

УДК 519.9

Яшук В.М.¹, проф
Терентьєва Ю.Г.², к.ф.-м.н., доц..
Штонь І.О.³ пров. інж.,
Коваль Ю.В.⁴ асист.
Сніцерова О.М.⁵, студ.

V. M. Yashchuk¹, Prof
Y.G. Terent'yeva², PhD, assoc. Prof.
I.O. Shton³, lead. Eng,
Yu. V. Koval⁴, ass. Prof
O.M. Snitserova⁵, stud.

Особливості спектрів люмінесценції лімфоцитів

Some peculiarities of the lymphocytes luminescence spectra

^{1,2,4,5}Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13,
e-mail:¹ yashchukvaleriy@gmail.com

^{1,2,4,5}Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01601, Kyiv, Volodymyrska st. 64/13,
¹e-mail: yashchukvaleriy@gmail.com

³Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45
e-mail:³ irina_shton@ukr.net

³R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, 03022 Kyiv, 45 Vasylkivska St.
e-mail:³ irina_shton@ukr.net

Вперше отримані спектри люмінесценції лейкоцитарної маси здорової людини та лейкоцитарної маси від хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) при кімнатних температурах і температурі рідкого азоту(78К). Проаналізовано спектральний прояв окремих біологічних компонент (білків, нуклеїнових кислот, коферментів), що входять до складу лімфоцитів і впливають на інтегральну форму спектру в обох випадках. Спектри флюоресценції для здорових і патологічно змінених клітин при кімнатних температурах практично ідентичні. Отже, такі спектри не можуть застосовуватись в діагностичних цілях. Спектри фосфоресценції для клітин отриманих від здорових і хворих на В-ХЛЛ донорів при низьких температурах істотно відрізняються. Головний внесок у спектри люмінесценції лейкоцитарної маси у хворих на В-ХЛЛ дають скоріше за все нуклеїнові кислоти (РНК,ДНК). Можна зробити припущення, що внесок РНК є домінуючим, що і зумовлює зміни в спектрах, які настають внаслідок онкологічної патології.

Ключові слова: спектр люмінесценції(флюоресценції, фосфоресценції), лімфоцит, РНК, В-клітинний хронічний лімфолейкоз.

For the first time the optical luminescence spectrum of the lymphocytes from healthy humans and from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) at the room temperature and the temperature of the liquid azote(78K) were obtained. 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. Fluorescence spectra for normal and pathological modified cells at room temperature are almost identical. Therefore, these spectra can not be used as a diagnostic tool. Phosphorescence spectra for cells obtained from healthy donor and patients with B-CLL at low temperatures are significantly different. According to results of the research, a presumable cause of established differences in luminescence spectra of lymphocytes from healthy persons and patients with B-CLL is in the latters of large quantities RNA and possibly DNA. One can assume the dominant contribution of RNA, which causes changes in the spectra, occuring as a result of cancer.

Key Words: luminescence spectrum(fluorescence, phosphorescence), lymphocytes, RNA, B-cell chronic lymphocytic leukemia.

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

Традиційний підхід до вивчення процесів, які відбуваються у клітинах живих організмів, полягає у використанні барвників, що взаємодіють з певними біологічними молекулами або складовими клітини, та візуальної фіксації такої взаємодії з допомогою мікроскопів. Такий метод потребує доволі дорогих реактивів, великого досвіду візуальної ідентифікації патології в клітинах, і, нажаль, не є 100%

надійним. В той же час, досвід показує, що люмінесцентна спектроскопія може стати альтернативним методом діагностики патології клітини, оскільки може надати не лише загальну інформацію про клітину, а й детальну - про її молекулярний склад, наявність чи відсутність певних центрів випромінювання, що, в свою чергу, пов'язане з наявністю або відсутністю певних патологій. Люмінесцентна спектроскопія в поєднанні з

абсорбційною спектроскопією [1] має ряд переваг перед іншими методами медико-біологічного аналізу: неінвазивність, швидкість, наочність, відсутність потреби у дорогих хімічних реагентах.

Дана робота полягає в такому спектральному підході, а саме, в аналізі патологічно змінених клітини як цілісного, живого об'єкту.

Експериментальні дослідження та матеріали

В якості досліджуваних клітин використано лімфоцити людини, виділені з крові здорових донорів та хворих на великий хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ). Метою роботи було отримання та аналіз спектрів флюоресценції та фосфоресценції цих клітин при кімнатній температурі і при 78 К, ідентифікація можливих біохімічних складових, що формують досліджувані спектри та визначення спектральних відмінностей між патологічно зміненими та нормальними лімфоцитами.

