

УДК 535.372

PACS number(s): 78.55.-m

ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРІВ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА СЕЧІ ЛЮДИНИ З МЕТОЮ ДІАГНОСТИКИ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ НИРОК

О. Коваленко, О. Морозов, В. Чорна

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
пр. Гагарина, 72, 49010 м. Дніпропетровськ
e-mail: koval@mail.dsu.dp.ua; morozovs@i.ua*

Досліджено спектри фотолюмінесценції плазми крові та сечі здорових та хворих людей на нефробластому (пухлина Вільмса). Джерело збудження N₂-лазер ($\lambda = 337,1$ нм). Діапазон спектральних вимірювань 350–850 нм, $T = 300$ К. У статті проаналізовані зміни в спектрах фотолюмінесценції. Було також показано, що ці зміни залежать від стадії захворювання.

Ключові слова: спектри фотолюмінесценції, плазма крові, сеча, нефробластома.

Численні літературні дані свідчать про те, що в більшості країн світу простежується невтішна статистика щодо зростання кількості онкологічних захворювань. Так тільки за минулі роки імовірність захворювань на злоякісну меланому шкіри збільшилась у десятки разів [1]. Дотепер остаточний діагностичний висновок відносно онкологічних захворювань може бути зроблений тільки на підставі цитологічних або гістологічних досліджень [2–4], які на жаль не вирішують проблеми швидкого та точного визначення діагнозу на ранніх стадіях розвитку захворювання. Проте, саме це питання останнім часом стає дедалі актуальнішим.

З метою розробки нових методів діагностики онкологічних захворювань на ранніх стадіях фахівці в галузі медицини та оптичної спектроскопії концентрують свою увагу на спектроскопічних дослідженнях біологічних об'єктів: аналіз спектрів фотолюмінесценції (СФ), поглинання, відбиття тощо. Такі дослідження, на нашу думку, можна поділити на три групи. В першій групі досліджуються спектральні властивості таких біологічних об'єктів, в яких, з одного боку, ймовірні онкологічні захворювання, а з другого боку, такі дослідження можна провести безпосередньо, без зайвих проблем. Вдалим прикладом в цьому плані є спектроскопічні дослідження шкіри людини та її новоутворень: пігментного невуса та меланоми. Внаслідок біохімічних змін, що мають місце в новоутвореннях, спектроскопічні дослідження фіксують суттєві зміни оптичних властивостей шкіри здорової людини порівняно з тими ділянками шкіри, де локалізований пігментний невус або меланома [5–8]. До другої групи біологічних об'єктів можна зачислити ті, в яких ймовірні онкологічні захворювання, але безпосередньо спектроскопічні дослідження на них провести неможливо. Однак, ми маємо можливість дослідити оптичні властивості біологічних речовин, які знаходяться з

цим об'єктом або органом у безпосередньому контакті. Така ситуація складається під час діагностики злоякісної пухлини нирок – нефробластоми. Нирки, виконуючи функції своєрідного фільтра плазми крові, виводять зайві речовини з сечею. Тому в разі захворювання нирок діагностику захворювання можливо провести на підставі аналізу оптичних властивостей тих біологічних речовин, з якими нирки працюють, а саме – плазми крові, сечі. Нарешті, до третьої групи біологічних об'єктів, в яких очікують наявність онкологічних захворювань, треба зачислити такі об'єкти, на яких провести спектроскопічні дослідження неможливо, крім того, у фахівців не має можливості вивчити оптичні властивості речовин, пов'язаних функціонально та безпосередньо з роботою цього об'єкта. Такими захворюваннями є, наприклад, пухлини головного мозку. Зрозуміло, що цей орган за своїми функціями безпосередньо не пов'язаний з виділенням сечі та не формує склад плазми крові, але завдяки мозковим рідинам він побічно впливає на склад останньої, і оскільки організм людини є єдиною біологічною системою, то і в цьому випадку можливі вияви захворювання, діагностика яких ґрунтується на підставі аналізу даних спектроскопічних досліджень макроскопічних аналізів. Зрозуміло: аналіз отриманих спектроскопічних даних для такого випадку буде найскладнішим, оскільки зміни оптичних властивостей досліджених біологічних речовин не будуть такими суттєвими порівняно з відповідними змінами оптичних властивостей тих біологічних об'єктів, що належать до першої та другої груп. Швидше за все аналіз оптичних даних тут не може бути зведений до прямого порівняння СФ за формою та інтенсивністю, як це було в [8, 9], він, можливо, потребуватиме розкладу інтегрального СФ на елементарні складові. Для СФ таке завдання вирішується різними методами [10], але вона дуже ускладнюється, коли складовими інтегрального спектра є неелементарні гауссіани. Саме так і відбувається у випадку дослідження СФ біологічних об'єктів.

