

УДК 519.9

Ящук В.М.¹, проф
Терентьєва Ю.Г.¹, к.ф.-м.н., доц..
Штонь І.О.² пров. інж.,
Коваль Ю.В.¹ асист.
Сніцерова О.М.¹, студ.
Гамалія М.Ф.², проф.

V. M. Yashchuk¹, Prof
Y.G. Terent'yeva¹, PhD
I.O. Shton², lead. Eng,
Ju. V. Koval¹, ass. Prof
O.M. Snitserova¹, stud.
M.F. Gamaliya², Prof.

Особливості УФ-спектрів поглинання лімфоцитів

Some peculiarities of the lymphocytes UV-absorption spectra

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13, ¹e-mail: juliaTer@i.ua

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01601, Kyiv, Volodymyrska st. 64/13, ¹e-mail: juliaTer@i.ua

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45

²R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, 03022 Kyiv, 45 Vasylykivska St.,

Вперше виміряні спектри оптичного поглинання лейкоцитарної маси здорової людини та лейкоцитарної маси від хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ). Проаналізовано спектральний прояв окремих біологічних компонент (білків, нуклеїнових кислот, коферментів), що входять до складу лейкоцитів і впливають на інтегральну форму спектру в обох випадках. Серед проаналізованих вище біохімічних речовин короткохвильовий максимум при 215 нм має тільки РНК. Близьке до нього значення короткохвильового максимуму спектру поглинання мають білок і коензими – 212 нм та ДНК – 208 нм. Встановлено, що спектри лейкоцитарної маси від здорових донорів та хворих істотно відрізняються. Головний внесок у спектр поглинання лейкоцитарної маси у хворих на В-ХЛЛ вносить рибонуклеїнова кислота (РНК). Факт наявності вказаної відмінності може в перспективі виявитись корисним в якості додаткового показника для встановлення діагнозу В-ХЛЛ.

Ключові слова: спектр поглинання, лімфоцит, РНК, В-клітинний хронічний лімфолейкоз

For the first time the optical absorption spectra of leukocytes from healthy humans and from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) were measured. Spectral manifestations of individual biological components (proteins, nucleic acids, nucleotides) that are constitutive parts of the white blood cells and affect the integral form of the spectrum are analyzed. Among the analyzed above biochemical substances shortwave maximum at 215 nm has only RNA. Close to the maximum value to shortwave absorption spectrum with protein and coenzyme - 212 nm and DNA - 208 nm. The spectra of leukocytes from healthy donors and patients differ significantly. The main contribution to absorption spectra of the leukocyte mass from patients with B-CLL makes ribonucleic acid (RNA). According to results of the research, a presumable cause of established differences in UV absorption spectra of leukocytes from healthy persons and patients with B-CLL is in the latters of large quantities RNA. The presence of these differences could potentially be useful as an additional indicator for the diagnosis of B-CLL.

Key Words: absorption spectrum, lymphocytes, RNA, B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Статтю представив д.ф.-м.н., проф. Макарець М. В.

1. Вступ

Спектроскопічні методи мають ряд переваг перед іншими методами медико-біологічного

аналізу, а саме: неінвазивність, швидкість, наочність, відсутність потреби у дорогих хімічних реагентах [1].

Більшість біологічних молекул не поглинає світла в видимій області, проте демонструє потужні смуги поглинання в ультрафіолетовій частині спектру. Біологи надають перевагу дослідженням УФ-поглинання для визначення ступені чистоти ДНК, РНК, протеїнів у зразку. Оцінюючи, наприклад, у спектрі поглинання ДНК інтенсивність максимуму при 260 нм, можна кількісно визначити її концентрацію. Цей метод не є, звичайно, абсолютно точним, проте він дуже широко застосовується завдяки своїй простоті, швидкості отримання результату, високій чутливості і невеликій кількості потрібного матеріалу.

