

УДК 616.351-006-089

**О.В. Зайцева, В.И. Жуков, С.В. Перепадя, А.С. Моисеенко,
Ю.А. Винник**

**ИЗУЧЕНИЕ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ
БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И ЕЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Харьковский национальный медицинский университет (г.Харьков)

Работа является фрагментом приоритетной научно-технической темы МОЗ Украины «Розробка технології хромомодульованої радіохемотерапії іноперабельних хворих на рак шийки матки і прямої кишки» (номер держреєстрації 0104U000166 від 2008 р.).

Вступление. Биохемиллюминесцентный анализ обладает уникальными возможностями для изучения возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных процессов, структуры и свойств химических и биологических систем, благодаря чему нашел широкое применение в экспериментальной и клинической медицине [3-7]. Известно, что в биологических системах хемиллюминесценция (ХЛ) возникает при рекомбинации перекисных свободных радикалов липидов: $RO_2^* + RO_2^* \rightarrow$ возбужденный продукт \rightarrow продукт + квант хемиллюминесценции. По механизму испускания кванта света люминесцентное свечение подразделяется на флуоресценцию (кратковременное послесвечение длительностью порядка 10^{-8} с и фосфоресценцию (сравнительно длительное послесвечение от 10^{-7} с до нескольких часов). Наличие послесвечения связано с тем, что после возбуждения, т.е. поглощения атомом кванта света (или УФ-излучения), вследствие чего электрон переходит на более высокий (2) энергетический уровень ($1 \rightarrow 2$), атом не сразу переходит в основное (1) невозбужденное

состояние. Сначала происходит безызлучательный переход электрона на более низкий (3) уровень ((2→3), безызлучательная диссоциация энергии в виде тепловых колебаний), а затем уже – с этого уровня на исходный уровень (3→1) с излучением кванта света. В сложных органических молекулах такой переход (3→1) может быть маловероятен (запрещен правилами отбора). В этом случае электрон довольно долго может находиться на промежуточном (метастабильном) уровне (3). Возвращение на исходный уровень происходит только в результате предварительного перехода электрона с уровня 3 на более возбужденный уровень 4 (этот переход 3→4 осуществляется за счет энергии теплового движения молекул), а затем уже электрон с испусканием кванта света возвращается в состояние 1 (переход, разрешенный правилами отбора (4→1)). Люминесценция, происходящая по данному механизму, и называется фосфоресценцией. Метод фосфоресценции позволяет определить наличие молекулярной патологии на уровне изучения электронных возбужденных состояний молекул.

Целью работы явилось изучение динамики интенсивности фосфоресценции сыворотки крови больных колоректальным раком (КРР), обоснование прогностических критериев оценки степени тяжести заболевания, стадии развития опухолевого процесса при дифференцированном выборе метода и объема хирургического вмешательства.

Объект и методы исследования. Изучение интенсивности фосфоресценции сыворотки крови проведено у 223 больных колоректальным раком (КРР) в возрасте 42-69 лет (133 мужчины, 90 женщин). Стадии развития опухолевого процесса были подтверждены клиническими, гистологическими и лабораторно-инструментальными

методами исследования. Группу сравнения (n=23) представляли условно здоровые доноры аналогичного возраста и пола (12 мужчин, 11 женщин). В зависимости от локализации патологического процесса рак прямой кишки (РПК) выявлен у 63 пациентов (35 мужчин, 28 женщин), рак поперечно-ободочной кишки (РПОК) – у 60 (37 мужчин, 23 женщин), рак слепой кишки (РСлК) – у 48 (28 мужчин, 20 женщин) и рак сигмовидной кишки (РСигК) – у 52 (33 мужчин, 19 женщин). Первая (I) стадия опухолевого процесса определена у 6 пациентов (4 мужчин, 2 женщины); вторая (II) – у 59 (32 мужчин, 27 женщин); третья (III) – у 93 (57 мужчин, 36 женщин) и четвертая (IV) – у 65 (40 мужчин, 25 женщин).

Среди мужчин РПК I, II, III и IV стадии установлен соответственно у 4; 8; 14 и 9 пациентов; РПОК – у 0; 9; 16 и 12; РСлК – у 0; 7; 13 и 8; РСигК – у 0; 8; 14 и 11 человек.

