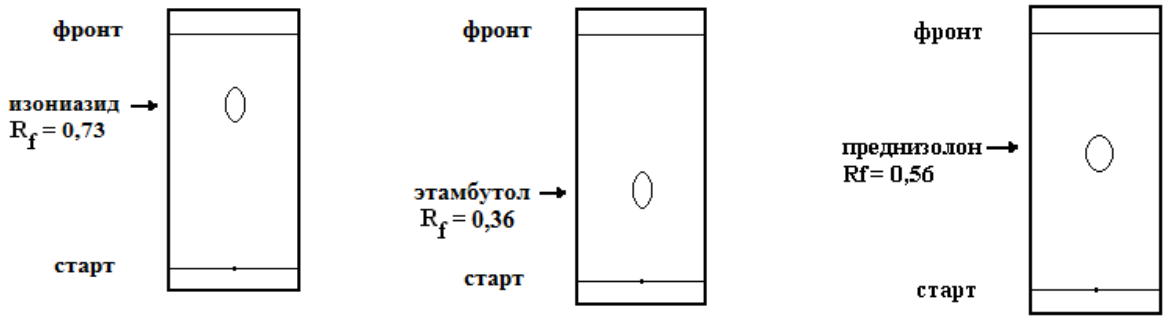


Рис. 1. ТСХ хроматограммы очищенных меченных тритием препаратов

На пластине вырезали участок с пятном препаратов, снимали с него силикагель и элюировали препараты растворителями. Элюаты высушивали и взвешивали. Радиоактивность препаратов определяли жидкостно-сцинтилляционным счетом на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Счет радиоактивности фракции меченого тритием препаратов после разделения тонкослойной хроматографией

Номер фракции	Вес фракции мг	Выход меченого препарата в %	Удельная активность МБк/ мг	Удельная молярная активность МБк/ммоль
Изониазид	20,7 мг	41,4%	3,41	468,5
Этамбутол	11,8 мг	23,6%	5,85	1 621,85
Преднизолон	20,1 мг	40,2 %	0,83	299,13
Дротаверин	18,3 мг	36,7%	18,9	8 155,3
Фуросемид	18,0 мг	36,0%	0,25	82,6

Идентичность исходных и меченых фармакологических препаратов определяли тремя независимыми методами по трем показателям: 1) значение Rf в тонкослойной хроматографии, 2) УФ-спектр исходных и меченых веществ и 3) конкурентное связывание исходных и меченых веществ с белками сыворотки крови.

Полученные меченые препараты анализировали методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области. Навески исходных и меченых фармацевтических препаратов растворяли в соответствующих растворителях и измеряли их УФ-спектры на спектрофотометре SPECORD 210 (фирма SPECORD, Германия) в диапазоне длин волн 220 – 350 нм в кювете толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения растворители. Для определения УФ-спектра этамбутола использовали реакцию этамбутола с ацетатом меди. Полученные УФ-спектры всех пяти веществ полностью соответствуют справочным литературным данным (см.рис. 2).

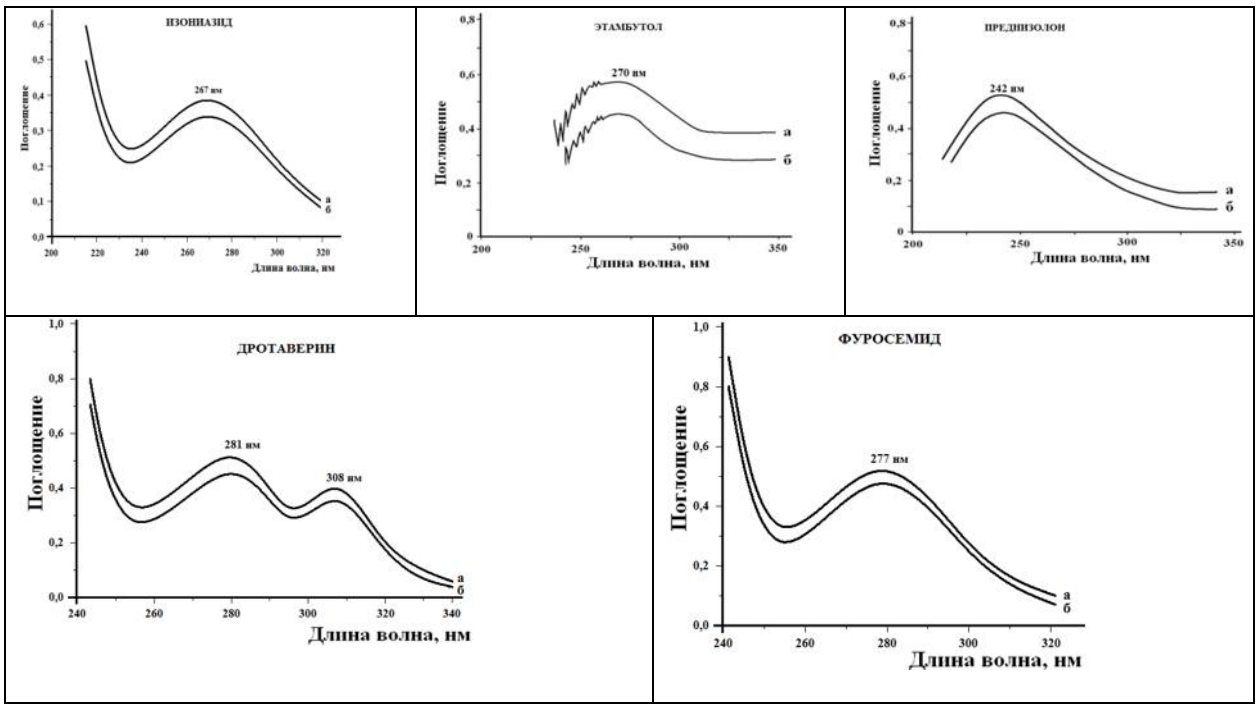


Рис. 2. УФ спектрыизониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида. УФ спектр: (а) – исходный (немеченный), (б) – меченный тритием препарат

В третьей главе диссертации **«Разработка радиохимического аналитического метода определения связывания меченых тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови человека»** приводятся экспериментальные исследования по разработке данного метода.

