

© А.В. БЕЛКИН

*Тюменский государственный университет
alexbel2@mail.ru*

УДК 612.111:616-006

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
КРОВИ ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ,
И ЕГО ИНТЕГРАЦИЯ В РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВИ**

**FLUORESCENT SPECTRAL BLOOD ANALYSIS
OF WOMEN WITH BREAST CANCER AND ITS INTEGRATION
INTO THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BLOOD**

АННОТАЦИЯ. Проведен флуоресцентный спектральный анализ крови женщин, больных раком молочной железы, и его интеграция в реологические характеристики крови. Показано, что у людей с раком молочной железы, прошедших курс лечения (III клиническая группа), спектр свечения, при котором наблюдается максимум интенсивности свечения флуоресцеин-зависимой флуоресценции, соответствует параметрам свечения крови здоровых людей. Проведена оценка деформальности и агрегационной способности эритроцитов крови здоровых людей и больных раком молочной железы. Показано снижение значений деформальности и агрегационной способности эритроцитов при раке молочной железы, в сравнении с деформальностью и агрегационной способностью здоровых людей. Выявлена положительная корреляция между уровнем флуоресценции и деформальности, флуоресценции и агрегационной способности эритроцитов.

SUMMARY. The article dwells upon the results of fluorescent spectral blood analysis of women with breast cancer and its integration into the rheological properties of blood. The authors claim that women with breast cancer after receiving treatment (III clinical group) demonstrate the emission spectrum with a maximum of emission intensity of fluorescein-dependent fluorescence emission corresponding to blood parameters of healthy people. Deformability and aggregation ability of red blood cells of healthy people and patients with breast cancer have been evaluated. It is proved that patients with breast cancer have lower values of deformability and aggregation ability of erythrocytes in comparison with deformability and aggregation ability of healthy people. A positive correlation between the level of fluorescence and deformability, fluorescence and erythrocyte aggregation has been revealed.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. Флуоресценция, деформальность эритроцитов, агрегация, онкопатология.

KEY WORDS. Fluorescence, deformability, erythrocyte aggregation, oncopathology.

Метод флуоресцентного спектрального анализа (ФСА) является одним из наиболее чувствительных и используется для выявления изменений в клетках на молекулярном уровне [1]. Основное достоинство ФСА по сравнению с другими видами спектрального анализа в том, что анализу могут быть подвергнуты относительно не стойкие соединения, которые разрушались бы при электрическом разряде или нагревании в пламени; интенсивность излучения значительно выше, чем у комбинационных спектров; требуются значительно меньшие количества (концентрации) вещества, чем для абсорбционной спектроскопии; и, наконец, исследуемые вещества могут быть непрозрачными [2]. Активация свободнорадикальных процессов обуславливает нарушения гемореологических свойств, реализуемых через повреждения циркулирующих эритроцитов (окисление мембранных липидов, повышение жесткости билипидного слоя, гликолизирование и агрегация белков мембраны), оказывая опосредованное влияние на другие показатели кислородтранспортной функции крови и транспорт кислорода в ткани [3]. Изучение биологических структур, обладающих собственной или индуцированной флуоресценцией, основанной на различиях в характеристиках свечения тканей в зависимости от физиологического состояния организма, является актуальной задачей, так как позволяет диагностировать данные состояния [4].

Целью настоящей работы была оценка флуоресцеин-зависимой флуоресценции цельной крови женщин в норме и при раке молочной железы, а также ее взаимосвязь с деформабильностью эритроцитов. Для сравнения были проведены измерения уровня флуоресценции крови здоровых людей и крови женщин с раком молочной железы. Для определения истинного содержания интересующих нас макромолекул (белки: например, альбумин) в крови необходимо использовать активаторы флуоресценции. Флуоресцеин является неспецифическим активатором, следовательно, при регистрации свечения мы видим спектры свечения многих белков. Неспецифичность данного метода позволяет комплексно отследить состояние показателей крови всего организма. Белки крови содержат три аминокислотных остатка, которые могут давать вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию: тирозин (Tyr), триптофан (Trp) и фенилаланин (Phe). Флуоресценция белков обычно возбуждается в максимуме поглощения при $\lambda=280$ нм и больших длинах волн. Следовательно, фенилаланин не возбуждается в большинстве экспериментальных случаев. Более того, квантовый выход фенилаланина в белках мал, так что испускание этого остатка наблюдается редко [5]. Поглощение света белками при $\lambda=283$ нм связано с тирозиновыми и триптофановыми остатками. При длинах волн > 295 нм поглощает главным образом триптофан. Диапазон флуоресценции крови здоровых людей составил 589-596 нм. Это обусловлено суммацией и разделением по времени свечения аминокислых остатков белков, главным образом транспортного альбумина [5]. Испускание квантов света тирозином в воде происходит при $\lambda=303$ нм и сравнительно не чувствительно к полярности растворителя. Максимум испускания для триптофана в воде находится при $\lambda=348$ нм и сильно зависит от полярности [3]. Детальный анализ флуоресценции белков крови затрудняется как обилием факторов, которые влияют на флуоресценцию индольной составляющей, так и наличием в большинстве белков нескольких разных триптофановых остатков. Так как каждый остаток находится в разном окружении, то и спектральные