Тому комплексні можливості спектроскопії, в тому числі аналіз УФ-спектрів поглинання біологічних тканин, є перспективними в застосуванні в області медичної діагностики, зокрема, онкозахворювань.

Можна стверджувати, що за 100 років, що пройшли від часів першої ідентифікації В-клітинного хронічного лімфолейкозу (В-ХЛЛ) як окремої хвороби, знань про фізіологію лейкоцитних клітин накопичилось дуже багато. Нажаль, ця хвороба займає чільне місце серед онкогематологічних захворювань і діагностується переважно у людей похилого віку (починаючи від 60 років), коли ефективність роботи імунної системи людини і без того суттєво знижується [2].

Проте, незважаючи на довгу історію вивчення, а також на доступність клітин лімфоцитів для проведення широкопланових експериментальних досліджень, природа виникнення цього захворювання досі не до кінця зрозуміла.

Схема гемопоезу, згідно якої зі стовбурових клітин кісткового мозку утворюються різні клітини крові, зокрема, і В-лімфоцити, є складним процесом, що включає в себе послідовне кількоступеневе перетворення клітини. Для нас в даному розгляді важливим є те, що початок цього ланцюгу перетворень знаходиться у кістковому мозку, а кінець - у крові, де лімфоцит в нормі живе протягом кількох діб і потім руйнується. В-лімфоцити у хворого на В-ХЛЛ відрізняються від цих клітин здорової людини тим, що на певному етапі свого розвитку вони нібито завмирають і перестають «старіти». В такому стані вони знаходяться дуже довго – до двох місяців, поки, нарешті, гинуть. Оскільки кістковий мозок продовжує продукувати нові злоякісні лімфоцити, їх

загальна кількість в крові стає дуже великою ($>10^{10}/л$). Слід додати, що такі клітини не виконують свої нормальні імунзахисні функції.

Можливості спектроскопії є досить потужними як для деталізації структури біологічних речовин, так і з для отримання висновків щодо їх інтегральних властивостей. Спектри поглинання та свічення окремих складових біологічних клітин вивчені докладно див., наприклад, [3]. На сьогодні зроблені перші скромні спроби використати абсорбційну та аутофлуоресцентну спектроскопію для того, щоб проаналізувати патологічно змінені клітини як цілісний, живий об'єкт. Дана робота полягає саме в такому спектральному підході, спрямованому на вивчення значущої відмінності між патологічно зміненими та нормальними лейкоцитами і на ідентифікацію можливих біохімічних складових, що формують досліджувані спектри.

2. Матеріали та устаткування

Матеріал для аналізу (патологічно змінені і нормальні клітини) був одержаний за сприяння Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ. Виділення лейкоцитів із цільної крові людини здійснювалось шляхом сепарування її на центрифугі у градієнті щільності феколурографіну з подальшим триразовим відмиванням клітин у фізіологічному розчині Хенкса. Концентрація лейкоцитів у досліджуваних розчинах NaCl (фізрозчин) складала 10^6 клітин/мл. Від моменту приготування зразка до отримання спектрів проходило від 15 до 30 хвилин. На момент запису спектрів $\sim 90\%$ клітин були живі. Розчини біохімічних сполук (ДНК, РНК, NAD, NAD-H, NADP, NADP-H) люб'язно надані Інститутом молекулярної біології та генетики (ІМБГ).

Спектри поглинання одержані на серійному двопробному спектрофотометрі Specord UV-VIS. Запис спектрів поглинання розчинів проводився в стандартних кварцевих кюветах товщиною 1 см (діапазон пропускання 170-1000 нм). Похибка запису хвильових чисел становила за паспортом 20 см^{-1} . Значення оптичної густини визначалось з точністю до 1% довжини оптичної шкали в режимі запису поглинання, тобто (від 0 до 1,4) – 0,02.

