

Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод термической активации трития

Г.А. Бадун¹, М.Г. Чернышева¹, Ю.Г. Казаишвили², Б.А. Рудой²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Российская Федерация, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

²ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»;
Российская Федерация, 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д.12

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бадун Геннадий Александрович – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, кандидат химических наук. Тел.: +7 (495) 939-47-93. E-mail: badunga@yandex.ru

Чернышева Мария Григорьевна – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, кандидат химических наук. Тел.: +7 (495) 939-47-93. E-mail: masha.chernysheva@gmail.com

Казаишвили Юрий Георгиевич – ведущий биолог сектора доклинических исследований, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (495) 741 49 89 (доб. 3902) E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Рудой Борис Анатольевич – руководитель отдела фармацевтических разработок, доктор биологических наук, профессор. Тел.: +7 (495) 741 49 89 (доб. 1243). E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. В процессе фармакокинетических исследований для количественного определения в биологических жидкостях небелковых полимерных лекарственных веществ должны применяться специальные методические подходы, в большинстве случаев связанные с предварительным введением в молекулы исследуемого полимера достаточно легко обнаруживаемой прибором специфической метки.

Цель работы. Получение меченной тритием фармацевтической субстанции «Кагоцел» для использования в биологических экспериментах по изучению показателей всасывания, распределения и выведения.

Материал и методы. Объект исследования – процесс введения трития в высокополимерную субстанцию – активный компонент лекарственного средства «Кагоцел». Тритиевую метку вводили в очищенный полимерный компонент субстанции методом термической активации трития, подбирая оптимальные условия реакции. Отсутствие существенных изменений физико-химических свойств субстанции на стадиях получения меченого продукта подтверждали хроматографическими методами (эксклюзионная и обращенно-фазовая ВЭЖХ).

Результаты. Разработанный метод с применением термической активации трития позволяет вводить метку в полимерный компонент субстанции «Кагоцел» с получением продукта с удельной активностью не менее 300 мКи/г. При наложении профилей элюции, полученных при эксклюзионной и обращенно-фазовой хроматографии субстанции «Кагоцел», и кривых, полученных с применением сцинтилляционного детектирования, подтверждено равномерное включение метки по фракциям полимера. Введенная в полимер субстанции «Кагоцел» метка стабильна, уровень спонтанного замещения атомов трития в кислой водной среде не превышает 2%. Меченый препарат достаточно стабилен при хранении в течение 1 месяца.

Заключение. Разработанный метод введения изотопов водорода обеспечивает получение стабильного меченого препарата субстанции «Кагоцел» с высокой удельной активностью, пригодного для дальнейших биологических исследований.

Ключевые слова: кагоцел, тритий, метод термической активации трития.

Для цитирования: Бадун Г.А., Чернышева М.Г., Казаишвили Ю.Г., Рудой Б.А. Синтез полимерной субстанции «Кагоцел», меченной тритием: метод термической активации трития. Фармация, 2018; 67 (7): 14–20. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-03>

SYNTHESIS OF TRITIUM-LABELLED POLYMERIC KAGOCEL SUBSTANCE: TRITIUM THERMAL ACTIVATION METHOD

G.A. Badun¹, M.G. Chernysheva¹, Yu.G. Kazaishvili², B.A. Rudoy²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Build. 3, GSP-1, Moscow 119991, Russian Federation

²ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», 12, Aircraft Designer Mikoyan St., Moscow 125252, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Gennadii A. Badun – Associate Professor of the Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Ph.D., Associate Professor. Tel.: +7 (495) 939-47-93. E-mail: badunga@yandex.ru

Maria G. Chernysheva – Associate Professor of the Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Ph.D. Tel.: +7 (495) 939-47-93. E-mail: masha.chernysheva@gmail.com

Yuriy G. Kazaishvili – Senior biologist of the Department of Preclinical Studies, Ph.D., Tel.: +7 (495) 741 49 89. E-mail: Yuriy.Kazaishvili@nearmedic.ru

Boris A. Rudoy – Head of the Department of Pharmaceutical Development, D.Sc., professor. Tel.: +7 (495) 741 49 89. E-mail: Boris.Rudoy@nearmedic.ru

SUMMARY

Introduction. Standard analytical approaches to the quantitative determination of polymeric substances, including natural polysaccharides, in biological matrices are not suitable. If it is necessary to quantify the test substance in their native state in biological fluids, an approach is frequently applied with the fluorescent or radioactive label being incorporated into the active ingredient.

