

## ВЛИЯНИЕ НА ЙОНИЗИРАЩО ГАМА-ЛЪЧЕНИЕ ВЪРХУ ДЕЙСТВИЕТО НА ФЕРИТИНА

ИВАНИНА ТОДОРОВА<sup>1</sup>, АНТОН ТОНЕВ<sup>2</sup>,  
ЛИЛИЯ ВЛАДИМИРОВА-МИХАЛЕВА<sup>1</sup>, ВАЛЕРИ КОЧЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра „Атомна физика“, Група „Медицинска физика и биофизика“,  
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

<sup>2</sup>Клиника по лъчелечение, УМБАЛ „Царица Йоанна - ИСУЛ“

*Иванина Тодорова, Антон Тонев, Лилия Владимирова-Михалева, Валери Кочев. ВЛИЯНИЕ НА ЙОНИЗИРАЩО ГАМА-ЛЪЧЕНИЕ ВЪРХУ ДЕЙСТВИЕТО НА ФЕРИТИНА*

Работата е посветена на изследване на ефекта от облъчването на феритин с различни дози гама-лъчение, използвани в лъчетерапията. Въпреки че светлината от видимата и ултравиолетовата част на спектъра определено въздействат директно върху редокс- състоянието на феритиновото минерално ядро, оказва се, че въздействието на много по-високо енергетичното гама-лъчение не е пряко. Промени в нативната четвъртична структура на белтъка не се забелязват с помощта на абсорбционна и флуоресцентна спектроскопия. Независимо от това обаче, при нарастване на дозата е налице улеснено възстановяване на неорганичното  $\text{Fe}^{3+}$  в ядрото и изпускане на  $\text{Fe}^{2+}$  от вътрешността на белтъка в присъствието на аскорбинова киселина като екзогенен редуктор. За обяснение на резултатите е предложена работна хипотеза, базираща се на влиянието на продуктите от радиолизата на водата върху архитектурата на тройните канали в протеиновата обвивка, отговорни за транспорта на желязото.

*Ivanina Todorova, Anton Tonev, Lilia Vladimirova-Mihaleva, Valery Kochev. EFFECT OF IONIZING GAMMA RADIATION ON THE FERRITIN ACTIVITY*

The consequences of exposure of ferritin with different doses of gamma radiation, used in therapy, are disclosed in the paper. Although, the ferritin is susceptible to UV and visible light, responding with a change in the redox state of its mineral core, the effect of high energy gamma photons turned out to be more subtle. The direct influence of radiation on the native conformation of the protein, as well as on the redox state of the immobilized iron was not observed by the absorption and

---

*За контакти:* Лилия Владимирова-Михалева, Катедра „Атомна физика“, Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул. „Джеймс Баучър“ 5, София 1164, тел.: +359 2 8161317, E-mail: vladimirova@phys.uni-sofia.bg

the fluorescence spectroscopy. However, at increased doses there is a facilitated recovery of  $\text{Fe}^{3+}$  in the inorganic core, and release of  $\text{Fe}^{2+}$  from the interior of the protein in the presence of ascorbic acid as exogenous reducing agent. According to a working hypothesis, this is attributed to the impact of the products of radiolysis of water on the architecture of the threefold channels responsible for the transport of iron.

**Keywords:** ferritin, gamma radiation therapy, potentiometric redox titration, radiolysis of water  
**PACS numbers:** 87.80.-y, 87.52.-g, 87.53.Tf, 87.14.Ee

## 1. ВЪВЕДЕНИЕ

### 1.1. РОЛЯ НА ЖЕЛЯЗОТО В ЖИВИТЕ ОРГАНИЗМИ

От над 100-те химични елемента, познати на науката днес, относително малко се срещат в човешкото тяло. Счита се, че само 24 елемента са най-важни за човешкия организъм (елементи като живак например се намират в тялото, но те не изпълняват съществена функция). Най-голям дял от елементите в човешкото тяло имат кислородът, въглеродът, водородът и азотът. Още през 1842 г. Либих разбира значимостта на химичните процеси, в които тези елементи участват, и предлага теория, според която при хранене човек приема три типа храни: карбонати, нитрогени и минерални соли, които са съществени за образуването на костите. Анализът на елементния състав на различни видове живи организми показва присъствие на метали в преобладаващата част от тях. Повечето метали са едва доловими, в остатъчни (следови) количества, но някои присъстват и в по-значителна степен. Пропорционалното съотношение на металите в различните животински видове и тъкани е доста сходно, но има съществени различия в количествено отношение [1]. Така наречените микроелементи – калций, натрий, калий и магнезий, са налични в големи количества, а остатъчните метали, известни също като хранителни микроелементи, присъстват в различни концентрации в зависимост от вида и тъканта. Прието е, че има осем остатъчни метала – желязо, цинк, мед, магнезий, селен, кобалт, молибден и хром, които трябва да присъстват в храната за осигуряване на нормалното човешко здраве. Всеки от тези метали съставлява по-малко от 0,01 % от човешкото тегло.

Металните йони са жизнено важни и участват в многобройни метаболитни процеси във всяка клетка. Те проявяват значителна селективност и специфичност в химичните реакции, като участват в състава на различни ензими и молекулни комплекси. Клетката е разработила елегантна и строго регулирана система, за да оползотвори тези метали на основата на окислително-редукционната им способност, за да защитават клетката и органелите. Редукционно неактивните йони, като Ca и Zn, участват в ензимните компле-

кси при ДНК метаболизма, докато редуционно активните йони, като Fe, Cu, Co и донякъде Mn, се използват в комплекси, които участват в окислителни реакции при преработка на вещества, съдържащи активен кислород.

В химичните си съединения желязото (Fe) проявява втора и трета валентност, а освен това при химични реакции то лесно може да променя степента си на окисление от +2 (т. нар. феро-желязо) в +3 (т. нар. фери-желязо) и обратно. Тази особеност се използва от редица електрон-транспортни протеини, които, комбинирани с подходящи лиганди, формират широк спектър от редокс-потенциали. В крайна сметка, желязото играе централна роля в редица биологични и клетъчни процеси, като дихателната електрон-транспортна верига, пренос на кислород и ДНК синтез.

Природата е создала хомеостазни процеси за регулиране концентрацията на желязото на различни нива. Регулира се приемът на желязо в тялото и клетката, както и транспортът и синтезата на белтъци, които поддържат необходимите физиологични концентрации на клетъчно ниво.

