АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ

На правах рукописи
УДК 546.11.027*3

ЯРМАТОВ БАХРОМ ХАЙДАРОВИЧ

РАЗРАБОТКА РАДИОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОЦЕНКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

01.04.01 – Приборы и методы экспериментальной физики

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по техническим наукам

Научный руководитель**:** Ким Андрей Алексеевич,
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник

Ташкент -2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 7

I.СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ 18

§1.1. Методы мечения органических соединений 18

§1.2. Мечение органических соединений тритием 19

§1.3. Метод мечения термически активированным тритием 25

§1.4. Методы очистки меченых соединений 28

§1.5. Характеристики фармакологических препаратов 30

§1.6. Связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови 34

§1.6.1. Связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови и фармакокинетические свойства 39

Выводы по главе 1 41

II. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ТЕРМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННЫМ ТРИТИЕМ 43

§ 2.1. Мечение фармакологических препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона 43

§ 2.2. Методика мечения термически активированным тритием фармакологического препарата изониазида, этамбутола и преднизолона 46

§ 2.3. Методика очистки меченых препаратов 48

§ 2.3. Анализ меченых препаратов ультрафиолетовой спектрофотометрией 54

§ 2.4. Наработка меченых трермически активированным тритием дротаверина и фуросемида 57

III. РАЗРАБОТКА РАДИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. 61

§3.1. Методы исследования альбумина и его связывающей способности 61
§3.2. Разработка аналитического метода для оценки связывания изониазида, этамбутола и преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови 63
§3.3. Сцинтилляционный счет радиоактивности трития в биологических образцах 67
§ 3.4. Определение конкурентного связывания меченных тритием препаратов с белками сыворотки крови 74
§ 3.5. Определение воспроизводимости результатов связывания меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови 80
IV. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗРАБОТАННОГО РАДИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ 84
§ 4.1 Исследование in vitro связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с различными заболеваниями 84
§ 4.2. Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека in vitro 95
§ 4.2.1. Исследование фонового влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека 98
§ 4.2.2. Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека в присутствии боратного буфера 104
§ 4.2.3.Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека вприсутствии борсодержащего препарата. 108

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 115
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 117

ОСНОВНЫЕ УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

РРО–2,5 дифенилоксазол сцинтилляционный;

РОРОР–1,4-ди 2-(5-фенил) оксазолил бензол;

ЖСС–жидко-сцинтилляционный счет;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин;

УФ – ультрафиолет;

Ки – мера радиоактивности, кюри;

Бк – мера радиоактивности, беккерель;

ИК – инфракрасная спектроскопия;

Х.ч. – химический чистый;

Ч.д.а. – чистый для анализа;

$T_{1/2}$ – период полураспада радионуклида;

ЧСА – сывороточный альбумин человека;

pH – водородный показатель;

$T_{1/2}$ – период полураспада радионуклида;

α – альфа частицы;

β^- - бета – распад ;

Х.ч. – химический чистый;

Ч.д.а. – чистый для анализа;

Гр – грей, единица измерения поглощенной дозы;

Ки – мера радиоактивности, кюри ;

Бк – мера радиоактивности, беккерель;

pH–водородный показатель;

МэВ – мега электрон вольт;

КэВ – кило электрон вольт;

НЗТ – нейтрон-захватная терапия;

М – молярность раствора;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и востребованность темы диссертации. В настоящее время в мирерадиохимические 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 валютного импорта меченых соединений и снизить себестоимость исследований.

В Институте ядерной физики Академии наук Республики Узбекистан более 40 лет развиваются экспериментальные исследования по синтезу меченых 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[1] 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 меченных 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

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

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

меченные 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 кровис 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 диссертационного 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;

выбраны 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 показан 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 меченных 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 радиохимическогометода 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 заболеванияхв рамках прикладного проекта ФА-А14-Ф068 «Создание научно-технической базы для развития метода нейтронзахватной 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 выбрать 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 нейтронзахватной 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 127 страниц.

Список опубликованных работ:

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 меченого 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)
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 меченых 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 меченых 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 меченых 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.

I. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЧЕНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

§ 1.1. Методы мечения органических соединений.

Для получения меченых фармакологических препаратов применяется целый ряд различных радонуклидов разных химических элементов. Для задачи данного исследования - мечение низкомолекулярных фармакологических препаратов изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида – необходимо было подобрать оптимальный радионуклид. Ниже приведен анализ свойств некоторых радионуклидов, используемых для мечения фармакологических препаратов.

Радионуклиды, используемые для мечения органических соединений. В органической химии для мечения низко- и высокомолекулярных соединений используются различные радионуклиды, такие как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{82}Br, ^{131}J. Среди перечисленных радионуклидов наиболее широко используется ^{3}H – тритий, с периодом полураспада ($T_{1/2}$) 12,3 лет. [1: с.246, 2; с. 471-497]. Разработаны различные методы мечения тритием как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных органических соединений, включая изотопный обмен. Радионуклид C^{14} является чистым бета излучателем с $T_{1/2}$ 5600 лет. Для определения ^{14}C используются специальные счетные трубки с тонким слюдяным окошком, пропускающим мягкое β-излучение этого изотопа или же жидкостные сцинтилляционные спектромтеры. [3; с.685, 4с.348, 5; с480]

Из радионуклидов фосфора для мечения биологически активных соединений используются ^{32}P ($T_{1/2}$ 14,3 дня) и ^{33}P($T_{1/2}$ 25,34дня). [3; с.685, 4с.348, 5; с480]. Эти радионуклиды удобны для мечения большого диапазона низко и высокомолекулярных органических соединений, содержащих фосфор.

Среди большого количества радиоактивных изотопов галоидов для мечения органических соединений в основном используются ^{36}Cl ($T_{1/2}$ $4 \cdot 10^5$ лет), ^{82}Br ($T_{1/2}$ около 36 часов) и ^{131}J ($T_{1/2}$ 8 дней) [3; с.685, 4с.348, 5; с480].

Для мечения низкомолекулярных фармакологических соединений использование углерода-14 в большинстве случаев неприменимо из-за высокой стоимости синтеза и исходных реактивов. К тому же мечение с ^{14}C проводится в основном во время синтеза соединения, а мечение готовых препаратов с C^{14} очень сложно, а в большинстве случаях практически невозможно.

Использование радионуклидов фосфора, серы и галллоидов для мечения низкомолекулярных фармацевтических препаратов изониазида, этамбутола, преднизолона и дротаверина также неприменимо, в связи с тем, что эти соединения не содержат атомов фосфора, серы и галоидов, а введение в соединения атомов других элементов изменит их фармакологические свойства.

В связи с этим среди всех перечисленных радионуклидов тритий имеет неоспоримое преимущество и является самым востребованным и удобным радионуклидом для получения меченых соединений для биологии и медицины по следующим соображениям. Во-первых, практически любую органическую молекулу, содержащую водород, можно метить тритием. Во-вторых, тритий легко вводится в разные соединения, и химия этих процессов разработана лучше, чем для любого другого радионуклида. В-третьих, тритий — это самый дешевый радионуклид, из используемых в биологии и медицине.

Исходя из приведенного выше анализа методов мечения органических соединений можно предположить, что использование трития для мечения низкомолекулярных фармакологических препаратов изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида представляется наиболее оптимальным для получения меченых препаратов с необходимыми параметрами.

§ 1.2. Мечение органических соединений тритием

Как указано выше для получения меченых радионуклидами изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида самым

удобным радионуклидом является тритий, поскольку введение трития в эти фармакологические соединения теоретически позволяет получать эти низкомолекулярные соединения без изменения структуры молекул. Этот аспект является чрезвычайно важным при получении меченых низкомолекулярных фармакологических веществ, поскольку любое изменение органической молекулы с малым молекулярным весом может чрезвычайно сильно изменять его биологические и фармакологические свойства.

Физико-химические свойства трития

Тритий открыли в 1934 г. Э. Резерфорд, М. Олифант и П. Хартек.Три́тий, символ T или ³H (сверхтяжёлый водород) — радиоактивный изотоп водорода, получается в ядерных реакциях. В природе образуется в верхних слоях атмосферы при соударении частиц космического излучения с ядрами атомов, например, азота. В процессе распада превращается в ³He с испусканием электрона и антинейтрино (бета-распад), период полураспада — 12,32 года. Доступная энергия распада очень мала (18,59 кэВ), средняя энергия электронов 6,5 кэВ [6; с.14-27, 7; с.101-105, 8; с.389].

Схема распада: $^{3}H \longrightarrow e + {}^{3}He$

Таблица 1.1

Ядерно-физические характеристики трития

Нуклид	T1/2	Тип расп.	$E_{ср}$, Мэв	Получение	р/акт. мг-ат.
^{3}H	12,32 года	β^-	0,0056	$^{6}Li(n,\alpha)$	1,07ТБк

В настоящее время разработан большой спектр методов получения меченых тритием органических соединений. Эти методы можно условно разделить на две группы: химические методы и различные варианты изотопного обмена. Химические методы включают в себя введение тритиевой метки гидрированием или дегалоидированием газообразным тритием, восстановление соответствующих предшественников тритийсодержащими реагентами,

методы с использованием конденсации сложных немеченых фрагментов с мечеными реагентами на последних стадиях синтеза или использование меченых предшественников в многостадийном синтезе [9; с.1-17]. Методы изотопного обмена также можно разделить на реакции с тритиевой водой и на реакции с газообразным тритием.

Основные методы получения ^{3}H-соединений

1. Химический синтез гидрированием $^{3}H_2$ ненасыщенных связей, дегалоидирование и восстановление гидроксильных или карбонильных соединений [10; с.71, 11; с.7, 12; с.160].

Реакция каталитического обмена галогена на водород (гидрогенолиз) известна давно, однако для получения соединений, меченных тритием, ее стали применять сравнительно недавно [6; с.14-27, 13; с.263-269]. Реакцию каталитического дегалогенирования обычно проводят в герметичных реакционных сосудах при интенсивном перемешивании суспензии катализатора в растворе галогензамещенного соединения в атмосфере газообразного трития. При этом применяют полярные и неполярные растворители. Образующийся в ходе реакции галогенид трития необходимо нейтрализовать, так как он отравляет катализатор, что ведет к снижению скорости реакции.

В случае изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида такой синтез исключен, поскольку требует синтеза соответствующих предшественников, содержащих дополнительные ненасыщенные связи, галоидзамещенные фрагменты и т.д., подлежащих дальнейшей модификации с использованием газообразного трития для получения меченого препарата. Этот метод является достаточно дорогим и чаще всего сложным. К недостаткам также можно отнести вероятность образования при синтезе большого количества радиоактивных отходов.

2. Модификация соединений с помощью ^{3}H-метильных или ^{3}H-ацетильных групп. Этот метод также не оптимальный для решения нашей задачи – получения меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида.Существует ряд методов, которые не нашли ши-

рокого распространения в синтезе меченных тритием природных диазинов. Основными недостатками являются:

а) необходимость закупки за валюту реагентов, содержащих ^{3}H-метильные или ^{3}H-ацетильные группы, что сильно увеличивает стоимость исследований.

б) вероятность изменения структуры молекул исследуемых соединений и, соответственно, их фармакологических и биологических свойств [2; с.471-497, 14; с.254-266].

3. Гидрирование с использованием $Li[B^3H_4]$ или $Li[Al^3H_4]$. Этот метод гидрирования, как и в предыдущем методе – предполагает необходимость закупки меченных тритием препаратов и высокая вероятность изменения структуры молекул используемых препаратов за счет разрыва связей, и соответственно, их фармакологических и биологических свойств [6; с.15-27].

Процессы восстановления и гидрирования были использованы для введения тритиевой метки в метильную группу тимина и его производных, а также в углеводную часть нуклеозидов. Для восстанавления используют обычно каталитические реакции с участием газообразного трития, меченные тритием $Na[B^3H_4]$ и $Li[Al^3H_4]$. В работе триэтил-бортритид лития (супертритид) получали при взаимодействии LiT и Et_3B, который был предложен для введения трития в соединения восстановлением некоторых функциональных групп [14; с.254-266]

Меченный тритием тимидин ($A_{мол}$ = 27,5 Ки ммоль$^{-1}$) был получен восстановлением 5-гидроксиметил-2'-дезокси-уридина в присутствии катализатора (родий на оксиде алюминия). Восстановлением 5-формил-2'-дезоксиуридина NaB^3H_4 в фосфатном буфере синтезирован меченный тритием 5-гидроксиметил-2'-дезоксиуридин.

4. Метод ферментативного синтеза из ^{3}H-меченых предшественников. Этот метод используется довольно редко и в основном применяется для биохимического синтеза меченных тритием органических соединений. Основными его недостатками являются сложность синтеза и дороговизна метода.

Также можно упомянуть биосинтез — выращивание микроорганизмов на среде, содержащей ^{3}H-предшественник (например, [метил-^{3}H] тимидин, для получения меченой ДНК), с последующим выделением целевого соединения. Однако, этот способ достаточно специфический и обычно применяется только в лабораторной практике для получения биополимеров.

5. Введение ^{3}H за счет тритиевой воды (гидролиз или изотопный обмен). Для введения метки в соединения, неустойчивые в условиях гидрирования, применяется метод изотопного обмена с тритиевой водой в инертных растворителях. Главным источником тритиевой воды [14; с.254-266], как правило, является PdO, который предварительно восстанавливают газообразным тритием. Очевидно, что чем активней катализатор, тем выше степень изотопного обмена с тритиевой водой, но и вероятность деградации лабильного вещества также возрастает [15; с.16, 16; с.483-498].

Различают реакции изотопного обмена с тритийсодержащим растворителем (в том числе с тритиевой водой) и каталитические реакции с газообразным тритием. Для реакций каталитического изотопного обмена чаще всего использованы гетерогенные палладиевые катализаторы [17; с.391-401], гомогенные катализаторы, такие как трифторметансульфоновая кислота,[18; с.1566-1567] трихлорид родия и ацетилацетонат рутения [19; 1427-1436], а также катализаторы на основе полимеров [20; с.391-400, 21; с.787-794],и металлов (Pt, Ni, Rh), нанесенных на гидрофобные (тефлон, полиэтилен, полистирол) носители. Изотопный обмен активированных ароматических протонов в среде AcO^{3}H-^{3}HC1 рассмотрен в работе [14; с.254-266]. В статье показана каталитическая роль металлов и водородных ионов в тритиевом обмене гетероциклических субстратов.

Реакции с тритийсодержащим растворителем, которым чаще всего является тритиевая вода, проводят обычно в водном растворе в сильнощелочной среде. В работе предложен препаративный метод специфического введения изотопов водорода в конденсированные бензогетероциклы. В основе метода лежит процесс изотопного обмена с дейтериевой и тритиевой водой при

температуре выше 145°С. Методы получения гетероциклических и гетероароматических соединений, содержащих изотопы водорода, рассмотрены соответственно в работах. [16; с.483-498].

В большинстве случаев твердофазные реакции проводят в жестких условиях: при температуре выше 200°С(обычно при 300, 500°С и выше). Для большинства биологически активных веществ использование таких высоких температур недопустимо; их изучают при более низких температурах (200-300°С). [2; с.471-497]. Совершенно естественно, что такие повышенные температуры реакции увеличивают вероятность деградации органических молекул.

6. Каталитический или термоактивированный водородный обмен.

Каталитический изотопный обмен можно проводить как в жидкой, так и в твердой фазе. При этом в качестве катализатора в случае с жидкой фазой используют PtO_2 или PdO [22; с.155-159]. А в случае с твердой фазой используется металлический катализатор (Ru, Rh, Pd, Pt) [23; с.569-576] К преимуществам каталитического метода можно отнести высокую удельную активность меченых соединений, возможность мечения биологических важных макромолекулярных соединений. Недостатком метода является деградация лабильных молекул, параллельное протекание реакций гидрирования, дегалоидирования и восстановления различных функциональных групп.

Для мечения методом изотопного обмена с термоактивированным тритием в качестве тритиевого агента используется чистый газообразный тритий [24; с.116-121] Реакция мечения проводится в гетерогенной фазе на границе твердая фаза-газ при температуре – до 1700ºС [25; с. 314-318, 26; с.431-438]. Преимуществам метода можно отнести то, что нет необходимости предварительно синтезировать тритийсодержащие соединения, использовать дорогостоящие катализаторы (как правило, благородные металлы), простота и дещевизна оборудования. Вместе с этим, основным преимуществом данного метода, является то, что в отличие от всех остальных методов, при мечении с термически активированным тритием для мечения используется само исход-

ное соединение, а не его производные, которые предварительно нужно синтезировать.

Недостатками метода являются небольшой выход реакции, возможность деградации исходных соединений. Однако при тщательном выборе условий синтеза, можно увеличивать выход и уменьщить деградацию лабильных молекул.

§ 1.3. Методы мечения термически активированным тритием

Необходимо отметить, что в ИЯФ АН РУз исследования в области мечения термически активированным тритием были начаты в 1986 году. Были разработаны и созданы установки для мечения, которые были запатентованы в СССР [27]. За последние несколько десятилетий был накоплен огромный опыт в области мечения различных органических и биологически активных соединений. Была разработана методология, которая является основой данной диссертационной работы.

Метод мечения термически активированным тритием (каталитический или термоактивированный изотопный обмен) основан на активации молекул трития на раскаленной вольфрамовой спирали при температуре выше 1400^{o} С. Вольфрам является катализатором диссоциации молекул трития и активации атомов трития.

Основные реакции мечения термически активированным тритием:

Диссоциация молекул трития:

$^{3}H_2 \rightarrow 2^{3}H$ Eact = 225 кДж/моль

Температура активации на вольфраме T_W = 1500-2500°K

Давление $P(^{3}H_2)$ = 0,5-3 Па

Изотопное замещение $^{1}H \leftrightarrow {}^{3}H$:

$^{3}H + RH \rightarrow R\bullet + {}^{3}HH$ Eact = 20-50 кДж/моль (0,25-0,5 эВ)

$R\bullet + {}^{3}H \rightarrow R^{3}H$ Eact ~ 0

Изотопная модификация — замещение водорода тритием — процесс неселективный (в отличие от химической модификации), он может протекать

в любых водородсодержащих частях молекулы, и поэтому практически вся ее поверхность оказывается помеченной [28; с.175]. Необходимо отметить, что при мечении термически активированным тритием всегда присутствует три мощных повреждающих фактора:

а) мощный тепловой поток от вольфрамовой спирали, разогретой до ≈ 1500-1700 ºС (горячие атомы трития образуются в результате термической диссоциации газообразного молекулярного трития T_2 на нагретой до 1700 ºС металлической поверхности). Этот тепловой поток частично нейтрализуется термостатированием реакционной колбы в жидком азоте (при температуре – 196 ºС). [29; с.825-841]

в) мощный световой поток от разогретой вольфрамовой спирали, который способен разрушать фотолабильные органические вещества. Разрушающий эффект светового потока частично регулируется временем засветки (нагрева спирали).[30; с.28, 31; с.476]

с) сама реакция замещения водорода термически активированными атомами трития.

Влияние этих факторов увеличивают деструкцию органического вещества-мишени и могут сильно уменьшать выход целевого меченого продукта реакции. Поэтому, несмотря на то, что метод используется уже несколько десятилетий, для каждого отдельного органического вещества необходимо модернизировать методику мечения, подбирая оптимальные условия мечения индивидуально для каждого соединения с учетом физико-химических свойств вещества

На практике, мечение термически активированным тритием осуществляется кратковременными циклами, включающими в себя заполнение системы газообразным тритием, кратковременной (как правило, от 10 до 30 секунд) активацией трития на разогретой вольфрамовой спирали, и откачиванием отработанного трития из системы. Все процедуры проходят при термостатировании реакционной колбы жидким азотом, чтобы максимально сни-

зить температурное воздействие на органическое вещество мишени [32; с.348-354, 33; с.38, 34; с.104].

Подбор оптимальных условий мечения заключается в определении оптимального количества циклов мечения, при котором достигается максимально возможная удельная активность вещества и достаточно низкий процент деструкции этого вещества. Это соотношение подбирается эмпирическим путем – после каждого цикла аликвота вещества отбирается на очистку и определяется процент деструкции и удельная активность вещества [35; с.232, 36; с.33, 37; с.7, 38; с.146-150].

Помимо эффекта деструкции метод мечения термически активированным тритием имеет одну специфическую особенность – реакционноспособные «горячие» атомы трития проникают в вещество мишени на очень небольшую глубину – 0,5-2 ангстрема. То есть реакция взаимодействия активированных атомов трития происходит в тонком поверхностном слое, после которого атомы теряют энергию активации и не способны вступать в реакцию замещения. Исходя из этого, для повышения удельной активности меченого вещества применяется ряд технических приемов и трития методов, увеличивающих площадь вещества-мишени, доступную для реакционноспособных активированных атомов трития. Одним из таких приемов является перерастворение лиофизированного вещества-мишени и повторная лиофилизация. Этот прием позволяет перемешать метящееся вещество и экспонировать на поверхность молекулы, ранее находящиеся в слое высушенной мишени. Этот прием также позволяет дополнительно очистить вещество мишени от тритиевой воды (постоянно образующейся при мечении термически активированным тритием) и от лабильного трития, слабо связанного с молекулами метящегося вещества. Очистка происходит за счет обмена тритием молекул вещества с растворителем и дальнейшего удаления растворителя с тритиевой водой при лиофилизации вещества-мишени [39; с.32-35].

Метод позволяет получить свободные от лабильного трития меченые препараты с использованием исходного вещества, без синтеза промежуточных соединений.

§ 1.4. Методы очистки меченых соединений

Во время мечения органических соединений термически активированным тритием, под влиянием высокой температуры и сильного светого излучения происходит их деструкция.Для очистки целевого меченого соединения от продуктов деструкции использовались различные методы.

При получении меченных термически активированным тритием органических соединений происходит частичная деструкция исходного вещества. Поэтому после этапа мечения всегда необходимо проводить этап очистки меченого вещества. Для очистки меченных тритием органических соединений используются различные методы – ВЭЖХ [[40; с.279-283, 41; с.704, 42; с.38-43], гель-фильтрацию [43; с.256, 44; с.792-797], тонкослойная хроматография (ТСХ) [45; с.1074-1080, 46; с.125-134, 47; с.481-485, 48; с.932-937]. В данной работе был использован метод ТСХ для очистки меченных тритием органических веществ от продуктов деструкции.

Тонкослойная хроматография

Для очистки меченных тритием органических соединений от лабильного трития и продуктов деструкции необходимо использовать эффективный метод, позволяющий получить хорошо очищенное вещество. При этом метод должен быть относительно недорогим и с минимальными радиоактивными отходами. Исходя из этого, нами был выбран метод тонкослойной хроматографии. Этот метод широко используется в очистке и анализе меченных соедиений [49; с.616, 50; с.25-27].

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – это один из вариантов хроматографии, основанный на различии в скорости перемещения компонентов смеси в плоском тонком слое (толщина 0,1-0,5 мм) сорбента при их движении в потоке подвижной фазы (элюента). Последняя представляет собой, как пра-

вило, жидкость, однако осуществлен и газовый вариант ТСХ. В качестве сорбентов используют мелкозернистые силикагель, Al_2O_3, целлюлозу, крахмал, полиамид, иониты и др. Суспензиями этих сорбентов покрывают пластинки из стекла, фольги или пластика; для закрепления слоя применяют крахмал, гипс или другие связующие вещества. В продаже имеются готовые пластинки с уже закрепленным слоем сорбента. Элюентами служат обычно смеси органических растворителей, водных растворов кислот, солей, комплексообразующих и других веществ. В зависимости от выбора хроматографической. системы (состава подвижной и неподвижной фаз) в разделении веществ основную роль могут играть процессы адсорбции, экстракции, ионного обмена, комплексообразования. На практике часто реализуются одновременно несколько механизмов разделения [49; с.616].

Для очистки меченных тритием органических соединений можно успешно применять ТСХ на силикагеле. Такая очистка позволяет получить достаточно чистое меченное тритием вещество, не содержащее побочных продуктов [51; с.483-489].

Выбор метода тонкослойной хроматографии для очистки меченных тритием низкомолекулярных органических соединений обусловлен следующими причинами: 1) использование других методов хроматографии, как например, ВЭЖХ и гель-фильтрация связан с постоянным загрязнением колонок и возможным повышением фона, при этом при постоянной очистке колонок образуются большие объемы радиоактивных отходов. Все это приводит к необходимости частой замены колонок, что сильно увеличивает расходы на исследования. 2) тонкослойная хроматография в большинстве случаев позволяет отделять меченое вещество от продуктов деструкции с высокой степенью чистоты. Кроме того, метод занимает достаточно мало времени и требуется небольшой расход реактивов. Важным фактором является то, что метод тонкослойной хроматографии не только проводить аналитическую оценку, но и в препаративном варианте позволяет очищать большие количе-

ства меченного тритием вещества. [38; с.146-150, 52; с.230-232, 53; с.24, 54; с.9, 55; с.44].

Необходимо отметить, что значение Rf в используемой системе является показателем идентичности меченого и исходного фармакологического препаратов. Таким образом, помимо очистки меченных тритием фармакологических препаратов можно также, хоть и косвенно, оценить идентичность полученных препаратов с исходными веществами.

УФ-спектрофотометрия

Другим, уже прямым, методом определения идентичности меченого и исходного фармакологического препаратов является УФ-спектрофотометрия. Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области успешно используется как для идентификации и количественного определения, так и в испытаниях на чистоту [56; с.176, 57; с.478].

Применение ультрафиолетовой спектрофотометрии для проверки доброкачественности фармакопейных препаратов является наиболее ценным в случаях, когда примеси или продукты разложения поглощают в области, отличной от исследуемого вещества.

Определение УФ спектра фармакологического вещества является важным методом в фармакологии для анализа идентичности и чистоты фармакологического вещества, а также для анализа этих веществ в сложных составах фармакологических препаратов. Кроме того, УФ-спектрофотометрия часто применяется в анализе для определения концентраций фармакологических веществ в биологических образцах – крови, плазме, сыворотке, лимфатической жидкости и т.д. [58; с.24, 59; с.302, 60; с.74, 61; с ,62; с.160-170, 63; с.113-117, 64; с.541-544]

§ 1.5. Характеристики фармакологических препаратов

Изониазид – это хорошо известный противотуберкулезный препарат.