Objective. To synthesize the tritium-labeled polymer component of Kagocel substance for pharmacokinetic studies, namely for the estimation of the parameters of absorption, distribution, and excretion.

Material and methods. The investigation object is the pharmaceutical substance Kagocel. The tritium label was incorporated into the polymer component of the substance by tritium thermal activation method. The identity of the tritium-labeled substance of the starting material was confirmed by size-exclusion chromatography with refractometric detection and by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection.

Results. The tritium thermal activation method allows the label to be incorporated into the polymer component of the Kagocel substance with a specific activity of at least 300 mCi/g. Upon applying the elution profiles obtained with size-exclusion and reversed-phase chromatography of the substance Kagocel and the curves obtained by scintillation detectors, it is seen that the basic time of radioactivity release corresponds to that of the polymer component of the substance Kagocel. The tritium-labelled substance Kagocel is stable; the tritium exchange in the acidic medium is no more than 2%.

Conclusion. The developed method for incorporating hydrogen isotopes provides a stable labeled preparation of the substance Kagocel with a high specific activity, which is suitable for further biological studies.

Key words: Kagocel, tritium, tritium thermal activation method.

For citation: Badun G.A., Chernysheva M.G., Kazaishvili Yu.G., Rudoy B.A.. Synthesis of tritium-labelled polymeric Kagocel substance: tritium thermal activation method. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2018; 67 (7): 14–20. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-07-03>

Введение

Биофармацевтические методы исследования предполагают необходимость специфического выявления и количественного определения в организме фармакологически активных веществ и продуктов их метаболической трансформации [1]. Основные методы анализа, применяемые для определения лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях, преимущественно относятся к хроматографическим (ВЭЖХ, ГЖХ, ВЭЖХ-МС, ГЖХ-МС), применяются также иммунологические (твердофазный иммуноферментный анализ, поляризационно-флуоресцентный иммуноанализ) и некоторые другие методы (рефрактометрия, кондуктометрия, потенциометрия) [2]. К критическим характеристикам эффективного биоаналитического метода относятся чувствительность, быстрота ответа и скорость исполнения, точность, возможность работы с малым объемом биоматериала и стоимость [3]. Они напрямую зависят от параметров используемой аналитической системы.

Наиболее часто встречающимся детектором в биоаналитических исследованиях образцов при ВЭЖХ-анализе является УФ-детектор. Во многих случаях используется флуориметрический детектор или сочетание ультрафиолетово-

го и масс-спектрометрического регистрирующих устройств. Однако ни один из указанных детекторов не годится для специфического количественного определения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) препарата «Кагоцел» в биологических жидкостях, что связано с особенностями строения и физико-химическими свойствами этого вещества.

Кагоцел представляет собой высокополимерное соединение – сополимер (привитой сополимер), основой которого является окисленное производное полисахарида – карбоксиметилцеллюлозы, с ковалентно связанными с этой полимерной цепью модифицированными молекулами природного полифенола – госсипола [4]. Полисахаридный комплекс преобладает (свыше 80–90% по массе) в составе таких молекул. С учетом особенностей образовавшихся химических структур молекулы госсипола не высвобождаются из сополимера в растворах и в организме. А количественное содержание его связанных молекул в полимере не превышает 3%. Поэтому ни свободный, ни связанный госсипол не могут быть использованы в качестве специфического адекватного аналита для отслеживания процессов абсорбции и распределения АФИ препарата «Кагоцел» [5]. К особенностям полисахаридов такого типа (целлюлозы, карбоксиметилцел-

люлозы) относится отсутствие специфических оптических или физико-химических свойств, которые могли бы позволить надежно выявить их в низких концентрациях биологических жидкостей [6]. В частности, спектр поглощения растворов субстанции препарата «Кагоцел» представляет собой монотонно убывающую кривую в УФ-области спектра.