Идентифицирани са редица заболявания и нарушения в организма, дължащи се на променена концентрация на металните йони. Например прекомерното приемане на желязо в организма се свързва с патологиите на наследствената хемохроматоза и болестта на Паркинсон. Клетъчното приемане, складиране и освобождаване са продиктувани от различни физиологични и метаболитни нужди на различните типове клетки. Не цялото количество желязо се използва непосредствено в метаболитните процеси. Когато нивото на несвързаното желязо стане високо, част от него се натрупва като резерв (секвестриране), за да се предотвратят токсичните ефекти, а при спадане на нивото му то се освобождава. Хепатоцитите служат за депо при натрупването на желязото, въпреки че и транспортният цикъл, включващ трансферин, играе важна роля при складирането. Секвестрираното желязо представлява около 20–30% от желязото в човешкото тяло, а по-голяма част от него е свързана изключително с белтъка, наречен феритин.

## 1.2. НАТИВНА КОНФОРМАЦИЯ И ДЕЙСТВИЕ НА ФЕРИТИНА

### **Третична и четвъртична структура. Канали в апоферитина**

Феритинът е протеин, който натрупва желязото и го освобождава по контролиран начин. Той действа в тялото като „буфер“ срещу недостиг на желязо – ако в кръвта има твърде малко желязо, феритинът може да освободи повече. В по-малка степен действа срещу излишък на желязо – ако в кръвта има твърде много, той адсорбира излишъка.

Гени на феритина са открити във всички животински и растителни видове и микроби. При животните феритина се намира предимно в цитоплаз-

мата, но се среща и в кръвта. При растенията се намира в хлоропластите и други пластиди, но не и в цитоплазмата. Сходството на феритина при растенията и животните е много голямо и се изразява в запазване в голяма степен на първичната последователност в полипептидната верига, в третичната и в четвъртичната структура. При бактериите се наблюдава различна последователност на веригата, но не и вторичната, третичната и четвъртичната структура. Феритинът при бактериите е много по-малък от този при животните и затова се нарича мини-феритин. Този при животните е по-голям и се нарича макси-феритин.

Феритинът е представител на клас белтъци с много големи молекули, чиято тримерна структура им позволява да играят важна роля в биологичните системи. За да разберем как феритинът натрупва желязо, трябва да се визуализира тримерната структура на молекулата и да се покаже връзката между отделните структурни елементи и функцията на молекулата.

Феритинът е голям, кълбовиден (глобуларен), олигомерен протеин с външен диаметър около 12 nm и с тегло 480000 Da. Той има формата на сфера, в сърцевината на която има кухня с диаметър около 8 nm, и с обем  $256 \text{ nm}^3$ . Стените на сферата са изградени от 24 (12 при мини-феритините) субединици, свързани помежду си с водородни и йонни връзки. Полипептидната верига на всяка субединица е четирикратно нагъната и представлява сноп от антипаралелни алфа-спирали. Така получените субединици приличат на парчета плат, от които е съшита симетрична пространствена структура с формата на футболна топка от 24 кръпки. Кълбото на феритина притежава осмостранна ротационна симетрия (по 4 оси – диагоналите, и по 3 оси – страните) (фиг. 1). Когато в молекулата на феритина отсъства желязо, молекулата се нарича апоферитин. Феритинът съдържа в центъра на сферата минерално ядро, в което се натрупват желязните атоми.

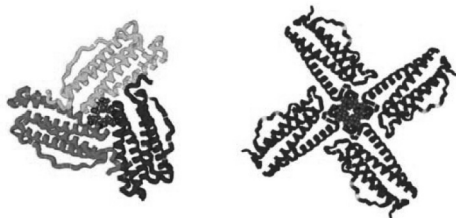


**Фиг. 1.** Разположение на 24-те субединици на феритина. Вляво е показано схематичното разположение, като Е означава страната към четворния канал, а N – към тройния. Вдясно е показан разрез на молекулата [2]

При допирането си субединиците оставят канали към кухината. Има два вида канали: тройни и четворни. Тройните се образуват при долепянето на три субединици, а четворните – там, където се срещат четири субединици (фиг. 2). Можем да си представим молекулата като куб, в средата на стените на който се намират четворните канали, а по върховете – тройните.

Така изградена, молекулата на феритина съдържа 6 четворни и 8 тройни канала, през които минават осите на симетрия. Каналите се използват за транспортиране на желязо навън или навътре към кухината на молекулата.

Шестте четворни канала, или пори, са хидрофобни, докато осемте тройни са изпълнени с полярни групи и следователно са хидрофилни. Желязото вероятно се транспортира през тройните канали [3], докато четворните се предполага, че пренасят малки молекули, като кислород и редуциращи агенти. Порите са широки само няколко ангстрьома, но динамични структурни трептения позволяват на малки молекули на редуктори да влизат достатъчно бързо, за да взаимодействат директно с желязото от ядрото.



**Фиг. 2.** Двумерно представяне тип „панделка“ на образуването на тройните и четворните канали [3]

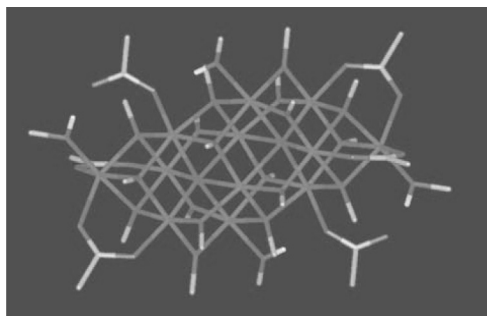
Чрез отваряне и затваряне на каналите се контролира достъпът на редуциращи агенти до ядрото и излизането на  $\text{Fe(II)}$  от молекулата [4].

*Ядрото.* За да освободи феритинът желязо, когато тялото има нужда от него, то трябва първо да се промени степента му на окисление от  $\text{Fe}^{3+}$  (трета) на  $\text{Fe}^{2+}$  (втора). След това желязото напуска сферичната структура на феритина през описаните канали. Този процес показва, че структурата на феритина е изключително важна за способността му контролирано да съхранява и освобождава желязо. За да се разбере как феритинът помага за поддържане на необходимото количество на желязо в организма, трябва да разгледаме по-подробно структурата на протеина.

J. M. Domínguez-Vera, et al. [5] представят модел на запълване на вътрешната част на феритина, според който ядрото е съставено от различни желязни оксиди, но главно на минералите ферихидрит [3] –  $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$ ,

и магнетит –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , които си променят съотношението при натрупване и освобождаване на желязо. Според този модел при освобождаване на желязо относителното съдържание на ферихидрит се намалява, а това на магнетит се увеличава. Така освобождаването на желязо става главно от ферихидрита, който се намира в обвивка от магнетит. Във вътрешността желязото се натрупва от стената на молекулата към центъра и се освобождава от центъра чрез разширяване на каналите, по които минават редуциращите агенти.

Ядрото може да съдържа до 4500 атома  $\text{Fe}^{3+}$  в трета степен на окисление, достигайки концентрация от 0,25 М, поради това, че ядрото е неразтворимо. Ядрото е свързано с вътрешната стена на обвивката с ковалентна връзка. Доскоро се смяташе, че всички микрокристали в ядрата са идентични. След изследване на редица ядра с помощта на различни техники, като рентгенова дифракция, мьосбауерова спектрография и електронна микроскопия, са установени различия в структурата на подреждане, магнитната ориентация и нивото на хидратация на молекулите.



