

УДК 535-31:535,21:612,08

М.С. ІВАХ<sup>1</sup>, Є.Р. КОСИЙ<sup>2</sup>, О.Т. КОЖУХАР<sup>1</sup>

## АНАЛІЗ ЗМІН ОПТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЛЕЙКОМАСИ ПРИ ФОТОФЕРЕЗИ

<sup>1</sup>Національний університет "Львівська політехніка"  
79013, вул. С. Бандери, 12, м. Львів, Україна,  
E-mail: ivah\_m@ukr.net

<sup>2</sup>Львівський медичний інститут,  
79015, вул. Поліщука, 76, м. Львів, Україна

**Анотація.** На основі експериментального порівняння оптичних характеристик лейкоцитів до і після сеансу фотоферезу та пояснень, з погляду сучасних біофізичних уявлень, їх повторюваних відмінностей запропоновано нові підходи щодо створення методів та засобів оцінювання ефективності сеансу.

**Аннотация.** На основе экспериментального сравнения оптических характеристик лейкоциты до и после сеанса фотофереза и объяснений, с точки зрения современных биофизических представлений, их повторяющихся различий предложены новые подходы по созданию методов и средств оценки эффективности сеанса.

**Abstract.** Based on the experimental comparison of optical characteristics leukocytes' liquid before and after the photopheresis session and explanations in terms of modern biophysical representations of recurring differences suggested new approaches to the creation of methods and means of evaluating the effectiveness of the session.

**Ключові слова:** фотоферез, лейкоцита, спектри поглинання

### ВСТУП

Ефективним методом у лікуванні псоріазу є метод екстракорпоральної фотохіміотерапії – фотоферезу (Ф). Метод Ф полягає у наступному: після прийому хворим пер ос 8-метоксипсоралену (8-МОП – фотосенсибілізатора), опромінюють ультрафіолетом області А (320-400 нм) отриману з крові хворого лейкоцита (ЛМ), яку після цього ретрансфундують. Молекули 8-МОП проникають до структур ДНК мутованих лейкоцитів і під дією ультрафіолетового опромінення (УФО), що створюється апаратурою Ф, активуються і блокують її реплікацію. У зв'язку з тим, що в механізмі біологічної дії УФО на клітини переважає процес електронного збудження, УФО вважають неіонізуючим опроміненням. Це надає опроміненню клітинам, зокрема, пулу малігнізованих лімфоцитів пацієнта властивостей антигену, що викликає ефект аутоімунізації [1].

Проблемою подальшого розвитку Ф та подібних фотомедичних лікувальних технологій є недостатність, а, у більшості, відсутність методів і засобів одержання лікарем неперервної (упродовж сеансу Ф) інформації про зміни оптичних властивостей опромінюваного зразка біорідини (ЛМ, крові, плазми) щодо правильності оцінки лікарем про достатність або, взагалі, доцільність проведення процедури, а також про необхідність корегування дози опромінення для досягнення кращого терапевтичного ефекту.

На основі проведених нами досліджень [2, 3] виявлено, що внаслідок Ф відбуваються повторювані зміни оптичних характеристик досліджуваної біорідини, зокрема, її спектрів поглинання та колірної температури (КТ) тестового світлового випромінювання. Ця закономірність і визначені кількісні характеристики таких змін можуть бути використаними для оцінювання достатності, доцільності та можливого корегування дози опромінення. Таке оцінювання спрямоване на досягнення кращого терапевтичного ефекту від проведення сеансу Ф.

