

57
А-26



На правах рукописи

А. Е. ЗАКАРЯН

**Сверхслабое свечение сыворотки крови
при злокачественном росте**

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор Б. Н. ТАРУСОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА • 1967

Работа выполнена на кафедре биофизики биолого-почвенного факультета Московского государственного университета.

Защита состоится « » 196 г. на биолого-почвенном факультете МГУ.

Автореферат разослан « » 1967 г.

Просьба Ваши отзывы и замечания присылать по адресу: Москва В-234, Ленинские горы, МГУ, биолого-почвенный факультет, Ученому секретарю.

57
A26
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА

Биолого-почвенный факультет
Кафедра биофизики

Одним из главных вопросов в настоящее время в медицине и в биологии является проблема злокачественного роста, в частности механизм его возникновения и развития. Особо важное значение имеет изучение физико-химических изменений при злокачественном росте и выявление различий в химическом составе нормальных и опухолевых клеток. Параллельно с биохимическими методами для решения подобных задач перспективно применение чувствительных физико-химических методов, особенно в тех случаях, когда количество исследуемых веществ недостаточно для химического и биохимического анализа.

Одним из таких методов можно считать изучение сверхслабого свечения различных тканей и органов животных и человека, способных излучать в сине-зеленой области электромагнитного спектра, которое исследовалось с помощью высокочувствительной регистрирующей техники (фотоэлектронные умножители) (Тарусов, Журавлев, Поливода). Дальнейшие исследования в этой области показали, что свечение обусловлено хемилюминесценцией, которая особенно интенсивно при рекомбинации свободных радикалов, образующихся в ходе автоокислительной реакции различных веществ липидной природы (Тарусов и др., 1961; Журавлев и др., 1961—1966).

А. Н. Журавлевым было показано, что интенсивность сверхслабого свечения живых тканей может изменяться в зависимости от содержания в них веществ, ослабляющих свечение как за счет поглощения, так и путем безизлучительной дезактивации возбужденных состояний молекул (эффект тушения).

Наряду с этим можно привести целый ряд работ (Пейк, 1955; Коммонер, 1954, 1955; Коломийцева, 1960; Козлов и др., 1966), в которых авторы, основываясь на экспериментальных данных по содержанию свободных радикалов в нормальных и опухолевых тканях, указывают на возможность участия свободнорадикальных реакций в злокачественном росте опухолей. Метод измерения сверхслабого свечения (ССС) или сверхслабой хемилюминесценции (ССХ) применялся рядом авторов для изучения антиоксидантной активности (АОА) различных тканей и органов как в норме, так и при злокачественных новообразованиях (Петрусевич, Иванов, Тарусов, 1965; Иванов и др., 1965; Тарусов и др., 1964).

Центральная научная
библиотека
Академии наук Киргизской ССР

296244

Еще давно постулировалось положение, что при злокачественном росте в крови появляется тушитель, который гасит слабые излучения, испускаемые живыми клетками (Гурвич Л. Д.).

Совсем недавно рядом авторов делались попытки зарегистрировать сверхслабое свечение крови в норме и при различных патологиях (Казначеев, Набиулли и др.).

Целью настоящей работы в плане этих исследований являлось: 1) обнаружение сверхслабого свечения сыворотки крови животных и человека, изучения некоторых закономерностей этого свечения;

2) исследование изменений сверхслабого свечения сыворотки крови при злокачественном росте опухолей;

3) изучение динамики изменения биоантиоксидантов в сыворотке крови животных и человека при злокачественном росте опухолей с различной локализацией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования служили белые крысы — самцы весом 180—200 г, которым трансплантировались опухоли (саркома-45; асцитная опухоль ОЯ, саркома Крокера и др.). Использовалась также сыворотка крови человека, взятая как у здоровых людей, так и онкологических больных с различной локализацией злокачественных опухолей.

В работе использовали:

1) метод сверхслабого свечения для изучения хемилюминесцентной реакции, происходящей при элементарных актах рекомбинации свободных радикалов;

2) метод ингибирования индуцированной хемилюминесценции для определения АОА исследуемых объектов;

3) метод хроматографии с использованием ионообменных смол;

4) метод ультрацентрифугирования в поле градиентов;

5) методы химического экстрагирования.

Измерение ССХ сыворотки крови проводилось на квантометрической установке, принцип работы которой описан ранее (Владимиров, Литвин, 1959; Васильев и др., 1959). Регистрирующим устройством была установка, работающая на декатронах по пересчетной схеме (ПСТ-100 Тип ПП-8). Параллельно к усилителю были присоединены интегратор ИСС-1 и самопишущее устройство ЭПП-09. Общий контроль за стабильной работой установки осуществляет при помощи электронного осциллографа ЭО-6 или Э-07. Стабильность работы всей установки и чувствительность ФЭУ-42Б контролировались также с помощью объекта постоянной интенсивности ССХ (неокисленная оленовая кислота НОК), сверхслабая хемилюминесценция которой при 25°С превышала фон в 8—10 раз.

Измерение ССХ сыворотки крови проводили в стеклянной двухстенной кювете с двойными стенками объемом 3 мл с диаметром рабочей поверхности передней стенки в 40 мм. Термостатирование исследуемого образца осуществляли пропусканием нагретого воздуха между стенками кюветы. Измерение температуры осуществлялось с помощью термопары. Расстояние между исследуемым объектом и окошком фотоумножителя составляло не более 10—15 мм.

Количественное определение АОА сыворотки крови производили методом ингибирования индуцированной хемилюминесценции. Для этого в специальной электрохимической ячейке с платиновыми электродами подвергались электролизу различные химические соединения: Д-тирозиновый раствор в растворе Na_2SO_4 ; насыщенный раствор цитрата натрия в метаноле; система спирт — H_2SO_4 в определенных отношениях и др., которые при анодном окислении давали стабильный уровень электрохемилюминесценции (ЭХЛ), регистрируемый вышеописанной установкой. При использовании какой-либо из указанных систем во всех опытах поддерживались постоянные электрохимические условия.