**Фиг. 3.** Схематично „пръчковидно“ представяне на опростен модел на феритиновото минерално ядро [3].

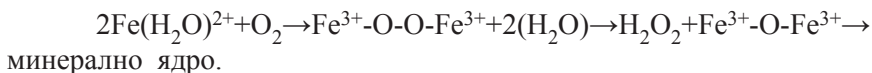
Опростен модел на съставното желязно ядро е показан на фиг. 3 изградено от съединение по формулата  $[\text{Fe}_{12}\text{O}_2(\text{OCH}_3)_{18}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_6(\text{CH}_3\text{OH})_{4,67}]$  [3].

### **Механизми за секвестриране и отделяне на желязото от феритина**

За да се свърже в минералното ядро, желязото преминава от втора в трета степен на окисление. Това е и главната лимитираща стъпка, намаляваща скоростта, с която желязото се акумулира в ядрото.

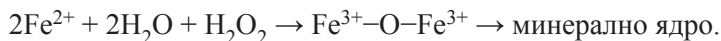
Главният път за транспорт на желязото навън и навътре е през осемте тройни хидрофилни канала в обвивката, които водят до фероксидазния активен център на разстояние 1–1,5 nm от входа [1]. Когато  $\text{Fe}^{2+}$  навлезе в ка-

нала много бързо, за милисекунди [6], се свързва със фероксидазния център и се образува междинният продукт двужелезен окис ( $\text{Fe}^{3+}\text{-O-Fe}^{3+}$ ) [6]:

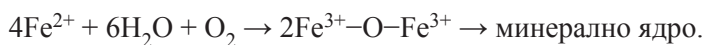


При тази реакция се консумира една кислородна молекула  $\text{O}_2$  на два железни йона  $\text{Fe}(\text{II})$  и се отделя водороден пероксид [7] във вътрешността на молекулата. Количеството отделен водороден пероксид зависи от отношението Н/Л на частите, съставляващи обвивката. Водородният пероксид е едновременно генетичен сигнал и опасен метаболитен продукт, който може да повреди клетката.

Полученият от предната реакция водороден пероксид се свързва с  $\text{Fe}^{2+}$ , като по този начин, от една страна, се неутрализира  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а от друга, се ускорява окислението на  $\text{Fe}^{2+}$ :



Когато желязното ядро нарасне достатъчно,  $\text{Fe}^{2+}$  участва и директно в каталитично окисление на повърхността на ядрото:



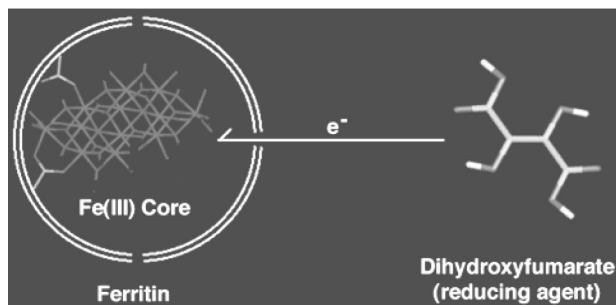
Тези три пътя за натрупване на желязото са много ефективни. Когато човешки Н-феритин се смеси с желязо в отношение 1:48, 80% от окислението настъпва за 0,2 s, а 99% от реакцията протича за 10 s.

Ролята, която играе водородният пероксид за минерализацията на феритина, не е напълно изяснена, но може да се отнася до еволюцията на каталитично неактивния L-феритин при гръбначните и до специфичното за всяка клетка отношение Н/Л [7]. По-високото съдържание на Н-феритин увеличава и концентрацията на  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 1.3. МЕХАНИЗЪМ ЗА ОСВОБОЖДАВАНЕ НА ЖЕЛЯЗОТО ОТ ФЕРИТИНА

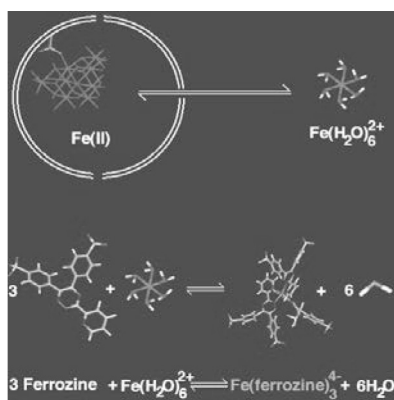
Първата стъпка при освобождаване на желязото е редуциране на степента на окисление в минералното ядро от трета до втора. Това става с помощта на редуктор, който преминава през тройните пори на феритина и достига ядрото или доставя електрон по друг механизъм до ядрото. Крайният резултат е преминаване на  $e^-$  (фиг. 4), който редуцира желязото и го превръща в разтворим йон  $\text{Fe}^{2+}$ . На фигурата ролята на редуктор играе дихидроксиформарата, но са известни и други хелатори и протеини, които изпълняват съ-

щата функция. За да може редуторът да достигне вътрешността, каналите на феритина трябва да са в отворено положение.



**Фиг. 4.** Преминане на електрон от външна среда до ядрото през канал в обвивката [3]

Втората стъпка е процесът, при който разтвореният железен йон  $\text{Fe}^{2+}$  се отделя от ядрото и чрез дифузия напуска вътрешността през тройните канали (фиг. 6) [3]. Процесът на освобождаване на желязо все още не е напълно изяснен. Извън молекулата на протеина хидратираният железен йон  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  реагира с три лиганда ферозин и се формира  $\text{Fe}(\text{ferrozine})_3^4$  (фиг. 5).



**Фиг. 5.** Дифузия на редуцираното желязо през обвивката

Ролята на редутор за понижаване степента на окисление на желязото (стъпка едно), както бе отбелязано по-горе, могат да играят редица вещества. Освен чрез дихидроксифумарата редукция може да настъпи и с по-малки или по-големи молекули, като дитионит ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), дифероксамин, аскорбинова киселина (витамин С), феропортин – протеинът, транспортиращ



желязото, и много други. Причина за отделяне на желязо от молекулата на феритина може да бъде и облъчване със светлина и йонизиращо лъчение [9].