Для створення відсутніх на сьогодні методів і засобів моніторингу кількісної інформації про зміни оптичних властивостей опромінюваного зразка, необхідно, на наш погляд, проаналізувати отримані результати щодо змін оптичних характеристик ЛМ та пояснити роль у цьому УФО впродовж сеансу опромінення відповідно до методу Ф, що покладено в основу представлених нижче досліджень.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень були зразки ЛМ, одержаної з крові пацієнта. У пацієнта забирали венозну кров у спеціальні об'єми для забору крові – гемакони. Були використані гемакони виробництва фірми RAVIMED, що містили консервант. Фракціонування отриманої від пацієнта крові проводили центрифугуванням (700 об/хв. протягом 5 хв.), після чого відбирали ЛМ, яку опромінювали ультрафіолетом (А) в апараті Ф типу "Ізольда". До складу ЛМ входили лейкоцити та плазма з незначною кількістю гемоглобіну, що з'являється внаслідок гемолізу еритроцитів при центрифугуванні. Досліджувались спектри поглинання зразків опроміненої та неопроміненої ЛМ за допомогою спектрофотометра UVIDEC-510 фірми JASCO. Дослідження КТ тестового світлового випромінювання проводили за допомогою розробленої нами оптико-електронної системи з наступною перевіркою за допомогою промислового кольорояскравоміру типу ЦТ-1 із змінними світлофільтрами.

Зразки ЛМ отримувались з Державної установи «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України». Для дослідження спектрів поглинання, досліджувану ЛМ розводили ізотонічним розчином (0.9 % NaCl), після чого заливали до кварцової кювети, яку встановлювали у кюветному відділенні спектрофотометра.

У монохроматичний потік випромінювання, що надходить з вихідної щілини в кюветне відділення, по чергово вводили контрольний (ізотонічний розчин) і досліджувані зразки. Випромінювання, що пройшло через кювету, потрапляє на фотоприймач, електричний сигнал якого після підсилення відображають у кількісній формі.

Застосована спеціально розроблена оптико-електронна система (ОЕС) (рис.1) на основі світлодіодних випромінювачів з керованою, відповідно до методики колориметрії, зміною ділянок спектру, забезпечувала спрощення експерименту для уникнення необхідності використання коштовного і громіздкого устаткування, зокрема, кольорояскравомірів.

Для прискорення та автоматизації одержання результатів було застосовано замість світлофільтрів випромінювальний елемент (ВЕ) із відповідними щодо методу, так званого, "кольорового відношення" спектрів. Випромінювальний елемент ОЕС створює на зразку ЛМ тестовий світловий потік по чергово у червоній та синій (або зеленій) ділянках спектру випромінювання. Така по черговість дозволила реалізувати принцип зазначеного методу.

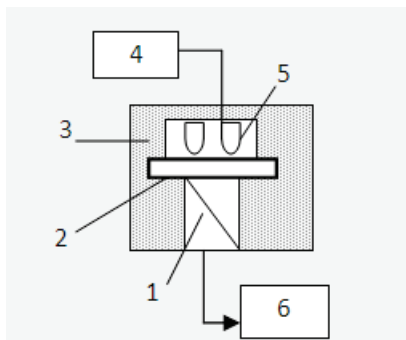


Рис. 1. ОЕС: 1 – ПЕ, 2 – зразок, 3 – світлозахисний корпус, 4 – блок живлення, 5 – ВЕ, 6 – вимірювач потужності випромінювання

На приймальний елемент (ПЕ) скеровується пройдені крізь зразок ЛМ тестові світлові потоки із подальшим перетворенням отриманих сигналів у значення КТ тестового світлового випромінювання та порівнянням цих значень для опромінених та неопромінених зразків. Спектри ВЕ відповідали спектрам стандартних світлофільтрів (КС11, СЗС9, ОС14), що застосовуються у кольорояскравомірів, зокрема, у приладі ЦТ-1. Вибір ПЕ для експериментального зразка ОЕС було здійснено із врахуванням забезпечення спектральної чутливості ПЕ відповідно до спектрів ВЕ.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Рандомізованими дослідженням одержано спектральні характеристики зразків ЛМ, в яких спостерігаються повторювані зміни поглинання тестових світлових потоків після УФО (рис. 2). Верхня крива, що відповідає опроміненому зразку, суттєво відрізняється зростанням інтенсивності вихідного тестового потоку в цілому по спектру і, переважно, в межах ділянки довжин хвиль 350-450 нм. На цій ділянці зростання повторювано становило 18 %. На ділянці довжин хвиль 500-600 нм, в якій регулярно спостерігались два характерних піка 530 нм та 570 нм, як і в решті спектру, зростання становить 25 %.

