

BARBARA OW CZAR CZYK, JERZY MAZUR CZAK, GRZEGORZ RUSSAK

Chemiluminiscencja osocza krwi u krów białaczkowych

Z Instytutu Zoohigieny i Profilaktyki w Produkcji Zwierzęcej SGGW-AR w Warszawie

Zjawisko chemiluminiscencji (ChL) zachodzi w reakcjach chemicznych kosztem energii egzogenicznych procesów elementarnych. Jest to promieniowanie elektromagnetyczne, będące odwróceniem reakcji fotochemicznych. Mechanizm tego zjawiska został w miarę dokładnie zbadany, a procesy te szczegółowo przedstawiono w całym szeregu opracowań monograficznych, uwzględnionych w poprzedniej części niniejszego opracowania (7).

Rejestracja bardzo słabych świeceń (ChL) znalazła zastosowanie jako metoda nie niszcząca badanych struktur w szeregu procesów biologicznych, zachodzących w środowisku atmosferycznego tlenu.

Zastosowanie ChL jako metody badawczej w śledzeniu zjawisk związanych z procesem nowotworzenia ma już obecnie dość obszerną naukową dokumentację oraz opracowania monograficzne (6, 10, 11).

W badaniach tych metodę ChL stosowano w celu:

a) określania aktywności naturalnych przeciwutleniaczy w samej tkance nowotworowej i tkankach podłoża. Badania te wykonywano przede wszystkim na nowotworach indukowanych u zwierząt laboratoryjnych (1, 6, 9),

b) zbadania wpływu cytostatyków na aktywność przeciwutleniaczy w tkance nowotworowej.

Mniej liczne prace dotyczą rejestracji bardzo słabych świeceń w surowicy (osoczu) krwi ludzi chorych na różnego typu nowotwory (17). Opublikowane zostały również pojedyncze doniesienia dotyczące rejestracji bardzo słabych świeceń otrzymanych z elementów morfotycznych krwi, na przykład z przypadków chronicznej białaczki limfatycznej (2).

W większości prac nie stosowano metod aktywacji procesu chemiluminiscencji. Poprzestano na bezpośredniej rejestracji słabych świeceń osocza lub białych krwinek, zachodzących w temperaturze pokojowej w obecności tlenu atmosferycznego (10, 11, 17). Jest to możliwe z uwagi na dużą czułość stosowanych obecnie fotopowielaczy, umożliwiających rejestrację przelicznikami elektronowymi nawet niewielkiej wydajności kwantowej ChL. W środowisku tlenu rejestruje się przejścia z metastabilnych poziomów singletowych na podstawowe stany tripletowe cząsteczek tlenu nawet wówczas, kiedy układy donorowo-akceptorowe są w stężeniu $10^{-15}M$.

Celem badań własnych była próba rejestrowania zjawisk fotonowych w osoczu krów zdrowych i podejrzanych o białaczkę. Jednocześnie modelowano przebiegi czasowe rekombinacji układów wolnorodnikowych w osoczu poprzez oddziaływanie na nie podwyższoną temperaturą łącznie z dodawaniem naturalnego przeciwutleniacza — tokoferolu.

W badaniach własnych założyliśmy, że w trakcie toczącego się procesu nowotworowego w osoczu winny zachodzić analogiczne zmiany, jakie stwierdza się w tkance nowotworowej. Są to zmiany stosunków ilościowych i jakościowych między reakcjami wolnorodnikowymi a pulą przeciwutleniaczy (1, 6, 14, 15). W opublikowanych dotychczas pracach nie stosowano do tych celów rejestracji zmiany słabych świeceń tkanki i surowicy zawierającej dodatek tokoferolu. Również zjawiska powstające w trakcie termochemiluminiscencji (TChL) nie były stosowane w badaniach nad osoczem zwierząt dotkniętych procesem nowotworowym.

Materiał i metody

Do badań użyto po 5 losowo wybranych próbek krwi od krów przebywających w wydzielonych gospodarstwach.