Всі отримані спектри поглинання розчинів біохімічних сполук ДНК, РНК, NAD, NAD-H,

NADP та NADP-H, наведені в даній статті, мають гарне співпадіння з відповідними спектрами, відомими з літератури, в області 220-400 нм. Однак, в літературі майже відсутні дані поглинання вказаних біохімічних сполук для діапазону 190-220 нм.

3. Порівняльний аналіз спектрів поглинання лейкоцитів з крові здорових донорів і лейкозних хворих

Слід зауважити, що під час досліджень спектрів лейкоцитарної маси хворих з підтвердженим діагнозом В-ХЛЛ було використано більше десяти різних зразків, взятих у хворих різної вікової категорії на різних стадіях захворювання. Спектри поглинання усіх зразків мали однакову характерну форму, що дає нам підстави для наступного аналізу. На рис. 1 наведено УФ спектр поглинання лейкоцитарної маси,

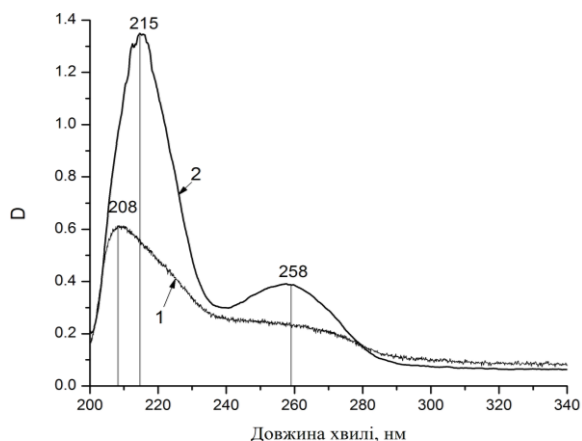


Рис. 1. Спектр поглинання лейкоцитарною масою здорової людини (кр. 1) та хворої на В-ХЛЛ (кр. 2).

отриманої від здорової людини (крива 1) та від хворої на В-ХЛЛ (крива 2). Спектр поглинання лейкоцитів в УФ-області має характерну «двогорбу» форму, з максимумами в області 215 нм та 260 нм. Проте, помітна суттєва відмінність у співвідношеннях інтенсивностей коротко- та довгохвильового максимумів на кривих 1 і 2: у лейкоцитарної маси від здорової людини воно складає 6:2,5, від хворої – 7:2.

Оскільки в крові у хворого на В-ХЛЛ накопичуються саме В-лімфоцити, а в крові здорової людини в нормі знаходяться в більшості Т-лімфоцити, для більш коректного порівняння спектрів поглинання лейкоцитарна маса здорової людини була розділена (методом розеткування на еритроцитах барана) на

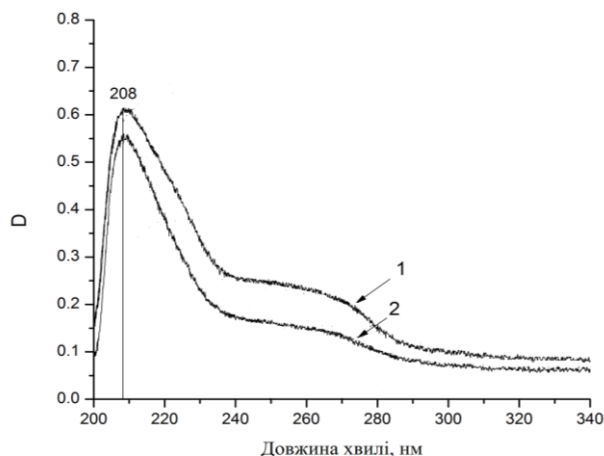


Рис. 2. Спектри поглинання лейкоцитарної маси (кр. 1) та В-лімфоцитів (кр. 2) здорової людини.

субпопуляції Т та В-лімфоцитів. На рис. 2 наведено спектри поглинання В-лімфоцитів та суцільної лейкоцитарної маси, одержаних з крові здорового донора. Аналіз цих спектрів дає можливість зробити наступні, важливі для нашого дослідження висновки.