В ситуации, когда необходимо провести количественную оценку исследуемого вещества в нативном состоянии, а применение упомянутых выше методов для количественного обнаружения в биологических жидкостях невозможно, часто единственным выходом остается прием с введением в состав активного вещества флюоресцентной или радиоактивной метки. Недостатком первого подхода является необходимость введения в изучаемое полимерное вещество относительно крупных молекул люминофора, что может привести к изменению фармакокинетических характеристик вещества. Более целесообразно использовать для этих целей радиоактивную метку. Для этого в биофармацевтических исследованиях обычно применяют слабые β -излучатели (^{14}C , ^3H), позволяющие количественно определять исследуемые вещества в биологических жидкостях и тканях [7,8]. С учетом особенностей строения полимерной субстанции «Кагоцел» для ее пометки наиболее пригодны изотопы ^{14}C и ^3H .

Для введения ^{14}C в изучаемые фармакологически активные вещества обычно используют прием химического замещения тех или иных функциональных групп. Однако расчеты, проведенные специалистами Радиохимического центра Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, показали, что доля атомов углерода в составе полимерной субстанции «Кагоцел», которая может быть подвергнута подобному изотопному замещению, составляет не более 1–2%. Расчетная удельная радиоактивность меченого препарата при этом составит порядка 1 ГБк/г, что, с учетом известных из предварительно проведенных экспериментов невысоких показателей биодоступности полимерного АФИ препарата «Кагоцел» и, как следствие, – низкой ожидаемой конечной концентрации активного вещества в плазме, не может обеспечить надежного определения препарата и осуществить адекватную валидацию биоаналитического метода даже с применением современных жидкостно-сцинтилляционных детекторов.

Поэтому более перспективным путем решения этой проблемы было признано получение меченого тритием полимерного компонента субстанции «Кагоцел». При одинаковом содержании радионуклидов удельная радиоактивность меченого тритием препарата в 63 раза выше, чем при использовании ^{14}C . Тритий как изотоп водорода может быть введен в состав молекул «Кагоцела» путем изотопного замещения при реакции с газообразным тритием. Такую реакцию можно осуществить, используя различные приемы активации трития [9, 10]. Дополнительным преимуществом этого подхода является также его более высокая радиационная безопасность.

Известно, что для описания препаратов, состоящих из смеси макромолекул переменного состава и нерегулярного строения, используют интегральные (усредняющие) характеристики. Поэтому при введении радиоактивной метки в такие препараты требуется обеспечить неизбирательное и относительно равномерное распределение радионуклида по фракциям полимера. Одновременно такой подход позволяет существенно повысить удельную активность продукта, что облегчает надежное детектирование меченого соединения даже при его незначительных количествах в биологических средах. Например, ранее было показано, что получить такие сложные смеси можно путем введения трития в гетерогенные по составу гуминовые и фульвокислоты, меченые препараты которых используются для исследования поведения этих веществ в самых сложных природных системах [11–13].

Ранее методы получения меченого тритием вещества «Кагоцел» не использовались. С учетом особенностей строения и свойств этого полимера для включения радиоактивной метки в молекулы этого полимера был выбран подход с использованием метода термической активации трития.

Цель данной работы – разработка методики введения изотопов водорода в полисахаридную полимерную субстанцию «Кагоцел».

Материал и методы

Введение трития в Кагоцел осуществляли методом термической активации. Для контроля сохранения основных свойств препарата на стадиях процесса и количественной оценки показателей меченой полимерной субстанции использовали методы эксклюзионной и

обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением различных детекторов (УФ-, рефрактометрического и сцинтилляционного).