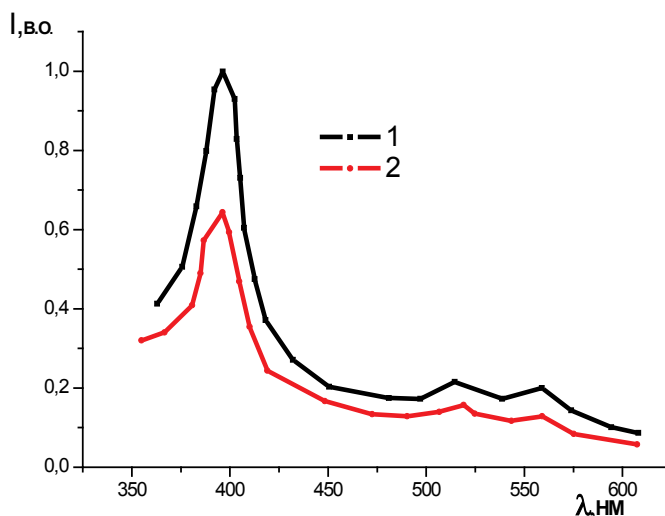


Рис. 2. Типові спектральні характеристики поглинання ЛМ, до та після опромінення під час сеансу Ф: 1 – опромінений, 2 – неопромінений зразок ЛМ

За результатами проведених досліджень можна зробити очевидний висновок щодо збільшення поглинальних властивостей ЛМ внаслідок УФО. У більшості експериментів таке збільшення спостерігалася в межах 50%.

Проведено дослідження залежності КТ пройденого через ЛМ тестового світлового потоку від сеансу УФО для різних пацієнтів на різних стадіях лікування. Як видно з рис. 3, для хворих, котрі на період досліджень отримували лікувальні сеанси Ф, КТ зменшувалася на 10-17 %, а для хворих на стадії завершення лікування – на 20-30 %.

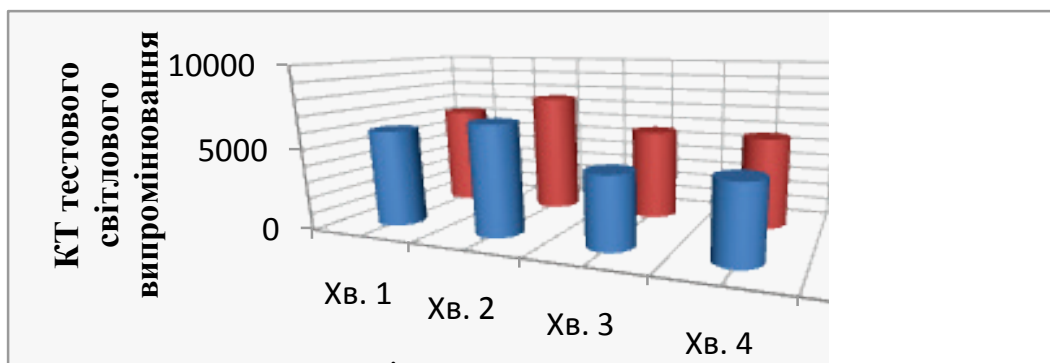


Рис. 3. Діаграма залежностей КТ від УФО для зразків ЛМ різних хворих

Представлені результати впливу УФО на зразки ЛМ свідчать про суттєві зміни КТ тестового світлового випромінювання, які повторюються для різних хворих у межах 10-30 %.

