

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБЛУЧЕНИЯ ЭПИТЕПЛОВЫМИ
НЕЙТРОНАМИ НА СВЯЗЫВАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ БОРАТНОГО БУФЕРА**

Б.Х.Ярматов

А.А.Ким

И.И.Садыков

Г.А.Кулабдуллаев

*(Институт Ядерной физики Академии Наук Республики Узбекистан,
Национальный университет Узбекистана, Ташкент Узбекистан)*

ВВЕДЕНИЕ

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.

Сывороточный альбумин крови играет важную роль в связывании лекарственных средств и их метаболитов, с последующей транспортировкой в различные органы человека.

Целью настоящей статьи является, исследование влияния облучения пучком эпитепловых нейтронов и нейтронно-захватной реакции бора на связывающую способность альбумина сыворотки крови, с использованием меченных тритием препаратов изониазида, этамбутола и преднизолон.

Экспериментальные условия и результаты измерений. Методы исследования, реактивы, аппаратура. Методы исследования – облучение эпитепловыми нейтронами, жидкостно-сцинтилляционный счет.

Аппаратура - жидкостно-сцинтилляционный счетчик РЖС-05, реактор ВВР-СМ.

Реактивы – РРО (дифенил оксазол - о.с.ч.) РОРОР(1,4-Ди -2-(5-фенил) оксазол бензол - о.с.ч.), боратный буфер с рН 7,4. 14,086 мМ, сыворотки, гель Sephadex G 25, буферный раствор (10 мМ Трис-НCl, 0,14 М NaCl, рН 7,4), меченные тритием изониазид, этамбутол и преднизолон.

Облучение эпитепловыми нейтронами проводили на 9-м горизонтальном канале реактора ВВР-СМ мощностью 10 МВт. Плотность потока эпитепловых нейтронов на выведенном пучке – $1,3 \cdot 10^8$ ней/см².с. Время облучения 1 час.

Жидкостно-сцинтилляционный счет. Измерение радиоактивности фракций проводили с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика РЖС-05 в толуольном сцинтилляционном коктейле (в 1л толуола 4г РРО и 0,05 г РОРОР) [1].

Отбор и подготовка образцов. Отбор образцов крови, приготовление сыворотки крови и определение общего белка и альбумина проводили в Ташкентской Медицинской Академии (ТашМА) на кафедре клинической фармакологии. Отбор образцов крови проводили 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 мин. 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 -20⁰С и хранили в этих условиях до проведения экспериментов. Непосредственно перед экспериментом образцы плазмы крови размораживали и отбирали аликвоты для исследований. Характеристики отобранных образцов приведены в табл. 1.

Таблица -1.

| № образца сыворотки крови | Пол | Возраст | Содержание общего белка | Содержание альбумина | Содержание альбумина в 20 мкл сыворотки |
|---------------------------|---------|---------|-------------------------|----------------------|---|
| 1 | Мужской | 21 год | 74 г/л | 55% (40,70 г/л) | 814,0 мкг |
| 2 | Мужской | 36 лет | 73 г/л | 59% (43,07 г/л) | 861,4 мкг |
| 3 | Мужской | 23 года | 76 г/л | 57% (43,32 г/л) | 866,4 мкг |
| 4 | Мужской | 23 года | 74 г/л | 59% (43,66 г/л) | 873,2 мкг |
| 5 | Мужской | 25 лет | 80 г/л | 59% (47,20 г/л) | 944,0 мкг |
| 6 | Мужской | 29 лет | 80 г/л | 60% (48,00 г/л) | 960,0 мкг |

Расчеты доз для экспериментов с сывороткой крови. Общая поглощенная доза в мишени при облучении эпитепловым нейтронным пучком состоит из четырех компонент: это дозы создаваемые в мишени эпитепловыми нейтронами, быстрыми нейтронами, γ -излучением присутствующим в пучке и доза от нуклида (¹⁰B). Нами были проведены исследования [2] для расчета дозы в присутствии ¹⁰B, которая может быть выражена в следующем виде:

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

Где D_n и D_γ дозы создаваемые нейтронами и γ -излучением, ρ_B – концентрация бора в ppm –единицах $D_n^{1\text{ppmB}}$ и $D_\gamma^{1\text{ppmB}}$ эти дозы создаваемые нейтронами и γ -излучением в присутствии 1 ppm ¹⁰B. Для определение общую поглощенную дозу требуются точные сведений об интегральной поглощенной

энергии от этих излучений. Имеющиеся данные разных авторов по энергосвыделению 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 - r и за 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/см²с, $w_i(r,t)$ -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:

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

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. 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/](http://ftp.aip.org/epaps/medical_phys/E-MPHYA6-29-009201/)). Проведенные расчеты [3] позволили определить мощности кермы:

$$K_n = 1,47445 \times 10^{-4} \text{ Гр /с и } K_\gamma = 3,21591 \times 10^{-9} \text{ Гр /с для 1г вещества,}$$
$$k^n_{1\text{ppmB}} = 2,42689 \times 10^{-5} \text{ Гр /с и } k^\gamma_{1\text{ppmB}} = 1,22 \times 10^{-10} \text{ Гр /с для 1 ppm }^{10}\text{B.}$$

Аликвоты образцов сыворотки по 250 мкл облучали на реакторе ВВР-СМ в течение 1 час. 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 рН 7,4. 14,086 мМ раствор боратного буфера содержит 152,284 мкг/мл природного бора, из которого содержание ¹⁰B составляет 30 мкг/мл.

По литературным данным эффективная концентрация ¹⁰B 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 ¹⁰B в 3,55 раз выше терапевтической дозы (106,49 мкг/мл ¹⁰B)). 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 нейтронным пучком как указано ранее. Другую часть использовали для измерения связывающей способности белков. Концентрация ^{10}B $\rho_{\text{B}}=106,49\text{мкг/мл}=106,49\text{ ppm}$.

Проведенные расчеты позволили определить следующие значения поглощенной дозы:

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

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

Методика проведения экспериментов. Из 6 образцов сывороток отбирали по две аликвоты объемом 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 нейтронным пучком, другую оставили для контрольного опыта. Во все образцы сыворотки до и после облучения добавляли 10 мкл меченных изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида. Через 30 мин. инкубации связанный и не связанный белок разделяли гель фильтрацией в микроколоне с Sephadex G-25. Радиоактивность полученных фракций измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике РЖС-05.

Результаты и обсуждение. Связывание лекарственных веществ с белками плазмы и, прежде всего, с сывороточным альбумином является одним из важных фармакокинетических параметров, определяющих распределение лекарств в организме [4-6]. 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 [4,7]. 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 [6,8,9].

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 $^{10}\text{B}(n,\gamma)^{11}\text{B}$, которое за несколько секунд распадается на ядро лития-7 и альфа частицу, что также может быть фактором разрушающим альбумин (рис. 1).

В связи с этим, нами проведены исследования связывающей способности сывороточного альбумина на фоне облучения эпитепловыми нейтронами в присутствии бора.

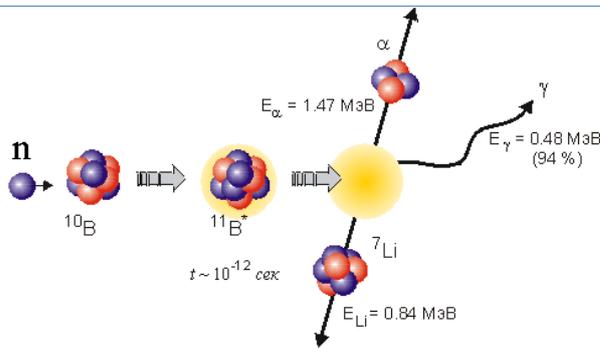


Рис. 1. Механизм реакции нейтронного захвата ^{10}B .