#### 1.4. ЛЪЧЕЛЕЧЕНИЕ. ТГТУ С ИЗТОЧНИК $^{60}\text{Co}$

Лъчелечението е третиране на туморни образувания чрез използване на рентгенови лъчи, гама-лъчи, електрони, протони или йони. Лъчелечението се използва при рак на кожата от почти един век и това са първите видове рак, които са третирани и върху които е постигнат туморен контрол. Оттогава насам много нови методи и техники са били разработени в борбата с рака и те продължават да се развиват. Лъчелечението е често използвано заради възможността да се прилага за контрол на растежа на туморните клетки. Йонизиращите лъчения разрушават ДНК на туморните клетки, което води до клетъчна смърт – митотична катастрофа. Тя (митотичната катастрофа) е събитие, при което клетката се разрушава по време на митозата. Йонизиращите лъчения разкъсват хромозомите в клетката. Базите на ДНК са разрушени, което кара двойната ѝ спирала да се раздвои. След като ДНК се разкъса, при тях не може да протече репарация. ДНК на клетките е податлива на разрушаване само в определени фази на митотичното делене. Облъчването на пациента се фракционира, за да може да се обхванат тези определени фази на всички клетки на туморното образувание при митотичното им деление. Въпреки че ДНК на здравите клетки също бива поразявана, поради своевременното протичане на репарациите те не са необратимо увредени и успяват да репарират своята ДНК преди следващия цикъл на делене. Мярката за клетъчна смърт е липсата на кислород в тъканите (хипоксия) и отношението на броя на делящите се клетки към броя на неделящите се.

Има 5 основни метода за лечение: оперативна интервенция, хормонотерапия, химиотерапия, палиация и лъчелечение.

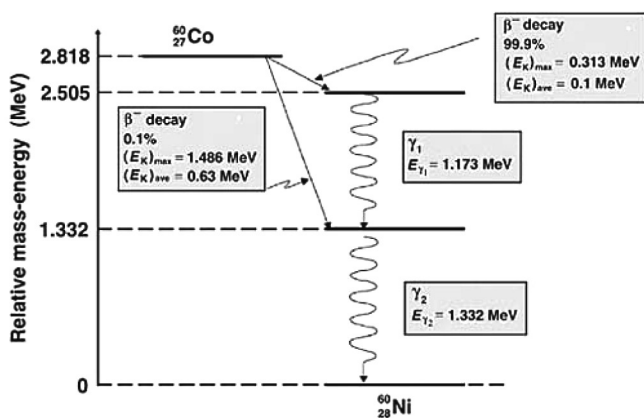
На 27 октомври 1951 г. за първи път е била клинично използвана ТГТУ с  $^{60}\text{Co}$  в London Health Sciences Centre в Лондон, Онтарио, Канада. Типичният заряд на тези уредби представлява цилиндър с приблизителни размери  $d = 2 \text{ cm}$  и  $h = 5 \text{ cm}$ , поставен в главата на терапевтичната уредба, насочен с основата си към пациентната маса [10]. Фактът, че източникът не е точков, усложнява геометрията на разпространение на лъчевия сноп и води след себе си редица проблеми, като например, т. нар. геометрична полусянка и трансмисионна полусянка. Тези полусенки се изразяват в промяна на дозата, респективно мощността на дозата, в краищата на лъчевото поле.

Радионуклидът  $^{60}\text{Co}$  е бета- и гама-лъчител с  $T_{1/2} = 5,27a$ .

Схемата на разпад е  $^{59}_{27}\text{Co} + n \rightarrow ^{60}_{27}\text{Co} \rightarrow ^{60}_{28}\text{Ni} + e^{-} + \gamma$ .

С вероятност  $P_1 = 99,9\%$   $^{60}\text{Co}$  претърпява  $\beta$ -разпад (фиг. 6), като максималната енергия на бета-спектъра е  $E_{\text{max}} = 0,313 \text{ MeV}$ , а средната енергия

на бета-спектъра е  $E_{avr} = 0,1$  MeV. От своя страна възбуденото ядро на  $^{60}\text{Ni}$  преминава на по-ниско енергетично ниво, излъчвайки  $\gamma$  с  $E_{\gamma} = 1,1732$  MeV. С вероятност  $P_1 = 0,1\%$   $^{60}\text{Co}$  претърпява  $\beta$ -разпад, като максималната енергия на бета-спектъра е  $E_{max} = 1,486$  MeV, а средната енергия на бета-спектъра е  $E_{avr} = 0,63$  MeV. От своя страна възбуденото ядро на  $^{60}\text{Ni}$  преминава на по-ниско енергетично ниво, излъчвайки  $\gamma$  с  $E_{\gamma} = 1,3325$  MeV. Електроните лесно се екранират и не се използват в лъчелечението. Средната енергия е 1,25 MeV.



Фиг. 6. Схема на разпад на  $^{60}\text{Co}$  [11]

С тези стойности се правят лъчезащитните и дозиметричните пресмятания. Дозният максимум се формира на 0,5 cm дълбочина. Уредби с такива източници са най-разпространени през втората половина на XX век и представляват основната апаратура за лъчелечение през този период. Те са най-подходящи за лечение на туморни образувания в областта на главата и шията, като тези случаи са около 25% от общия брой. Останалият процент случаи включва рак на хранопровода, рак на белият дроб, рак на шийката на матката, рак на простатната жлеза. Тези локализации са на дълбочина от около 10–15 cm.

При използването на ТГТУ за лъчелечение процентната дълбока доза в туморното огнище е малка и се изисква създаването и изпълнението на сложни дозиметрични планове за постигане на оптимално дозно покриване на КМО (клиничен мишенен обем), изработване на оловни блокове за формиране на лъчевия сноп и др. През годините тези уредби не претърпяват съществено развитие, за да отговорят на повишените изисквания на физиците и лекарите относно дозиметричното планиране и изпълнение на облъчването и дозите, получавани в СТО (същинския туморен обем) и в критичните органи.

Със създаването и развитието на кобалтовата машина и методите за дозиметрично планиране за първи път е станало възможно да се облъчват дълбоко разположени тумори, без това да води след себе си тежки увреждания за кожата. Източник на йонизиращото лъчение в ТГТУ е закрит радиоактивен източник с много висока активност – от порядъка на десетки хиляди Ci.

Радиоактивният източник е разположен в главата на ТГТУ. Нейната основна функция е лъчезащитна: ограничаване на еквивалентната доза в помещението до допустимите норми и осигуряване на двете положения на източника – работно и неработно. При работно положение източникът излъчва свободно в пространството, ограничен от блендираща система. При неработно положение източникът се премества така, че на пътя на лъчите да има оловна и уранова преграда, която намалява интензитета на лъчението с няколко порядъка. Масата на урана, използван в главата на ТГТУ, е около 560 kg. Колимиращата система има задача да променя геометричните размери на лъчевото поле. Тя е съставена от метални блокове, които се движат в една или няколко равнини и формират лъчеви полета с правоъгълна форма. Полусянка, в общ смисъл, е областта в периферията на лъчевия сноп, където мощността на дозата има много голям градиент. Геометричната полусянка при ТГТУ е областта от облъчваната среда, до която достигат първични фотони само от източника. По аналогия с оптиката това е областта от средата, от която се вижда част от източника. Прави се всичко възможно да се намали нейното влияние. Зареждането на ТГТУ с радиоактивен източник е периодичен процес. В последните години се практикува смяната на цялата глава на ТГТУ с нова, старата се отстранява и се „погребва”.