З огляду на викладене проаналізуємо отримані нами результати щодо біологічних об'єктів другого типу. На першому етапі перед нами було поставлено завдання: розробити такий спосіб доопераційної діагностики злоякісних пухлин нирок у дітей, застосування якого дало б змогу шляхом залучення люмінесцентної спектроскопії плазми крові хворих підвищити об'єктивність та спростити процедуру встановлення первинного діагнозу без необхідності виконання доопераційного морфологічного аналізу. Це своєю чергою дасть можливість уникнути повторних високих променевих навантажень та додаткових стресових ситуацій щодо хворої людини. Діагностували злоякісні новоутворення нирок на підставі зіставлення та аналізу інтегральних СФ плазми крові, який показав, що захворювання приводить до характерного зменшення амплітуди і напівширини смуг, а також до зміни форми спектра в цілому (рис. 1, табл. 1).

Для реєстрації СФ зразків використовували автоматизований оптичний спектральний комплекс, який складається із джерела оптичного збудження (імпульсний газовий N_2 -лазер з $\lambda = 337,1$ нм), автоматичної системи керування монохроматором (МДР-12) та фотоелектричної реєстрації (фотоелектричний помножувач ФЭУ-136, охолоджений до $T = 250$ К, який працював у режимі лічби фотонів). Зразки сечі і плазми крові при $T = 300$ К об'ємом не більш ніж 1 мл розміщені у пробірках, виготовлених з нелегованого високоякісного оптичного кварцу діаметром 5 мм, товщиною стінок 1 мм збуджувались лазерними імпульсами з довжиною хвилі 337 нм тривалістю 8 нс з частотою повторення 100 Гц. Середня потужність збуджувального випромінювання становила 2 мВт. Під час реєстрації СФ сканування за довжинами хвиль у спектральному діапазоні 350–850 нм через 1 нм проводили за допомогою монохроматора, інтенсивність сигналу вимірювали неселективним фотоприймачем з

чутливістю не менше 300 А/лм. Після отримання у такий спосіб СФ зразків проводили подальшу математичну обробку оригінальних спектрів, завдяки якій були отримані усереднені СФ як здорових дітей, так і хворих на нефробластому третьої та четвертої стадії захворювання (рис. 1). Усереднення проводили за трьома точками оригінальних СФ. Перший максимум в СФ усіх зразків 415–437 нм був пов'язаний з матеріалом пробірки, тому в подальшому уваги до нього ми не привертаємо.

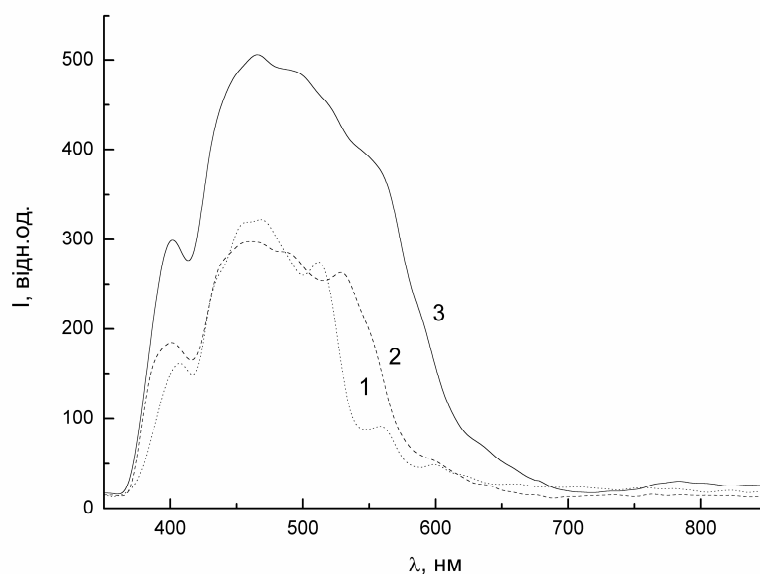


Рис. 1. Усереднені (за трьома вимірюваннями) СФ плазми крові: 1 – на 4-ій стадії захворювання; 2 – на 3-ій стадії захворювання; 3 – здорової дитини