Исследование связывающей способности сывороточного альбумина проводили с помощью меченных тритием препаратов преднизолона, этамбутола и изониазида. Поскольку эти препараты относятся к различным фармакологическим группам, имеющим различные химические структуры, и следовательно и центр, и тип связывания с альбуминами крови. Это позволяет оценить более качественно характер нарушения альбумина крови.

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

Связывающую способность альбумина измеряли соотношением активности меченных тритием препаратов во фракциях до и после гель фильтрации. Результаты измерений до и после облучения представлены в табл. 2 и рис. 2.

Таблица 2.

Связывание меченых преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облучения нейтронным пучком

| № | Количество связанного с белками меченного препарата, нг/20 мкл сыворотки | | | | |
|--|--|-----------|-------------|------------|-----------|
| | изониазид | этамбутол | преднизолон | дротаверин | фуросемид |
| Сыворотка крови в 50мМ боратном 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 50мМ боратном 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 |

Из результатов, приведенных в табл. 2 и рис. 2, видно, что облучение пучком эпитепловых нейтронов сыворотки крови человека в 50 мМ боратном буфере меняет характеристики связывания меченных тритием фармакологических препаратов с транспортными белками сыворотки в

различной степени. При этом наблюдается как уменьшение связывания, так и его увеличение, что свидетельствует о функциональной активности связывающих сайтов молекулы альбумина. При этом не наблюдается полной денатурации лиганд-связывающих сайтов альбумина. Полученные данные вполне согласуются с литературными данными, показывающими, что для полной денатурации белков необходимы более мощные дозы нейтронного облучения [11].