Методика введения метки. Раствор полимерной субстанции «Кагоцел» концентрацией 1 мг/мл вносили и равномерно распределяли по стенкам колбы объемом 0,5 л, после чего быстро замораживали, помещая колбу в жидкий азот. Для удаления воды сосуд на 30 мин подключали к лиофильной сушилке. Затем колбу с препаратом присоединяли к вакуумной установке, удаляли воздух и заполняли сосуд тритием до давления 0,5 Па. Активацию трития осуществляли с помощью вольфрамового атомизатора, который нагревали электрическим током до температуры 1650 °С в течение 10 с. На стадии обработки процедуры введения метки сравнили два режима: полное термостатирование вещества-мишени при температуре жидкого азота (-196 °С) (препарат №1) и частичное термостатирование, когда в жидкий азот помещалась только нижняя часть (треть) реакционного сосуда (препарат №2). Обработанный атомами трития препарат смывали со стенок реакционного сосуда, используя 4 мл воды качества MilliQ.

Очистку меченного тритием препарата от лабильной метки проводили в два этапа. При предварительной очистке (1-й этап), когда удаляется основная часть лабильной метки, меченный тритием препарат растворяли в воде MilliQ с последующей ее отгонкой в ротационном испарителе. На втором этапе для более полной очистки проводили диализ препарата с использованием мембраны с пределом отсека 2 кДа в течение 12 сут. Перемешивание растворов в процессе диализа выполняли с помощью орбитального шейкера, а внешний раствор регулярно заменяли и контролировали в нем содержание метки.

В ходе приготовления препарата для контроля сохранения специфических физико-химических характеристик препарата субстанции применяли два варианта хроматографического анализа. Эксклюзионная хроматография осуществлялась с использованием пары колонок Ultrahydrogel 1000 и 120 размером 300×7,8 мм, заполненных гелем на основе гидроксил-полиметакрилата с размером пор 1000 и 120 Å, соответственно, соединенных последовательно, при температуре колонок +30 °С с воздушным термостатированием. В качестве подвижной фазы использовали раствор калия фосфата однозамещенного 50 мМ рН 7,0.

Обращенно-фазовая хроматография проводилась на колонке YMC-Triart C18 размером 250 × 4,6 мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали буферный раствор 30 мМ калия фосфата однозамещенного рН 2,5 и ацетонитрил в соотношении 2:8.

Стабильность меченной тритием субстанции «Кагоцел» оценивали двумя способами – после хранения в течение 28 дней в прохладном защищенном от света месте (холодильник), и после инкубации меченного тритием соединения в кислом фосфатном буфере рН 2,5 в течение 15 ч. В качестве показателя стабильности использовали степень изменения значений радиоактивности в растворах до инкубации в выбранных условиях и после нее.

Результаты и обсуждение

Синтез меченной тритием полимерной субстанции «Кагоцел» осуществляли по описанной выше методике (см. раздел «Материал и методы»). При этом два использованных варианта введения метки давали разные значения удельной активности конечного препарата. Первоначальная удельная активность препарата №2 была в 2 раза выше, чем у препарата, полученного первым способом. После первой стадии очистки от лабильной метки удельная активность снижалась на 20% для обоих препаратов.

На этапе диализной очистки были обнаружены некоторые различия в степени связывания метки: после диализа препарата №1 дополнительно удалялось около 40% радиоактивности, а из препарата №2 – около 50%. Кинетика изменения радиоактивности препаратов в процессе диализной очистки отображена на рис. 1.

Хроматографический анализ препаратов (эксклюзионная хроматография с рефрактометрическим детектированием), подвергнутых диализу в течение 12 сут (рис. 2), не выявил существенного изменения профиля элюции основного компонента (время выхода – 27–34 мин, объем удерживания – 14–17 мл).

При наложении профилей элюции, полученных при эксклюзионной хроматографии субстанции «Кагоцел», и кривых, полученных с применением сцинтилляционного детектирования, видно, что время выхода радиоактивности соответствует времени выхода полимерного компонента субстанции (рис. 3).

С помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ было показано, что хроматограммы исходной суб-

станции и меченого препарата после всех стадий очистки не имеют существенных различий (рис. 4).

Таким образом, хроматографическое исследование подтверждает сохранение контролируемого этими методами состава препарата.

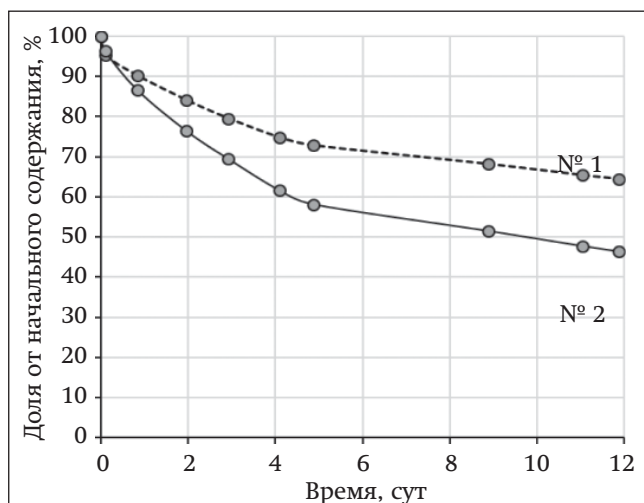


Рис. 1. Зависимость изменения доли трития (% от начального содержания) от времени в препарате №1 и препарате №2 меченого «Кагоцела» в процессе диализной очистки

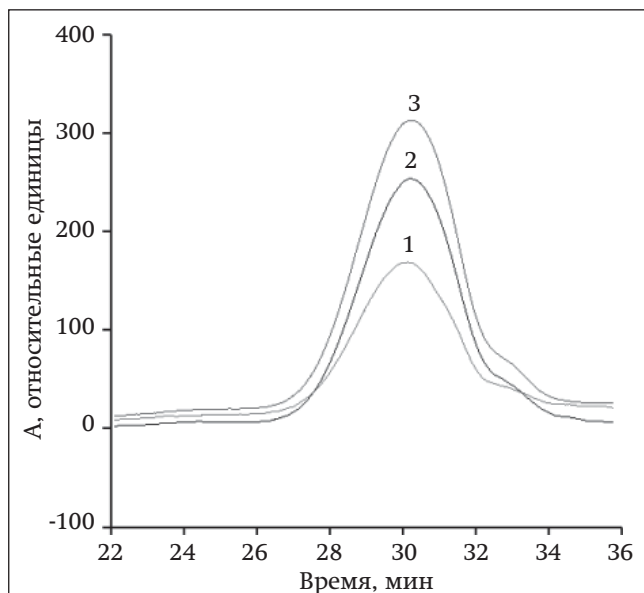


Рис. 2. Хроматографические профили элюции (рефрактометрическое детектирование), полученные при эксклюзионной хроматографии препаратов:
1 – профиль исходной субстанции;
2 – профиль меченого препарата №1 после диализной очистки;
3 – профиль меченого препарата №2 после диализной очистки

К соединениям, меченым изотопами (особенно – содержащим тритиевую метку), которые используются в биологических испытаниях,

