

**Науковий і Інженерно-технологічний центр
біотехнічних систем «СОНАР» НАН України**

На правах рукопису

ПАНКРАТОВ Юрій Володимирович

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО
ЗАЛІЗА В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ
ТВАРИН**

03.00.05 — біофізика

**Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ 1995



Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Науковому і Інженерно-технологічному центрі «СОНАР» НАН України.

Наукові керівники: кандидат медичних наук
БАКАЙ Едуард Аполінарійович,
кандидат хімічних наук
МІХАЙЛІК Ольга Михайлівна.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
ЛЕМЄШКО Віктор Васильович,
кандидат фізико-математичних наук
РАЗУМОВ Олег Миколайович.

Провідна організація: НДІ проблем кріобіології та кріомедицини НАН України (м. Харків).

Захист відбудеться «12» грудня 1995 р. о _____ год.
год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.13.01 при
Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за
адресою: 252024 Київ 24, вул. Богомольця, 4.

Автореферат розісланий «10» лютого 1995 р.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З. О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність теми.

В останні 15-20 років за кордоном почався інтенсивний розвиток досліджень, спрямованих на використання високодисперсних феромагнетиків (головним чином на основі сполук заліза) та реагентів на магнітних носіях в біології та медицині. В міжнародній медичній практиці високодисперсні феромагнітні частинки досить широко використовуються для діагностики та лікування цілого ряду онкологічних, імунологічних та інфекційних захворювань. Багато які методи та підходи до лікування і діагностики (радіочастотна гіпертермія пухлин, контрастування магнітної томографії, спрямований транспорт біологічно активних речовин) потребують введення дисперсного магнітного матеріалу в організм. Питання розподілу та біотрансформації високодисперсних магнітних матеріалів в організмі мають таким чином важливе значення для успішного використання їх в медицині. Дані про ефекти та механізм біотрансформації високодисперсного заліза можуть також бути застосовані в дослідженнях низки патологій, пов'язаних з перевантаженням організму залізом.

Метою роботи було вивчення розподілу по органах, агрегації, механізму та деяких наслідків біотрансформації високодисперсного заліза і ролі поверхневих властивостей матеріалу в цих процесах.

Основними завданнями були: розробка метода отримання із спектрів електрон-спінового резонансу препаратів біологічних тканин кількісної інформації про вміст в них заліза у складі феромагнітних частинок, низкомолекулярних комплексів Fe(II), трансферину та феритину на основі теоретичної моделі феромагнітного резонансу в агрегатах магнітних мікрочастинок; дослідження розподілу по органах та біотрансформації зразків високодисперсного заліза з різними властивостями поверхні; дослідження впливу магнітного поля на кінетику процесів пероксидного окислення.

ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИСУВАЮТЬСЯ НА ЗАХИСТ

1. В роботі розроблена теоретична модель феромагнітного резонансу в агрегатах малих магнітних часток, коректність моделі підтверджена даними, що одержані методами рентгенівської фотоелектронної і гамма-резонансної спектроскопії.
2. Несиметричні широкі сигнали в області g-фактора 2-5, що з'являються в спектрах електрон-спінового резонансу тканин експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза були вперше ідентифіковані як сигнали різних типів агрегатів магнітних мікрочасток і сигнали залізнакопичувального білка феритину.
3. Екзогенне залізо, що звільнилось в результаті біодеградації високодисперсного заліза, включається головним чином до складу феритину.

Наукова новизна.

В роботі розроблена і вперше використана для кількісного дослідження агрегації, розподілу по органах та біотрансформації високодисперсного заліза теоретична модель феромагнітного резонансу в агрегатах магнітних мікрочастинок, вперше були одержані кількісні дані про вміст феромагнітної фази, низкомолекулярних комплексів заліза, феритину в тканинах і трансферину та метгемоглобіну в крові експериментальних тварин після внутрішньовенного введення високодисперсного заліза.

Сигнали з шириною 1000-5000 Е (ерстед) і g-фактором 2-5, що з'являються у спектрах ЕСР тканин експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза були вперше ідентифіковані як сигнали різних типів агрегатів магнітних мікрочастинок. Сигнали з шириною 300-800 Е, g-фактором 2.0-2.5 і 4.0-4.4, що мають магнітну анізотропію і з'являються у спектрах ЕСР тканин експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза були вперше ідентифіковані як сигнали білка феритина з різним ступенем насичення залізом. Виявлено створення

молекулами феритину *in vivo* агрегатних структур, що мають значну магнітну анізотропію, що виявляється у залежності спектрів електрон-спінового резонансу тканин експериментальних тварин від орієнтації та режиму заморожування в слабких магнітних полях.

Показано прискорення пероксидного окислення в постійних магнітних полях в діапазоні 0-280 мТл, визначені константи швидкостей магніточутливих стадій.

Практична цінність роботи.

Отримані результати та розроблений метод аналізу спектрів електрон-спінового резонансу можуть бути використані при розробці оптимальних видів феромагнетиків медичного призначення і при діагностиці патологій, пов'язаних з перевантаженням організму залізом.

Особистий внесок пошукувача

Усі теоретичні та експериментальні результати, окрім спектрів ЯГР і РФС, були одержані пошукувачем під керівництвом канд. мед. наук Бакая Е.А. і канд. хім. наук Михайлік О.М.

Апробація роботи. Результати роботи доповідались на: 4^й Всесоюзній конференції по примененню магнітних жидкостей в биологии и медицине (Сухуми, 1991), Sixth International Conference on Magnetic Fluids (Paris 1992), 11th International Congress on Biophysics, 1^{ім} З'їзді Українського Біофізичного товариства (Київ, 1994), European Iron Club Meeting (Hamburg, 1995).

Публікації. З теми дисертації опубліковано 4 статті в міжнародних наукових виданнях і тези 7 доповідей на конференціях.

Структура дисертаційної роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, теоретичної частини, методичної частини, двох глав, де викладаються результати роботи, висновків і містить в собі 153 сторінки, 25 малюнків, 8 таблиць, 91 цитованих джерел.