Сыворотку крови фракционировали с помощью хроматографии с некоторой модификацией, с применением ионообменной смолы ДАУЭКС 50×4 100×200, ДАУЭКС 50×8 100/200 и ДАУЭКС 50×5 100×200 методом вытеснения градиентом раствора Na_2SO_4 . Полученные фракции добавляли в электрохимическую ячейку через тефлоновую трубку и исследовали по их ингибирующей способности тушить реакцию ЭХЛ.

Ультрацентрифугирование производили на ультрацентрифуге *spinko-model E* в поле градиентов раствора сахарозы при $g=125490$ (скорость = 44 770 об/мин). Полученные фракции также исследовали по ингибированию ЭХЛ.

Методы химического экстрагирования позволяли получить фосфолипидные и липидные фракции сыворотки крови как в норме, так и при злокачественном росте. Для этого использовали метод Блур (метанол-хлороформ-эфир 3:2:1), применяли также хлороформ, метанол 1:2 и другие органические растворители. Получение фракции исследовали на измерение АОА по тушению ЭХЛ. На получение таким образом кривой $I-f(t)$ каждая точка является средней арифметической значения сигнала для 8—10, а иногда и большего числа измерений. Определение достоверности полученных результатов проводилось по методу Стьюдента — Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Исследование сверхслабой хемилюминесценции сыворотки крови

В настоящее время сверхслабому свечению живых органов и тканей посвящается значительное количество работ. После обнаружения этого феномена (Колли, Фачинни, 1954; Владимиров,

Литани, 1959; Тарусов, Журавлев, Поливода, 1961); естественно, возникло предположение о связи его с физиологическими процессами организма как в норме, так и при различной патологии, а также о возможности получения информации о физико-химических и биохимических процессах, протекающих в живом организме. С этой целью была исследована хемилюминесценция гомогенатов тканей, органов животных и спонтанная хемилюминесценция липидов. Однако в литературе недостаточно данных об исследовании ССХ крови, в частности сыворотки, несмотря на то, что сыворотка крови и вообще кровь является главным связующим звеном, благодаря которому осуществляется перераспределение основных активных метаболитических продуктов в организме.

Полученные нами результаты по изучению ССХ сыворотки крови контрольных крыс и здоровых людей приведены на табл. 1.

Таблица 1

Влияние температуры на ССХ *имп/10 сек.*, сыворотки крови.
Фон установки 1000 ± 50 *имп/10 сек.*

Объект исследования	Температура °С					
	40	45	50	55	60	65
Сыворотка контрольных крыс	60 ± 10	120 ± 20	184 ± 30	218 ± 32	310 ± 40	420 ± 43
Сыворотка здоровых людей	60 ± 16	130 ± 25	200 ± 32	252 ± 33	340 ± 42	430 ± 46
Плазма здоровых людей	60 ± 12	135 ± 26	216 ± 30	260 ± 30	315 ± 39	395 ± 47

Из таблицы видно, что начиная от 40°С интенсивность хемилюминесценции возрастает с повышением температуры. В температурном интервале от 50°С до 55°С скорость возрастания интенсивности ССХ несколько уменьшается. Дальнейшее повышение температуры (55°С—65°С и выше) сопровождается резким усилением свечения. Приведенная таблица показывает, что результаты, полученные при исследовании сыворотки и плазмы крови здоровых людей, почти не отличаются друг от друга. Также можно отметить, что не наблюдалось резких различий в интенсивности ССХ между сывороткой крови контрольных крыс и здоровых людей.

Исходя из полученных данных представлялось интересным изучить хемилюминесцентную реакцию сыворотки крови при насыщении ее кислородом и в условиях аноксии. Для этого через сыворотку пропускали ток азота и измеряли ССХ при температуре 50°С. В этом случае наблюдаемая хемилюминесценция сыворотки полностью исчезала. При замене азота на кислород ССХ появ-

лялось вновь. Так, если при указанной температуре уровень свечения сыворотки равнялся 200 ± 50 *имп/10 сек.* (фон = 1000 *имп/10 сек.*), то после насыщения азотом свечение сыворотки равнялось фону, а при пропускании кислорода свечение усиливалось и достигало 360 ± 70 *имп/10 сек.* Критерий достоверности вышеприведенных результатов проверялся по методу Стьюдент—Фишера и во всех опытах превышал 3.

Для выяснения роли ферментативных процессов в акте свечения нами были применены различные катионы тяжелых металлов (Ba^{++} , Be^{++} и др.); которые как известно могут тормозить или ингибировать ряд ферментативных процессов. В сыворотку также добавлялась АТФ и соли металлов (Fe^{++} , Mg^{++}), которые могли индуцировать действие ферментных систем. Но во всех случаях в наших опытах мы не наблюдали какого-нибудь отклонения от контроля. Подобные эксперименты были проведены в широком диапазоне температур (от 20°С до 50°С с интервалом 5°С) для установления оптимума, при котором могли действовать самые разнообразные ферменты.

В предварительных опытах было показано, что при добавлении в сыворотку крови некоторых веществ из ряда циклических углеводов наблюдается вспышка хемилюминесценции, которая со временем уменьшается. Однако величина этой вспышки и характер ее затухания неодинаков для ряда известных циклических соединений. Нами были испытаны такие биологически активные вещества, как 20-метилхолантрен; 9,10-дибромантрацен; 9,10-диметил-1,2-бензатрацен; 1,2,5,6-дибромбензантрацен (ДМБА). Из неканцерогенного ряда был взят антрацен. Опыты проводились при комнатной температуре, указанные углеводы растворяли в специальном органическом «сверхрастворителе» ДМФА (диметилформамиде). Результаты, полученные в этих экспериментах, приведены в табл. 2.