Синонимы: INH, INAH, изониазидиум, гидразид изоникотиновой кислоты, тубазид. В настоящее время изониазид относится к так называемым

препаратам первой линии (то есть основным препаратам для лечения туберкулеза)[65; с.432]. Поэтому изониазид является на сегодняшний день одним из основных хорошо изученных противотуберкулезных препаратов. Он применяется в качестве противотуберкулезного средства с высокой бактериостатической активностью в отношении микробактерий туберкулеза различной формы и локализации. [66; с.463, 67; с.167–169.]

Химическая формула: $C_6H_7N_3O$. Молекулярная масса: 137,14

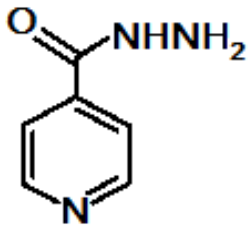


Рис. 1.1. Структурная формула изониазида

Свойства: белый кристаллический порошок без запаха, горького вкуса. Растворим в воде (при 20 °С 1:17, при 80 °С 1:1), в этиловом спирте (при 20 °С 1:10, при 70 °С 1:1), трудно растворим в 95% этиловом спирте, очень мало растворим в хлороформе, практически не растворим в диэтиловом эфире. Температура плавления 170-174 °С.

Этамбутол – также как и изониазид, относится к так называемым препаратам первой линии и является на сегодняшний день одним из основных хорошо изученных противотуберкулезных препаратов. [68; с.47-49, 69; с.82, 70; с.8-10].

Химическая формула:

$C_2H_5CH(CH_2OH)$-$NHCH_2CH_2NH$-$CH(CH_2OH)C_2H_5$ * 2HC1,

Молекулярнаямасса: 277,23

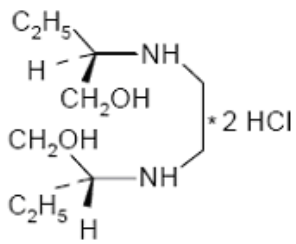


Рис. 1.2. Структурная формула этамбутола

Свойства: Этамбутола — белый кристаллический порошок. Без запаха или почти без запаха, с горьким вкусом.

Легко растворим в воде, растворим 1:1 в воде, 1:4 в спирте, 1:850 в хлороформе и 1:9 в метиловом спирте. Очень слабо растворим в эфире.

Температура плавления 198,5-200,3 °С.

Преднизолон– гормональное средство (глюкокортикоид для системного и местного применения). Является дегидрированным аналогом гидрокортизона.

Преднизолон относится к классу стероидных соединений Химическое название преднизолона: прегнадиен-1,4-триол- 11β,17α,21-дион 3,20 или 1-дегидрогидрокортизон. [71; с.70, 72;с. 478]

Химическая формула: $C_{21}H_{28}O_5$, Молекулярная масса 360,4.

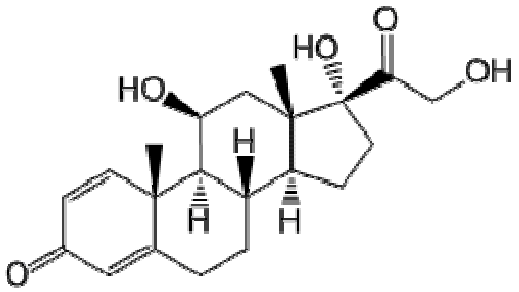


Рис.1.3. Структурная формула преднизолона

Свойства: Белый или белый со слабым желтоватым оттенком кристаллический порошок.

Вкус, запах, гигроскопичность: гигроскопичный.запах: без запаха Растворимость- ацетон: трудно растворим, вода: трудно растворим, диоксан: трудно растворим, метанол: растворим, хлороформ: мало растворим, этанол: растворим Температура плавления: 229°С, при плавлении разлагается.

Дротаверина гидрохлорид (Но-шпа) – это фармакологический препарат, широко используемый в медицине в качестве спазмолитического и болеутоляющего средства. [73; с.126,74; с.183-185]

Химическая формула $C_{24}H_{31}NO_4 \cdot HCl$. Молекулярная масса 433,97

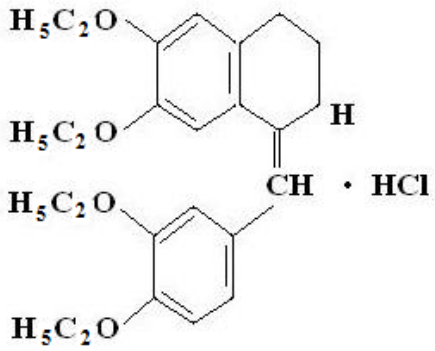


Рис. 1.4. Структурная формула 1-(3,4-диэтоксибензилиден)-6,7-диэтокси–1,2,3,4-тетрагидроизохинолина гидрохлорида

Свойства: Дротаверина гидрохлорид - светло-желтый или зеленовато-желтый кристаллический порошок. Легко растворим в хлороформе, растворим в этиловом спирте 95% и в 1,0 н водном растворе соляной кислоты, умеренно растворим в воде.

Температура плавления 209-211 °С.

Фуросемид (4-хлор-N-(2-фурилметил)-5-сульфамоилантраниловая кислота) - это фармакологический препарат, широко используемый в качестве мочегонного средства. Фуросемид представляет собой белый кристаллический порошок, нерастворимый в воде. По химическому строению (наличие атома хлора и сульфонамидной группы при фенильном ядре) имеет элементы сходства с дихлотиазидом и близкими к нему соединениями [75; с.753-769**,** 76; с.32-36,77; с. 1082 - 1086].

Химическая формула: $C_{12}H_{11}O_5N_2SCl$. Молекулярная масса: 330,5

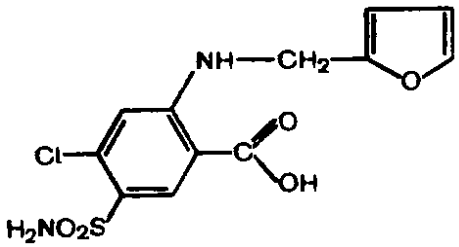


Рис. 1.5. Структурная формула фуросемида

Свойства: Кристаллический порошок белого или почти белого цвета.

Практически не растворимый в воде, растворимый в ацетоне, умеренно растворимый в 96% спирте, мало растворимый в эфире, практически не растворимый в метиленхлориде. Трудно растворим в этаноле, свободно растворим в разбавленных растворах щелочей и нерастворим в разбавленных растворах кислот.

§ 1.6. Связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови

Связывание с белками крови

Многие лекарственные вещества обладают выраженным физико-химическим сродством к макромолекулам, в связи с чем, попав в кровь или лимфу, они связываются с белками. Это имеет существенное значение, поскольку только свободная фракция вещества фармакологически активна. Она способна проникать через клеточные мембраны, влиять на специфические мишени, подвергаться превращениям под влиянием ферментов или экскретироваться из организма.

Свободная и связанная фракции находятся в равновесии: в связанном виде вещество циркулирует в крови до тех пор, пока концентрация свободной фракции не снизится вследствие тех или иных процессов, после чего происходит высвобождение его части, что обеспечивает стабильность плазменной концентрации. Иными словами, связавшись с белками крови, препарат образует депо [78].

Связывание с белками приобретает клиническое значение тогда, когда оно превышает 80-90%. Так, уменьшение связи с белками с 98% до 96% способно увеличить свободную фракцию на 100%, что чревато развитием передозировки. Такая ситуация может развиться при различных физиологических и патологических состояниях, при которых уменьшается количество белка в крови (например, новорожденные и особенно недоношенные, пожилые люди, истощенные больные, пациенты с нарушенной белковосинтетической функцией). Так, для значительного увеличения свободной фракции фенитоина

[дифенина] достаточно снижения сывороточного альбумина до 30 г/л (нижняя граница нормы – 33 г/л); этот эффект у фуросемида [лазикса] становится значимым при снижении альбумина до 20 г/л [79].

Важно подчеркнуть, что изменения фракции, связанной с белком, в патологических условиях могут протекать в обе стороны. Например, у хинидина этот показатель, составляющий в норме 87-92%, при застойной сердечной недостаточности снижается до 82%, а при хронической дыхательной недостаточности возрастает до 96%. При инфаркте миокарда происходит повышение 1-кислого гликопротеина, что способствуетα усиленному связыванию верапамила [изоптина, финоптина], дизопирамида [ритмодана], лидокаина, хинидина и др. и в результате с 5 по 12 день болезни отношение связанного и свободного дизопирамида возрастает в 3 раза. Увеличение уровня белка в крови, например, при онкологических заболеваниях может уменьшать величину свободной фракции препарата, в связи с чем его эффект будет снижаться [80].

Связывание с белками крови становится клинически важным параметром при острых и хронических тяжелых патологических состояниях, особенно у детей, поскольку при этих состояниях важно достичь не только оптимальной фармакологической нагрузки, но при этом по возможности избежать фармакологической перегрузки организма.

Среди белков крови наибольшую роль в образовании комплексов с лекарствами играет альбумин (который связывает салицилаты, пенициллины, сульфониламиды и многие др., главным образом, слабые кислоты). Однако в этом процессе участвуют и другие компоненты крови – глобулины, липопротеиды, 1-кислый гликопротеид и даже форменные α элементы. При этом некоторые вещества связываются одновременно с несколькими структурами. Например, хлорпромазин [аминазин] связывается с липопротеидами и эритроцитами, трициклический антидепрессант имипрамин [мелипрамин] 1-кислымαи хинидин – с липопротеидами, гликопротеидом и эритроцитами [81].

Физико-химические свойства и функции альбумина

Впервые альбумин был выделен и идентифицирован из белковых фракций крови путем электрофореза в 1937 году Arne Tiselias. За истекший период времени эти хорошо растворимые глобулярные белки достаточно глубоко изучены физиками, химиками, генетиками, клиницистами, однако окончательно полного представления об их структуре и функциональных возможностях пока нет [82].

Сывороточный альбумин представляет собой белок, образованный длинной полипептидной цепью, состоящей из 582 аминокислотных остатков, тридцать три из которых – остатки цистеина. Молекула альбумина содержит 9 дважды сложенных фрагментов и 17 дисульфидных связей [82]. Вторичная и третичная структура этого белка изучены пока недостаточно, однако современные представления о трехдоменной структурной организации альбумина позволяют предположить наличие у него гибкой структуры, что и обеспечивает его широкие возможности связывания и транспорта различных как высоко-, так и низкомолекулярных метаболитов. Показано, что альбумин обладает гетерогенностью, обусловленной не только генетически, но и постсинтетическими трансформациями структуры белка, в том числе – изменений его физико-химических свойств в процессе функционирования. Альбумин гетерогенен в отношении содержания сульфидных (SH-) групп, поэтому одну из фракций именуют меркаптоальбумином, а другую – немеркаптоальбумином. Кроме того, обнаруживается и микрогетерогенность, вызванная как характером, так и количеством молекул агрегированных с альбумином веществ [82].

Альбумин – это единственный белок крови, не содержащий углеводных остатков. Его молекулярная масса составляет 66700 ± 400 Да, а концентрация в плазме крови здоровых людей – около 40 г/л. Период полужизни альбумина в кровяном русле - 19-20 суток [82].

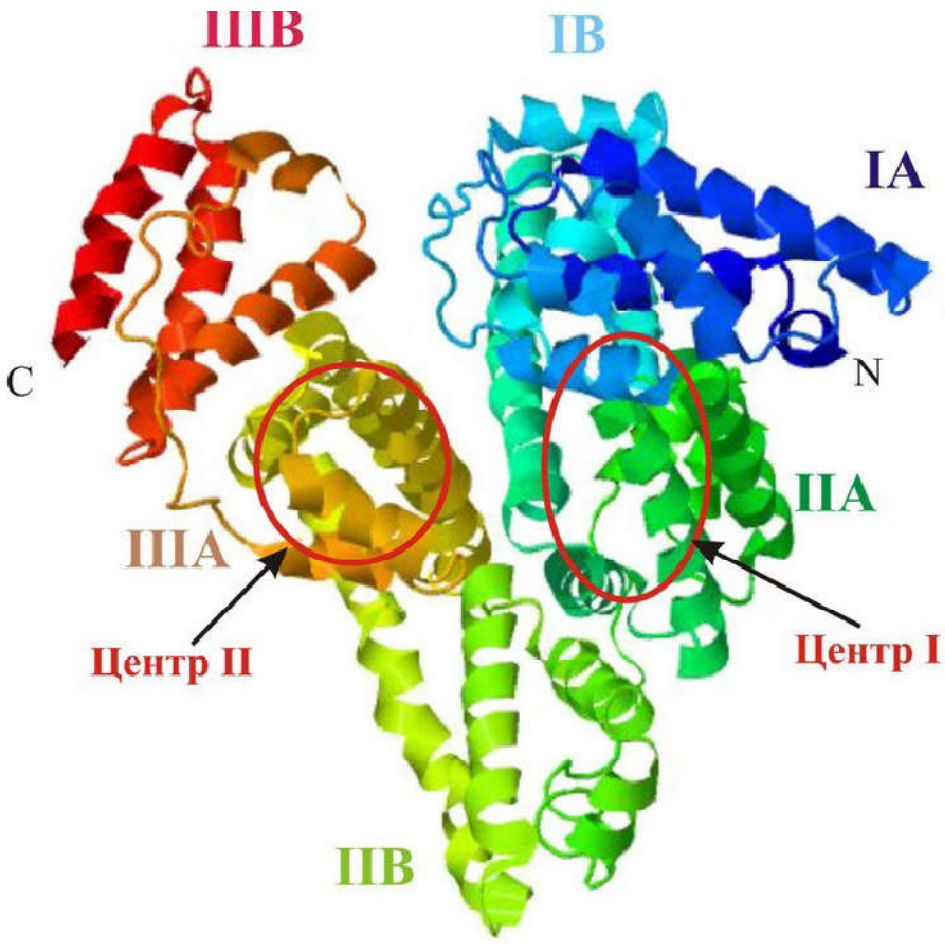


Рис. 1.6. Структура сывороточного альбумина человека (PDB код: 1bm0). На рисунке обозначено подразделение альбумина на домены (I-III) и субдомены (A и B), а также примерная локализация центров I и II по Sudlow[83, 84; с.439-446]

На сегодняшний день достоверно установлено, что альбумин выполняет в организме транспортную функцию по переносу множества амфифильных метаболитов (жирные кислоты, билирубин), лекарственных препаратов, компонентов эндо и экзотоксемии, обеспечивает поддержание 80 % собственно онкотического давления крови [85]. Альбумин является важным компонентом антиоксидантной защиты организма, обрывая цепи свободнорадикальных реакций и активно взаимодействуя с гидроксильными радикалами. Нарушение транспортной функции альбумина, вызванное эндотоксикозом, может привести к тяжелым последствиям. Поэтому определение концентраций общего белка и альбумина крови является обязательным в алгоритме

клинико-биохимических исследований. Однако, как показывает практика, нормальное содержание альбумина далеко не всегда означает его нормальное функционирование, так как существует множество факторов (pH, температурный градиент, дилюция, характер экзо- и эндотоксических лигандов и др.), вызывающих нарушение конформации белковой молекулы с изменением ее свойств и функций [85].

Сывороточный альбумин, помимо поддержания осмотического давления крови и белкового резерва организма, выполняют важную функцию, осуществляя транспорт эндогенных и экзогенных субстанций [86; с.183, 87;с.432]. В основе транспортной функции альбумина лежит способность к обратимому связыванию лигандов различной химической структуры, таких как биологически активные вещества [88; с.1118-1122], жирные кислоты [89; с.730-739, 90; с.300-307], неорганические ионы [91; с.1317-1321], а также лекарственные вещества (ЛВ) и их метаболиты [92; с.393-399, 93; с. 38-52, 94;с.1015-1019, 95; с.77-87]. Благодаря связыванию повышается растворимость лигандов в плазме крови, снижается их токсичность, осуществляется защита связанных соединений от ферментативной и окислительной деградации. Вместе с тем, связывание ЛВ с альбумином вносит существенный вклад в фармакокинетику лекарств, оказывая влияние на параметрыих распределения и элиминации. В связи с этим молекулярные аспекты лиганд альбуминовых взаимодействий неизменно находятся в поле зрения специалистов, занимающихся проблемами фармакокинетики, лекарственных взаимодействий, а также разработкой новых лекарственных препаратов [96; с.41-49]

Сывороточный альбумин человека (САЧ) — это глобулярный белок с молекулярной массой около 66 килодальтон. Главным местом синтеза САЧ в организме является печень, где одна молекула этого белка синтезируется примерно за 20 минут, а в сутки около 10-15 грамм альбумина. В плазме крови концентрация САЧ около 35-50 г/л, что составляет 47-62%отвсех белков плазмы, в 1 литре лимфы содержится 15-36 г альбумина, в межклеточной жидкости – 3 г/л, вликворе - 0.3 г/л [97; с.226].

Альбумин - важнейший транспортный белок. Он транспортирует свободные жирные кислоты, неконъюгированный билирубин, Ca^{2+}, Cu^{2+}, триптофан, тироксин и трийодтиронин. Многие лекарства (аспирин, дикумарол, сульфаниламиды) связываются в крови с альбумином. Этот факт необходимо учитывать при лечении заболеваний, сопровождающихся гипоальбуминемией, так как в этих случаях повышается концентрация свободного лекарства в крови. Кроме того, следует помнить, что некоторые лекарства могут конкурировать за центры связывания в молекуле альбумина с билирубином и между собой [98, 99; с.214]

Альбумин составляет более половины массы белков плазмы крови и выполняет множество разнообразных функций. Одна из важнейших функций альбумина - связывание низкомолекулярных метаболитов и токсинов и доставка их в печень. Эта транспортная функция альбумина снижается при нарушениях синтеза альбумина, когда его становится меньше, или при изменении его структуры. Однако гораздо чаще транспортная функция альбумина нарушается при нормальном его уровне в плазме. Это происходит при многих заболеваниях, когда развитие печеночной и почечной недостаточности приводит к резкому росту концентрации метаболитов и токсинов в кровии блокированию связывающих центров альбумина. В этих условиях способность альбумина связывать такие вещества снижается - иногда более чем в 10 раз [99; с.214].

§ 1.6.1. Связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови и фармакокинетические свойства

Изониазид

Изониазид хорошо абсорбируется из желудочно-кишечного тракта (прием во время еды снижает всасывание), может подвергаться значительной биотрансформации при «первом прохождении» через печень. C_{max} изониазида достигается через 1–3 ч и при приеме 300 мг составляет 3–7 мкг/мл, эффективная концентрация сохраняется в течение 6–24 ч после перорального

приема. Связывание изониазида с белками плазмы очень низкое - до 10% [100].

Этамбутол

Этамбутол, также как и изониазид, относится к так называемым препаратам первой линии и является на сегодняшний день одним из основных хорошо изученных противотуберкулезных препаратов. После приема внутрь всасывается 75–80%. Связывание с белками плазмы — 20–30%. C_{max} достигается через 2–4 ч и составляет при приеме дозы 25 мг/кг 2–5 мкг/мл; через 24 ч концентрация в плазме составляет менее 1 мкг/мл (уменьшается до неопределяемого уровня у пациентов с ненарушенной функцией почек) [101].

Преднизолон

После приема внутрь быстро и хорошо абсорбируется из ЖКТ. В плазме 70–90% находится в связанном виде: с транскортином (кортикостероид-связывающий альфа$_1$-глобулин) и альбумином. T_{max} при приеме внутрь составляет 1–1,5 ч. Биотрансформируется путем окисления преимущественно в печени, а также в почках, тонкой кишке, бронхах. Окисленные формы глюкуронизируются или сульфатируются. $T_{1/2}$ из плазмы — 2–4 ч, из тканей — 18–36 ч. Проходит через плацентарный барьер, менее 1% дозы проникает в грудное молоко. Выводится почками, 20% — в неизмененном виде [102].

Дротаверин

Дротаверин быстро и полностью абсорбируется после парентерального введения. Он в значительной степени (95-98%) связывается с белками плазмы крови человека, особенно с альбумином, гамма- и бета-глобулинами. После первичного метаболизма 65% введенной дозы поступает в кровоток в неизмененном виде. Метаболизируется в печени. Полупериод биологического существования составляет 8-10 часов. За 72 часа дротаверин практически полностью выводится из организма, более 50% выводится с мочой и приблизительно 30% – с калом. В основном дротаверин выводится в форме метаболитов, в неизмененной форме в моче не определяется [103].

Фуросемид

Фуросемид — один из самых популярных современных диуретиков — известен с 1964 года и представляет собой сульфаниламидное соединение— производное антраниловой кислоты с метилфуриловым радикалом. Отличительной особенностью является быстро наступающее действие (3—4 минут после внутривенного введения), хотя продолжительность его сравнительно невелика. По силе действия он превосходит большинство других диуретиков.Связывание с белками плазмы составляет 96-98%. В печени подвергается биотрансформации с образованием неактивных метаболитов (в основном — глюкуронида). Связывание с белками плазмы снижается при печеночной недостаточности. Экскретируется на 88% почками и на 12% — с желчью [104].

Выводы к главе 1

Приведенный обзор литературы показывает, что для мечения органических соединений используются различные радионуклиды, но среди них мечение тритием выгодно отличается по многим параметрам.

Проанализированы работы, посвященные различным методам мечения тритием. Показано, что метод мечения термически активированным тритием имеет как свои недостатки, так и неоспоримые преимущества, что для мечения каждого отдельно взятого вещества необходимо проводить исследования по выбору оптимальных условий мечения: температуры, количество циклов, методик очистки меченого препарата.

Проведенный обзор показал, что для оценки связывающей способности белков крови самым удобным и точным методом является использование меченых соединений. Однако приведенные работы посвящены исследованию свойств белков с использованием какого-либо одного вещества. Недостаточно изучено влияние как собственной, так и внешней радиоактивности на влияние связывающей способности белков.

В связи с этим для мечения каждого отдельно взятого вещества необходимо разработать отдельную методику. Исследование связывающей способности белков необходимо проводить комплексно, с использованием не-

скольких препаратов с различными свойствами, изучать влияние радиоактивности, различных заболеваний, пола и возраста пациента, что и определено основной задачей данной диссертации.

II. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТЕРМИЧЕСКИ АКТИВИРОВАННЫМ ТРИТИЕМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Методы исследования, реактивы, аппаратура

Методы исследования - метод мечения термически активированным тритием, тонкослойная хроматография, авторадиография, жидкостно-сцинтилляционный счет.

Аппаратура - установка для мечения термически активированным тритием, жидкостно-сцинтилляционный счетчик РЖС-05.

Реактивы – NaCl, NaOH, Трис, PPO (дифенил оксазол - о.с.ч. «Реахим») POPOP (1,4-Ди -2-(5-фенил) оксазолил бензол - о.с.ч. «Реахим»), пара-терфенил - о.с.ч. «Реахим», пластини с силикагелем Silufol («Kavalier», Чехословакия), Sephadex G-25 («Sigma-Aldrich», США), толуол - о.с.ч. «Реахим»,аммиак концентрированный (25%), ацетон, метанол, этанол, изопропанол, ацетон, этилацетат, хлороформ, изониазид, этамбутол, преднизолон, дротаверин и фуросемид (фармакологической чистоты).

§ 2.1. Мечение фармакологических препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона

При проведении мечения методом термической активации трития значительная часть вещества разрушается; с увеличением продолжительности проведения реакции и при повышении температуры спирали, обеспечивающей термическую активацию трития, растет доля образующихся побочных продуктов. Поэтому в целях получения высокой удельной радиоактивности при сохранении разумного радиохимического и химического выхода требуется проведение ряда последовательных реакций мечения с варьирующими параметрами с определением промежуточного радиохимического и химического выхода. Для определения оптимального режима мечения требуется проведение целого ряда экспериментов.

Сама процедура мечения термически активированным тритием проводилась в реакционной колбе, показанной на рисунке 2.1.

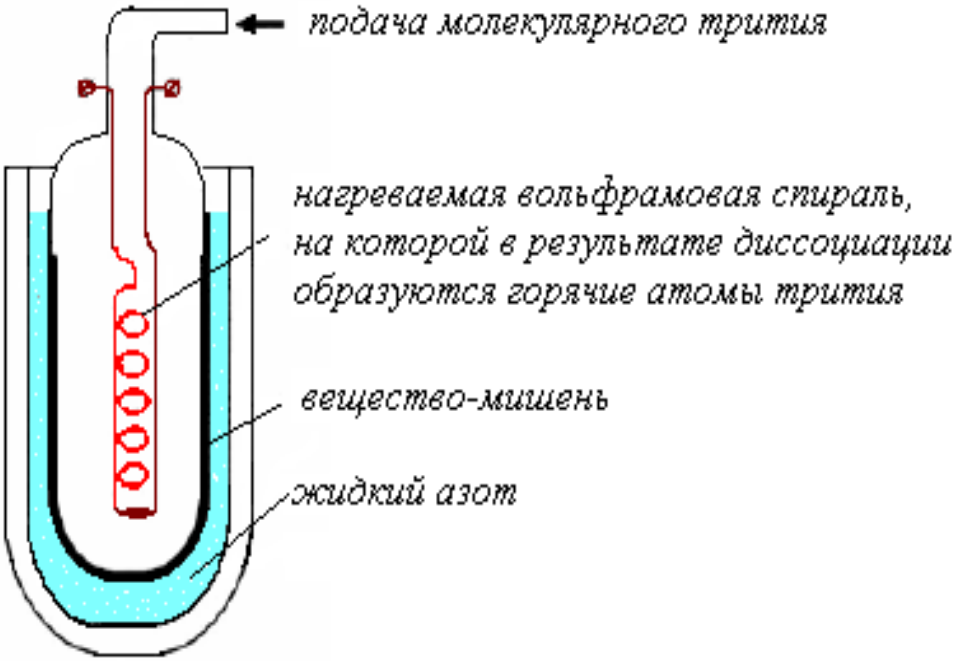


Рис. 2.1. Принципиальная схема реакционной колбы для мечения термически активированным тритием

Как показано на рисунке 2.1., молекулярный тритий подается в реакционную колбу, где на вольфрамовой спирали при температуре 1700 ºС происходит каталитическая активация молекул трития с получением термически активированных реакционноспособных атомов трития [105; с.178-181, 106; с.14-20]. Само мечение органического вещества-мишени, нанесенного на стенках реакционной колбы, происходит за счет прямого замещения водорода на атомы термически активированного трития [107; с.131-135, 108; с.264-268, 109; с.503, 110; с.90]. С углеводородами, например, включение метки протекает в две стадии: сначала горячий атом трития отрывает атом водорода от молекулы-мишени

$$T^* + RH \rightarrow R^{\bullet} + HT,$$

а затем образовавшийся свободный радикал R рекомбинирует с холодным атомом трития

$$T^* + R^{\bullet} \rightarrow RT.$$

Для включения метки важно, чтобы радикал «дожил» до встречи с атомом трития и тот заместил бы именно оторвавшийся водород. Это достигает-

ся охлаждением мишени до температуры жидкого азота 77К, при которой радикалы практически неподвижны, а атомарный холодный тритий свободно диффундирует по всему объему.