У женщин I стадия заболевания обнаружена только при РПК (2 случая). Как и у мужчин, больных женщин с I стадией заболевания РПОК, РСлК и РСигК не было выявлено. II, III и IV стадии РПК установлены, соответственно, у 6; 13 и 7 женщин; при РПОК – у 8; 9 и 16; при РСлК – у 6; 7 и 7; при РСигК – у 7; 7 и 5.

Программа исследований предусматривала изучение спектрофлуориметрическим методом интенсивности флуоресценции сыворотки крови у больных колоректальным раком в зависимости от пола, локализации патологического процесса и стадии развития опухоли до проведения соответствующего лечения. Известно, что интенсивность ХЛ существенно возрастает при добавлении к исследуемым биологическим системам, например, солей двухвалентного железа, перекиси водорода, люминола. Для усиления интенсивности флуоресценции мы использовали люминол. На кварцевую пластину размером 5x45 мм

наносили 50 мкл люминол-содержащей сыворотки крови (10 мкл 3% раствора люминола) и помещали в термостат. При температуре 30°C нанесенные капли высушивались с образованием твердой пленки в течение 20 мин. После этого кварцевую пластину с высушенной сывороткой крови помещали в фосфороскоп [1] биохемиллюминметра ХЛМЦ-01 и измеряли интенсивность фосфоресценции (I_{ϕ}) в зависимости от длины волны ($\lambda_{\text{в}}$) возбуждающего света $I_{\phi}=f(\lambda_{\text{в}})$, т.е. спектр возбуждения. Источником возбуждающего света служила ртутная лампа ДРК-120, с помощью монохроматора ДМР-4 выделялись следующие длины волн $\lambda_{\text{в}}= 297; 313; 334; 365; 404$ и 434нм . Поглощенная сывороткой крови энергия затем излучалась в виде квантов света (фосфоресценции), что и регистрировалось с помощью фотоэлектронного умножителя ФЭУ-130 в режиме счета фотонов счетчиком СБС-2. Все процессы измерения были автоматизированы, погрешность не превышала во всех случаях 3%. Результаты исследования обрабатывались методами вариационной статистики с оценкой достоверности различий по Стьюденту-Фишеру.

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты исследования интенсивности люминол-усиленной фосфоресценции сыворотки крови больных КРР и условно здоровых пациентов при различных длинах волн возбуждающего света в зависимости от пола представлены в табл. 1.

Таблица 1

Интенсивность люминол-усиленной фосфоресценции сыворотки крови больных КРР и условно-здоровых пациентов в зависимости от пола

Длина волны возбуждающего света, $\lambda_{\text{в}}$ (нм)	Интенсивность фосфоресценции (I_{ϕ} , имп/с) $M \pm m$	
	Больные КРР	Условно здоровые (референтная группа)

	Муж(n=133)	Жен. (n=90)	Муж(n=12)	Жен. (n=11)
297	5884,6±297,2*	6403,5±348,3*	3156,7±128,4	3263,5±145,7
313	405,8±32,6*	396,7*±41,5*	308,4±22,5	327,2±16,8
334	846,3±28,8*	815,9±38,4*	640,3±47,8	667,5±31,4
365	2996,4±123,8*	2893,7±158,6*	1786,5±61,7	1734,6±56,8
404	1873,5±67,4*	1946,4±73,5*	497,3±36,5	513,4±42,3
434	1734,8±79,2*	1846,5±63,7*	582,6±28,4	604,7±33,5

Примечание: * – различия с группой «условно здоровые» достоверные, $p < 0,05$.

Установлено, что при длинах волн возбуждающего света $\lambda_b=297$ нм (УФ-диапазон); $\lambda_b=404$ нм и 434 нм (видимый свет) интенсивность флуоресценции сыворотки крови как у мужчин, так и у женщин была наиболее высокой. Превышение ее значений по сравнению с условно здоровыми составило 86,4% и 96,2% соответственно при $\lambda_b=297$ нм; 276,9% и 279,1% – при $\lambda_b=404$ нм; 197,7% и 205,3% – при $\lambda_b=434$ нм (рис.).