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили в Ташкентской медицинской академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. Для проведения исследований были отобраны образцы крови у здоровых людей в возрасте от 20 до 39 лет. Кровь отбирали натощак из вены стерильным шприцом и вносили в пробирку. После свертывания крови образцы центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 минут и отбирали супернатант – сыворотку крови. В образцах сыворотки определяли содержание общего белка и содержание альбумина стандартными лабораторными биохимическими методами. Образцы сыворотки крови замораживали в морозильнике при -20^{0}С и хранили в этих условиях до проведения экспериментов. Непосредственно перед экспериментом образцы сыворотки крови размораживали и отбирали аликвоты для исследований.

Определение общего белка и альбумина в образцах сыворотки пациентов проводили в ТашМА по стандартным клиническим лабораторным методикам.

Задачей диссертационного исследования являлась разработка комплексного радиохимического метода, позволяющего оценить связывающую способность транспортных белков сыворотки человека с помощью пяти меченых тритием фармакологических препаратов различных

классов низкомолекулярных химических соединений: изониазидом, этамбутолом, преднизолоном, дротаверином и фуросемидом.

Схема разрабатываемого метода заключалась в следующем:

1. Отбор пробы крови у пациента.
2. Получение сыворотки крови.
3. Инкубация аликвоты сыворотки крови с мечеными тритием изониазидом, этамбутолом, преднизолоном, дротаверином и фуросемидом.
4. Отделение белков сыворотки крови от свободных несвязанных меченых тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида.
5. Измерение радиоактивности трития, связанной с белками сыворотки крови.

Для разрабатываемого метода был выбран минимально возможный используемый объем образца сыворотки крови – 20 мкл. Для измерения было выбрано оптимальное количество вносимых меченых тритием препаратов – по 1 мкг на образец. Для отделения белков сыворотки крови от свободных несвязанных меченых тритием препаратов была использована гель-фильтрация на микроколонках с SephadexG-25 с рабочим объемом 300 мкл, уравновешенных буферным раствором 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4.

Для измерений был подобран следующий оптимальный объем реакционной смеси с образцом:

20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого тритием препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4.

Поскольку измерение тритиевой радиоактивности в биологических образцах сильно осложняется за счет эффекта тушения сцинтилляции, то были исследованы эффекты тушения сцинтилляции при измерении тритиевой радиоактивности в сыворотке крови. Для измерения тритиевой радиоактивности был использован толуольный сцинтиллятор (4г пара-терфенила и 0,05 г POPOP на 1л толуола). Хорошо известно, что вода и низкомолекулярные органические соединения являются сильными тушителями сцинтилляции. Поскольку в наших экспериментах используется водный раствор, а в образцах сыворотки может присутствовать большое количество низкомолекулярных органических соединений различных классов, то необходимо было определить эффект тушения сцинтилляционного счета. При измерении индивидуальных образцов сыворотки крови, было обнаружено, что эффективность счета тритиевой метки сильно варьируется. Очевидно это связано с наличием в различных образцах сыворотки одного или нескольких факторов, которые тушат сцинтилляционное свечение. Для разработки нашего метода необходимо было проверить насколько изменяется эффект тушения сцинтилляции в отдельном образце сыворотки крови при фракционировании этого образца методом гель-фильтрации на колонке с SephadexG-25.

Было проанализировано 6 образцов сыворотки крови, взятой у 6 здоровых добровольцев. Для каждого меченого препарата (изониазида,

этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида) было приготовлено по 2 образца с 6 разными сыворотками:

1) контроль: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого изониазида + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4;

2) гель-фильтрация: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого изониазида + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4.

После внесения в образцы меченого препарата образцы инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После этого по одному образцу каждойиз 6 сывороток крови наносили на микроколонки с SephadexG-25, эюлировали буферным раствором и собирали элюируемые фракции по 300 мкл. Собирали по три фракции с каждой гель-фильтрации. Первая фракция содержала высокомолекулярные белки со связанным препаратом, вторая - низкомолекулярные белки, а третья - низкомолекулярные соединения, в том числе свободный меченый препарат. Активность контрольного образца и каждой фракции измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе. Полученные данные, пересчитанные на количество меченых тритием препаратов, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Точность обнаружения меченого тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Препараты	Средний % обнаружения	P=0,05 %RSD
Изониазид	99,90 ± 0,91	0,91
Этамбутол	99,69±1,19	1,19
Преднизолон	99,53±0,92	0,92
Дротаверин	99,84±1,51	1,51
Фуросемид	99,33±0,64	0,64

Полученные данные показали присутствие эффекта «тушения» сцинтилляционного счета в различных образцах сыворотки крови человека. При отделении фракции белков из сыворотки, эффект тушения остается неизменным во всех фракциях. Исходя из этих результатов, можно с достаточной уверенностью утверждать, что применение внутреннего стандарта (применение дополнительного контрольного образца без фракционирования) позволяет точно определить количество меченого тритием препарата, связанного с белками сыворотки.

В дальнейшем использовалась следующая схема расчетов связанного меченого препарата – сцинтилляционный счет в контрольном образце в имп/мин принимали за 100%, и содержание препарата вычисляли по процентному содержанию от контрольного образца.

Определение конкурентного связывания меченых тритием препаратов с белками сыворотки крови

Для определения связывающей емкости белков сыворотки крови исследовано конкурентное связывание с белками меченого тритием препарата, и немеченого исходного препарата при различных концентрациях. Такой тест является также дополнительным доказательством идентичности меченого препарата и немеченого исходного препарата. Кроме того, результаты такого эксперимента проверяют линейность метода в измеряемом диапазоне концентраций препаратов.

Было проанализировано 6 образцов сыворотки крови, взятой у 6 здоровых добровольцев. Для каждого меченого препарата было приготовлено по 4 образца с 6 разными сыворотками.

После внесения меченых препаратов образцы инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После этого образцы наносили на микроколонки с SephadexG-25, собирали первые фракции по 300 мкл и измеряли активность, связанную с белками сыворотки.

На основании полученных данных были построены графики конкурентного связывания для пяти препаратов. Данные образца 1 были приняты за 100% и, соответственно, были пересчитаны данные образцов №2 и 3. Графики конкурентного связывания представлены на рисунке 3.

