

*На правах рукописи*



СЕМИБРАТОВА ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**УФ АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ  
СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ЧЕЛОВЕКА  
И ЕЕ АНАЛОГОВ**

01.04.07 – физика конденсированного состояния  
03.01.02 – биофизика

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Иркутск – 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Иркутский государственный университет» на кафедре экспериментальной физики

**Научный руководитель** доктор физико-математических наук,  
профессор, Егранов Александр Васильевич

**Консультант** кандидат физико-математических наук,  
доцент, Титов Юрий Михайлович

**Официальные оппоненты:** доктор физико-математических наук,  
профессор, Барышников Валентин Иванович  
(ГОУ ВПО ИрГУПС, г. Иркутск)

доктор физико-математических наук,  
Зилов Сергей Анатольевич  
(Институт лазерной физики СО РАН,  
г. Иркутск)

**Ведущая организация** ГОУ ВПО «Национальный исследовательский  
Томский политехнический университет»,  
г. Томск

Защита диссертации состоится «24» ноября 2010 г. в 9 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.04 при Иркутском государственном университете по адресу: 664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 20

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Иркутского государственного университета

Автореферат разослан «\_\_\_» октября 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук,  
доцент



Б.В. Мангазеев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Изучение обмена веществ мозга является неотъемлемой частью биохимического исследования метаболизма в целом организме, но представляет определенные трудности в связи с морфологическими и функциональными особенностями нервной системы. Экспериментальные данные показывают, что из-за более выраженной защитной и регуляторной функции барьера между кровью и мозгом спинномозговая жидкость лучше отражает биохимические изменения в мозге, чем кровь [1]. Спинномозговая жидкость (или ликвор), являясь внутренней средой центральной нервной системы, наиболее полно характеризует функциональную активность различных медиаторных систем головного и спинного мозга. Поэтому при заболеваниях нервной системы изучение спинномозговой жидкости, несмотря на некоторые методические сложности, наиболее целесообразно [2].

Спинномозговая жидкость изучалась ранее с помощью различных методов. Наибольшее количество данных получено химическими, биохимическими и микроскопическими исследованиями [2, 3]. Вместе с тем в изучении спинномозговой жидкости имеются определенные пробелы. Прежде всего, это касается использования физических спектральных методов анализа. В прошлые десятилетия были попытки получения данных из УФ абсорбционных исследований [4, 5, 6]. Но вследствие широких перекрывающихся полос поглощения ранее не удалось получить однозначных результатов. Успешное развитие рентгеновской и ЯМР томографии, привело к получению большого количества полезной визуальной информации. На фоне этих успехов результаты спектральных исследований выглядели более скромно, и ими перестали интересоваться. На сегодняшний день ситуация изменилась благодаря компьютерной технике, позволяющей проводить измерения с последующим анализом.

Известно, что в состав спинномозговой жидкости входит более  $10^4$  веществ, в УФ области спектра все они имеют широкие и часто перекрывающиеся полосы поглощения [7, 8]. С одной стороны, это представляет определенные трудности для анализа состава. С другой стороны, спектр поглощения содержит информацию обо всех органических веществах. Поэтому важно научиться выделять из малоструктурированных спектров информацию об изменении состава спинномозговой жидкости, связанном с заболеванием. Для изучения различия в спектрах поглощения спинномозговой жидкости не только больных, но и здоровых людей, разработана методика, основанная на измерениях спектров поглощения спинномозговой жидкости с последующим математическим анализом.

Разработанная методика была также использована для изучения направленного транспорта лекарственных препаратов. Идея селективного воздействия фармакологических препаратов на определённые клетки была актуальна всегда, но приблизиться к её разрешению удалось лишь в настоящее время

благодаря разработке и внедрению в медицину методов направленного транспорта. Доставка лекарственных препаратов осуществляется клетками крови (эритроцитами, лейкоцитами, тромбоцитами и др.). Направленный транспорт лекарственных препаратов в охваченную патологическим процессом зону позволяет, наряду с созданием в ней высокой концентрации вводимого препарата, максимально снизить токсическое воздействие, терапевтическую дозу препарата и кратность введения [9].

Гепатопротектор «Эссенциале Н» используется в медицинской практике для восстановления функциональной активности печени и снижения токсического действия химиотерапевтических препаратов у больных онкологическими и др. заболеваниями [10]. Интерес представляла эффективность связывания «Эссенциале Н» с клетками крови (эритроцитами) и определение оптимального времени экспозиции «Эссенциале Н» для терапевтических задач. Для стандартных биохимических методик, используемых в медицине, это оказалось недоступно. В связи с этим, предложенная методика, основанная на измерениях с последующим математическим анализом УФ спектров поглощения надосадочной жидкости крови и «Эссенциале Н», позволяет качественно и количественно определять содержание «Эссенциале Н» в крови для решения задач направленного транспорта лекарственных препаратов и повышения эффективности лечения.

#### **Цели работы.**

1. Спектральные исследования спинномозговой жидкости человека с целью выявления особенностей ее состава при нейрохирургических заболеваниях и в период выздоровления.

2. Изучение эффективности связывания лекарственного препарата «Эссенциале Н» с клетками крови человека методом УФ абсорбционной спектроскопии.

#### **Задачи исследования.**

1. Выделить и проанализировать перекрывающиеся полосы поглощения соединений, входящих в состав спинномозговой жидкости.

2. Выявить изменения состава спинномозговой жидкости в зависимости от вида и тяжести заболевания на основе спектральных данных.

3. Определить оптимальные условия при экспозиции препарата «Эссенциале Н» с клетками крови методом УФ абсорбционной спектроскопии.

**Методы исследования.** Основным методом исследования являлась УФ абсорбционная спектроскопия. Дополнительно применялся хемилюминесцентный метод.

**Объекты исследования.** Спинномозговая жидкость человека, надосадочная жидкость крови человека, лекарственный препарат «Эссенциале Н».

#### **Научная новизна.**

1. Впервые использована методика исследования слабоструктурированных УФ спектров поглощения спинномозговой жидкости, позволяющая выявлять характерные полосы, связанные с патологией.

2. Впервые изучено изменение УФ спектров поглощения спинномозговой жидкости в зависимости от клинических проявлений различных нейрохирургических заболеваний. Проведено сопоставление спектров поглощения с клиническими проявлениями заболеваний.

3. Впервые использован метод УФ абсорбционной спектроскопии для определения времени экспозиции лекарственного препарата «Эссенциале Н» с клетками крови.

**Практическая значимость.** Предложенная методика, основанная на измерениях УФ спектров поглощения, с последующими обработками на спектрально-вычислительном комплексе, позволяет выявлять изменения в составе спинномозговой жидкости при нейрохирургических заболеваниях. Высокая чувствительность методики даёт возможность использовать её для регистрации малых повреждений центральной нервной системы. Это позволяет более детально оценивать и интерпретировать состояния качественных свойств спинномозговой жидкости у нейрохирургических больных.

Результаты исследований могут быть использованы для решения задач направленного транспорта лекарственных препаратов и повышения эффективности лечения. В частности, данная методика позволяет качественно и количественно определять содержание лекарственных препаратов в биологических жидкостях, даже если концентрации препарата ничтожно малы.

#### **Основные защищаемые положения.**

1. В спектрах поглощения спинномозговой жидкости человека обнаружена характерная структура, связанная с электронными переходами в амидной группе белков.

2. Увеличение поглощения спинномозговой жидкости в области 210-230 нм связано с усилением  $n_0 \rightarrow \pi^*$  перехода в амидной группе при изменении структуры белка.

3. На основе спектроскопического исследования надосадочной жидкости крови выявлена нелинейная зависимость связывания препарата «Эссенциале Н» с клетками крови от времени экспозиции и установлено оптимальное время связывания «Эссенциале Н» с клетками крови.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации докладывались на VII Всероссийской школе-семинаре «Люминесценция и сопутствующие явления» (Иркутск, 2001), III международном съезде нейрохирургов (Санкт-Петербург, 2002), VI Байкальской молодежной научной школе по фундаментальной физике «Волновые процессы в проблеме космической погоды» (Иркутск, 2003), VII Байкальской молодежной научной школе по фундаментальной физике «Взаимодействие полей и излучения с веществом» (Иркутск, 2004), X Байкальской молодежной научной школе по фундаментальной физике «Современные проблемы в астрофизике и физике космической плазмы» (Иркутск, 2007), Феофиловском симпозиуме «Спектроскопия кристаллов, активированных редкоземельными ионами и ионами переходных металлов» (Иркутск, 2007), XI Международной школе-семинаре по люминесценции и лазерной физике (Иркутск, 2008).

### **Внедрение результатов работы в практику.**

Результаты научных исследований внедрены в практику работы отделения нейрохирургии Иркутского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии и ГУЗ «Областной онкологический диспансер» города Иркутска.