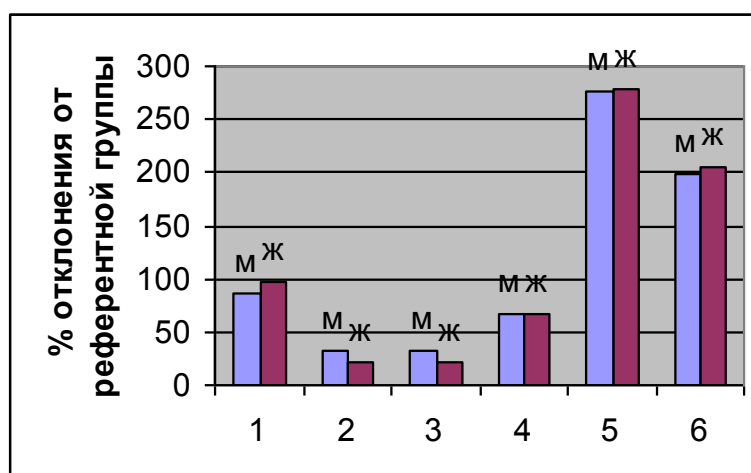


Рис. Отклонение (%) значений интенсивности флуоресценции сыворотки крови больных КРР от референтной группы при разных длинах волн возбуждающего света (λ_b): 1 – 297 нм; 2 – 313 нм; 3 – 334 нм; 4 – 365 нм; 5 – 404 нм; 6 – 434 нм; м – мужчины; ж – женщины.

При длине волны возбуждающего света $\lambda_{\text{в}}=313\text{нм}$ наблюдалось усиление интенсивности фосфоресценции на 31,5% и 21,2%, а при $\lambda_{\text{в}}=334\text{нм}$ – на 32,2% и 22,2% соответственно у мужчин и женщин. Интенсивность фосфоресценции в области спектральной полосы возбуждения $\lambda_{\text{в}}=365\text{нм}$ повышалась у мужчин на 67,7% и у женщин – на 66,8%. Достоверных различий между значениями интенсивности фосфоресценции сыворотки крови у мужчин и женщин не выявлено при всех спектральных линиях возбуждения.

Анализ динамики излучательной способности сыворотки крови показал, что в данной сложной исследуемой многокомпонентной системе содержатся реакционно-способные молекулы, имеющие высокие уровни электронных возбужденных состояний, обусловленных неспаренными электронами, находящимися в триплетном положении. Эти данные свидетельствуют о том, что у больных при канцерогенезе толстого кишечника происходит глубокая внутримолекулярная перестройка, изменение конформации макромолекул и межмолекулярных взаимодействий, которые сопряжены с накоплением в сыворотке крови большого большого числа молекул, находящихся в триплетном возбужденном состоянии. Появление высоких значений интенсивности фосфоресценции сыворотки крови в ультрафиолетовой и видимой областях света указывает на чувствительности к данным длинам волн возбуждающего света и свидетельствует об изменении конформационных свойств белковых молекул в сыворотке крови, связанных с их окислительной модификацией и развитием мембранной патологии [5].

Исследование интенсивности фосфоресценции у больных КРР в зависимости от локализации опухолевого процесса обнаружило

аналогичные изменения во всех группах больных без учета различий по полу (табл. 2).

Таблица 2

**Интенсивность люминол-усиленной флуоресценции
сыворотки крови больных КРР и условно здоровых пациентов в
зависимости от локализации опухолевого процесса**

Длина волны возбужда- ющего света, $\lambda_{\text{в}}$ (нм)	Интенсивность флуоресценции ($I_{\text{ф}}$, имп/с) $M \pm m$				
	Больные КРР (n=223)				Условно здоровые (n=23)
	РПК (n=63)	РПОК (n=60)	РСлК (n=48)	РСигК (n=52)	
297	6253,4±387,5*	6673,2±318,7*	5997,8±364,5*	6731,4±356,7*	3210,7±137,5
313	410,6±73,8*	465,7±54,3*	437,6±65,7*	483,5±76,8*	317,8±19,6
334	825,7±59,3*	846,2±45,8*	807,4±53,6*	796,3±68,4*	653,9±39,6
365	2945,3±178,4*	2835,4±126,3*	3014,5±186,3*	2868,7±154,3*	1760,5±59,2
404	1916,2±128,6*	1876,7±105,4*	1894,3±145,8*	1812,4±133,6*	505,3±39,4
434	1784,6±132,5*	1843,6±98,5*	1826,4±103,7*	1938,6±145,2*	593,6±30,9

Примечание: * – различия с группой «условно здоровые» достоверные, $p < 0,05$.

