

СИНТЕЗ ЛИНОЛЕОВОЙ КИСЛОТЫ, МЕЧЕННОЙ ^{13}C И ^{14}C , ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Я. Я. Тыньо¹✉, Г. В. Морозова², Ю. К. Бирюкова³, Д. А. Сивохин⁴, Н. В. Позднякова⁵, М. В. Зылькова³, Е. С. Богданова³, М. С. Смирнова³, А. Б. Шевелёв^{3,6}

¹ Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Россия

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

³ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

⁵ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

⁶ Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова, Москва, Россия

В настоящее время для диагностики заболеваний печени и билиарной системы требуется разработка простого неинвазивного теста с высокой чувствительностью и специфичностью. Соединения, меченные изотопом углерода, уже имеют широкое применение в диагностике различных заболеваний методами дыхательных тестов, безопасны и способны достоверно выявлять метаболические нарушения или дефицит специфических ферментов в органах. Целью работы было получить линолеовую кислоту, меченную ^{13}C и ^{14}C , по степени очистки пригодную для проведения дыхательных тестов в целях диагностики заболеваний гепатобилиарной системы. В предложенном способе химический выход реакции синтеза ^{13}C -линолеовой кислоты по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 86,4%, по ^{13}C -карбонату бария — 96,0%. Химический выход реакции синтеза ^{14}C -линолеовой кислоты по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 87,39%, по ^{14}C -карбонату бария — 97,1%. Удельная радиоактивность ^{14}C -линолеовой кислоты составила $45,36 \pm 0,02$ мКи/г. Радиохимический выход реакции — 96,0%. Способ удобен для серийного выпуска готового продукта.

Ключевые слова: дыхательный тест, линолеовая кислота, ^{13}C , ^{14}C , гепатобилиарная система, заболевания печени

Вклад авторов: Я. Я. Тыньо — идея, общее руководство; Г. В. Морозова — синтез конечных соединений путем карбоксилирования реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C , материальный баланс всей схемы синтеза; Ю. К. Бирюкова — ЯМР-анализ конечного продукта синтеза; Д. А. Сивохин — обзор литературы, подготовка рукописи к печати; Н. В. Позднякова — обзор литературы; М. В. Зылькова — определение уровня радиоактивности атомов углерода в исходных веществах, полупродуктах синтеза и конечных соединениях; Е. С. Богданова — расшифровка ЯМР-спектра конечных продуктов синтеза; М. С. Смирнова — определение температуры плавления конечного соединения; А. Б. Шевелёв — материально-техническое снабжение работы и обеспечение доступа к оборудованию, редактирование перевода рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ярослав Ярославович Тыньо
Сиреневый бульвар, д. 4, г. Москва, 105122; ytynio@mail.ru

Статья получена: 31.03.2020 **Статья принята к печати:** 15.04.2020 **Опубликована онлайн:** 25.04.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.022

SYNTHESIS OF ^{13}C - AND ^{14}C -LABELED LINOLEIC ACIDS FOR USE IN DIAGNOSTIC BREATH TESTS FOR HEPATOBILIARY SYSTEM DISORDERS

Tynio YY¹✉, Morozova GV², Biryukova YuK³, Sivokhin DA⁴, Pozdnyakova NV⁵, Zylkova MV³, Bogdanova ES³, Smirnova MS³, Shevelev AB^{3,6}

¹ Russian State University of Physical Education, Sport, Youth and Tourism, Moscow, Russia

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁵ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

⁶ Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, Russia

At present, there is a need for a simple, noninvasive, highly specific and sensitive diagnostic test for hepatobiliary system disorders. Compounds labeled with carbon isotopes are widely used in various diagnostic breath tests; they are safe and can reliably detect a metabolic disorder or enzyme deficiency. The aim of this study was to synthesize ^{13}C - and ^{14}C -labeled linoleic acids suitable for use in hepatobiliary breath tests in terms of purity. In the synthesis of ^{13}C -labeled linoleic acid, the chemical yield for 1-bromo-8,11-heptadecadien was 86.4% and the chemical yield for barium carbonate- ^{13}C , 96.0%. In the synthesis of ^{14}C -labeled linoleic acid, the chemical yield for 1-bromo-8,11-heptadecadien was 87.39%; for barium carbonate- ^{14}C it was 97.1%. The specific radioactivity of ^{14}C -labeled linoleic acids was 45.36 ± 0.02 mCi/g. The radiochemical yield of the reaction was 96.0%. The proposed method is suitable for batch production.