Мечение термически активированным тритием осуществляли кратковременными циклами, включающими в себя заполнение системы газообразным тритием, кратковременной (10 секунд) активацией трития на разогретой вольфрамовой спирали, и откачиванием оставщегося трития из системы (см. рисунок 2.1). Все процедуры проходили при термостатировании реакционной колбы жидким азотом, чтобы максимально снизить температурное воздействие на органическое вещество мишени [32; с.348-354, 33; с.38, 34; с.104].

Подбор оптимальных условий мечения заключался в определении оптимального количества циклов мечения, при котором достигается максимально возможная удельная активность вещества и достаточно низкий процент деструкции этого вещества. Это соотношение подбирали эмпирическим путем – после каждого цикла отбирали аликвоту вещества на очистку и определяли процент деструкции и удельную активность вещества [35; с.232, 36; с.33, 37; с.7, 38; с.146-150].

Помимо эффекта деструкции метод мечения термически активированным тритием имеет одну специфическую особенность – реакционноспособные «горячие» атомы трития проникают в вещество мишени на очень небольшую глубину – 0,5-2 ангстрема. То есть реакция взаимодействия активированных атомов трития происходит в тонком поверхностном слое, после которого атомы теряют энергию активации и не способны вступать в реакцию замещения. Исходя из этого, для повышения удельной активности меченого вещества применяется ряд технических приемов и методов, увеличивающих площадь вещества-мишени, доступную для реакционноспособных активированных атомов трития. Одним из таких приемов является перерастворение лиофизированного вещества-мишени и повторная лиофилизация. Этот прием позволяет перемешивать метящееся вещество и экспонировать на поверхность молекулы, ранее находящиеся в слое высушенной мишени. Этот прием

также позволяет дополнительно очистить вещество мишени от тритиевой воды (постоянно образующейся при мечении термически активированным тритием) и от лабильного трития, слабо связанного с молекулами метящегося вещества. Очистка происходит за счет обмена тритием молекул вещества с растворителем и дальнейшего удаления растворителя с тритиевой водой при лиофилизации вещества-мишени [39; с.32-35].

Метод позволяет получить свободные от лабильного трития меченые препараты с использованием исходного вещества, без синтеза промежуточных соединений.

§ 2.2. Методика мечения термически активированным тритием фармакологического препарата изониазида, этамбутола и преднизолона

Фармакологические препараты метили термически активированным тритием на установке, разработанной в Институте Ядерной Физики [27]. Нами был подобран оптимальный режим мечения.

Процедура мечения включает в себя растворение 50 мг препарата в спирте (изониазид и этамбутол растворяли метаноле, преднизолон в этаноле). Затем раствор наносили на внутреннюю поверхность реакционной колбы, покрытую силикагелем, и высушивали при комнатной температуре до полного удаления растворителя, 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 10 секунд с минутными перерывами между разогреванием спирали. Между циклами реакционную колбу размораживали, препарат растворяли соответствующим спиртом, отбирали аликвоту на измерение и снова высушивали. После окончания мечения препарат растворяли спиртом, снимали со стенок реакционной колбы многократным ополаскиванием колбы небольшими порциями спирта. Полученный раствор высушивали до полного удаления растворителя, затем снова растворяли и повторно высушивали для удаления несвязавшего-

ся и лабильного трития. Нами было обнаружено изменение цвета препарата, что свидетельствует об интенсивной деструкции или трансформации вещества.

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) [111; с.89-95].

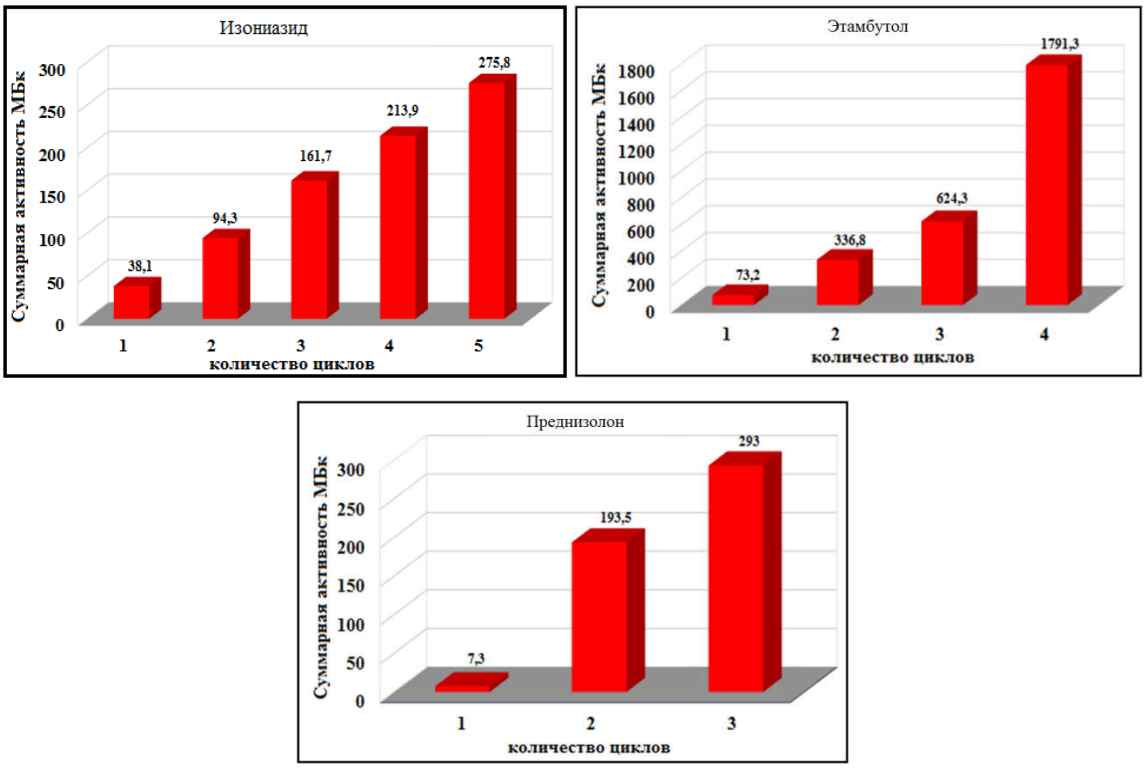


Рис. 2.2. Зависимость суммарной активности меченных тритием препаратов от длительности процедуры мечения.изониазид, этамбутол, преднизолон

Нами было обнаружено, что при увеличении количества циклов увеличивается суммарная активность препарата (рисунок 2.2). Также было обнаружено, что после определнного количества циклов за счет трансформации и/или деструкции исходного вещества снижается химический выход целевого меченого препарата. Исходя из этого количество циклов для изониозида составило - 5, этамбутола – 4, а для преднизолона – 3.

§ 2.3. Методика очистки меченых препаратов

Очистка меченных тритием соединений – это отдельная довольно сложная технологическая задача. Для этого нами была использована тонкослойная хроматография на силикагеле. Выбор этого метода обусловлен исходя из ряда причин.

Во-первых, при мечении органических соединений используются микроколичества исходного вещества. В связи с этим использование жидкостной хроматографии для очистки меченого препарата приводит к большим потерям синтезированного вещества и к большим объемам загрязненных тритием растворов, требующих захоронения. Использование ТСХ позволяет эффективно очищать небольшие количества органических соединений практически без потерь вещества и с небольшим количеством радиоактивных отходов.

Во-вторых, длительный опыт использования ТСХ для очистки меченных тритием препаратов показал высокую степень очистки для разных классов органических соединений.

И наконец, ТСХ является наиболее дешевым и простым в исполнении методом очистки, не требующим дорогостоящей аппаратуры и расходных материалов.

При разработке методики очистки нами было исследовано несколько систем ТСХ и выбрана система, позволяющая наиболее четко разделять пятна с оптимальным значением Rf.

Для очистки изониазида использовали смесь этилацетата, изопропанола, ацетона и концентрированного аммиака в различных соотношениях. В системе этилацетат : изопропанол: ацетон: аммиак концентрированный в соотношении (7: 1: 1: 1) Rf изониазида составлял 0,55 (рисунок 2.3).

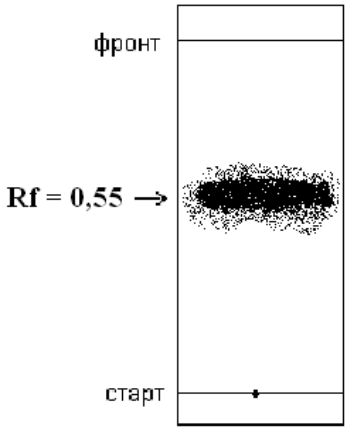


Рис. 2.3 - ТСХ хроматограмма изониазида этилацетат: изопропанол:ацетон:аммиак концентрированный, соотношение (7:1:1:1)

Как видно из рисунка в хроматограмме отсутствует линия фронта и пятно изониазида окружено неким ореолом, вероятно из побочных продуктов. Это показывает недостаточную эффективность очистки целевого продукта. Исследование ТСХ очистки изониазида показало, что наибольшее значение Rf (0,73) достигается при соотношениях (15 : 20: 2: 5) и (10 : 10: 5: 5) (таблица 2.1).

Таблица 2.1

Очистка меченого изониазида методом ТСХ в системе этилацет:изопропанол:ацетон:аммиак концентрированный

Соотношение растворителей	Значение Rf
(15 : 20: 2: 5)	0,73
(20 : 20: 5: 10)	0,71.
(10 : 10: 5: 5)	0,73.

Однако при соотношении растворителей (15 : 20: 2: 5) пятно изониазида более четко разделялась от линии фронта (рисунок 2.4).

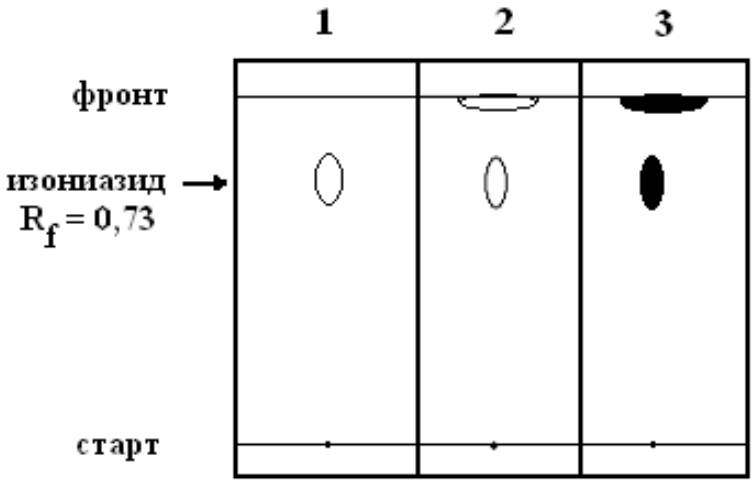


Рис. 2.4. ТСХ хроматограмма меченого препарата изониазида в системе этилацет: изопропанол: ацетон: аммиак концентрированный. 1 – немеченый препарат изониазида (контроль) (УФ визуализация), 2 – меченый препарат изониазида (УФ визуализация), 3- авторадиография меченого препарата изониазида

Визуализацию пятен проводили с помощью авторадиографии и УФ излучением.

На хроматограмме ТСХ обнаружили четко выделенную полосу побочных продуктов, которая продвигалась с фронтом растворителя.

На пластине вырезали участок с пятном изониазида, снимали с него силикагель и элюировали меченый изониазид метанолом. Кроме того, вырезали полосу старта и пятно с фронта хроматограммы. Фракции элюировали метанолом, высушивали и взвешивали. Радиоактивность фракций определяли жидкостно-сцинтилляционном счетом на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г РРО и 0,05 г РОРОР). Данные представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2

Счет радиоактивности фракций меченного тритием препарата изониазида после разделения тонкослойной хроматографией

Номер фракции	Вес фракции мг (% от общего веса = 50 мг)	Счет радиоактивности фракции в МБк (% от суммарной активности = 275,8 МБк)	Удельная активность МБк/ мг	Удельная молярная активность
Старт	6,7 мг 13,4%	9,3 МБк	1,39 МБк/мг	
Изониазид	20,7 мг 41,4%	70,7 МБк	3,41 МБк/мг	468,5 МБк/ммоль = 12,66 мКи/ммоль
Фронт	22,6 мг 45,2%	195,8 МБк	8,66 Бк/мг	

После очистки сделали контрольную ТСХ хроматограмму очищенного меченого тритием изониазида

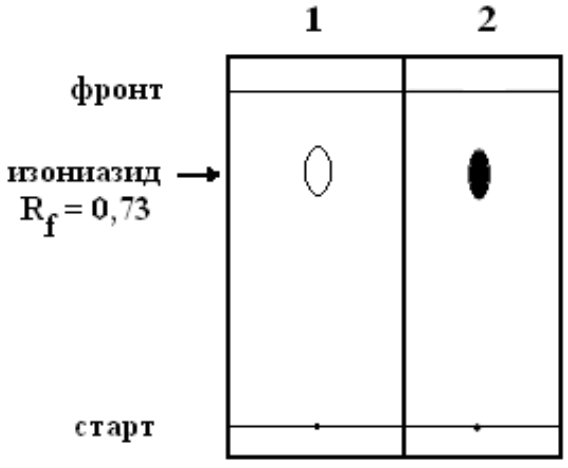


Рис. 2.5. ТСХ хроматограмма очищенного меченного тритием препарата изониазида в системе этилацет : изопропанол: ацетон: аммиак концентрированный. 1 – немеченый препарат изониазида (контроль) (детекция УФ), 2 – меченый препарат изониазида (авторадиография)

Как видно из рисунка 2.5, на контрольной хроматограмме ТСХ линия фронта отсутствует и получено чистое пятно изониазида.

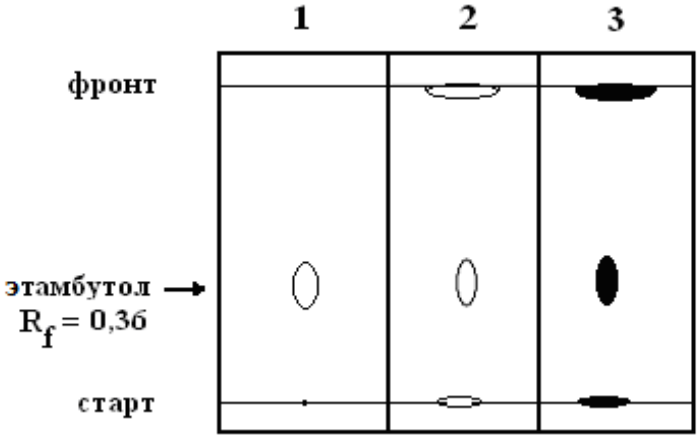
Таким же образом подбирали систему и для очистки других препаратов, состав которых приведен в таблице 2.3.

Таблица 2.3

Системы для очистки препаратов методм ТСХ

№	Препарат	Система	Rf
1	Изониазид	этилацетат:изопропанол:ацетон:аммиак конц. (15:20:2:5)	0,73
2	Этамбутол	этилацетат:метанол:ацетон:аммиак конц. (7:1:1:1)	0,36
3	Преднизолон	Хлороформ:этанол (9:1)	0,56

Хроматограммы ТСХ для очистки этамбутола и преднизолона приведены на рисунке 2.6.



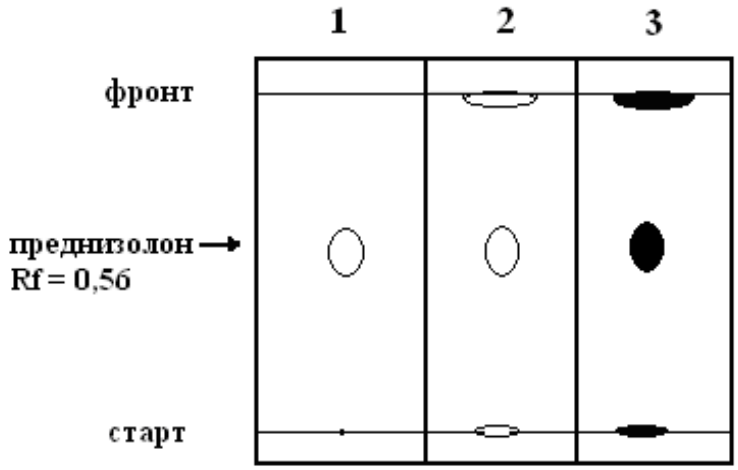


Рис. 2.6. Хроматограммы ТСХ очистки этамбутола и преднизолона в соответствующих системах (таблица 2.3). 1 – контроль, 2 – УФ визуализация, 3 – авторадиографическая визуализация пятен

Таким образом, разработана система очистки меченного тритием изониазида, этамбутола и преднизолона с использованием тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе этилацет : изопропанол: ацетон: аммиак концентрированный в соотношении (15:20:2:5) для изониазида, в соотношении (7:1:1:1) для этамбутола и в системе хлороформ:этанол (9:1) для преднизолона. Удельные весовые и молярные активности изониазида приведены в таблице 2.2, этамбутола и преднизолона в таблице 2.4.

Таблица 2.3

Счет радиоактивности фракций меченного тритием препарата этамбутола после разделения тонкослойной хроматографией

Номер фракции	Вес фракции (% от общего веса 50 мг)	Счет радиоактивности фракции в Бк	Удельная активность Бк/ мг	Удельная молярная активность
Этамбутол				
Старт	10,1 мг 20%	108,8 МБк	10,8 МБк/мг	--
Этамбутол	11,8 мг	69,0 МБк	5,85	1.621,85

	23,53%		МБк/мг	МБк/ммоль =43,83 мКи/ммоль
Фронт	28,1 мг 56,47%	1613,5 МБк	57,4 МБк/мг	--
Преднизолон				
Старт	15,1 мг 30,2 %	7,0 МБк	0,46 МБк/мг	-
Предни-золон	20,1 мг 40,2 %	16,7 МБк	0,83 МБк/мг	299,13 МБк/ммоль =8,09 мКи/ммоль
Фронт	14,8 мг 29,6%	269,3 МБк	18,19 МБк/мг	-

§ 2.3. Анализ меченых препаратов ультрафиолетовой спектрофотометрией

Полученные меченые препараты анализировали с использованием спектрофотометрии в ультрафиолетовой области. Навески исходного фармацевтического препарата и меченого препарата изониазида растворяли в метаноле. Оптическую плотность растворов исходного (немеченого) и меченного тритием изониазида измеряли на спектрофотометре SPECORD 210 (фирма SPECORD, Германия) при длине волны 267±2 нм [112; с.24] в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения растворитель – метанол (рисунок 2.7).

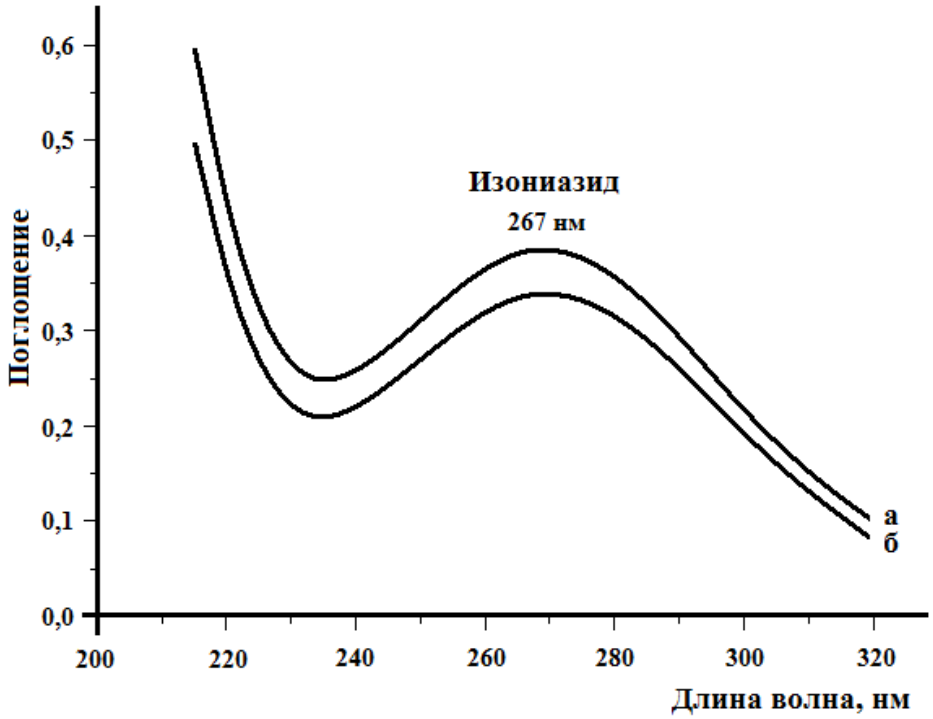


Рис. 2.7. УФ спектр изониазида в метиловом спирте. Максимум поглощения изониазида соответствует 267 нм. УФ спектр: (а) – исходный (немеченый), (б) – меченный тритием изониазид

Этамбутол гидрохлорид не поглощает ультрафиолетовый свет; однако он образует комплекс с ионами меди, с максимальным поглощением при 270 нм. Анализ этамбутола УФ спектрофотометрией проводили по методике, приведенной в работе [113; с.302].

Оптическую плотность растворов исходного и меченного тритием этамбутола измеряли на спектрофотометре при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения растворитель с ацетатом Cu (II) (рисунок 2.8).

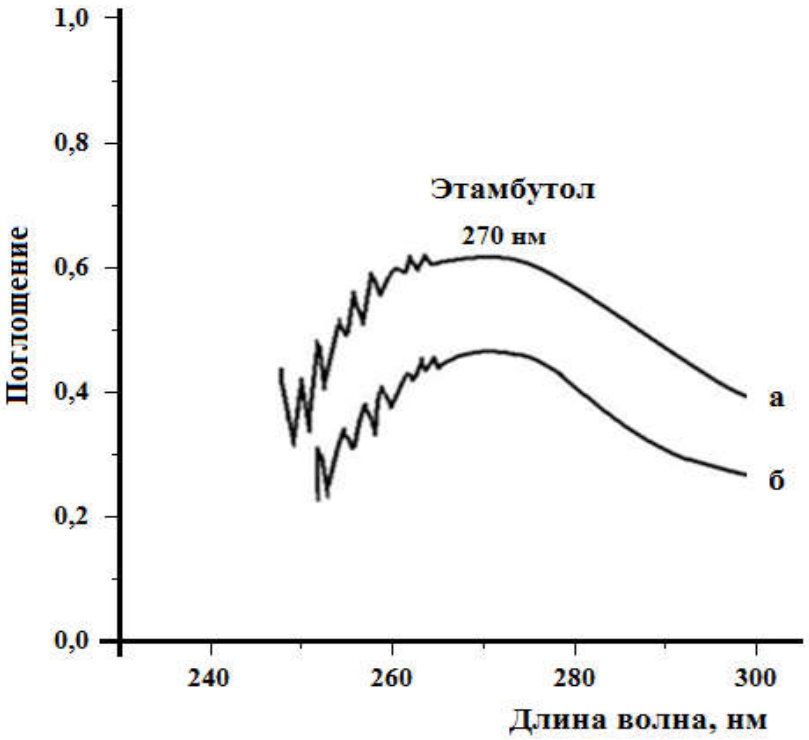


Рис. 2.8. УФ спектр комплекса этамбутола с ацетатом меди (II). (а) – исходный (немеченый), (б) – меченный тритием этамбутол

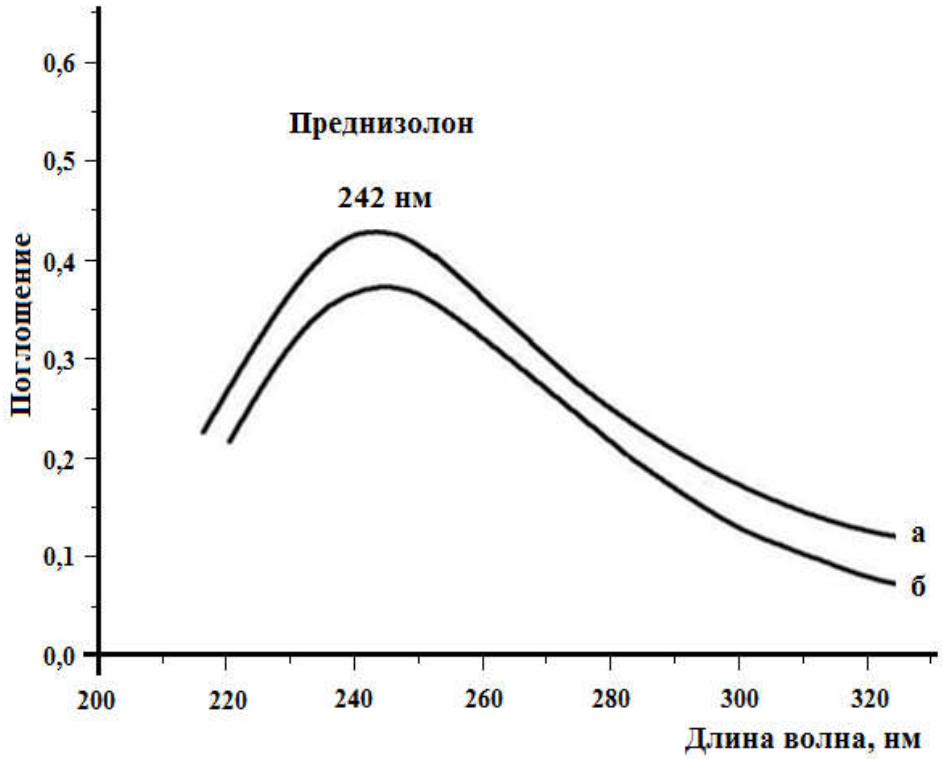


Рис. 2.9. УФ спектр исходного и меченого преднизолона в этиловом спирте. (а) – исходный, (б) – меченный тритием преднизолон

Для анализа преднизолона навески исходного и меченого препарата растворяли в этаноле. Оптическую плотность растворов измеряли на спек-

трофотометре при длине волны 242±2 нм [114; с.74], используя в качестве раствора сравнения растворитель – этанол.