Do badań porównawczych zastosowano wyciąg metanolowo-chloroformowy z tkanki nowotworowej, która operacyjnie pobrano od dwu prób (samice, 10—12 lat) z rozpoznaniem *carcinoma solidum partim carcinoma alveolare* oraz *cyst-adenocarcinoma papillomatousum* (1, 6).

Impulsy zliczano przelicznikiem elektronowym typ PEL-5 z zastosowaniem fotopowielacza EMI9514S. Natężenie promieniowania rejestrowano z powierzchni 7 cm^2 pojemnika umieszczonego nad fotopowielaczem. Rejestrację prowadzono 25 minut w próbce ogrzewanej do 40°C .

Do pojemnika wkładano próbki o końcowej objętości 2,5 ml, zawierające osocze rozcieńczone wodą destylowaną w stosunku 1:5 oraz dl-alfa-tokoferol (f-myl L. Hoffmann — La Roche) o końcowym stężeniu $1,0 \times 10^{-6}M/l$.

Analogicznie postępowano z wyciągami metanolowo-chloroformowymi z tkanki nowotworowej.

Wyniki

Uzyskane wyniki na losowo wybranym materiale doświadczalnym w ustalonych przedziałach czasowych spełniają podstawowy warunek chemiluminiscencji (3), wynikający z równania:

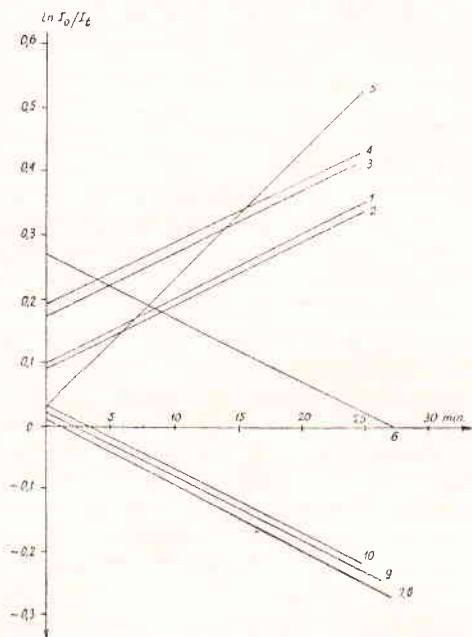
$$I_t = I_0 e^{-\frac{t}{k}}$$

gdzie: I_0 — początkowa wartość natężenia promieniowania

I_t — wartość natężenia promieniowania w czasie t

k — stała charakterystyczna dla danej reakcji.

Przebieg w czasie natężenia promieniowania badanych próbek osocza przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Wpływ α -tokoferolu na przebieg chemiluminescencji osocza OZ (1—5) i OB (6—10)

Jak z niej wynika intensywność promieniowania osocza po dodaniu tokoferolu dla obu badanych populacji znacznie się różni. W osoczu krów, u których badaniem hematologicznym prowadzonym w okresie dwuletnim, wykluczono podejrzenie białaczki, w badanym czasie obserwujemy ciągły zanik natężenia ChL. Natomiast osocze krów, zaliczonych do podejrzanych o białaczkę, cechuje natężenie promieniowania, które nasila się w analizowanym przedziale czasowym. Wartości liczbowe dla stałej szybkości reakcji podane są w tab. 1.