Таблиця 1

Аналіз параметрів усереднених СФ плазми крові

Параметри СФ	Зразки плазми здорових дітей	Зразки плазми дітей хворих на нефробластому	
		3 стадія захворювання	4 стадія захворювання
Довжина хвилі в максимумі випромінювання СФ, нм	468	461	468
Інтенсивність в максимумі випромінювання СФ, відн. од.	505	298	322
Напівширина, нм	190	176	108

На першому етапі дослідження аналізували параметри усереднених СФ (рис. 1, табл. 1). З наведених даних бачимо, що за наявності захворювання на нефробластому інтенсивність СФ плазми крові зменшується в середньому в 1,7 разів, крім того, з подовженням стадії захворювання з боку довгохвильового крила спектру напівширина спектрів зменшується: на 3-ій стадії на 22 нм, а на 4-ій стадії на 52 нм.

На другому етапі аналізували форму оригінальних СФ плазми крові здорових та хворих дітей наведених на рис. 2–3, табл. 2. Аналіз проводили тільки у спектральному проміжку 430–640 нм, незважаючи на те, що СФ реєструвались у більшому спектральному діапазоні.

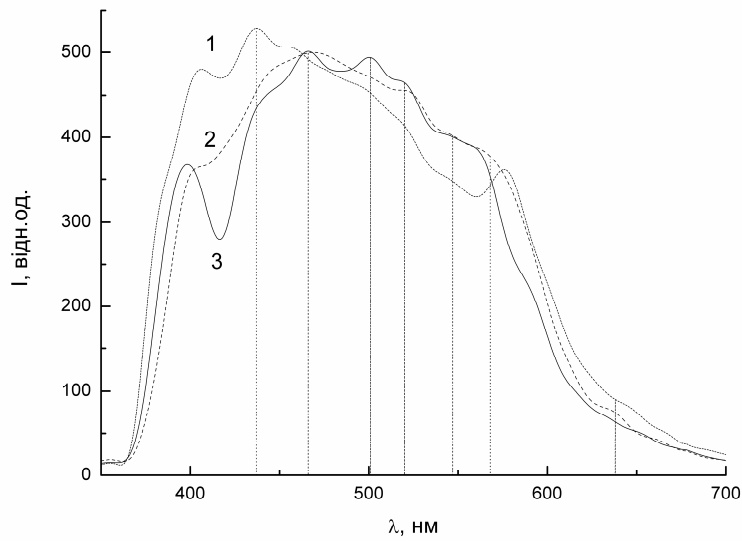


Рис. 2. Оригінальні СФ плазми крові здорових дітей: 1 – стать жін., вік 3 місяці; 2 – стать жін., вік 8 років; 3 – стать чол., вік 7 років

Таблиця 2

Аналіз форми оригінальних СФ плазми крові на наявність структурних максимумів

Максимуми в СФ	Нм												
	437	466		501		520		547		568		638	
Здорових дітей													
Дітей, хворих на нефробластому:													
1) 3 стадія захвор., стать жін., вік 5 років;	436	461	485					530		552		593	637
2) 3 стадія захвор., стать чол., вік 9 років;	442	466	491					528		556		600	637
3) 4 стадія захвор., стать чол., вік 1 рік 1 міс.	436	463				512				558		600	

Таке рішення було зумовлене тим, що, по-перше, в спектральному діапазоні більш ніж на 640 нм точність реєстрації сигналу зменшувалась завдяки погіршенню співвідношення сигнал/шум, по-друге, в діапазоні 350–430 нм реєстрували стабільний максимум, зумовлений передусім кварцовою пробіркою, а не плазмою крові. Якщо вважати спорідненими ті максимуми, які різняться на ± 7 нм, то на підставі аналізу даних, наведених в табл. 2, можна зробити висновок: у розглянутому спектральному діапазоні СФ плазми крові здорових дітей мають 7 максимумів (рис. 2, табл. 2).

