

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.3

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ІНІЦІЙОВАНОЇ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ СИРОВАТКИ КРОВІ

З.Ю. Готра, І.Я. Олійник

Національний університет "Львівська політехніка", вул. С. Бандери 12., Львів 79013, Україна
Надійшла до редакції 10 грудня 2005 року

Дана робота присвячена дослідженню кінетичних закономірностей ініційованої хемілюмінесценції (ІХЛ) при онкологічних захворюваннях, туберкульозі та саркоїдозі. Зокрема в роботі проведений комплексний аналіз максимального спалаху інтенсивності та інтегральної світлосуми при різних стадіях захворювання. Встановлено зменшення інтенсивності максимального спалаху в порівнянні з нормою при онкозахворюваннях до III ст. включно та збільшення при IV ст. захворювання. Інтегральна світлосума була переважно нижчою за норму. При туберкульозі та саркоїдозі спостерігалось беззаперечне збільшення цих

показників. З аналізу кінетики випливає необхідність випрямлення кривих в координатах $\left(t, \ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{\text{стан}}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{\text{стан}}}} \right)$.

Експеримент це підтвердив. Тангенс кута нахилу при усіх захворюваннях відрізнявся. Зокрема встановлено його суттєве збільшення при онкозахворюваннях. Отримані дані поясненні відмінностями у кількості центрів реакції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хемілюмінесценція, сироватка крові, кінетика

Ініційована хемілюмінесценція (ІХЛ) вже тривалий час використовується в діагностичних цілях, але нажаль при дослідженні ІХЛ увагу переважно звертають на максимальну інтенсивність та інтегральну площу під графіком кінетики [1]. Без уваги залишається сама кінетика. Тому в даній роботі ми постаралися зробити аналіз кінетичних кривих при таких захворюваннях як онкологічні, туберкульоз та саркоїдоз не лише з точки зору величин що знімаються безпосередньо в експерименті, а й фізично оцінюючи кінетику процесу.

Теоретичний аналіз кінетичних кривих

Хемілюмінесцентні методи визначення констант швидкостей в елементарних актах хімічних реакцій у рідинах були розроблені в Інституті хімічної фізики АН СРСР [2].

За рахунок того, що найбільший внесок в процес ХЛ вносить рекомбінація перекисних радикалів інтенсивність свічення пропорційна швидкості їх рекомбінації:

$$I = \eta k_6 [RO_2^*]^2, \quad (1)$$

де η -- квантовий вихід ХЛ.

k_6 -- швидкість рекомбінації перекисних радикалів

$[RO_2^*]$ -- концентрація перекисних радикалів

Розглянемо теорію даного методу, модифіковану для нашого випадку, а саме, коли досліджувався перехід системи СК + фосфатний буфер + $FeSO_4 + H_2O_2$ після збудження перекисом водню з збудженого (критичного) стану у стаціонарний стан.

В нестационарному режимі

$$- \frac{d[RO_2^*]}{dt} = w_i - k_6 [RO_2^*]^2 \quad (2)$$

де w_i - швидкість ініціювання ланцюга окиснення

t - момент часу

Інтегрування даного рівняння та після врахування, що в стаціонарному режимі $\frac{d[RO_2^*]}{dt} = 0$, та

$$\frac{I_{\text{стан}}}{I} = \frac{[RO_2^*]_{\text{стан}}^2}{[RO_2^*]^2}, \text{ в кінцевому результаті отримаємо}$$

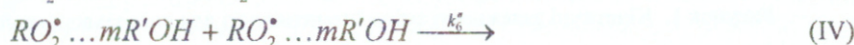
Дослідження кінетики ініційованої хемілюмінесценції ...

$$\ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{\text{стац}}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{\text{стац}}}} = 2t \sqrt{w_i k_6} \quad (3)$$

де t - час з моменту введення перекису водню; I - величина інтенсивності свічення в момент часу t ; $I_{\text{стац}}$ - інтенсивність свічення в момент часу, коли інтенсивність стає стаціонарною (при $t = 60$ с). Тобто

в координатах $\left(t, \ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{\text{стац}}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{\text{стац}}}} \right)$ має відбуватися випрямлення кінетики ініційованої ХЛ. Слід

зауважити, що СК є складною системою з великою кількістю процесів, що призводять до свічення. Тому розглянемо випадок, коли процес окислення органічної речовини RH відбувається в розчиннику $R'OH$, що гідратує радикали RO_2^* . Тоді можна записати наступну схему:



В такій системі встановлюється рівновага між гідратованими та негідратованими радикалами і обрив ланцюга відбувається по трьом паралельним реакціям з участю як гідратованих, так і негідратованих радикалів. Продукти реакції по всім трьом реакціям будуть одні й ті самі [3] спирт, кетони, O_2 і деяка кількість молекул розчинника в залежності від типу реакції обриву ланцюга. Оскільки рівновага між усіма формами радикалів встановлюється достатньо швидко [4] можна вважати, що кожній даній концентрації розчинника відповідає строго визначене співвідношення концентрацій RO_2^* та $RO_2^* \dots mR'OH$.

Вираз для загальної швидкості обриву ланцюга в такій системі можна записати у вигляді:

$$\alpha' = k_6 [RO_2^*]^2 + k_6' [RO_2^*] [RO_2^* \dots mRO'OH] + k_6'' [RO_2^* \dots mRO'OH]^2, \quad (4)$$

враховуючи

$$[RO_2^* \dots mRO'OH] = K_1 [RO_2^*] [R'OH]^m, \quad (5)$$

отримаємо

$$\alpha = k_6 + k_6' K_1 [R'OH]^m + k_6'' K_1^2 [R'OH]^{2m} \quad (6)$$

В даному випадку коли в системі присутній кілька сортів перекисних радикалів отримаємо

$$I = \eta \delta \alpha [RO_2^*]^2 \quad (7)$$

Де коефіцієнт δ враховує співвідношення виходів свічення у трьох реакціях рекомбінації.

Так як співвідношення $[RO_2^*] / [RO_2^* \dots mRO'OH]$ при даній концентрації середовища в якому відбуваються реакції не змінюється на протязі досліду, то величина δ при цих умовах є постійною.

Це показує, що і в цьому випадку у вказаних координатах має відбуватися спрямлення, але швидкість рекомбінації тоді є узагальненою. Наділі ми будемо просто записувати її k_6 маючи на увазі під нею саме узагальнену енергію активації. Це дозволить нам дослідити кінетику процесу.

Для реєстрації ХЛ протягом 5 хвилин прогрівали установку БХЛ - 06 і встановлювали необхідний температурний режим в кюветному блоці, після чого вимірювали фон установки з пустою кюветою. Об'єктом дослідження служила сироватка крові (СК) хворих та здорових людей. Кров брали з ліктьової вени в кількості 6-8 мл натще в стерильні пробірки, які потім центрифугували при 2000 об/хв протягом 15 хв. Виміри проводилися протягом перших 3 годин після взяття крові. В вимірювальну кювету вносилося 0,1 мл СК, 0,4 мл розчину сульфату заліза (0,01 мМ), 0,4 фосфатного буфера та 0,1 H_2O_2 . після чого протягом 60 с вимірювали кінетику загасання ІХЛ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати кінетики ініційованої ХЛ при онкозахворюваннях представлені на рисунку 1. Слід зауважити, що залежно від нозології принципових відмінностей щодо кінетичних параметрів не спостерігалось.

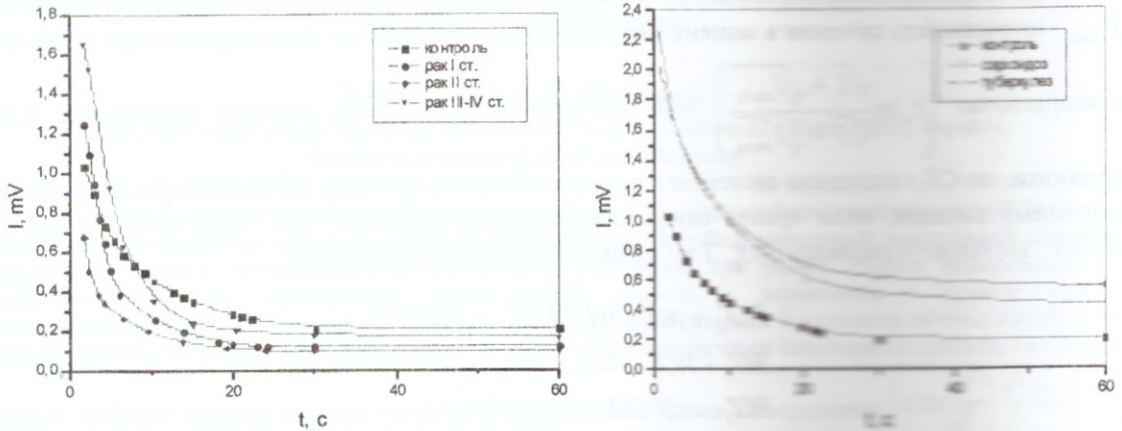


Рисунок 1. Кінетичні залежності зміни інтенсивності для онкозахворювань в порівнянні з нормою.

