ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ; ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

т. XXIX, № 6, 1976

УДК 578.088.8

А. Х. АВАКЯН, Г. Л. ГРИГОРЯН, Э. Г. РОЗАНЦЕВ

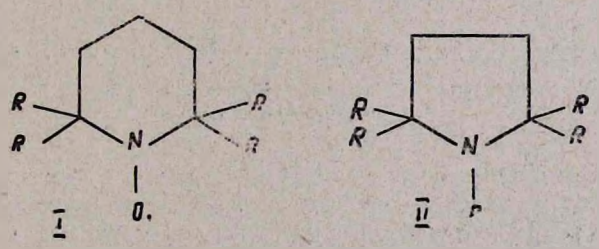
ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ДИФФУЗИИ В КОСТНОЙ ТКАНИ

Показано, что цианкриновая наплавка, образующаяся при ультразвуковом соединении костей, является барьером для проникновения в кость низкомолекулярных соединений. Определены коэффициенты поступательной и вращательной диффузии нитроксильного радикала в кости.

Изучение процесса диффузии низкомолекулярных водорастворимых веществ в кость, помимо общетеоретического, имеет и практическое значение, в частности для травматологии и ортопедии в связи с проблемой регидратации лиофилизированной кости. Вопрос о восстановлении свойств костной ткани путем насыщения ее влагой, утраченной в процессе сушки, все еще недостаточно хорошо изучен.

Изучение процесса диффузии важно и в аспекте выяснения проницаемости цианкринового слоя, наносимого при ультразвуковой сварке костей.

Для решения этих вопросов чрезвычайно удобен метод, предложенный Стрюковым [5] для исследования процессов диффузии в полимерной среде. Он основан на применении парамагнитных молекул — стабильных нитроксильных радикалов [7] и, по существу, является одним из вариантов метода спиновых меток или зондов [2, 6, 8]. В качестве спиновых меток или зондов обычно используют различные производные нитроксильных радикалов пиперидинового (I) или пирролидинового (II) рядов.



Интерес к диффузии нитроксильных радикалов в костную ткань обусловлен еще и тем, что они являются антиоксидантами и поэтому могут обладать консервирующими свойствами.

При помощи метода электронного парамагнитного резонанса можно не только измерять концентрацию вводимых в исследуемую систе-

му нитроксильных радикалов, но и получать информацию об их локализации, ориентации и молекулярных движениях.

Материал и методика. Объектом исследования служили кортикальные участки большой берцовой кости трупов людей. Лиофилизацию производили на установке «Юзифруа». Остаточная влажность кости после высушивания составляла около 1%. Ультразвуковое соединение костей производили при помощи установки УРСК-7Н МВТУ им. Баумана.

В качестве спинового зонда использовали нитроксильный радикал 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксипиперидин-1-оксил [4].

Спектры ЭПР регистрировали на серийном отечественном радиоспектрометре РЭ-1301. Для исследования в спектрометре ЭПР костный порошок помещали в тонкостенные стеклянные ампулы, предварительно проверенные на наличие сигнала ЭПР.

Результаты и обсуждение. Нитроксильные радикалы нами были использованы для выяснения проницаемости циакриновой наплавки и изучения их поступательной и вращательной диффузии в костной ткани.

Для выяснения проницаемости водорастворимых веществ через циакриновую наплавку, наносимую при ультразвуковой сварке, был проделан следующий опыт. Костный цилиндр целиком покрывали циакриновой наплавкой при помощи ультразвука и помещали в водный раствор стабильного радикала (концентрация раствора 10^{-2} М). Затем записывали сигналы ЭПР от циакринового слоя и от кости, защищенной циакрином.

Из рис. 1 хорошо видно, что циакриновый слой препятствует проникновению спинового зонда.