### АНАЛІЗ І ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Одним із важливих аспектів аналізу та обговорення одержаних результатів є проблема визначення речовини, яку містить ЛМ, що поглинає лікувальне УФО та ініціює перші стадії процесу поглинання. З цих позицій доцільним є розглянення особливостей спектрів фотохімічної дії та поглинання УФО об'єктами фотохімічних реакцій. При цьому бралася до уваги, що в речовинах із більшим показником поглинання інтенсивність фотохімічних змін у молекулах органічного барвника, фотоінактивації білку, пошкодження молекул нуклеїнових кислот та окислення ліпідів є більшою. У ділянках спектру, де поглинання відсутнє, це не спостерігається.

За результатами досліджень взаємодії ЛМ із тестовим випромінюванням у видимій ділянці спектру, можна стверджувати, що вплив лікувального УФО призводить до повторюваних для усіх зразків ЛМ зростання поглинання та зменшення КТ тестового світлового потоку, пройденого крізь зразки. Це узгоджується із сучасними біофізичними уявленнями про механізми взаємодії УФО з білками та ДНК клітин. Така взаємодія викликає їх фотозбудження, що супроводжується фотодисоціацією, перенесенням

енергії збудження від донора до акцептора, що викликає два типи реакцій – функціонально-фізіологічний та деструктивно-модифікаційний. Перший тип характерний для впливу на клітини та організми видимого опромінення, а другий – для впливу УФО.

Відповідно до сучасної біофізичної моделі (рис. 3) характерними молекулярними механізмами біологічної дії УФО є зміни структури і функцій ДНК, фотоінактивація білків і пошкодження мембран клітин.

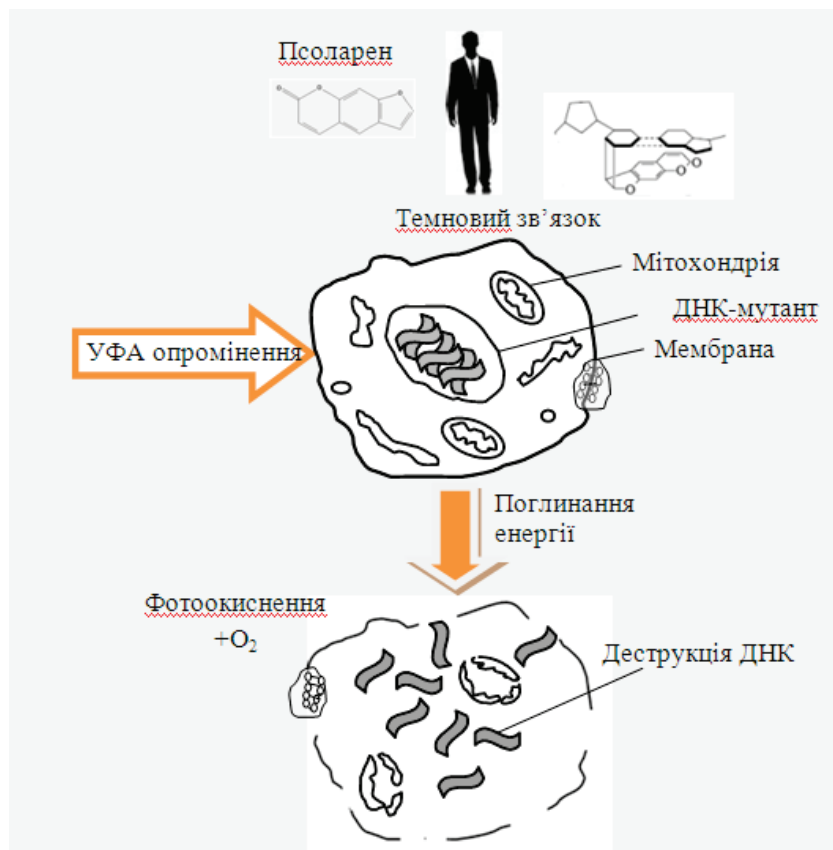


Рис. 3. Біофізична модель дії УФО при фотоферезі

Загальним для всіх фотобіологічних процесів біологічної дії УФО є характерні послідовні стадії: поглинання УФО молекулою з її електронним збудженням, перерозподіл у збудженій молекулі поглинутої енергії, її міжмолекулярного перенесення, утворення первинних фотопродуктів і перетворення їх у перші хімічні стійкі сполуки.