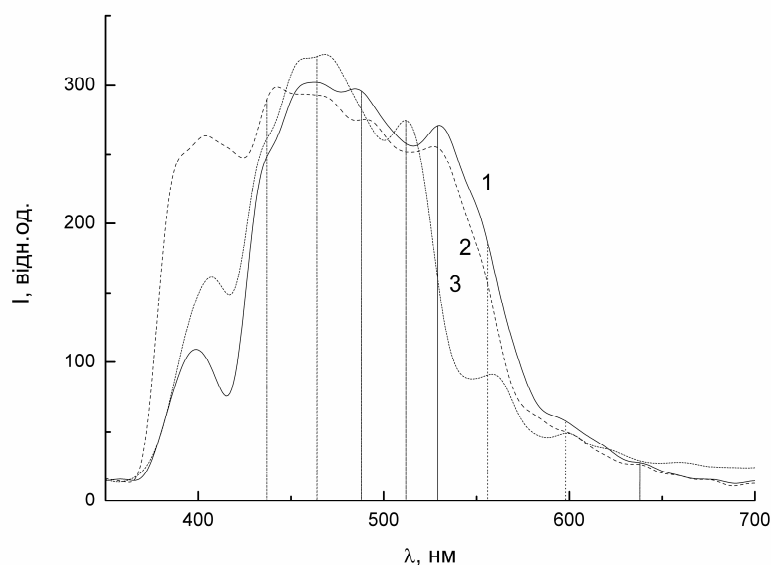


Рис. 3. Оригінальні СФ плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 3-ій стадії захворювання: 1 – стать жін., вік 5 років; 2 – стать чол., вік 9 років; 3 – на 4-ій стадії захворювання, стать чол., вік 1 рік 1 місяць

В СФ плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 3-ій та 4-ій стадії захворювання 4, максимуми з цих семи, а саме – 501, 520, 547 та 638 нм взагалі не спостерігались. Перші 2 максимуми (436–442 та 461–464 нм) реєструвались у всіх СФ, що належать як здоровим, так і хворим дітям. Довгохвильовий максимум (638 нм) реєструвався у всіх СФ, крім спектрів, що належать до плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 4-ій стадії захворювання.

СФ плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 3-ій та на 4-ій стадії захворювання мали сім та п'ять максимумів відповідно (рис. 3, табл. 2). При цьому СФ плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 3-ій стадії захворювання, порівняно зі СФ здорових дітей характеризувались чотирма новими максимумами (рис. 3 криві 1, 2, табл. 2), а саме: 485–491, 528–530, 552–556, 593–600 нм. Порівняно з СФ плазмою крові здорових дітей, СФ дітей, хворих на нефробластому на 4-ій стадії захворювання характеризувались трьома новими максимумами (рис. 3 крива 3, табл. 2): 512, 558, та 600 нм, відповідно.