свойства каждого остатка в общем случае различаются. Испускания всех остатков перекрываются во всем используемом диапазоне длин волн, и довольно сложно разделить спектральные вклады каждого из них в многотриптофановом белке. Например, для большинства белков с единственным триптофановым остатком не наблюдается единственного времени затухания флуоресценции. По этой причине нельзя просто интерпретировать многоэкспоненциальную кинетику затухания в терминах поведения индивидуальных остатков в многотриптофановых белках крови онкобольных и здоровых пациентов.

Важную роль в исследовании играло то, что большинство пациентов с РМЖ проходили химиотерапию. По данным О.И. Коняева и соавторов применение препаратов для фотодинамической терапии злокачественных новообразований вызывает увеличение в 1,5 раза уровня альбумина и щелочной фосфатазы в сыворотке крови теплокровных по сравнению с фоновыми показателями. Также происходит влияние на периферическую кровь, уменьшая в 1,5-2 раза общее число эритроцитов, количество гемоглобина, снижая в 1,5-2 раза гематокритное число и увеличивая в 1,5-2 раза СОЭ. В данной работе было подтверждено повышение концентрации альбумина в 2 раза, а также косвенно доказано увеличение скорости оседания эритроцитов за счет обработки данных по агрегации сыворотки крови. Интересным фактом при проведении нашего исследования является положительная динамика у пациенток с РМЖ III клинической группы, прошедших курс лечения - величина волн затухания, при которых возрастает интенсивность свечения флуоресцеин-зависимой флуоресценции, находится в пределах 589-596 нм, что соответствует параметрам свечения крови здоровых людей. Найденные различия в спектрах могут быть использованы для правильного выбора и коррекции химиотерапии для конкретного пациента. Вместе с тем установлено, что развитие опухоли приводит к существенному изменению содержания свободного железа. Под «свободным» или «лабильным» железом принято понимать большой пул слабосвязанного, легко диализуемого двухвалентного железа. Свободное железо может играть значительную роль в процессах развития окислительного стресса. Для опухолевых клеток характерно повышенное содержание железа. Активные формы кислорода (АФК) инактивируют железо-регуляторный белок. Все происходящие в опухоли процессы приводят к уменьшению количества свободных радикалов, и, таким образом, к уменьшению уровня флуоресценции в диапазоне, характерном для здоровых людей [6], [7].

При анализе полученных результатов и проработке соответствующей литературы мы пришли к выводу, что на фоне общей картины можно выделить важную роль транспортного белка — альбумина. При корреляционном анализе с агрегометрией было подтверждено наличие сдвигов именно за счет этого белка. Данные результаты позволили усовершенствовать методику, сделав акцент на мониторинге состояния этого белка. Многочисленные статьи ведущих лабораторий мира показывают роль и влияние альбумина на свойства крови. И именно раковые заболевания рассматриваются в этом аспекте как ключевая мишень для научных исследований.

Отмечая актуальность и новизну данной работы, нельзя обойти стороной факт неспецифичности анализа, позволяющего быстро получить результаты, что, несомненно, необходимо в клинической диагностике. В настоящее время более

популярны специфические метки, такие как флуоресцентные зонды, которые прикрепляются только к одному белку или молекуле, в то время как кристаллы флуоресцеина окрашивают все молекулы в сыворотке крови. С одной стороны, при использовании специфических меток мы видим конформации только интересующих нас макромолекул, что дает комплексное понимание процессов, происходящих в их активных центрах. Но, с другой стороны, мы упускаем возможность заметить изменения в микроокружении данных органических соединений, что, безусловно, влияет на все показатели исследуемого образца.

Деформабильность эритроцитов при прохождении по кровяному руслу обусловлена упругими свойствами мембраны этих клеток, а также наличием особой белковой структуры, выстилающей внутреннюю сторону мембраны и называемой цитоскелетом. При воздействии различных физико-химических факторов и при ряде патологических состояний деформационная лабильность эритроцитов претерпевает существенные изменения. Среди эндогенных факторов, влияющих на деформабильность эритроцитов, можно отметить изменение структуры и концентрации гемоглобина, уровня содержания молекул 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, а также ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} в клетке. Экзогенные факторы, регулирующие деформабильность эритроцитарной мембраны, изучены в значительно меньшей степени, но играют существенную роль в реализации стресс-реакции и других патологических состояний организма. Снижение коэффициента когезии эритроцитов может быть связано с меньшим содержанием фибриногена и несколько большей относительной концентрацией альбумина, большей деформабильностью эритроцитов. При патологических изменениях мембран, сопровождающихся, как правило, ухудшением деформабильности и усилением агрегации эритроцитов, происходит физиологическая регуляция, противодействующая изменению вязкости крови за счет реципрокных последствий их прямой положительной связи. Эта связь реологических детерминант является неспецифической и может быть использована в качестве маркера функционального состояния организма. При изучении крови женщин с раком молочной железы наблюдалось достоверное снижение значений деформируемости эритроцитов в сравнении с деформабильностью эритроцитов здоровых людей.