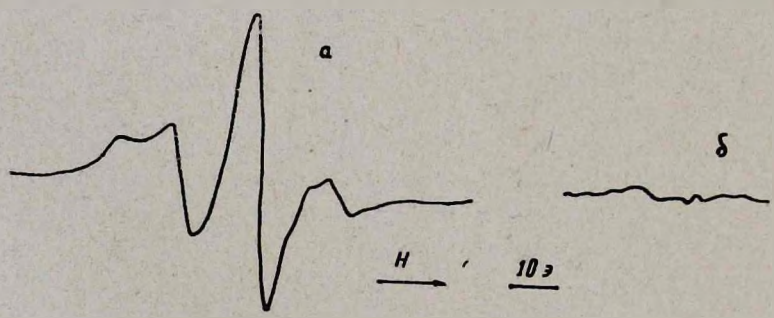


Рис. 1. а) Спектр ЭПР циакринового слоя, наносимого при ультразвуковой сварке после пропитывания спиновым зондом. б) Спектр ЭПР кости, защищенной циакрином.

В целях изучения поступательной диффузии измеряли диффузионное распределение парамагнитных частиц, мигрирующих в образец кости через торец. Слои кости снимали через каждый миллиметр. По интенсивности сигнала ЭПР измеряли концентрацию радикалов в разных слоях (рис. 2).

Для определения коэффициента поступательной диффузии (Дп) экспериментальным путем необходимо знать изменение концентраций парамагнитных частиц, мигрирующих в образец на определенные расстояния и в течение определенного времени.

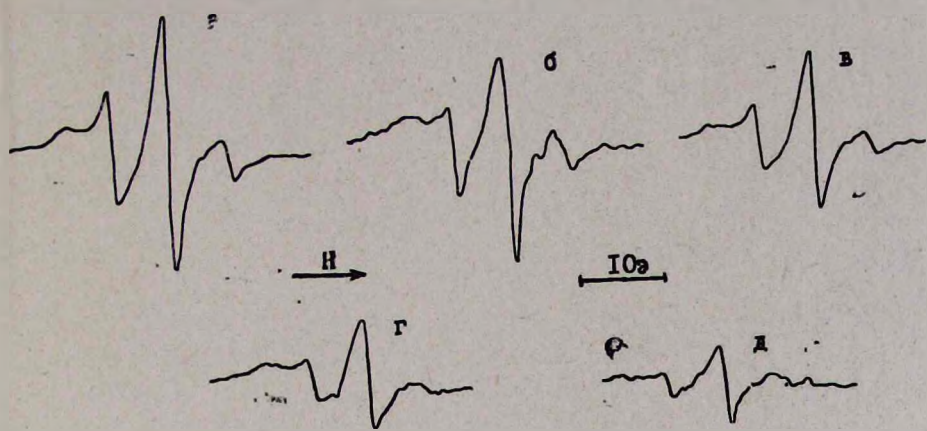
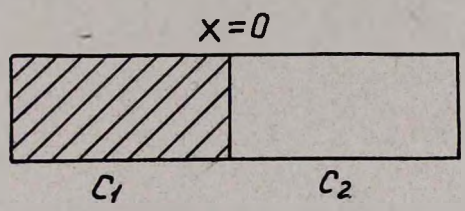


Рис. 2. Спектры ЭПР нитроксильных радикалов в различных слоях костного цилиндра через 1, 2, 3, 4, 5 мм от торца (а, б, в, г, д соответственно).

Решение одномерного уравнения диффузии при исходных концентрациях вещества по одну и другую сторону точки x=o, равных C_1 и C_2, в общем случае имеет вид [3]:



$$C = \frac{C_1 + C_2}{2} - \frac{C_1 - C_2}{2} \Phi(\lambda x), \tag{1}$$

где

$$\Phi = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\lambda x} e^{-y^2} dy,$$

$$\lambda = \frac{1}{2\sqrt{D_n t}}, \tag{2}$$

t—время диффундирования

при $C_2 = 0$

$$C = \frac{C_1}{2} [1 - \Phi(\lambda x)]. \tag{3}$$

Если известна концентрация вещества на двух различных расстояниях x_1 и x_2 от торца, то, используя выражение (3), можно получить:

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{1 - \Phi(\lambda x_2)}{1 - \Phi(\lambda x_1)}, \tag{4}$$

где C_1 и C_2—концентрации данного вещества на расстояниях x_1 и x_2 соответственно.