С целью дальнейшего изучения влияния канцерогенных веществ на свечение сыворотки крови нами были поставлены опыты в условиях *in vivo*. Для этого животным вводили внутримышечно соответствующий углеводород (канцероген или неканцероген) и затем спустя 2, 4, 6 часов получали сыворотку. Эти исследования показали, что через 2—3 часа после введения 1,2,5,6-ДМБА, 20-метил-холантрена, бензпирена в сыворотке крови опытных животных наблюдалась повышенная ССХ, затем она уменьшалась и через 10 и более часов сравнивалась с контролем. Так, например, фон установки равнялся 1000 ± 50 *имп/10 сек.*, свечение контрольной плазмы крыс превышало его на 300 ± 60 *имп/10 сек.* Через 3 часа после внутримышечного введения 1,2,5,6-ДМБА уровень свечения сыворотки крови возрастал до 500 ± 70 *имп/10 сек.*, превышение над фоном. Когда 1,2,5,6-ДМБА вводили через хвостовую вену, то максимум свечения сыворотки крови наблюдался через 2 часа. В этом случае, при фоне 1000 ± 50 *имп/10 сек.* вспышка свечения сыворотки превышала над

Таблица 2

Изменение интенсивности ССХ (имп/10 сек) сыворотки крови при добавлении некоторых циклических углеводородов.
Фон установки = 500 ± 30 имп/10 сек температура комнатная

	Время в минутах							
	0,6	1	2	3	4	5	6	7
ДМФА	200 ± 45	170 ± 40	130 ± 40	100 ± 40	70 ± 25	60 ± 25	50 ± 20	50 ± 20
20-метилхолан- трен	300 ± 100	670 ± 60	640 ± 50	600 ± 5	500 ± 50	410 ± 40	270 ± 40	220 ± 40
1, 2-диброман- трацен	470 ± 60	450 ± 50	420 ± 40	380 ± 40	320 ± 50	270 ± 40	260 ± 40	190 ± 40
9,10-диметил- 1, 2-бензан- трацен	500 ± 70	470 ± 50	400 ± 50	370 ± 50	290 ± 50	250 ± 50	230 ± 50	200 ± 35
1, 2, 5, 6-ДМБА	480 ± 60	440 ± 50	410 ± 45	390 ± 45	370 ± 47	340 ± 50	290 ± 60	260 ± 40
Антрацен	300 ± 50	280 ± 45	240 ± 47	210 ± 40	200 ± 45	190 ± 47	190 ± 50	150 ± 50

фоном на 600 ± 90 имп/10 сек. Результаты, полученные от остальных канцерогенных веществ по влиянию на свечения сыворотки крови, были сходны с результатами, полученными в опытах с 1,2,5,6-ДМБА. Антрацен, не являющийся биологически активным, почти не повлиял на интенсивность СХЛ сыворотки крови в условиях *in vivo*. Так, при фоне установки 1000 ± 50 имп/10 сек превышение над фоном составляло 390 ± 60 имп/10 сек в том случае, когда СХЛ контрольной сыворотки равнялась 360 ± 60 имп/10 сек при температуре 60°C .

Чтобы составить представление о природе явления, а также о характере субстратов, участвующих в акте свечения, мы исследовали сыворотку крови контрольных и облученных животных. Облучение животных приводило на рентгеновской установке РУТ-200-20-3 (РУМ-11) при напряжении по прибору 180 в и при токе 15 ма с использованием алюминиевого фильтра толщиной 1 мм. Опыты показали, что сыворотка крови животных после облучения дозой в 850 р хемилюминесцирует более интенсивно, чем сыворотка крови контрольных необлученных животных. Начиная с первых 3 часов после облучения наблюдается небольшая интенсификация ССХ сыворотки крови, которая на 80 ± 20 имп/10 сек больше контроля. За 3—4 сутки после облучения наблюдается максимум свечения сыворотки крови — 170 ± 30 имп/10 сек больше контроля. За последующие сутки это свечение постепенно уравнивается к контролю.

Опыты с облучением контрольной сыворотки крови крыс и здоровых людей большими дозами рентгена (50; 100; 150 кр) показали, что максимум интенсификации ССХ наблюдается в диапазоне дозы 50—100 кр и при этом свечение превышает над контролем на 25—30%.

2. Изучение ССХ сыворотки крови при злокачественном росте

В течение последних лет было установлено, что при росте злокачественных опухолей в организме изменяется равновесие антиокислительных веществ, вследствие чего общий уровень окислительных процессов подавляется (Тарусов, Иванов, Петрусевиц, Бурлакова и др.).

С целью установления связи между АОА и актом свечения в биологических субстратах при злокачественном росте опухолей мы исследовали ССХ сыворотки крови раковых животных и больных с различной локализацией злокачественных опухолей. С этой целью крысам прививали различные опухолевые штаммы и изучали динамику изменения ССХ сыворотки крови на разных сроках после прививки в широком интервале температур. Полученные результаты этих экспериментов представлены на рис. 1, где на оси абсцисс отложено изменение температуры, а на оси ординат — интенсивность ССХ сыворотки крови в импульсах.