1. В обох спектрах короткохвильовий максимум (208 нм) співпадає;

2. Обидва спектри мають довгохвильову смугу в області 240-265 нм, без яскраво вираженого максимуму.

3. Отже, можна припустити, що головною складовою, що формує спектр лейкомаси, є В-лімфоцити, бо подібність кривих 1 та 2 очевидна. Тому, враховуючи складність процесу розділення лейкоцитарної маси на Т та В компоненти для проведення первинного якісного порівняння спектрів поглинання В-клітин у зразках крові від хворих і здорових людей достатньо у першому наближенні використовувати спектри цільної лейкоцитарної маси.

4. Аналіз спектральних властивостей біохімічних складових, що формують спектри лейкоцитарної маси.

В ближній УФ області (190-360 нм) поглинають молекули, що мають ароматичні складові, в яких наявні делокалізовані π -електронні системи. Саме ці оптичні центри є визначальними для електронних спектрів, зокрема, поглинання біологічних об'єктів. π -електронвісні системи локалізовані в окремих хромофорних групах. У протеїнах це – ароматичні амінокислоти (триптофан, фенілаланін, тирозин), У ДНК та РНК це –

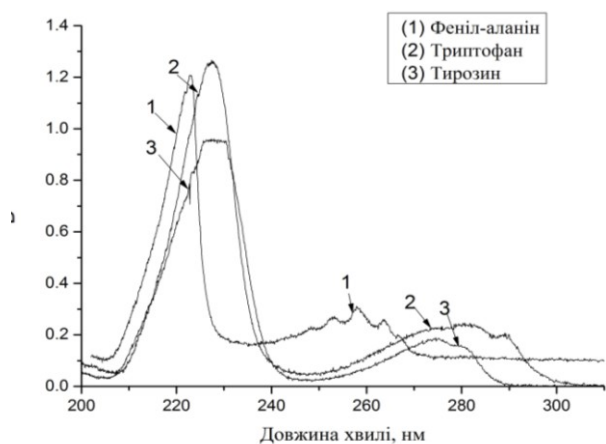


Рис. 3. Спектри поглинання ароматичних амінокислот.

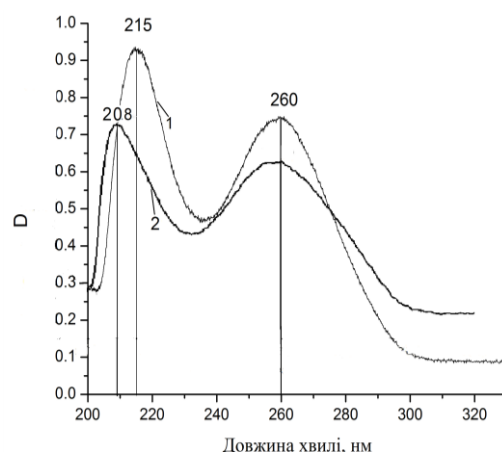


Рис. 5. Спектр поглинання РНК (кр. 1), ДНК (кр. 2).