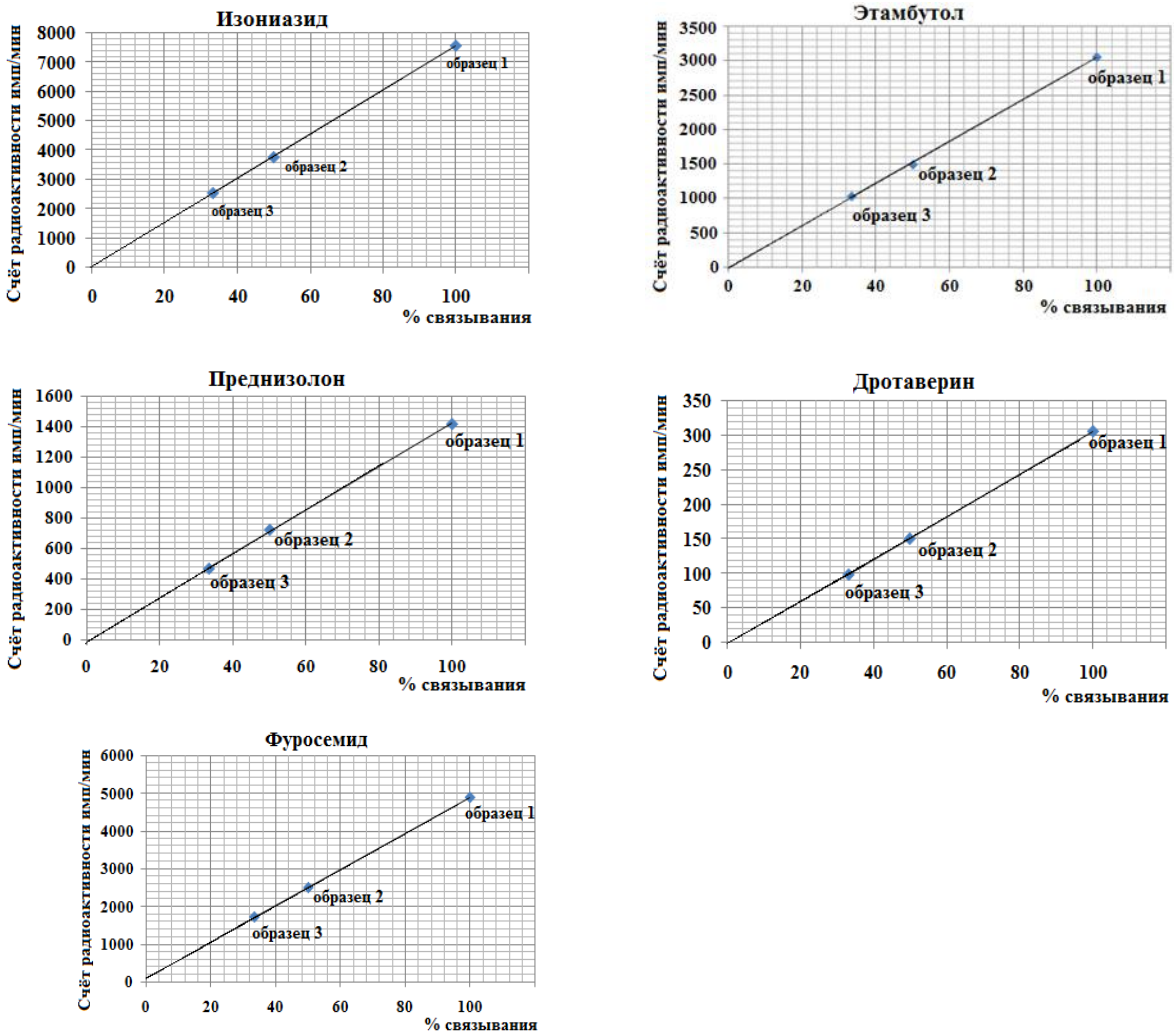


Рис. 3. Графики конкурентного связывания меченых тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина фуросемида

Таким образом, полученные результаты показывают хорошую линейность конкурентного связывания всех пяти меченых тритием препаратов при разбавлении различными концентрациями исходных немеченых препаратов. Полученные данные также являются дополнительным доказательством идентичности меченого препарата и немеченого исходного препарата.

Также определяли воспроизводимость результатов связывания меченых тритием препаратов с белками сыворотки крови на 6-ти одинаковых образцах с сывороткой от одного пациента, выявлена хорошая воспроизводимость результатов (от 0,7 до 9,2%).

В четвертой главе диссертации **«Использование разработанного радиохимического аналитического метода в медико-биологических исследованиях»** приводятся экспериментальные данные медико-биологических исследований, основанных на применении разработанного в диссертационной работе метода.

Исследование in vitro связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с различными заболеваниями.

Разработанный комплексный радиохимический аналитический метод был использован в совместных исследованиях с Ташкентской медицинской академией. Цель этих исследований заключалась в оценке связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца и подагрой.

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили описанными выше методами в Ташкентской медицинской академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. В исследуемую группу вошли 45 пациентов, которые были распределены на 5 групп. В первую группу вошли 10 пациентов в возрасте от 41 до 61 года с диагнозом «гипертоническая болезнь», во вторую - 10 пациентов в возрасте от 35 до 61 года с диагнозом «ишемическая болезнь сердца», в третью - 7 пациентов в возрасте от 40 до 65 лет с диагнозом «подагра», в четвертую - 8 пациентов в возрасте от 14 до 65 лет, проходящих обследование, и в пятую - 10 пациентов с различными другими заболеваниями. Образцы сыворотки крови замораживали в морозильнике при -20^{0}С и хранили в этих условиях до проведения экспериментов. Непосредственно перед экспериментом образцы сыворотки крови размораживали и отбирали аликвоты для исследований.

Для проведения анализа связывающей способности белков сыворотки крови нами была использована следующая схема экспериментов.

Для каждого препарата приготавливали в двух повторах инкубационную смесь, состоящую из 270 мкл буферного раствора (10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4) и 20 мкл сыворотки крови. В образцы вносили отдельно в каждый раствор по 1 мкг соответствующих меченых тритием препаратов в 10 мкл раствора. Со всех препаратов делали по два параллельных образца, один из которых, с внесенным меченым препаратом, использовали в качестве контрольного образца с внутренним стандартом, а второй образец

использовали для измерения связывания препаратов с белками. После подготовки образцов пять пробирок с образцами инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем отделяли фракцию белков гель-фильтрацией на одноразовых отдельных микроколонках, содержащих по 100 мг SephadexG25, предварительно уравновешенных буферным раствором (10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4). На одну колонку наносили весь объем реакционной смеси отдельного препарата, элюировали буферным раствором, собирали первую фракцию 300 мкл, и измеряли радиоактивность.

Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченого препарата, связанного с белками сыворотки крови. Полученные результаты показали, что количество связанных с белками препаратов сильно варьировало практически во всех группах исследования. При этом усредненные значения не коррелировали со средними концентрациями альбумина в сыворотке пациентов практически во всех группах (рисунок 4).

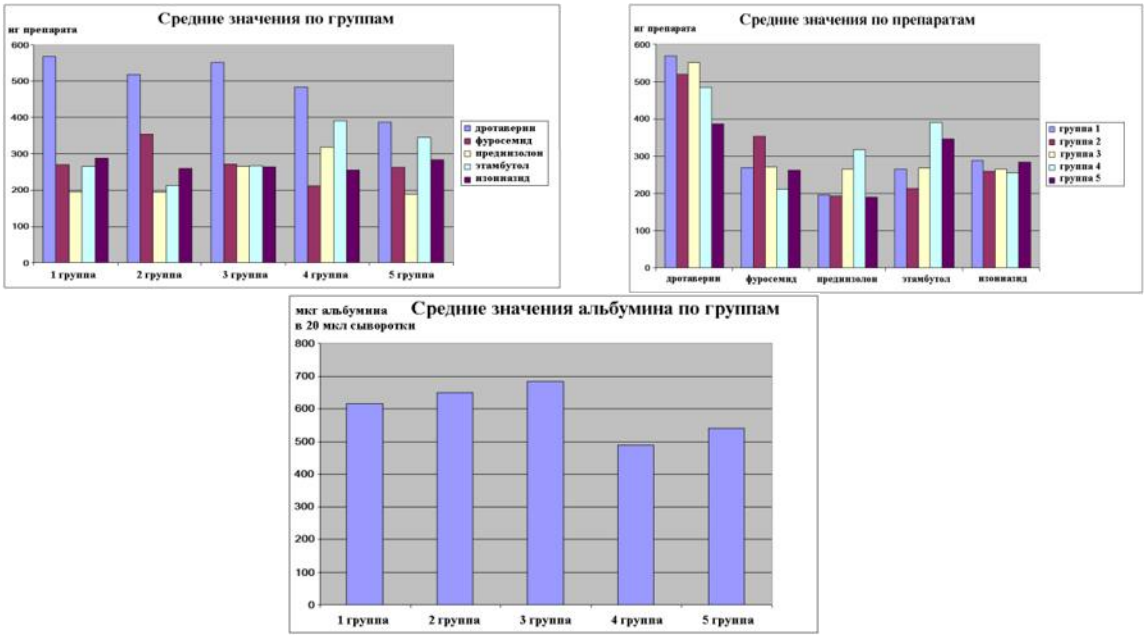


Рис. 4. Средние значения связывания меченых препаратов с белками сыворотки крови больных в пяти группах

В результате проведенных исследований были получены точные количественные характеристики связывания меченых тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови больных при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и подагре. Обнаружено, что в этих группах больных диапазон связывания препаратов белками был гораздо уже, чем в других группах, хотя эти данные не являются статистически значимыми. При этом степень связывания препаратов не зависела от количественного содержания альбумина в сыворотке крови. Вероятнее всего, что степень связывания зависит от индивидуального физиологического состояния и фармакологической нагрузки, получаемой больными во время лечения.

Таким образом, разработанный метод позволяет точно оценить индивидуальную емкость транспортной системы белков крови пациентов при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и подагре. В свою очередь, это может позволить более точно корректировать дозировку препаратов, применяемых в лечении этих заболеваний, чтобы избежать излишней фармакологической нагрузки на ослабленный организм больного.

Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека in vitro.

Разработанный радиохимический аналитический метод был использован в ИЯФ АН РУ для исследования влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на сыворотку крови in vitro. Цель этих исследований заключалась в оценке воздействия облучения эпитепловыми нейтронами на белки сыворотки крови без наличия дополнительных фармакологических препаратов и в присутствии в образцах 50 мМ боратного буфера, а также в присутствии в образцах борсодержащего препарата ({5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18-дигидропорфирин)} натрия).

Для проведения исследования были отобраны образцы крови у здоровых людей в возрасте от 20 до 39 лет.

Из каждого образца сыворотки отбирали по две аликвоты по 250 мкл сыворотки, одну аликвоту использовали для измерения связывающей способности белков, а другую облучали нейтронным пучком, после чего измеряли связывающую способность белков.

Облучение проводили на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа пучком эпитепловых нейтронов. Поглощенная доза составляла 0,133 Гр.

Графики связывания меченых препаратов с белками сыворотки крови до и после облучения эпитепловыми нейтронами представлены на рисунке 5.

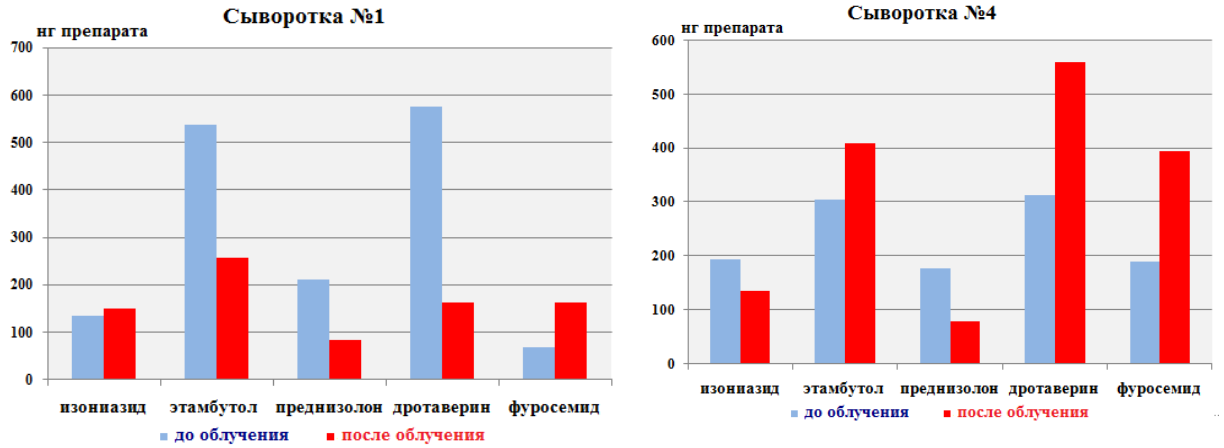


Рис. 5. Связывание меченых препаратов с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ

Необходимо отметить, что наибольшие изменения связывающей способности белков сыворотки крови после облучения эпитепловыми нейтронами произошли в образцах №1 и 2 с более низким содержанием альбумина, в то время как в образцах с более высоким содержанием

альбумина наблюдались менее резкие изменения связывания меченых препаратов.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1) облучение сыворотки крови человека на реакторе ВВР-СМ пучком эпитепловых нейтронов поглощенной дозой 0,133 Гр меняет характеристики связывания меченых тритием фармакологических препаратов с транспортными белками сыворотки крови человека;

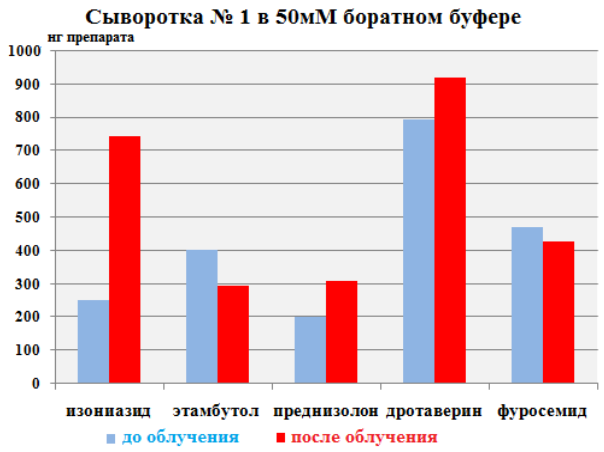
2) связывающая способность транспортных белков крови человека изменяется под воздействием эпитепловых нейтронов в различной степени в отдельных образцах. Несмотря на сильные индивидуальные отличия в результатах, можно достаточно уверенно предположить, что облучение пучком эпитепловых нейтронов в целом не оказывает разрушающего воздействия на связывающую способность транспортных белков сыворотки крови человека.

Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека в присутствии боратного буфера.

В качестве источника бора использовали боратный буфер с pH 7,4. По литературным данным эффективная концентрация ^{10}B в облучаемой опухоли составляет примерно 30 мкг/г. Для оценки воздействия нейтронного облучения на белки сыворотки крови была выбрана концентрация боратного буфера 50 мМ (с содержанием ^{10}B в 3,55 раз выше терапевтической дозы (106,49 мкг/мл ^{10}B). Применение боратного буфера в качестве источника бора в облучаемом образце сыворотки практически не влияет на связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови. Это, в свою очередь, позволяет изменять концентрацию бора в исследуемом образце в большом диапазоне.

Подготовленные для исследований образцы разделяли на две части, одну часть из которых использовали в качестве контроля для измерения связывающей способности белков без облучения, а другую часть облучали на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа пучком эпитепловых нейтронов. Рассчетное значение поглощенной дозы составило 9,436 Гр.

Результаты исследований представлены на рисунке 6.



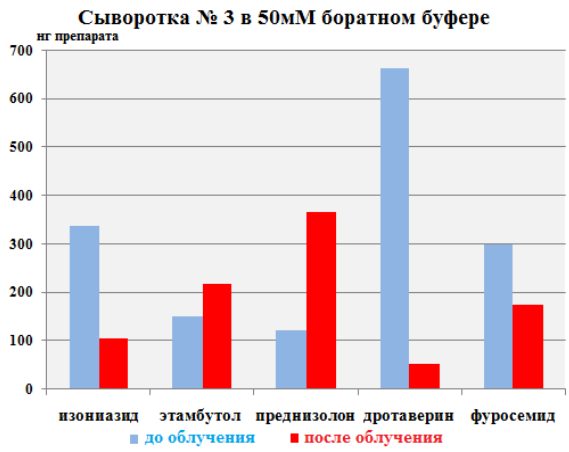


Рис. 6. Связывание меченых препаратов с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов в присутствии 50 мМ боратного буфера

Также, как и в случае с фоновым облучением (без бора) нами было обнаружено, что облучение эпитепловым нейтронным пучком сыворотки крови человека в присутствии 50 мМ боратного буфера (с концентрацией ^{10}B 106,49 мкг/мл) поглощенной дозой 9,436 Гр меняет характеристики связывания меченых тритием фармакологических препаратов с транспортными белками сыворотки в различной степени. При этом наблюдается как уменьшение связывания, так и его увеличение, что свидетельствует о функциональной активности связывающих сайтов молекулы альбумина. Процент изменений связывания вполне сопоставим с изменениями при облучении в отсутствии бора. При этом также не наблюдается полной денатурации лиганд-связывающих сайтов альбумина. Полученные данные вполне согласуются с литературными, показывающими, что для полной денатурации белков необходимы более мощные дозы нейтронного облучения.

Исходя из этого, можно достаточно уверенно предположить, что терапевтическое облучение пучком эпитепловых нейтронов в целом не оказывает разрушающего воздействия на связывающую способность транспортных белков сыворотки крови человека как в присутствии ^{10}B, так и в его отсутствие.

Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека в присутствии борсодержащего препарата.

Цель этих экспериментов заключалась в оценке воздействия облучения эпитепловыми нейтронами на белки сыворотки крови в присутствии борсодержащего препарата.

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили как указано ранее.