Как видно из рисунков 2.7 – 2.9 УФ спектры всех трех исходных и меченых препаратов практически идентичны, что доказывает их одинаковую структуру и состав.

Таким образом, нами были подобраны оптимальные условия мечения изониазида, этамбутола и преднизолона, разработана методика их очистки методом ТСХ, доказана их тождественность двумя методами: ТСХ и УФ спектрофотометрией. Наработаны и очищены достаточные количества всех трех меченных тритием препаратов для дальнейших экспериментов по исследованию связывающей способности белков крови человека.

§ 2.4. Наработка меченых термически активированным тритием дротаверина и фуросемида

Как указано выше полученные нами меченные тритием препараты изониазида, этамбутола и преднизолона в дальнейшем использовались для оценки связывающей способности белков крови человека. Для более полного и комплексного исследования этих свойств белков нами были наработаны еще два препарата меченные тритием - дротоверина и фуросемида.

Эти пять соединений являются фармацевтическими препаратами различного действия, имеют разную фармакокинетику, различный механизм распространения в организме, пути и времени вывода из организма человека.

Для получения меченного термически активированным тритиемфармакологического препарата дротаверина гидрохлорида и фуросемида были использованы разработанные ранее в ИЯФ АН РУ методики [115; С.214-215].Ранее с помощью этого метода было получен меченный тритием дротаверин с удельной активностью 1,392 ГБк/ммоль (37,62 мКи/ммоль).

При наработке меченого препарата был подобран оптимальный режим мечения для увеличения удельной молярной активности в зависимости от длительности процедуры мечения (рисунок 2.10).

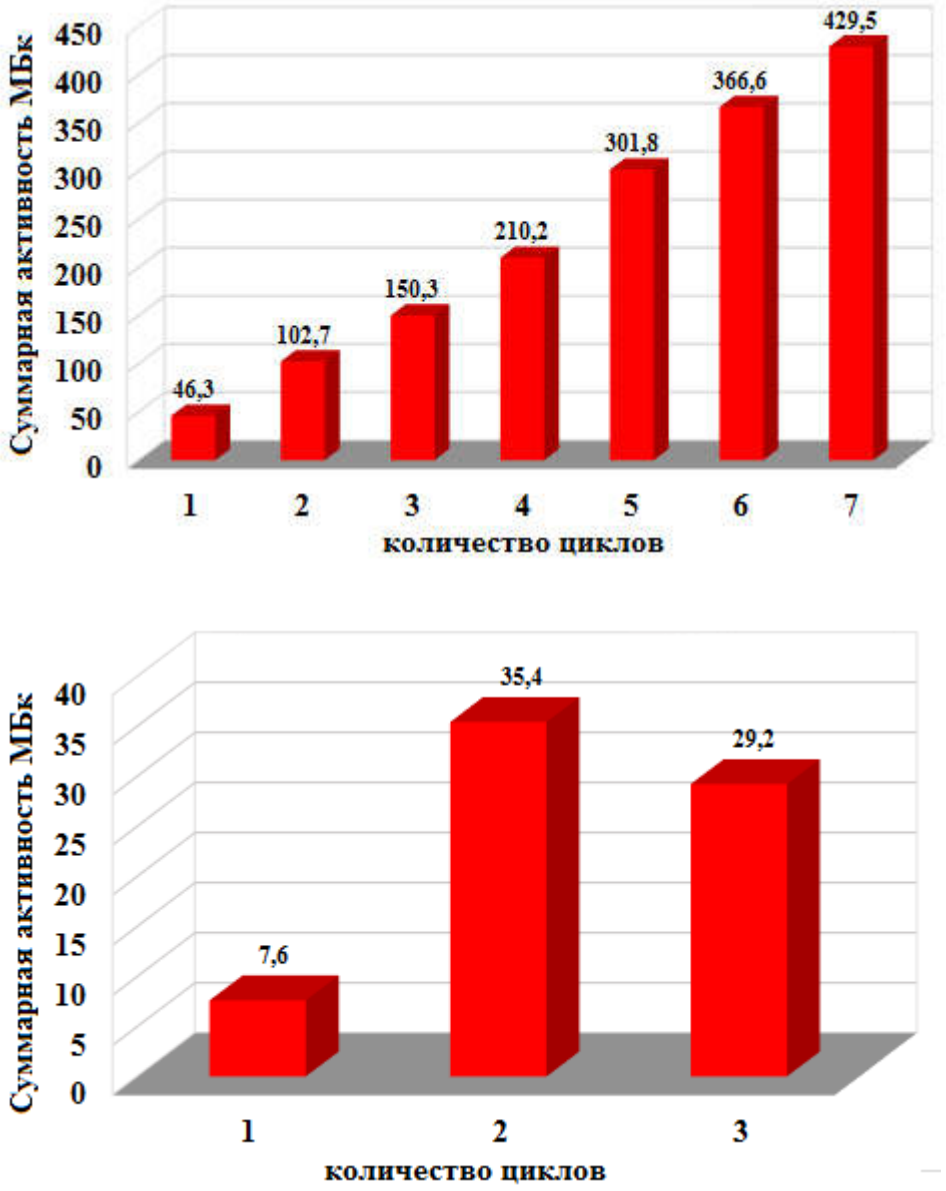


Рис. 2.10. Зависимость удельной активности меченного тритием дротаверина гидрохлорида (верхний график) и фуросемида (нижний график) от длительности процедуры мечения

Нами было обнаружено, что при увеличении количества циклов мечения увеличивается удельная активность суммарной фракции дротоверина. Но при этом также происходит существенное разрушение исходного вещества. Ранее нами было обнаружено, что после восьми циклов мечения выход меченого дротаверина составлял всего 20%. Поэтому мы уменьшили количество циклов мечения до семи циклов и при этом выход меченого дротаверина соста-

вил 36,67%. При этом была получена удельная активность примерно в шесть раз выше, чем было описано ранее [115; с.214-215, 116;с.24, 117; с.151-152].

Очистку меченого препарата дротаверина от побочных продуктов проводили тонкослойной хроматографией в системе изопропанол: аммиак : вода (8:1:1), а фуросемида в системе гексан:ацетон (1:1) [115; с.214-215, 116;с.24, 117; с.151-152].

Полученный очищенный препарат дротаверина имел удельную весовую активность = 18.9 МБк/мг, удельную молярную активность = 8 155,3 МБк/ммоль = 8,155 ГБк/ммоль = 220,4 мКи/ммоль.

Необходимо отметить, что ранее с помощью этого метода [115; с.214-215] был получен меченный тритием дротаверин с удельной активностью 1,392 ГБк/ммоль (37,62 мКи/ммоль). Повышение удельной активности можно также объяснить применением свежих тритиевых мишеней, применяемых в качестве источника газообразного трития.

Полученный очищенный препарат фуросемида имел удельную активность 0,25 МБк/мг удельную молярную активность = 82,6 МБк/ммоль = 2,2 мКи/моль.

Полученные препараты анализировали УФ спектрофотометрией по методике, приведенной в работе [118; с.129] (рисунок 2.11).

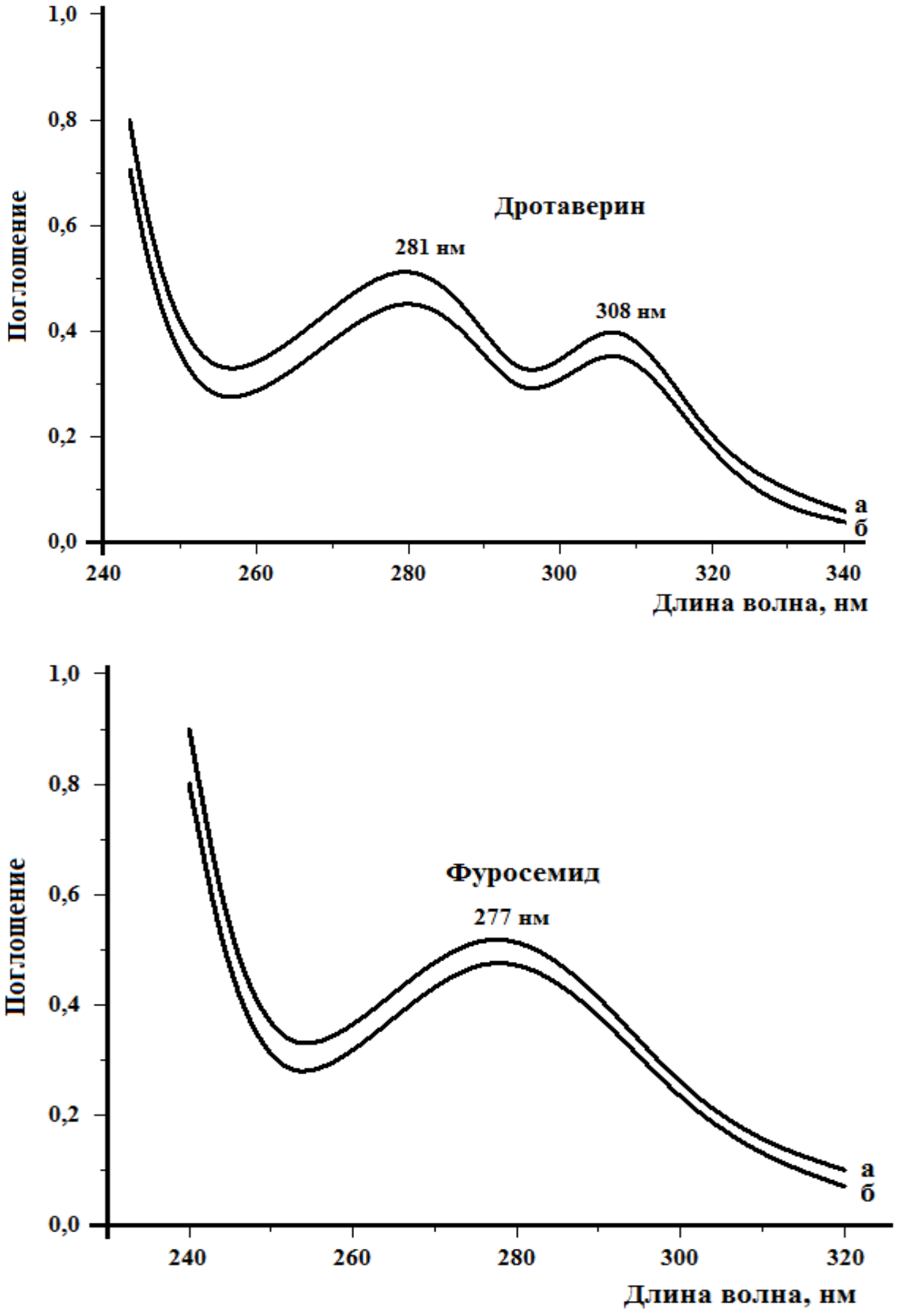


Рис. 2.11.УФ спектр исходного и меченого дротаверина и фуросемида.

III. РАЗРАБОТКА РАДИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ МЕЧЕНЫХ ТРИТИЕМ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

§ 3.1. Методы исследования альбумина и его связывающей способности

В настоящее время разработано множество клинических и исследовательских методов анализа связывающих свойств альбумина [119; с.224]. Все эти методы условно можно разделить на две большие группы методов изучения связывания лигандов с белками крови.

Одну группу можно обозначить как группу «непрямых методов», которая основана на регистрации изменений физико-химических параметров, отражающих процесс взаимодействия специфического или тестового лиганда с альбумином. В этих методах измеряется связывание с альбумином различных зондов – абсорбционных красителей, флуоресцентных зондов, спиновых зондов, ЭПР-зондов, ЯМР-зондов. Например, о связывании сульфодиметоксина с альбумином можно судить по изменению флуоресценции зонда АНС. Их использует большинство исследователей, регистрируя изменения конформации альбумина, состояния его окружения и т.д. при связывании лигандов. Непрямые методы помимо выводов о связывающей способности альбумина позволяют сделать выводы о самой молекуле белка, ее структуре, физико-химическом состоянии центров связывания [120; с.20-23, 121; с.161-163, 122;.38-42, 123; с.65-71, 124; с.378–383, 125; с.2129–2134] .

Ко второй группе относятся методы, позволяющие непосредственно определить концентрацию свободного и связанного с белком лиганда (все разновидности диализа, электрофорез, ультрацентрифугирование, хроматография). Это – «прямые» методы. Они позволяют, например, разделить связанную и несвязанную с альбумином форму лекарства [126; с.695-704].

Накопленные к настоящему времени данные литературы показывают, что альбумин является основным белком крови, ответственным за связыва-

ние и транспорт не только метаболитов и токсинов, но также фармакологических препаратов, поступающих в кровь человека. Исходя из этого, точное определение связывающей емкости альбумина сыворотки крови позволяет определить правильную лекарственную нагрузку на транспортную систему белков крови человека, как в нормальном физиологическом состоянии, так и при патологии и заболеваниях. Определение правильной лекарственной нагрузки на транспортную систему белков крови человека может быть чрезвычайно важным для клинической медицины, особенно при таких длительных заболеваниях как туберкулез. Необходимо подчеркнуть, что хронические заболевания достаточно часто сопровождаются нарушениями транспортной системы белков крови человека. Кроме того, противотуберкулезные препараты изониазид и этамбутол являются достаточно токсичными и оказывают сильную нагрузку на ослабленные физиологические системы человека. Поэтому точное определение связывающей способности белков сыворотки крови человека может позволить избежать излишней (токсичной) фармакологической нагрузки при лечении туберкулеза [127].

Остальные три препарата (дротаверин, фуросемид и преднизолон), используемых в разработанном аналитическим методе, представляют собой три различных класса фармакологических соединений, которые часто используются при острых состояниях пациентов с различными тяжелыми заболеваниями. При таких состояниях точная оценка транспортной системы белков крови человека может быть крайне необходимой для избежания передозировки фармакологических препаратов для индивидуальных больных.

Разработанный в данной диссертационной работе метод является «прямым» методом и имеет следующие преимущества:

1) за счет использования меченных тритием фармакологических соединений метод имеет максимально возможную чувствительность и точность. При этом, поскольку для измерения достаточно минимального объема образца, то этот метод может использоваться в варианте микрометода;

2) поскольку в разработанном методе используется одновременно пять фармакологических соединений, то это позволяет полнее оценить общую связывающую способность белков сыворотки крови человека, чем при использовании вышеуказанных методов, которые в основном оценивают связывание белков сыворотки крови (альбумина) с одним фармакологическим соединением.

Таким образом, исходя из сказанного выше, в рамках данной диссертационной работы решаются следуюшие задачи:

- разработка радиохимического аналитического метода определения связывания меченых изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови человека;

- проведение медико-биологических исследований с использованием разработанной тест системы для оценки связывания фармакологических препаратов с белками сыворотки крови человека;

- исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека.

§ 3.2. Разработка аналитического метода для оценки связывания изониазида, этамбутола и преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови

По литературым данным основная масса альбумина и других основных транспортных белков крови остается в сыворотке крови после осаждения скоагулировавшего сгустка крови. Поэтому для разработки аналитического метода нами была выбрана сыворотка крови человека. Этот выбор был еще обусловлен тем, что работа с сывороткой значительно упрощает процедуру анализа, поскольку не требуется применения антикоагулянтной системы, как в случае с плазмой крови.

Нами была выбрана следующая схема разрабатываемого аналитического метода:

1. Отбор пробы крови у пациента,

2. Получение сыворотки крови.

3. Инкубация аликвоты сыворотки крови с меченным тритием фармакологическим соединением.

4. Отделение белков сыворотки крови от свободного несвязанного меченного тритием фармакологического соединения.

5. Измерение радиоактивности трития, связанной с белками сыворотки крови.

Для реализации этой схемы необходимо решить две методологические задачи:

а) подобрать оптимальный метод отделения белков сыворотки крови от свободного несвязанного меченного тритием фармакологического соединения.

б) подобрать оптимальную систему сцинтилляционного измерения активности трития в биологических образцах.

Методы исследования, реактивы, аппаратура.

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили в Ташкентской Медицинской Академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. Для проведения нашего исследования 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 -20^0C 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.

За основу метода нами были взяты проводимые ранее исследования. Задачей нашего исследования являласьразработка комплексного радиохимического метода, позволяющего оценить связывающую способность транспортных белков сыворотки человека с помощью пяти меченных тритием фармакологических препаратов: дротаверина, фуросемида, изониазида, этамбутола и преднизолона. С точки зрения клинической фармакологии применение такого метода может позволить оценить связывающую емкость белковой транспортной системы по пяти различным классам низкомолекулярных химических соединений.

Для разрабатываемого метода нами был выбран минимально возможный используемый объем образца сыворотки крови – 20 мкл. Для измерения было выбрано оптимальное количество вносимых меченных тритием препаратов – по 1 мкг на образец. Для отделения белков сыворотки крови от свободных несвязанных меченных тритием нами была использована гель-фильтрация на микроколонках с SephadexG-25. Для измерений готовили одноразовые пластиковые колонки, в которые вносили по 100 мг сухой смолы SephadexG-25. Смолу SephadexG-25 предварительно замачивали в течение нескольких часов и уравновешивали буферным раствором 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4. После уравновешивания объем смолы составлял 300 мкл.

Для измерений нами был подобран следующий оптимальный объем реакционной смеси с образцом: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченного тритием препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 М NaCl, pH 7,4.

Гель-фильтрация на колонке с SephadexG-25. В разработанном аналитическом методе нами был применен классический метод гель-фильтрации на SephadexG-25, часто используемый для очистки водных растворов белков [128; с.550-555, 129; с.1-14, 130; с.530-532]. С помощью метода гель-

фильтрации можно быстро разделить макромолекулы в соответствии с их размерами. Носителем для хроматографии является гель, который состоит из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок. Так сефадексы - это поперечно-сшитые декстраны (α-1→6-глюканы микробиального происхождения) с заданными размерами пор. Сшиты цепи декстрана трехуглеродными мостиками с помощью эпихлоргидрина.

Гель-фильтрация широко используется для определения величин молекулярных масс, обессоливания растворов нативных белков, концентрирования растворов полимеров. В медицине гель-фильтрацию применяют для диагностического разделения белков сыворотки крови, например при макроглобулинемии, гемоглобинопатиях, при ранней диагностике беременности, для получения очищенных препаратов ферментов [130; с.530-532]

Метод гель-фильтрации позволяет получать водный раствор белков, очищенный от низкомолекулярных соединений. При такой схеме очистки белков фракция белков выходит с элюирующим раствором в первой трети объема колонки. Низкомолекулярные соединения, не связанные с белками, остаются на колонке и элюируются тремя объемами колонки. В нашем случае применение гель-фильтрации на SephadexG-25 позволяет очистить белки от несвязавшихся меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида. В отличие от метода осаждения белков сульфатом аммония при гель-фильтрации не происходит никакой денатурации белков. [131; с.1117, 132; с.358, 133; с.536 с, 134; с.536]

Применение гель-фильтрации в классическом варианте смоле, уравновешенной элюирующим буфером имеет один существенный недостаток – большой объем элюата. Большой объем элюируемых белков плазмы связанных с меченными тритием фармакологическими препаратами необходимо концентрировать, поскольку в сильно разбавленных водных растворах снижается эффективность счета тритиевой метки [135; с.131]. При этом возникает опасность частичной потери радиоактивной метки.

Для того, чтобы снизить расходы реактивов и объем используемого радиоактивного вещества в аналогичных случаях в радиохимии обычно применяются микрометоды. Для разработки метода нами был выбран микрометод гель-фильтрации и использованы микроколонки с SephadexG-25 (100 мг смолы на колонку).

§ 3.3. Сцинтилляционный счет радиоактивности трития в биологических образцах

Основным недостатком трития является сложность его детектирования и количественного измерения из-за малой энергии β-излучения. Наиболее эффективный способ измерения активности трития — это жидкостной сцинтилляционый счет. Для жидкостного сцинтилляционного счета используются гомогенные и гетерогенные сцинтилляционные системы. Гомогенные сцинтилляционные системы образуются при полном растворении проб в сцинтилляторе. В гомогенных смесях измерения наиболее точные. Особенно это относится к измерениям низкоэнергетического β-излучения ^{3}H. При введении в сцинтиллятор пробы происходят различные процессы, приводящие к уменьшению светового выхода жидкостного сцинтиллятора. Механизм явления подробно описан в литературе [136; с.182, 128]. Ввиду большого разнообразия данных о тушащих свойствах различного рода веществ, присутствующих в растворах, которые необходимо вводить в жидкостный сцинтиллятор, сделаны попытки некоторой классификации экспериментального материала. Так, в работе [137; с.49-53] предложен параметр «фактор ослабления сцинтилляции», соответствующий относительному уменьшению светового выхода сцинтиллятора при введении 1 ммоль тушащего вещества. Фактор ослабления светового выхода сцинтиллятора для ароматических галоидов (хлороформа, трихлорэтана, хлор-л-ксилола и т. п.) растет с увеличением доли хлора в молекуле, а также зависит от положения хлора в молекуле тушащего вещества. Если в качестве тушителей использовать спирты, то тушащий эффект возрастает с увеличением

длины углеродной цепи. Тушение свечения, возбужденного ультрафиолетовым светом, не соответствует тушению свечения, возбужденного β-излучением [135; с.131].

Известно, что большое количество воды в образце также ослабляет сцинтилляцию. Наличие белков, солей и низкомолекулярных органических соединений в измеряемом биологическом образце может значительно уменьшить световой выход сцинтиллятора за счет эффекта тушения сцинтилляции.

Для оптимального измерения содержания трития в измеряемых биологических образцах нами были проанализированы литературные данные и был экспериментально выбран следующий состав сцинтиллятора: 4г PPO и 0,05 г POPOP) в 1л толуола [138; с.183].

Измерение тритиевой радиоактивности в биологических образцах сильно осложняется за счет эффекта тушения сцинтилляции. 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 нами было обнаружено, что эффективность счета тритиевой метки сильно варьирует. 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) меченного изониазида + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

2. Гель-фильтрация: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченного изониазида + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

После внесения в образцы меченого препарата образцы инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После этого по одному образцу каждой из 6 сывороток крови наносили на микроколонки с SephadexG-25, элюировали 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 фракция содержала низкомолекулярные белки и третья фракция содержала низкомолекулярные соединения, в том числе свободный меченный препарат. Активность контрольного образца и каждой фракции измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г РРО и 0,05 г РОРОР). Во флаконы для сцинтилляционного счета вносили по 3 мл толуольного сцинтилляционного раствора и по 300 мкл измеряемого раствора. Флаконы выдерживали в течение 20 минут в темноте для уравновешивания раствора. После этого измеряли радиоактивность на счетчике РЖС-05. Полученные данные представлены в таблицах 3.1 – 3.5.

Таблица 3.1

Точность обнаружения меченного тритием изониазида после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Изониазид						
Номер образца	Контроль, имп/мин	1 фракция 300мкл, имп/мин	2 фракция 300 мкл, имп/мин	3 фракция 300 мкл, имп/мин	сумма фракций № 1-3, имп/мин	общий % обнаружения
1	10626	1446	149	8947	10542	99,21%
2	8040	7560	54	479	8093	100,66%
3	9750	1626	138	7912	9676	99,24%
4	18864	3684	210	14787	18681	99,03%
5	17490	6654	156	10736	17549	100,32%
6	16212	3930	192	12239	16361	100,92%
Среднее значение % обнаружения						**99,90%**
SD						**0,91**
P=0,05, %RSD						**0,91**

Таблица 3.2

Точность обнаружения меченного тритием этамбутола после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Этамбутол						
Номер образца	Контроль, имп/мин	1 фракция 300мкл, имп/мин	2 фракция 300 мкл, имп/мин	3 фракция 300 мкл, имп/мин	сумма фракций № 1-3, имп/мин	общий % обнаружения
1	3858	2082	102	1630	3814	98,86%
2	5832	3060	84	2667	5811	99,64%
3	6330	864	156	5382	6402	101,14%
4	14856	4548	186	12233	16967	98,36%
5	8046	3558	96	4314	7968	99,03%
6	9744	2394	132	7297	9823	100,81%
Среднее значение % обнаружения						**99,69%**
SD						**1,19**
P=0,05, %RSD						**1,19**

Таблица 3.3

Точность обнаружения меченного тритием преднизолона после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Преднизолон						
Номер образца	Контроль, имп/мин	1 фракция 300мкл, имп/мин	2 фракция 300 мкл, имп/мин	3 фракция 300 мкл, имп/мин	сумма фракций № 1-3, имп/мин	общий % обнаружения
1	5496	1164	96	4186	5446	99,09%
2	7410	1416	132	973	7427	100,23%
3	9294	1764	126	7298	6188	98,84%
4	17250	3060	186	13885	17131	99,31%
5	18312	2652	180	15652	18484	100,94%
6	18336	666	246	17200	18112	98,78%
Среднее значение % обнаружения						**99,53%**
SD						**0,92**
P=0,05, %RSD						**0,92**

Таблица 3.4

Точность обнаружения меченного тритием дротаверина после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Дротаверин						
Номер образца	Контроль, имп/мин	1 фракция 300мкл, имп/мин	2 фракция 300 мкл, имп/мин	3 фракция 300 мкл, имп/мин	сумма фракций № 1-3, имп/мин	общий % обнаружения
1	510	276	36	188	492	98,04%
2	20772	306	150	20356	20812	100,19%
3	390	246	18	134	398	102,05%
4	1032	324	42	655	1021	98,93%
5	966	360	40	558	958	99,17%
6	1176	768	54	363	1184	100,68%
Среднее значение % обнаружения						**99,84%**
SD						**1,51**
P=0,05, %RSD						**1,51**

Таблица 3.5

Точность обнаружения меченного тритием фуросемида после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Фуросемид						
Номер образца	Контроль, имп/мин	1 фракция 300мкл, имп/мин	2 фракция 300 мкл, имп/мин	3 фракция 300 мкл, имп/мин	сумма фракций № 1-3, имп/мин	общий % обнаружения
1	75540	5124	648	69198	74430	98,53%
2	40386	4878	864	34290	40032	99,12%
3	38472	9042	966	28260	38268	99,47%
4	64344	12246	1068	50766	64080	99,59%
5	79152	29034	1110	48168	78312	98,94%
6	74370	25680	1008	47928	74616	100,33%
Среднее значение % обнаружения						**99,33 %**
SD						**0,64**
P=0,05, %RSD						**0,64**

Полученные результаты были пересчитаны на количество меченных тритием препаратов (данные представлены на рисунке 3.1).