### **Публикации и личный вклад автора.**

По результатам исследований в соавторстве и лично автором опубликовано 11 работ, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК для публикации научных работ. Получено решение о выдаче патента на изобретение от 09 февраля 2010 года по заявке №2009118629/14 «Способ лечения анемии при химиолучевой терапии».

Большая часть экспериментов и расчетов выполнена автором самостоятельно.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения и списка литературы из 91 наименования, из которых 40 зарубежных и 51 и отечественных авторов. Работа изложена на 108 страницах, содержит 6 таблиц и 39 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **ВВЕДЕНИИ** сформулированы цели исследования, обоснована актуальность и фундаментальная важность решаемой научной задачи, кратко изложено содержание диссертации, перечислены полученные результаты и положения, выносимые на защиту.

В **ПЕРВОЙ ГЛАВЕ** содержится обзор литературных данных, посвященных изучению спинномозговой жидкости человека физическими методами. Из литературных данных видно, что использование физических спектральных методов для диагностики неврологических и нейрохирургических заболеваний занимает скромное место в общем потоке исследований спинномозговой жидкости.

Применение ИК-спектроскопии для исследования спинномозговой жидкости в значительной степени ограничено из-за сильного поглощения ИК излучения водой и перекрывающимися полосами поглощения различных соединений. Трудности использования инфракрасной спектроскопии на практике являются не только техническими, но связаны также с отсутствием методики, позволяющей применить математический анализ при определении частот колебаний и отнесении их к той или иной химической связи. Метод комбинационного рассеяния света дополняет ИК-спектроскопию. Его основным преимуществом является слабое поглощение воды в этой области. В состав многих соединений спинномозговой жидкости входят большие асимметричные молекулы, поэтому метод комбинационного рассеяния света регистрирует те же полосы, что и ИК-спектроскопия.

Методы хроматографии используются для разделения спинномозговой жидкости на фракции. Однако, в силу высокой стоимости и трудоемкости, хроматографические методы используются главным образом в научных ис-

следованиях, и лишь в исключительных случаях находят применение в клинической практике. Кроме того, будучи незаменимым методом качественного анализа, хроматография имеет весьма ограниченные возможности для количественного определения веществ.

Использование ЯМР-спектроскопии на ядрах  $^1\text{H}$  для изучения спинномозговой жидкости имеет ограничения в связи с тем, что область значений химических сдвигов, в которых наблюдаются резонансные линии биологических молекул, достаточно мала, это существенно затрудняет интерпретацию спектров, а наличие интенсивного пика воды затрудняет наблюдение сигналов, представляющих интерес метаболитов. Заметно большее разрешение достигается в спектрах ЯМР на ядрах  $^{13}\text{C}$ , имеющего более широкий диапазон химических сдвигов по сравнению с протонами. Но для многокомпонентных систем, таких как спинномозговая жидкость, очевидно значительное перекрытие спектральных линий, несмотря на то, что столь большая область значений химических сдвигов должна была бы гарантировать достаточно хорошее разрешение.

Органические соединения, входящие в состав спинномозговой жидкости имеют широкие полосы поглощения в УФ области. Но в целом, спектр поглощения характеризует большинство органических соединений, входящих в состав спинномозговой жидкости. Применение УФ спектроскопии требует методики анализа перекрывающихся полос поглощения различных соединений.

Во **ВТОРОЙ ГЛАВЕ** приведены результаты исследования спинномозговой жидкости пациентов с нейрохирургическими заболеваниями методом абсорбционной спектроскопии. Повреждения позвоночно-двигательного сегмента занимают третье место среди всех травм человеческого организма. В условиях компрессии спинального субарахноидального пространства возникают ликвородинамические расстройства: нарушается циркуляция и изменяется давление спинномозговой жидкости. Страдают основные функции спинномозговой жидкости – транспортная, экскреторная, механическая и функция специфического защитного иммунобиологического барьера. Исследование спинномозговой жидкости позволяет подтвердить наличие ишемии и воспаления с возможностью определения блока субарахноидального пространства.

Известные методы диагностики состава спинномозговой жидкости – клинический и биохимический анализы, хроматографические методы и метод электрофореза – позволяют провести количественное измерение вещества (белков спинномозговой жидкости) [3]. Однако, известно, что локально текущий воспалительный процесс не всегда сопровождается повышением белка в спинномозговой жидкости, в то время как диагностика этого состояния важна при выборе тактики лечения [11]. Кроме того, для полного лабораторного исследования необходимо от 7 до 9 мл спинномозговой жидкости.

Для диагностики изменений состава спинномозговой жидкости, наблюдающихся при компрессии спинного мозга и его корешков (то есть воспали-

тельного процесса, обусловленного поражением позвоночно – двигательного сегмента поясничного и пояснично–крестцового отдела) предложен метод УФ абсорбционной спектроскопии спинномозговой жидкости. При этом для исследования необходимо всего 0,05 мл спинномозговой жидкости.

В основу работы положены спектральные данные спинномозговой жидкости 35 пациентов в возрасте от 22 до 70 лет, из них 10 – с компрессионным синдромом пояснично – крестцового отдела позвоночника, обусловленным дегенеративно – дистрофического и / или травматического генеза, 10 – с травмой опорно – двигательного аппарата с длительностью заболевания от двух недель до двух лет и 15 условно здоровых пациентов.

Экспериментальное оборудование, на котором проводились исследования спинномозговой жидкости, представляет собой спектрально-вычислительный комплекс. Спектрально-вычислительный комплекс позволяет записывать спектры поглощения, отражения, люминесценции и фотовозбуждения в спектральном диапазоне 0,19-4,00 мкм. Точность измерений коэффициента поглощения  $k$  составляет для разных участков спектра от 0,5 до 0,1 %. Математическая обработка производилась по программе, включенной в состав спектрально-вычислительного комплекса.

Так как коэффициент поглощения спинномозговой жидкости в ультрафиолетовой области находится в пределах от  $0,1 \text{ см}^{-1}$  до  $\geq 100 \text{ см}^{-1}$ , то для записи длинноволновой УФ компоненты спектра поглощения приходилось разводить ликвор водой. Разведенный ликвор помещали в кварцевую кювету толщиной 1 см и пропускали через него УФ монохроматизированное (использовался монохроматор МДР-12) излучение от дейтериево-дуговой лампы ДДС-30 (190 нм – 360 нм). Причём запись спектра поглощения ликвора разделили на две части. Первую часть спектра, коротковолновая область (190 нм - 230 нм) с высоким коэффициентом поглощения, регистрировали обычно в разведении 1:100. Вторую часть спектра, длинноволновая область (231 нм - 360 нм) с более низким коэффициентом поглощения, регистрировали в разведении 1:20. Это было сделано для более качественной записи спектра поглощения спинномозговой жидкости, имеющей большой динамический диапазон. После каждая часть спектра умножалась на величину разведения. В результате спектр поглощения представляет зависимость коэффициента поглощения от длины волны. На рис. 1 представлен характерный спектр поглощения спинномозговой жидкости.

Анализ наиболее интенсивной части спектра поглощения (190–240 нм) показал, что плавно убывающее в длинноволновую область поглощение происходит по экспоненциальной зависимости. Оно представляет собой наложение спадающих ветвей полос поглощения, максимумы которых расположены в области вакуумного УФ. Регистрация этих полос затруднена ввиду интенсивного поглощения воды. Совокупность спадающих ветвей этих полос моделировалась соответствующей экспоненциальной функцией. Далее эта зависимость вычиталась из исходного спектра поглощения спинномозговой

жидкости. В результате удавалось наблюдать полосы, которые были слабее в 100 раз спадающего континуума (рис. 2).

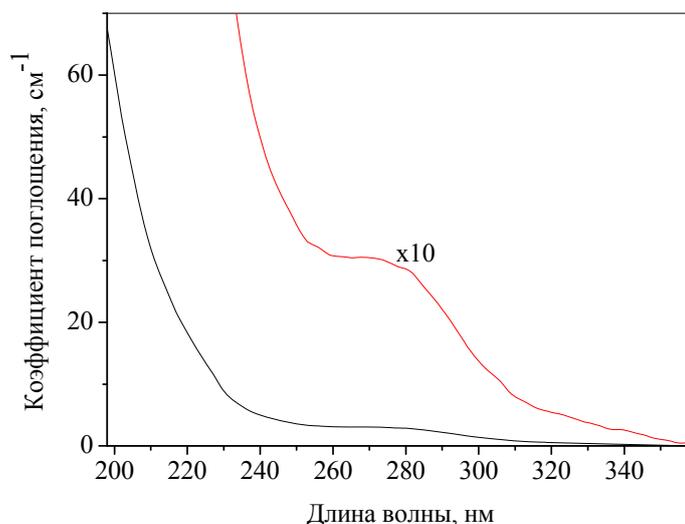


Рис. 1. Спектр поглощения спинномозговой жидкости больного и его длинноволновая часть, увеличенная в 10 раз по коэффициенту поглощения.