Кінетика ініційованої ХЛ має логарифмічний вигляд. При виході на стаціонарний рівень кінетичні криві онкозахворювань лежать усі нижче за норму. Максимальна інтенсивність є також неоднаковою. Зокрема вона є більшою за норму при онкозахворюваннях III-VI стадій та I стадії. Рівень стаціонарної ХЛ при туберкульозі та саркоїдозі лежить вище згаданого рівня норми. Зокрема слід зауважити, що спалах інтенсивності при саркоїдозі є більшим ніж при туберкульозі, але вже на 2 с інтенсивність ІХЛ СК хворих саркоїдозом є меншою від ІХЛ СК хворих на туберкульоз. Після 60 с інтенсивність ХЛ фактично незмінюється.

Аналіз графічних результатів проводився по двом величинам: I_{\max} – максимальна інтенсивність свічення, яка спостерігалась на 0,6-1 с, S – інтегральна світлосума (площа під графіком ХЛ протягом 60 с), яка відображає сумарну інтенсивність ПОЛ за цей час. Результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Інтенсивність піку ХЛ, інтегральної площі, та їхнього добутку в залежності від захворювання

	Кількість осіб	I_{\max} , mV	S , (mV)c	ϕ , (mV) ² c
Контроль	77	1,032	21,841	22,540
Рак I ст.	30	1,246	13,098	16,320
Рак II ст.	19	0,667	11,633	7,759
Рак III-IV ст.	14	1,654	17,852	29,528
Туберкульоз	46	2,235	36,000	80,460
Саркоїдоз	10	1,997	46,744	93,347

З таблиці видно достовірне збільшення піку інтенсивності ХЛ при туберкульозі та саркоїдозі в порівнянні з нормою. Крім того спостерігається зменшення цього показника при II ст. онкозахворювань. Інтенсивність при I ст. та III-IV ст. слабо збільшена.

Тобто ми можемо констатувати, що дані експериментів за критерієм I_{\max} показали явні відмінності між контролем та II ст. онкозахворювань, а також достовірне збільшення I_{\max} відносно норми при туберкульозі та саркоїдозі. Деяке збільшення I_{\max} спостерігалось на початковій та кінцевій стадіях раку.

Відмічається значна відмінність між патологіями по показнику S . Встановлено зниження світлосуми індукованої ХЛ відносно контролю при онкозахворюваннях, але присутня деяка схожість між контролем та раком III-IV ст. при туберкульозі та саркоїдозі знову спостерігається підвищення.

Для виділення більш суттєвих закономірностей вводився узагальнений параметр ϕ . Цей коефіцієнт дорівнював добутку інтегральної світлосуми на максимальну інтенсивність. Результати аналізу представлені в таблиці 1.

По параметру ϕ дуже добре прослідковуються статистично достовірні відмінності між стадіями онкохворих, а також між туберкульозом та саркоїдозом.

Дослідження кінетики ініційованої хемілюмінесценції ...

Результати логарифмування при усіх патологіях дали подібний результат.