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

Спектри люмінесценції при кімнатній температурі і температурі рідкого азоту вимірювались на серійному спектрофлюориметрі Cary Eclipse (Varian Inc., Agilent Tech.) з використанням криостату Optistat DN (Oxford Instruments); Максимальна роздільна здатність приладу Cary Eclipse - 1,5 нм, що визначається апаратною функцією та найменшою шириною щілини. Але оскільки досліджувані смуги люмінесценції досить широкі (~50 нм), то обрана спектральна ширина щілини для вимірів становила 10 нм. [Геометрична ширина] × [дисперсія приладу], що за рекомендацією виробника становить 1/10 від напівширини смуги випромінювання. Похибка визначення інтенсивності не перевищує 1%. Для врахування спектральної чутливості ФЕП, що використовується у флюориметрі, у програмному

забезпеченні приладу передбачена можливість корекції спектрів за рахунок врахування кривої чутливості. Для спектральних вимірювань використовували стандартні кварцеві кювети розміром 1×1 см.

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.

Люмінесценція лейкоцитів при кімнатних температурах

Як відомо, лейкоцитами здорової людини містять в собі лейкоцити різного типу, в тому числі Т, та В-лімфоцити. Навпаки, у крові хворого на В-ХЛЛ накопичуються у величезній кількості (> 10^{10} /л) саме В-лімфоцити [2]. Для проведення коректного аналізу спектральних властивостей потрібно порівнювати між собою спектри клітин однакового типу. Тому з лейкоцитарної маси крові здорового донора були виділені В-лімфоцити (методом розеткоутворення на еритроцитах барана). В результаті, лейкоцитарна маса була розділена на дві фракції: в одній знаходились В-лімфоцити, в другій – залишки лейкоцитарної маси після виокремлення В-лімфоцитів. Ми вважаємо, що в останній фракції присутні переважно клітини Т-лімфоцитів і деяка (відносно невелика) кількість інших клітин лейкоцитів, таких, як моноцити,

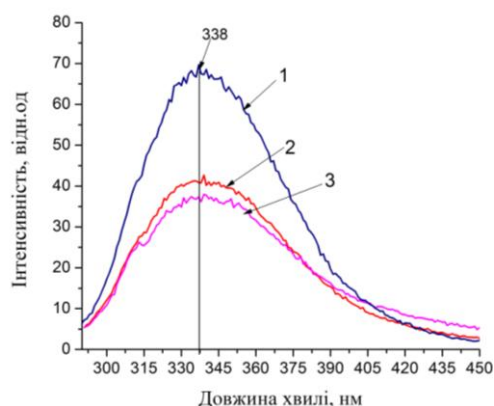


Рис. 1. Спектри флюоресценції лейкоцитарної маси (1), В-лімфоцитів (2), Т-лімфоцитів (3); $\lambda_{\text{сб.}} = 280\text{ нм}$, $T = 293\text{ К}$.

тощо. Це припущення було підтверджено шляхом традиційного контролю складу клітинного препарату за допомогою мікроскопу. Для цільної лейкоцитарної маси здорових клітин та для її фракцій, які складаються з переважно В та Т лімфоцитів були отримані спектри флюоресценції при кімнатній температурі

(рис. 1). Як видно, форми спектрів (кр. 1 та кр. 2) абсолютно ідентичні. Це дає можливість зробити висновок, що в подальшому є доволі коректним проведення порівняльного аналізу спектрів

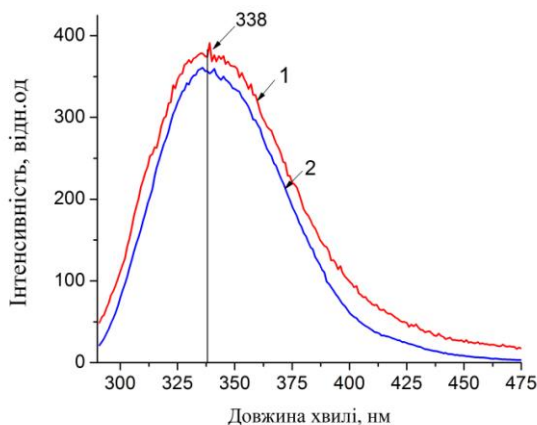


Рис. 2. Спектри флюоресценції при $T=300\text{K}$ здорових лімфоцитів (1) і лейкоцитів хворого на В-ХЛЛ (2); $\lambda_{36} = 280\text{ nm}$.