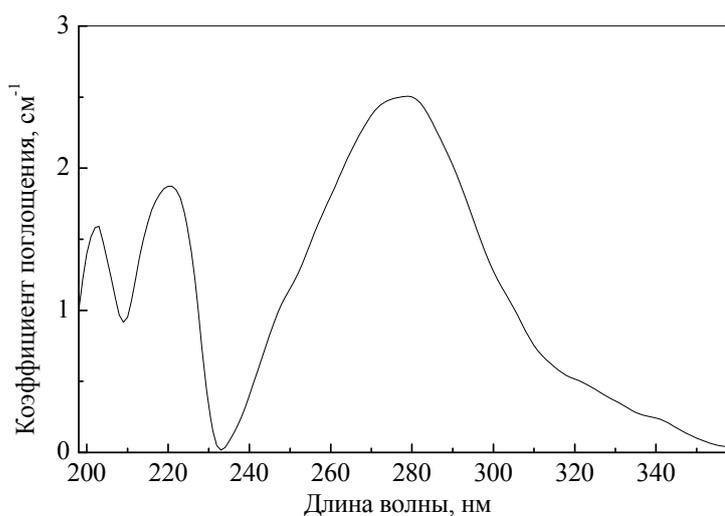
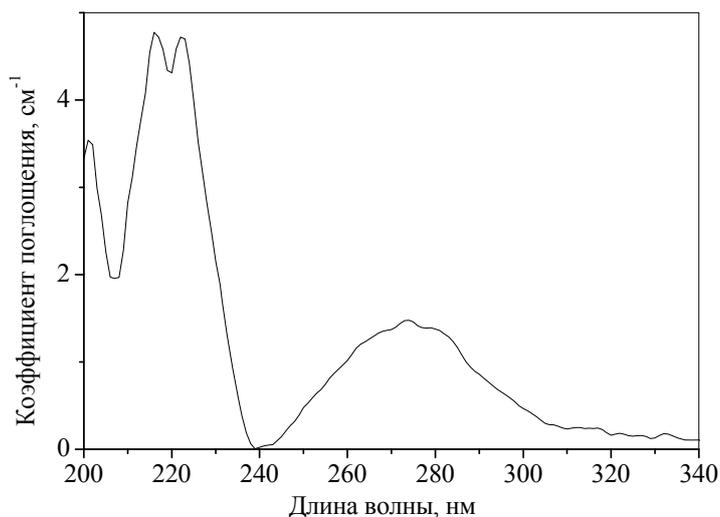


Рис. 2. Спектр поглощения спинномозговой жидкости больного с вычтенной коротковолновой экспоненциальной полосой

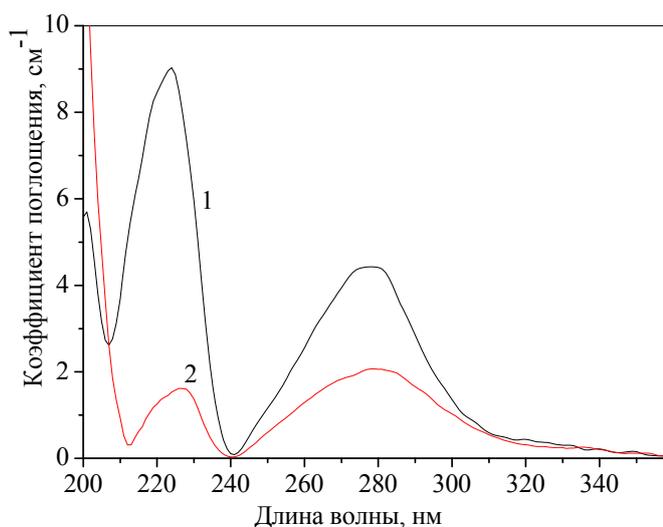
В другом подходе использовался усредненный спектр поглощения спинномозговой жидкости для группы условно здоровых пациентов для выявления спектральных особенностей спинномозговой жидкости больных. Затем получена разность спектра поглощения больного и данного усредненного спектра. Этот способ позволил определить ранее описанным методом дополнительные полосы поглощения, характерные для больных (рис. 3).



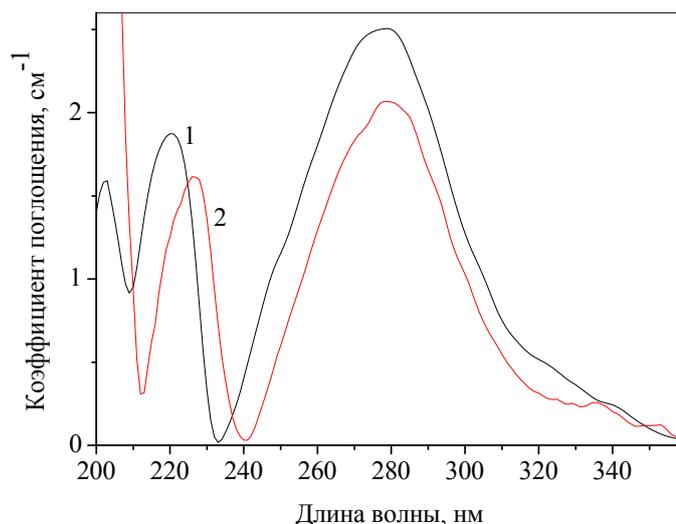
*Рис. 3.* Разность спектра поглощения спинномозговой жидкости больного и усредненного спектра поглощения спинномозговой жидкости группы здоровых людей с удаленной коротковолновой экспоненциально спадающей полосой.

Для практического использования важно знать относительное изменение концентрации веществ, которая определяется площадью полосы поглощения в координатах волнового числа. Для этого было проведено интегрирование спектров по двум характерным областям: коротковолновой (210–240 нм) и длинноволновой (240–320 нм).

У пациентов с нейрохирургическими заболеваниями выявлены две характерные группы: с высоким содержанием белка в спинномозговой жидкости (до 0,75 г/л) и близким к норме содержанием белка (до 0,34 г/л). Характерные спектры поглощения в сравнении с нормой представлены на рис. 4 и рис. 5.



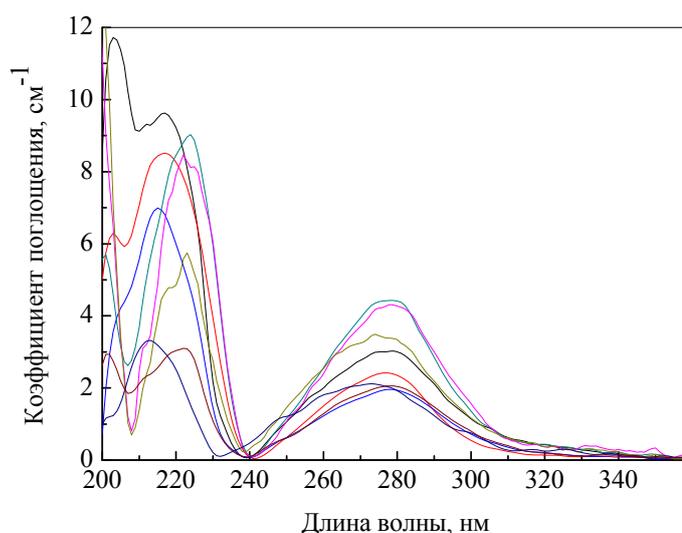
*Рис. 4.* Спектр поглощения спинномозговой жидкости больного при нарушении ликвородинамики и содержании белка 0,44 г/л (1) и спектр поглощения спинномозговой жидкости в случае нормы при содержании белка 0,22 г/л (2)



*Рис. 5.* Спектр поглощения спинномозговой жидкости пациента с травмой опорно-двигательного аппарата при нормальном содержании белка (1) и спектр поглощения спинномозговой жидкости в случае нормы (2)

На рис. 6 и 7 представлена совокупность характерных спектров поглощения пациентов с нейрохирургическими заболеваниями при повышенном и близким к норме содержанием белка.

При использовании компьютерного анализа для математической обработки УФ-спектров поглощения спинномозговой жидкости были выявлены следующие особенности. Спектры поглощения спинномозговой жидкости пациентов с заболеваниями позвоночно-двигательного сегмента имеют характерные полосы, максимумы которых часто находятся на следующих длинах волн: 203, 219, 222, 226 и 280 нм. Усредненный спектр поглощения спинномозговой жидкости группы условно здоровых пациентов имеет максимумы в области 226 и 277 нм.