Наиболее высокие уровни интенсивности флуоресценции наблюдались при $\lambda_{\text{в}}=297\text{нм}$. Флуоресценция сыворотки крови при этом повышалась на 94,7%; 107,8%; 86,8% и 109,6%, соответственно у больных РПК, РПОК, РСлК и РСигК. Интенсивность флуоресценции сыворотки крови при $\lambda_{\text{в}}=404\text{нм}$ увеличивалась на 279,2%; 271,4%; 274,8% и 258,6% соответственно. В меньшей мере наблюдались различия в уровнях флуоресценции при длинах волн возбуждения $\lambda_{\text{в}}=313\text{нм}$, 334нм и 365нм. Так, при $\lambda_{\text{в}}=313\text{нм}$ интенсивность флуоресценции повышалась на 29,2%;

46,2%; 37,6% и 52,1%; при $\lambda_b=334\text{нм}$ – на 26,2%; 29,4%; 23,4% и 21,7%; при $\lambda_b=365\text{нм}$ – на 67,2%; 61%; 71,2% и 62,9% соответственно у больных РПК, РПОК, РСЛК и РСигК.

Исследование уровней интенсивности флуоресценции сыворотки крови больных при различных стадиях КРР выявило высокую ее информативность в спектральных областях возбуждения $\lambda_b=297\text{нм}$; 404нм и 434нм и показывает прямую корреляционную зависимость между степенью тяжести заболевания и интенсивностью флуоресценции сыворотки крови у больных раком толстого кишечника (табл. 3).

Таблица 3

Интенсивность люминол-усиленной флуоресценции сыворотки крови больных КРР и условно здоровых пациентов в зависимости от стадии развития колоректального рака

Длина волны возбуждающего света, λ_b (нм)	Интенсивность флуоресценции (I_f , имп/с) $M \pm m$				
	Стадия КРР, (n)				Условно здоровые (n=23)
	I-стадия (n=6)	II-стадия (n=59)	III-стадия (n=93)	IV-стадия (n=65)	
297	5706,3±127,5*	6157,8±104,5*	6508,3±118,6*	6837,4±162,7*	3210,7±137,5
313	394,8±23,6*	415,6±32,7*	488,9±42,7*	520,6±43,8*	317,8±19,6
334	762,5±33,8*	794,3±26,5*	825,6±53,2*	863,7±29,4*	653,9±39,6
365	2796,8±75,3*	2837,6±83,4*	2925,8±77,4*	3097,6±105,8*	1760,5±59,2
404	1754,6±56,3*	1814,3±76,8*	1897,2±83,6*	1972,4±63,5*	505,3±39,4
434	1710,3±64,5*	1794,8±73,6*	1923,8±105,4*	1986,7±84,3*	593,6±30,9

Примечание: * – различия с группой «условно здоровые» достоверные, $p < 0,05$.

Коэффициент корреляции во всех случаях был больше 0,87.

Уровни интенсивности флуоресценции сыворотки крови в условиях возбуждения монохроматическим светом длиной волны $\lambda_{\text{в}}=297\text{нм}$ повышались на 77,7%; 91,7%; 102,3% и 112,9%; при $\lambda_{\text{в}}=313\text{нм}$ – на 24,2%; 30,7%; 53,8% и 63,8; при $\lambda_{\text{в}}=334\text{нм}$ – на 16,6%; 21,4%; 26,2% и 32%; при $\lambda_{\text{в}}=365\text{нм}$ – на 58,8%; 61,2%; 66,2% и 75,9%; при $\lambda_{\text{в}}=404\text{нм}$ – на 247,2%; 259,5%; 275,4% и 290,3%; при $\lambda_{\text{в}}=434\text{нм}$ – на 188,1%; 102,3%; 224,1% и 234,6%. При длинах волн возбуждающего света $\lambda_{\text{в}}=404\text{ нм}$ и 434 нм отмечалось увеличение интенсивности флуоресценции более чем на 200% при всех стадиях (I-IV) КРР. Существенным было и повышение уровней флуоресценции при длине волны возбуждения 297нм .