Keywords: breath test, linoleic acid, ^{13}C , ^{14}C , hepatobiliary system, liver disease

Author contribution: Tynio YY conceived and supervised the study; Morozova GV synthesized the final product by carboxylation of the Grignard reagent with ^{13}C and ^{14}C dioxides, did preparative calculations; Biryukova YuK conducted NMR-analysis of the final product; Sivokhin DA analyzed the literature and wrote the manuscript; Pozdnyakova NV analyzed the literature; Zylkova MV measured the radioactivity of carbon atoms in the reagents, intermediate and final products; Bogdanova ES analyzed the NMR spectra of the final products; Smirnova MS determined the melting point of the final products; Shevelev AB provided reagents and instrumentation and revised the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yaroslav Y. Tynio
Sirenevi bulvar, 4, Moscow, 105122; ytynio@mail.ru

Received: 31.03.2020 **Accepted:** 15.04.2020 **Published online:** 25.04.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.022

Численность наблюдаемых пациентов с хроническими заболеваниями печени, приводящими к циррозу (вирусные гепатиты В и С, алкогольные и токсические гепатиты, первичный склерозирующий холангит и др.), непрерывно растет [1].

Биопсия печени остается золотым стандартом оценки состояния органа. Однако инвазивность процедуры и связанные с этим риски осложнений для пациента не позволяют использовать этот метод в качестве рутинного [2]. Внедрение в практику методов неинвазивной диагностики, обладающих высокой достоверностью, простотой выполнения и безопасностью, как для самого пациента, так и для обслуживающего персонала [3], позволит оценивать эффективность лечения в динамике, наличие функциональных резервов печени [2, 4]. Этим функциональные тесты выгодно отличаются от эластографии или расчета лабораторных индексов APRI [5] либо Forns [6].

Диагностика с помощью дыхательных тестов основана на способности различных органов и систем метаболизировать ^{13}C - и ^{14}C -препараты с образованием $^{13}\text{CO}_2$ [7] или $^{14}\text{CO}_2$ [8], которые распределяются кровеносной системой по всем органам и тканям, и, выделяясь через легкие, могут быть достоверно обнаружены в выдыхаемом воздухе пациента с помощью масс-спектрометрии или ИК-спектрометрии в варианте NDIRS (недиспергирующий инфракрасный анализатор) и лазерной абсорбции CRDS (спектральная техника для измерения поглощения, основанная на определении времени затухания излучения в ячейке с двумя высокоотражающими зеркалами при многократном прохождении света между ними) [3, 9]. Таким образом, появляется возможность постановки диагноза на основе анализа фармакокинетических показателей — изменения концентрации $^{14}\text{CO}_2$ в выдыхаемом воздухе во времени и информации о путях и скоростях метаболических превращений препарата [10].

Уже разработаны и внедрены в практику дыхательные тесты для оценки функционального состояния печени на основе оценки скорости метаболизации ^{13}C -метацетина [11–13], ^{13}C -галактозы и ^{13}C -аминофеназона [14] (оценивается активность цитохрома P450), ^{13}C -фенилаланина [15, 16], ^{13}C -кофеина [17, 18], ^{13}C -триоктаноина (тройного эфира глицерина и ^{13}C -каприловой кислоты) для обнаружения дефицита ферментов поджелудочной железы [7, 19].

Одним из наиболее перспективных направлений в ядерной медицине является использование дыхательных тестов на основе различных фармацевтических препаратов с использованием меченых жирных кислот, в частности линолевой. Данное соединение играет существенную роль в энергетическом обмене клеток высших организмов и служит строительным блоком для липидов нескольких классов, таких как нейтральные жиры, фосфолипиды и эфиры холестерина [20].

Линолевая кислота — длинноцепочечное нерастворимое в воде соединение. В организме под действием желчи, выделяемой из желчного пузыря, в тонком кишечнике происходит гидролиз жирной кислоты с образованием смешанных мицелл. В случае нарушения работы гепатобилиарной системы, приводящего к нехватке желчных солей в желчи, замедляется всасывание меченых жирных кислот, что может быть обнаружено по изотопному составу выделяющегося углекислого газа [20].

В литературе описан стереоспецифический синтез изомеров моно-непредельных жирных кислот с ^{14}C -атомом в первом положении с использованием одиннадцати стадий

при помощи инверсии олефина [21]. Преимущество этого способа в возможности получения мононенасыщенных жирных кислот с различным расположением двойной связи. Однако изложенный в работе способ чрезвычайно трудоемок, требует препаративного разделения стереоизомеров по окончании стадии эпоксицирования, а также такого дорогостоящего и токсичного источника ^{14}C , как цианид. Все это ограничивает промышленное применение описанной разработки.