*Рис. 6.* Совокупность спектров поглощения спинномозговой жидкости пациентов с нейрохирургическими заболеваниями при высоком содержании белка (от 0,37 до 0,75 г/л)

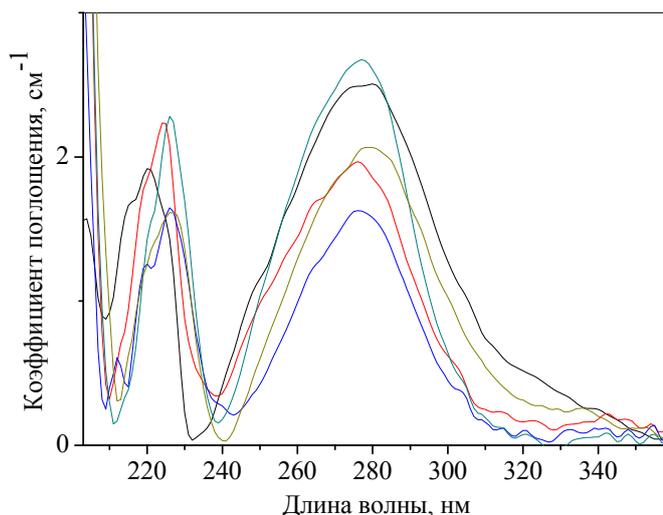


Рис. 7. Совокупность спектров поглощения спинномозговой жидкости пациентов с нейрохирургическими заболеваниями при содержании белка, близком к норме (от 0,16 до 0,34 г/л)

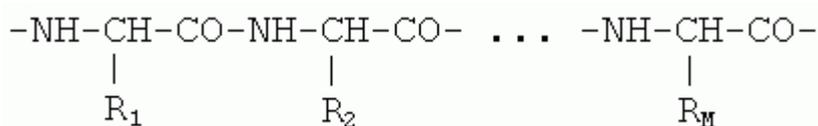
В таблице 1 приведены результаты обработки УФ спектров поглощения спинномозговой жидкости в норме и при заболевании в сопоставлении с биохимическими данными.

Таблица 1. Сопоставление результатов математической обработки УФ спектров поглощения спинномозговой жидкости с биохимическими данными

диагноз		концентрация поглощающих компонентов в полосе 210-240 нм, $\int_{210}^{240} k(\nu) d\nu$ см <sup>-2</sup>	концентрация поглощающих компонентов в полосе 240-280 нм, $\int_{240}^{280} k(\nu) d\nu$ см <sup>-2</sup>	$k(\lambda_{\max}=220 \text{ нм}), \text{ см}^{-1}$	$k(\lambda_{\max}=280 \text{ нм}), \text{ см}^{-1}$	общий белок, г/л	изменения относительно нормы		
							концентрация поглощающих компонентов в полосе 210-240 нм	концентрация поглощающих компонентов в полосе 240-320 нм	общий белок
условно здоровые (n = 15)	средние показатели	5277	11175	1,71	2,02	0,22			
компрессионный синдром пояснично-крестцового отдела (n = 10)	1.	20791	35983	5,82	4,02	0,75	3,94	3,22	3,41
	2.	34934	32072	8,67	5,09	0,62	6,62	2,87	2,82
	3.	34165	22512	9,02	4,43	0,42	6,47	2,01	1,91
	4.	30528	22014	8,46	4,31	0,44	5,78	1,97	2,00
	5.	18907	19905	5,74	3,45	0,39	3,58	1,78	1,77
	6.	11149	18146	3,30	2,84	0,37	2,11	1,62	1,68
	7.	19704	16311	6,91	2,78	0,33	3,73	1,46	1,50
	8.	7542	14304	2,34	2,52	0,30	1,43	1,28	1,36
	9.	15189	14832	5,12	2,45	0,29	2,88	1,33	1,32
	10.	10393	14248	2,51	2,67	0,27	1,97	1,27	1,23
травма опорно-двигательного аппарата (n = 10)	1.	39102	29390	8,41	4,92	0,59	7,41	2,63	2,68
	2.	25620	28273	8,27	4,87	0,54	4,85	2,53	2,45
	3.	33475	23853	8,48	4,71	0,53	5,26	2,13	2,41
	4.	17302	20897	5,52	3,87	0,42	3,27	1,87	1,91
	5.	21088	18938	6,44	3,20	0,39	3,99	1,69	1,77
	6.	34545	17142	9,62	3,02	0,34	6,55	1,53	1,55
	7.	7966	16787	2,23	2,74	0,31	1,51	1,50	1,41
	8.	7353	13408	2,16	2,44	0,25	1,39	1,19	1,14
	9.	6155	10681	2,03	1,96	0,20	1,16	0,95	0,91
	10.	5486	8356	1,65	1,63	0,16	1,04	0,75	0,73

Сравнение спектров поглощения спинномозговой жидкости в норме и при заболевании показало, что в случае воспалительного процесса  $k$  возрастает до 5,3 раз в области 220 нм и до 2,5 раз в области 280 нм. Изменение концентрации поглощающих компонентов спинномозговой жидкости относительно нормы в области 220 нм составляет до 6,5 раз, а в области 280 нм – до 3,2 раз. При сопоставлении данных анализа спектров поглощения с биохимическими данными выявлена согласованность изменения концентрации общего белка относительно нормы с относительным изменением концентрации поглощающих компонентов в области 280 нм (таблица 1). Так, например, изменение концентрации общего белка по биохимическим данным составило от 3,41 до 0,73 раз. Относительное изменение концентрации поглощающих компонентов в области 280 нм составило соответственно от 3,22 до 0,75 раз. Согласно литературным данным поглощение в области 280 нм обусловлено ароматическими аминокислотами (в основном, тирозина и триптофана), входящими в состав белков [12, 13]. Однако, в области 220 нм концентрация поглощающих компонентов возрастает от 6,55 до 1,04 раз относительно нормы. При этом по биохимическим данным белковый состав спинномозговой жидкости у данной группы нейрохирургических больных остался неизменным, но изменилось количественное содержание общего белка. Это значит, что вклад в поглощение в области 220 нм связан не только с поглощением аминокислот белков, но и с изменениями в структуре белков спинномозговой жидкости, проявляющимися при заболевании.

Функциональные свойства белков определяются их конформацией, т.е. расположением полипептидной цепи в пространстве. Уникальность конформации для каждого белка определяется его первичной структурой, связанной с линейной последовательностью чередования аминокислот  $R_1, R_2, \dots, R_M$  в полипептидной цепи



Вторичная структура белков обусловлена способностью групп пептидной связи к водородным взаимодействиям:  $C=O \dots H-N$ . Пептидная цепь приобретает не произвольную, а строго определенную конформацию, фиксируемую водородными связями. Известны несколько способов укладки полипептидной цепи:  $\alpha$ -спираль - образуется внутрицепочечными водородными связями между NH-группой одного остатка аминокислоты и CO-группой четвертого от нее остатка;  $\beta$ -структура (складчатый лист) - образуется межцепочечными водородными связями или связями между участками одной полипептидной цепи изогнутой в обратном направлении; беспорядочный клубок – это участки, не имеющие правильной, периодической пространственной организации [13].

Под третичной структурой белка подразумевают пространственную ориентацию полипептидной спирали или способ укладки полипептидной це-

пи в определенном объеме. Третичная структура белка стабилизирована ковалентными, водородными, ионными связями, а также гидрофобно-гидрофильными взаимодействиями.

В результате изучения электронных спектров амидной группы  $-\text{CO}-\text{NH}-$  установлены электронные переходы, которые представлены на рис. 8.

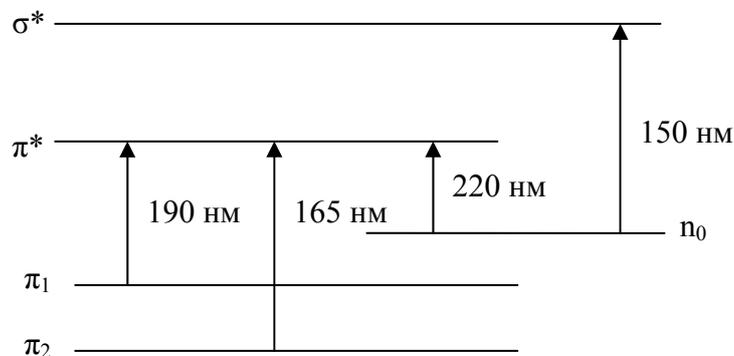


Рис.8. Электронные переходы в амидной группе

На рис. 8 уровень  $\pi_2$  отвечает связывающей, уровень  $\pi^*$  – несвязывающей орбиталиам  $\text{C}=\text{O}$ , уровень  $\pi_1$  – несвязывающей орбитали азота, уровень  $n_0$  – состоянию неподеленной пары электронов атома кислорода. Переход  $n_0 \rightarrow \sigma^*$  – атомный электронный переход в кислороде. При образовании вторичной структуры белка в виде  $\alpha$ -спирали наблюдается увеличение поглощения в области 220 нм, связанное с  $n_0 \rightarrow \pi^*$  переходом в амидной группе [12, 13].

Таким образом, в спектрах поглощения спинномозговой жидкости выявлены характерные полосы в области 220 и 280 нм, обусловленные поглощением аминокислот, входящих в состав белков. Изменения спектров поглощения в области 210-230 нм связаны с конформационными изменениями в структуре белков, проявляющиеся при заболевании. Увеличение коэффициента поглощения в области 220 нм связано с увеличением степени  $\alpha$ -спиральности белков спинномозговой жидкости.