ЗМІСТ РОБОТИ

В першій главі викладен аналіз наявних літературних даних що до розподілу колоїдних и магнітних частинок в організмі, біотрансформації високодисперсного заліза, теоретичних та експериментальних даних що до агрегації магнітних мікрочастинок і методах, що використовуються в дослідженнях розподілу, агрегації і біотрансформації в організмі високодисперсних частинок. Літературні дані свідчать про те, що в розподілу по органах колоїдних, у тому числі і магнітних, мікрочастинок значну роль грають їхні властивості їх поверхні. На жаль, результати більшості досліджень в цій галузі мають в основному якісний характер, а зіставленню даних заважає застосування в експериментах недостатньо охарактеризованих зразків високодисперсних феромагнетиків. За умови розробки моделі феромагнітного резонансу в суспензіях магнітних мікрочастинок методом феромагнітного і електрон-спінового резонансу можуть бути джерелом кількісної інформації про вміст феромагнітної фази і продуктів біотрансформації високодисперсного заліза після його введення в організм.

В другій главі викладається теоретична модель феромагнітного резонансу в агрегатах магнітних мікрочастинок, яка враховує такі особливості, як магніто-дипольна взаємодія частинок між собою, наявність на їх поверхні немагнітного покриття и існування різних типів агрегатів. На основі припущень, що зроблені при розробці моделі, були отримані рівняння, що дозволяють розраховувати спектри феромагнітного резонансу агрегатів частинок. Форма и положення максимумів ліній поглинання обумовлюються типом агрегату, а ширина товщиною немагнітного покриття на поверхні частинок.

В третій главі наведені фізичні і хімічні характеристики використаних зразків високодисперсного заліза і описуються експериментальні методики.

Спектри електрон-спінового резонансу препаратів тканин експериментальних тварин (миши; щури, кролі) після внутрішньовенного введення суспензій високодисперсного заліза в дозах 50-200 мг/кг ваги реєстрували, застосовуючи ЕПП-спектрометри "Radiorav" и "ЭПА-10-минь" ("St.-Peterburg Instruments"), в інтервалі температур 100-200 К при частоті НВЧ-випромінення 9.0 - 9.30 Гц, мікрохвильовій потужності - 5 - 70 мВт, в діапазоні магнітних полів 500 - 5500 Е. Зразки тканин заморожували и зберігали в рідкому азоті. Концентрацію низькомолекулярних комплексів заліза в ткацях вимірювали як концентрацію нітрозильних комплексів заліза після обробки препаратів тканин нітридом калія (Тарасова Н.И., Коваленко О.А., Ванін А.Ф., 1982). Для досліджень механізму біотрансформації високодисперсного заліза методом ядерної гамма-резонансної спектроскопії були синтезовані зразки високодисперсного заліза зі ступенем збагачення ізотопом Fe^{57} близько 96%. Спектри реєстрували на спектрометрі МР255, в режимі постійного прискорення, зі джерелом Co^{57} в матриці хрому з активністю 150 мКюрі. Для розкладання експериментальних спектрів на компоненти була розроблена програма с використанням методу градієнту для оптимізації положення максимума і ширини лінії і методу найменших квадратів для обчислення питомої ваги компонент. За кінетикою перексидного окислення ліпосом з 1,2-діолеїлфосфатиділ-холіну при температурі 42°C слідували по витраті кисню за допомогою датчика парціального тиску типу електроду Кларку. При математичному моделюванні кінетики перексидного окислення використовували методи Рунге-Кутта та Девіса-Свена-Кемпі.

В четвертій главі описано моделювання спектрів феромагнітного резонансу суспензій високодисперсного заліза на основі розробленої моделі і порівняння теоретичних та експериментальних результатів. Моделювання проводилось для агрегатів слідуєчих типів: *ланцюгових*, в яких частинки розміщені по одній прямій, спрямованій вздовж силових ліній магнітного

полю; *сферичних*, для яких як наближення приймалась щільна упаковка частинок; *"плоских" шарів*, інтерпретуваних як шари частинок, сорбованих на поверхні біологічних тканин, основою характерною рисою яких було розположення найближчого оточення кожної частинки в одній з п'яти площині, причому орієнтація цих площин може бути свавільною. Моделювання виявило, що ЕСР-спектри агрегатів різних типів мають значчі відзнаки. Максимум поглинання ланцюгових агрегатів може лежати в області магнітних полів 200 - 2000 Е, сферичних - в області 2600 - 2800 Е, "плоских шарів" - 3100 - 3300 (для частоти НВЧ випромінювання 9.2-9.3 ГГц). Форма лінії поглинання відрізняється від лоренцевої, а при збільшенні товщини немагнітного покриття на поверхні частинок збільшується ширина лінії в спектрах усіх типів агрегатів через збільшення дисипації енергії при розсіянні спінових хвиль.

Для оцінки коректності розробленої теоретичної моделі феромагнітного резонансу в агрегатах магнітних мікрочастинок порівнювали значення товщини немагнітного покриття на поверхні частинок, отримані в результаті аналізу експериментальних спектрів ЕСР суспензій ряду зразків вискодисперсного заліза зі значеннями, отриманими по даним рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФС). Була виявлена фінна кореляція між даними РФС та значеннями, розрахованими згідно з розробленою теорією.