Способы химического синтеза ^{13}C - и ^{14}C -производных наиболее распространенных в пищевых продуктах ненасыщенных жирных кислот: линолевой и линоленовой из наиболее доступного сырья — CO_2 на базе изотопов углерода в литературе не описаны. Биологические способы с применением водорослей, простейших и грибов (например, *Thraustochytrium* или *Mortierella alpina*) имеют низкий радиохимический выход, не превышающий 60% [22, 23]. Остальную часть изотопа выбрасывают в виде отходов, что с учетом большой длительности распада ^{14}C приводит к высокой экологической опасности схемы синтеза. Кроме того, к недостаткам известного из литературы биологического способа с точки зрения применимости ^{13}C - и ^{14}C -жирных кислот в дыхательных тестах является распределение меченых атомов по всей длине углеродной цепи ацила. Между тем, для достижения максимальной чувствительности, воспроизводимости и безопасности дыхательных тестов целесообразно использовать препараты жирных кислот, имеющих 100% меченого атома в позиции 1 (карбоксильная группа). Часто в результате биогенного синтеза образуется смесь жирных кислот различного состава. Например, показано, что биогенный синтез с использованием *Thraustochytrium* приводит к образованию 10 различных жирных кислот с выходами 0,72–21,82%. Кроме того, 1,9% изотопа включается в жирные кислоты неидентифицированной структуры [23].

Целью работы было представить способ синтеза линолевой кислоты с помощью ^{13}C и ^{14}C по положению 1 ацила с использованием CO_2 в качестве источника аномального изотопа для последующего применения в диагностике гепатобилиарной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Чистоту полученных промежуточных и конечных продуктов контролировали тонкослойной хроматографией на силикагеле на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck; Германия) и sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, в системе этилацетат : гексан (1 : 1). Визуализацию разделенных соединений проводили с помощью паров йода. Структуру целевого продукта подтверждали спектроскопией ядерного магнитного резонанса на приборах моделей AM-300, 300 МГц (Bruker; Германия) и DRX-500, 500 МГц (Bruker; Германия). В качестве растворителя для проведения анализа методом ЯМР-спектроскопии использовали ^2H -хлороформ, съемку проводили при частоте 300,1 МГц.

Для определения удельной активности меченых атомов углерода использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик DPM 7001 (НТЦ Радэк; Россия), оснащенный двумя фотоэлектронными умножителями. Для определения активности смесей использовали микрокалориметр Кальея Setaram C80 (SETARAM Instrumentation; Франция). Значения pH водных растворов определяли потенциометрическим

методом с помощью рН-метра модели Sartorius PB-11 (Sartorius; Германия).

Материалы

Использовали следующие материалы:

– 1-бром-8,11-гептадекадиен $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{Br}$ AppliChem (США) со следующими характеристиками: молярная масса — 315,332 г/моль; температура плавления — 23,4 °С; температура кипения — 112 °С [24];

– источник стабильного изотопа углерода: безводный ^{13}C -карбонат бария (АО «Всерегionalное объединение «Изотоп»; Россия), со следующими характеристиками, указанными производителем: изотопная чистота — 99,32%; молекулярная масса — 198,3359 г/моль; температура плавления — 1558 °С;

– источник радиоактивного изотопа углерода: безводный ^{14}C -карбонат бария (ПО «МАЯК» Госкорпорации «РОСАТОМ»; Россия) со следующими характеристиками, указанными производителем: изотопная чистота — 97,8%; молярная масса — 199,3359 г/моль; температура плавления — 1566 °С; удельная радиоактивность — 66,92 мКи/г.

– осушенные аргон и азот квалификации «высокая чистота» («М-газ»; Россия), а также этилацетат по ГОСТ 22300-76 изм.1-3 («Химмед»; Россия), гексан по ТУ 2631-158-44493179-13 («ЛенРеактив»; Россия), магний (стружка) по ГОСТ 804-93 («Интерхим»; Россия), йод кристаллический чда («ЛенРеактив»; Россия), диэтиловый эфир по ТУ 2600-001-45682126-13 («Химмед»; Россия), серную кислоту хч по ГОСТ 4204-77 («Химмед»; Россия), соляную кислоту хч по ГОСТ 3118-77 («Химмед»; Россия), гидроксид натрия 98% (Fluka Швейцария; каталожный номер 71695), ацетонитрил по ТУ 6-09-3534-87 («Химсервис»; Россия).