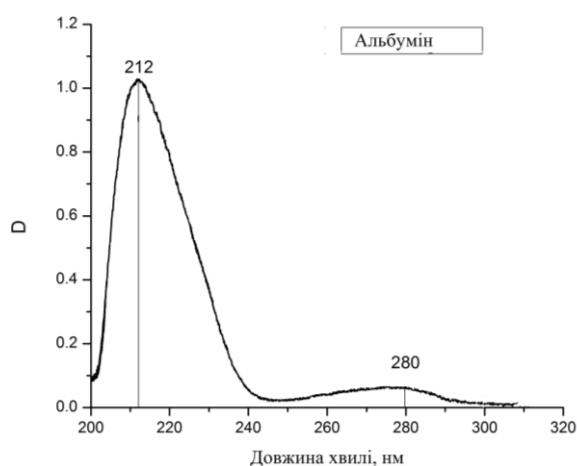


Рис. 4. Спектр поглинання людського альбуміну

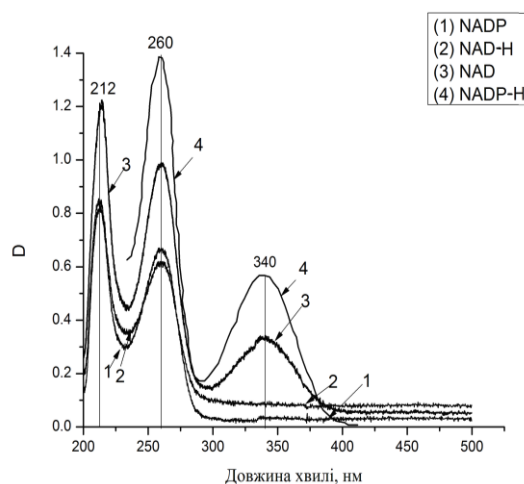


Рис. 6. Спектри поглинання коферментів.

нуклеотиди. Такі π -електронні системи наявні в структурі коферментів NAD, NADH, NADP та NADPH.

Джерелом смуги поглинання білків у довгохвильовій частині спектру з максимумом в області 230-290 нм є циклічні хромофори – ароматичні кільця амінокислот. Спектри мають чітко виражену коливальну структуру, характерну для бензолу, яка серед ароматичних амінокислот найбільш явно помітна у спектрі феніл-аланіну (рис. 3). В роботі [4] було показано, що домінуючий вклад в поглинання протеїнів в цій області дає триптофан. Тому в довгохвильовій частині УФ-спектру поглинання білків домінує смуга 280 нм (рис. 4).

Короткохвильовий максимум спектрів поглинання усіх ароматичних амінокислот забезпечується другим електронним переходом у відповідних ароматичних хромофорах та електронними

переходами в лінійних хромофорах пептидних груп і лежить в межах 215-230 нм. Проте, оскільки в молекулі білка хромофорні групи залишків амінокислот з'єднані між собою безпосередньо, це призводить до гіпсохромного зсуву короткохвильового максимуму в спектрі білка порівняно з відповідними максимумами спектрів окремих амінокислот, залишки яких входять до складу білка. В результаті, білки мають потужну смугу поглинання з максимумом при 212 нм (рис. 4).

В спектрі зразка лімфоцитів від хворого на В-ХЛЛ (рис. 1) білкових смуг в явному вигляді немає (хоча, при невеликій інтенсивності вони швидше за все представлені у вигляді мінорної компоненти).

Максимум поглинання в області 260 нм, що стійко спостерігається в усіх пробах лімфоцитів від хворих на В-ХЛЛ, є характерними для РНК і

ДНК (рис. 5), а також коензимів NAD, NAD-H, NADP та NADP-H, які присутні в живій клітині (рис. 6). Смуга поглинання в області 260 нм у досліджених патологічно змінених клітин є чіткою, хоча і доволі широкою, її максимум має тенденцію до стійкого зміщення (до 5 нм) в бік коротких довжин хвиль.

Щодо NAD та NADP-H, то вказані речовини є активними учасниками внутрішньоклітинного окисно-відновного обміну, і для цих речовин є характерними максимуми поглинання ще і в довгохвильовій області УФ-діапазона (близько 340 нм), які на спектрах поглинання живих клітин (рис. 1) не проявляються зовсім. Отже, їх спектральний прояв у спектрах поглинання лімфоцитів можна вважати нехтовним.

Серед проаналізованих вище біохімічних речовин короткохвильовий максимум при 215 нм має тільки РНК. Близьке до нього значення короткохвильового максимуму спектру поглинання мають білок і коензими – 212 нм та ДНК – 208 нм.

Таким чином, проаналізувавши можливі складові спектру поглинання лімфоцитів у хворої на В-ХЛЛ людини, можна зробити припущення, що злоякісні клітини демонструють присутність відносно більшої кількості молекул РНК.