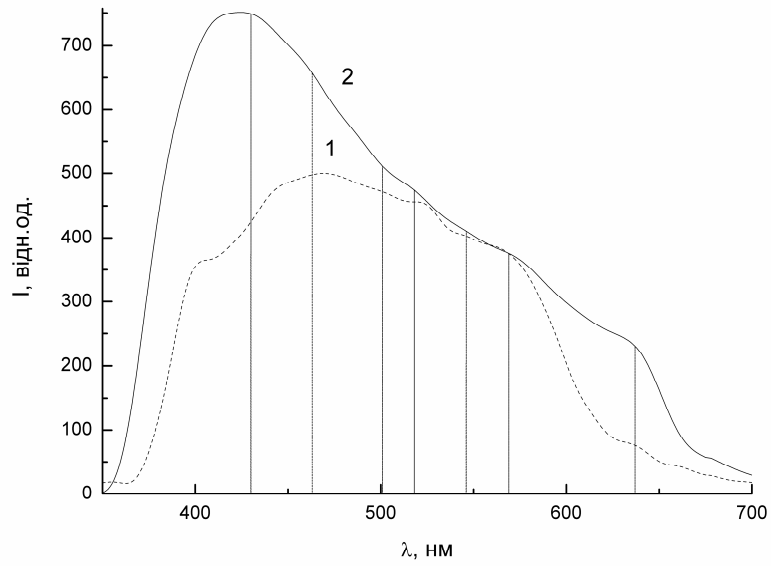
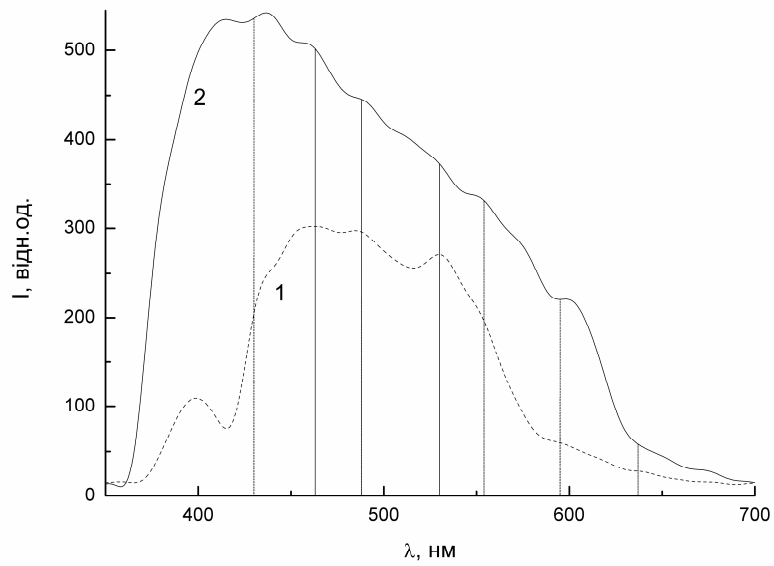
*a**б*

Рис. 4. СФ 1 – плазми крові, 2 – сечі: *a* – здорової дитини пацієнта віком 8 років жіночої статі; *б* – хворої на нефробластому на 3-ій стадії віком 5 років жіночої статі

Треба підкреслити, що смугу випромінювання з максимумом 512 нм реєстрували тільки в СФ плазми крові дітей на 4-ій стадії захворювання, тоді як максимуми 558 та 600 нм реєстрували в СФ плазми крові дітей, хворих на нефробластому як на 3-ій, так і на 4-ій стадії захворювання.

Цікаві спостереження дає порівняльний аналіз СФ плазми крові зі СФ сечі однієї і тієї ж дитини: здорової або ураженої хворобою (рис. 4, *a* та 4, *b*, табл. 3). В СФ плазми крові і сечі здорового пацієнта реєструється 7 максимумів, розташованих в інтервалі довжин хвиль 420–640 нм. Як і раніше, перший максимум у всіх СФ в діапазоні 420–437 нм зумовлений матеріалом пробірки. Інші максимуми в СФ сечі зміщені щодо максимумів СФ плазми крові один від одного не більше ніж на ± 7 нм. Отож простежується той факт, що кожному екстремуму в СФ плазми крові відповідає свій екстремум в СФ сечі.

Таблиця 3

Аналіз форми оригінальних СФ плазми крові та сечі
на наявність структурних максимумів

Максимуми в СФ	Нм											
Плазми крові здорових дітей		437	466		501	520		547		568	638	
Сечі здорових дітей	423		459		501	516		544		569	635	
Плазми крові дітей, хворих на нефробластому на 3-ій стадії		436	461	485			530		552		593	637
Сечі дітей, хворих на нефробластому на 3-ій стадії	424		466	491			530		556		595	637

Така сама картина відповідності спостерігається і в разі хвороби (рис. 4, *b*, табл. 3), тобто, зрозуміло, що СФ плазми крові та сечі подібні. У випадку захворювання інтенсивність випромінювання як СФ плазми крові, так і СФ сечі зменшується. Треба зазначити, що практично на всьому спектральному діапазоні довжин хвиль (окрім ділянки спектра 520–570 нм для СФ здорової дитини – рис. 4, *a*) інтенсивність випромінювання СФ сечі перевищує інтенсивність випромінювання СФ плазми крові. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що в сечі концентрація амонійних з'єднань, відповідальних за екстремуми, більша ніж у плазми крові.

Вищенаведене дає змогу зробити такий висновок: на підставі вимірів СФ плазми крові та сечі потенційно можливо розробити методику експрес-діагностики захворювання на нефробластому. За наявності відповідного програмного забезпечення така діагностика за даними макроскопічних аналізів дозволить отримати необхідну інформацію протягом декількох хвилин.