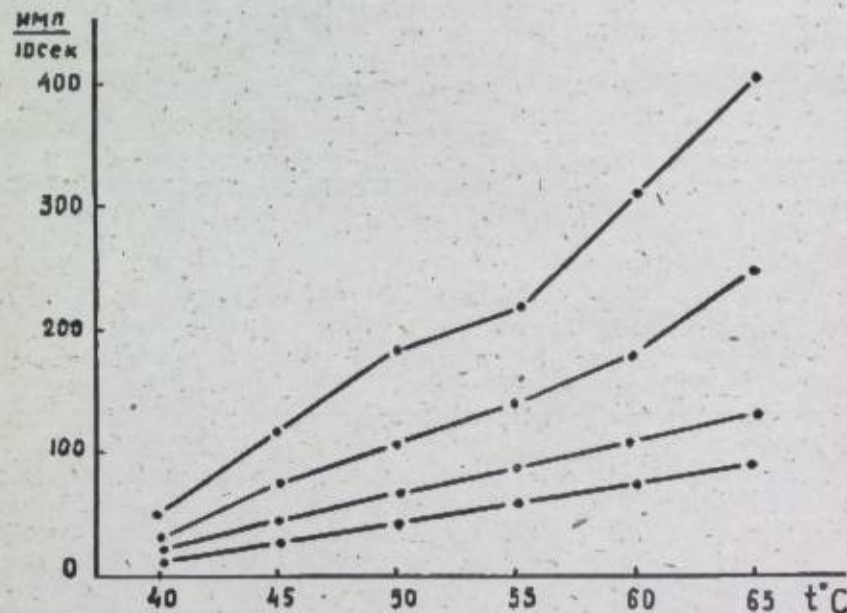


Рис. 1. Влияние температуры на интенсивность ССХ сыворотки крови в норме и при злокачественном росте.
1 — контроль; 2, 3, 4 — свечение сыворотки крови раковых животных соответственно на 5, 10, 15 день.

Как видно из рис. 1, интенсивность ССХ сыворотки крови контрольных животных (крив. 1) намного выше по сравнению с сывороткой крови раковых животных (крив. 2, 3, 4).

В качестве исследуемого материала нами также была взята сыворотка, полученная от здоровых людей (доноров 50) и больных (80) с различной локализацией злокачественной опухоли. Результаты этой серии опытов по измерению ССХ при температуре 55°С были сходны с результатами опытов на экспериментальных животных. Оказалось, что уровень ССХ сыворотки крови, полученной от онкологических больных, заметно понижен по сравнению со свечением сыворотки крови от здоровых людей (табл. 3).

Таблица 3
Изменение ССХ (и.мп./10 сек) сыворотки крови у онкологических больных различной локализации опухолей

Объект исследования	40	45	50	55	60	65
Сыворотка здоровых людей	60 ± 16	130 ± 25	200 ± 32	252 ± 33	340 ± 42	430 ± 46
Рак желудка	50 ± 18	90 ± 18	140 ± 28	160 ± 30	230 ± 25	270 ± 39
Рак молочной железы	47 ± 19	85 ± 26	130 ± 26	170 ± 27	220 ± 27	250 ± 36
Лимфогранулематоз (белокровие)	36 ± 17	60 ± 28	100 ± 26	130 ± 25	180 ± 30	200 ± 38
Миома матки	48 ± 16	76 ± 18	125 ± 29	146 ± 29	210 ± 28	230 ± 33
Рак яичников	47 ± 18	80 ± 18	137 ± 27	165 ± 29	230 ± 28	240 ± 37

Журавлевым и др. (1961—1965) было показано, что увеличение количества тканевых антиоксидантов приводит к снижению интенсивности хемилюминесцентной реакции в биологических системах. Предполагалась возможность участия в этих реакциях витамина Е (α-токоферола) в качестве природного антиоксиданта.

Для выяснения роли α-токоферола в подобных реакциях окислительного типа, которые сопровождаются высвечиванием квантов света, а также в качестве попытки объяснения угнетения сверхслабого свечения при злокачественных новообразованиях с точки зрения увеличения ингибирующих веществ в сыворотке крови, нами были поставлены следующие эксперименты. Крысы содержались в условиях специальной диеты без витамина Е. В течение 3—4 месяцев у животных развивался Е-авитаминоз. Сыворотка от этих животных характеризовалась повышенной по сравнению с контролем, интенсивностью сверхслабого свечения. Так, если контрольная сыворотка давала превышение свечения на 30—35% над фоном, то от сыворотки Е-авитаминозных крыс превышение достигало почти 60—65%. После внутримышечного введения химически чистого α-токоферола Е-авитаминозным крысам

наблюдалось снижение интенсивности сверхслабого свечения сыворотки крови. При больших дозах введенного α-токоферола уровень свечения приближался к контролю, а в некоторых случаях понижался еще более значительно. В дальнейшие сроки при развитии Е-авитаминоза в сыворотке крови крыс не наблюдалось заметного отклонения интенсивности ССХ по сравнению с данными, полученными на 3—4 месяца Е-авитаминоза.

3. Исследование антиокислительной активности сыворотки крови при злокачественном росте

В предыдущих разделах настоящей работы нами было показано, что при росте злокачественных опухолей в сыворотке крови наблюдается снижение интенсивности ССХ. Эти результаты также показали, что снижение может быть вызвано увеличением природных антиокислителей в сыворотке крови. Для выяснения природы веществ, способных ингибировать ССХ, мы предприняли опыты по фракционированию сыворотки крови на ионообменной колонке; полученные фракции исследовали методом ингибирования ЭХЛ водно-солевого раствора тирозина. Об. АОА данной фракции судили по отношению интенсивности начальной ЭХЛ (I_0) до добавления исследуемой фракции к интенсивности ЭХЛ (I_1) после добавления исследуемого образца. Результаты, полученные как в опытах с интактными животными, так и при злокачественном росте, иллюстрированы на рис. 2.

На кривой 1 приведена активность фракции сыворотки контрольных крыс (до прививки опухоли). Нетрудно заметить, что наивысшая АОА наблюдается в 3—4 фракциях, АОА 5-й фракции намного ниже, а в 6-й фракции снова наблюдается заметное повышение этой активности. В последующих фракциях АОА постепенно понижается. Кривая 2 (рис. 2) отображает АОА сыворотки крови после 4—5 дня прививания опухоли. Как видно из этой кривой, в некоторых фракциях (3, 4, 5) замечается повышение АОА, которая начиная с 6-й фракции, сравнивается с контролем.