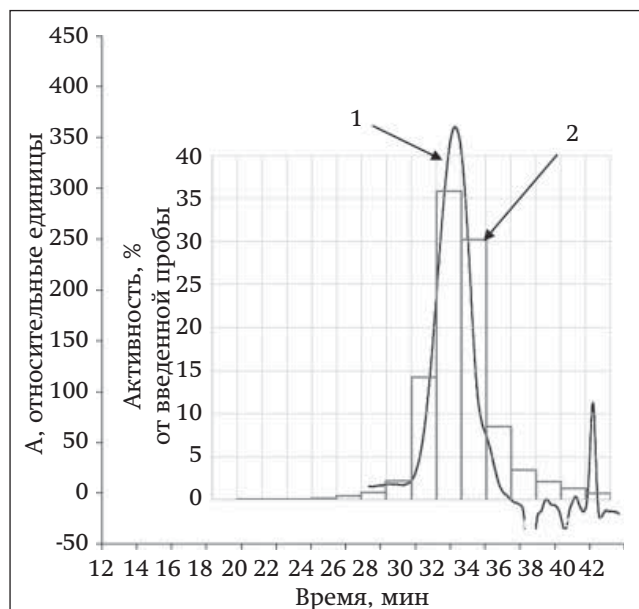


Рис. 3. Совмещение профилей элюции меченой тритием полимерной субстанции «Кагоцел» (рефрактометрическое детектирование при эксклюзионной хроматографии (кривая 1) и измеренной с помощью радиометрического детектора активностью фракций (диаграмма 2)

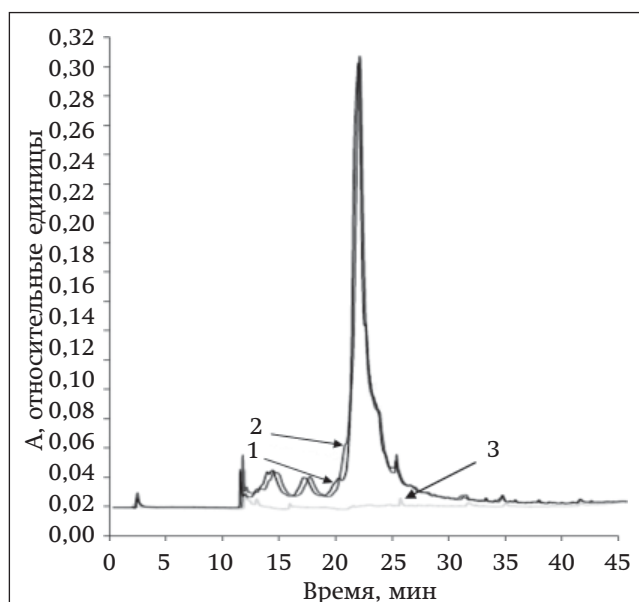


Рис. 4. Хроматографические профили, полученные при обращенно-фазовой ВЭЖХ:
1 – исходная полимерная субстанция «Кагоцел»;
2 – меченная тритием субстанция;
3 – подвижная фаза

предъявляют высокие требования по показателю стабильности [7, 14]. Оценку стабильности меченной тритием субстанции «Кагоцел» проводили как после длительного хранения (28 дней) препарата в лиофилизированном виде, так и в условиях инкубации (рН 2,0, t 37°C) меченого тритием соединения в растворе, имитирующем кратковременное пребывание субстанции в желудочном соке.

Сопоставление профилей элюции радиоактивности при эксклюзионной хроматографии меченного тритием полимерного компонента субстанции «Кагоцел» сразу после очистки и через 4 нед хранения (рис. 5) подтверждает стабильность меченной тритием полимерной субстанции при хранении в лиофилизированном виде в течение 1 мес. Стабильность меченой субстанции была подтверждена также альтернативным методом (длительный диализ с использованием диализной мембраны с пределом отсечения 1 кДа). При этом доля лабильной метки в пермеате составила 1,7% и 4,1% сразу после очистки и через 4 нед, соответственно.

Препарат «Кагоцел», согласно инструкции по медицинскому применению, принимается перорально. Поэтому следовало оценить возможное влияние повышения кислотности среды на стабильность введенной тритиевой метки. Известно, что в условиях экстремальных воздействий (высокая температура, сильнокислые или сильнощелочные среды), а также в процессе ферментативных реакций возможен обмен изотопов водорода в составе молекул с протонами воды [8]. Возможность перехода трития в лабильное состояние в кислой среде оценивали в эксперименте с инкубацией меченной тритием субстанции в 30 мМ растворе однозамещенного фосфата калия с рН 2,5. Радиоактивность раствора измеряли до и после 15 ч инкубации с последующим удалением лабильной метки упариванием (см. таблицу). Уменьшение активности в пробе на 4,5% включает, в том числе потери в связи с отбором проб для измерения радиоактивности, которые составили в среднем 2%. Таким образом, можно заключить, что в кислой среде наблюдается незначительный уровень обмена трития – не более 2%.