При травмах нарушается проницаемость гематоэнцефалического барьера, что приводит к появлению в спинномозговой жидкости железосодержащих белков крови, в частности гемоглобина [14]. На рис. 9 представлен спектр поглощения спинномозговой жидкости, в которой присутствуют белки крови.

Анализ спектров поглощения спинномозговой жидкости пациентов с нейрохирургическими заболеваниями в видимой области позволил выявить характерные полосы, максимумы которых находятся на следующих длинах волн: 398, 428, 542, 578 нм. Полосы поглощения в области 428, 542 и 578 нм соответствуют производным гемоглобина – оксигемоглобину и метгемоглобину [15, 16]. Сравнение спектров поглощения спинномозговой жидкости в норме и при заболевании показало, что в случае присутствия в ликворе крови коэффициент поглощения возрастает до 10 раз в области 400 нм, до 8 раз в области 420 нм и до 9 раз в области 540, 580 нм.

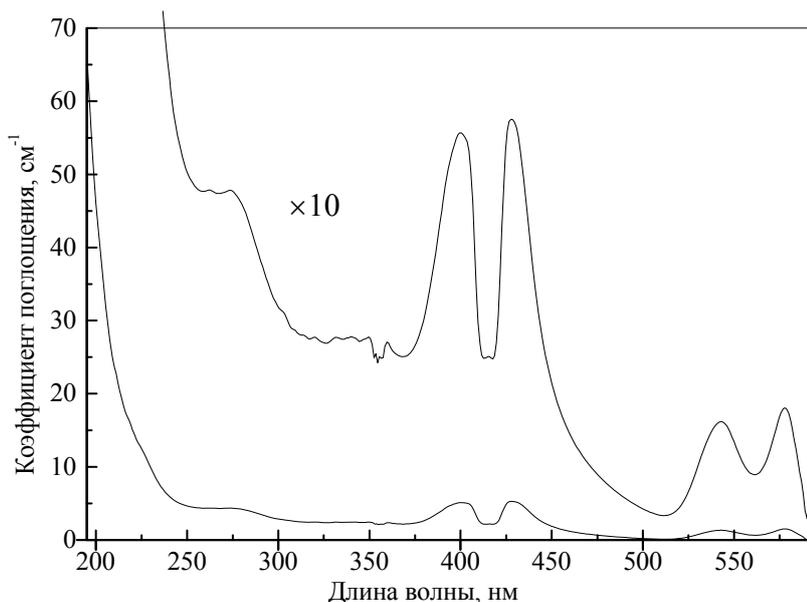


Рис. 9. Спектр поглощения спинномозговой жидкости больного и длинноволновая часть спектра, увеличенная в 10 раз по коэффициенту поглощения

Абсорбционный метод исследования спектров поглощения спинномозговой жидкости, предложенный выше, позволяет использовать его для целей диагностики и прогнозирования течения болезней.

**В ТРЕТЬЕЙ ГЛАВЕ** содержатся результаты хемилюминесцентных исследований спинномозговой жидкости при нейрохирургических заболеваниях. Компрессионный синдром пояснично–крестцового отдела позвоночника сопровождается воспалительным процессом в спинномозговой жидкости. В результате жизнедеятельности клеток вырабатываются активные формы кислорода (пероксиды и свободные радикалы), уровень которых при воспалительном процессе возрастает. Это приводит к накоплению поврежденных оснований ДНК, продуктов окисления белков и липидов [17]. Использование хемилюминесцентного метода для исследования спинномозговой жидкости у нейрохирургических больных позволяет получить дополнительную информацию, связанную с воспалительными процессами.

Хемилюминесценция спинномозговой жидкости наблюдалась на компьютерном хемилюминометре CL-3606М. Измерение производилось в режиме счета фотонов в спектральном диапазоне 400 – 850 нм (ФЭУ-79). Окислительная хемилюминесцентная реакция активизировалась перекисью водорода в присутствии катализатора при температуре  $30 \pm 0,1$  °С. Для этого готовился раствор люминола (106 мг), содержащего 10 мл 0,1М раствора NaOH. Из этого раствора составлялся раствор, контролирующий концентрацию перекиси водорода, который содержит 50 мкл щелочного раствора люминола и 20 мкл 6% раствора перекиси водорода.

Измеряемый раствор разливался в кварцевую кювету и устанавливался в разогретый до  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  измерительный барабан. В хемиллюминиметре должен наблюдаться на протяжении 90 мин сигнал с начальной интенсивностью  $\sim 10^5$  фотонов/с. Сигнал во времени экспоненциально затухает. В последний момент в прогретые пробирки, установленные в барабанном отделении хемиллюминиметра, добавляется 50 мкл 6% раствора перекиси водорода.

На рис. 10 представлены общий вид кинетики хемиллюминесценции спинномозговой жидкости. Резкий рост интенсивности свечения обусловлен добавлением в этот момент перекиси водорода. В дальнейшем наблюдается спад по экспоненциальному (или близкому к нему) закону. Регистрация производилась в режиме счета фотонов при температуре исследуемых образцов  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

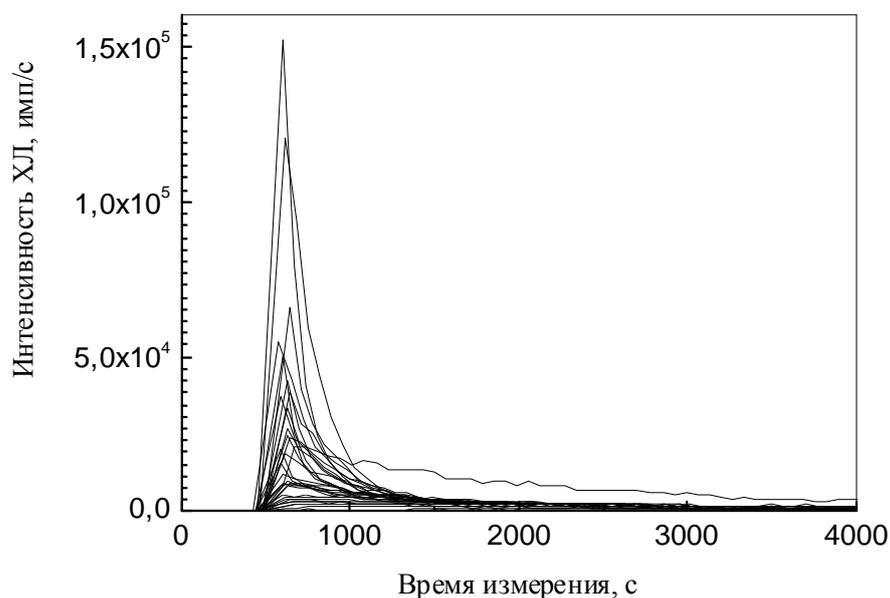


Рис. 10. Общий вид кинетики хемиллюминесценции спинномозговой жидкости

При логарифмировании по интенсивности (вертикальная ось) экспоненциальная зависимость видна как наклонная прямая линия. Угол наклона характеризует скорость затухания свечения, а значит и интенсивность окислительной химической реакции. На рис. 11 приведены характерные затухания хемиллюминесценции для медленной компоненты.

Для дальнейшей работы необходимо выбрать пределы интегрирования по времени для определения общего потока фотонов спинномозговой жидкости. В случае, если важна только быстрая компонента хемиллюминесценции, то время интегрирования необходимо выбрать в пределах от 15 до 20 мин после добавления перекиси водорода. В случае, если важна только медленная компонента хемиллюминесценции, то может быть достаточным определение интенсивности свечения после того, как быстрая компонента высветилась, т. е. примерно через 25 минут, либо интегрировать начиная с 25 мин после добавления перекиси и заканчивая на 90 или 180 мин. Для облегчения такого

выбора ниже представлена зависимость постоянной времени свечения от максимальной интенсивности хемилюминесценции в полулогарифмических координатах рис. 12 и двойных логарифмических рис. 13.

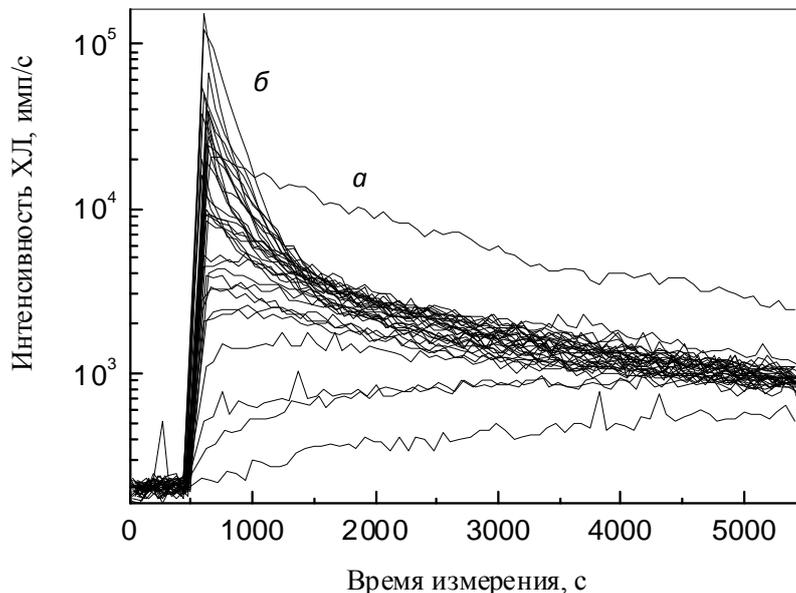


Рис. 11. Характерные затухания хемилюминесценции для медленной компоненты (а) и суперпозиции быстрой и медленной компонент (б).