Полученные данные (таблицы 3.1-3.5 и рисунок 3.1) показывают присутствие эффекта «тушения» сцинтилляционного счета в различных образцах сыворотки крови человека. Этот эффект вероятнее всего вызван наличием разнообразных органических соединений в сыворотке крови человека. При этом полученные данные также показывают, что при отделении фракции белков из сыворотки эффект тушения остается неизменным во всех фракциях. Исходя из этих результатов, можно с достаточной уверенностью утверждать, что применение внутренного стандарта (применение дополнительного контрольного образца без фракционирования) позволяет точно определить количество меченного тритием препарата, связанного с белками сыворотки.

В дальнейшем использовалась следующая схема расчетов связанного меченного препарата – сцинтилляционный счет в контрольном образце в

имп/мин принимали за 100%, и содержание препарата вычисляли по процентному содержанию от контрольного образца.

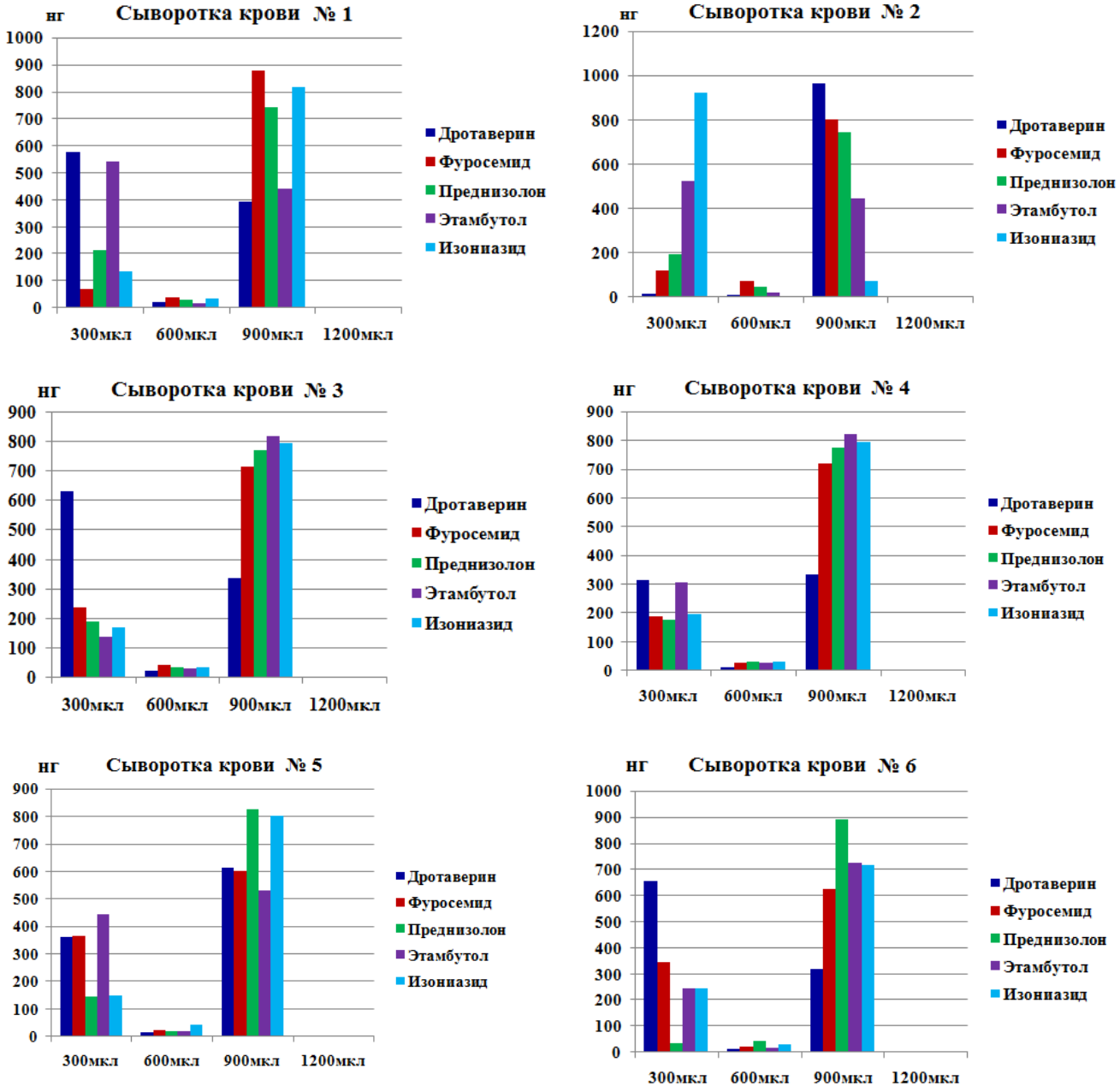


Рис. 3.1. Количество меченых тритием препаратов, инкубированных с 6 различными сыворотками, в трех фракциях, элиюрованных с микроколонок SephadexG-25 после гель-фильтрации

§ 3.4. Определение конкурентного связывания меченых тритием препаратов с белками сыворотки крови

Для того чтобы определить связывающую емкость белков сыворотки крови нами было исследовано конкурентное связывание с белками меченного 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.

Нами были проведены эксперименты по определению связывания меченого тритием препаратов в присутствии различных концентраций исходных немеченых препаратов.

Было проанализировано 6 образцов сыворотки крови, взятой у 6 здоровых добровольцев.

Сыворотка крови № 1 (муж., 25 лет, общий белок = 74 г/л, альбумин =54% (39,96 г/л)).

Сыворотка крови № 2 (муж., 25 лет, общий белок = 78 г/л, альбумин = 57%(44,46 г/л)).

Сыворотка крови № 3 (муж., 29 лет, общий белок = 78 г/л, альбумин = 62%(48,36 г/л)).

Сыворотка крови № 4 (муж., 31 год, общий белок = 80 г/л, альбумин = 60%(48,0 г/л)).

Сыворотка крови № 5 (муж., 33 года, общий белок = 75 г/л, альбумин = 62%(46,5 г/л))

Сыворотка крови № 6 (муж., 28 лет, общий белок = 82 г/л, альбумин = 62%(50,84 г/л))

Для каждого меченного препарата (изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида) было приготовлено по 4 образца с 6 разными сыворотками:

Контроль - 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

Образец. № 1 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

Образец. № 2 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого препарата + 10 мкл (1 мкг) немеченого препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

Образец. № 3 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченого препарата + 20 мкл (2 мкг) немеченого препарата + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

После внесения в образцы меченого препаратов образцы инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После этого образцы наносили на микро-колонки с SephadexG-25, собирали первые фракции по 300 мкл и измеряли активность, связанную с белками сыворотки. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).

Результаты определения конкурентного связывания меченых тритием препаратов с белками сыворотки крови приведены в таблицах 3.6 – 3.10

Таблица 3.6

Определение конкурентного связывания меченного тритием изониазида с белками сыворотки крови

Номер образца сыворотка крови	Контроль, имп/мин (100% радиоактивность)	Образец. № 1, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 2, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 3, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)
1	10626	1446 (13,60%)	716 (6,74%)	493 (4,64%)
2	8040	7560 (94,03%)	3776 (46,96%)	2561 (31,85%)
3	9750	1626 (16,68%)	799 (8,19%)	563 (5,77%)
4	18864	3684 (19,53%)	1823 (9,66%)	1241(6,58%)
5	17490	6654 (38,04%)	3302 (18,88%)	2245 (12,84%)
6	16212	3930(24,24%)	1994 (12,30%)	1295 (7,99%)

Таблица 3.7

Определение конкурентного связывания меченного тритием этамбутола с белками сыворотки крови

Номер образца сыворотка крови	Контроль, имп/мин (100% радиоактивность)	Образец. № 1, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 2, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 3, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)
1	3858	2082(53,96%)	1028 (26,65%)	706 (12,30%)
2	5832	3060(52,47%)	1501 (27,74%)	1041 (17,85%)
3	6330	864(13,65%)	421(6,65%)	301(4,75%)
4	14856	4548(30,61%)	2295(15,45%)	1536 (10,34%)
5	8046	3558(44,22%)	1772(22,02%)	1145 (14,23%)
6	9744	2394(24,57%)	1176(12,07%)	812(8,33%)

Таблица 3.8

Определение конкурентного связывания меченного тритием преднизолона с белками сыворотки крови

Номер образца сыворотка крови	Контроль, имп/мин (100% радиоактивность)	Образец. № 1, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 2, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 3, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)
1	5496	1164(21,18%)	563 (10,24%)	399 (7,26%)
2	7410	1416(19,11%)	719 (9,70%)	463 (6,25%)
3	9294	1764(18,98%)	889 (9,56%)	601 (6,46%)
4	17250	3060(17,74%)	1539 (8,92%)	1011 (5,86%)
5	18312	2652(14,48%)	1337 (7,30%)	872 (4,76%)
6	18336	666(3,63%)	337 (1,84%)	216 (1,18%)

Таблица 3.9

Определение конкурентного связывания меченного тритием дротаверина с белками сыворотки крови

Номер образца сыворотка крови	Контроль, имп/мин (100% радиоактивность)	Образец. № 1, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 2, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 3, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)
1	510	276(54,12%)	136 (26,67%)	96(18,82%)
2	2077	306(14,73%)	151 (7,27%)	99 (4,77%)
3	390	246(63,08%)	145 (37,18%)	80 (20,51%)
4	1032	324 (31,39%)	158 (15,31%)	111 (10,75%)
5	966	360 (37,27%)	176 (18,22%)	123 (12,73%)
6	1176	768 (65,31%)	380 (32,31%)	251 (21,34%)

Таблица 3.10

Определение конкурентного связывания меченного тритием фуросемида с белками сыворотки крови

Номер образца сыворотка крови	Контроль, имп/мин (100% радиоактивность)	Образец. № 1, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 2, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)	Образец. № 3, имп/мин (% от внесенной радиоактивности)
1	75540	5124(6,78%,)	2543 (3,37%)	1726 (2,28%)
2	40386	4878(12,08%)	2490 (6,16%)	1710(4,23%)
3	38472	9042 (23,50%)	4502 (11,96%)	2946 (7,66%)
4	64344	12246(19,03%)	6042 (9,39%)	4206(6,54%)
5	79152	29034(36,68%)	13176 (16,65%)	9870(12,45%)
6	74370	25680(34,53%)	12606 (16,95%)	8706(11,71%)

На основании полученных данных были построены кривые конкурентного связывания для пяти препаратов. Данные образца 1 были приняты за 100% и соотвественно были пересчитаны данные образцов №2 и 3. Графики представлены на рисунке3.2.

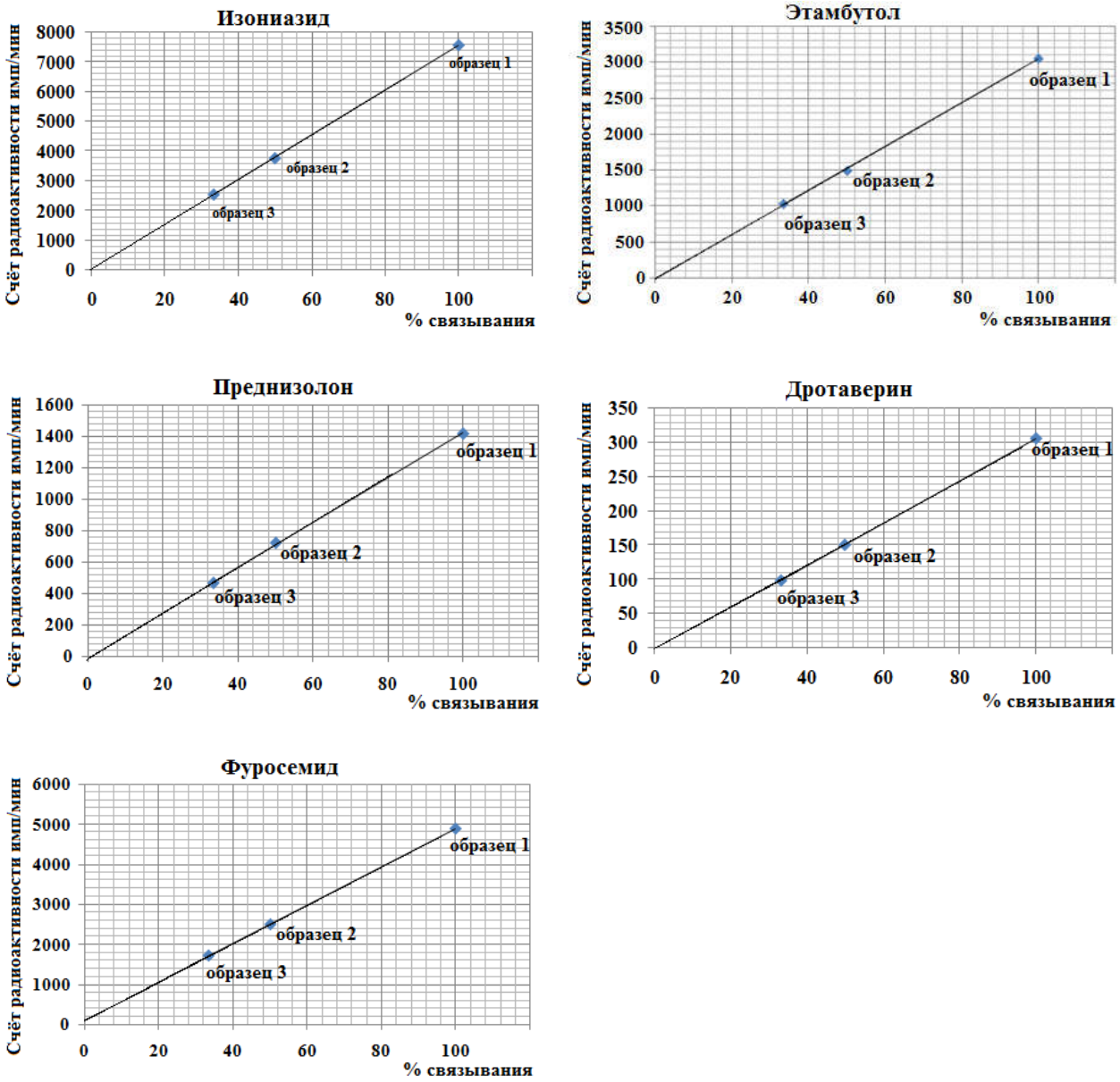


Рис. 3.2. График конкурентного связывания меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина

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

§ 3.5. Определение воспроизводимости результатов связывания меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови

Нами было приготовлено 6 одинаковых образцов с сывороткой от одного пациента:

Контроль: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченного этамбутола + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

Образцы 1-5: 20 мкл сыворотки + 10 мкл (1 мкг) меченного этамбутола + 270 мкл 10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4

После внесения в образцы меченого препарата 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. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).Результаты представлены в таблицах 3.11-3.16.

Таблица 3.11

Счет радиоактивности изониазида в первой фракции 300 мкл, собранной после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Образец	Счет радиоактивности изониазида во фракции белков, имп/мин	количество изониазида в образце - % от внесенной радиоактивности)	Количество изониазида, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки
Контроль	10626	100% (1000 нг)	-
№ 1	1446	13,61%	136,1 нг
№ 2	1487	13,99%	139,8 нг
№ 3	1431	13,47%	134,7нг
№4	1493	14,05%	140,5 нг
№ 5	1422	13,38%	133,8 нг
№ 6	1457	13,71%	137,0 нг
		Среднее	137,0
		SD	1,1
		%RSD	0,80%

Таблица 3.12

Счет радиоактивности этамбутола в первой фракции 300 мкл, собранной после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Образец	Счет радиоактивности этамбутола во фракции белков, имп/мин	количество этамбутола в образце - % от внесенной радиоактивности)	Количество этамбутола, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки
Контроль	3858	100% (1000 нг)	-
№ 1	2082	53,97%	539,7 нг
№ 2	2097	54,35%	543,5 нг
№ 3	2109	54,66%	546,6нг
№4	2035	52,75%	527,5 нг
№ 5	2076	53,81%	538,1 нг
№ 6	2046	53,03%	530,3 нг
		Среднее	537,6
		SD	9,19
		%RSD	1,71%

Таблица 3.13

Счет радиоактивности преднизолона в первой фракции 300 мкл, собранной после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Образец	Счет радиоактивности преднизолона во фракции белков, имп/мин	количество преднизолона в образце - % от внесенной радиоактивности)	Количество преднизолона, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки
Контроль	5496	100% (1000 нг)	-
№ 1	1164	21,18%	211,8 нг
№ 2	1112	20,43%	202,3 нг
№ 3	1187	21,52%	215.9 нг
№ 4	1179	21,27%	214.5 нг
№ 5	1126	20,85%	204.8 нг
№ 6	1155	21,02%	210,2 нг
		Среднее	209,9
		SD	2,32
		%RSD	1,10%

Таблица 3.14

Счет радиоактивности дротаверина в первой фракции 300 мкл, собранной после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Образец	Счет радиоактивности дротаверина во фракции белков, имп/мин	количество дротаверина в образце - % от внесенной радиоактивности)	Количество дротаверина, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки
Контроль	510	100% (1000 нг)	-
№ 1	294	57,65%	576,5 нг
№ 2	296	58,04%	580,4 нг
№ 3	300	58,82%	588,2 нг
№4	291	57,06%	570,6 нг
№ 5	285	55,88%	558,8 нг
№ 6	302	59,22%	592,2 нг
		Среднее	577,8
		SD	3,5
		%RSD	0,60%

Таблица 3.15

Счет радиоактивности фуросемида в первой фракции 300 мкл, собранной после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG-25

Образец	Счет радиоактивности фуросемида во фракции белков, имп/мин	количество фуросемида в образце - % от внесенной радиоактивности)	Количество фуросемида, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки
Контроль	75540	100% (1000 нг)	-
№ 1	5124	6,78%	67,8 нг
№ 2	5004	6,74%	66,2 нг
№ 3	5176	6,84%	68,5нг
№4	5182	6,81%	68,6 нг
№ 5	5219	6,87%	69,1 нг
№ 6	5020	6,71%	66,5 нг
		Среднее	67,8 нг
		SD	0,7
		%RSD	1,03%

Таблица 3.16

Сводная таблица воспроизводимости результатов связывания меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови

Образец №	Количество меченного препарата, связавшегося с белками в 20 мкл сыворотки, в нг				
	Изониазид	Этамбутол	Преднизолон	Дротаверин	Фуросемид
№ 1	136,1	539,7	211,8	576,5	67,8
№ 2	139,8	543,5	202,3	580,4	66,2
№ 3	134,7	546,6	215.9	588,2	68,5
№4	140,5	527,5	214.5	570,6	68,6
№ 5	133,8	538,1	204.8	558,8	69,1
№ 6	137,1	530,3	210,2	592,2	66,5
Среднее	137,0	537,6	209,9	577,8	67,8
SD	1,1	9,19	2,32	3,5	0,7
%RSD	0,80%	1,71%	1,10%	0,60%	1,03%

Таким образом, показано, что метод обладает хорошей воспроизводимостью результатов связывания меченных тритием изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида с белками сыворотки крови.

Установлено, что с 20 мкл сыворотки связывается только часть внесенных в инкубационную смесь меченных тритием препаратов – менее 1 мкг. Следовательно, внесения в инкубационную смесь 1 мкг меченого препарата достаточно, чтобы обеспечить весь предполагаемый диапазон связывания препарата с белками сыворотки крови.

IV.ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗРАБОТАННОГО РАДИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИТИЧЕСКОГО МЕТОДА В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

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

Известно, что эффективность и безопасность фармакотерапии, прежде всего, определяется особенностью клинических и фармакологических свойств лекарственных средств. Приоритетное значение приэтом имеют особенности их фармакокинетики в организме человека. Связывание лекарственного вещества с белками плазмы крови является одним из главных параметров, от которого зависит не только скорость наступления фармакологического действия, но и длительность циркуляции лекарственных средств в крови, продолжительность фармакологического действия в целом, а также вероятный риск развития побочного действия.

Транспорт лекарственных препаратов белками крови в основном осуществляется за счет альбуминов. Благодаря своим лиганд-образующим свойствам альбуминовая фракция белков крови способствует транспортировке и элиминации многих продуктов экзогенного и эндогенного происхождения, в том числе лекарственных средств. Поэтому количественная характеристика белков крови в частности альбуминов имеет весьма важное значение в детоксикации организма, в обеспечении его химического гомеостаза и в проведении эффективной и безопасной фармакотерапии. В норме альбумин имеет различную степень связывания молекул различной природы. Следовательно, общий объем альбумина в крови имеет определенную связывающую емкость для различных фармакологических препаратов, которая ограничена общим количеством альбумина, циркулирующего в крови. Определение этой связывающей емкости может оказаться весьма важной для определения эффективного переноса лекарственного препарата в крови и определения оптимальной дозы лекарственного препарата, что, в свою очередь, может играть весомую

роль в обеспечении эффективности и безопасности проводимой лекарственной терапии [139; с.111-112, 140; с.49-52.].

Как известно, при многих патологиях печени концентрация альбумина в крови снижается. В свою очередь уменьшение общего пула альбумина в крови резко уменьшает связывающую емкость сывороточного альбумина. При этом может увеличиваться не только свободная фракция лекарственных средств, но и возникает дополнительная интоксикация за счет того, что альбумин не успевает выводить эндогенные метаболиты из кровотока. Увеличение концентрации эндобиотиков в крови может резко снизить связывающую способность альбумина к лекарственным препаратам за счет конкуренции с метаболитами за связывающие центры альбумина. Во многом детали этого процесса остаются не до конца ясными при различных системных заболеваниях. Исследование полной картины динамики связывающей способности альбумина к лекарственным средствам и изменений общей связывающей емкости сывороточного альбумина при системных заболеваниях может оказаться чрезвычайно важным с научной точки зрения для понимания механизма развития патологии транспортной системы крови. Помимо этого, результаты таких исследований могут оказаться особо важными с прикладной точки зрения, поскольку помогут точно определить транспортные возможности крови при острых и хронических системных заболеваниях. Это в свою очередь может оказаться полезным для определения стратегии и тактики лечения, для оценки лекарственной нагрузки на транспортную систему крови и для выбора оптимальных доз лекарственных препаратов. Последний пункт весьма важен для того, чтобы избежать необоснованного назначения лекарственных препаратов в условиях нарушенной транспортной системы крови [141; с.55-57, 142; с.115-116, 143; с.432].

И, наконец, исследование транспортной системы сывороточного альбумина в норме и патологии может оказаться фундаментальной базой для исследования компенсаторных механизмов транспортной системы крови.

Необходимо отметить, что большинство исследований связывающей способности транспортных белков крови в норме и патологии проводилось или методами, использующими различные зонды (флуоресцентные, спиновые, ЭПР-зонды, ЯМР-зонды [120; с.20-23, 121; с.161-163, 122;.38-42, 123; с.65-71, 124; с.378–383, 125; с.2129–2134]), или методами прямого измерения связывания фармакологических препаратов. В первом случае оценка связывающей способности белков чаще всего является усредненной и не позволяет получать точные характеристики связывания для отдельных препаратов. Во втором случае исследования, как правило, ограничиваются прямым измерением связывания одного или двух фармакологических препаратов.

Разработанный в данной диссертационной работе радиохимический аналитический метод позволяет избежать вышеуказанных методических ограничений за счет использования для измерения меченных тритием фармакологических соединений, позволяющего сильно увеличить чувствительность метода. Кроме того, одновременное применение пяти меченных тритием фармакологических соединений различных классов (изониазида, этамбутола и преднизолона, дротаверина и фуросемида) позволяет проводить комплексную оценку связывающей способности транспортных белков крови человека.