В качестве борсодержащего препарата использовали новый препарат {5,10,15,20-тетракис [n-(1’-карба-клозо-додекаборан-1’-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий, любезно предоставленный Институтом биоорганической химии АН РУ. Препарат чувствителен к свету, растворим в воде, ацетоне и ацетонитриле. Химическая формула: $C_{48}H_{60}B_{44}F_{16}N_4Na_4$. Молекулярный вес: 1564,63. Содержание ^{10}B в борсодержащем препарате составляет 6,244% в/в. Для оценки фонового воздействия облучения эпитепловыми нейтронами на белки сыворотки крови была выбрана концентрация ^{10}B 0,3122 мкг/мл ^{10}B, которая в 100 раз меньше эффективной концентрации ^{10}B в облучаемой опухоли (30 мкг/г). Выбор минимальной концентрации обусловлен, во-первых, тем, что при внутривенных введениях препаратов после возникновения максимальной концентрации происходит длительное снижение концентрации введенного препарата и достаточно важно определить степень разрушения белков сыворотки крови нейтронным

облучением при небольших остаточных концентрациях ^{10}B. Во-вторых, рабочий диапазон разработанного метода позволяет определять минимальные концентрации фармакологических препаратов, связывающихся с белками, поэтому введение в образец больших количеств (> 1 мкг) бор-содержащего препарата может сильно затруднять детекцию связывания фармакологических препаратов с белками сыворотки крови.

Эксперименты проводили по следующей схеме:

Приготовили 6 образцов сывороток. Каждый образец сыворотки был поделен на две части по 250 мкл, в которые внесли по 1,3 мкг (в 13 мкл воды) борсодержащего препарата: {5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий. Бор-содержащий препарат внесли из расчета 100 нг (6,244 нг ^{10}B) на 20 мкл сыворотки. Конечная концентрация борсодержащего препарата в неразбавленной сыворотке составляла 5 мкг/мл (0,3122 мкг/мл ^{10}B). Одну часть образцов облучали пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ как указано выше. Поглощенная доза составляла 0,16 Грей. Другую часть использовали для измерения связывающей способности белков без облучения.

Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченого препарата, связанного с белками сыворотки крови. Обобщенные результаты связывания меченых препаратов с белками сыворотки крови до и после облучения эпитепловыми нейтронами представлены на рисунке 7.

Было обнаружено, что присутствие борсодержащего препарата в сыворотке мало влияет на связывание альбумином меченых препаратов, что может быть объяснено большой молекулярной массой самого препарата. Вероятнее всего из-за большой молекулярной массы борсодержащий препарат не может конкурировать за сайты связывания альбумина с мечеными изониазидом, этамбутолом, преднизолоном, дротаверином и фуросемидом.

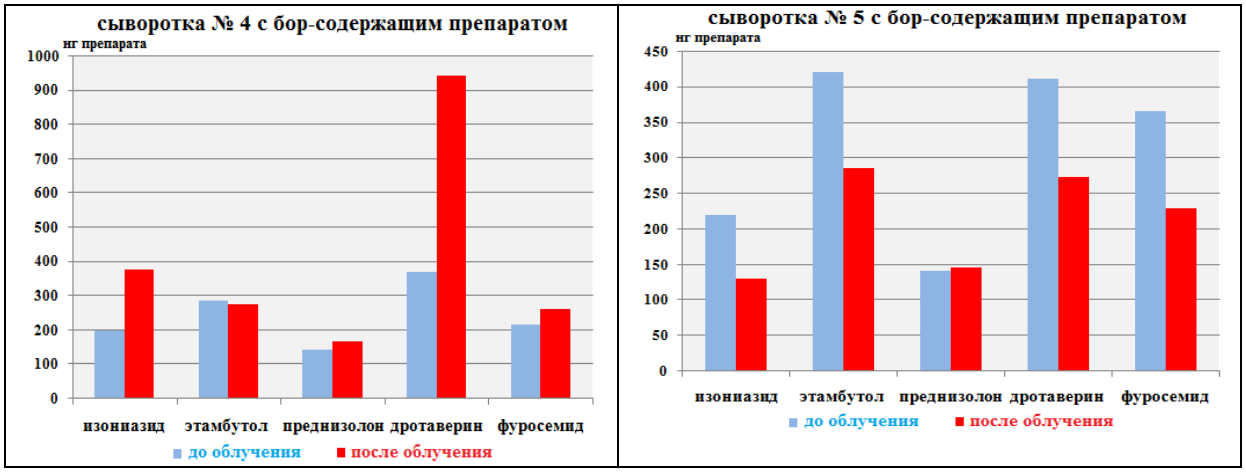


Рис. 7. Связывание меченых изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ в присутствии борсодержащего препарата

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:
1) облучение сыворотки крови человека в присутствии борсодержащего препарата на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа нейтронным пучком меняет характеристики связывания меченых тритием фармакологических препаратов с транспортными белками;
2) несмотря на сильные индивидуальные отличия в результатах, можно достаточно уверенно предположить, что облучение пучком эпитепловых нейтронов в присутствии борсодержащего препарата в конечной концентрации 5 мкг/мл (0,3122 мкг/мл ^{10}B) не оказывает разрушающего воздействия на связывающую способность транспортных белков сыворотки крови человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенных исследований по диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по техническим наукам на тему «Разработка радиохимического метода оценки связывающей способности транспортных белков крови человека» можно сделать следующие выводы:

1. Разработаны методики мечения термически активированным тритием изониазида, этамбутола, преднизолона и усовершенствованы ранее разработанные методики мечения дротаверина и фуросемида.
2. Разработаны методики очистки полученных меченых тритием препаратов методом тонкослойной хроматографии.
3. Разработан радиохимический аналитический метод для определения связывающей способности белков сыворотки крови с помощью меченых фармакологических соединений изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида.
4. Обнаружены сильные индивидуальные различия в связывании изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида белками сыворотки крови.
5. Впервые установлена степень влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на связывающую способность белков сыворотки крови методом «in vitro».
6. Впервые точно оценены изменения степени связывания белков сыворотки крови с препаратами при фоновом облучении пучком эпитепловых нейтронов с бор-нейтрон захватной реакцией в присутствии боратного буфера и борсодержащего препарата.
7. Впервые установлено, что облучение сыворотки крови человека эпитепловыми нейтронами в ядерном реакторе с поглощенными дозами от 0,133 Гр до 9,436 Гр в различной степени меняет характеристики связывания белков сыворотки крови человека, но при этом в целом не оказывает разрушающего воздействияна связывающую способность транспортных белков.