Абсолютированный эфир получали по следующей схеме. Диэтиловый эфир по ТУ 2600-001-45682126-13 промывали насыщенным раствором хлорида кальция из расчета 50 мл на 1 л эфира и сушили над прокаленным в течение суток при +120 °С хлоридом кальция, используя 130 г сухого вещества для обработки 1 л эфира в течение 48 ч. Реагент фильтровали через бумажный складчатый фильтр в сухую колбу и добавляли металлический натрий из расчета 1 г на 1 л. Колбу плотно закрывали пробкой с установленной хлоркальциевой трубкой. Эфир использовали для карбоксилирования реактива Гриньяра при том условии, что при внесении новых порций натрия не наблюдалось выделения водорода.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линолевой кислоты, меченной ^{13}C и ^{14}C в первом положении, проводили в две стадии: 1) получение реактива Гриньяра; 2) карбоксилирование реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C .

Получение реактива Гриньяра

Собирали установку из трехгорлой колбы на 250 мл, в боковые горловины колбы вставляли хорошо действующий обратный холодильник с хлоркальциевой трубкой и капельную воронку с трубкой, уравнивающей давление во время прикапывания эфирного раствора. В центральное отверстие через масляный затвор вводили мешалку с электрическим приводом. В колбу помещали 3,0 г магниевой стружки и кристаллик йода. Всю установку продували током аргона квалификации «высокая чистота» в

течение 20 мин. Через капельную воронку в колбу вводили 160 мл абсолютного эфира, включали мешалку и при слабом токе аргона добавляли 3,78 г (12 ммоль) 1-бром-8,11-гептадекадиена в виде раствора в диэтиловом эфире объемом 80 мл. Для начала реакции колбу нагревали на водяной бане до кипения эфира. После начала реакции водяную баню выключали и процесс перемешивания продолжали до полного растворения магния (рис. 1.; разрешения из [25]).

Карбоксилирование реактива Гриньяра диоксидом ^{13}C и ^{14}C

Установка, использованная для получения меченых кислот карбоксилированием реактивом Гриньяра, представляла собой высоковакуумную гребенку, снабженную шлифами для присоединения реакционной колбы, источника CO_2 и ртутного манометра, а также трубками для входа и выхода азота. Коническая трехгорлая реакционная колба была изготовлена с таким расчетом, чтобы ее можно было замораживать, и снабжена магнитной мешалкой, позволяющей работать в вакууме при охлаждении (рис. 2; с разрешения из [25]).

Источник диоксида ^{13}C и ^{14}C представлял собой круглодонную колбу, содержащую 5,4 ммоль карбоната

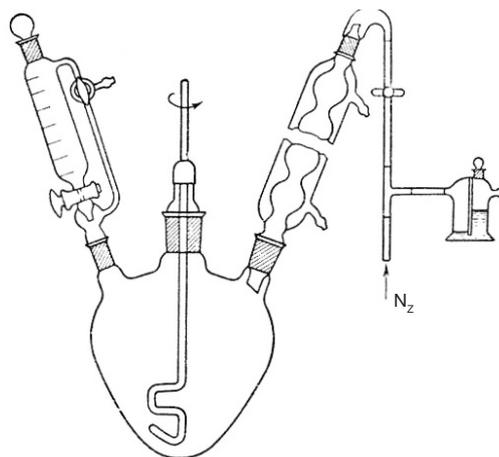


Рис. 1. Прибор для получения реактива Гриньяра а атмосфере аргона

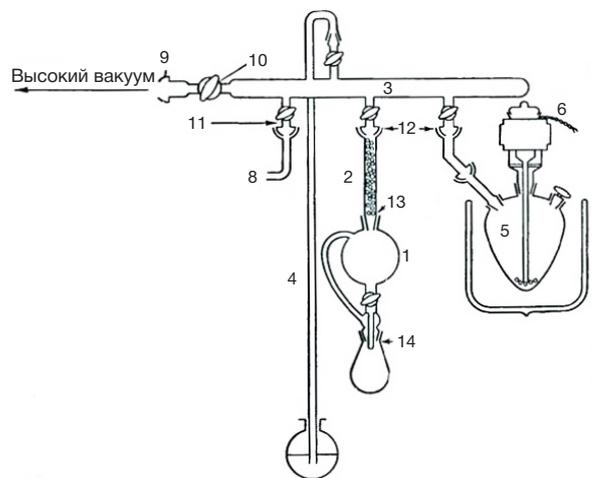


Рис. 2. Прибор для карбоксилирования реактивов Гриньяра. 1 — источник оксида углерода; 2 — трубка с драйритом; 3 — высоковакуумная гребенка (диаметр трубки 13 мм); 4 — ртутный манометр; 5 — колба; 6 — магнитная мешалка (110 в, 3 фазы); 7 — баня для охлаждения; 8 — подача азота; 9 — шлиф 28/12; 10 — кран с отверстием 3 мм; 11 — кран с отверстием 2 мм; 12 — шлиф 18/9; 13 — шлиф 14/35; 14 — шлиф 14/20

бария на базе изотопов: для изотопа ^{13}C — навеска массой 1,071 г, для изотопа ^{14}C — 1,076 г. Колбу соединили с заполненной концентрированной серной кислотой капельной воронкой, снабженной приспособлением для выравнивания давления. Эту часть установки соединили с вакуумной гребенкой через трубку, наполненную осушителем.