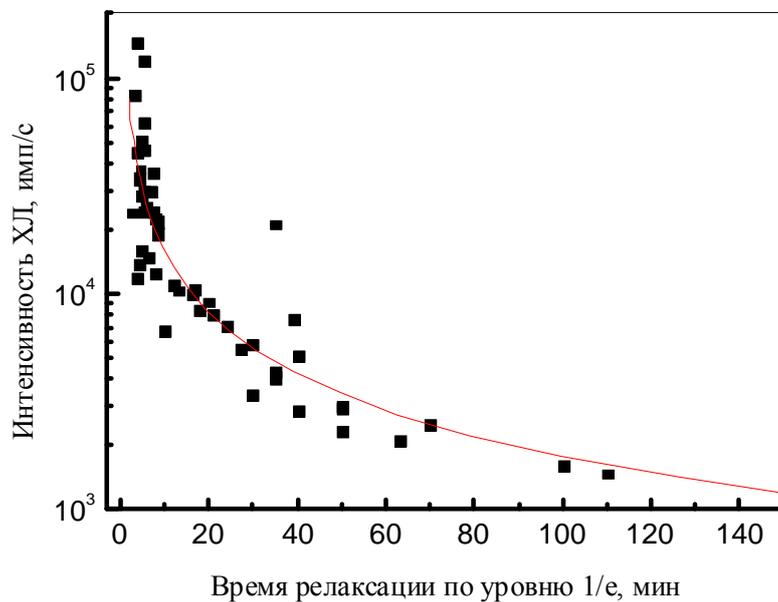
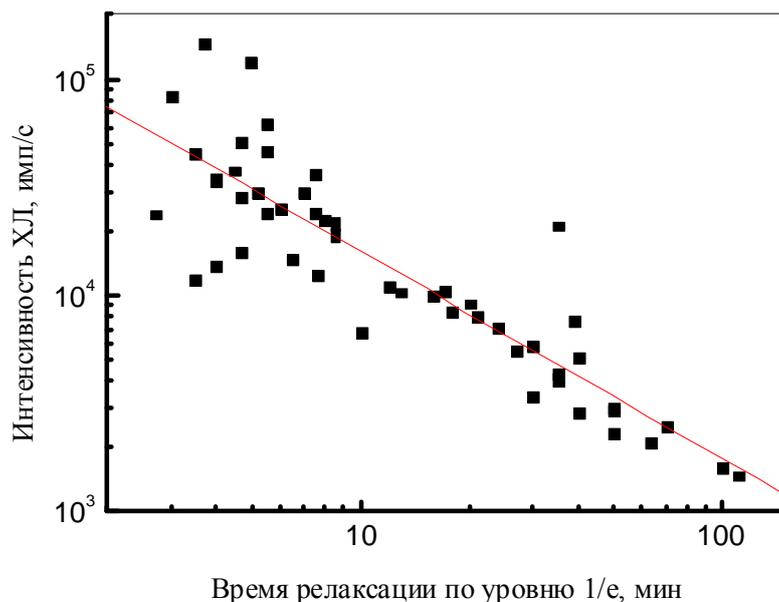


Рис.12. Взаимосвязь постоянной времени релаксации хемилюминесценции от интенсивности хемилюминесценции в максимуме в полулогарифмических координатах. Точки представляют данные измерений для каждого образца спинномозговой жидкости. Плавная линия – усредненная интерполяция.



*Рис.13.* Взаимосвязь постоянной времени релаксации хемилюминесценции от интенсивности хемилюминесценции в максимуме в двойных логарифмических координатах. Точки представляют данные измерений для каждого образца спинномозговой жидкости. Прямая линия – усредненная интерполяция

В результате исследований наблюдались заметные изменения окислительной хемилюминесценции спинномозговой жидкости в зависимости от вида и тяжести заболевания. При воспалительных процессах содержание белков в спинномозговой жидкости повышается. В зависимости от этого возрастает интенсивность хемилюминесценции. Кинетика хемилюминесценции позволяет выделить несколько компонент затухания: первая компонента представляет быстрое затухание с длительностью до 15 мин, остальные – медленное затухание с общей длительностью до 90 мин.

При сопоставлении спектров хемилюминесценции с клиническими проявлениями заболеваний получены следующие результаты. Хемилюминесцентные измерения спинномозговой жидкости у больных с осложненной травмой позвоночно-двигательного сегмента (давность заболевания 1 год и 30 лет с умеренно выраженными неврологическими расстройствами при нормальном количестве белка) отмечалось увеличение времени затухания хемилюминесценции (20–40 мин), снижение пиковой интенсивности хемилюминесценции и суммарного потока фотонов ( $8,0 \cdot 10^3$  фот/с;  $1,05 \cdot 10^7$  фот). У больных с выраженными прогрессирующими текущими неврологическими расстройствами (длительность заболевания 5 лет, при низком количестве белка) в спинномозговой жидкости отмечалось увеличение интенсивности хемилюминесценции ( $1,5 \cdot 10^5$  фот/с) и суммарного потока фотонов ( $3,7 \cdot 10^7$  фот/с), снижение времени затухания хемилюминесценции (3,7 мин). У больных с неосложненной травмой позвоночно-двигательного сегмента (давность заболевания 15 лет, без неврологических расстройств при нормальном количестве белка) параметры хемилюминесценции спинномозговой жидкости находились в пределах:  $1,38 \cdot 10^4$  фот/с; 4 мин;  $1,25 \cdot 10^7$  фот/с.

В **ЧЕТВЕРТОЙ ГЛАВЕ** изучена эффективность связывания лекарственного препарата «Эссенциале Н» с клетками крови. Для исследования использован метод УФ абсорбционной спектроскопии. Гепатопротектор «Эссенциале Н» используется в медицинской практике для восстановления функциональной активности печени и снижения токсического действия химиотерапевтических препаратов у больных онкологическими и др. заболеваниями [10]. В литературных источниках и инструкции к препарату описаны рекомендации по введению препарата с кровью [18], однако конкретных указаний на время его экспозиции в данном составе не имеется. В связи с этим целью исследования являлось изучение эффективности связывания препарата «Эссенциале Н» с клетками крови (эритроцитами) в зависимости от времени экспозиции в термостате.

Исследование проводилось с кровью здоровых доноров (*in vitro*). У донора производился забор 450 мл крови, после чего кровь центрифугировали в рефрежераторной центрифуге Мультифуга-4 в течение 15 минут при скорости 2000 об/мин. После разделения крови на компоненты нативная плазма возвращалась донору. Исследование проводили при временной экспозиции: 10 секунд, 10, 20, 30 и 60 мин. К эритроцитарно-лейкоцитарной взвеси добавляли «Эссенциале Н» в объеме 5 мл. Полученную смесь помещали в термостат при температуре 37<sup>0</sup>С. В результате происходило связывание «Эссенциале Н» с клетками крови (эритроцитами). Затем взвесь отмывали центрифугированием в физиологическом растворе в режимах, указанных ранее. Предполагалось, что связанный с клетками крови «Эссенциале Н» выпадает в осадок после центрифугирования, а несвязанный препарат содержится в надосадочной жидкости. Поэтому дальнейшее исследование проводили с надосадочной жидкостью крови, содержащей «Эссенциале Н».

Для реализации поставленной цели использовалась методика, основанная на измерениях с последующим математическим анализом УФ спектров поглощения надосадочной жидкости крови и «Эссенциале Н».

В литературных источниках отсутствует информация о спектральных свойствах «Эссенциале Н» и надосадочной жидкости крови. В связи с этим проведена регистрация спектров поглощения лекарственного препарата и надосадочной жидкости. Так как спектры малоструктурированы, было проведено выделение характерных полос поглощения по методике, изложенной во второй главе.

Выявлено, что спектр поглощения «Эссенциале Н» имеет характерные полосы поглощения, максимумы которых находятся на длинах волн < 210, 247 нм, 260 нм 285 и 351 нм. «Эссенциале Н» относится к препаратам фосфолипидного ряда, которые имеют максимумы полос поглощения на длинах волн 213, 225, 239, 253 нм, 260 и 280 нм [19].

В спектре поглощения надосадочной жидкости имеет широкую полосу поглощения в области 282 нм, которая соответствует поглощению ароматических аминокислот (тирозин, триптофан) в этой области.