SCIENTIFIC COUNCIL DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREES AT THE INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS

INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS

YARMATOV BAKHROM KHAYDAROVICH

DEVELOPMENT OF A RADIOCHEMICAL METHOD FOR ASSESSING THE BINDING ABILITY OF HUMAN BLOOD TRANSPORT PROTEINS

01.04.01- Instruments and methods of experimental physics

DISSERTATION ABSTRACT
OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)ON TECHNICAL SCIENCES

Tashkent – 2020

The theme of the dissertation of the doctor of philosophy (PhD)on physical and mathematical scienceswas registered by the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under № B2019.4.PhD/T1391.

The doctoral (PhD) dissertation was carried out at the Institute of Nuclear Physicsof the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation was posted in three (Uzbek, Russian, English (resume)) languages on the website of the Scientific Council at www.inp.uz and on the website of "Ziyonet" informational and educational portal at www.ziyonet.uz.

Scientific consultant:	**Kim Andrey Alekseevich** Doctor of Philosophy (PhD) on Biological Sciences, Senior Researcher
Official opponents:	**Bozorov Erkin Khojievich** Doctor of Physical and Mathematical Sciences, professor
	Nishonov Serzodzhon Zhumanazarovich Doctor of Philosophy (PhD)on Technical Sciences
Leading organization:	**National University of Uzbekistan**

The defense of the dissertation will be held on "**18**" **06** 2020, at **12-00** at the meeting of the Scientific Council No. DSc.02/30.12.2019.FM/T.33.01 at the Institute of Nuclear Physics (Address: INP, Ulugbek settlement, 100124 Tashkent city. tel. (+99871) 289-31-41, fax (+99871) 289-36-65; e-mail: info@inp.uz).

The doctoral (PhD) dissertation can be looked through in the Information Resource Centre of the Institute of Nuclear Physics (registered under No. **32**) Address: INP, Ulugbek settlement, 100124 Tashkent city. tel. (+99871) 289-31-19.

The abstract of dissertation was distributed on "**13**" **06** 2020.
(Registry record No. **32** dated "**13**" **06** 2020.)

M.Yu. Tashmetov
Chairman of the Scientific Council for Awarding
Doctor of physical and mathematical sciences, Professor

S.B.Igamov
Scientific Secretary of the Scientific Council for Awarding
Doctorof physical and mathematical sciences

I. Nuritdinov
Chairman of the Scientific Seminar of the Scientific
Council on Award of Scientific Degrees,
Doctor of physical and mathematical sciences, Professor

INTRODUCTION (annotation of PhD dissertation)

The aim of the research is the development of a radiochemical method for assessing the binding ability of blood proteins by pharmacological preparations isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverin and furosemide using drugs labeled with thermally activated tritium.

The tasks of the research: development of methods for labeling with thermally activated tritium of pharmacological preparations of isoniazid, ethambutol and prednisolone, production of tritium-labeled pharmacological preparations of drotaverine and furosemide;

development of radiochemical analytical methodology for determining the binding ability of serum proteins using labeled pharmacological compounds of isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverine and furosemide;

the use of the developed technique in studies of the binding ability of serum proteins of patients with various diseases in vitro.

the use of the developed technique in studies of the effect of irradiation with epithermal neutron beam on the binding ability of human serum proteins.

The objects of the researchare tritium radionuclide, pharmacological preparations isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverine, furosemide and human serum.

The subjects of the research are the binding ability of serum proteins and its characteristics in various diseases and radiation exposure.

The methods of the research. Methods of experimental nuclear physics, radiochemistry, and analytical chemistry: labeling with thermally activated tritium, thin-layer chromatography, gel filtration, UV spectrophotometry, irradiation by epithermal neutron beam on the horizontal channel of the reactor WWR-SM of INP AS RUz.

The scientific novelty of dissertation research is as follows:

methods for labeling with thermally activated tritium of isoniazid, ethambutol, prednisolone and purification of tritium-labeled preparations by thin layer chromatography have been developed;

radiochemical analytical method has been developed to determine the binding ability of blood serum proteins using labeled pharmacological compounds of isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverine and furosemide;

conditions were selected for an individual assessment of the binding ability of serum proteins in patients with hypertension, coronary heart disease and gout;

the degree of influence of exposure to a beam of epithermal neutrons on the binding ability of serum proteins by the in vitro method has been established;

it was found for the first time that irradiation of human blood serum with an epithermal neutron beam on a channel of a nuclear reactor with absorbed doses from 0.133 Gy to 9.436 Gy does not have a destructive effect on the binding ability of transport proteins.

Practical results of the research are as follows:

accurate data have been obtained on the binding of isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverin and furosemide to serum proteins in healthy people and in

patients with hypertension, coronary heart disease and gout, which allow to individually evaluate the effectiveness of the pharmacological load and, if necessary, adjust it;

For the first time, the effect of non-destructive radiation influence of epithermal neutrons and particles of boron-neutron capture reaction on the binding ability of human serum proteins is shown.

The reliability of the research results is ensured by conducting experimental studies using independent methods for assessing the identity characteristics of labeled pharmacological compounds isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverine and furosemide, comparing data from various researchers.

Scientific and practical significance of the research results.

The scientific significance of the research results is determined by the data obtained on the change in the characteristics of the binding ability of human blood serum proteins in various diseases and when exposed to epithermal neutron irradiation, which makes it possible to determine the optimal individual doses of pharmacological preparations for patients and to evaluate the effects of single doses of epithermal neutron irradiation on the transport function of human blood serum proteins.

The practical significance of the research results lies in the fact that the developed radiochemical analytical method can be used in clinical studies to individually assess the binding ability of patients' blood serum proteins in various diseases.

Implementation of the research results. Based on the results of the development of a radiochemical method for assessing the binding ability of human blood transport proteins:

the developed methods for labeling with thermally activated tritium of isoniazid, ethambutol, prednisolone and purification of the obtained preparations by thin layer chromatography, a radiochemical analytical method for determining the binding ability of blood serum proteins using labeled pharmacological compounds of isoniazid, ethambutol, prednisolone, drotaverine and furosemide were used in experiments on the binding ability in vitro blood serum proteins for various diseases as part of the FA- A14-Ф068 “Creation of a scientific and technical base for the development of neutron capture therapy at the VVR-SM reactor of the INP AN RUz” (2009-2011) (letter of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan No. 2/1255-546 of January 20, 2020). Using scientific results, it was possible to choose the conditions for an individual assessment of the binding ability of the serum proteins of patients with hypertension, coronary heart disease and gout;

the results of determining the effect of irradiation with an epithermal neutron beam on the binding ability of blood serum proteins using the in vitro method were used to determine the degree of binding of the obtained pharmacological preparations to blood serum proteins when irradiated with an epithermal neutron beam in the presence of a borate buffer and a boron-containing preparation in the framework of the FA application project -A14-Ф068 “Creation of a scientific and technical base for the development of neutron capture therapy at the VVR-SM

reactor of the INP AN RUz” (2009-2011) (letter of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan №2 / 1255-546 on January 20, 2020). Using scientific results, it was possible to identify the effect of non-destructive radiation effects of epithermal neutrons and boron-neutron particles of a capture reaction on the binding ability of human serum proteins

Approbation of research results. The results of these studies were discussed at 10 international and national conferences.