Для проведения реакции установку откачали с помощью масляного насоса до давления 0,1 мм рт. ст. и заполнили сухим азотом. Затем, при помощи предварительно промытой и заполненной азотом пипетки с поршневой подачей, быстро ввели в реакционную колбу раствор реактива Гриньяра, полученный из 6 ммоль 1-бром-8,11-гептадекадиена (половина общего полученного количества). Свободный боковой отвод реакционной колбы закрыли пробкой, колбу охладили жидким азотом и откачивали систему до давления 0,1 мм рт. ст. После этого дали содержимому реакционной колбы оттаять, нагревая его смесью сухого льда и ацетона до $-77\text{ }^\circ\text{C}$, снова замораживали жидким азотом и опять откачали систему для удаления выделившегося азота.

Карбоксилирование реактива Гриньяра проводили при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$, постоянно перемешивая содержимое колбы. Для запуска выделения CO_2 на базе изотопов углерода к карбонату бария из капельной воронки медленно прибавляли концентрированную серную кислоту, при этом следили за тем, чтобы давление в приборе не превышало 500 мм рт. ст. Для полного выделения меченого CO_2 в конце реакции осторожно нагревали реакционную колбу с карбонатом бария до окончательного его растворения. После полного истощения реактива Гриньяра давление CO_2 в приборе согласно показаниям манометра перестало снижаться. По этому показателю как в случае $^{13}\text{CO}_2$, так и в случае $^{14}\text{CO}_2$, реакция полностью завершилась в течение 15 мин.

Реакционную колбу с реактивом Гриньяра охладили жидким азотом, для того чтобы в нее перешел весь оставшийся в системе меченый CO_2 , затем закрыли кран, соединяющий прибор с источником меченого CO_2 , и для полного поглощения меченого CO_2 реакционную массу перемешивали в течение 15 мин при температуре $-20\text{ }^\circ\text{C}$. После этого установку заполнили азотом и соединили

с атмосферой. Полученный комплекс разлагали разбавленной соляной кислотой. Подкисленную смесь экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт обработали 100 мМ NaOH и подкислили полученный щелочной раствор до pH 7,0. Выделившуюся кислоту отфильтровали. Осадок собрали, промыли водой и перекристаллизовали из ацетонитрила при $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (считали, что для линолевой кислоты $t_{\text{замерз}} = -11\text{ }^\circ\text{C}$).

Масса полученной ^{13}C -линолевой кислоты составила 1459 мг (5,184 ммоль). Итоговый химический выход реакции по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 86,4%, по $^{13}\text{CO}_2$ — 96,0%. Экспериментально измеренная температура замерзания продукта составила $-11,0\text{ }^\circ\text{C}$.

Масса полученной ^{14}C -линолевой кислоты составила 1480 мг (5,243 ммоль). Итоговый химический выход реакции по 1-бром-8,11-гептадекадиену составил 87,39%, по $^{13}\text{CO}_2$ — 97,1%. Удельную активность ^{14}C -линолевой кислоты определяли на сцинтилляционном счетчике: она составила $45,36 \pm 0,02$ мКи/г. Таким образом, общий радиохимический выход составил 96,0%. Препарат имел температуру замерзания $-10,7\text{ }^\circ\text{C}$.

Анализ полученных образцов ^{13}C - и ^{14}C -линолевых кислот с помощью тонкослойной хроматографии на платинах Kieselgel 60 F254 в системе этилацетат : гексан (1 : 1) (см. Материалы и методы) позволил обнаружить примеси. Определение массы основного вещества, элюированного из силикагеля после разделения методом ТСХ, показало, что в случае ^{13}C -линолевой кислоты на него приходится 98,2% сухой массы готового препарата.