## 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 2.1. ХИМИКАЛИ, РЕАГЕНТИ И АПАРАТУРА

**Материали.** Животински феритин HoSF (Type I, Sigma) под формата на разтвор в 150 mM NaCl беше използван без никакво допълнително пречистване. Съдържанието на феритин в разтвора е  $\sim 100 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Аскорбиновата киселина (AA) като разтвор от 100 mg/ml, производство на Фармахим (България), беше закупена от аптечната мрежа. Калиев хлорид, KCl (HANNA Instrument.), с концентрация 0,1 M играеше ролята на поддържащ електролит. Цериев дисулфат,  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (CARLO ERBA, Италия), 0,1 M служеше като основен титрант. Глутатион (GSH, Merck) бе използван.

**Апаратура.** Потенциометричното титруване бе провеждано с експерименталната установка, коментирана по-подробно в [12]. В нея точков платинов (Pt) електрод (OH-09615, Radelkis, Унгария) служи като работен

(WE), а двуконтактен Ag/AgCl електрод (OP-0820P, Radelkis, Унгария) – като сравнителен (RE). Последователните порции от титранта бяха внасяни в реакционната среда с пипета – диспенсер (Plastomed, Полша). Разликата в потенциалите на двата електрода (работен, WE, и сравнителен, RE) беше измервана с потенциометър N5170 (ELWRO, Полша). Получените данни бяха обработвани с помощта на пакет от програми Origin 7.0.

## 2.2. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧНО РЕДОКС-ТИТРУВАНЕ

Титруването, изобщо, е аналитична процедура, при която се определя неизвестното количество на някакво вещество от разтвора – аналит, с помощта на реакцията му с друго вещество – титрант, чиято концентрация е известна. Това става, като към разтвора се добавят последователно аликвотни (еднакви по количество) порции от титранта, докато количеството му се изравни с това на аналита. Така, познавайки стехиометрията на реакцията, можем да определим количеството на интересувания ни аналит. В химията за аналитично титруване се използват главно четири типа реакции: киселинно-основни, в които реагират киселини и основи; окислително-редукционни (редокс), в които реагентите са окислител и редуктор; комплексометрични, свързани с образуването на комплекси с координационни връзки (най-често между метал и лиганди); и преципитатни, при които се образуват неразтворими утайки. Ясно е, че с тях не се изчерпват всички варианти на метода. Титруване може да се извършва например и с реакциите антиген-антитяло.

В хода на титруването, измервайки потенциометрично разликата  $E_{\text{cell}}$  между двата електрода, се получава зависимостта на  $E_{\text{cell}}$  от обема на титранта, известна като крива на титруване. В отсъствие на интерфериращи реакции тя има характерна сигмоидална форма с две „плати”, определящи се от стандартните потенциали на аналита и титранта. Когато тяхната реакция протича със стехиометрично съотношение 1:1, не е трудно да се види, че точката на еквивалентност се намира по средата между тези плати,  $E_{\text{eq}} = \frac{1}{2}(E_a^0 + E_t^0)$ , и тогава се говори за симетрична крива на титруване. При различна стехиометрия тя е отместена съответно към потенциала на аналита или титранта и кривата на титруване е несиметрична. Освен това, тъй като в този момент техните количества се изравняват, в повечето случаи точката на еквивалентност представлява инфлексна точка за кривата на титруване и оттам нататък потенциалът се определя от съотношението на двете редокс-форми на преобладаващия титрант. По този начин точката на еквивалентност може да бъде определена чрез първата производна на кривата на титруване, която има максимум в инфлексната точка. Също така е ясно, че грешката в определянето на тази точка не може да бъде по-голяма от

$V_t(\text{eq}) \pm \frac{1}{2} \Delta V$ , понеже разстоянието между точките е  $\Delta V$  (т.е. точността зависи от големината на аликвотните порции и от концентрацията на титранта  $[T_O]_0$  в тях).

Потенциалът, изразен чрез уравнението на Нернст, може да се представи и като функция на обема на добавения титрант:  $V_t = n \Delta V$ . При условие че реакцията  $A_R + T_O \rightarrow A_O + T_R$  протича напълно (т.е. има висока равновесна константа), количеството на титранта  $T_O$  ще бъде равно на количеството на окислената форма на анализа  $A_O$  и

$$[A_O] = nN_t/V(n) ; [A_R] = (N_A - nN_t)/V(n),$$

където  $V(n) = V_0 + V_t$  е общият обем на разтвора. Тогава уравнението на Нернст (W. N. Nernst, 1889) приема вида

$$E = E_a^0 + 0,05916 \log \frac{nN_t}{N_a - nN_t} = E_a^0 + 0,05916 \log \frac{V_t}{A - V_t}, \quad (3)$$

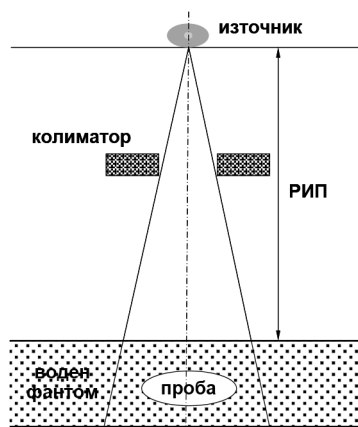
където  $A = \Delta V N_A / N_t = V_0 [A_R]_0 / [T_O]_0 = \text{const}$  е постоянна величина за даденото титруване и съдържа неизвестната  $[A_R]_0$ . Ясно е, че ако кривата на титруване бъде апроксимирана с уравнението (3), константата  $A$  може да бъде определена. Това дава един друг начин (разбира се, по-неточен) за намиране на количеството на анализа.

### 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

#### 3.1. ОБЛЪЧВАНЕ НА ФЕРИТИНА

Действието на всички детектори на ядрени и йонизиращи лъчения се основава на процесите на взаимодействие с веществото на различните видове лъчения: леки и тежки заредени частици, фотони, неутрони. За преминаващото лъчение веществото на средата представлява съвкупност от ядра и електрони, т.е. заредени обекти, които притежават маса [13]. Макар че различните видове лъчения взаимодействат специфично, общото е предаването на енергия от преминаващите частици към атомите на средата. С проникването си във веществото както енергията на частиците, така и интензитетът на снопа намаляват поради разсейване и поглъщане. При предвидените експерименти ще се използват  $\gamma$ -лъчите поради това, че еластичните разсейвания не водят до загуба на енергия, а само до промяна в посоката на движение на фотона. Следователно съществени са само фотоэффектът, комптоновото разсейване и възникването на двойка електрон-позитрон. Именно

чрез тях се обясняват особеностите на поглъщането на фотонните лъчения: много силно проникващи в сравнение със заредените частици и не намаляват енергията си при преминаване през веществото, а само интензитета си.