При сравнении спектра поглощения надосадочной жидкости и спектра поглощения «Эссенциале Н» выявлено, что полосы поглощения препарата не перекрываются с полосами поглощения надосадочной жидкости (рис. 14). Это позволяет обнаружить «Эссенциале Н» в надосадочной жидкости.

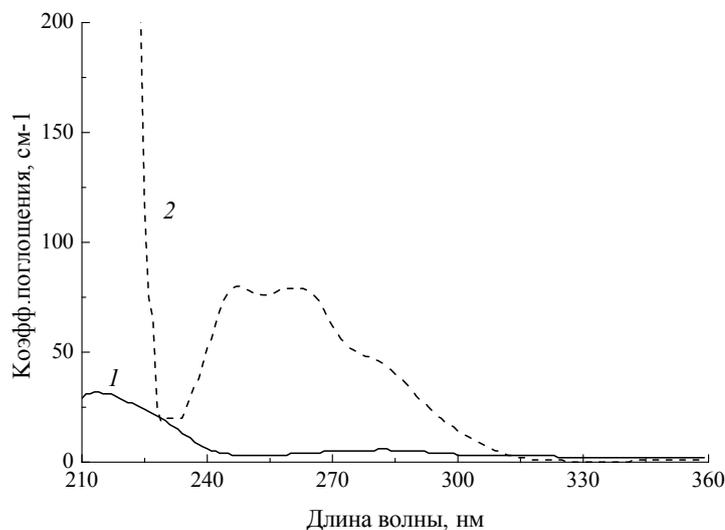


Рис. 14. Сравнительный спектр поглощения надосадочной жидкости крови (1) и «Эссенциале Н» (2)

Затем была проведена регистрация спектров поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н» при временах экспозиции в термостате ( $37^{\circ}\text{C}$ ) от 0 до 60 мин. Далее выполнена математическая обработка спектров для выделения характерных полос поглощения по методике, изложенной в главе 2. На рис. 15 представлены спектры поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н» при различных временах экспозиции в термостате.

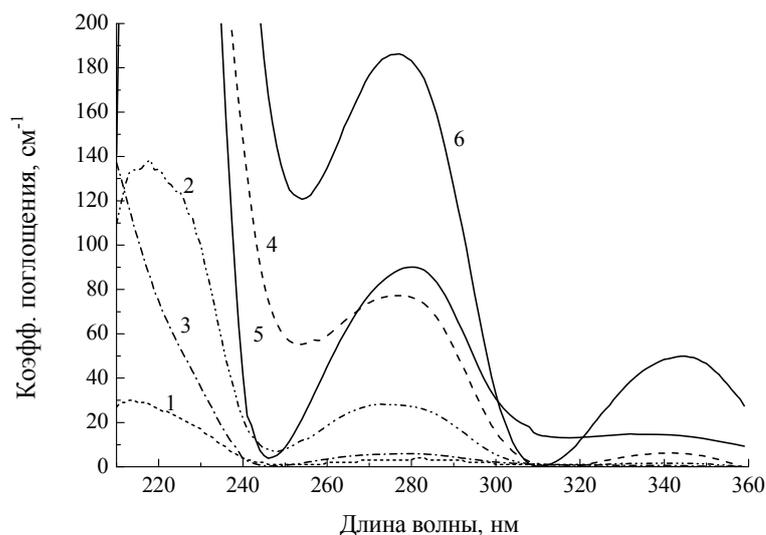


Рис. 15. Спектр поглощения надосадочной жидкости крови (1) и надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н», выдержанной в термостате в течение: 10 секунд (2), 10 мин (3), 20 мин (4), 30 мин (5), 60 мин (6)

В таблице 2 приведены характеристики полос поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н» при различных временах экспозиции.

Таблица 2. Характеристики полос поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н»

Время экспозиции	215-220 нм		277-282 нм		332-344 нм	
	$k_{max}$ , см <sup>-1</sup>	$\lambda_{max}$ , нм	$k_{max}$ , см <sup>-1</sup>	$\lambda_{max}$ , нм	$k_{max}$ , см <sup>-1</sup>	$\lambda_{max}$ , нм
60 мин	1209,63	216	186,24	277	49,93	344
30 мин		220	80,16	280	4,78	332
20 мин	544,16	<210	77,21	277	6,25	342
10 мин		<210	5,8	279		
10 с	138,21	218	27,91	282	1,43	340

Анализ спектров поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н» показывает, что при времени экспозиции 10 с в спектре поглощения надосадочной жидкости крови присутствуют полосы поглощения «Эссенциале Н» в области 218 нм и 340 нм. Это связано с тем, что препарат ещё не связывается с клетками крови, и может быть обнаружен в надосадочной жидкости. При времени экспозиции 10 мин спектр поглощения имеет полосу в области 279 нм, характерную для «чистой» надосадочной жидкости. Значит, в течение 10 мин происходит эффективное связывание «Эссенциале Н» с клетками крови. При дальнейшей экспозиции в течение 20 мин, 30 мин и 60 мин происходит высвобождение «Эссенциале Н» в надосадочную жидкость, и это проявляется в спектре поглощения, который содержит характерные полосы в области 216-220 нм и 277-280 нм.

Для характеристики концентрации «Эссенциале Н» была определена площадь полос поглощения надосадочной жидкости, содержащей «Эссенциале Н». Для этого было проведено интегрирование спектров по характерным областям УФ диапазона (240–360 нм). В таблице 6 приведены результаты нахождения площадей полос поглощения.

Относительное увеличение концентрации «Эссенциале Н» для времени экспозиции 1 час составило 39,0 раз; при 30 мин – 19,5 раз; при 20 мин – 11,8 раз; при 10 мин – 1,3 раза; при 10 с – 6,3 раза.

Таким образом, минимальная концентрация препарата в надосадочной жидкости, а следовательно, и степень связывания «Эссенциале Н» с клетками крови, является максимальной при экспозиции в течение 10 минут. Дальнейшее увеличение экспозиции приводит к разрушению клеток крови и освобождению «Эссенциале Н». Это позволяет регистрировать препарат в спектре поглощения надосадочной жидкости крови и определять количественное содержание «Эссенциале Н».

### **Основные результаты и выводы**

В результате исследований наблюдались заметные изменения спектров поглощения спинномозговой жидкости в УФ и видимой области спектра в

зависимости от вида и тяжести заболеваний. Данные абсорбционной спектроскопии подтверждаются хемилюминесцентными исследованиями.

Для анализа слабоструктурированных спектров поглощения спинномозговой жидкости разработана методика, позволяющая выявлять различия в спектрах поглощения спинномозговой жидкости при заболевании и в период выздоровления. Данная методика использована для изучения эффективности направленного транспорта лекарственного препарата «Эссенциале Н».

По итогам исследования можно сделать следующие **ВЫВОДЫ**:

1. Спектры поглощения спинномозговой жидкости в УФ области слабоструктурированы. Для обнаружения характерной структуры разработана методика на основе измерений и последующего компьютерного анализа спектров поглощения спинномозговой жидкости, позволяющая выявлять характерные изменения в спектрах, связанные с патологией.
2. В спектрах поглощения спинномозговой жидкости выявлены полосы, максимумы которых находятся в области 220 нм и 280 нм. Выделенные полосы поглощения обусловлены поглощением аминокислот, входящих в состав белков. Сравнение спектров поглощения спинномозговой жидкости в норме и при заболевании показало, что в случае воспалительного процесса коэффициент поглощения возрастает до 5,3 раз в области 220 нм и до 2,5 раз в области 280 нм.
3. Изменения спектров поглощения в области 210-230 нм связаны с конформационными изменениями в структуре белков, проявляющиеся при заболевании. Увеличение коэффициента поглощения в области 220 нм связано с увеличением степени  $\alpha$ -спиральности белков спинномозговой жидкости.
4. Анализ спектров поглощения спинномозговой жидкости пациентов с нейрохирургическими заболеваниями в видимой области позволил выявить характерные полосы, максимумы которых находятся на следующих длинах волн: 398, 428, 542, 578 нм. Полосы поглощения в области 428, 542 и 578 нм соответствуют производным гемоглобина – оксигемоглобину и метгемоглобину. Появление в спинномозговой жидкости гемоглобина и его производных свидетельствует о нарушении проницаемости и даже разрушении гематоэнцефалического барьера вследствие неврологических заболеваний или травм. Сравнение спектров поглощения спинномозговой жидкости в норме и при заболевании показало, что в случае присутствия в спинномозговой жидкости крови коэффициент поглощения возрастает до 10 раз в области 400 нм, до 8 раз в области 420 нм и до 9 раз в области 540, 580 нм.
5. При воспалительных процессах в спинномозговой жидкости накапливаются продукты окисления белков. В зависимости от этого меняется интенсивность и время затухания хемилюминесценции. При сопоставлении хемилюминесцентных измерений спинномозговой жидкости с проявлениями заболеваний выявлено, что у больных с осложненной травмой позвоночно-двигательного сегмента (при высоком количестве белка в спинномозговой жидкости) отмечалось увеличение времени затухания хемилюминес-

ценции (20–40 мин), снижение пиковой интенсивности хемилюминесценции и суммарного потока фотонов ( $8,0 \cdot 10^3$  фот/с;  $1,05 \cdot 10^7$  фот). У больных с выраженными неврологическими расстройствами (при низком количестве белка) в спинномозговой жидкости отмечалось увеличение интенсивности хемилюминесценции ( $1,5 \cdot 10^5$  фот/с) и суммарного потока фотонов ( $3,7 \cdot 10^7$  фот/с), уменьшение времени затухания хемилюминесценции (3,7 мин). У больных с неосложненной травмой позвоночно-двигательного сегмента (при нормальном количестве белка) параметры хемилюминесценции спинномозговой жидкости находились в пределах:  $1,38 \cdot 10^4$  фот/с; 4 мин;  $1,25 \cdot 10^7$  фот/с.