Сравнение спектра ^1H ЯМР ^{14}C -линолевой кислоты с эталонным $1\text{S}/\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2/\text{c}1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18(19)20/\text{h}6-7, 9-10\text{H}, 2-5, 8, 11-17\text{H}_2, 1\text{H}_3, (\text{H}, 19, 20)/\text{b}7-6-, 10-9$, описанным в литературе [26], показало полное соответствие структуры синтезированного вещества структуре линолевой кислоты (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значимое преимущество предложенного способа синтеза линолевой кислоты, меченой изотопами ^{13}C и ^{14}C , состоит в ускорении процесса получения целевых продуктов, сокращении потерь меченого CO_2 , в повышении его

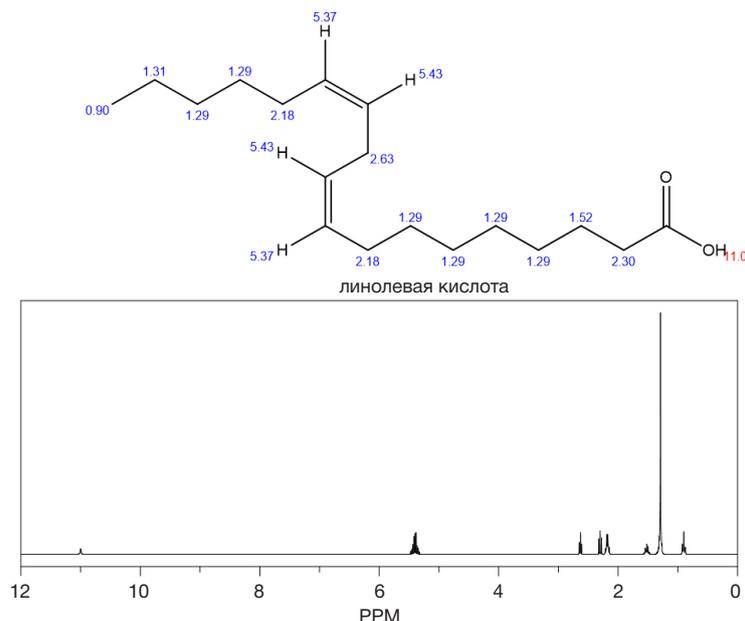


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР ^{14}C -линолевой кислоты

суммарного химического и радиационного выхода. Важным результатом является также исключение распределения изотопно-меченых атомов по всей длине углеродной цепи ацила: при использовании разработанного метода включение происходит только в первом положении.

Упрощение и снижение стоимости процесса получения целевых продуктов обусловлены уменьшением длительности реакции за счет подбора оптимальных соотношений реагентов и использования теста на окончание реакции карбоксилирования реактива Гриньяра с помощью измерения давления CO_2 в системе. Разработанный метод обеспечивает существенное повышение радиационного и химического выхода продукта по источнику изотопа по сравнению с известными способами [21–23]. Включение меченого изотопа в целевой продукт приближается к количественному, в результате практически полностью исключается выброс радиоактивных отходов во внешнюю среду. С учетом затратности и сложности утилизации радиоактивных отходов с длительным периодом полураспада это играет существенную роль с точки зрения экономической эффективности способа.

Полученные в ходе работы образцы ^{13}C - и ^{14}C -линолевой кислот по своей чистоте и количеству

пригодны для проведения доклинических испытаний острой, субхронической, хронической и других типов токсичности в соответствии с требованиями [27]. После подтверждения безопасности соединения, изготавливаемые предлагаемым способом, могут быть рекомендованы для испытаний в клинических условиях в качестве диагностических дыхательных тестов в целях диагностики заболеваний гепатобилиарной системы.

ВЫВОДЫ

Предложен метод получения линолевой кислоты, содержащей атомы углерода ^{13}C или ^{14}C в первом положении. От известных аналогов он отличается простотой и включает две вместо 11 стадий. При работе с ^{14}C способ дает радиохимический выход, близкий к количественному (96%), что полностью исключает проблему утилизации опасных радиоактивных отходов, возникающих при работе с ^{14}C -содержащими исходными веществами. Для синтеза кислот предложенным способом не требуется использования сложного аналитического и препаративного оборудования, что удобно для серийного выпуска готового продукта.