Таблиця 1. Товщина покриття на поверхні високодисперсного заліза, нм

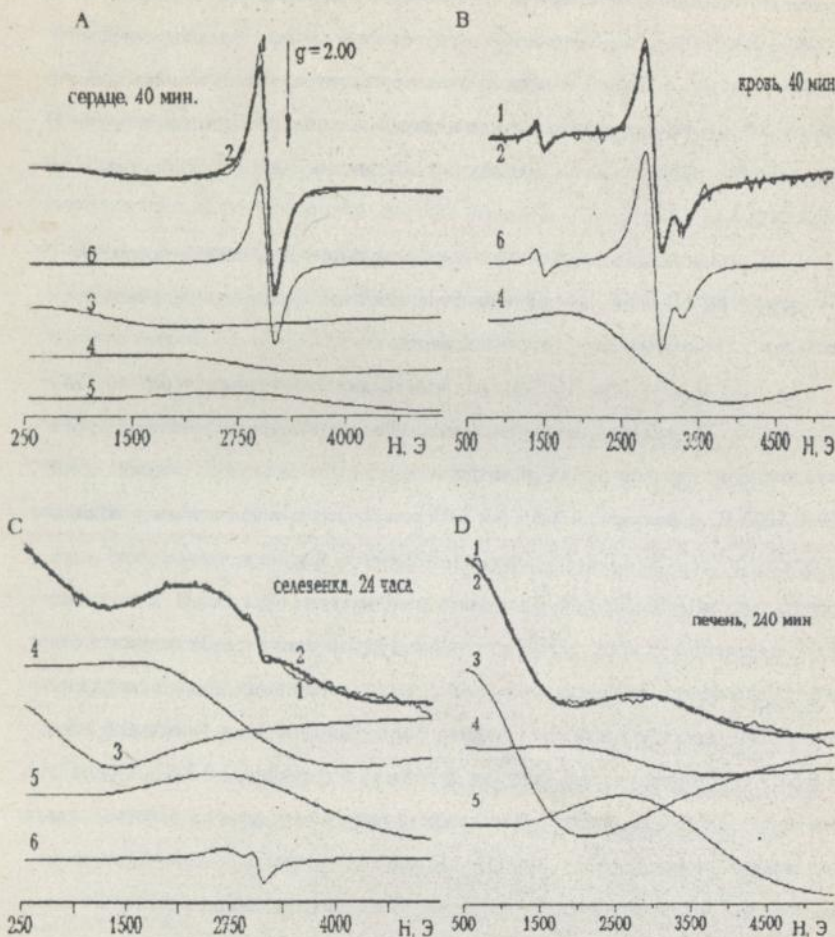
Шифр зразка	вдпж2	вдпж3	S3	S7	S9	S10	S11	U19
по даним РФС	5	7.5	5.5	7.2	9.6	4.6	6.1	6.0
по даним ФМР	4.5	7	5.5	7	7.5	6	6.6	6.0

Аналіз теоретичних та експериментальних даних дозволяє зробити висновок про те, що в рамках розробленої моделі можливі кінкський опис спектрів феромагнітного резонансу а агрегованих суспензіях високодисперсного заліза, кількість магнітної фази в біологічних тканинах може бути визначено за спектром поглинання НВЧ-випромінювання з точністю 10-20% (в залежності від відношення сигнал/шум).

П'ята глава присвячена результатам дослідження розподілу по органах, агрегації та біотрансформації різних зразків високодисперсного заліза після їх внутрішньовенного введення експериментальним тваринам і вплив на кінетику пероксидного окислення постійного магнітного поля (створеного частками або магнітними системами, що застосовуються в медицині).

В першому розділі викладаються результати досліджень розподілу і біотрансформації серії зразків високодисперсного заліза, що відрізняються складом і хімічними властивостями поверхні

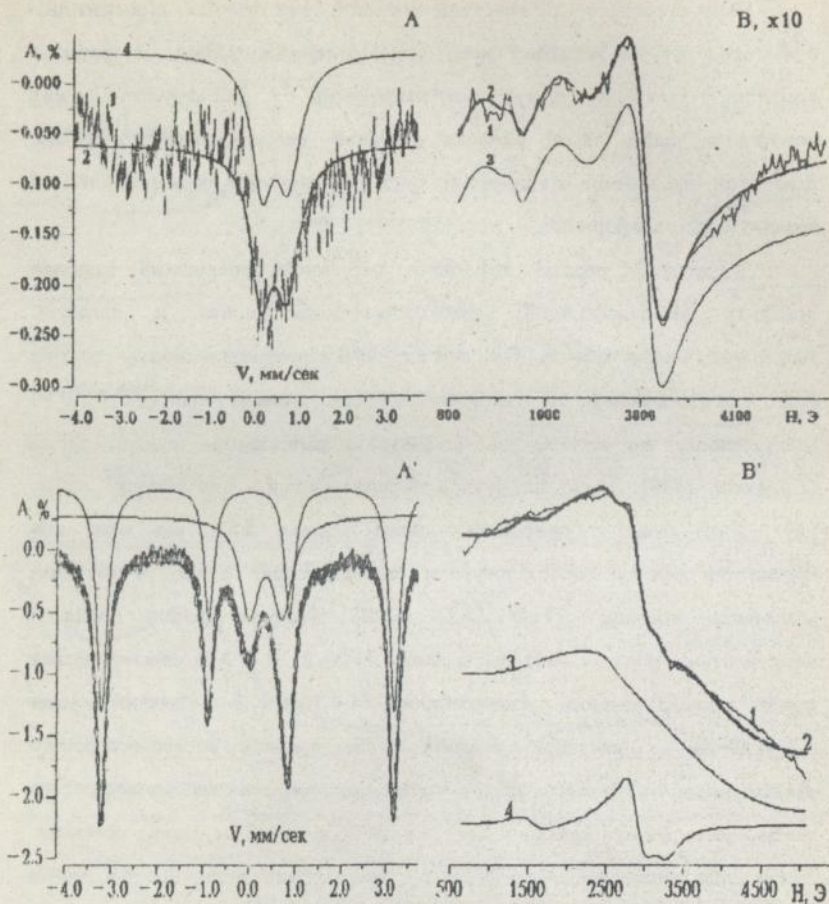
В спектрах ЕСР препаратів тканин, відібраних через 40, 240 хвилин и 24 години після внутрішньовенного введення суспензій усих використаних зразків поряд зі сигналами агрегатів частинок (ширина лінії 2000-5000 Е, g-фактор 2.0-2.5 і 4.0-6.0) реєструються нові сигнали в області g-факторів 2.0-2.5 і 4.0-4.4 з шириною 300-800 Е, форма і інтенсивність яких обертально змінюються при змінюванні температури (Мал.1). В спектрах ЕСР препаратів тканин, відібраних через 40, 240 хвилин и 24 години після внутрішньовенного введення суспензій усих використаних зразків поряд зі сигналами агрегатів частинок (ширина лінії 2000-5000 Е, g-фактор 2.0-2.5 і 4.0-6.0) реєструються нові сигнали в області g-факторів 2.0-2.5 і 4.0-4.4 з шириною 300-800 Е, форма і інтенсивність яких обертально змінюються при змінюванні температури (Мал.1). Поява цих сигналів відбувається в результаті біотрансформації частинок високодисперсного заліза і, як показано в другому розділі глави 5, пояснюється включенням екзогенного заліза в склад феритину.