Концентрация парамагнитной метки (в относительных единицах), измеренная по интенсивности сигнала ЭПР на различных расстояниях от торца кости, приводится ниже.

С (относительные единицы)	1	0,8	0,63	0,43	0,3
Х (мм)	1	2	3	4	5

Подставляя эти экспериментальные данные в выражение (4), находим значения для $\lambda \left(\frac{1}{мм}\right)$:

$\lambda_1 = 0{,}155$; $\lambda_2 = 0{,}150$; $\lambda_3 = 0{,}165$; $\lambda_4 = 0{,}166$; $\lambda_{ср} = 0{,}159$.

Максимальное отклонение этих величин от среднего значения не превышает 5%. Коэффициент поступательной диффузии можно легко найти из соотношения (2), $\lambda_{ср}$. При постоянном времени диффузии, равном 24 часа, коэффициент Дп оказался равным $0{,}448 \pm 0{,}004$ мм²/час.

Таким образом, найдено хорошее подтверждение закона Фика для диффузии низкомолекулярных водорастворимых веществ в кость.

Метод ЭПР позволяет находить коэффициенты не только поступательной, но и вращательной диффузии, Двр. Так, анализ спектров ЭПР нитроксильного радикала в кости (рис. 2) показывает, что он является наложением сигналов ЭПР нитроксильных радикалов, находящихся по меньшей мере в двух различных состояниях. Узкие компоненты спектра (отмечены на рис. 2а стрелками) принадлежат радикалам, обладающим относительно большой вращательной подвижностью, а широкие компоненты (например, первая слева того же спектра) относятся к радикалам, вращательная подвижность которых заторможена значительно сильнее. Коэффициенты вращательной диффузии для этих двух типов радикалов можно оценить соответственно $\simeq 10^8$ и 10^7 сек$^{-1}$. Более точное определение коэффициентов Двр в данном случае связано с трудностями, возникающими из-за сложности спектра (наложение сигналов ЭПР).

Центральный институт травматологии и ортопедии
МЗ СССР, Институт химической физики АН СССР

Поступило 1.III 1976 г.

Ա. Խ. ԱՎԱԳՅԱՆ, Գ. Լ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Է. Գ. ՌՈԶԱՆՑԵՎ

ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՅԻՆ ՊԱՐԱՄԱԳՆԻՍԱՅԻՆ ՌԵԶՈՆԱՆՍԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ՈՍԿՐԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ ԴԻՖՈՒԶԻԱՅԻՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐԵԼՈՒ ՀԱՄԱՐ

Ամփոփում

Ուսումնասիրվել է, որ ցիակրինային զոդումը, որը առաջանում է ոսկորների գերձայնային միացությունից, հանդիսանում է արգելապատ ցածր մոլեկուլյար նյութերի ներթափանցման համար։ Որոշված են նիտրոքսիլ ռադիկալի առաջնթաց և պտտական դիֆուզիայի գործակիցները ոսկորի մեջ։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бучаченко А. Л., Вассерман А. Л.* Стабильные радикалы. М., 1973.
2. *Лихтейнштейн Г. И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М, 1974.
3. *Манниг Дж.* Кинетика диффузии атомов в кристаллах. М., 1971.
4. *Розанцев Э. Г.* Изв. АН СССР, 2, 187, 1964.
5. *Стрюков В. Б.* ДАН СССР, 197, 641, 1968.
6. *Kalmanson A. E., Grigoryan G. L.* In: „Experimental methods in biophysical chemistry", Ed. by C. Nicolau. J. Wiley, L. Sons Inc. N. Y. L., 589, 1973.
7. *Rozantsev E. G.* Free Nitroxyl Radicals, Plenum Rress, New York—London, 1970.
8. *Stone T. J., Buckman T., Nordio P. L., McConnel H. M.* Proc. Nat. Acad. Sci. US 54, 1010, 1965.