Проследив за динамикой АОА фракций сыворотки крови при злокачественном росте различных опухолей, мы получили следующие данные: в первом периоде роста опухолей наблюдается интенсивное увеличение количества веществ, способных ингибировать окислительную реакцию ЭХЛ. При использовании различных опухолевых штаммов этот период длился с 4 дня после прививки до 8—10 день. Второй период (10—16 дни) характеризовался тем, что увеличение количества ингибиторов замедлялось и их уровень оставался более или менее постоянным. В третьем периоде это увеличение ингибиторов совсем прекращалось, а в некоторых случаях наблюдался их спад.

Чтобы установить природу этих веществ, мы обрабатывали плазму кристаллическим витамином А, вводя его в определенной

концентрации. Считали, что витамин А, являясь антагонистом липидных антиоксидантов, инактивирует их, и ожидали понижения АОА этих фракций после обработки плазмы витамином А. Как видно из рис. 2 (крив. 3), после обработки сыворотки витамином А, АОА в некоторых (3, 4, 5) фракциях заметно снижается.

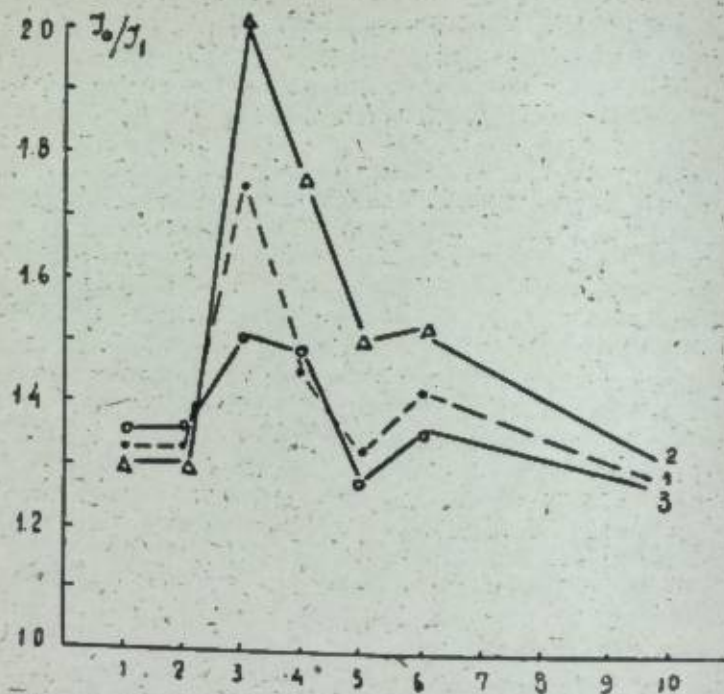


Рис. 2. Ингибирование ЭХЛ фракцией сыворотки крови крыс при росте асцитной опухоли ОА.
1 — интактные крысы; 2 — 4 день прививки опухоли. Ось абсцисс — номера фракции; по оси ординат — АОА фракции

Для обнаружения действия α -токоферола как одного из тканевых антиоксидантов (витамина Е) на организм и изучения связи между α -токоферолом и АОА сыворотки крови, которая увеличивается при злокачественном росте, одну группу крыс держали на специальной диете, не содержащей витамина Е в течение 3—4 месяцев. В дальнейшем Е-авитаминозным крысам вводили химически чистый α -токоферол в количестве 20 мг на 100 г веса и исследовали сыворотку спустя 6 часов после внутримышечного введения. Полученную сыворотку как у Е-авитаминозных, так и у крыс после введения α -токоферола, разгоняли на ионообменной колонке с применением синтетической смолы (Дауэкс 50×4 100/200; 50×8 100/200) и полученные фракции исследовали на их АОА по ингибированию реакции ЭХЛ. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 3.

На кривой 1 (рис. 3) приведены результаты, полученные от сыворотки крови контрольных животных. Кривая 2 и 3 (рис. 3), соответственно показывают изменение АОА сыворотки крови при Е-авитаминозе и при внутримышечном введении витамина Е. Как видно из кривой 2, во фракциях 1, 2, 3 фиксируется резкое понижение антиокислительной активности по сравнению с теми же фракциями контрольной сыворотки (крив. 1). Затем, при введении α -токоферола в этих же фракциях (1, 2, 3, 4) наблюдается повышение АОА, которое во фракциях 4, 5 не только доходит до нормы (контроля), но и превышает ее.

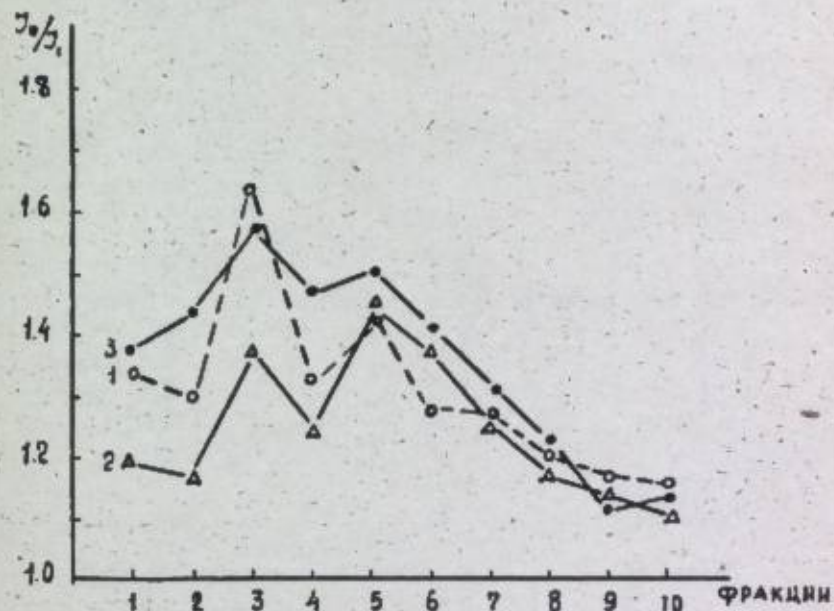


Рис. 3. Изменение АОА фракцией сыворотки крови крыс при недостатке витамина Е и при внутримышечном введении α -токоферола