Фиг. 7. Постановка на експеримента

Експериментите се извършват съгласно схемата на фиг. 7. Използван източник е наличният  $^{60}\text{Co}$ . В епруветка, тип „ендорф“, с вместимост 1,5 ml се поставя 50  $\mu\text{l}$  феритин (съдържащ 18  $\mu\text{mol}$  желязо) и се допълва с 0,1 М КСI до крайна концентрация на желязото от 12 mM. Поставя се във вана, като разстоянието от повърхността до центъра на ендорфката е съответно (А) 4,5; 3 и 2,5 cm. Облъчването се извършва чрез ТГТУ с източник  $^{60}\text{Co}$  (фиг. 8). Изследвани са три проби с обща доза съответно: 0,1 Gy; 2 Gy и 12 Gy, и РИП = 75 cm. (РИП – разстояние източник–повърхност). Мощността на дозата в т. А е 1,608; 1,613 и 1,593  $\text{cGy}\cdot\text{s}^{-1}$ . Времето на облъчване е съответно 79 s, 83 s и 839 s.



Фиг. 8. ТГТУ с източник  $^{60}\text{Co}$

### 3.2. ЕЛЕКТРОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЪЗДЕЙСТВИЕТО НА ГАМА-ЛЪЧЕНИЕТО ВЪРХУ ФЕРИТИНА

За да бъде отделено от феритина, желязото трябва първо да бъде редуцирано, т.е. Fe(III) от минералната сърцевина трябва да бъде превърнато в Fe(II), което впоследствие напуска белтъчната обвивка. Такива експерименти са били многократно провеждани по-рано в най-различни варианти: използвайки редуктори с малки размери (като например, дихидроксифумарат [14] или дитионит  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  [15, 16]), способни да проникнат през порите във вътрешността на протеиновия „кафез“; с помощта на чувствително по-големи молекули (включително редокс-протеини), които прехвърлят електрони през „пътища“ в обвивката (апоферитина) [17, 18]; или директно редуцирайки феритиновите молекули върху метален електрод [19].

Както бе споменато във въведението, феритинът играе ключова роля на кръстопътя в метаболизма на желязото и кислорода, където се раждат и дезактивират множество токсични продукти. Очевидно от неговото адекватно функциониране ще зависи до голяма степен предпазването на клетките и тъканите от тяхното вредно действие. Тъй като в основата на поглъщането и изпускането на желязото от феритина стоят редокс-процеси, изключително важно е да се знае какви химически и физически фактори на средата им влияят.

Напоследък особено внимание се отделя на ефектите върху изявата на феритина, предизвикани от йонизиращите и нейонизиращите електромагнитни лъчения. Този интерес е разбираем, като се има предвид непрекъснатото увеличаващите се дози, на които човек е подложен по различни причини – във всекидневния живот, в работната среда, в рискови ситуации, по време на лечение и т.н. Действително, в литературата могат да бъдат намерени голям брой изследвания, посветени на желязо-зависимите процеси на перекисно окисление, инициирани от електромагнитни лъчения [19–22]. Въпреки че ролята на феритина в секвестирането на свободното желязо е неоспорима, все още не е напълно ясно дали той спомага за елиминирането на АФК или обратно. Това се дължи на факта, че в много случаи развитието на окислителен стрес е следствие от увеличеното съдържание на феритина, който започва да се държи като про-оксидант.

Ето защо в нашата работа се спираме конкретно само на директното въздействие на лъчението върху феритиновата молекула, а не на променената му по индиректен начин вътреклетъчна активност (вследствие например от регулация на синтеза на белтъка). Освен това е ясно, че данните, получени от редуцията на феритина по химичен път, не могат пряко да бъдат екстраполирани към резултатите от въздействието на някакъв тип лъчение [23].

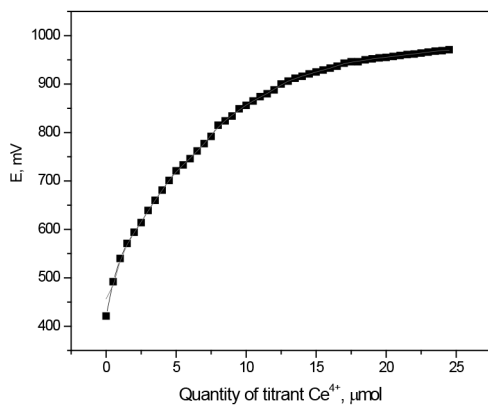
След тези встъпителни думи, мотивиращи проведените от нас изследва-

ния с гама-лъчение от  $^{60}\text{Co}$ , по-надолу ще представим получените резултати. Веднага трябва да кажем, че не съвсем според очакванията за силно въздействие на едно електромагнитно лъчение с висока енергия ( $h\nu$ ), полученият ефект се оказва не толкова очевиден, а по-скрит (subtle), изискващ малко по-сложна интерпретация.

Представените резултати са от серия опити за установяване влиянието на гама-лъчението върху редукцията и изпускането на желязото от ядрото на феритина. За сравнение са дадени и няколко контролни измервания, спомагащи за изграждането на работна хипотеза относно механизмите за въздействие на лъчението върху сложната белтъчна молекула.

Всички потенциометрични измервания са направени с аликвотни количества от пробите облъчен или необлъчен материал. Те са с обем от 500  $\mu\text{l}$  и съдържат от порядъка на 6  $\mu\text{mol}$  феритин, който се внася в съда за титруване. Процедурата е една и съща за всички представени по-долу случаи, като титруването се извършва с еднакви порции (0,5  $\mu\text{mol}$ ) от титранта  $\text{Ce}^{4+}$ , добавяни през равни интервали от време (2 min).