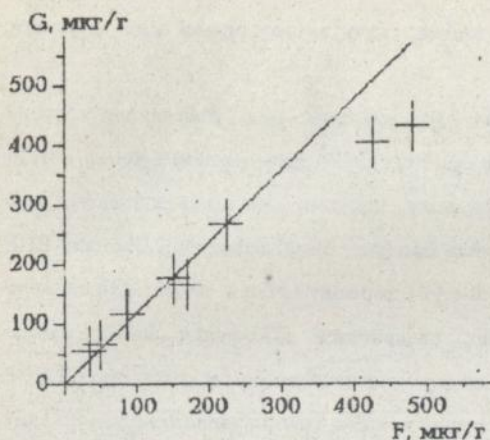
Мал.1. Спектри ЕСР препаратів тканин експериментальних тварин через різні інтервали часу після введення суспензій вискодисперсного заліза, стабілізованого поліакріламідом (А), олеїною кислотою (В), фенолітриетоксисіланом (С), γ -амінопропілтриетоксисіланом (D): експериментальний спектр (1), сума (2) модельних спектрів ланцюгових агрегатів (3), сферичних агрегатів (4), "пласких шарів" (5); продукту біотрансформації (6), температура 150 К, частота НВЧ 9.30 ГГц, потужність 5 мВт, амплітуда модуляції 3 Гс.

Після нормування по спектрам суспензій були отримані кількісні дані про вміст в органах магнітної фази. Далі про динаміку кількості в тканинах магнітної фази, продукту біотрансформації і низькомолекулярних комплексів заліза після введення суспензій високодисперсного заліза, показують, що властивості поверхні суттєво сказуються на їх розподілі по органах і біотрансформації.

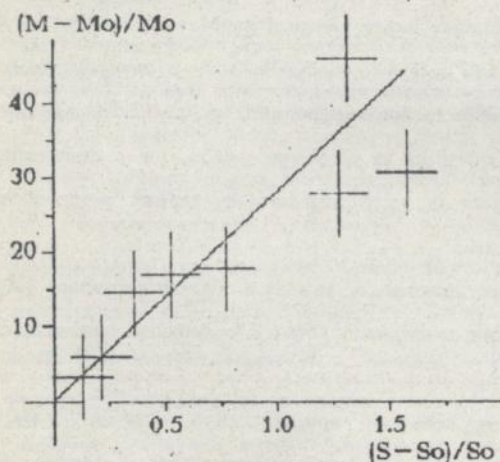
В другому розділі приведені результати досліджень природи продукту біотрансформації високодисперсного заліза в організмі експериментальних тварин. Дані, які одержані в результаті аналізу спектрів ЕСР, порівнювались з даними ядерної гама-резонансної (ЯГР) спектроскопії, що дозволяє ідентифікувати різноманітні сполуки заліза (Суздаєв, 1988). Ефект Мессбауера виявляється лише для ізоотопу залізу Fe^{57} , вміст якого у природному залізі близько 2.2%, ось чому для збільшення ефекту використовували високодисперсне залізо зі ступенем збагачення ізоотопом Fe^{57} 96%. В ЯГР спектрах тканин поряд з компонентами секстету металевого заліза (Мал.2, А і А'), спостерігається дублет з квадрупольним розщепленням 0.64-0.70 мм/с і хімічним зсувом 0.35-0.42 мм/с, присутній і в контролі (без введення високодисперсного заліза), інтенсивність якого значно зростає після введення високодисперсного заліза, збагаченого ізоотопом Fe^{57} у печінці, легенях, серці, селезінці. Зіставлення параметрів цього дублету з літературних даних про параметри ЯГР-спектрів різноманітних сполук заліза (Rossiter M.J., Hodgson A.E.M., 1965; Giessen A.A., 1967; Kaufman K.S., 1980; Yang C., 1986) дозволяє однозначно віднести його до білку феритину, який є основним депо заліза в організмі (Левцин, 1991). В спектрах ЕСР тих же зразків тканин експериментальних тварин до і після введення високодисперсного заліза, реєструються широкі сигнали агрегатів металевого заліза (Мал.2, В') і вузький сигнал в області g-фактора 2.0-2.5 і 4.0-4.5 (Мал.2, В і В').



Мал.2 Спектри ЯГР (А) і ЕСР (В) препаратів печінки миші в контролі і через 24 години (А', В') після введення суспензій вискодисперсного заліза: експериментальні дані (1), сума (2) спектрів агрегатів металевого заліза і продукту біотрансформації.



Мал.3 Кореляція між даними про вміст металевого заліза в тканинах експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза, що отримані методами ЯГР-спектроскопії (G) і ЕСР-спектроскопії (F).



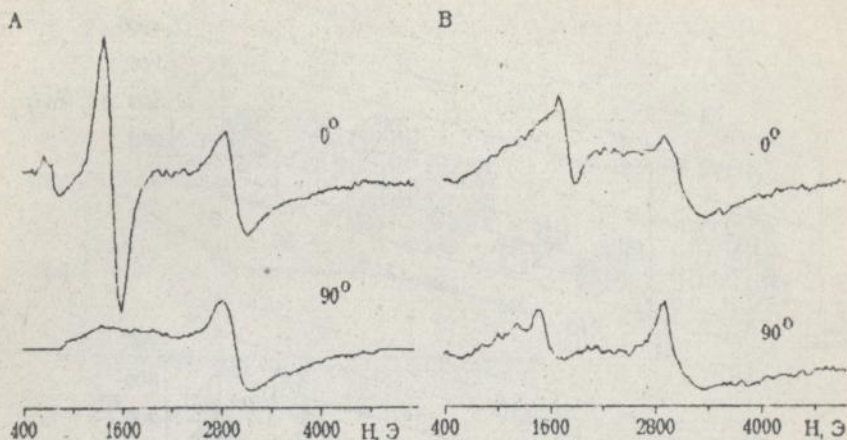
Мал.4 Кореляція між даними про відносний зріст концентрації продукту біотрансформації (феритину) в тканинах експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза, що отримані методами ЯГР-спектроскопії $((M-M_0)/M_0)$ і ЕСР-спектроскопії $((S-S_0)/S_0)$.