Исследования показывают, что появление в длинноволновой области спектра возбуждения значительного количества молекул в триплетном состоянии может свидетельствовать о разобщении окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания, ингибировании процессов биоэнергетики, которые сопровождаются рассеиванием тепловой энергии и снижением продукции АТФ у больных КРР. Наличие высоких энергетических уровней возбужденных электронных состояний, обусловленных присутствием неспаренных электронов в активной молекуле, указывает на изменение реакционной способности и конформационных свойств белков, нуклеиновых кислот и других биологически активных молекул [2]. Известно, что фотоны ультрафиолетового спектра поглощаются, в основном, ароматическими аминокислотами (тирозин – $\lambda_{\text{погл}}=280\text{нм}$, триптофан – $\lambda_{\text{погл}}=220\text{нм}$), белки ($\lambda_{\text{погл}}=280\text{-}300\text{нм}$), нуклеиновыми кислотами и нуклеотидами ($\lambda_{\text{погл}}=260\text{нм}$), которые содержатся в сыворотке крови [3,7]. Анализ исследования позволяет судить о том, что у больных КРР отмечаются глубокие структурно-метаболические, реакционно-способные и

конформационные изменения со стороны крупных полимерных молекул и их мономерных компонентов. Усиление интенсивности флуоресценции в длинноволновой области ($\lambda_{\text{в}}=404\text{нм}, 434\text{нм}$) может указывать на повышение в сыворотке крови уровня внеэритроцитарного гемоглобина и содержания геминов как результат развития у больных КРР свободно-радикальной - мембранной патологии.

Выводы. Исследования интенсивности флуоресценции сыворотки крови больных КРР позволили обнаружить нарушение конформационных свойств биологически важных молекул, появление значительного количества электронно-возбужденных молекул, способных активировать свободно радикальные процессы и разобщать окислительное фосфорилирование и тканевое дыхание, которые в совокупности формируют энергетический голод, тканевую гипоксию и мембранную патологию, являющуюся патогенетическим фактором развития канцерогенеза толстого кишечника. Уровни интенсивности люминесценции сыворотки крови больных КРР являются прогностически значимым показателем в диагностике степени тяжести заболевания и определении объема хирургического вмешательства. Наиболее информативными являются длины волн возбуждающего света $\lambda_{\text{в}}=297\text{нм}; 404\text{нм}$ и 434нм , именно на них проявляется высокая чувствительность аминокислот, белков, нуклеотидов, нуклеиновых кислот к действию ультрафиолетового и видимого света. Наличие высоких уровней интенсивности флуоресценции при I стадии развития КРР указывает на уже существующее достаточно длительное и вялотекущее заболевание, которое сопровождается формированием молекулярной патологии и требует не только оперативной, но и патогенетической метаболической коррекции.

Перспективы дальнейших исследований. Предполагается

провести флуоресцентный анализ сыворотки крови больных колоректальным раком для оценки структурно-функционального состояния плазматических мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абашин В.М. Устройство для регистрации при комнатной температуре люминесценции биологических мембран / В.М. Абашин, Н.Г. Сергиенко, В.И. Жуков [и др] // Патент №4946578/25 UA, Бюл. №8.опубл. 20.03.95.
2. Жуков В.И. Оксидантно-антиоксидантные взаимодействия и структурно-функциональное состояние плазматических мембран у больных раком прямой кишки / В.И. Жуков, С.В. Перепадя, Ю.А. Винник [и др] // Вісник проблем біології і медицини. – 2010. – Вип.1. – С. 116-120.
3. Журавлев А.И. Спонтанная биохемилюминесценция животных тканей / А.И. Журавлев. – Москва: Наука, 1983. – С. 3-30.
4. Зайцева О.В. Состояние свободно-радикальных процессов, перекисного окисления липидов и белков при псориазе / О.В. Зайцева, Н.В. Жукова, Е.А. Броше // Эксперим. і клін. медицина. – 2002, №4 – С. 86-89.
5. Зайцева О.В. Структурно-функциональное состояние цитоплазматических мембран при субхроническом токсическом воздействии на организм теплокровных животных оксиэтилированного ксилита Л-655-2-100 / О.В. Зайцева, В.А. Телегин, В.И. Жуков [и др.] // Эксперим. і клін. медицина. – 2007, №3. – С. 63-68.
6. Перцева Н.Г. Значение метода биохемилюминесценции в педиатрии (обзор) / Н.Г. Перцева, В.И. Зверева // Вопросы охраны материнства. –

1992. – №5. – С. 43-48.