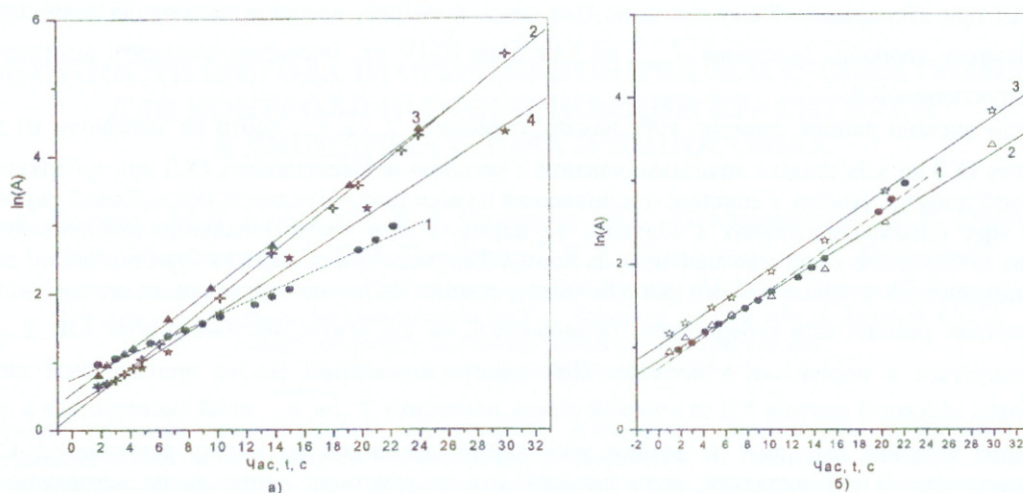


Рисунок 2. Залежність $\ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{стац}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{стац}}}$ від часу для СК онкологічних хворих в порівнянні з нормою

- а) 1-контрольна група, 2-1 ст. онкозахворювань, 3-II ст. онкозахворювань, 4-III-IV ст. онкозахворювань
 б) 1-контрольна група, 2-саркоїдоз, 3- туберкульоз

Виявлено, що отримані експериментально ХЛ криві дійсно спрямляються в координатах $\left(t, \ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{стац}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{стац}}} \right)$. Злами у графіків відсутні..

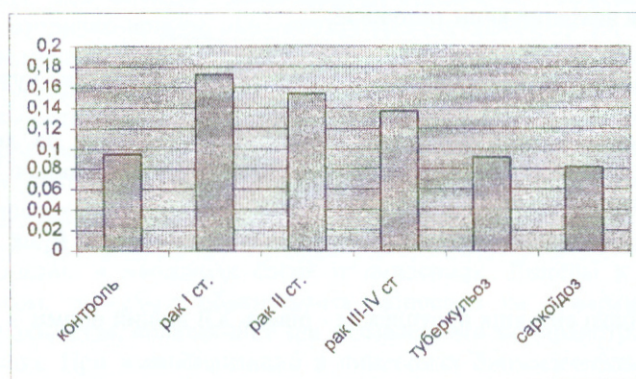


Рисунок3. Залежність тангенсу кута нахилу від патології

Для аналізу отриманих результатів звернемо нашу увагу на хімічні процеси, що протікають при цих захворюваннях. Інтенсивність ХЛ прямо пропорційна квадрату концентрації гідроперексидів. Тому відмінності в кінетиці ХЛ при захворюваннях обумовлюється кількісними змінами в ланцюгу ПОЛ. Загальну схему ПОЛ можна відобразити наступним чином: ліпіди \rightarrow дієнові кон'югати (ДК) \rightarrow гідроперекиси ліпідів \rightarrow малонові альдегіди. При всіх патологіях, які були досліджені вище, по літературних даних спостерігаються різні зміни первинних і вторинних продуктів ПОЛ і антирадикальної активності (АРА).

Так відмінності параметра S ХЛ, при захворюваннях на саркоїдоз і туберкульоз, можна пояснити більш сильним збільшенням кількості ДК, відносно нормального стану, при першому захворюванні [5]. Вищий пік ХЛ при туберкульозі, можливо, відображає зменшення вмісту фракції фосfolіпідів, як відносно нормального стану, так і відносно саркоїдоза [6,7]. ХЛ доказує різноплановий патогенез цих захворювань.

Суттєві відмінності в процесах ПОЛ існують і при онкопатологіях. Існують дані про зменшення сумарної пероксидазної активності (СПА) при початкових стадіях онкозахворювань [8]. СПА зменшується при збільшенні об'єму пухлини. Цей факт, ймовірно, пояснює зменшення величини S в процесі розвитку хвороби. Зростання I_{\max} на I ст. і на III-IV ст., очевидно, залежить від первинних процесів індукування ХЛ.

