

МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ МЕТОДОМ ЭПР

М.И.Ибрагимова¹, А.И.Чушников¹, В.Н.Моисеев², В.Ю.Петухов¹, Е.П.Жеглов¹

¹Казанский физико-технический институт КазНЦ РАН, ibragimova@kfti.knc.ru

²Клинический онкологический диспансер МЗ РТ

Методом ЭПР исследована венозная кровь 86 больных со злокачественными новообразованиями, локализованными в мочеполовой области. Контрольная группа состояла из доноров (44 чел.), сдающих кровь на станции переливания. В спектрах ЭПР крови онкологических больных обнаружены линии поглощения от метгемоглобина, трансферрина, церулоплазмينا и свободных радикалов. Анализ позволил выявить характерные особенности в спектрах, присущие онкологическим больным. Было установлено, что у более 60% больных интегральная интенсивность сигнала от церулоплазмينا превышает верхнюю границу для контрольной группы и зависит от стадии роста опухоли. При этом концентрация метгемоглобина у ~ 95 % исследованных пациентов находится ниже среднего значения для нормы, и этот параметр также коррелирует со стадией роста опухоли. По нашему мнению, высокий уровень церулоплазмينا в сочетании с низкой концентрацией метгемоглобина у условно здоровых людей может являться показателем для необходимости проведения тщательных обследований на наличие злокачественных новообразований.

В списке причин смертности людей во всем мире онкологические заболевания стоят на втором месте. Несмотря на значительные успехи диагностической медицины, вопросы патогенеза онкологии до сих пор до конца не изучены. Обычно, общее состояние пациента оценивают из анализа крови. Одним из физических методов, который позволяет выявлять патологические изменения в организме по изучению состава крови, является электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) [1]. К преимуществам метода ЭПР можно отнести его высокую чувствительность по сравнению с биохимическими методами, получение одновременной количественной информации о таких белках плазмы крови, как церулоплазмин (Ср) и трансферрин (Тf), а также возможность определения патологических процессов окисления, индуцированных свободными радикалами, как по изменению концентрации метгемоглобина, так и по появлению новых линий в спектрах ЭПР крови, в частности, от гемихромов. Хотя метод ЭПР позволяет регистрировать лишь элементы крови, обладающие парамагнетизмом, оказалось, что они являются одними из показателей, по которым можно судить о состоянии онкологического больного, и метод может быть эффективным в онкологической диагностической практике.

В последнее время большое внимание уделяется изучению изменения концентрации церулоплазмينا при развитии онкологической патологии. Было показано, что концентрация Ср в плазме крови может служить онкомаркером при раке простаты [2,3], раке яичек [4] и раке легких [5]. Существенное изменение концентраций Ср и Тf у лабораторных животных с привитыми раковыми клетками было зарегистрировано также и методом ЭПР [6,7]. Однако, исследования влияния роста злокачественных новообразований на спектры ЭПР крови пациентов в литературе не описаны.

Целью данной работы является изучение возможностей использования метода ЭПР для мониторинга состояния больных со злокачественными новообразованиями.

Забор крови онкологических больных проводился в клиническом онкологическом диспансере. Было исследовано более 86 образцов крови пациентов со злокачественными новообразованиями I-IV стадии роста, локализованными в мочеполовой области (33 пациента с раком мочевого пузыря, 29 пациента – с раком почки, 24 пациента с раком простаты и яичка).

В качестве контрольной группы (44 чел.) были выбраны доноры, сдающие кровь на станции переливания.

Одинаковое количество венозной крови (0,7 мл), содержащей гепарин для предотвращения сворачивания, помещалось в инсулиновые одноразовые шприцы и замораживалось в жидком азоте. Спектры были записаны на ЭПР спектрометре «Varian E-12». Замороженные в жидком азоте образцы крови, извлекались из шприцев и быстро перемещались в кварцевый дьюар с жидким азотом, который устанавливался в резонатор спектрометра. Все спектры регистрировались при одинаковых режимах на частоте 9,38 ГГц при мощности микроволнового излучения 50 мВт. Для проведения количественной обработки спектров при каждом измерении записывался спектр от эталонного образца (антрацита) с известным g-фактором.