Литература

- Liou IW. Management of end-stage liver disease. *Med Clin North Am.* 2014; 98 (1): 119–52. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.09.006.
- Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol.* 2015; 10 (1): 1–6.
- Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res.* 2007; 1 (1): R1–R13. DOI: 10.1088/1752-7155/1/1/014003.
- Razlan H, Marzuki NM, Tai M-L S, Shamsul Tze-Zen Ong A-S, Mahadeva S. Diagnostic value of the ^{13}C -methacetin breath test in various stages of chronic liver disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2011; 2011 (1): 1–6. DOI: 10.1155/2011/235796.
- Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology.* 2002; 36 (4): 986–92. DOI: 10.1053/jhep.2002.36128.
- Wai CT, Greenson KJ, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Jorge AM, Hari SC, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003; 38 (2): 518–26. DOI: 10.1053/jhep.2003.50346.
- Эльман А. Р., Рапопорт С. И. Стабильно-изотопная диагностика в России: итоги и перспективы. ^{13}C -препараты, приборы, методы. *Клин. мед.* 2014; 92 (7): 5–11.
- Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med.* 2016; 39 (11): 2012–14.
- Плавник Р. Г. ^{13}C -Уреазный дыхательный тест на *Helicobacter pylori* (клинические и организационные аспекты). М.: МЕДПРАКТИКА-М, 2017; 36 с.
- Grattagliano I, Lauterburg BH, Palasciano G, and Portincasa P. ^{13}C -breath tests for clinical investigation of liver mitochondrial function. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40 (9): 843–50. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02331.x.
- Gorowska-Kowolik K, Chobot A, and Kwicien J. ^{13}C -Methacetin Breath Test for Assessment of Microsomal Liver Function: Methodology and Clinical Application. *Gastroenterol Res Pract.* 2017; 2017 (1): 1–5.
- Moran S, Mina A, Duque X, Ortiz-Olvera N, Rodriguez-Leal G, Sierra-Ramírez JA, et al. The utility of the ^{13}C -methacetin breath test in predicting the long-term survival of patients with decompensated cirrhosis. *J Breath Res.* 2017; 11 (3): 1–28. DOI: 10.1088/1752-7163/aa7b99.
- Эльман А. Р., Корнеева Г. А., Носков Ю. Г., Хан В. Н., Шишкина Е. Ю., Негримовски В. М. и др. Синтез продуктов, меченных изотопом ^{13}C , для медицинской диагностики. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева).* 2013; LVII (5): 3–24.
- Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M, et al. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3 (3): 279–85. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00720-7.
- Moran S, Gallardo-Wong I, Rodriguez-Leal G, McCollough P, Mendez J, Castañeda B, et al. L-[1- ^{13}C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes Environ Health Stud.* 2009; 45 (3): 192–7. DOI: 10.1080/10256010903083995.
- Zhang GS, Bao ZJ, Zou J, Yin SM, Huang YQ, Huang H, et al. Clinical research on liver reserve function by ^{13}C -phenylalanine breath test in aged patients with chronic liver diseases. *BMC Geriatr.* 2010; 10 (23): 1–8. DOI: 10.1186/1471-2318-10-23.
- Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, et al. The ^{13}C -caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2008; 42 (4): 408–12, 2008. DOI: 10.1097/MCG.0b013e318046ea65.
- Gordon J, Park H, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, et al. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the ^{13}C -caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 (9): 1411–6. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06760.x.
- Braden B. ^{13}C breath tests for the assessment of exocrine pancreatic function. *Pancreas.* 2010; 39 (7): 955–9. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181dbf330.
- Титов В. Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. Гиполипидемическая терапия и профилактика атеросклероза. Клинико-лабораторный консилиум. 2014; 1: 4–29.
- Georgin D, Taran F, Mioskowski C. A divergent synthesis of [1- ^{14}C]mono-E isomers of fatty acids. *Chem Phys Lipids.* 2003; 125 (1): 83–91.
- Kawashima H, Akimoto K, Tsuyoshi F, Hideo N, Kyoko K, Sakayu S. Preparation of ^{13}C -labeled polyunsaturated fatty acids by an

- arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Analytical Biochemistry*. 1995; 229 (2): 317–22. DOI: 10.1006/abio.1995.1419.
23. Zhao X, Qiu X. Analysis of the biosynthetic process of fatty acids in *Thraustochytrium*. *Biochimie*. 2018; 144 (1): 108–14.
24. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 86th ed. CRC Press. 2006; p. 3–320.
25. Поздеев В. В., Тыньо Я. Я., Морозова Г. В., Быченко А. Б., Бирюкова Ю. К., Швелев А. Б., авторы; ООО «ГК Наш Мир», патентообладатель. Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ¹³C и ¹⁴C. Патент РФ № 2630691. 12.09.2017.
26. Shaaban M, Abd-Alla HI, Hassan AZ, Aly HF, Ghani MA. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. *Org Med Chem Lett*. 2012; 2 (1): 30.
27. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012; 994 с.