6. Для характеристики эффективности связывания «Эсенциале Н» с клетками крови (эритроцитами) использована та же методика, что и для анализа спинномозговой жидкости. Изучена степень связывания «Эсенциале Н» с клетками крови в зависимости от времени экспозиции в термостате от 10 с до 60 мин.
7. При анализе УФ спектров поглощения надосадочной жидкости крови, содержащей «Эсенциале Н» выявлено, что при экспозиции 10 мин достигалось наибольшее связывание «Эсенциале Н» с клетками крови. Результаты УФ спектроскопических исследований согласуются с клиническими данными, в которых сообщается об улучшении биохимических показателей и уменьшении количества осложнений у онкологических больных при экстракорпоральной фармакокоррекции с «Эсенциале Н» при экспозиции препарата с клетками крови в течение 10 минут.
8. Новые методы исследования, возникшие на стыке клинической медицины и физики с применением компьютерной техники, позволяют более детально оценивать и интерпретировать состояния качественных свойств спинномозговой жидкости у нейрохирургических больных. Разработка физических методов анализа данных позволяет оптимизировать и совершенствовать подходы к лечению заболеваний.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

- [1]. Титов Ю.М., Сороковиков В.А., Семибратова В.А., Грузин П.Г. и др. Спектроскопические исследования цереброспинальной жидкости // Труды VII Всероссийской школы-семинара Люминесценция и сопутствующие явления. - Иркутск: ИГУ, 2001. С.80-82.
- [2]. Грузин П.Г., Сороковиков В.А., Титов Ю.М., Семибратова В.А. Изменение цереброспинальной жидкости при поражении ПДС // Тезисы III съезда нейрохирургов. - СПб., 2002. С. 242.
- [3]. Сороковиков В.А., Потапов В.Э., Копылов В.С., Семибратова В.А., Титов Ю.М. Спектроскопия и хемилюминесценция как метод исследования цереброспинальной жидкости у больных сколиозом // Тезисы III съезда нейрохирургов. – СПб., 2002. С. 244.
- [4]. Семибратова В.А., Титов Ю.М. Спектроскопия спинномозговой жидкости человека // Труды IV Сессии молодых ученых «Волновые про-

- цессы в проблеме космической погоды», БШФФ-2003 – Иркутск: ИГУ, 2003. С. 190-194.
- [5].Грузин П.Г., Потапов В.Э., Семибратова В.А., Сороковиков В.А., Титов Ю.М. Методы анализа слабоструктурированных УФ спектров поглощения ликвора для нейрохирургических задач // Труды V Сессии молодых ученых «Взаимодействие полей и излучения с веществом», БШФФ-2004. – Иркутск: ИГУ, 2004. С. 224-228.
- [6].Семибратова В.А., Титов Ю.М. Абсорбционный метод определения железосодержащих компонентов ликвора для нейрохирургических задач // Труды X Сессии молодых ученых «Современные проблемы в астрофизике и физике космической плазмы», БШФФ-2007. – Иркутск: ИГУ, 2007. С. 309-312.
- [7].Семибратова В.А., Титов Ю.М. Хемилюминесценция спинномозговой жидкости // Труды X Сессии молодых ученых «Современные проблемы в астрофизике и физике космической плазмы», БШФФ-2007. – Иркутск: ИГУ, 2007. С. 312-314.
- [8].Семибратова В.А., Титов Ю.М. Метод определения железосодержащих компонентов ликвора для нейрохирургических задач // Оптика и спектроскопия. – 2008. Т.5, №3. С. 423-427.
- [9].Семибратова В.А., Михайлов С.А., Морилов Д.Д., Горбачев В.И. УФ спектроскопия лекарственных препаратов // Известия ВУЗов. Физика. 2009. Т.52, №12/3. С. 287-290.
- [10].Морилов Д.Д., Горбачев В.И., Дворниченко В.В., Семибратова В.А., Михайлов С.А., Москвина Н.А. Способ введения стабилизатора мембран «Эссенциале Н» // Медицинская физика. 2009. №4 (44). С. 86-90.
- [11].Морилов Д.Д., Горбачев В.И., Дворниченко В.В., Семибратова В.А., Михайлов С.А. К вопросу о фармакокинетике «Эссенциале Н» //Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 73, №1. С. 26-29.
- [12].Решение о выдаче патента на изобретение от 09 февраля 2010 года по заявке №2009118629/14 «Способ лечения анемии при химиолучевой терапии» авторов Морилова Д.Д., Горбачева В.И., Дворниченко В.В., Семибратовой В.А.

### **Список цитируемой литературы**

- [1].Фридман, А. П. Основы ликворологии / А. П. Фридман. – Л. : Медицина, 1971. – 647 с.
- [2].Маршалл, В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл ; пер. с англ. под ред. Н. И. Новикова. – М. – СПб. : Бинум – Невский диалект, 2000. – 367 с.
- [3].Мошкин, А. В. Клиническое значение биохимического исследования спинномозговой жидкости / А. В. Мошкин, Л. М. Бурмакова // Лаборатория. – 1997. – №7. – С. 3-6.

- [4].Sophian, L. H. Ultraviolet absorption spectra of normal cerebrospinal fluid / L. H. Sophian, V. J. Connolly // *Physical chemistry*. – 1951. – Vol. 55, № 5. – P. 712–716.
- [5].Studies in difference spectra of cerebrospinal fluid / C. W. Kreke [et al.] // *Clinical chemistry*. – 1966. – Vol. 12, № 3. – P. 165-174.
- [6].A simple, inexpensive, and precise spectrophotometric method for evaluating the concentration of ascorbic acid in cerebrospinal fluid: data from different neurological pathologies / A. Cupello [et al.] // *International journal of neuroscience*. – 2002. – Vol. 112, № 11. – P. 1337-1345.
- [7].Фрайфельдер, Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии / Д. Фрайфельдер. – М. : Мир, 1980. – 582 с.
- [8].Карнаухова, Л. И. УФ-спектроскопия биологических макромолекул / Л.И. Карнаухова, Е.Н. Тупицын. – Саратов: изд-во Саратовского гос. ун-та, 2002. – 15 с.
- [9].Горбачев, В. И. Экстракорпоральная фармакотерапия в лечении инфекционных осложнений: моногр. / Под ред. В. И. Горбачева, Т. В. Мухоедовой, Н. Г. Корнилова. – Иркутск, 2009. – 135 с.
- [10].Ушкалова, Е. А. Место эссенциальных фосфолипидов в современной медицине / Е. А. Ушкалова // *Фарматека*. – 2003. – № 10 (73). – С. 10-15.
- [11].Эйнштейн, Э. Белки мозга и спинномозговой жидкости в норме и патологии / Э. Эйнштейн. – М. : Мир, 1988. – 280 с.
- [12].Демченко, А. П. УФ спектрофотометрия и структура белков / А. П. Демченко. – Киев : Наукова думка, 1981. – 208 с.
- [13].Волькенштейн, М. В. Биофизика / М. В. Волькенштейн. – М. : Наука, 1988. – 593 с.
- [14].Bradbury, M. The concept of a blood - brain barrier / M. Bradbury. – New York : Wiley, 1979. – 465 p.
- [15].Zijistra, W. G. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin and methemoglobin / W. G. Zijistra, A. Buusrma, W. P. Meeuwseen van der Roest // *Clinical chemistry*. – 1991. – Vol. 37, № 9. – P. 1633-1638.
- [16]. Блюменфельд, Л.А. Гемоглобин / Л. А. Блюменфельд // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – №4. – С. 34-38.
- [17].Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биологической химии*. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
- [18].Бурбелло, А. Т. Современные лекарственные средства / А. Т. Бурбелло, А. В. Шабров, П. П. Денисенко. – СПб. : Нева, 2006. – 896 с.
- [19].Chiral molecular self-assembly of phospholipid tubules: A circular dichroism study / M. S. Spector [et al.] // *PNAS*. – 1996. – Vol. 93, № 23. – P. 12943-12946.