Існують дані див., наприклад, [4], згідно яких інтенсивність спектрального максимуму ДНК при 260 нм (рис. 6) залежить від наявності і кількості кисню в клітині: чим бідніша клітина на кисень, тим максимум вищий. В світлі цих даних отримана нами різниця в інтенсивності максимуму при 260 нм між нормальними і злоякісними лейкоцитами (рис. 1) може бути пов'язана з відомим відмінним характером окисно-відновного обміну пухлинних клітин.

Слід зазначити, що спектри поглинання нормальних та злоякісних лейкоцитів мають суттєві відмінності. Короткохвильовий максимум спектру нормальних клітин (рис. 1) гіпсохромно зміщений на 7-10 нм по відношенню до відповідного максимуму клітин від лейкозного хворого. Разом з тим в порівнянні з відповідною смугою лейкоцитів хворого, довгохвильове плече спектру поглинання лейкоцитів здорової людини є значно слабшим за інтенсивністю, смуга є доволі широкою, займаючи діапазон 240-280 нм, а максимум практично невиражений. Це може свідчити про радикальне зменшення вкладу РНК, натомість, збільшення впливу ДНК на загальний спектр на фоні загального збагачення клітин киснем.

5. Порівняльний аналіз поглинання лейкоцитів здорового донора, лейкоцитів від хворого на В-ХЛЛ та клітин культури Namalwa

Namalwa є модельною клітинною культурою, що отримана шляхом злоякісної трансформації людських В-лімфоцитів в результаті приєднання до їх ДНК частини ДНК вірусу Епштейна-Барра. Таким чином, В-клітини отримали невластиву їм здатність активно ділитися. На рис. 7 наведено спектри поглинання лейкоцитів від здорової людини, від хворої на В-ХЛЛ та клітин культури Namalwa. Особливістю спектру поглинання

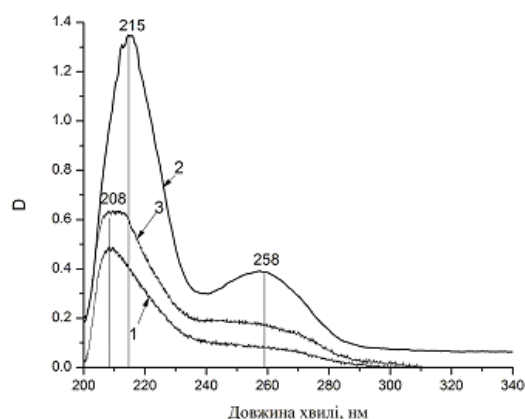


Рис. 7. Спектр поглинання лейкоцитів здорової людини (кр. 1), хворої на В-ХЛЛ (кр. 2), клітинної культури Namalwa (кр. 3).

клітин Namalwa є більш широкою короткохвильова смуга, яка, очевидно, демонструє наявність двох центрів поглинання, яким відповідають дві близько розташовані смуги з максимумами при 208 нм та 215 нм, перший з яких співпадає з максимумом спектру поглинання клітин здорової людини, а другий – хворої. Довгохвильове плече спектру Namalwa схоже за формою на таке у спектрі поглинання клітин від здорової людини. На нашу думку, спектр Namalwa відображає наявність і ДНК і РНК, яка утворюється в клітинах внаслідок їх активного поділу. В той же час, присутність великої кількості РНК (значно більшої, ніж в клітинах Namalwa) в клітинах від хворих на В-ХЛЛ поки не має переконливого пояснення, оскільки ці клітини зовсім не діляться.

Висновки

За результатами проведених досліджень можна зробити припущення, що причиною встановленої відмінності УФ-спектрів

поглинання лейкоцитарної маси здорових людей та хворих на В-ХЛЛ, є наявність в лімфоцитах хворих великої (значно більшої, ніж в клітинах від здорової людини) кількості РНК. Факт

наявності вказаної відмінності може в перспективі виявитись корисним в якості додаткового показника для встановлення діагнозу В-ХЛЛ.