Зіставлення даних про вміст металевої фази, отриманих незалежно двома методами potwierджує коректність розрахунку вмісту магнітної фази по спектрам ЕСР тканин з використанням розробленої моделі феромагнітного резонансу в агрегатах малих магнітних часток (Мал. 3, як відхиленьня по осі ординат вказане середнє квадратичне відхиленьня даних гамма-резонансної спектроскопії від даних, одержаних методом спектроскопії ЕСР (20%), а по осі абсцис - систематична похибка використаного методу

аналізу спектрів ЕСР (15%), тангенс куту нахилу прямої лінії дорівнює одиниці).

Лінійна кореляція даних про відносний зріст інтенсивності сигналу продукту біотрансформації S в спектрах ЕСР і інтенсивності дублету в ЯГР-спектрах, віднесеного до феритину, здається достатньо хорошою, щоб зробити висновок про ідентичність продукту біотрансформації (сигналу ЕСР в області g-фактора 2.0-2.5 і 4.0-4.5) і феритину (Мал.4, де як відхилення по осі ординат вказане середнє квадратичне відхилення даних гамма-резонансної спектроскопії від даних, одержаних методом спектроскопії ЕСР (25%), а по осі абсцис - систематична похибка використаного методу аналізу спектрів ЕСР (15%)). Коефіцієнт нахилу прямої на Мал.4 дорівнює 28 і становить 0.65 від відношення вмісту ізоотопу Fe^{57} у використаному високодисперсному залізі (96%) до його природного вмісту (2.2%). Таким чином, в склад феритину включається як екзогенне залізо, так і ендогенне залізо, "випущене" екзогенним із пулу низькомолекулярних комплексів $Fe(II)$ та білків, що містять залізо.

Виявлена магнітна анізотропія сигналу в області g-фактора 4.4-4.0 і 2.5-2.0, який був віднесений до феритину (Мал. 5). Змінення положення, інтенсивності і форми ліній при зміні орієнтації зразків тканин відносно магнітного полюса спектрометра свідчать про наявність в об'ємі зразку частинок, що мають анізотропний магнітний момент і не є агрегатами частинок металевого заліза. Відомо, що феритин може бути в магнітоупорядкованому стані і має магнітну анізотропію, величина якої залежить від кількості заліза в ньому (Суздальов И.П., 1988). Крім того, відома схильність молекул феритину до агрегації, особливо при високих ступенях заповнення залізом (Smith A.G., Carther P., 1990). Певно, анізотропія ЕСР-спектрів, що була виявлена в даній роботі, є наслідком агрегації молекул феритину в магнітному полі.



Мал.5 Спектри ЕРС зразку печінки миші (контроль), зареєстровані після швидкого заморожування в магнітному полі 250 Е (А) і в магнітному полі Землі (Б) в залежності від куту між напрямком магнітного поля в момент заморожування та напрямком поля в момент реєстрації спектру. Температура 172 К, частота НВЧ 9.30 ГГц, потужність 50 мВт, амплітуда модуляції 10 Гс.

В ретьому розділі обговорюються закономірності агрегації, розподілу та біотрансформації суспензій високодисперсного заліза при внутрішньовенному введенні експериментальним тваринам. Виявлена зміна агрегативного стану високодисперсного заліза в організмі, що виявляється в появі нового типу агрегатів - "пласких шарів" частинок при одночасному зменшенні відносної частки ланцюгових агрегатів, зміни в агрегативному стані частинок супроводжуються збільшенням товщини захістного (немагнітного) покриття на їх поверхні, внаслідок набрякання полімерного гелю або сорбції білків на поверхні частинок.

Аналіз даних про розподіл по органах магнітної фази М, низькомолекулярних комплексів Fe(II) і продукту біотрансформації (феритин) Ferr і даних про їх сумарну кількість в організмі (Мал.6) дозволяє зробити висновок, що хімічні властивості поверхні визначають в першу чергу динаміку розподілу часток по органах. Процес біотрансформації відбувається для усіх зразків по єдиному механізмі, а розбіжності в властивостях поверхні впливають на кінетику процесів.