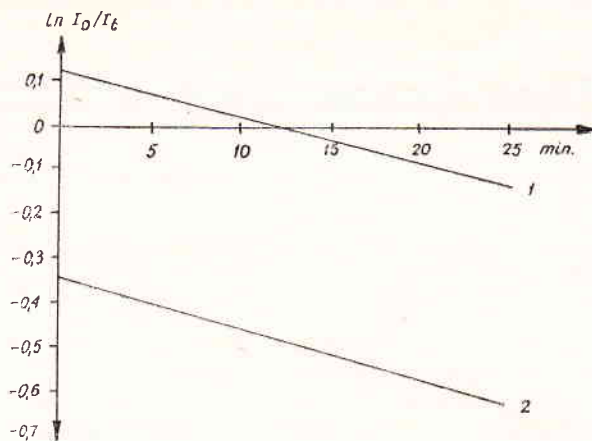
Tab. 1. Wartości k badanego osocza

Osocze krów zdrowych		Osocze krów podejrzanych o białaczkę	
Nr próby	k	Nr próby	k
1	+ 0,01	6	- 0,01
2	+ 0,01	7	- 0,01
3	+ 0,01	8	- 0,01
4	+ 0,01	9	- 0,01
5	+ 0,02	10	- 0,01

Z powyższej analizy wynika, że osocze oznakowane symbolem OZ — charakteryzuje zanik intensywności chemiluminescencji w czasie i przebiegu ze stałą $0,01 < k < 0,02$, zależną od początkowej wartości promieniowania.

Osocza oznakowane symbolem OB charakteryzują się wzrostem natężenia promieniowania w czasie, ze stałą zaniku $k = -0,01$ dla wszystkich badanych prób osocza.

Na ryc. 2 przedstawiono charakterystykę zmian promieniowania wyciągów metanolowo-chloroformowych tkanki nowotworowej w reakcji z tokoferolem.



Ryc. 2. Wpływ α -tokoferolu na przebieg chemiluminescencji: 1. *carcinoma solidum partim alveolare*, 2. *cyst-adenocarcinoma papillomatosum*

Z wykresu wynika wzrost natężenia promieniowania badanych wyciągów, a stała zaniku $k = -0,01$. Użytkany wynik reakcji z wyciągami z tkanki nowotworowej jest identyczny jak z osoczem OB.

Omówienie wyników i dyskusja

Jedną z podstawowych reakcji odpowiedzialnych za biochemiluminescencję jest rekombinacja nadtlenu (12, 16) według reakcji:



Procesowi temu towarzyszy rekombinacja pewnej części nadtlenu z wytworzeniem wzbudzonych produktów zdolnych do luminiscencji:



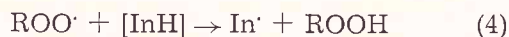
gdzie:

$h\nu$ — fotony o energii 40—70 kcal/mol

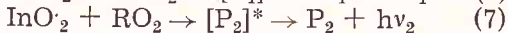
$ROO \cdot$ — aktywne substraty rodników nadtlenu

$[P]^*$ — produkt rekombinacji w stanie wzbudzonym, który przechodzi w związek $[P]$ z utratą energii $h\nu$.

Procesy te, przebiegające normalnie we wszystkich żywych komórkach organizmu, utrzymywane są na niskim poziomie dzięki obecności przeciwutleniaczy (InH), które blokują wolne rodniki:



Przeciwutleniacze mogą ponadto zmieniać charakter bioluminescencji, a więc w ich obecności bardziej prawdopodobna jest rekombinacja typu:



Procesowi temu może towarzyszyć czasowy wzrost biochemiluminiscencji od razu po wprowadzeniu inhibitora w aktywnie utleniany substrat, zawierający zwiększoną ilość produktów w stanie utlenionym (16).

W wielu pracach wykazano, że witamina E hamuje destrukcyjny proces powstawania nadlenków w wielonienasyconych lipidach (1, 3, 12). Efektywność jej jako naturalnego przeciwutleniacza uwarunkowana jest stężeniem w granicach 10^{-6} M/l (1). W przypadku niedoboru witaminy E utlenianie lipidów jest ekstensywne i niekontrolowane, prowadząc tym samym do uszkodzenia wewnątrzkomórkowych struktur i powstawania nieprawidłowych metabolitów (4).