7. Серкиз Я.И. Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии / Я.И. Серкиз, Е.Е. Чеботарев, В.А. Барабой [и др.] // Киев: Наукова думка, 1984. – 293 с.

УДК 616.351-006-089

ВИВЧЕННЯ ФОСФОРЕСЦЕНЦІЇ СИРОВАТКИ КРОВІ ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК ТА ЇЇ ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Зайцева О.В., Жуков В.І., Перепада С.В., Моїсеєнко А.С., Вінник Ю.О.

Резюме. Проведено дослідження люмінол-підсиленої фосфоресценції сироватки крові хворих (n=223) на колоректальний рак (КРР) в залежності від локалізації, стадії (I-IV) розвитку пухлинного процесу, статі. Встановлено порушення конформаційних властивостей біологічно важливих молекул, появу значної кількості електронно-збуджених молекул, які можуть активувати вільнорадикальні процеси та десинхронізувати окислювальне фосфорилування й тканинне дихання, що у сукупності формує енергетичний голод, тканинну гіпоксію та мембранну патологію. Рівні інтенсивності люмінол-підсиленої фосфоресценції сироватки крові хворих на КРР розглядаються як прогностично сприятливі показники в діагностиці ступеня важкості захворювання і визначенні об'єму хірургічного втручання. Високі рівні інтенсивності при I стадії розвитку КРР свідчать про вже існуюче достатньо тривале и в'яло текуче захворювання.

Ключові слова: колоректальний рак, фосфоресценція, сироватка крові.

UDC 616.351-006-089

**INVESTIGATION OF PHOSPHORESCENCE OF BLOOD SERUM
IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER AND ITS DIAGNOSTIC
SIGNIFICANCE**

**Zaytseva O.V., Zhukov V.I., Perepadya S.V., Moiseenko A.S., Vinnik
Yu.A.**

Summary. In patients (n=223) receiving colorectal cancer (CRC) it was investigated luminal-intensified phosphorescence of blood serum in dependence on localization of the process, stage (I-IV) of illness, sex. It is determined breach of conformatic properties of biologically significance molecules, appearance of the large quantity of electric excited molecules, which can activate free radical processes and desynchronize oxidizing phosphorylation and tissue respiration, in total it forms energetic dearth, tissue hypoxia and membrane pathology. Luminol-intensified phosphorescence intensity levels of blood serum in patients with CRC can be prognostic favorable indices in diagnosis of disease severity and in determination of surgical intervention size. High levels of intensity at CRC of the 1-st stage testify to existence of the sufficiently long-lasting and inactive disease.

Key words: colorectal cancer, phosphorescence, blood serum.

УДК 616.351-006-089

**ИЗУЧЕНИЕ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ
БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ И ЕЕ
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

**Зайцева О.В., Жуков В.И., Перепадя С.В., Моисеенко А.С.,
Винник Ю.А.**

Реферат. Проведено исследование люминол-усиленной фосфоресценции сыворотки крови больных (n=223) колоректальным раком

(КРР) в зависимости от локализации, стадии (I-IV) развития опухолевого процесса, пола. Установлено нарушение конформационных свойств биологически важных молекул, появление значительного количества электронно-возбужденных молекул, которые могут активировать свободнорадикальные процессы и десинхронизировать окислительное фосфорилирование и тканевое дыхание, что в совокупности формирует энергетический голод, тканевую гипоксию и мембранную патологию. Уровни интенсивности люминол-усиленной флуоресценции сыворотки крови больных КРР рассматриваются как прогностически значимые показатели в диагностике степени тяжести заболевания и определении объема хирургического вмешательства. Высокие уровни интенсивности при I стадии развития КРР свидетельствуют об уже существующем достаточно продолжительном и вяло текущем заболевании.

Ключевые слова: колоректальный рак, флуоресценция, сыворотка крови.