лейкомаси від пацієнта хворого на В-ХЛЛ та здорового донора, використовуючи в обох випадках недиференційовані лейкомаси.

Спектри флюоресценції В-лімфоцитів (рис. 2) демонструють практично ідентичну форму для здорових та патологічно змінених В-клітин; а максимумами, що спостерігаються на довжині хвилі $\lambda_{\text{max}} = 338\text{ nm}$ чітко співпадають з максимумом спектра флюоресценції триптофану [3]. Як наслідок, спектр флюоресценції при кімнатних температурах не дає додаткової інформації про наявність патології всередині клітин, а скоріше за все, характеризує випромінювання клітинних оболонок, до складу яких входять пептиди. Нажаль, при кімнатних температурах випромінювання РНК і ДНК неможливо зареєструвати через дуже малий ($\sim 10^{-9}$) квантовий вихід [4, 5]. Таким чином, ці спектри при кімнатній температурі могли б відобразити лише такі зміни, що відбуваються саме в білковій частині клітини. В живих клітинах присутні коферменти NAD, NAD-H, NADF, NADF-H, відповідальні за окисно-відновлювальні процеси. Спектр флюоресценції як здорових, так і патологічно змінених клітин має максимум на довжині хвилі $\lambda_{\text{max}} = 338\text{ nm}$ (рис. 1, рис. 2), в той час як типовий спектр флюоресценції коферментів (рис. 3) має максимум, розташований в більш довгохвильовій області. Тому їх вклад в спектр флюоресценції лейкоцитів є мінорним, що корелює з результатами [1]. Спектри фосфоресценції лімфоцитів при кімнатних температурах

отримати, нажаль, не вдалось через погане співвідношення сигнал/шум.

З порівняння низькотемпературних спектрів фосфоресценції лейкоцитів здорової людини та спектрів лейкомаси пацієнтів, хворих на В-ХЛЛ

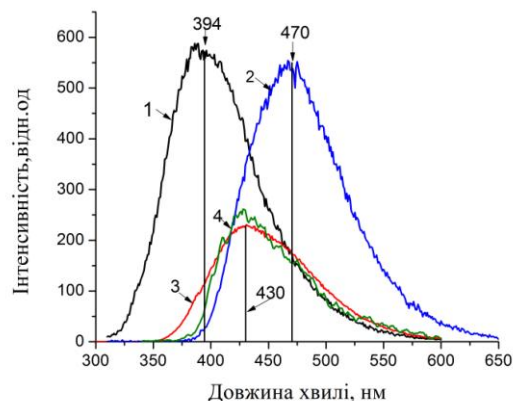


Рис. 3. Спектри флюоресценції при кімнатних температурах ко-ферментів NAD (1), NADH (2) і фосфоресценції при $T = 78\text{ K}$ NAD (3), NADH (4).

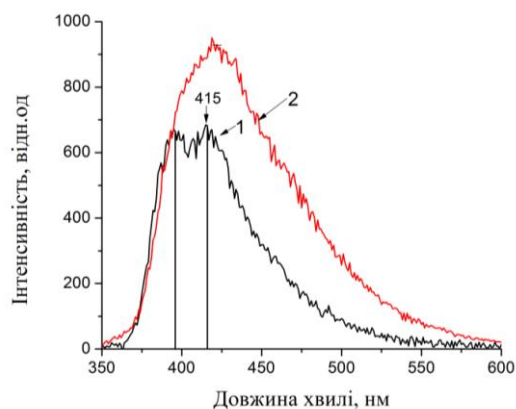


Рис. 4. Спектри фосфоресценції при $T=78\text{ K}$: (1) – В-лімфоцитів здорової людини, (2) – лейкомаси пацієнта, хворого на В-ХЛЛ.

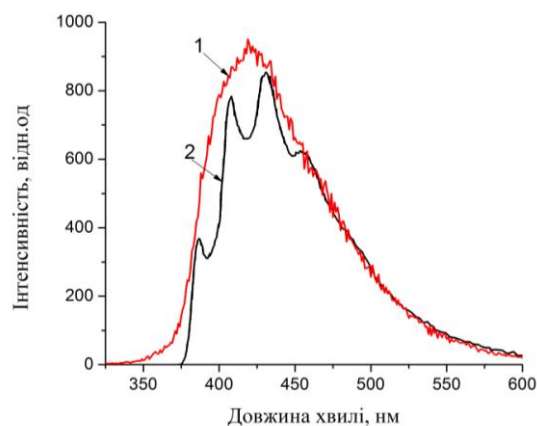


Рис. 5. Спектри фосфоресценції лейкоцитів отриманих від пацієнта, хворого на В-ХЛЛ. $T = 78\text{ K}$, $\lambda_{36} = 230\text{ nm}$ (1) і РНК, $T = 4\text{ K}$ (2) [4].