W literaturze często pojawia się pytanie dotyczące udziału różnych związków w hamowaniu procesów wolnorodnikowych. Problem ten nie został jeszcze rozwiązany. Niektórzy autorzy wiążą go z zawartością określonych związków typu tokoferol, ubichinon czy poszczególnych frakcji fosfolipidowych, inni zaś z całokształtem i współdziałaniem różnych czynników, których zmiana wpływa na zestaw lipidów. Niestety, fizykochemiczna charakterystyka poszczególnych frakcji lipidowych jest dotychczas nieznana i w tej sytuacji na specjalną uwagę zasługuje tokoferol — związek, którego mechanizm działania jest najlepiej wyjaśniony.

Osocze charakteryzuje się słabym promieniowaniem w widzialnej części widma. Natężenie tego promieniowania rejestrowane w temperaturze 38°C i w bardzo czułych fotopowielaczach rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Promieniowanie osocza uzależnione jest od lipidów lub lipoproteinowych kompleksów. Stąd wyraźnie zaznacza się wpływ ilości i stopnia utlenienia lipidów na chemiluminiscencję osocza, to znaczy wpływ związków oddziałujących na samoutlenianie lipidów tkankowych oraz związków regulujących metabolizm lipidów (17).

Z doświadczeń prowadzonych na indukowanych nowotworach wynika, że w tkankach objętych procesem nowotworzenia, w zależności od fazy rozwoju, zmienia się zarówno skład ilościowy, jak i jakościowy frakcji lipidowych. Zjawisku temu towarzyszy odpowiednio ilościowa zmiana zawartości naturalnych przeciwutleniaczy (1, 13). Dotyczy to nie tylko samej tkanki nowotworowej, lecz również krwi, przenoszącej te związki do innych tkanek. Związki te w procesie nowotworzenia wykorzystywane są głównie przez rozwijającą się tkankę nowotworową na niekorzyść innych, pozostałych narządów i tkanek. Jednocześnie wykazano dynamikę zmian lipidów, kwasów tłuszczowych i fosfolipidów osocza krwi z indukowanym nowotworem (17). W procesie rozwoju nowotworu obserwuje się wzrost zawartości lipidów w osoczu przy zmniejszonej ilości fosfolipidów odpowiedzialnych za hamowanie reakcji wolnorodnikowych. Tym samym należy sądzić, że w tego rodzaju procesach patologicznych w osoczu krwi wystę-

puje większe stężenie substratów reakcji wolnorodnikowych, przy jednoczesnym obniżeniu puli naturalnych przeciwutleniaczy (14).

W przedstawionej pracy własnej badając promieniowanie samego osocza, nie stwierdzono żadnej korelacji pomiędzy natężeniem procesu patologicznego a natężeniem promieniowania.

Wprowadzenie dodatkowego czynnika, jakim był alfa-tokoferol pozwoliło na uchwycenie zasadniczych różnic, wynikających ze składu ilościowego i jakościowego osocza OB i OZ.

Na specjalną uwagę zasługuje analogiczny przebieg wzrostu chemiluminiscencji osocza OB i wyciągu metanolowo-chloroformowego tkanki nowotworowej w tych samych warunkach doświadczenia, charakteryzujący się tą samą wartością stałej k przebiegającego procesu. Można więc twierdzić, że zarówno w rozwiniętej tkance nowotworowej, jak i w osoczu, istnieje większe stężenie produktów w stanie utlenionym, odpowiedzialne za wzrost chemiluminiscencji według równania 6 i 7 — przy obniżonej zawartości naturalnych przeciwutleniaczy, odpowiedzialnych za zanik ChL według równania 4. W ten sposób łańcuch reakcji wolnorodnikowych, skierowany zostaje na inne tory, charakteryzujące się odmienną kinetyką i wydajnością kwantową reakcji.

W surowicy pochodzącej od zwierząt zdrowych tego typu zjawiska nie obserwuje się. Dominujący jest zanik ChL, uwarunkowany zarówno naturalnym stężeniem przeciwutleniaczy, suplementacją alfa-tokoferolu, jak i utrzymaniem reakcji wolnorodnikowych na stacjonarnie niskim poziomie.