При проведении корреляционного анализа наблюдалась высокая положительная корреляция между уровнем флуоресценции и значением деформабильности эритроцитов. Это объясняется тем, что значения данных характеристик зависят от одних процессов, протекающих в организме, в частности, от процесса накопления транспортного белка альбумина. Уровень флуоресценции прямо пропорционален концентрации данной макромолекулы. При онкозаболеваниях, особенно в сочетании с химиотерапией, происходит интенсификация процессов метаболизма, что в результате дает общее увеличение транспортных белков для переноса органических веществ в кровяном русле человека, а также происходит изменение свойств клеток крови, и как следствие — изменение агрегационной способности. В перспективе методы флуоресцентной спектроскопии, лазерной дифрактометрии и оценки агрегационной способности эритроцитов будут использованы для более глубокого изучения реологических свойств крови, которые являются отражением функционального состояния организма в целом. Это позволит расширить и оптимизировать процесс исследования.

Комплексная методика, позволяющая рассматривать как специфическую, так и общую, неспецифическую картину, позволит сделать большие шаги в биофизике и медицине, особенно в аспекте исследования злокачественных новообразований, требующих совершенных и многофакторных подходов.

На основе полученных данных были сделаны следующие **выводы**:

1. В крови онкологических больных максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра в диапазон 568-579 нм, в сравнении с 589-596 нм для крови здоровых людей.

2. У пациенток, прошедших лечение или находящихся в состоянии ремиссии (III клиническая группа), максимум интенсивности флуоресценции смещается в длинноволновую область спектра, что соответствует диапазону свечения крови здоровых людей.

3. При РМЖ происходит достоверное снижение деформируемости эритроцитов, в сравнении с деформабильностью эритроцитов здоровых людей.

4. Выявлена положительная корреляция между уровнем флуоресценции и деформабильности (+0,50).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
2. Фархутдинов Р.Р. Клиническое применение метода регистрации хемилюминесценции крови // Вопросы медицинской химии. 1986. № 3. С. 86-89.
3. Журавлев А. И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. М.: Медицина, 1975. 128 с.
4. Гурвич А. Энергетические основы митогенетического излучения и его регистрация на фотоэлектронных умножителях. М.: Медицина, 1974.
5. Loschenov, V.B., Konov, V.I., Prokhorov, A.M.. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostic // Laser Physics. 2000. Vol. 10. № 6. Pp. 1188-1207.
6. Дюбко Т.С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков // Вестник Харьковского национального университета. Сер. Биология. 2006. Вып. 3. С. 221-231.
7. Синяков А.Г. О состоянии онкологической помощи в Тюменской области за 2009 // Информационный онкобуллетень. 2009. 45 с.

REFERENCES

1. Lakovich, Dzh. *Osnovy fluorestsentnoi spektroskopii* [Basics of Fluorescence Spectroscopy]. Moscow, 1986. 496 p. (in Russian).
2. Farkhutdinov, R.R. Clinical use of blood chemiluminescence method of recording. *Voprosy meditsinskoj khimii — Problems of Medical Chemistry*. 1986. № 3. Pp. 86-89. (in Russian).
3. Zhuravlev, A.I. *Sverkhslaboe svechenie syvorotki krovi i ego znachenie v kompleksnoi diagnostike* [Superweak glow serum and its importance in the complex diagnosis]. Moscow, 1975. 128 p. (in Russian).
4. Gurvich, A. *Energeticheskie osnovy mitogeneticheskogo izlucheniia i ego registratsiia na fotoelektronnykh umnozhiteliakh* [Energy basis mitogenetic radiation and its registration on the photomultiplier tube]. Moscow, 1974. (in Russian).
5. Loschenov, V.B., Konov, V.I., Prokhorov, A.M.. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostic // Laser Physics. 2000. Vol. 10. № 6. Pp. 1188-1207.

6. Diubko, T.S. On some aspects of the application of fluorescence analysis in cryobiology. 1. The intrinsic fluorescence of proteins. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universitetata. Ser. Biologiya* — *Bulletin of Kharkov National University. Series «Biology»*. 2006. Vol. 3. Pp. 221-231. (in Russian).

7. Siniakov, A.G. On the state of cancer care in the Tyumen region in 2009. *Informatsionnyi onkobiulleten'* — *Information cancer bulletin*. 2009. 45 p. (in Russian).

Автор публикации

Белкин Алексей Васильевич — доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета, кандидат биологических наук

Author of the publication

Alexey V. Belkin — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Human Anatomy and Physiology, Institute of Biology, Tyumen State University