Список використаних джерел

1. Яцук В.М., Ткачук З.Ю., Левченко С.М. та ін.. Люмінесценція протеїнів і полірибонуклеотидів. Можливість спектрального тестування їх взаємодії./ В.М.Яцук, З.Ю. Ткачук, С.М. Левченко та ін.. //Біотехнологія -2012. –т. 5, N 4, С. 104-111.
2. Глузман Д.Ф. Диагностическая онкогематология / Д.Ф.Глузман, Л.М. Складенко, В.А. Надгорная– Киев: ДИА, 2011.-253с.
3. Тюкавкина Н.А. Биоорганическая химия / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков - Москва: «Медицина», 1991.- с. 274
4. Rupak D. Spectrophotometric analysis of nucleic acids: oxygenation-dependant hyperchromism of DNA / Rupak Doshi, Philip J. R. Day, Paolo Carampin, Ewan Blanch, Ian J. Stratford, Nicola Tirelli // Anal Bioanal Chem.- 2010.- Vol. 396. - pp.2331–2339
5. Yashchuk V. Optical Response of the Polynucleotides-Proteins Interaction /Yashchuk V., Kudrya V., S. Levchenko, Z. Tkachuk, D.Hovorun, V.Melnyk, V.Vorob'yov, G.Klishevich// Mol. Cryst. Liq. Cryst.- Vol. 535.- pp. 93–110, 2011
6. Lacowicz R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. / R.Lacowicz//NY: Sprin. ger Science, 2006.
7. Yashchuk V. The nature of the electronic excitation capturing centers in the DNA / V.Yashchuk, V.Kudrya, M.Losytsky et all // J. Mol. Liq. – 2006. – V. 127, Iss. 1–3. – P. 79– 83.
8. Parsas N. Prasad Introduction to Biophotonics, / N. Prasad. - N.Y. John Wiley @ Sons, 2008, P.77.
9. Яцук В.М. Фотоніка полімерів / В.М.Яцук// - К., ВПЦ "Київський університет", 2004, 112 с.

References

1. YASHCHUK, V. TKACHUK, Z. LEVCHENKO, S. et all. (2012). Luminescenciya proteiniv i polyrybonukleitydiv. Mozhlyvist sprktralnogo testuvannya ih vzayemodii. *Biotehnologija* -V. 5: Iss 4. pp. 104-111.
2. GLUZMAN, D. (2011) *Diagnosticheskaya onkogematologiya*. Kiev: DIA.
3. TUKAVKINA, N., BAUKOV, Yu. (1991) *Bioorganicheskaja himiya*. Moskva: Meditsina.
4. DOSHI, R. DAY, P. CARAMPIN, P. BLANCH, E. STRATFORD, I. TIRELLI, N. Spectrophotometric analysis of nucleic acids: oxygenation-dependant hyperchromism of DNA. *Anal Bioanal Chem.*(2010).Vol. 396: p.2331–2339.
5. YASHCHUK, V. KUDRYA, V., LEVCHENKO, S. TKACHUK, Z. HOVORUN, D. MEL'NIK, V., VOROB'YOV, V., KLISHEVICH, G. (2011) Optical Response of the Polynucleotides-Proteins Interaction. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* V. 535: p. 93–110.
6. LACOWICZ, R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. NY: Springer Science.
7. YASHCHUK, V. KUDRYA, V. LOSYTSKY, M. et al. (2006) The nature of the electronic excitation capturing centers in the DNA. *J. Mol. Liq.* V. 127: Iss. 1–3. p. 79– 83.
8. PRASAD, N. (2008) *Introduction to Biophotonics*. N.Y. John Wiley @ Sons, , P.77.
9. YASHCHUK, V. Фотоніка полімерів (2004) К. "Kyivskij Universytet". P. 112.

Надійшла до редколегії 15.05.2014