(рис. 4) впливає: по-перше, спектри відрізняються за формою: два чітких максимуми в спектрі здорових клітин і один – в спектрі патологічно змінених. По-друге, у спектрах патологічно змінених клітин наявне довгохвильове плече, на відміну від спектру фосфоресценції для здорових В-лімфоцитів.

По-третє – максимум зсувається в область більших довжин хвиль. Такі зміни можуть бути спричинені присутністю великої кількості нуклеїнових кислот – ДНК і РНК, що узгоджується з результатами, отриманими в [1]. Спектр низькотемпературної фосфоресценції ДНК є безструктурним [5], а спектр РНК – навпаки має характерну структуру [3,4]. На рис. 5 наведено спектр низькотемпературної фосфоресценції для патологічно змінених клітин і спектр РНК [4]. Можна зробити припущення, що всередині клітини лімфоцита спектрально проявляється комбінація РНК і ДНК, причому РНК, на наш погляд, дає домінуючий внесок,

який і зумовлює зміни в спектрах, що настають внаслідок онкологічної патології.

Висновки

1. Спектри флюоресценції лімфоцитів при кімнатних температурах ідентичні для клітин здорового донора і для патологічно змінених клітин. Такі спектри не можуть застосовуватись з діагностичною метою.
2. Спектри фосфоресценції для здорових клітин і клітин від донорів, хворих на В-ХЛЛ, радикально відрізняються при низьких температурах. Спектр фосфоресценції здорових клітин має два максимуми, що відповідають довжинам хвиль $\lambda_{\max 1} = 395$ нм, $\lambda_{\max 2} = 415$ нм. Спектр патологічно змінених клітин має складну форму, що скоріше за все обумовлено наявністю великої кількості нуклеїнових кислот (РНК) в клітині хворого.
3. Аналіз спектрів фосфоресценції при низьких температурах може виступати як додатковий метод діагностики наявності патології.

References

Список використаних джерел

1. Яцук В.М. Особливості УФ-спектрів поглинання лімфоцитів / В. М. Яцук, Ю. Г. Терентьева, О. М. Сніцєрова, Коваль Ю.В, Штонь І.О// Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка, сер. фіз-мат науки. – 2014. – №3. – С. 291–296.
2. Глузман Д. Диагностическая онкогематология / Д. Глузман, Л. Скляренко, В. Надгорная. – Киев: ДИА, 2011. – 253 с.
3. Yashchuk V.M. Optical response of the Polinucleotid-proteins interaction / V. M. Yashchuk, V.V. Kudrya, S.M. Levchenko, Z.Y. Tkachuk, D.M. Hovorun, V.I. Mel'nik, V.P. Vorob'yov, G.V. Klishevich // Mol. Cryst. Liq. Cryst.– 2011. – Vol. 535. – P. 93–110.
4. Yashchuk V.M. The Peculiarities of the RNA Luminescence / V.Yu. Kudrya, V.M. Yashchuk, S.M.Levchenko, V.I.Mel'nik, L.A.Zaika, D.M.Govorun // Mol. Cryst. Liq. Cryst.- 2008.- Vol. 497.- P.93–100.
5. Yashchuk V.M. The nature of the electronic excitations capturing centres in the DNA/ V. Yashchuk , V. Kudrya , M.Losytskyu, H. Suga, T. Ohul'chanskyu // Journal of Molecular Liquids – 2006.- Vol. 127.- P.79-83.

1. YASHCHUK V.M. et al. (2014) Some peculiarities of the lymphocytes UV-absorption spectra. *Visn., Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ser. Phys.-Math. Science.* 3. p. 291-296.
2. GLUZMAN, D., SKLIARENKO, L. and NADGORNAYA, V., (2011) *Diagnostic onkogematology.* Kyiv:DIA.
3. YASHCHUK, V. et al. (2011) Optical Response of the Polynucleotides-Proteins Interaction. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 535. p. 93–110.
4. YASHCHUK V.M. et al. (2008) The Peculiarities of the RNA Luminescence. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 497. p.93–100.
5. YASHCHUK V. et al. (2006) The nature of the electronic excitations capturing centres in the DNA. *Journal of Molecular Liquids.* 127. p.79–83.

Надійшла до редколегії 26.03.2015