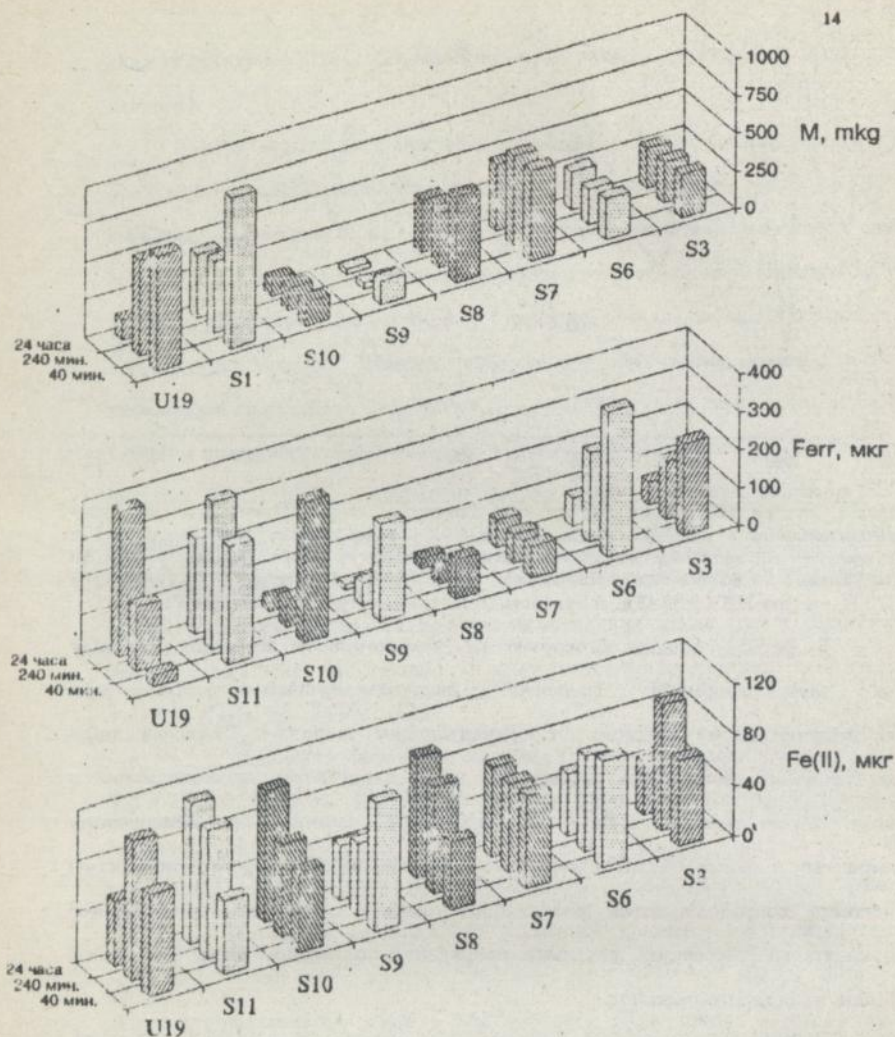
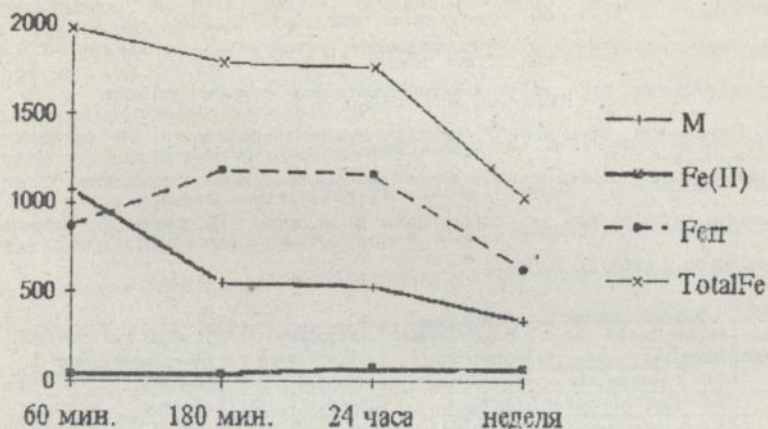


Рис. 6. Діаграми сумарного вмісту екзогенного заліза в складі магнітної фази (M), низькомолекулярних комплексів (Fe(II)) і феритину (Ferr) в організмі експериментальних тварин (миші) через різні проміжки часу після введення суспензій високодисперсного заліза.



Мал.7. Кількість екзогенного заліза в складі магнітної фази (M), низькомолекулярних комплексів (Fe(II)), феритину (Ferr) і трансферину (Transf) в організмі експериментальних тварин (миші) та їх сума (TotalFe) після введення суспензій високодисперсного заліза стабілізованого олеїною кислотою.

Сума екзогенного заліза в досліджуваних органах зменшується вже через добу, через тиждень магнітна фаза в значній мірі витрачається, частка екзогенного заліза в складі феритину значно вище ніж частка його в складі низькомолекулярних комплексів (Мал.7). Кількість заліза в складі трансферіна збільшується в 1.5-3 рази відносно контрольного значення, при цьому вона значно менше ніж кількість заліза в складі феритіна. Рівень насичення трансферіну залізом в нормі близько 20-30%, таким чином максимальний можливий рівень насичення трансферіну при біотрансформації високодисперсного заліза так і не досягається. Таким чином, накопичення екзогенного заліза відбувається в основному в складі феритіну, збільшення рівня феритіну є лише проявленням загальної інтенсифікації обміну заліза.

Очевидно, головну роль в розподілі та біотрансформації частинок високодисперсного заліза в організмі відіграє їх взаємодія з фагоцитуючими клітинами. Це припущення добре узгоджується з літературними даними (Davis S., 1991) і експериментальними даними про швидку біотрансформацію зразків високодисперсного заліза з гідрофобною поверхнею (S9, S10) і

найбільш повільною біотрансформацією зразка U19 з прищепленим полімерним покриттям з поліорганосілоксану, який не має за даними РФС на поверхні активних груп, здатних активізувати фагоцитуючі клітини.

Результати проведеного аналізу процесів розподілу по органах і біотрансформації різних зразків високодисперсного заліза дозволяли оцінити параметри, суттєві для їх застосування в медицині. Ці параметри коротко представлені у вигляді Таблиці 2.

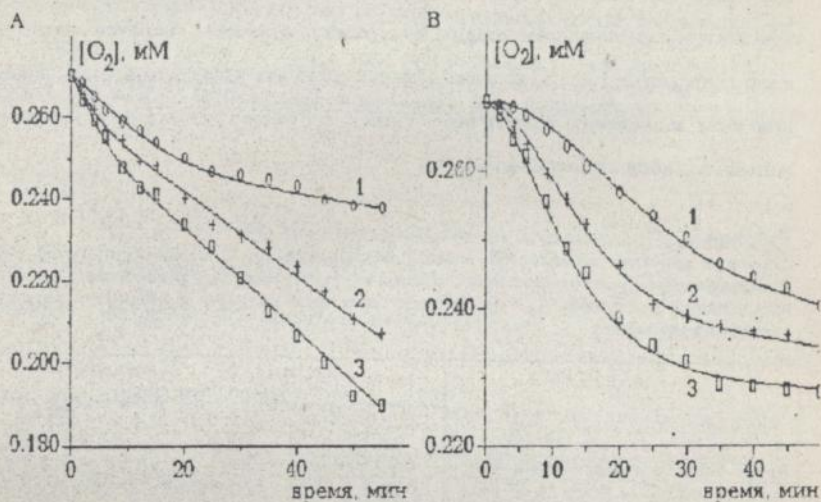
Таблиця 2.