Для дальнейшего изучения природы веществ, способных ингибировать окислительные реакции, мы ультрацентрифугировали сыворотку крови при различных градиентах сахарозы в пробирке. Опыты проводили как на экспериментальных животных при Е-авитаминозе и после внутримышечного введения α -токоферола, так и при злокачественном росте. В опытах также использовалась сыворотка крови, полученная от здоровых людей и онкологических больных. Полученные результаты приведены на рис. 4.

Результаты этих экспериментов показали, что при фракционировании сыворотки ультрацентрифугированием в градиентном поле первая фракция обладает наибольшей АОА по сравнению со второй и третьей фракциями. Опыты с сывороткой крови кон-

трольных, раковых, E-витаминозных и крыс, получавших α -токоферол, а также с сывороткой крови здоровых людей и раковых больных, показали, что основное изменение АОА при вышеуказанных нарушениях в организме происходит в первой фракции сыворотки крови. Нетрудно заметить, что при злокачественном росте опухолей животных (рис. 4, III) и человека (рис. 4, IV) в пер-

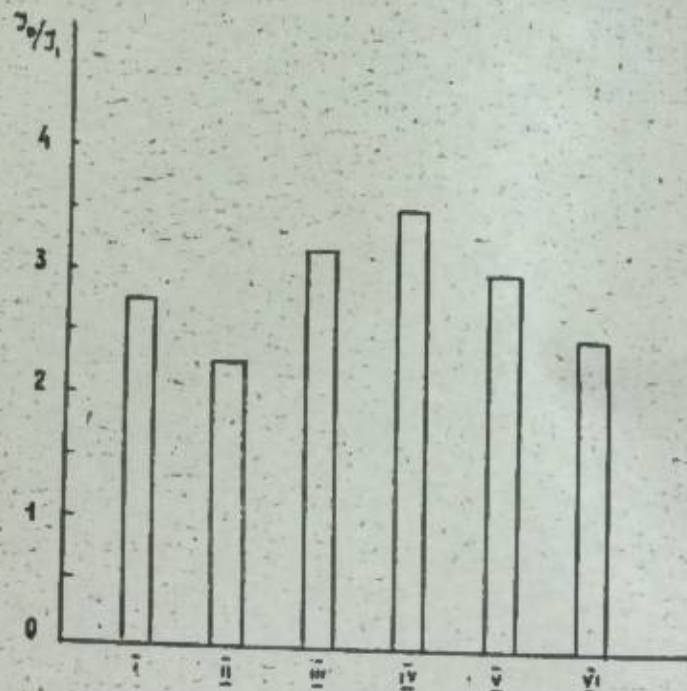


Рис. 4. Изменение АОА сыворотки крови во фракциях ультрацентрифугата.
I — интактные; II — E-авитаминозные; III — опухолевые крысы; IV — после внутримышечного введения α -токоферола; V — сыворотка от больных лейкоземией; VI — сыворотка здоровых людей

вых фракциях намного выше по сравнению с контролем. Однако при случае E-авитаминоза (рис. 4, II) АОА понижена по сравнению с контролем (рис. 4, I), но после внутримышечного введения она намного повышается по сравнению с сывороткой крови E-авитаминозных крыс (рис. 4, II).

Для сравнения результатов, полученных методом ультрацентрифугирования, с результатами, полученными при использовании хроматографии, отдельные фракции (1, 2, 3) ультрацентрифугата разделялись на колонке (Дауэкс 50×4 100/200). Полученные результаты приведены на рис. 5.

Как видно из рисунка, основные количества активных веществ, способные ингибировать ЭХЛ, адсорбируются в верхних слоях колонки (1, 2, 3, 4 фракции). В следующих фракциях эта активность падает до минимума. Кривые 2 и 3 соответственно изображают активность колоночных фракций после разложения на ионообменной колонке 2 и 3 фракции ультрацентрифугата.

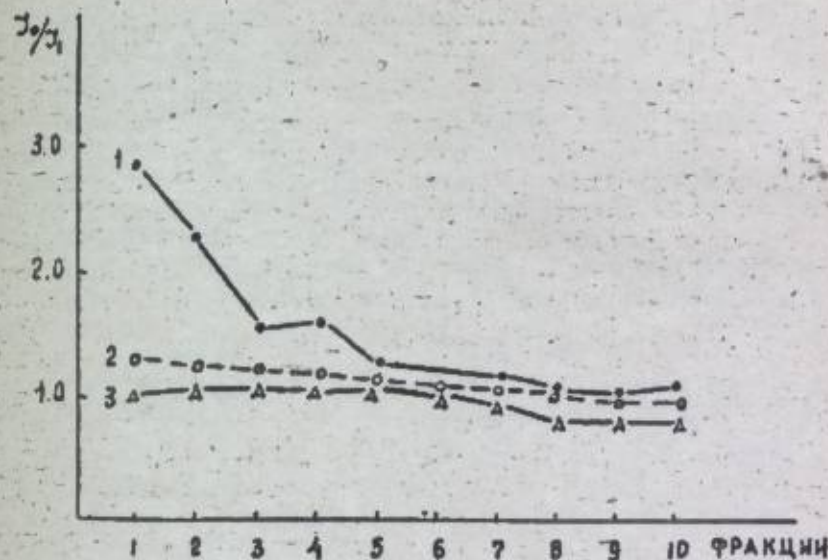


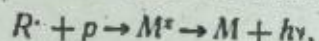
Рис. 5. АОА сывороточной фракции ультрацентрифугата после разложения на ионообменной колонке (у контрольных животных). Кривые 1, 2, 3 соответствуют первой, второй и третьей фракции ультрацентрифугата.