Заключение

Полученные в ходе эксперимента результаты свидетельствуют, что метод введения радиоактивной метки с применением метода термической активации трития пригоден для введения тритиевой метки в полимерный компонент субстанции «Кагоцел». Разработана методика введения изотопов водорода в полисахаридную полимерную субстанцию «Кагоцел», обеспечивающая получение меченых препаратов этой субстанции с высокой удельной активностью, достаточной для последующих фармакокинетических исследований.

Использованный методический прием является достаточно щадящим по отношению к исследованному полимеру. Методами хроматографии подтверждено сохранение молекулярно-массовых

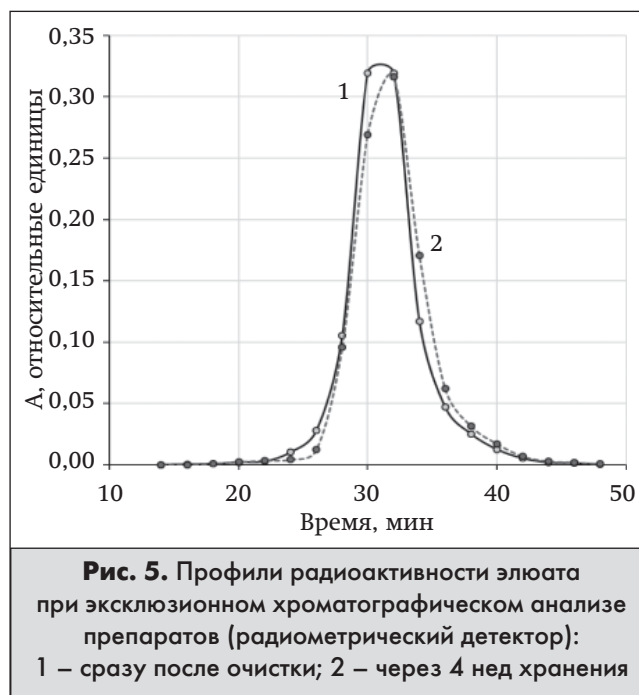


Рис. 5. Профили радиоактивности элюата при эксклюзионном хроматографическом анализе препаратов (радиометрический детектор): 1 – сразу после очистки; 2 – через 4 нед хранения

Стабильность меченной тритием субстанции «Кагоцел» в кислой среде (рН=2,5)

Параллель	Удельная радиоактивность раствора ^3H Кагоцела, мкКи/мл		Доля лабильного трития, %
	исходный раствор	после инкубации в буферном растворе с рН 2,5	
1	6,82	6,54	4,1
2	6,84	6,51	4,8
3	6,76	6,50	3,8
4	6,72	6,34	5,6
Среднее значение	6,78	6,47	4,5

характеристик исходной субстанции, не выявлено накопления существенных количеств дополнительных примесей, продуктов деградации, а также изменения времени удерживания компонентов, регистрируемых при обращенно-фазовой хроматографии.

Радиохимическая чистота полученного меченого тритием препарата полимерной субстанции «Кагоцел» составляет более 95%. Показана стабильность введенной метки в течение 1 мес хранения в лиофильно высушенном состоянии. Отсутствует влияние кратковременного закисления препарата (рН 2,5) на стабильность меченой тритием субстанции «Кагоцел».