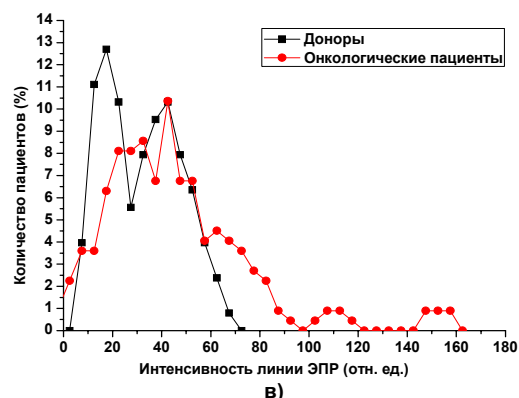
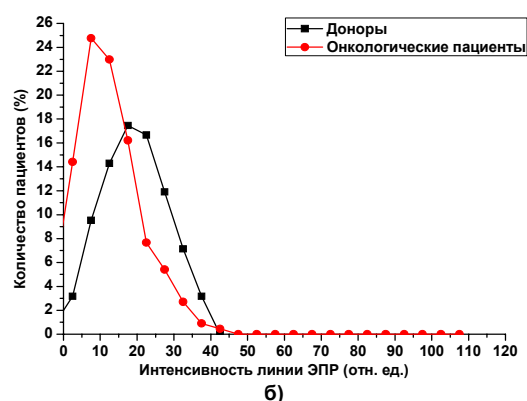
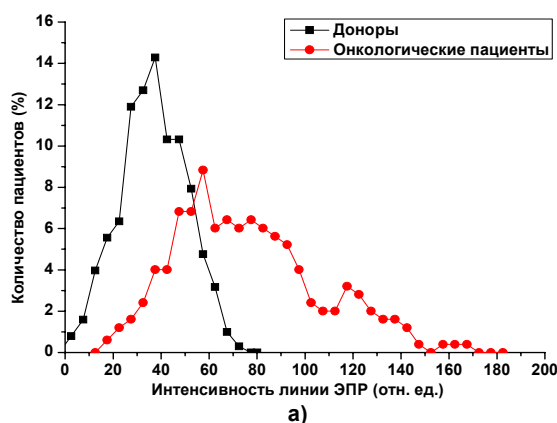


Рис.1. Статистическая обработка ЭПР - спектров крови онкологических пациентов и доноров: церулоплазмин (а), метгемоглобин (б), трансферрин (в). Температура регистрации 77 К

Поскольку в данных экспериментах ширина и форма линий от образцов одинакового объема оставалась неизменной, количественный анализ спектров проводился по измерению интенсивностей соответствующих сигналов от производной линии поглощения.

Типичный спектр ЭПР крови онкологических больных, содержит четыре основные линии от метгемоглобина (MetHb с $g \sim 6$), трансферрина (Tf с $g \sim 4,3$), церулоплазмина (Cp с $g \approx 2,056$) и свободных радикалов (R с $g \approx 2,003$) [1,8]. Следует отметить, что ни в одном из спектров ЭПР крови онкологических больных не были обнаружены сигналы от гемихромов, которые были зарегистрированы у 70 % исследованных нами доноров. Кроме того, в спектрах не зарегистрированы и дополнительные линии поглощения от Mn^{2+} ($g=2,14$), Mo^{5+} , Fe^{2+} ($g=2,44$), FeS-NO ($g=2,03$), наблюдаемые авторами [9] в крови крыс после прививки им саркомы С-45.

На рис.1 а-в приведены результаты обработки спектров ЭПР крови для больных со злокачественными новообразованиями и соответствующие данные для исследованной нами контрольной группы доноров крови.

Как видно из рис. 1 а, одной из характерных особенностей для всех исследованных онкологических больных является наличие

достаточно высокого уровня церулоплазмينا в крови. Ср - это медьсодержащий гликопротеид, с аминокислотными остатками молекулы которого связано 6 атомов меди, причем два из них диамагнитны. Отметим, что методом ЭПР регистрируется лишь парамагнитная фаза данного белка. При данной выборке более чем для 60% больных интенсивность сигнала от Ср превышает его верхний предел для нормы. Максимальное превышение уровня Ср относительно верхнего предела (в 2,5 раза) зарегистрировано при раке почки IV стадии с метастазами в лимфатических узлах и брюшной полости. Выявлена зависимость концентрации церулоплазмينا от стадии роста опухоли: при I-II стадиях средний уровень Ср в 1,9 раза превышает соответствующий средний уровень для доноров, а при III-IV стадиях – в 2,2 раза. Вместе с тем, для 7% обследованных больных зафиксировано низкое значение концентрации этого белка (ниже среднего значения для нормы).

Церулоплазмин – это белок острой фазы, который выполняет в организме ряд важных биологических функций: повышает стабильность клеточных мембран, участвует в иммунологических реакциях и ионном обмене, оказывает антиоксидантное действие, тормозит перекисное окисление липидов. Исходный уровень Ср является важнейшей индивидуальной характеристикой. Изменение уровня Ср не должно превышать определенных предельных значений. Превышение его уровня более чем на 40% от исходной концентрации приводит к снижению функциональной активности гормон-рецепторных систем, что является губительным для организма [9].

Таким образом, церулоплазмин можно считать универсальным онкомаркером при появлении злокачественных новообразований в мочеполовой области. Более того, необходим дальнейший набор статистических данных, поскольку у ряда больных уже на I-II стадиях роста опухоли выявлены достаточно высокие значения этого белка, что, на наш взгляд, может свидетельствовать о плохих прогнозах течения болезни.