Разработанный комплексный радиохимический аналитический метод был использован в совместных исследованиях с Ташкентской Медицинской Академией. Целью этих исследований было: оценить связывающую способность 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 в Ташкентской Медицинской Академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. 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. В исследуемую группу пациентов вошло 45 пациентов, данные представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Демографические данные, диагноз и содержание белка и альбумина в сыворотке крови обследованных пациентов

Образец №	Содержание общего белка	Содержание альбумина	Содержание альбумина в 20 мкл сыворотки
1 группа - гипертоническая болезнь (возраст от 41 до 61 года)			
1	58,9 г/л	41,6%(24,50 г/л)	490,0мкг
2	70,5 г/л	41,6% (29,33 г/л)	586,6 мкг
3	81,5 г/л	40,8% (33,25 г/л)	665,0 мкг
4	86,6 г/л	44,1% (38,19 г/л)	763,8 мкг
5	71,1 г/л	43,3% (30,79 г/л)	615,8 мкг
6	71,5 г/л	43,3% (30,96 г/л)	619,2 мкг
7	75,5 г/л	43,3% (32,69 г/л)	653,8 мкг
8	79,2 г/л	44,1% (34,93 г/л)	698,6 мкг
9	70,5 г/л	41,6% (29,33 г/л)	586,6 мкг
10	71,1 г/л	34,4% (24,46 г/л)	489,2 мкг
2 группа ишемическая болезнь сердца (возраст от 35 до 61 года)			
1	74,0 г/л	41,6% (30,78 г/л)	615,6 мкг
2	71,1 г/л	41,6% (29,58 г/л)	591,6 мкг
3	68,4 г/л	40,0% (27,36 г/л)	547,2 мкг
4	79,2 г/л	41,0% (32,47 г/л)	649,4 мкг
5	76,3 г/л	41,0% (31,28 г/л)	625,6 мкг

6	76,3 г/л	40,0% (30,52 г/л)	610,4 мкг
7	98,8 г/л	46,6% (46,04 г/л)	920,8 мкг
8	73,3 г/л	45,0% (32,99 г/л)	659,8 мкг
9	71,1 г/л	43,3% (30,79 г/л)	615,8 мкг
10	91,0 г/л	36,5% (33,22 г/л)	664,4 мкг
3 группа подагра (возраст от 40 до 65 лет)			
1	75,1 г/л	44,1% (33,12 г/л)	662,4 мкг
2	92,1 г/л	48,3% (44,48 г/л)	889,6 мкг
3	82,4 г/л	46,6% (38,40 г/л)	768,0 мкг
4	75,1 г/л	41,0% (30,79 г/л)	615,8 мкг
5	91,6 г/л	46,6% (42,69 г/л)	853,8 мкг
6	75,1 г/л	34,4% (25,83 г/л)	516,6 мкг
7	69,4 г/л	34,9% (24,22 г/л)	484,4 мкг
4 группа – обследование (возраст от 14 до 65 лет)			
1	81,5 г/л	38,3% (31,21 г/л)	624,2 мкг
2	91,6 г/л	35,6% (32,61 г/л)	652,2 мкг
3	51,6 г/л	31,5% (16,25 г/л)	325,0 мкг
4	76,9 г/л	34,2% (26,30 г/л)	526,0 мкг
5	70,5 г/л	32,8% (23,12 г/л)	462,4 мкг
6	56,1 г/л	32,1% (18,01 г/л)	360,2 мкг
7	65,8 г/л	31,5% (20,73 г/л)	414,6 мкг
8	77,9 г/л	34,9% (27,19 г/л)	543,8 мкг
5 группа – разные заболевания (возраст от 28 до 63 лет)			
1	74,6 г/л	35,6% (26,56 г/л)	531,2 мкг
2	80,4 г/л	34,2% (27,50 г/л)	550,0 мкг
3	74,6 г/л	34,9% (26,04 г/л)	520,8 мкг
4	88,0 г/л	36,0% (31,68 г/л)	633,6 мкг
5	80,4 г/л	36,3% (29,19 г/л)	583,8 мкг
6	71,5 г/л	32,8% (23,45 г/л)	469,0 мкг

7	77,9 г/л	34,2% (26,64 г/л)	532,8 мкг
8	72,8 г/л	35,4% (25,77 г/л)	515,4 мкг
9	74,0 г/л	36,3% (26,86 г/л)	537,2 мкг
10	76,3 г/л	35,4% (27,01 г/л)	540,2 мкг

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

Непосредственно перед экспериментом образцы сыворотки крови размораживали и отбирали аликвоты для исследований.

Для каждого препарата приготавливали в двух повторах инкубационную смесь, состоящую из 270 мкл буферного раствора (10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4) и 20 мкл сыворотки крови. В образцы вносили отдельно в каждый раствор по 1 мкг меченных тритием препаратов дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида в 10 мкл раствора. Все образцы с препаратами делали в двух повторах, одна часть образцов с внесенными мечеными препаратами использовалась в качестве контрольных образцов с внутренним стандартом, а вторая часть образцов использовалась для измерения связывания препаратов с белками. После подготовки образцов пять пробирок с образцами инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации отделяли фракцию белков гель-фильтрацией на одноразовых отдельных микроколонках, содержащих по 100 мг SephadexG25, предварительно уравновешенных буферным раствором (10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4). На одну колонку наносили весь объем реакционной смеси отдельного препарата, элюировали буферным раствором, собирали первую фракцию 300 мкл, и измеряли радиоактивность. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).

Для решения проблемы тушения сцинтилляции и сохранения точности измерения нами был использован метод внутреннего стандарта. Для каждого измерения отбирали по две аликвоты сыворотки крови – одну аликвоту ис-

пользовали для приготовления реакционной смеси с добавлением меченого препарата (по 1 мкг) с дальнейшей инкубацией, последующей гель-фильтрацией и измерением радиоактивности в первой фракции белков, а вторую аликвоту использовали для контрольной реакционной смеси с добавлением стандартного количество меченого препарата (по 1 мкг) и измерением радиоактивности. Измеренную в контрольном образце радиоактивность принимали за 100%. Содержание связанного с белками меченого препарата рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{B}{A} \times 100$$

Где А - % меченого препарата, связанного с белками.

В - счет радиоактивности в образце (имп/мин)

С - счет радиоактивности в контроле (имп/мин)

Соответственно, количество меченого препарата, связавшегося с фракцией белков, пересчитывали из процентов от общего количества меченого препарата, внесенного в инкубационную смесь (1 мкг).

Полученные количественные значения меченого препарата, связанного с общими белками сыворотки крови, пересчитывали на концентрацию альбумина в сыворотке крови.

Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченого препарата, связанного с белками сыворотки крови. Результаты представлены в таблице 4.2 и на рисунке 4.1.

Таблица 4.2

Обобщенные результаты связывания меченых препаратов дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови по группам заболеваний

№ образца (пациента)	Количество связанного с белками меченого препарата				
	изониазида, нг/20 мкл сыворотки	этамбутола, нг/20 мкл сыворотки	преднизолона, нг/20 мкл сыворотки	дротаверина, нг/20 мкл сыворотки	фуросемида, нг/20 мкл сыворотки
Группа 1 - Гипертоническая болезнь (10 человек)					
1	217,2 нг	382,8 нг	171,4 нг	514,7 нг	288,4 нг
2	331,4 нг	256,4 нг	147,9 нг	391,3 нг	302,8 нг
3	351,7 нг	347,2 нг	311,6 нг	812,5 нг	218,4 нг
4	234,5 нг	275,3 нг	189,5 нг	700,0 нг	277,6 нг
5	385,0 нг	159,0 нг	189,4 нг	333,3 нг	276,3 нг
6	221,8 нг	253,1 нг	200,5 нг	149,4 нг	198,9 нг
7	345,0 нг	268,0 нг	177,5 нг	417,9 нг	168,9 нг
8	302,0 нг	236,4 нг	176,2 нг	672,9 нг	420,3 нг
9	202,8 нг	215,6 нг	198,5 нг	956,5 нг	309,9 нг
10	295,2 нг	263,6 нг	190,4 нг	731,7 нг	239,2 нг
Группа 2– ишемическая болезнь сердца (10 человек)					
1	165,4 нг	201,8 нг	130,2 нг	759,5 нг	214,8 нг
2	203,6 нг	202,7 нг	297,4 нг	423,4 нг	222,8 нг
3	255,2 нг	260,9 нг	177,2 нг	729,9 нг	372,1 нг
4	215,5 нг	198,4 нг	117,3 нг	314,0 нг	285,8 нг
5	327,1 нг	228,7 нг	121,8 нг	813,7 нг	388,2 нг
6	239,2 нг	149,6 нг	380,9 нг	227,6 нг	381,9 нг
7	193,7 нг	241,3 нг	158,7 нг	965,8 нг	713,3 нг
8	278,5 нг	309,7 нг	128,2 нг	148,4 нг	297,4 нг
9	293,3 нг	165,8 нг	288,5 нг	451,3 нг	410,5 нг
10	422,6 нг	175,0 нг	131,5 нг	362,6 нг	243,5 нг
Группа 3 – подагра (7 человек)					
1	334,0 нг	199,3 нг	332,5 нг	724,8 нг	249,1 нг

2	151,2 нг	214,3 нг	213,4 нг	538,5 нг	346,9 нг
3	326,9 нг	268,0 нг	236,4 нг	535,1 нг	211,8 нг
4	265,5 нг	313,0 нг	303,2 нг	182,4 нг	402,8 нг
5	206,8 нг	284,8 нг	273,3 нг	873,1 нг	307,5 нг
6	319,7 нг	371,0 нг	263,9 нг	427,0 нг	240,7 нг
7	251,1 нг	223,4 нг	237,3 нг	579,9 нг	144,0 нг
Группа 4 – обследование (9 человек)					
1	159,2 нг	271,5 нг	511,1 нг	243,8 нг	199,9 нг
2	149,5 нг	251,6 нг	208,1 нг	536,6 нг	144,1 нг
3	186,3 нг	262,9 нг	262,6 нг	479,0 нг	203,1 нг
4	324,6 нг	367,8 нг	243,8 нг	428,6 нг	179,7 нг
5	227,5 нг	217,7 нг	319,2 нг	562,1 нг	223,3 нг
6	555,7 нг	441,1 нг	226,8 нг	280,4 нг	182,0 нг
7	198,7 нг	770,2 нг	186,5 нг	516,9 нг	297,1 нг
8	310,3 нг	305,5 нг	833,0 нг	757,8 нг	231,7 нг
9	181,8 нг	631,7 нг	69,3 нг	563,2 нг	245,6 нг
Группа 5 – разные заболевания (10 человек)					
1	171,6 нг	611,7 нг	167,2 нг	246,2 нг	389,9 нг
2	179,3 нг	405,1 нг	121,5 нг	217,5 нг	337,5 нг
3	207,9 нг	247,5 нг	212,7 нг	459,3 нг	156,5 нг
4	220,8 нг	283,7 нг	243,9 нг	954,1 нг	321,0 нг
5	500,0 нг	482,0 нг	180,1 нг	567,9 нг	185,0 нг
6	233,0 нг	349,2 нг	177,3 нг	525,0 нг	312,1 нг
7	518,6 нг	248,1 нг	217,2 нг	152,4 нг	281,3 нг
8	286,3 нг	380,5 нг	177,1 нг	364,6 нг	312,3 нг
9	237,4 нг	207,6 нг	222,9 нг	76,6 нг	169,1 нг
10	286,8 нг	242,3 нг	184,6 нг	303,7 нг	164,2 нг

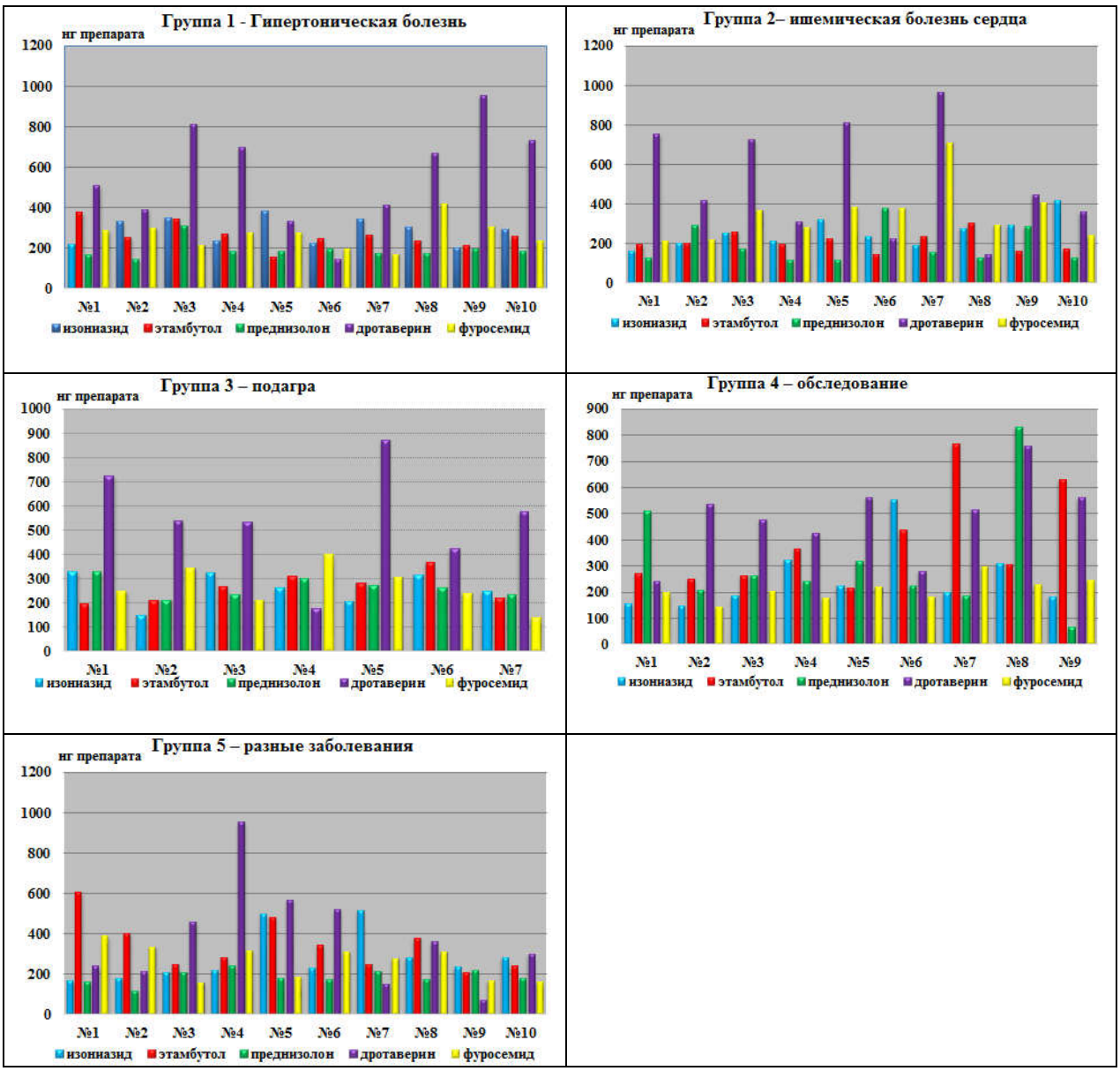


Рис 4.1. Связывание меченых дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови больных в пяти группах

Нами было обнаружено, 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 4.2).

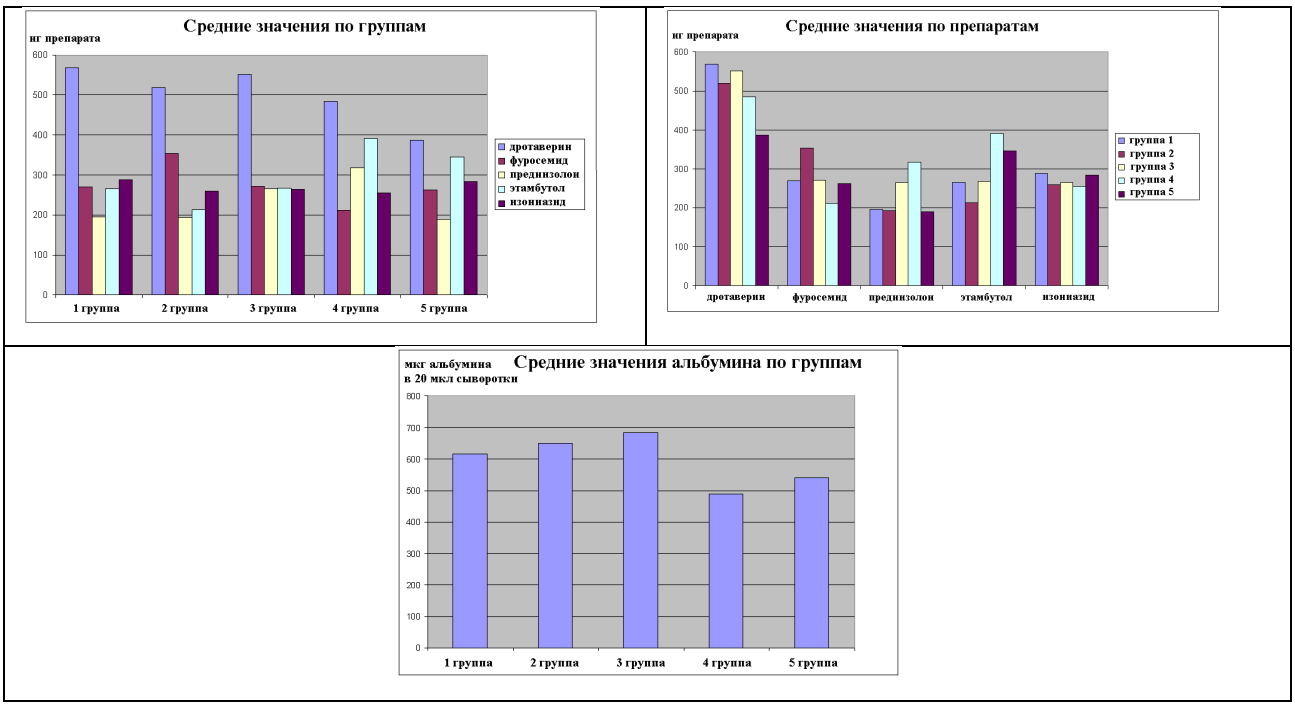


Рис 4.2. Средние значения связывания меченых дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови больных в пяти группах

Нами были получены точные количественные характеристики связывания меченых тритием дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови больных при гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и подагре. Нами было обнаружено, что в группах больных с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца и подагрой 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.

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

Разработанный радиохимический аналитический метод был использован в лаборатории ядерной медицины ИЯФ АН РУз для исследования влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на сыворотку крови in vitro. Исследования проводились в рамках темы ФА-А14-Ф068 «Создание научно-технической базы для развития метода нейтрон захватной терапии на реакторе ВВР-СМ ИЯФ АН РУз». 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) [144; с.676-678].

Бор нейтронно-захватная терапия является одним из развивающихся направлений в современной онкологии. Сущность метода в том, что в опухоль вводится препарат содержащий элемент значительным сечением захвата тепловых нейтронов, в частности бор, и облучается пучком нейтронов. При этом излучение, которое возникает в опухоли при реакции нейтронного захвата ^{10}B, поражает опухолевые ткани. Однако, на фоне облучения нейтронами и сопутствующего гамма излучения могут иметь место различные побочные эффекты, которые до конца не изучены. Одним из таких эффектов может быть влияние на связывающую способность сывороточного альбумина крови. Высокий поток нейтронов и гамма излучения может вызвать конформационные изменения в структуре альбумина, которые в свою очередь приводят к нарушению его связывающей способности.

Связывание лекарственных веществ с белками плазмы и, прежде всего, с сывороточным альбумином является одним из важных фармакокинетических параметров, определяющих распределение лекарств в организме. Облучение пучком нейтронов и сопутствующими высокоэнергетическими гамма квантами, при нейтрон-захватной терапии, может привести к нарушению конформации в структуре альбумина, что способствует изменению связывания лекарств и продуктов метаболизма. В конечном итоге происходят изменения в функциональной активности альбуминов и нарушение транспортной функции последнего, что сопровождается и модификацией параметров фармакокинетики лекарственных препаратов применяемых для лечения.

Необходимо отметить, что в нейтрон-захватной терапии для усиления эффекта воздействия нейтронов, используется препарат содержащий бор-10, которое при последующем облучении нейтронами дает вторичное излучение поражающее опухолевые клетки. Вторичное излучение бора, определяется образованием бора 11 по реакции $^{10}B(n,\gamma)^{11}B$, которое за несколько секунд распадается на ядро лития-7 и альфа частицу, что также может быть фактором разрушающим альбумин (рисунок 4.3).

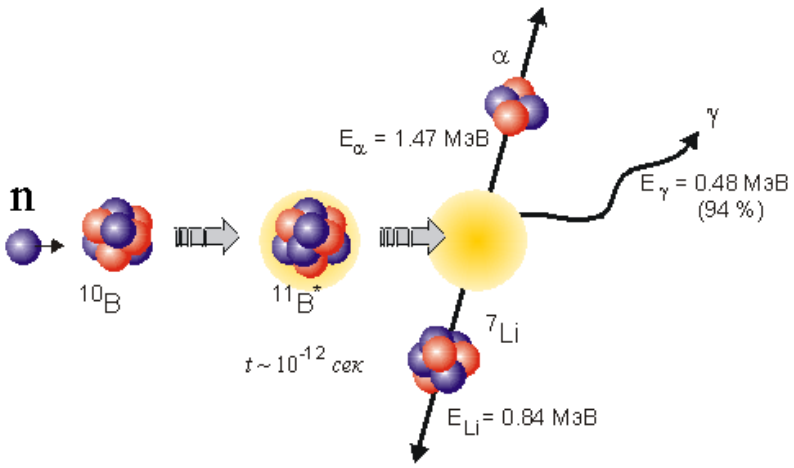


Рис. 4.3. Механизм реакции нейтронного захвата ^{10}B

Целью проведенных исследований являлась оценка влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов и нейтронно-захватной реакции бора на связывающую способность альбумина сыворотки крови, с использованием ме-

ченных тритием препаратов изониазида, этамбутола и преднизолона дротаверина и фуросемида.

Расчеты доз для экспериментов с сывороткой крови были проведены специалистами лаборатории ядерной медицины ИЯФ АН РУз по общепринятым методикам.Общая поглощенная доза в мишени при облучении эпитепловым нейтронным пучком состоит из четырех компонентов: это дозы создаваемые в мишени эпитепловыми нейтронами, быстрыми нейтронами, γ-излучением присутствующим в пучке и доза от нуклида (^{10}B). Были проведены исследования [145; с.127-138] для расчета дозы в присутствии ^{10}B, которая может быть выражена в следующем виде:

$$D_{общ} = D_n + D_\gamma + \rho_B(D^n_{1ppmB} + D^\gamma_{1ppmB}) \quad (1)$$

Где D_n и D_γдозы создаваемые нейтронамии γ-излучением, ρ_B – концентрация бора в ppm –единицах D^n_{1ppmB} и D^γ_{1ppmB} эти дозы создаваемые нейтронами и γ-излучением в присутствии 1 ppm^{10}B. Для определение общую поглощенную дозу требуются точные сведений об интегральной поглощенной энергии от этих излучений. Имеющиеся данные разных авторов по энерговыделению и распределению дозы являются неполными, а зачастую и противоречивыми. Точное измерение поглощенной дозы в экспериментах с эпитепловыми нейтронами является сложной ядерно-физической задачей. Поэтому для оценки поглощенной дозы удобным является определение кермы. Преимуществом кермы является возможность определения её расчетными путями. Для определения кермы при известном спектре нейтронов в точке с координатами - rиза время - t используется следующее выражение:

$$K(r,t) = \int dE \cdot \Phi(r,E) \sum w_i(r,t)\, k_i(E) \quad (2)$$

где, E - энергия нейтронов, МэВ; $\Phi(r,E)dE$-плотность потока нейтронов в точке с координатами r в интервале энергии dE, нейтрон/см^{2}с, $w_i(r,t)$-относительная фракция нуклида, рассчитанная с учетом его распределения во времени, $k_i(E)$- удельная керма (керма фактор) i-того нуклида в зависимости от энергии. Исходя из этого формулу (1) можно написать в следующем виде:

$$K_{общ} = K_n + K_\gamma + \rho_B(k^n_{1ppmB} + k^\gamma_{1ppmB}) \quad (3)$$

Для определения кермы в образце сыворотки с бором при облучении эпитепловым нейтронным пучком ВВР-СМ АН РУз требуется определение удельной кермы в зависимости от энергии нейтронов для каждого элемента образца сыворотки. Плотность потока нейтронов на месте облучения образцов измеряли методом активации фольг. Данные по нейтронным керма-факторам элементов сыворотки, использованные в вычислениях были взяты из электронной базы данных EPAPS (http://ftp.aip.org/epaps/medical_phys/E-MPHYA6-29-009201/). Проведенные расчеты [146; с.166-170] позволили определить мощности кермы:

$K_n = 1{,}47445\times10^{-4}$ Гр /с и $K_\gamma = 3{,}21591\times10^{-9}$ Гр /с для 1г вещества

$k^n_{1ppmB}=2{,}42689\times10^{-5}$ Гр /с и $k^\gamma_{1ppmB} =1{,}22\times10^{-10}$ Гр /с для 1 ppm ^{10}B

Полученные расчеты были использованы в диссертационном исследовании для определения поглощенных доз при облучении экспериментальных образцов сыворотки крови человека.

Необходимо подчеркнуть, что данные исследования, были первыми медико-биологическими исследованиями нейтрон-захватной терапии, проведенными на биологических образцах на пучке эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ ИЯФ АН РУз. До настоящего времени в научной литературе не обнаружено данных о влиянии нейтронного излучения и излучения бор-нейтрон-захватной реакции на транспортную функцию сывороточных белков крови человека, что показывет научную новизну полученных результатов диссертационной работы.

§ 4.2.1. Исследование фонового влияния облученияэпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили в Ташкентской Медицинской Акаде-

мии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. Для проведения нашего исследования 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. Характеристики образцов сыворотки крови представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3

Характеристики исследованных образцов

№ образца сыворотки крови	Содержание общего белка	Содержание альбумина	Содержание альбумина в 20 мкл сыворотки
1	74 г/л	54% (40.0 г/л)	799,2 мкг
2	78 г/л	57% (44,5 г/л)	889,2 мкг
3	78 г/л	62% (48,4 г/л)	967,2 мкг
4	80 г/л	60% (48,0 г/л)	960,0 мкг
5	75 г/л	62% (46,5 г/л)	930,0 мкг
6	82 г/л	62% (50,8 г/л)	1016,8 мкг
7	80 г/л	60% (48,0 г/л)	960,0 мкг

Эксперименты проводили по следующей схеме:

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

Аликвоты образцов сыворотки по 250 мкл облучали на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа нейтронным пучком, мощность реактора 10 МВт. Плотность потока нейтронов на месте облучения образцов измеряли методом активации фольг.

В качестве источника бора использовали боратный буфер с pH 7,4. 14,086 мМ раствор боратного буфера содержит 152,284 мкг/мл природного бора, из которого содержание ^{10}B составляет 30 мкг/мл.