Шифр зразка	модифікатор поверхні	Накопичення в печінці	Час циркуляції в крові	Швидкість біотрансформації
S3	гліцилдіметакрілат	інтенсивне	великий	середня
S6	декстран	середнє	великий	середня
S7	2-гідроксіетиленет-акрілат п акріламід	інтенсивне	середній	низька
S8	2-гідроксіЗдіетиламінопропілметакрілат	інтенсивне	середній	низька
S9	дівінілбензол	слабке	малий	висока
S10	олеїнова к-та	слабке	малий	висока
S11	фенілтріетоксісілан	середнє	середній	низька
U19	γ-амінопропіл-тріетоксісілан	середнє	великий	дуже низька

Дані, приведені в Таблиці 2 показують, що оцінка часу циркуляції в крові по накопиченню в печінці та легенях, що використовується для колоїдних полімерних носіїв ліків (Davis S., 1989) не може бути використана для високодисперсного заліза, що відносно швидко біотрансформується.

З четвертому розділі викладаються дані про вплив постійного магнітного поля на процеси перекисного окислення за участю заліза у вигляді низькомолекулярних комплексів та обговорюються пов'язані з цим наслідки потрапляння в організм. Магніточутливими можуть бути процеси за участю вільних радикалів та парамагнітні іонів (Бучаченко А.Л., 1978; Chen I.L., 1984; Marget G., 1986), навіть слабкі магнітні поля (1-10 мТл) можуть впливати на кінетику таких процесів за механізмом спінової заборони. Середнє магнітне поле поблизу поверхні сферичних частинок заліза може досягати за оцінками 0.75 -1 Тл, поблизу частинок магнетиту - 0.25-0.3 Тл, магнітні поля що застосовуються в клініці (ЯМР-томографія і т.д.) досягають 0.01 -1 Тл. Не

можна не враховувати можливого впливу цих полів на вільнорадикальні процеси в організмі. Залізо у складі низькомолекулярних комплексів - каталізатор вільнорадикальних процесів і збільшення його концентрації в тканинах при біотрансформації високодисперсного заліза може призводити до підвищення концентрації вільних радикалів і продуктів вільнорадикального окислення (Шабарчина М.М., Ципин А.И. и др., 1991). Як модель для дослідження впливу постійного магнітного поля на процеси вільнорадикального окислення було обрано процес пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) в ліпосомах з індивідуального фосфоліпіда в закритій системі. Кінетичні криві, зображені на Мал.8 свідчать про прискорення ПОЛ в магнітному полі.



Мал. 8. Кінетика поглинання кисню в процесі Fe(II)-залежного окислення ліпідів ліпосом із 1,2-діолеїлфосфатиділхоліну при 4°C і напрузі магнітного поля 0 мТ (1), 8 мТ (2) і 280 мТ (3), при концентрації аскорбату 200 μM (А) і без аскорбату (В). Суцільні лінії - кінетичні криві, розраховані з використанням набору констант (Табл.3), що забезпечують найкращий збіг з експериментальними даними. Середовище реакції: концентрація фосфоліпіду 0.55 mg/ml , 150 mM NaCl в 10 mM Tris-HCl буфері pH 7.4, концентрація сульфату заліза (II) 2.5 μM .

За експериментальними кінетичними даними були обчислені константи швидкостей окремих реакцій процесу ПОЛ. Схема реакції для відкритої системи (Владимирова Ю.А., 1972, Волков Е.И., 1985) була змінена, враховуючи відсутність гозобміну з зовнішнім середовищем, для кожного набору констант швидкостей окремих стадій була обчислена крива споживання кисню (як рішення системи диференціальних рівнянь) і ставився у відповідь функціонал, що являє собою інтеграл модуля різниці експериментальної і теоретичної кривих, задалі проводилось варьовування констант з метою мінімізації функціоналу. Було знайдено набір констант, який забезпечує найкращий збіг (з похибкою 1-1.3 %) теоретичної і експериментальної кривих одночасно для обох типів кінетик (з участю і без участі аскорбату). Значення констант магніточутливих стадій при різних значеннях напруги магнітного поля показані в Табл.3, як межі величин констант вказані інтервали значень, при яких відхилення теоретичних кривих від експериментальних залишається менше похибки експерименту (2%).

Таблиця 3.

Значення констант швидкостей реакцій ініціювання (k_0), відновлення йонів заліза аскорбатом (k_{10}) і ефективна константа утворення і рекомбінації ліпідних пероксидних радикалів (k_e) при різних значеннях напруги зовнішнього постійного магнітного поля.

	Стадія процесу	Константи ($M^{-1} s^{-1}$) при напрузі магнітного поля		
		0	8 мТ	280 мТ
k_0	$Fe(II) + O_2 \rightarrow Fe(III) + O_2^-$	2.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	8.2 ± 0.1
k_{10}	$Fe(III) + H_2Asc \rightarrow Fe(II) + P$	0.20 ± 0.02	3.2 ± 0.1	4.3 ± 0.2
k_e	$RH + RO_2^{\cdot} \rightarrow ROOH + R^{\cdot} \quad (k_3)$	(5.0 ± 0.2)	(7.5 ± 1.0)	(10.8 ± 1.4)
	$RO_2^{\cdot} + RC_2^{\cdot} \rightarrow P + O_2 \quad (k_6)$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$	$\times 10^{-4}$

Магніточутливими виявилися реакції ініціювання і відновлення заліза(III) аскорбатом - ключові реакції каталізу залізом процесів вільнорадикального окислення, субстратом якого можуть бути не тільки ліпіди, но і ДНК, белки і т.п.

Таким чином, магнітне поле є таким же фактором прискорення процесів вільнорадикального окислення, як і підвищення концентрації заліза в складі низькомолекулярних комплексів.

При внутрішньовенному введенні високодисперсного металевого заліза здійснюється його швидка біотрансформація з короткочасним підвищенням концентрації низькомолекулярних комплексів заліза і включенням екзогенного заліза в склад феритину, отож інтенсифікація процесів вільнорадикального окислення обмежується періодом біотрансформації. У випадку магнетиту, здатного до довготривалої (роки) циркуляції в організмі створюються умови для постійної інтенсифікації процесів вільнорадикального окислення в результаті дії сильного магнітного поля навіть при капсулюванні частінок і нормальному рівні концентрації заліза. С цієї точки зору перевагу при застосуванні в медицині слід віддати високодисперсному залізу, а не магнетиту.