В последнем разделе нашей работы представлены результаты экстрагирования сыворотки крови смесью Блур (этил. спирт-метанол-хлороформ 3:2:1), смесью метанол-хлороформ 2:1 и другими органическими растворителями. При этом выделялись фракции белков, фракции липидов и различных жирных кислот и фракции фосфолипидов. Было исследовано изменение АОА фосфолипидных фракций как в норме, так и при злокачественном росте в сыворотке крови человека и животных. Измерение АОА экстрагированных фракций проводили по ингибированию ЭХЛ. В качестве стандартной модели пользовались обычно той же смесью, в которой проводили экстрагирование с добавлением серной кислоты ($100:1 \cdot 10^{-1} \text{NH}_2\text{SO}_4$) или насыщением цитратом натрия для обеспечения электропроводности в ячейке. Суммарные результаты, полученные в этих опытах, показали, что фосфолипидные фракции обладают наиболее выраженной АОА. В сыворотке крови рако-

вых больных и опухолевых животных АОА фосфолипидных фракций увеличивается. Так, если величина тушения ЭХЛ фосфолипидами нормальной сыворотки животных равняется 1,3—1,4, то при росте опухолей ОЯ, саркома-45 эта величина повышается до 1,6—1,7. Изучение белковых фракций этих экстрактов не привели к выявлению разницы между нормальной сывороткой и сывороткой крови опухолевых животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами экспериментальные данные по изучению ССХ сыворотки крови свидетельствуют о том, что изменение температуры существенно сказывается на скорости этой реакции. По-видимому, это можно объяснить уменьшением активационного барьера, и следовательно активированием процессов образования свободных радикалов, приводящих к появлению возбужденных молекул (Васильев, 1963—1965), дезактивация которых приводит к высвечиванию квантов света по схеме:



Однако этот тип реакции может являться далеко не единственным для генерации квантов света.

Журавлев, Тарусов и др. показали, что субстраты липидной природы могут высвечивать в результате реакции автоокисления. Полученные нами результаты подтверждают это положение и указывают к тому же на то, что в сыворотке крови этот процесс может идти в сложных липопротениновых комплексах, которые содержат большой процент веществ липидной и жирной природы.

Анализируя полученные результаты по температурной зависимости, можно предполагать, что на различных температурных участках кривой за генерацию световых квантов ответственна не одна единственная реакция. Зависимость ССХ при этом описывается в первом приближении законом Арренуса. Заметное повышение $Q_{10}(2,6)$ выше 55°C , возможно, объясняется как денатурацией белковых молекул, вследствие чего сыворотка заметно просветляется и становится оптически более прозрачной, так и разрушением липопротениновых комплексов. Последнее может подтверждаться тем, что при обратном переходе температуры не наблюдается перегиб на контрольной кривой свечения сыворотки в области температур $50-55^\circ\text{C}$.

Влияние кислорода возможно связано с ускорением окислительных процессов, происходящих в липидах и жирах сыворотки крови. Возможно, последующий распад образовавшихся при этом перекисных соединений обеспечивает поставку перекисных радикалов, рекомбинация которых приводит к увеличению скорости реакции ССХ. Как было показано, в условиях аноксии этот процесс резко приостанавливается. Наблюдаемое изменение реакции

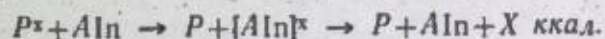
ССХ в зависимости от присутствия кислорода указывает на окислительную природу этой реакции.

Добавление к сыворотке ионов различных металлов (Ba^{++} , Be^{++} , Fe^{++} , Mg^{++}), угнетающих или катализирующих ряд ферментативных реакций, не привело к заметному отличию реакции ССХ от нормы, что указывает на неферментативный характер этой реакции.

Испытание влияния ряда веществ циклического строения на ход свечения сыворотки крови как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* указывает на радикальную природу ССХ. Повышение при этом интенсивности реакции сверхслабого свечения, по-видимому, происходит в результате рекомбинации различных сортов радикалов (Васильев Р. Ф., 1963—1965), т. е. рекомбинацией радикалов циклических углеводородов с радикалами и молекулами биологической природы.

Интенсификация реакции ССХ в облученных образцах сыворотки крови, а также сыворотке, полученной от крыс, облученных рентгеном, свидетельствует об усилении окислительных процессов в липидных структурах организма (Мальц, Кудряшов, Козлов) и переходом ряда перекисей в сыворотку крови из различных пораженных органов. Также можно предположить, что при облучении уменьшается количество ингибиторов, идущих на обеспечение стационарности окислительных процессов в организме.

Полученные экспериментальные данные по изучению сверхслабого свечения сыворотки крови при злокачественном росте показывают, что при этом увеличивается количество ингибирующих веществ, тормозящих хемилюминесцентную реакцию сыворотки крови, наблюдаемую, в основном, при окислительных процессах. При этом ингибитор может взять на себя энергию возбужденных радикалов и молекул и излучать эту энергию в виде тепла по схеме



Полученные результаты по изучению изменения интенсивности ССХ в зависимости от динамики роста злокачественных опухолей показывают, что в ходе роста опухоли интенсивность реакции ССХ падает. Это может быть обусловлено увеличением антиокислительных веществ в различных органах и постепенным переходом их в русло крови.

Данные, полученные в опытах с Е-авитаминозными крысами, а также с введением им α -токоферола, свидетельствуют о том, что витамин Е как природный антиокислитель имеет прямое отношение к антиоксидантам сыворотки и может, по-видимому, являться одним из них.