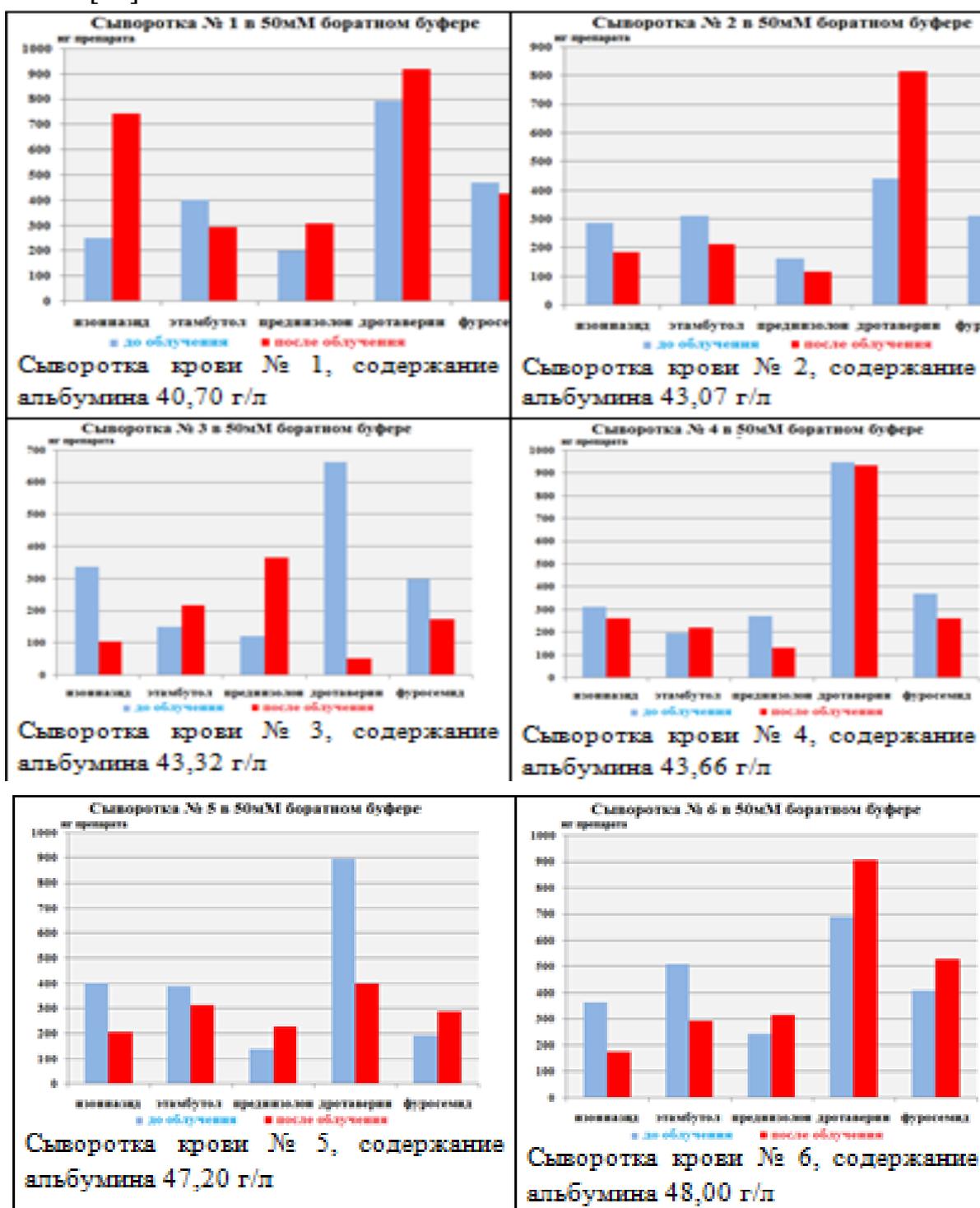


Рис. 2. Связывание меченых преднизолона, этамбутола и изониазида с белками сыворотки крови до и после облучения нейтронным пучком.

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 в присутствии ^{10}B .

Выводы. Исследовано влияние пучка нейтронов на связывающее свойство альбумина сыворотки крови в присутствии бора с помощью меченных тритием препаратов изониазида, этамбутола, преднизолона, дротаверина и фуросемида. Показано, что пучок эпитепловых нейтронов с плотностью потока $1,3 \cdot 10^8$ нейтрон/см²×с в присутствии 106,5 мкг бора не оказывает существенного разрушающего эффекта на связывающую способность транспортных белков сыворотки крови.

ЛИТЕРАТУРА:

1. О.А. Рысьев, А.В. Жарков, Е.И. Долгирев, Сцинтилляционный метод измерения трития в биологии и медицине. (Москва, 1978).
2. Г.А. Кулабдуллаев, Г.А. Абдуллаева, Ю.Н. Коблик, Ш.Н. Сайтжанов, А.А. Ким, Г.Т. Джураева. Узбекский физический журнал. № 4, стр. 127-138, (2013)
3. Г.А. Абдуллаева, Ю.Н. Коблик, Г.А. Кулабдуллаев, А.А. Ким, Г.Т. Джураева, А.Ф. Небесный, Ш.Н. Сайтжанов. Атомная энергия, т.115, № 3, стр.166-170. (2013)
4. Arne T Hostmark. Norsk Epedemiology. Vol. 13, N 1, pp. 107-113, (2003)
5. Sakata K., Hashimoto T., Ueshima H., National Integrated Projects for Prospective Observation of Noncommunicable Diseases and its Trend in the Aged // Eur. J. Epidemiol.. Vol. 17, N 5, pp. 461-468, (2001)
6. Seedher N., Bhatia S, Pharm.Biomed.Anal. Vol. 39, N 1-2, pp. 257-262, (2005).
7. Becker N. A. In:Scriver C.R.,Beaudet A.L., Sly W.S., Walle D., eds. The metabolic and molecular basis of inherited disease 8th ed. New York. Vol. 2. pp. 2513-2535, (2001).
8. Phillips A, Shaper A.G., Winchup P.H. Lancet., N 2, pp. 1434-1436, (1989).
9. Seaton K. Gout, J Natl Med Assoc. Vol. 88, N 8, pp. 473-486, (1996).
10. Sweet W.H. Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors// J. Neuro Oncology, Vol. 33, N 1-2, pp. 19-26, (1997).
11. Защита и восстановление при лучевых повреждениях., «Наука», (Москва 1966)