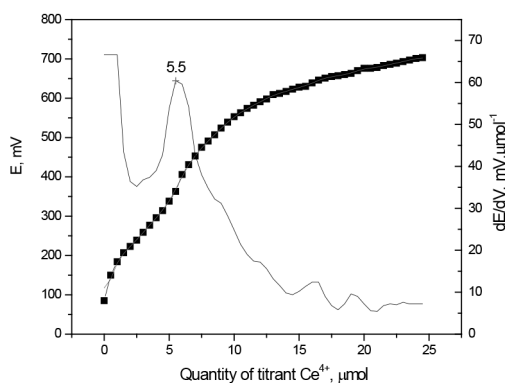
Като първа стъпка бе проверена възможността лъчението да предизвика директна мобилизация на желязото (т.е. възстановяване и изпускане), подобно на UV и видимата светлина. Една проба на облъчен с доза 2 Gy феритин бе титрувана без добавяне на екзогенен редуктор. Както се вижда от фиг. 9, получената крива не притежава инфлексия в широк диапазон до количества от титранта в размер на 25  $\mu\text{mol}$ . Това недвусмислено означава, че няма пряка редукция на неорганичния състав във вътрешността на феритина и в пробата не се отделя  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Фиг. 9.** Крива на титруване за облъчен с 2 Gy феритин без наличие на екзогенен редуктор в средата. Стъпката на титруване е  $0,5 \mu\text{mol Ce}^{4+} \cdot \text{min}^{-1}$



Този резултат, по наше мнение, е важен, тъй като подсказва, че сечението на взаимодействие на гама-лъчението с минералното ядро е ниско и не може да доведе до възстановяване на желязото до  $\text{Fe}^{2+}$  в една пряка редокс-реакция. Същевременно пробите с необлъчен феритин показват стандартно поведение и след инкубация от 60 минути в среда с аскорбинова киселина (АА) в качеството на редуктор се наблюдава повече или по-малко ясна инфлексия в кривата на титруване (фиг. 10). Това позволява да се оцени количеството на изпуснатото желязо, възстановено от екзогенния редуктор АА, като се намери максимумът на производната (вж. Материали и методи). Количеството АА, което се използва за екзогенен редуктор, е подбрано да бъде около  $13 \mu\text{mol}$ , със сигурност превишаващо очакваното количество  $\text{Fe}^{2+}$  в пробата.



**Фиг. 10.** Крива на титруване за необлъчен феритин след инкубация в присъствието на  $2 \text{ mg}$  АА за  $60 \text{ min}$ . Условията на титруване са същите като на фиг. 11. Лявата скала се отнася за измерения редокс-потенциал, а дясната за големината на получената производна

Следващите експерименти имат за цел да установят каква е зависимостта на количеството редуцирано и отделено желязо от големината на получената доза.

Кривата на титруване, отнасяща се за феритин, облъчен с най-ниската използвана доза от  $0,1 \text{ Gy}$ , също има сигмоидален характер, което отчетливо демонстрира отделянето на  $\text{Fe}^{2+}$  в малко по-голямо количество от случая за необлъчените проби. За съжаление при следващата по големина работна доза от  $2 \text{ Gy}$  резултатите от титруването не бяха задоволителни и се оказаха неподходящи за извличане на адекватна информация.

При най-високите дози (от  $12 \text{ Gy}$ ), с които сме работили, поведението на феритина следва досегашната тенденция. С други думи, видът на кривата се запазва сигмоидален, дори е още повече подчертан и отделеното количество

$\text{Fe}^{2+}$  може лесно да се определи. Макар то да нараства слабо с увеличаване на дозата, все пак засега не сме сигурни, че това не е артефакт. В случая, за целите на нашата работна хипотеза обаче това не е толкова важно.

Резюмирайки последната серия данни, може с увереност да се каже, че с увеличаване на дозата възстановяването на минералното ядро и изпускането на  $\text{Fe}^{2+}$  от вътрешността на феритиновата молекула се засилва. В подкрепа на това твърдение е все по-ясно изразеният сигмоидален вид на кривата на титруване и очевидното нарастване на нейния наклон в точката на еквивалентност. Като мярка за това нарастване може да служи големината на производната. Наистина, тя е най-малка за необлъчените проби и най-голяма за максималната доза от 12 Gy. Нещо повече, едно измерване на проба, облъчена с 12 Gy и впоследствие обработена термично, показва още по-висока стойност на производната. Данните от тези няколко измервания са дадени в табл. 5.

**Таблица 5.** Големина на производната за различните дози на облъчване

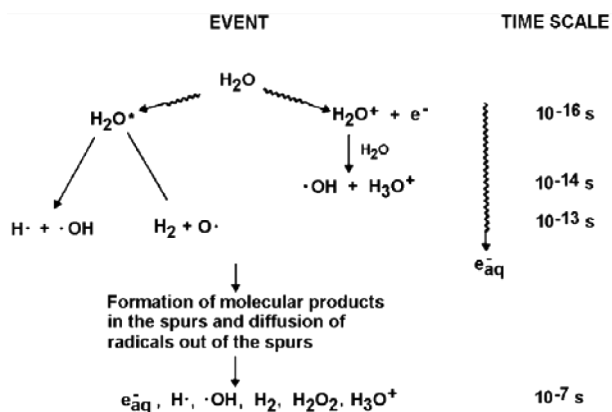
Вид на пробата	$dE/dV, \text{V.mmol}^{-1}$
0 Gy	60,4
0,1 Gy	60,3
12 Gy	92,4
12 Gy + 90°C	105,4

Без да се впускаме в по-задълбочена дискусия, която изисква да се ангажират сериозни аргументи от сложната електрохимична теория на потенциометричното титруване [25, 26], само ще споменем, че нарасналата производна на кривата на титруване в действителност говори за преодоляването на някакви дифузионни пречки за среща между реагентите. Същите съображения очевидно са в сила и за екзогенния редуктор, предизвикващ възстановяването на неорганично свързаното желязо. Това дава основание да направим заключението, че с увеличаване на дозата се получава улеснен достъп на молекулите на аскорбата до минералното ядро във вътрешността на феритина.

Естествено, основният въпрос е на какво се дължи повишеното пропускане на йони през феритиновата обвивка. Без съмнение, получените от нас резултати не са достатъчни за изграждането на пълна и ясна представа за механизмите на въздействие на гама-лъчението върху молекулата на феритина, която има достатъчно сложна четвъртична структура. Необходими са и множество други паралелни изследвания с експериментална техника от типа на инфрачервена спектроскопия (англ. Fourier Transform Infra Red, FTIR),

раманово разсейване, рентгеноструктурен анализ и т. н., които да осигурят една комплементарна информация за промените във феритина. Ясно е, че неговите конформационни метаморфози под действие на радиацията не са съвсем очебийни. Така например, в измерените от нас абсорбционни и флуоресцентни спектри на облъчения феритин (които не са показани, за да не се претоварва изложението) не се забелязват видими промени, което означава, че в нативната конформация на белтъка не настъпват съществени изменения вследствие на третирането му с тези дози.

Че все пак са налице някакви, макар и малки, отмествания в четвъртичната структура на феритина, е несъмнено. С оскъдните данни, с които разполагаме обаче, ни е позволено само да коментираме, да спекулираме относно причините за появата им. Като най-правдоподобна, по наше мнение, звучи версията за промяна в йоногенната картина на каналите в апоферитиновата обвивка (фиг. 4, 5). Известно е, че тези канали са покрити с лесно дисоцииращи се групи [27], които силно се влияят от състоянието на водното си обкръжение (хидратацията). Вероятно то не е трудно да бъде променено от наличието на заредени частици и радикали от типа на АФК, генерирани от гама-лъчението в процеса на радиолизата на водата. Такава интерпретация на наблюдаваните ефекти от радиацията означава, че в нашата работна хипотеза отдаваме превес на индиректното въздействие на лъчението.