References

1. Liou IW. Management of end-stage liver disease. *Med Clin North Am*. 2014; 98 (1): 119–52. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.09.006.
2. Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. ¹³CO₂ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
3. Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13. DOI: 10.1088/1752-7155/1/1/014003.
4. Razlan H, Marzuki NM, Tai M-L S, Shamsul Tze-Zen Ong A-S, Mahadeva S. Diagnostic value of the ¹³C-methacetin breath test in various stages of chronic liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2011; 2011 (1): 1–6. DOI: 10.1155/2011/235796.
5. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, 2002; 36 (4): 986–92. DOI: 10.1053/jhep.2002.36128.
6. Wai CT, Greenson KJ, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Jorge AM, Hari SC, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003; 38 (2): 518–26. DOI: 10.1053/jhep.2003.50346.
7. Elman AR, Rapoport SI. Stabil'no-izotopnaja diagnostika v Rossii: itogi i perspektivy. ¹³C-preparaty, pribory, metody. *Klin med*. 2014; 92 (7): 5–11. Russian.
8. Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
9. Plavnik RG. ¹³S-Ureaznyj dyhatel'nyj test na *Helicobacter pylori* (klinicheskie i organizacionnye aspekty). M.: MEDPRAKTIKA-M, 2017; 36 s.
10. Grattagliano I, Lauterburg BH, Palasciano G, and Portincasa P. ¹³C-breath tests for clinical investigation of liver mitochondrial function. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40 (9): 843–50. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02331.x.
11. Gorowska-Kowolik K, Chobot A, and Kwiecien J. ¹³C-Methacetin Breath Test for Assessment of Microsomal Liver Function: Methodology and Clinical Application. *Gastroenterol Res Pract*. 2017; 2017 (1): 1–5.
12. Moran S, Mina A, Duque X, Ortiz-Olvera N, Rodriguez-Leal G, Sierra-Ramírez JA, et al. The utility of the ¹³C-methacetin breath test in predicting the long-term survival of patients with decompensated cirrhosis. *J Breath Res*. 2017; 11 (3): 1–28. DOI: 10.1088/1752-7163/aa7b99.
13. Elman AR, Korneeva GA, Noskov YuG, Khan VN, Shishkina EYu, Negrimovski VM, Syntheses of products labeled with ¹³C isotope for medicine diagnosis. *Russian Chemical Journal*. 2013; LVII (5): 3–24.
14. Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M, et al. ¹³C-galactose breath test and ¹³C-aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85. DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00720-7.
15. Moran S, Gallardo-Wong I, Rodriguez-Leal G, McCollough P, Mendez J, Castañeda B, et al. L-[1-¹³C]phenylalanine breath test in patients with chronic liver disease of different etiologies. *Isotopes Environ Health Stud*. 2009; 45 (3): 192–7. DOI: 10.1080/10256010903083995.
16. Zhang GS, Bao ZJ, Zou J, Yin SM, Huang YQ, Huang H, et al. Clinical research on liver reserve function by ¹³C-phenylalanine breath test in aged patients with chronic liver diseases. *BMC Geriatr*. 2010; 10 (23): 1–8. DOI: 10.1186/1471-2318-10-23.
17. Schmilovitz-Weiss H, Niv Y, Pappo O, Halpern M, Sulkes J, Braun M, et al. The ¹³C-caffeine breath test detects significant fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42 (4): 408–12, 2008. DOI: 10.1097/MCG.0b013e318046ea65.
18. Gordon J, Park H, Wiseman E, George J, Katelaris PH, Seow F, et al. Non-invasive estimation of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using the ¹³C-caffeine breath test. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26 (9): 1411–6. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06760.x.
19. Braden B. ¹³C breath tests for the assessment of exocrine pancreatic function. *Pancreas*. 2010; 39 (7): 955–9. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181dbf330.
20. Titov VN. Klinicheskaja biohimija zhirnyh kislot, lipidov i lipoproteinov. Gipolipidemicheskaja terapija i profilaktika ateroskleroza. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2014; 1: 4–29. Russian.
21. Georgin D, Taran F, Mioskowski C. A divergent synthesis of [1-¹⁴C]-mono-E isomers of fatty acids. *Chem Phys Lipids*. 2003; 125 (1): 83–91.
22. Kawashima H, Akimoto K, Tsuyoshi F, Hideo N, Kyoko K, Sakayu S. Preparation of ¹³C-labeled polyunsaturated fatty acids by an arachidonic acid-producing fungus *Mortierella alpina* 1S-4. *Analytical Biochemistry*. 1995; 229 (2): 317–22. DOI: 10.1006/abio.1995.1419.
23. Zhao X, Qiu X. Analysis of the biosynthetic process of fatty acids in *Thraustochytrium*. *Biochimie*. 2018; 144 (1): 108–14.
24. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 86th ed. CRC Press. 2006; p. 3–320.
25. Pozdеев ВВ, Тыньо ЯЯ, Морозова ГВ, Быченко АБ, Бирюкова ЮК, Швелев АБ; LLC "GK Our World". Method of Synthesis of Linoleic and Linolenic Acids Labeled with Carbon Isotopes ¹³C and ¹⁴C. RF Patent # 2630691. 12.09.2017.
26. Shaaban M, Abd-Alla HI, Hassan AZ, Aly HF, Ghani MA. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. *Org Med Chem Lett*. 2012; 2 (1): 30.
27. Mironov AN. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. M.: Grif i K, 2012; 994 s.