Do wyjaśnienia pozostaje natura przeciwutleniaczy zawartych w surowicy zwierząt zdrowych i chorych. Według Żurawlewa (14) luminiscencja lipidów uzależniona jest od:

- substratu,
- związków typu ergosteryny, nie wpływających na przebieg reakcji lecz jedynie nasilających luminiscencję,
- naturalnych przeciwutleniaczy.

Autor ten wyróżnia dwa rodzaje przeciwutleniaczy. Do pierwszego zalicza związki takie, jak α -naftol, które osłabiają chemiluminiscencję, zaś same lub też produkty ich utlenienia, rodniki i produkty rekombinacji rodników, nie promieniają. Do drugiego rodzaju zalicza na przykład adrenalinę i lecytynę, które to związki zwiększają natężenie chemiluminiscencji i zmieniają przebieg reakcji wolnorodnikowych.

W tym aspekcie można sądzić, że w osoczu OZ istnieje zwiększona pula przeciwutleniaczy pierwszego rodzaju, natomiast w osoczu OB, jak doświadczalnie wykazano, przeważa drugi rodzaj przeciwutleniaczy.

Potwierdzenie tych założeń, jak również ocena przydatności opisaney metody do rozpoznawania białaczki limfatycznej bydła będzie przedmiotem kolejnej publikacji.

Piśmiennictwo

1. Akademia Nauk ZSRR: Bioantyoksydanty w łuczewom porażeni i etokaczestwiennom rostie. Izdatelstwo Nauka Moskwa, 1975.
2. Burtakowa E. W. i wsp.: Trudy MOIP, 16, 202, 1966.
3. Bursa S.: Chemia fizyczna, PWN, W-wa, 1976.
4. Green J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 29, 1972.
5. Instrukcja nr 1 Min. Roln. z dn. 2.I.1973 r. w sprawie postępowania przy białaczce bydła. (Nr WETzp-550/6-2/72).
6. Kozłowski J. P.: Swobodnoradikalny i ich rol w normalnych i patologicznych procesach. Izdatelstwo Moskowsko Uniwersiteta, 1973.
7. Mazurczak J., Owczarczyk B., Russak G.: Medycyna Wet. 34, 496, 1978.
8. Marwitt M. K.: Fed. Proc., 24, 68, 1965.
9. Sidorik E. P. i wsp.: Trudy MOIP 50, 72, 1974.
10. Szpolinowska A. M. i wsp.: Trudy MOIP 39, 168, 1972.
11. Szpolinowska A. M., Bondariew I. M.: Trudy MOIP 39, 170, 1972.
12. Tappel A. L.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 203, 12, 1972.
13. Tarusow B. N., Iwanow I. I.: Trudy MOIP, 16, 211, 1966.
14. Zurawlew A. I., Wiesielowski W. A.: Trudy MOIP 21, 19, 1965.
15. Zurawlew A. I. i wsp.: Trudy MOIP 21, 75, 1965.
16. Zurawlew A. I.: Trudy MOIP 16, 63, 1966.
17. Zurawlew A. I.: Trudy MOIP 50, 9, 1974.

Adres autora: dr Barbara Owczarczyk, ul. Akademicka 1/13, 02-038 Warszawa.

Овчарчик Б., Мазурчак Е., Руссак Г. — Химилуминесценция плазмы крови лейкоемических коров.

Cel badań zakładał się w próbie zapisu chemiluminescencyjnym metodą fotonnych zjawień w krwiowej plazmie zdrowych i podejrzanych w leukemii krow.

W próbach modelizowali czasowe zmiany rekombinacji swobodnoradikalnych systemów w plazmie pod wpływem na nich podwyższonej temperatury i dodatkiem naturalnego przeciwutleniacza — tokoferolu. Dla porównania wielkości badania na

metanolo-chloroformnych wyciągach z nowotworowej tkanki.