Исследованиями реакции ССХ в сыворотке животных и людей как в норме, так и при различных видах опухолей была по-

казана единая форма изменения определенных (в частности окислительных) процессов при росте злокачественных опухолей, хотя, естественно, причины их образования могут быть самыми различными. Изучение АОА сыворотки крови показывает, что при злокачественном росте мы наблюдали только количественные изменения антиоксидантов, способных ингибировать реакцию ЭХЛ.

Результаты при фракционировании сыворотки ультрацентрифугированием свидетельствуют о том, что липидные антиоксиданты крови входят в состав липопротеинового комплекса, которые играют большую роль при транспортировке различных липидов, жиров и витаминов.

Данные о том, что липопротеины адсорбируются в первых фракциях ионообменной смолы косвенно, подтверждают липидную природу этих фракций при разделении сыворотки на ионообменной колонке.

Ионообменное разделение сыворотки показало, что наиболее активными по ингибированию ЭХЛ являются более легкие фракции, имеющие липидную природу. Это было подтверждено в опытах, где сыворотка обрабатывалась кристаллическим витамином А. Тот факт, что в условиях Е-авитаминоза, а также при внутримышечном введении α -токоферола Е-авитаминозным крысам наблюдается изменение АОА во фракциях, изменяющихся при злокачественном росте, говорит о связи природных антиоксидантов с антиоксидантами, образовавшихся при росте злокачественных опухолей.

Дальнейшее выделение фосфолипидов сыворотки крови и их изучение по ингибированию реакции ЭХЛ в спиртовых растворах позволяет предположить, что из липидных структур наиболее активными в ингибировании ЭХЛ являются фосфолипиды. Однако сколько-нибудь однозначных выводов о том, что при злокачественном росте в организме изменяется содержание только фосфолипидов, сделать невозможно без проведения дальнейших детальных исследований.

ВЫВОДЫ

1. С помощью высокочувствительных приборов (ФЭУ-426) обнаружено сверхслабое свечение сыворотки крови в видимой области спектра.

2. Установлено, что сверхслабое свечение является результатом окислительных процессов, происходящих в липидных и липопротеиновых структурах крови, и не может быть следствием ферментативных реакций.

3. Некоторые химические вещества канцерогенной природы могут активировать реакцию свечения в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Предполагается, что эти вещества взаимодействуют с перекисными радикалами липидной природы.

4. Показано, что интенсивность сверхслабого свечения сыворотки крови животных и человека подавляется при наличии у них злокачественных опухолей по сравнению со здоровым организмом.

5. Методом ингибирования реакции ЭХЛ изучено изменение АОА сыворотки крови, показано, что при росте злокачественных опухолей как у экспериментальных животных, так и у человека суммарная активность ингибирующих веществ повышается и не носит при этом специфического характера.

6. Методом ионообменной хроматографии, ультрацентрифугированием в градиенте плотности и экстрагированием органическими растворителями установлено, что ингибирующие вещества — антиоксиданты имеют липидную природу и относятся к группе фосфолипидов.

7. Выявлена корреляция между интенсивностью сверхслабого свечения и антиокислительной активностью сыворотки крови при росте злокачественных опухолей.

Список опубликованных научных работ по теме диссертации:

1. Закарян А. Е., Тарусов Б. Н. Ингибирование хемилюминесценции плазмы крови при злокачественном росте. «Биофизика», 1966, № 5.

2. Закарян А. Е., Тарусов Б. Н. Изучение сверхслабого свечения сыворотки крови при злокачественном росте. «Биофизика», 1967, № 3.

3. Закарян А. Б., Тарусов Б. Н. Исследование антиокислительной активности фракцией сыворотки крови ингибированием хемилюминесценции при малигнизации. «Биофизика», 1967, № 4.

4. Закарян А. Е., Тарусов Б. Н. Исследование сверхслабого свечения больных раком. «Бюл. МОИП», 1967 (в печати).

5. Закарян А. Е., Тарусов Б. Н. Сверхслабое свечение сыворотки крови при развитии злокачественных опухолей. Тезисы докладов симпозиума «Физико-химические механизмы злокачественного роста». Изд. МОИП, 1967.

6. Закарян А. Е., Кочур Н. А., Тарусов Б. Н. О сверхслабой хемилюминесценции сыворотки крови онкологических больных. Тезисы докладов симпозиума «Физико-химические механизмы злокачественного роста». Изд. МОИП, 1967.

7. Закарян А. Е., Иванов И. И., Кочур Н. А., Тарусов Б. Н. Изменение ингибирующей активности сыворотки крови у Е-авитаминозных и гипervитаминозных крыс при раке. Тезисы докладов симпозиума «Физико-химические механизмы злокачественного роста». Изд. МОИП, 1967.

296244

Центральная научная
библиотека
Академии наук МССР

8. Закарян А. Е., Мкртчян Р. Г., Петросян Э. П., Коваленко Т. А. Изменение хемилюминесценции переживающих тканей в норме и при некоторых патологических состояниях. Тезисы докладов симпозиума «Физико-химические основы авторегуляции в клетках». Изд. МОНП, 1965.

9. Мкртчян Р. Г., Закарян А. Е. и др. Некоторые вопросы сверхслабого свечения митохондрий в печени при злокачественных новообразованиях и лучевом поражении. Тезисы докладов симпозиума «Физико-химические основы авторегуляции в клетках». Изд. МОНП, 1965.

Сдано в набор 3/VII 1967 г.

Л-42054. Формат 60×90^{1/16}

Физ. печ. л. 1,25.

Подписано к печати 30/VI 1967 г.

Зак. 229. Тираж 200 экз.

Издательство Московского университета, Москва, Ленинские горы
Административный корпус

Типография Изд-ва МГУ (филиал), Москва, проспект Маркса, 20