ВИСНОВКИ

1. В роботі розроблена теоретична модель феромагнітного резонансу в агрегатах магнітних мікрочастинок, коректність моделі підтверджується даними отриманими методами рентгенівської фотоелектронної і гамма-резонансної спектроскопії.

2. Теоретична модель дозволила ідентифікувати сигнали з ширинною 1000-5000 Е, g-фактором 2-5 і анізотропні сигнали з ширинною 300-800 Е і g-фактором 2.0-2.5 і 4.0-4.4, що з'являються у спектрах ЕСР тканин експериментальних тварин після введення високодисперсного заліза відповідно як сигнали різних типів агрегатів магнітних мікрочастинок і сигнали білка феритина з різним ступенем насичення залізом, виявлена анізотропія спектрів електрон-спінного резонансу тканин, що є наслідком створення молекулами феритину *in vivo* агрегатних структур, які мають значну магнітну анізотропію.

3. На основі розробленої моделі були отримані кількісні дані про вміст феромагнітної фази, низькомолекулярних комплексів заліза, феритину в

тканинах і трансферину та метгемоглобіну в крові експериментальних тварин після внутрішньовенного введення високодисперсного заліза, і показало, що властивості поверхні високодисперсних частинок визначають характер процесів агрегації, розподілу по органах і кішечку їх біотрансформації.

4. Показана здатність високодисперсного заліза до швидкої біотрансформації з короткочасним підвищенням концентрації трансферину і низькомолекулярних комплексів заліза і включенням екзогенного заліза головним чином в склад феритину.

5. Показано прискорення перексидного окислення ліпідів в постійних магнітних полях в діапазоні 0-280 мТл, визначені константи швидкостей магніточутливих стадій.

6. Зроблен висновок про перевагу застосування в медицині високодисперсного заліза порівняно з високодисперсним магнетитом, що використовується традиційно.

Перелік робіт, опублікованих з теми дисертації

1. "Biotransformation of intravenously injected finely dispersed iron powders" O.M.Mikhailik, Yu.V.Pankratov, E.A.Bakai. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1993, (122), N1-3, pp.379-382
2. "Surface structure of finely dispersed iron powders.4. Structure of a methylvinylchlorosilane-modified coating" O.M.Mikhailik, Yu.V.Pankratov, S.S.Mikhailova, V.I.Povstugar. Colloids and Surfaces, 1994, (90), N2, pp.111-116.
3. "Steady magnetic fields effect on lipid peroxidation kinetics" U.V. Lalo, Yu.V.Pankratov, O.M. Mikhailik. Redox Report, 1994, (1), N1, pp. 71-75.
4. "Розподіл, агрегація та біотрансформація високодисперсного заліза при внутрішньовенному введенні в організмі експериментальних тварин". Ю.В.Панкратов, О.М. Михайлик. 1-й З'їзд Українського Біофізичного товариства, Київ, 1994, тези деп., сс.194-195.

Yu. V. Pankratov. "The features of the organ distribution of finely dispersed iron".

Dissertation in Candidate Degree (Ph. D) in Biological Science. Speciality 03.00.05 - Biophysics. Bogomoletz Institute of Physiology, Ukraine, Kiev, 1995
 Dissertation is dedicated to studying of the organ distribution, aggregation, the mechanism and some consequences of finely dispersed iron biotransformation. According to the ESR and Mossbauer spectroscopic data on samples enriched with a ^{57}Fe isotope finely dispersed iron in vivo undergoes rapid biotransformation with subsequent incorporation mainly into ferritin. The quantitative data on the dynamics of distribution of finely dispersed iron with different surface properties and the products of its biotransformation (ferritin, low molecular iron complexes, and transferrin) in different internal organs of experimental animals have been obtained. The shape and position of the ESR spectra for ferritin in tissue samples was found to depend on the orientation in the magnetic field, temperature and freezing conditions. Ferritin molecules in vivo form aggregate structures displaying strong magnetic anisotropy. The process of lipid peroxidation was found to be accelerated by weak steady magnetic fields, the rate constants of magneto-sensitive stages have been determined at various external magnetic fields ranging from 0 to 280 mT.

Панкратов Ю.В. "Особенности распределения высокодисперсного железа в организме экспериментальных животных". Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Специальность 03.00.05 -биофизика. Институт физиологии им. Богомольца, Киев, 1995 г. Работа посвящена изучению распределения по органам, агрегации, механизма и некоторых последствий биотрансформации высокодисперсного железа, влияния свойств поверхности на эти процессы. Методами мессбауэровской и ЭСР спектроскопии с использованием образцов, обогащенных изотопом Fe^{57} , показано, что высокодисперсное железо в организме подвергается быстрой биотрансформации, включаясь главным образом в состав ферритина. Получены количественные данные о динамике распределения по органам высокодисперсного железа с различным химическим составом поверхности и продуктов его биотрансформации (ферритин, низкомолекулярные комплексы железа, трансферрин). Обнаружена зависимость вида ЭСР спектров ферритина в тканях от ориентации в магнитном поле, температуры и режима замораживания, что является следствием образования агрегатных структур с высокой магнитной анизотропией. Обнаружено ускорение перекисного окисления в постоянных магнитных полях в диапазоне 0-280 мТл, определены константы скоростей магниточувствительных стадий.

Ключові слова

Высокодисперсні феромагнетики, залізо, розподіл в організмі, біотрансформація, магнітний резонанс, феритин, низкомолекулярні комплекси заліза, вплив магнітного поля, перекисне окислення.

Ідти до друку. 30.10.95. Формат 60x84/16. Папір для розмнож. апар.
Сп. друк. Ум. друк. арк. 1,23. Ум. фарбо-відб. 1,28. Обл.-вид. арк. 0,91.
Тираж 100 прим. Зам. 811.

Редакційно-видавничий відділ з поліграфічною дільницею
Інституту кібернетики Імені В.М.Глушкова НАН України
252022 Київ 22, проспект Академіка Глушкова, 40

A. 33. 218

1100000

AB 33.518