Другой важной особенностью для онкологических больных, установленной из анализа спектров ЭПР, является то, что для ~ 95% обследованных пациентов уровень метгемоглобина в крови ниже среднего значения для нормы (рис.1 б). Максимальное превышение (40%) уровня метгемоглобина относительно среднего уровня для нормы было зарегистрировано при раке простаты IV стадии. Уровень MetHb также зависит от стадии роста опухоли: при I-II стадиях средний уровень метгемоглобина в 1,8 раза ниже соответствующего среднего уровня для доноров, а при III-IV стадиях – в 2,9 раза. Считается, что MetHb - это патологическая форма гемоглобина, возникающая в крови за счет окисления диамагнитного гемового железа Fe^{2+} до парамагнитного Fe^{3+} . Обратная реакция перехода Fe^{3+} в Fe^{2+} в норме обусловлена действием метгемоглобинредуктазы. По уровню MetHb можно судить об интенсивности процесса гемолиза. Согласно современным представлениям уровень MetHb у здоровых людей составляет 1-1.5% от общего гемоглобина. Следует отметить, что обычно при анализе крови концентрацию метгемоглобина не определяют. Вместе с тем, обследование контрольной группы показало, что у 15% доноров уровень MetHb превышает верхнюю границу для нормы (на рисунке эти данные не представлены). При этом аномально высокое значение, зарегистрированное в наших исследованиях, в 4,5 раза превосходило среднее значение для нормы. Кроме того, у 70% обследованных нами доноров выявлено наличие гемихромов. Подавление процессов окисления гема до метгемоглобина и отсутствие образования гемихромов при онкологической патологии могут свидетельствовать об изменении функциональных способностей гема реагировать на различного рода окислители, как это происходит при нормальном функционировании организма. Интересно, что факт отсутствия окисленных форм гемоглобина при росте злокачественных новообразований наблюдается с одной

стороны на фоне анемии, характерной для большинства онкологических больных, а с другой – повышенной потребности опухоли в кислороде для ее дальнейшего роста. Для выяснения причин такого противоречия требуется проведение дополнительных исследований.

Проведенные исследования показывают, что пониженная концентрация MetHb в крови также может свидетельствовать о наличии злокачественных новообразований.

Еще одним парамагнитным белком плазмы крови является трансферрин. Tf – это железотранспортный белок плазмы, одна молекула которой связывает два иона Fe^{3+} . По интенсивности сигнала ЭПР от трансферрина можно судить об уровне кроветворения. Повышенная концентрация Tf указывает, прежде всего, на железодефицитную анемию, а пониженный уровень – на наличие воспалительного процесса. Как видно из рис.2 в, концентрация трансферрина у онкологических больных, в целом, находится в пределах нормы. Однако для 18% обследованных больных обнаружено высокое содержание Tf и для 8% - пониженное. Аномально высокие концентрации трансферрина зарегистрированы в основном в крови больных со злокачественными новообразованиями в мочевом пузыре, хотя для большинства пациентов его концентрация соответствует норме.

Таким образом, в рамках данной работы показана возможность использования метода ЭПР для мониторинга состояния онкологических больных со злокачественными образованиями, локализованными в мочеполовой области. По нашему мнению, высокий уровень церулоплазмينا в сочетании с низкой концентрацией метгемоглобина у условно здоровых людей может являться показателем для необходимости проведения тщательных обследований на наличие злокачественных новообразований.

1. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В.: Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии, М.: Энергоатомиздат 1989, 232 с.
2. Navak S.B. *et al.* Indian J.Physiol.Pharmacol. 47 (1), 108-110 (2003).
3. Foutiou K.*et al.* Minerva Urol.Nefrol. 59 (4), 407-411 (2007).
4. Navak S.B.*et al.* Indian J.Physiol.Pharmacol. 48 (4), 486-488 (2004).
5. Navak S.B. *et al.* Indian J.Physiol.Pharmacol. 49 (5), 341-344 (2005).
6. Warner F.W., Stjernholm R., Cohn I. Med.Phys., 5 (2), 100-106 (1978).
7. Dodd N.J. Br. J. Cancer, 32 (1), 108-120 (1975).
8. Ажипа Я.И.: Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса, М.: Наука 1983, 528 с.
9. Пулатова М.К., Филатов Д.Э. *и др.* Изв. РАН. Сер. биол. №5, 737-747 (1990).

EPR MONITORING OF ONCOLOGY PATIENTS

M.I.Ibragimova¹, A.I.Chushnikov¹, V.N.Moiseev², V.Yu.Petukhov¹, E.P.Zheglov¹

¹Kazan Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, 420029 Kazan, Russian Federation

²Tatarstan Republic Cancer Hospital

Using X-band EPR venous blood of 86 patients with cancer of I-IV stages in urogenital system was investigated. 44 blood donors were chosen as a control group. The spectra investigated consist of four basic lines which are attributed to methemoglobin, transferrin, ceruloplasmin and free radicals. The analysis of spectra allowed revealing the distinguish features for oncology patients. For 60% of cancer patients examined the ceruloplasmin level is higher than the upper level for normal, depending on the cancer stage. Practically for all oncology patients examined (95%) the methemoglobin concentration is lower the mean level for normal and this parameter also correlates with cancer stage. In our opinion the high value of ceruloplasmin in combination with the low level of methemoglobin can be the indicator of the necessity for the further thorough examination of human beings for the existence of malignant tumor.