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Горьков В. А., Карамышева Е. И. Введение в фармакокинетику. Клиническая фармакокинетика. 2004; 1: 2–4. [Gorkov V.A., Karamysheva E.I. Introduction to pharmacokinetics. Klinicheskaya farmakokinetika. 2004; 1: 2–4 (in Russian)].
2. Рейхарт Д. В., Чистяков В. В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях. Казанский медицинский журнал. 2010; 91: 4 [Reikhart D.V., Chistyakov V.V. Analysis of drugs in pharmacokinetic studies. Kazanskiy meditsinskiy zurnal. 2010; 91: (4) (in Russian)].
3. Медведев Ю. В., Раменская Г. В., Шохин И. Е., Ярушок Т. А. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). Химико-фармацевтический журнал. 2013; 47 (4): 45–51 [Medvedev Y.V., Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., Yarushok T.A. HPLC and UPLC for determining drugs in blood (a review). Himiko-farmaceuticheskiy zurnal, 2013; 47 (4): 45–51. DOI: <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2013-47-4-45-51> (in Russian)].
4. Кагоцел в педиатрии. К вопросу о репродуктивной безопасности: Сборник ст. Под ред. чл.-корр. Т.А. Гуськовой. М., 2018; 112. [Kagocel in pediatrics. On the issue of reproductive safety: (by ed. T.A. Guskova). Moscow, 2018; 112 (in Russian)].
5. Синицын, А. П., Хотченков, В. П., Рудой, Б. А., Казаишвили, Ю. Г. Оценка возможности высвобождения свободного госсипола из препарата «Кагоцел» под воздействием имитаторов пищеварительных соков человека. Фармация. 2017; 66 (5): 41–7. [Sinitsin A.P., Khotchenkov V.P., Rudoy B.A., Kazaishvili Yu.G. Release of free gossypol from Kagocel under the influence of human digestive juice simulants. Farmatsiya. 2017; 66 (5): 41–7 (in Russian)].
6. Williams V. R. et al. Basic physical chemistry for the life sciences. – 1978. – №. 541.3 W5.
7. Allen, P., Bragg, R. A., Caffrey, M., Ericsson, C., Hickey, M. J., Kingston, L. P., Elmore, C. S. The synthesis of a tritium, carbon-14, and stable isotope-labeled cathepsin C inhibitors. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2017; 60 (2): 124–9. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3483>
8. Lappin G., Temple S. Radiotracers in Drug Development. CRC Press Taylor & Francis Group, 2006; 320.
9. Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Myasoedov N. F. The efficiency of solvent-free catalyst systems in the synthesis of tritium-labelled biologically active compounds. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals. 2010; 53 (11–12): 693–703. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1828>
10. Badun G. A., Chernysheva M. G., Ksenofontov A. L. Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method // Radiochimica Acta International journal for chemical aspects of nuclear science and technology. – 2012. – Т. 100. – №. 6. – С. 401–408. <https://doi.org/10.1524/ract.2012.1926>
11. Badun G. A. et al. A new technique for tritium labeling of humic substances //Radiochimica Acta International journal for chemical aspects of nuclear science and technology. – 2010. – Т. 98. – №. 3. – С. 161–166. <https://doi.org/10.1524/ract.2010.1695>
12. Klein, O. I., Isakova, E. P., Deryabina, Y. I., Kulikova, N. A., Badun, G. A., Chernysheva, M. G., Koroleva, O. V. Humic Substances Enhance Growth and Respiration in the Basidiomycetes Trametes Maxima Under Carbon Limited Conditions. Journal of Chemical Ecology. 2014; 40 (6): 643–52. DOI: <http://sci-hub.tw/10.1007/s10886-014-0445-x>
13. Kulikova, N. A., Abroskin, D. P., Badun, G. A., Chernysheva, M. G., Korobkov, V. I., Beer, A. S., Perminova, I. V. Label Distribution in Tissues of Wheat Seedlings Cultivated with Tritium-Labeled Leonardite Humic Acid. Scientific Reports. 2016; 6. Article number: 28869 DOI: 10.1038/srep28869
14. Boyd, B. J., Kaminskas, L. M., Karellas, P., Krippner, G., Lessene, R., Porter, C. J Cationic poly-L-lysine dendrimers: pharmacokinetics, biodistribution, and evidence for metabolism and bioresorption after intravenous administration to rats. Molecular pharmaceutics. 2006; 3 (5): 614–27. DOI: 10.1021/mp060032e

Поступила 27 августа 2018 г.