Фиг. 11. Продукти от радиолизата на водата при гама-облъчване и техните времена на живот [28]

Поради големите технологични интереси (охлаждане на реакторите) и изключителната роля, която играе в биосистемите, радиобиологията и медицината [20], водата е отдавна обект на интензивни изследвания и нейните радиохимични трансформации са добре проучени [29]. Продуктите от

разлагането на водата са многобройни и се получават в няколко последователни етапа с характерни времеконстанти (фиг. 11). Най-общо казано, се разглеждат три стадия: физичен ( $<10^{-14}$  s), физико-химичен ( $10^{-14}$ – $10^{-12}$  s) и нехомоген химичен ( $10^{-12}$ – $10^{-7}$  s) [27]. В последна сметка, като резултат от реакциите в тях остават следните крайни продукти със съответните добиви (в единици 1/100 eV) в скоби – e-aq(2,63), H(0,55), •OH(2,7), HO<sub>2</sub>(0,008), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0,7) and H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>(2,7) [30]. За да изясним тяхното действие, направихме опит да измерим концентрацията на водородния пероксид в облъчени проби от дестилирана вода. Използвани бяха две методики – колориметричен анализ и хемилуминесцентна техника. За съжаление обаче поради ниския добив (0,7/100 eV), дори и за най-силно облъчените, с 12 Gy, проби не бе възможно да се установи количеството на пероксида.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследвано е въздействието на гама-лъчение от <sup>60</sup>Co върху някои пороцеси, свързани с хомеостазата на желязото, и по-специално, евентуални изменения в конформацията на феритиновата молекула, отговорна за регулацията на физиологичното ниво на желязото. Получените резултати говорят за един не толкова очевиден ефект, изискващ по-сложна интерпретация. Въз основа на тях е предложена работна хипотеза за механизмите, по които лъчението предизвиква засилена мобилизация на желязото от минералното ядро на феритина.

От направените електрохимични експерименти може да се направят следните изводи:

1. Директна промяна в редокс-състоянието на неорганично свързаното желязо от ядрото на феритина под действие на гама-лъчението не се наблюдава.
2. С увеличаване на дозата е налице улеснен достъп на екзогенния редуктор (аскорбинова киселина, AA) до вътрешността на молекулата, дължащ се вероятно на фини изменения в четвъртичната структура (най-вече геометрията на входните канали). Това води до засилено изпускане на Fe<sup>2+</sup> в изследвания разтвор.
3. Като индикация за повишената дифузия през феритиновата обвивка може да служи големината на производната на кривата на титруване.
4. Съгласно предложената работна хипотеза, наблюдаваните ефекти са резултат от индиректното въздействие на лъчението посредством генерираните продукти на радиолиза на водата.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Nadadur, S. S., K. Srirama, An. Mudipalli. *Indian J. Med. Res.*, 2008, **128**, 533.
- [2] [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Protein\\_Synthesis9-Regulation\\_of\\_Protein\\_Synthesis\\_at\\_mRNA\\_Level](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Protein_Synthesis9-Regulation_of_Protein_Synthesis_at_mRNA_Level).
- [3] <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Ferritin/Ferritin.html>
- [4] Hasan, M. R., T. Tosha, E. C. Theil. *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 31394.
- [5] Domínguez-Vera, J.M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8062.
- [6] Theil, E.C. *Journal of Nutrition*, 2003, **133**, 1549 S.
- [7] Cozzi, A., B. Corsi, S. Levi, P. Santambrogio, G. Biasiotto, P. Arosio. *Blood*, 2004, **103**, 2377.
- [8] Hintze K. J., E. C. Theil. *Cell Mol. Life Sci.*, 2006, **63**, 591.
- [9] Wolszczak M., J. Gajda. *Res. Chem. Interm.*, 2010, **36**, 549.
- [10] Тонев, А. магистърска дипломна работа, СУ, 2013.
- [11] [http://www.nar.edu/openbook.php?record\\_id=11976&page=198](http://www.nar.edu/openbook.php?record_id=11976&page=198)
- [12] Владимирова Л., В. Кочев, *Annuaire de L'Universite de Sofia "St. Kl. Ohridski"*, *Faculte de Physique*, 2009, **102**, 33.
- [13] <http://www.wikipedia.org>
- [14] Frey R., M. Donlin, J. Bashkin, "Ferritin Molecular – Graphucs Tutorial", Washington University: St. Louis, Mo, 1995. URL: LabTutorials/Ferritin/Ferritintutorial.html.
- [15] Richards, T. D., K. P. Pitts, G. D. Watt. *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **61**, 1.
- [16] Zhang Bo. PhD Thesis, Brigham Young University, 2006.
- [17] Sirivech S., E. Frieden, S. Osaki. *Biochem. J.*, 1974, **143**, 311.
- [18] Watt G.D., D.Jacobs, R.B. Frankel. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 1988, **85**, 20, 7457.
- [19] Huang H.Q., Q.M.Lin, T.L.Wang. *Biophys.Chem.*, 2002, **97**, 17.
- [20] Morliere, P., S. Salmon, M. Aubailly, A. Risler, R. Santus. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997,**1334**, 283.
- [21] Sies, H., D. Jones. Oxidative stress In: Encyclopedia of Stress (Fink G, ed), Elsevier, San Diego, 2007.
- [22] Schroeder, P., J. Lademann, M.E. Darvin, H. Stege, C. Marks, S. Bruhnke, J. Krutmann. *J. Inv. Derm.*, 2008, **128**, 2491.
- [23] Goralska, M., J. Ferrell, J. Harned, M. Lall, S. Nagar, L.N. Fleisher, M.C. McGahan. *Exp. Eye Res.*, 2009, **88**, 204.
- [24] Giordani, A., J. Haigle, P. Leflon, A. Risler, S. Salmon, M. Aubailly, J.-C. Maziere, R. Santus, P. Morliere. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2000, **54**, 43.
- [25] Bard, A.J., L.R.Faulkner Electrochemical methods: Fundamentals and applications, 717 pp., John Wiley & Sons, New York, 1980.
- [26] Bott, A.W. *Current Separations*, 2000, **18**, 4, 129.
- [27] Čuba, V., V. Múčka, M. Pospíšil. In: *Advances in Nuclear Fuel, InTech*, 2012, 27.
- [28] Stepanov, S. V., V. M. Byakov. *High Energ. Chem*, 2005, **39**, 131.
- [29] Allen, A. O. Princeton, 1961.
- [30] Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W.P. & Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref.*, 1988, **17**, 513.

Дата на постъпване: 14.01.2014 г.

Рецензент: доц. д-р Геновева Златева, Медицински факултет, СУ