По литературным данным эффективная концентрация ^{10}B в облучаемой опухоли составляет примерно 30 мкг/г. Для оценки воздействия нейтронного облучения на белки сыворотки крови нами была выбрана 50 мМ концентрация боратного буфера (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 в отличие от фармакологических препаратов не влияет на связывание фармакологических препаратов с белками сыворотки крови.Это в свою очередь позволяет изменять концентрацию бора в исследуемом образце в большом диапазоне.

Конечная концентрация боратного буфера в образце составляла 50 мМ (= 106,49 мкг/мл ^{10}B). Одну часть образцов облучали пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа. Другую часть использовали для измерения связывающей способности белков. Концентрация ^{10}B ρ_B=106,49мкг/мл=106,49 ppm

Проведенные расчеты (см. раздел 1.11.2) позволили определить следующие значения поглощенной дозы:

$K_{общ}$ = 0,1327 Гр доза для образцов без бора

$K_{общ}$ = 9,4365 Гр доза для образцов с бором.

После облучения анализировали связывающую способность белков, как описано ниже.

Для измерения связывающей способности белков приготавливали инкубационную смесь: 10 мкл (1 мкг) меченого препарата (дротаверина, фуросемида, изониазида, этамбутола, или преднизолона) + 270 мкл буфера + 20

мкл сыворотки. Образцы делали в двух повторах – один образец использовали в качестве контроля с внутренним стандартом, а второй использования для измерения связывания препаратов с белками после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG25. В образцы вносили по 1 мкг препаратов дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида в 10 мкл раствора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации отделяли фракцию белков гель-фильтрацией на одноразовых отдельных микроколонках, содержащих по 100 мг SephadexG25, предварительно уравновешенных буферным раствором (10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4). На одну колонку наносили весь объем реакционной смеси отдельного препарата, элюировали буферным раствором, собирали первую фракцию 300 мкл, и измеряли радиоактивность. В контрольном образце измеряли радиоактивность без гель-фильтрации, чтобы определить степень тушения сцинтилляции и эффективность счета сцинтиллятора в каждом образце. Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченого препарата, связанного с белками сыворотки крови. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).

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 в таблице 4.5 и на рисунке 4.3.

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.

Таблица 4.5

Связывание меченных дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ

№ образца	Количество связанного с белками меченого препарата, нг/20 мкл сыворотки				
	изониазид	этамбутол	преднизолон	дротаверин	фуросемид
Сыворотка крови до облучения нейтронным пучком					
1	136,1 нг	539,7 нг	211,8 нг	576,5 нг	67,8 нг
2	920,3 нг	524,7 нг	193,5 нг	14,7 нг	120,8 нг
3	166,8 нг	136,5 нг	189,8 нг	630,8 нг	235,0 нг
4	195,3 нг	306,1 нг	177,4 нг	314,0 нг	190,3 нг
5	148,9 нг	442,2 нг	144,8 нг	362,7 нг	366,8 нг
6	242,4 нг	245,7 нг	36,3 нг	653,1 нг	345,3 нг
Сыворотка крови после облучения нейтронным пучком					
1	149,6 нг	257,0 нг	84,3 нг	162,3 нг	164,2 нг
2	78,0 нг	265,2 нг	97,1 нг	118,8 нг	254,6 нг
3	141,4 нг	567,0 нг	241,7 нг	420,7 нг	237,6 нг
4	136,8 нг	409,1 нг	79,8 нг	560,0 нг	394,5 нг
5	380,4 нг	335,7 нг	202,8 нг	392,2 нг	289,7 нг
6	246,5 нг	207,2 нг	120,5 нг	445,4 нг	328,8 нг

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1) Облучение сыворотки крови человека пучком эпитепловых нейтроновна реакторе ВВР-СМ с поглощенной дозой 0,1327 Гр меняет характеристики связывания меченных 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.

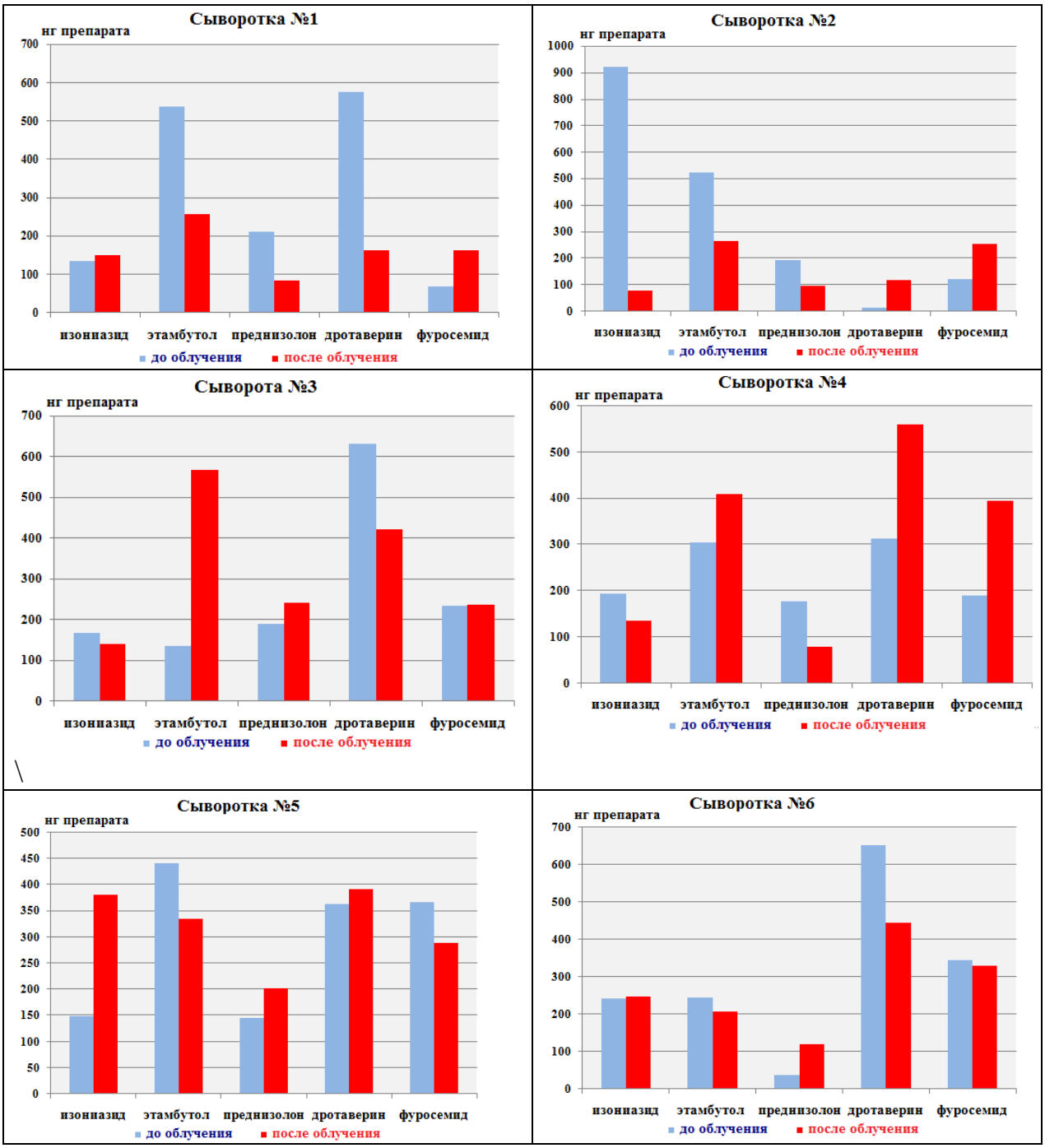


Рис. 4.3. Связывание меченных дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ (в норме концентрация альбумина в сыворотке крови = 35-50 г/л)

§ 4.2.2. Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека вприсутствии боратного буфера

Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили в Ташкентской Медицинской Академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии как указано ранее (см. § 4.2.1). Характеристики образцов сыворотки крови представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6

Характеристики исследованных образцов

№ образца сыворотки крови	Содержание общего белка	Содержание альбумина	Содержание альбумина в 20 мкл сыворотки
1	74 г/л	55%(40,70 г/л)	814,0 мкг
2	73 г/л	59% (43,07 г/л)	861,4 мкг
3	76 г/л	57% (43,32 г/л)	866,4 мкг
4	74 г/л	59% (43,66 г/л)	873,2 мкг
5	80 г/л	59% (47,20 г/л)	944,0 мкг
6	80 г/л	60% (48,00 г/л)	960,0 мкг

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 нами была выбрана 50 мМ концентрация боратного буфера (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.

Эксперименты проводили по следующей схеме. Приготовили 6 образцов сывороток. Каждый образец сыворотки был поделен на две части по 250 мкл, в которые внесли 27 мкл 0,5 М боратного буфера. Конечная концентрация боратного буфера в образце составляла 50 мМ (= 106,49 мкг/мл ^{10}B). Одну часть образцов облучали пучком эпитепловых нейтроновкак указано ранее (см. § 4.2.1). Другую часть использовали для измерения связывающей способности белков без облучения.

Для измерения связывающей способности белков приготавливали инкубационную смесь: 10 мкл (1 мкг) меченого препарата (дротаверина, фуросемида, изониазида, этамбутола, или преднизолона) + 270 мкл 50 мМ боратного буфера, 0,14 MNaCl, pH 7,4 + 20 мкл сыворотки. Образцы делали в двух повторах – один образец использовали в качестве контроля с внутренним стандартом, а второй использования для измерения связывания препаратов с белками после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG25. В образцы вносили по 1 мкг препаратов дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида в 10 мкл раствора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации отделяли фракцию белков гель-фильтрацией на одноразовых отдельных микроколонках, содержащих по 100 мг SephadexG25, предварительно уравновешенных буферным раствором (50 мМ боратный буфер, 0,14 MNaCl, pH 7,4). На одну колонку наносили весь объем реакционной смеси отдельного препарата, элюировали буферным раствором, собирали первую фракцию 300 мкл, и измеряли радиоактивность. В контрольном образце измеряли радиоактивность без гель-фильтрации, чтобы определить степень тушения сцинтилляции и эффективность счета сцинтиллятора в каждом образце. Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченного препарата, связанного с белками сыворотки крови. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г PPO и 0,05 г POPOP).

Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченного препарата, связанного с белками сыворотки крови. Обобщенные результаты

связывания меченых препаратов с белками сыворотки крови до и после облучения эпитепловыми нейтронами представлены в таблице 4.7 и на рисунке 4.4.

Таблица 4.7

Связывание меченых дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки

№ образца	Количество связанного с белками меченого препарата, нг/20 мкл сыворотки				
	изониазид	этамбутол	преднизолон	дротаверин	фуросемид
Сыворотка крови в 50мМборатном буфере до облучения нейтронным пучком					
1	250,2	401,1	200,5	796,6	472,8
2	287,3	312,1	164,1	441,0	311,9
3	338,0	150,7	122,5	663,0	300,7
4	311,4	196,0	273,5	947,7	369,3
5	402,9	389,9	139,3	896,9	194,9
6	364,0	511,5	247,3	691,8	411,0
Сыворотка крови в 50мМборатном буфере после облучения нейтронным пучком					
1	743,0	294,0	308,2	919,1	428,5
2	184,7	213,6	117,6	815,8	276,5
3	104,4	219,3	367,4	52,4	175,1
4	260,3	219,7	132,4	935,8	260,3
5	208,9	315,5	227,9	400,0	291,1
6	176,9	294,7	317,7	907,0	529,7

Также как и в случае с фоновым облучением (без бора) нами было обнаружено, что облучение эпитепловым нейтронным пучком сыворотки крови человека в 50 мМ боратном буфере (с концентрацией ^{10}B 106,49 мкг/мл)

меняет характеристики связывания меченных тритием фармакологических препаратов с транспортными белками сыворотки в различной степени. При этом наблюдается как уменьшение связывания, так и увеличение связывания, 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.

Рис. 4.4. Связывание меченных дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облуче-

ния пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ в 50 мМ боратном буфере (в норме концентрация альбумина в сыворотке крови = 35-50 г/л)

Полученные данные вполне согласуются с литературнымиданными, 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.

§ 4.2.3. Исследование влияния облучения эпитепловыми нейтронами на связывающую способность белков сыворотки крови человека вприсутствии 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 в Ташкентской Медицинской Академии на кафедре клинической фармакологии как указано ранее (см. § 4.2.1). Характеристики образцов сыворотки крови представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8

Характеристики исследованных образцов

№ образца сыворотки крови	Содержание общего белка	Содержание альбумина	Содержание альбумина в 20 мкл сыворотки
1	70 г/л	54% (37,8 г/л)	756 мкг
2	77 г/л	56% (43,12 г/л)	862,4 мкг

3	72 г/л	56% (40,32 г/л)	806,4 мкг
4	77 г/л	58% (44,66 г/л)	893,2 мкг
5	83 г/л	61% (50,63 г/л)	1012,6 мкг
6	80 г/л	62% (49,6 г/л)	992 мкг

В качестве бор-содержащего 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.

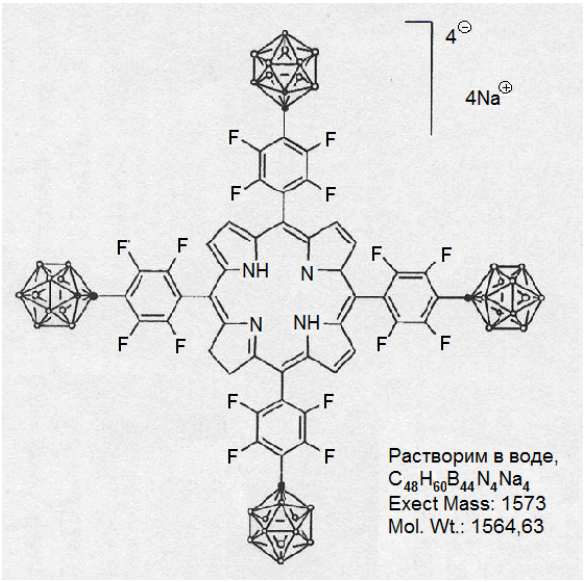


Рис. 4.5 Структурная формула {5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий

В 1 М борсодержащего препарата (1564,63 г) содержится 44 М природного бора (475,64 г), из которых ^{10}B (19,7%) – 93,70 г, а B^{11}(80,3%) – 381,94 г. Содержание ^{10}B в борсодержащем препарате составляет 6,244% в/в. По литературным данным эффективная концентрация ^{10}B в облучаемой опухоли составляет примерно 30 мкг/г. Для оценки фонового воздействия нейтронного облучения на белки сыворотки крови нами была выбрана концентрация ^{10}B в 100 раз меньше (0,3122 мкг/мл ^{10}B). Выбор минимальной концентрации обу-

словлен, 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 метода позволяет определять минимальные концентрации фармакологических препаратов, связывающихся с белками, поэтому введение в образец больших количеств (> 1 мкг) борсодержащего 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) бор-содержащего препарата: {5,10,15,20-тетракис [n-(1'-карба-клозо-додекаборан-1'-ил) тетрафторфенил] 17,18- дигидропорфирин)} натрий. Борсодержащий 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 ранее (см. § 4.2.1). Поглощенная доза составляла0,1604 Гр. Другую часть использовали для измерения связывающей способности белков без облучения.

Для измерения связывающей способности белков приготавливали инкубационную смесь: 10 мкл (1 мкг) меченого препарата (дротаверина, фуросемида, изониазида, этамбутола, или преднизолона) + 270 мкл буфера + 20 мкл сыворотки. Образцы делали в двух повторах – один образец использовали в качестве контроля с внутренним стандартом, а второй использования для измерения связывания препаратов с белками после гель-фильтрации на микроколонке с SephadexG25. В образцы вносили по 1 мкг препаратов дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида в 10 мкл раствора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После

инкубации отделяли фракцию белков гель-фильтрацией на одноразовых отдельных микроколонках, содержащих по 100 мг SephadexG25, предварительно уравновешенных буферным раствором (10 мМ Трис-HCl, 0,14 MNaCl, pH 7,4). На одну колонку наносили весь объем реакционной смеси отдельного препарата, элюировали буферным раствором, собирали первую фракцию 300 мкл, и измеряли радиоактивность. В контрольном образце измеряли радиоактивность без гель-фильтрации, чтобы определить степень тушения сцинтилляции и эффективность счета сцинтиллятора в каждом образце. Измеренную радиоактивность пересчитывали на количество меченого препарата, связанного с белками сыворотки крови. Радиоактивность измеряли на счетчике РЖС-05 в толуольном сцинтилляторе (в 1л толуола 4г РРО и 0,05 г РОРОР).

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 в таблице 4.9 и на рисунке 4.6.

Нами 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 меченными дротаверином, фуросемидом, преднизолоном, этамбутолом и изониазидом.

Установлено, что после облучения сыворотки крови пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ в присутствии бор-содержащего препарата происходит изменение связывающей способности альбумина. При этом наблюдается как уменьшение связывания, так и увеличение связывания, что свидетельствует о функциональной активности связывающих сайтов молекулы альбумина.

Таблица 4.9

Связывание меченых дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови с борсодержащим препаратом до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов на реакторе ВВР-СМ

№ образца	Количество связанного с белками меченого препарата, нг/20 мкл сыворотки				
	изониазид	этамбутол	преднизолон	дротаверин	фуросемид
Сыворотка кровидо облучения нейтронным пучком					
1	166,2 нг	281,8 нг	139,3 нг	324,3 нг	256,7 нг
2	334,1 нг	443,3 нг	251,8 нг	423,4 нг	137,6 нг
3	284,6 нг	391,1 нг	113,8 нг	518,0 нг	252,3 нг
4	200,0 нг	287,1 нг	142,3 нг	371,5 нг	217,1 нг
5	219,6 нг	422,0 нг	141,4 нг	413,0 нг	367,2 нг
6	308,1 нг	401,2 нг	77,6 нг	539,1 нг	319,3 нг
Сыворотка кровипосле облучения нейтронным пучком					
1	210,9 нг	129,6 нг	116,3 нг	330,9 нг	177,0 нг
2	294,7 нг	806,1 нг	273,5 нг	421,8 нг	572,5 нг
3	231,1 нг	672,5 нг	137,5 нг	308,1 нг	206,3 нг
4	375,9 нг	274,5 нг	168,8 нг	944,2 нг	262,6 нг
5	131,3 нг	286,9 нг	146,6 нг	273,8 нг	230,5 нг
6	192,4 нг	568,9 нг	224,7 нг	744,3 нг	453,5 нг

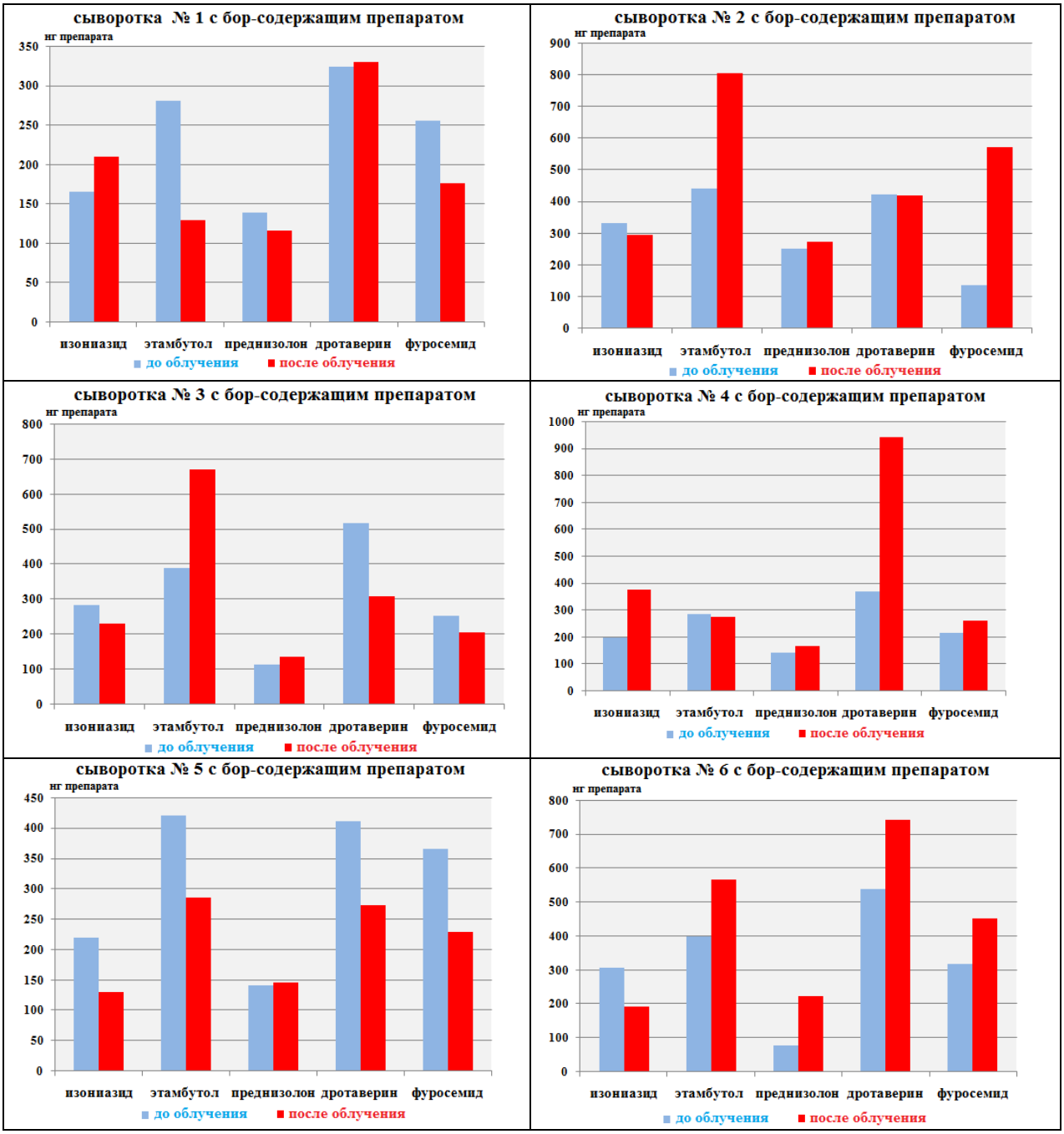


Рис. 4.6. Связывание меченных дротаверина, фуросемида, преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облучения пучком эпитепловых нейтронов в присутствии борсодержащего препарата (в норме концентрация альбумина в сыворотке крови = 35-50 г/л)

Исходя из полученных данных можно сделать следующие выводы:

- облучение сыворотки крови человека в присутствии борсодержащего препарата на реакторе ВВР-СМ в течение 1 часа пучком эпитепловых ней-

троновменяет характеристики связывания меченных тритием фармакологических препаратов с транспортными белками сыворотки крови человека;

- 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 присутствии борсодержащего препарата в конечной концентрации борсодержащего препарата 5 мкг/мл (0,3122 мкг/мл ^{10}B) в целом 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 меченных тритием препаратов методом тонкослойной хроматографии.
3. Разработан радиохимический аналитический метод для определения связывающей способности белков сыворотки крови с помощью меченных 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. Разработанный радиохимический аналитический метод использован в совместных с Ташкентской Медицинской Академией МЗ РУз исследованиях in vitro связывающей способности белков сыворотки крови пациентов с гипертонической болезнью, ишемической болезнью сердца и подагрой.
6. Впервые установлена степень влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов на связывающую способность белков сыворотки крови методом «in vitro».
7. 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 бор-содержащего препарата.
8. 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. - М.: Наука, 2003. – 246 с.
2. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Твердофазный метод ввдения тритиевой метки в биологически активный соединения // Успехи химии. – Москва, 2003.- № 72 (5). –С. 471-497.
3. Миклухин Г. П. Изотопы в органической химии. – Киев: Издательство АН УССР, 1961. - 685 с.
4. Филатов Э.С., Симонов Е.Ф. Физико-химические и ядерно-химические способы получения меченых органических соединений и их идентификация. - М.:Энергоатомиздат, 1987. – 348 с.
5. Мэррей А., Уильямс Д.Л.. Синтезы органических соединений с изотопами голоидов, азота, кислорода, фосфора, серы. Часть 3. - Москва. Издательство. ИЛ, 1962. – 480 с.
6. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Синтез и исследование тритий-меченных липидов и их аналогов // Химико-фармацевтический журнал. – Москва, 1999. –№ 6 (33). – С. 14-27.
7. SchrammS.I.,NagaevI.Yu., ShevchenkoV.P., ArkhipovaA.S., MyasoedovN.F., SabirshA., Haeggström. Preparation of high specific activity tritium-labelled leukotriene B4 suitable for radioligand binding assay // Journal of Labelled Compound sand Radiopharmaceuticals, 2008. –№ 2(51). – С. 101-105.
8. Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник. - Л.: Химия, 1978. – 389 с.
9. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A. Solid phase isotope exchange with spillover hydrogen in amino acids, peptides, and proteins. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. January 2005. –Vol. 31, Iss. 1, - pp 1–17.
10. Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. Optimization of Conditions for Tritium Labeling of Organic Compounds by Isotope Exchange with Tri-

tium Water, Based on the Concepts of Reactions on the Catalyst Surface. // Radiochemistry, 2005. – Vol. 47, - pp. 403–409

11. Шевченко В.П. Синтез и исследование изотопномодифицированных липидов и их аналогов. Автореф. дис. канд. тех. наук. Москва, 1992. -7 с:

12. Макквиллин. Ф.Д. Гомогенное гидрирование в органической химии: Пер. с англ. М.: Химия, 1980. –160 с.

13. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Шевченко К.В., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. Селективное дегалоидирование и гидрирование тритием ненасыщенных соединений, адсорбированных на носителях // Перспективные материалы 2010. - № 8.- С. 263-269

14. Сидоров Г.В., Мясоедов Н.Ф., Синтез меченных тритием биологически важных диазинов // Успехи химии, 1999. – Т 68, № 3.- С. 254-266.

15. Бассалык Л. С, Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. и др. Определение рецепторов стероидных гормонов в гормонозависимых опухолях для назначения эндокринной терапии (методические рекомендации). — М.: 1987. - 16 с.