Publication of the research results.

On the topic of the dissertation, 17 scientific papers were published, including 7 scientific articles, of which 1 in foreign scientific journals recommended by the Higher Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publishing the main scientific results of the dissertation.

Structure and volume of the dissertation The dissertation consists of an introduction, four chapters, conclusion, list of references. The volume of the dissertation is 129 pages of typewritten text.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХРАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; part I)

1. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. Мечение изониазида термически активированным тритием // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2012. - №2. - С. 23-25 (01.00.00. №7)
2. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. Мечение этамбутола термически активированным тритием // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2012. - №6. - С. 30-32 (01.00.00. №7)
3. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Кист А.А., Садыков И.И. Использование метода термической активации трития для получения меченного тритием преднизолона // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2014. - №1. – С. 54-56 (01.00.00. №7)
4. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Кист А.А., Садыков И.И. Оптимизация условий мечения препаратов термически активированным тритием //Узбекский физический журнал. – Ташкент, 2014. - №4. - С. 314-318. (01.00.00. №5)
5. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И., Мавлянов И.Р.Конкурентное связывание меченных тритием изониазида и этамбутола с альбумином сыворотки крови // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2014. - №6. - С. 12-14. (01.00.00. №7)
6. Yarmatov B.Kh., Kim A.A., Djuraeva G.T., Sadikov I.I. Application of method of thermal activation of tritium for obtaining of tritium labeled isoniazid, ethambuthol and prednisolone // Oxford Review of Education and Science. - Oxford University Press: Oxford (United Kingdom), 2016.- No 1(11). -pp. 431-438 (№41. SCImago; IF=3,548)
7. Ким А.А.,Ярматов Б.Х., Кулабдуллаев Г.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И., Усманов Т.М. Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека в присутствии боратного буфера // Доклады Академии Наук РУз.- Ташкент, 2019. - №6. – С.13-19 (01.00.00. №7)

II бўлим (II часть; part II)

8. Kim A.A., Djuraeva G.T., Yarmatov B. Kh. Application of method of thermally activation of tritium for labeling of izoniazide // “Modern Problems of Nuclear Physics”: Book of Abstracts of 7th International Conference, September 22-25, 2009. – Tashkent (Uzbekistan), 2009. - p. 232.
9. Yarmatov B.Kh., Kim A.A., Djuraeva GT. Application of method of thermal activation of tritium for labeling of izoniazide // 16 Radiochemical Conference (RadChem 2010), April 18-23, 2010, Book of Abtracts. - Marianske Lazne (Czech Republic), 2010. - p. 19.

10.Мавлянов И.Р., Абдуллаев А.К., Ярматов Б.Х., Ким А.А. Джураева Г. Оценка связывания меченных тритием лекарственных веществ с альбумином крови у больных ишемической болезнью сердца // «Актуальные вопросы мирного использования атомной энергии»: Сб.статейМежд. Конф. молодых ученых и специалистов 6-8 июня 2012. – Алматы (Республика Казахстан), 2012. -С.124-126.
11. Мавлянов И.Р., Абдуллаев А.К., Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. Оценка связывания меченных тритием лекарственных веществ с альбумином крови у больных подагрой //«Актуальные вопросы мирного использования атомной энергии»: Сб.статейМежд. конф. молодых ученых и специалистов 6-8 июня 2012. – Алматы (Республика Казахстан), 2012. -С. 126-128
12. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Мавлянов И.Р. Разработка радиохимического аналитического метода определения связывания меченных тритием изониазида, этамбутола и преднизолона белками сыворотки крови человека // «Актуальные вопросы мирного использования атомной энергии»: Сб.статей межд.конф. молодых ученых и специалистов 6-8 июня 2012. – Алматы (Республика Казахстан), 2012. - С. 143- 144.
13.Абдуллаев А.К., Мавлянов И.Р., Мавлянов З.И., Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. Изучение связывающей способности меченных тритием лекарственных веществ с альбумином крови больных ишемической болезнью сердца // «Актуальные вопросы мирного использования атомной энергии»: Сб.статей межд.конф. молодых ученых и специалистов, 6-8 июня 2012. - Алматы (Республика Казахстан), 2012. - С. 93-97.
14.Мавлянов И.Р., Абдуллаев А.К., Мавлянов З.И., Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. / Оценка транспортной функции альбумина в крови с помощью меченных тритием лекарственных веществ у больных подагрой // «Актуальные вопросы мирного использования атомной энергии»: Сб.статей межд.конф. молодых ученых и специалистов 6-8 июня 2012. – Алматы (Республика Казахстан),2012. - С. 214-219.
15.Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И., Мавлянов И.Р. Определение конкурентного связывания меченного тритием препаратов с альбумином сыворотки крови // «Приоритетные направления в области науки и технологий в XXI веке»: VII межд.науч.конф. 30-31 мая 2014. – Ташкент, Республика Узбекистан, 2014. - С.114-116.
16.Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева, Г.Т. Садыков И.И., Мавлянов И.Р. Получение меченных тритием препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона // «Приоритетные направления в области науки и технологий в XXI веке»: VII межд.науч.конф. 30-31 мая 2014. - Ташкент, Республика Узбекистан, 2014. - С. 117-121.
17. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И. Радиохимический метод мечения фармакологических препаратов термически активированным тритием // «Ядерная физика и ядерные технологии»: Сборник докладов IV Респ.конф. молодых физиков, 2-3 декабря 2014. – Ташкент, Институт ядерной физики АН РУз, 2014. - С.89-95.

Илмий рахбар **А.А.Ким**

Талабгор **Б.Х.Ярматов**