Pokazali, że intensywność promieniowania plazmy po dodatku tokoferolu dla obu badanych populacji znacznie różni się, o czym świadczą różne stałe wygaszenia k. Dla plazmy z zdrowych krow $k > 0$, dla plazmy z podejrzanych w leukemii, i metanolo-chloroformnych wyciągów nowotworowej tkanki $k < 0$.

Авторы дискутируют описанное явление в контексте различных пропорций антиокислителей и субстратов свободнорадикального окисления в сыворотке крови здоровых и подозреваемых в лейкоемии животных.

Owczarczyk B., Mazurczak J., Russak G. — Chemiluminescence of plasma in leukaemic cows.

The purpose of the work was to examine photon events in the plasma of normal and leukaemia suspected cattle by means of chemiluminescence. In the experiments the recombinations processes of free radicals systems in the plasma being under the influence of higher temperature and the addition of antioxidant (tocopherol) were controlled. The extracts from neoplasma tissues served as a control. It was found that the intensity of plasma ionization after the addition of tocopherol in the both populations was different and was reflected by the various disappearance constants of ionization k. In case of the plasma of normal cattle $k > 0$ but from cattle suspected and from neoplasma extracts $k < 0$ were found. The findings were discussed by the authors taking into consideration different proportions of antioxidants and free radicals substrates in sera of normal and leukaemia suspected animals.

WŁODZIMIERZ A. GIBASIEWICZ, KAZIMIERZ GIBASIEWICZ
Ostrów Wielkopolski

Poziom ołowiu w węzłach chłonnych krów zdrowych i chorych na białaczkę

Wiadomo, że substancje mineralne odgrywają zasadniczą rolę w wielu procesach biologicznych. Wszelkie ich zmiany ilościowe nie mogą być — rzecz oczywista — obojętne dla prawidłowej dynamiki życia zwierząt. Dlatego podjęto intensywne badania w celu wyjaśnienia roli „metali życia”, jako kofaktorów w etiopatogenezie białaczek (1—5).

We wcześniejszych pracach dokonaliśmy określenia poziomu wapnia, fosforu, potasu i magnezu (3) oraz cynku, żelaza, miedzi i manganu (4) w zmienionych węzłach chłonnych krów chorych na białaczkę. Obecne doniesienie jest kontynuacją rozpoczętych badań i ma na celu wyjaśnienie zawartości ołowiu w węzłach chłonnych krów białaczkowych, jak i zdrowych.

Materiał i metody

Do badań pobrano *post mortem* węzły chłonne biodrowe przyśrodkowe (*inn. iliaci mediales*) 8 krów rasy ncb w wieku 5—7 lat chorujących na białaczkę limfatyczną oraz 8 krów zdrowych, będących własnością gospodarstw sektora państwowego. Zawartość ołowiu w węzłach chłonnych określano metodą atomowej spektrofotometrii płomieniowej (ASA).

Wyniki i omówienie

W tab. 1 podano wyniki otrzymanych pomiarów w zakresie grupy kontrolnej (I) i doświadczalnej (II). Tabela przedstawia ponadto średnie wyników i 95-procentowy przedział ufności. Średnie obu grup porównywano za pomocą testu Studenta, przyjmując istotność różnic na poziomie $\alpha = 0,05$.

W węzłach chłonnych krów grupy kontrolnej średnia zawartość ołowiu wynosiła 0,41 ppm. Natomiast w zmienionych węzłach chłonnych krów białaczkowych poziom ołowiu był wyższy o 0,09 ppm i wynosił 0,50 ppm. Różnica ta okazała się istotna.

Tab. 1. Zawartość ołowiu w węzłach chłonnych krów zdrowych i białaczkowych (ppm)

Nr sztuki	Grupa								Średnia	Przedział ufności
	1	2	3	4	5	6	7	8		
I	0,40	0,40	0,43	0,39	0,40	0,43	0,41	0,41	0,41	P 0,05
II	0,52	0,49	0,48	0,49	0,49	0,52	0,48	0,52	0,50	