16. ШевченкоВ.П., НагаевИ.Ю. Синтез меченных тритием соединений липидной природы // Биорганическая химия 1999. – Т. 25, № 7.-С. 483-498.

17. Myasoedov N.F. Introduction of Tritium into Organic Compounds by Isotope Exchange Reactions // Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. - 1993. - Vol.33,№ 5. - pp.391-401

18. Brewer J.R., Jones J.R., Eawrie K.W., Saunders D., Simmonds A. Applications of a polymer-supported acid catalyst to tritiation studies: implications concerning reaction mechanisms //Journal of the Chemical Society Chemical Communications. - 1990. -iss. 22. -pp. 1566-1567.

19. Hesk D., Jones J.R., S.Eockley W.J. Regiospecific tritium labeling of aromatic acids, amides, amines and heterocyclics using homogeneous rhodium trichloride and ruthenium acetylacetonate catalysts //Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals.- 1990. - Vol. 28. - pp. 1427-1436.

20. Brewer J.R., Jones J.R., Eawrie K.W., Saundersb D., Simmondsc A. Tritiationof organic compounds by polymer-supported acid catalysts. // Journal of La-

belled Compounds and Radiopharmaceuticals.- 1994. –Vol. 34, lss. 4.–pp. 391-400.

21. Brewer J.R., Jones J.R., Eawrie K.W., Saundersb D., Simmondsc A.Tritiation of organic compounds by polymer-supported base catalysts. // Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. - 1994. –Vol. 34, iss. 8. –pp. 787-794.

22. Buchman O., Pri-Bar I., Shimoni M. Catalyzed exchange between tritium gaz and organic molecules in solution/ // Journal of Labelled Compounds. Radiopharmaceuticals. -1978. - Vol. 14, № 1. –C. 155-159

23. Filikov A.V., Myasoedov N.F. The Kinetics of Solid-State Catalytic Tritiation of Thymine Journal of catalysis. - 1991. –V. 130. - pp. 569-576

24. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И., Мавлянов И.Р. Получение меченныхтритиемпрепаратовизониазида, этамбутола и преднизолона. // «Приоритетные направления в области науки и технологий в XXI веке»: VII международная научная конференция 30-31 мая 2014. – Ташкент(Узбекистан), 2014. –С.114-116.

25. 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.

26. YarmatovB.Kh., KimA.A., DjuraevaG.T., SadikovI.I. Applicationofmethodofthermalactivationoftritiumforobtainingoftritium labeled isoniazid, ethambuthol and prednisolone. // Oxford Review of Education and Science. - Oxford University Press: Oxford (United Kingdom), 2016. –No 1(11). -pp. 431-438

27. Сидоров В.Н., Щербаков Д.Ю., Рихтер В.А. Рабинов И.В. Способ получения меченных тритием органических соединений. Авторское свидетельство № SU 1631943 (1990)

28. Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Гольданский В.И., Колб В.А., Спирин А.С., Шишков А.В. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул.- Москва, 1999. – 175 с.

29. Шишков А.В., Баратова Л. А. Тритиевая планиграфия биологических систем // Успехи химии. – Москва, 1994. – Т 63, № (9). –С. 825-841.

30. Чернышева М. Г. Определение состава и строения поверхностных слоев молекулярных систем с помощью атомарного трития и меченных тритием соединений:Автореф. дис. канд.тех.наук. – Москва, 2008. - 28 с.

31. Бадун Г.А., Чернышева М.Г. Критический анализ применения меченных тритием соединений для фармакокинетических исследований // Сборник тезисов IX Российской конференции по радиохимии «Радиохимия 2018». - Санкт-Петербург (Россия), 2018.–476 с.

32. Бадун Г.А., Куликова Н.А., Чернышева М.Г., Тясто З.А., Коробков В.И., Федосеев В.М., Цветкова Е.А., Константинов А.И., Кудрявцев А.В., Перминова И.В. Тритиевая метка - уникальный инструмент для изучения поведения гуминовых веществ в живых системах // Вестник Московского университета. – Москва, 2009. - Т 50, №5.–С. 348-354.

33. Бадун Г.А. Меченые тритием соединения. – М.:МГУ им. М.В.Ломоносова, 2008.–38 с.

34. Чернышева М.Г., Бадун Г.А.Меченые тритием наноалмазы в физико-химических и биохимических исследованиях // IX Российская конференция с международным участием "Радиохимия 2018"17-21 сентября 2018. - Санкт-Петербург (Россия), 2018. – 104 с.

35. Kim A.A., Djuraeva G.T., Yarmatov B. Kh. Application of method of thermally activation of tritium for labeling of izoniazide //7th International Conference “Modern Problems of Nuclear Physics”, September 22-25, 2009: Book of Abstracts. – Tashkent (Uzbekistan), 2009. – p.232

36. Yarmatov B.Kh., Kim A.A., Djuraeva G.T. 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. – 33 p.

37. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Сманова З.А. Получение меченных тритием фармакологических препаратов изониазида и этамбуто-

ла//Материалы Республиканской научно-практической конференции «Взгляд молодых ученых на актуальные проблемы науки». - Ташкент, 2010. – 7 с.

38. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Сманова З.А. / Разработка методов получения меченных тритием фармакологических препаратов изониазида и этамбутола. // III Республиканская конференция молодых физиков «Ядерная физика и ядерные технологии», 1-2 декабря 2010: Сборник докладов. – Ташкент: Институт ядерной физики АН РУз, 2010. – С.146-150

39. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т. Мечение этамбутола термически активированным тритием //Доклады Академии Наук РУз. Ташкент: АН РУз, 2012. – №6. –С. 32-35

40. Голубицкий Г.Б., Басова Е.М., Иванов В.М. Влияние нагрузки на колонку на правильность результатов анализа таблеток ”Пенталгин Н” методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии. – Москва, 2008. - Т. 63, № 3.–С. 279-283.

41. СадекП. Растворители для ВЭЖХ: пер. с англ. / П. Садек. Москва, БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 704 с.

42. ВласовА.М., Чукарина Е.В., Эллер К.И., Раменская Г.В . Применение ВЭЖХ для анализа биологически активных компонентов чая. // Сборник трудов 10-го Международного конгресса Phytopharm.- СПб, 2006. – С. 38-43.

43. Иохансон Б.Г. Гель-фильтрация в тонком слое и её модификация.- В кн.: Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков.- М.:Мир, 1974. – 256 с.

44. Соркина Д.А., Коношенко С.В. О применении метода гель-фильтрации в тонком слое сефадекса для поерделения молекулярного веса альбуминов сыворотки крови //Прикладн. биохим. и микробиол. – М.:РАН, 1975. – Т. 9, №5.–С. 792-797.

45. Березкин В.Г., Кормишкина Е.В. Вариант традиционной тонкослойной хроматографии с контактно закрытым сорбционным слоем (Бескамерная ТСХ) // Журнал аналитической химии. – Москва,2006. –Т. 61, №10. –С. 1074-1080.

46. BerezkinV.G., BuzaevV.V. Newthin-layerchromatographyplatewithaclosedsorbentlayeranddetailsofitsapplication // Journal of Chromatography A.–Moscow, 1997 –Vol. 758. –pp. 125-134.

47. Березкин В.Г., Бузаев В.В. Новый вариант ТСХ с закрытым сорбционным слоем // Доклады АН. – Москва,1996. –Т. 347, № 4. –С. 481-485.

48. Березкин В.Г., Кормишкина Е.В. Вариант круговой тонкослойной хроматографии с закрытым сорбционным слоем // Журнал прикладной химии. – Москва, 2007. – Т. 80, № 6. –С. 932-937

49. Hahn-Deinstrop E. Applied thin-layer chromatography.- Weinheim: Wiley-VCH, 2007. –616 p.

50. Паньжин В.С., Будко Е.В., Голубицкий Г.Б. Применение ТСХ для контроля качества многокомпонентных препаратов ”Пенталгин ФС” и ”Пенталгин Н” // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. - 2009. - № 8. -С. 25-27.

51. Kim A.A., Djuraeva G.T., Zinovev P.V., Sadikov I.I., Rylov A.A. A new technique for tritium labeling of complex technical mixture of PCB congeners // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2007. - vol.272, N 3.–P.483-489

52. ЯкубовМ.Р., АрзамасцевА.П., ДорофеевВ.Л.Экспресс-анализ комбинированных противотуберкулезных средств методом ТСХ // Химия. Биология. Фармация. - 2006.- № (1). –С 230-232.

53. Якубов М.Р. Стандартизация и контроль качества противотуберкулезных лекарственных средств: Автореф. дис. канд. фарм.Наук. – Москва, 2007. –24 с.

54. ЯкубовМ.Р., АрзамасцевА.П., ДорофеевВ.Л.Установление подлинности комбинированных противотуберкулезных препаратов с использованием метода ТСХ // Человек и лекарство: Тез.докл. XII Росс.нац.конгр.-Москва, 2005. –С. 9.

55. ЯкубовМ.Р., АрзамасцевА.П., ДорофеевВ.Л.Установления подлинности монокомпонентных противотуберкулезных препаратов методом ИК-

спектроскопии// Человек и лекарство: Тез.докл. XIIIРоссийского национального конгресса. — М., 2006. – С.44

56. Столяров К.П. Химический анализ в ультрафиолетовых лучах. -М.-Л., 1965. – 176 с.

57. Лигостаев А.В. Количественная оценка преднизолона с помощью спектрофотометрического метода // Материалы ежегодной конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2007». -Новосибирск: Сибмедиздат, 2007. – 478 с.

58. Израилова Г. Обоснование состава и стандартизация лекарственного препарата, содержащего изониазид и рифампицин: Автореф. дис. канд. фарм.Наук. – Москва-Пятигорск, 2011. – 24 с.

59. Thesis (Ph.D. (Pharmaceutics))-North-West University, Potchefstroom Campus, 2007. A-M. Redelinghuys, Quality specifications for antituberculosis fixed dose combination products, Thesis submitted for the Degree Doctor of Philosophy at the Potchefstroom Campus of the North-West University Potchefstroom, 2006. – 302 p.

60. Тыжигирова В.В., Филиппова С.Ю. Применение ИК– и УФ– спектроскопических методов в фармацевтическом анализе // Учебное пособие по фармацевтической химии для студентов фармацевтического факультета. -Иркутск, 2010. – 74 с.

61. Новиков М. Ю., Писарев Д. И., Новиков О. О., Фадеева Д. А., ПоповН.Н. Разработка методики определения компонентов новых комбинированных анальгетиков //Фармация. -2012. –Вып. 18/3, № (10). - 129 с.

62. Gahandule M., Banerjee S.K. Development of UV spectrophotometric methods and validation for estimation of furosemide in bulk and tablet dosage form by absorbance maxima and Area Under the Curve method // International Journal of Advances in Pharmaceutics. - 2016. – Vol. 5, Iss. 6.–pp. 160-170.

63. Nagaraju P. A. Validated Reverse Phase HPLC Method for the Simultaneous estimation of Simvastatin and Ezetimibe in Pharmaceutical dosage forms //Journal of Global Pharma Technology. - 2010. – Vol. 2, Iss. 4. – pp. 113-117.

64. Kumar D.A., Sujan D.P., Vijayasree V.,.Jillella V L N Seshagiri Rao. Simultaneous determination of Simvastatin and Ezetimibe in tablets by HPLC //Journal of Chemistry. -2009. – Vol. 6, Iss. 2.– pp. 541-544

65. Страчунский, Л.С., Козлов, С.Н. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. – Москва. Боргес, 2002. –432 с.

66. СтрачунскийЛ.С., , БелоусовЮ.Б., КозловН. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – Смоленск, 2007. - 464 с.

67. Справочник лекарств РЛС: инструкция, применение и описание вещества Изониазид. – Москва: Агропромиздат, 2008. – С. 167–169.

68. Маничева О. А. Некоторые аспекты определения чувствительности мико-бактерий туберкулеза к этамбутолу при использовании полужидкой среды // Пробл. туберкулеза. -2003. –№ (10). –С. 47-49.

69. Шорманова А.Л., Лобановский В.М., Соловьев Е.О., Стаханов В.А. Влияние препарата этамбутол на орган зрения у больных впервые выявленным туберкулезом легких//Материалы Всерос. науч.-практ.конф.- СПб., 2008. – 82 с.

70. Аленова А.Х., Исмаилова А.Т., Дильмагамбетов Д.С. Взаимовлияние типов лекарственной резистентности и иммунитета у больных туберкулезом легких // Пробл. туберкулеза. - 2002. –№ (7). –С. 8-10.

71. Исмаилова Г.К., Курегян А.Г. Количественное определение преднизолона и магнетита в магнитоуправляемой липосомальной форме // Современные наукоемкие технологии. - 2004. –№ 3. — 70 с.

72. Лигостаев А.В. Количественная оценка преднизолона с помощью спектрофотометрического метода // Материалы ежегодной конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна-2007». -Новосибирск: Сибмедиздат, 2007. – 478 с.

73. Мухутдинова А.Н. Биодеструкция дротаверина гидрохлорида актинобактериями рода: Дисс. Канд. биолог.наук: 03.02.03 / Пермь:Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 2015. –126 с.

74. Мичник Л.А. и др. Разработка технологии суппозиториев с амоксиклавом и дротаверина гидрохлоридом // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. - Пятигорск, 2007. –Вып. 62. –С. 183-185.

75. Katta N., Balla S., Alpert M.A. Does Long-Term Furosemide Therapy Cause Thiamine Deficiency in Patients with Heart Failure? A Focused Review // The American Journal of Medicine. - 2016. – Vol. 129, Iss. 7.– pp. 753-769.

76. НосковВ.Б.,ГончаровИ.Б., Ковачевич И.В. и др. Особенностифармакодинамики и фармакокинетики фуросемида и фурезиса // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1999. - Т. 62, № 3. –С. 32-36.

77. Дорощук В.А., Гонта Н.А. и др. Определение фуросемида в моче методом ВЭЖХ с предварительным мицеллярно- экстракционным концентрированием // Журнал аналитической химии. - 2009. - Т.64, №10. - С. 1082 - 1086.

78. http://chitalky.ru/?p=5706

79. https://studopedia.net/5_47152_postuplenie-lekarstva-v-organizm.html

80. https://studfiles.net/preview/2767130/page:3/

81. https://studfiles.net/preview/1148663/page:5/

82. https://biokem.ru/?p=42

83. Protein Data Bank. A Resource for Studying Biological Macromolecules. http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

84. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S. et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 A resolution // Protein Eng. – 1999. – Vol. 12. – № (6). – pp. 439-446.

85. https://stepik.org/lesson/75350/step/1?unit=52249

86. Чёгёр С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Изд-во АкадемииСоц. Республики Румынии, 1975. – 183 с.

87. Peters T., Jr. All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. – San Diego: Academic Press. 1996. - 432 p.

88. Ascenzi P., Fasano M. Serum heme-albumin: an allosteric protein // IUBMB Life. – 2009. –Vol.61, № 12. – pp. 1118-1122.

89. Fujiwara S., Amisaki T. Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by binding of fatty acids // Proteins. – 2006. – Vol .64, № 3. – pp. 730-739.

90. Van der Vusse G.J. Albumin as fatty acid transporter // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2009. – Vol.24,N4. – pp.300-307

91. Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J. et al. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site // Biochem. Soc. Trans. – 2008. – Vol. 36. – Pt. 6. – pp. 1317-1321

92. Kandagal P.B., Ashoka S., Seetharamappa J. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. – Vol. 41. – №2. – pp. 393-399

93. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharaya A.A., Otagiri M., Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // J. Mol. Biol. 2005. - Vol. 353. -pp.38-52

94. Takamura N., Haruta A., Kodama H. et al. Mode of interaction of loop diuretics with human serum albumin and characterization of binding site // Pharmaceutical Research. 1996. – Vol.13. – № (7). – P.1015-1019.

95. Varshney A., Sen P., Ahmad E. et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? // Chirality. – 2010. – Vol. 22,N1. – pp. 77-87

96. Васильев А.Н. Качественные доклинические исследования — необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов //Антибиотики и химиотерапия. -2012. – Т. 57, № 1-2. -С. 41-49.

97. ГрызуноваЮ. А., ДобрецоваГ. Е. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. – М.: ИРИУС, 1994. – 226 с.

98. https://www.slideshare.net/OlgaShatova/150512-1-ss

99. Барышева Е.С., Бурова К.М. Биохимия крови //Лабораторный практикум. –Оренбург, 2014. - 214 с.

100. https://www.rlsnet.ru/regdoc/61097
101. https://medi.ru/instrukciya/etambutol_6634/
102. https://www.rlsnet.ru/regdoc/63416
103. https://medi.ru/instrukciya/drotaverin_2677
104. https://www.rlsnet.ru/regdoc/61021
105. Бадун Г.А., Волкова С.В., Кузьмичева О.Н.,. Михалина Е.В, Тясто З.А. Мониторинг потока «горячих» атомов трития в методе термической активации // Радиохимия. – Москва, 2005. – Т.47, №2. -С. 178-181.
106. Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А. Синтез полимерной субстанции меченной тритием: метод термической активации трития // Фармация. – Москва, 2018. –Т 67, № 7. -С. 14-20.
107. RozhkoT.V., BadunG.A., RazzhivinaI.A., GuseynovO.A., GuseynovaV.E., KudryashevaN.S.On the mechanism of biological activation by tritium // Journal of Environmental Radioactivity. - 2016. – Т. 157.–pp. 131-135.
108. БадунГ.А.,Чернышева М.Г.,Алдобаев В.Н. Получение меченных тритием модифицированных одностенных углеродных нанотрубок для фармакокинетических исследований // Радиохимия. – Москва, 2016.– Т. 58, № 3.–С. 264-268.
109. Ксенофонтов А.Л., Богачева Е.Н., Федорова Н.В., Лукашина Е.В., Долгов А.А., Добров Е.Н., Чернышева М.Г., Бадун Г.А.Оптимизация условий метода тритиевой планиграфии при исследовании различных агрегатов белка оболочки вируса табачной мозаики// IX Российская конференция с международным участием "Радиохимия 2018": Сборник материалов, 17-21 сентября 2018. - Санкт-Петербург (Россия), 2018. – 503 с.
110. Богданова Ю.Г., Должикова В.Д., Коробков В.И., Бадун Г.А., Чернышева М.Г. Метод авторадиографии в исследованиях строения адсорбционных слоев поверхностно-активных веществ при модифицировании и смачивании поверхностей твердых тел // XV Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию иконформациям молекул: Сборник статей, 14-18 июня 2010. – Петрозаводск (Россия), 2010. –90с.

111. Ярматов Б.Х., Ким А.А., Джураева Г.Т., Садыков И.И. / Радиохимический метод мечения фармакологических препаратов термически активированным тритием // IV Республиканская конференция молодых физиков «Ядерная физика и ядерные технологии»:Сборник докладов, 2-3 декабря 2014. – Ташкент: Институт ядерной физики АН РУз, 2014. -С.89-95.

112. Израилова Г. Обоснование состава и стандартизация лекарственного препарата, содержащего изониазид и рифампицин:Автореф. диссерт. на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. - Пятигорск, 2011. –С.24.

113. Тыжигирова В.В., Филиппова С.Ю. Применение ИК и УФ спектроскопических методов в фармацевтическом анализе. -Учебное пособие по фармацевтической химии для студентов фармацевтического факультета. -Иркутск, 2010. –74 с.

114. Kim A.A., Djuraeva G.T., Shukurov B.V. Development of method of tritium labeling of pharmacological preparate of drotaverine hydrochloride (nospa) // The Third Eurasian Conference “Nuclear Science and its Application”: Book of Abstracts October 5-8, 2004. - Tashkent, 2004. –pp. 214-215.

115. Kim A.A., Djuraeva G.T., Dadakhonov J.A. Application tritium labeled drotaverine and furosemide for estimation of drug binding capacity of blood transport system // 16 Radiochemical Conference (RadChem 2010): Book of Abtracts 18-23 April 2010. -Marianske Lazne (Czech Republic), 2010. – 24 p.

116. Дадаханов Ж.А, Ким А.А., Джураева Г.Т., Шукуров Б.В., Мавлянов И.Р. Применение меченых тритием дротаверина и фуросемида для оценки связывающей способности транспортной системы крови //III Республиканская конференция молодых физиков Узбекистана «Ядерная физика и ядерные технологии»:Сборник докладов,1-2 декабря 2010. - Ташкент, 2010. – С. 151-152

117. Новиков М. Ю., Писарев Д. И., Новиков О. О., Фадеева Д. А., Попов Н. Н. Разработка методики определения компонентов новых комбинированных анальгетиков // Фармация. – Москва,2012. –Вып. 18/3, № 10.–С. 69-78.

118. Луйк А.И., Лукьянчук В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. –М.: Медицина, 1984. – 224 с.

119. Миллер Ю.И. Использование флуоресцентного зонда в оценке связывающей способности сывороточного альбумина человека при печеночной недостаточности // Лабораторное дело. - 1989. - № 7. -С. 20-23.

120. Миллер Ю.И., Добрецов Г.Е. Влияние лекарственных препаратов на флуоресценцию К-35 в комплексе с альбумином // Альбумин сыворотки крови в клинической медицине./ Под.ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. - М.: Гэотар, 1998 - С. 161-163.

121. Миллер Ю.И., Юшко Э.Г., Добрецов Г.Е., Красовицкий Б.М., Айдыралиев Р.К. Флуоресцентный метод определения альбумина в сыворотке крови при гипербилирубинемии // Вопросы медицинской химии. – Москва, 1990. - № 2. - С. 38-42.

122. SpectorA., JohnK.M. Effectsoffreefattyacidonthefluorescenceofbovineserumalbumin // Arch. Biochem. -1986. -Vol. 127. -pp. 65-71.

123. Gurachevsky A., Muravskaya E., Gurachevskaya T., Smirnova L., Muravsky V. Cancerassociated alteration in fatty acid binding to albumin studied by spin-label electron spin resonance // Cancer Investigation. - Informa Healthcare (United States), 2007.-Т. 25- pp. 378–383.

124. Kazmierczak S.C., Gurachevsky A., Matthes G., Muravsky V. Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring // Clinical Chemistry. - 2006, - Vol. 52, iss. 11. -pp. 2129–2134.

125. Kragh-Hansen U., Chuang Victor T.G., Otagiri M. Practical aspects of the ligand -binding and enzymatic properties of human serum albumin // Biol. Pharm. Bull. - 2002. - Vol. 25. - pp. 695-704.

126. https://www.lsgeotar.ru/izoniazid-etambutol-piridoxin.html

127. Barlow C.F., FIremark H., Roth L.J. Drug-plasma binding measured by Sephadex //Journal of Pharmacy and Pharmacology. - 1962. –Vol.9. –pp. 550-555

128. Killander J. Separation of human heme- and hemoglobin-binding plasma proteins, ceruloplasmin and albumin by the gel filtration //Biochimica et Biophysica Acta.-Elsevier,1964. –V.93, N 1. –P.1-14

129. Hummel J.P., Dreyer W.J. Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration //Biochimica et Biophysica Acta.– Elsevier, 1962. -V.63, N 3 –P 530-532.

130. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. –М.:Мир, 1982. - 1117 с.

131. Скоупс Р. Методы очистки белков. -М.:Мир, 1985. - 358 с.

132. Остерман Л.А.Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. –М.: Наука, 1981. - 536 с.

133. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. –М.: Наука, 1985. - 536 с.

134. Рысьев О.А., Жарков А.В., Долгирев Е.И. Сцинтилляционный метод измерения трития в биологии и медицине. – М.: Атомиздат, 1978. - 131 с

135. Шрам Э., Ломбер Р. Органические сцинтилляционные детекторы. – М.: Атомиздат, 1967. - 182 с

136. Jaffee M., Ford L.A. On the nature c.of quenching. Intren // Journal of Applied Radiation and Isotopes. - 1970. -Vol. 21, N 1. -pp. 49-53

137. Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина.- Бухарест: Изд-во Академии СРР, 1975. - 183 с.

138. Каримов Х.Я., Зуева Е.Б., Рахимов М.М., Усманов Ш.Р. Сывороточный альбумин //Медицинский журнал Узбекистана. - Ташкент, 1998. - № 6.-С. 111-112.

139. Мокашова В.В., Солнцева В.И., Рослый И.М. Интоксикационный синдром у больных при остром вирусном гепатите В //Эпидемиология и инфекционные болезни. – Москва, 1996. - № 1. -С. 49-52.

140. Тусаковский Е. Е., Таршинина А. В., Бондырева Е. Ю., Ходжаев Ш. Х. Роль олигомерности сывороточного альбумина человека при его взаимодействии с рецепторами полиальбумина в сыворотке крови больных вирусным

гепатитом В // Вопросы медицинской химии. – Москва, 1993. –Т. 39, №2. -С. 55-57.

141. Толкачев В.С. Коньюгационная способность сывороточного альбумина при вирусном гепатите // Врачебное дело. - 1982. - № 8. -С. 115-116.

142. Страчунский, Л.С., Козлов, С.Н. Современная антимикробная химиотерапия. -Руководство для врачей. – М.: Боргес, 2002. - 432 с.

143. Самойлова К.А., Васильева З.Ф., Штильбанс В.И. и др. Изменение связывающей способности альбумина крови человека после ее УФ-облучения в терапевтических дозах // Бюл. экспер. биол. - 1987. - Т. 104, № 12. - С. 676-678.

144. Кулабдуллаев Г. А., Абдуллаева Г. А., Коблик Ю. Н., Сайтжанов Ш.Н., Ким А.А., Джураева Г.Т. К использованию гадолиния для исследований по нейтрон захватной терапии на реакторе ВВР-СМ // Узбекский физический журнал. - Ташкент, 2013. - Т.15, № 5-6. - С. 292-304

145. Абдуллаева Г.А., Коблик Ю.Н., Кулабдуллаев Г.А., Ким А.А., ДжураеваГ.Т., Небесный А.Ф, Сайтжанов Ш.Н. Оприделение кермы в биологической ткани с гадолинием при облучении эпитепловым нейтронным пучком ВВР-СМ ИЯФ АН РУз // Атомная энергия. – Москва, 2013. - Т.115, № 3. -С. 166-170.