Як було вказано раніше, тангенс кута нахилу становить $2\sqrt{w_i k_6}$, тобто не залежачи на те, що інтенсивність ІХЛ на всіх стадіях онкозахворювань є меншою за інтенсивність ІХЛ при туберкульозі та саркоїдозі цей добуток (корінь з швидкості ініціювання на константу швидкості рекомбінації перекисних радикалів) при онкозахворюваннях є більшим за норму, а при таких запальних захворюваннях як туберкульоз та саркоїдоз несуттєво меншими за норму. Такі відмінності можуть бути пояснені лише за рахунок відмінностей у кількості центрів хімічних реакцій. Тобто не залежачи на велику кількість центрів хімічних реакцій при туберкульозі та саркоїдозі, на що вказує високий рівень ХЛ, $2\sqrt{w_i k_6}$ слабо зменшується в порівнянні з нормою. При онкозахворюваннях мисмо протилежний випадок: низький рівень кількості центрів ХЛ та високий рівень показника $2\sqrt{w_i k_6}$, який зменшується в процесі прогресування хвороби, але так і не досягає рівня норми, що вказує на високу реакційність СК при онкозахворюваннях. В тих випадках, коли переважають деструктивні зміни, як це переважно є при туберкульозі, саркоїдозі та онкозахворюваннях останньої стадії показник зменшується. Це може бути викликано попаданням в кров, із тканин, продуктів некроза пригнічуючих світлення.

ВИСНОВКИ

Не зважаючи на подібність кінетики ініційованої ХЛ при різних патологічних процесах таких як онкологічні захворювання, туберкульоз, саркоїдоз аналіз призводить до висновків різноплановості протікання цих захворювань. При дослідженнях виявлені відмінності у збільшенні піку інтенсивності ХЛ при туберкульозі та саркоїдозі в порівнянні з нормою. Крім того спостерігається зменшення цього показника при II ст. онкозахворювань. Інтенсивність при I ст. та III-IV ст. слабо збільшена. Відмічається значна відмінність між патологіями по показнику S . Встановлено зменшення світлосуми індукованої ХЛ відносно контролю при онкозахворюваннях, але присутня певна схожість між контролем та раком III-IV ст. при туберкульозі та саркоїдозі знову спостерігається підвищення. Виведений узагальнюючий параметр ϕ , що дорівнював добутку інтегральної світлосуми на максимальну інтенсивність, дозволяє провести більш детальне дослідження вказаних вище патологій.

Кінетичні криві спрямляються в координатах $\left(t, \ln \frac{\sqrt{I} + \sqrt{I_{\max}}}{\sqrt{I} - \sqrt{I_{\max}}} \right)$, тангенс кута спрямлення при усіх

патологіях є різним. Пояснення отриманих результатів можливе лише за комплексного розгляду біохімічних відмінностей складу СК при цих патологіях. Основні узагальнюючі закономірності можна представити у наступних твердженнях:

- при онкопатологіях, незважаючи на низький рівень ХЛ показник $2\sqrt{w_i k_6}$ є вищим в порівнянні з нормою
- при туберкульозі та саркоїдозі ситуація протилежна - рівень ХЛ вищий норми, а $2\sqrt{w_i k_6}$ фактично не змінюється.

Ми пояснюємо це різною кількістю центрів хімічних реакцій. Зокрема при онкопатологіях їх має бути значно менше в досліджуваній пробі ніж при нормі, туберкульозі та саркоїдозі, та навпаки - при саркоїдозі та туберкульозі кількість центрів хімічної реакції окиснення має бути значно більшою.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андрусик І.Я. Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона: Междисциплинарный сборник научных работ. - Донецк: Дон УНУ. 2002. - Вып 1. С. 193-197.
2. Шляпингох В.А. и др. Хемилюминесцентные методы исследования медленных окислительных реакций. М.: Наука, 1966.
3. Russel G.A. // J. Am. Chem. Soc. - 1965. - V. 79. - P. 2737.
4. Заиков Г.И., Майзус З.К., Эмануель Н.М. // Нефтехимия. - 1968. - Т. 8. - С.207.
5. Костина З.И., Котенко Т.В., Обросова Т.И. // Пробл. туб. - 1988. - №7. - С.23-25.
6. Гуревич Г.Л. Значение исследования показателей обмена липидов у больных с впервые выявленным туберкулезом легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Минск, 1982. - 11с.
7. Маланюк В.И., Максимова А.В.// Пробл. туб. - 1980. - №11. - С.42-45.
8. Розенко Л.Я., Сидоренко Ю.С., Франциянц Е.М. // Вопросы онкологии. - 1989. - Т. 45, №5. - С.534-541.