1. Ганина К. П. Злокачественная меланома и предшествующие ей изменения кожи / К. П. Ганина, Л. А. Налескина. – К. : Наукова думка, 1991. – 168 с.
2. Иконописов Р. Л. Пигментные опухоли / Р. Л. Иконописов. – София : Медицина и Физкультура, 1977. – 268 с.
3. Романенко А. М. Иммуногистохимическая диагностика опухолей почек / А. М. Романенко, А. Ломбарт-Бош // Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека; под ред. Петрова С.В. и Райхлина Н.Т. – Казань : Титул, 2004. – С. 93–100.

4. *Черницький Е.А.* Спектральный люминесцентный анализ в медицине / Е.А. Черницький, Е.И. Слобожанина. – Минск : Наука и техника, 1989. – 141 с.
5. *Clark W. H.* Electron microscope observation of human cutaneous melanomas correlated with their biologic behavior. Melanoma and skin cancer / W. H. Clark, B. Heggeler, R. Bretton // Proc. Int. Cancer Conf. Sydney. – 1972. – P. 121–141.
6. *Rost F.* Fluorescence microscopy and microspectrofluorimetry of malignant melanoma, naevi and normal melanocytes / F. Rost, J. M. Polak // Virchows Arch. A. – 1969. – Vol. 4. – P. 321–326.
7. *Herrmann W. P.* Immunologische Charakterisierung der Tyrosinase von malignen Melanomen, Naevuszellnaevi und klinisch gesunder Haut / W. P. Herrmann // Arch. dermatol. – Forsch. – 1971. – Vol. 1. – P. 65–74.
8. *Демченко М. С.* Використання методу люмінесцентної спектроскопії для діагностики злоякісних пухлин шкіри на прикладі меланоми / М.С. Демченко, О.В. Коваленко, О.С. Морозов // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Фізика і радіоелектроніка. – 2008. – Т. 16, № 2/1. – С. 166–171.
9. *Вінніков А.І.* Дослідження імунологічних реакцій методом лазерної флуоресцентної спектроскопії / А.І. Вінніков, О.В. Коваленко, В.Г. Гаврилюк, А.І. Завацька, О.С. Морозов // Імунологія та алергологія. – 2005. – № 3. – С. 78.
10. *Коваленко А. В.* Методи розкладання спектрів фотолумінесценції кристаллов ZnS:Mn на індивідуальні складові / А.В. Коваленко, А.С. Морозов, Ю.В. Ушаков, Т.А. Прокоф'єв // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Фізика і радіоелектроніка. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 147–152.

INVESTIGATION THE PHOTOLUMINESCENCE SPECTRA OF PLASMA BLOOD AND URINE FOR DIAGNOSTIC OF KIDNEY TUMOUR

A. Kovalenko, A. Morozov, V. Chorna

*Oles Gonchar Dnipropetrovsk National University
Gagarina av., 72, 49010 Dnipropetrovsk
e-mail: koval@mail.dsu.dp.ua; morozovs@i.ua*

It has been investigated the photoluminescence spectra of human plasma blood and urine, which are healthy and fall ill on nephroblastoma (Wilms tumour) The excitation source was N₂-laser ($\lambda = 337,1$ nm). Range of spectrum measure was 350–850 nm, T = 300 K. The paper was present the analysis of change in photoluminescence spectra. It was also shown that this change dependent on stage of disease.

Key words: photoluminescence spectra, plasma blood, urine, nephroblastoma.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И
МОЧИ ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЧЕК****О. Коваленко, О. Морозов, В. Черная**

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара
пр. Гагарина, 72, 49010 г. Днепропетровск
e-mail: koval@mail.dsu.dp.ua; morozovs@i.ua*

Исследованы спектры фотолюминесценции плазмы крови и мочи здоровых и больных людей на нефробластому (опухоль Вильмса). Источник возбуждения N₂-лазер ($\lambda = 337,1$ нм). Диапазон спектральных измерений 350–850 нм, $T = 300$ К. В работе проанализированы изменения в спектрах фотолюминесценции. Было также показано, что эти изменения зависят от стадии заболевания.

Ключевые слова: спектры фотолюминесценции, плазма крови, нефробластома, моча.

Стаття надійшла до редколегії 14.10.2009
Прийнята до друку 06.07.2010