Особливу роль у Ф відіграють фотосенсибілізатори, зокрема, найбільш розповсюджені в медичній практиці, псоралени, поглинають випромінювання в інших ділянках спектру. Поглинуту енергію вони передають молекулам біополімерів чим викликають їх опосередковане ураження.

Перша стадія – фотофізична, полягає у поглинанні випромінювання біологічно активним хромофором – молекулою, що здатна поглинати випромінювання певної довжини хвилі та започатковувати ланцюг фотобіологічного процесу. Кількісне оцінювання поглинання та впливу на нього складових зразка ЛМ із заданими товщинами  $l$ , коефіцієнтами розсіювання  $b$  та поглинання  $a$ , що утворюють  $k_v$  - коефіцієнт послаблення ( $k_v = a + b$ ), можна здійснювати на основі закону Бугера-Ламберта-Бера:  $I = I_0 \cdot e^{-k_v \cdot l}$ .

Запас енергії збудженої молекули, що перевищує поріг активації більшості хімічних реакцій поступово витрачається на їх перебіг, що відіграє головну роль у механізмі поглинання УФО. Безпосередньо поглинають кванти УФО нуклеїнові кислоти та білки із максимумами спектрів поглинання 260 нм та 280 нм та гемоглобін – в ділянці довжин хвиль 500-600 нм (в залежності від його форм). Хромофорами слугують азотисті основи ДНК, у структурі яких під впливом УФО виникають фотопродукти на кшталт зшивок ДНК-білку. Ці перетворення становлять другу стадію – так звану, первинну фотохімію, впродовж якої утворюється первинний продукт, що приймає безпосередню участь у подальших хімічних або фізико-хімічних перетвореннях.

Під час третьої стадії (вторинної фотохімії) внаслідок спонтанних хімічних перетворень

первинного продукту утворюється стабільний (стійкий впродовж тривалого часу) продукт. З погляду біофізичної моделі поглинання, що призводить до порушення структури ДНК і закодованої в ній генетичної інформації, переважну роль відіграє зшивка "ДНК-білок", фотоліз якого створює зшивки певних амінокислот, що, найбільш ймовірно, сприяє зростанню виявленого в експерименті поглинання у ділянці спектру 350-450 нм.

Темнові перетворення, що відповідають четвертій стадії викликають ланцюг біохімічних реакцій або перетворень клітинних структур. Кінцевий біологічний продукт, як наслідок біохімічних або структурних змін створюється на рівні організму впродовж п'ятої стадії.

Вирішальне значення у порушенні структури (деструкції) під дією УФО відіграє положення зазначених амінокислот. Деструкція амінокислотних залишків, що входять до активного центру білка впливають на їх конформацію, що призводить до втрати функціональної активності цього білка, свідченням чого, вірогідно, і є причиною зростання поглинання у зазначеній вище ділянці спектру, що було одержано експериментально. Поглинута залишками тирозину, фенілаланіну, гістидину та цистину енергія випромінювання мігрує до триптофану, що є найбільш чутливим, і руйнує його. Це порушує конформацію та інактивує білки.

### ВИСНОВКИ

На основі експериментального порівняння спектрів поглинання та колірних температур тестового випромінювання для зразків лейкомасти до і після опромінення під час сеансу фотоферезу виявлено їх повторювані відмінності. На основі експерименту та біофізичного аналізу сформовано принципи оцінювання ефективності проведення лікувального сеансу Ф за методом порівняння перелічених характеристик ЛМ до і після опромінення. Виходячи із сучасної біофізичної моделі основними молекулярними механізмами біологічної дії УФО на ЛМ можна вважати зміни структур і функцій ДНК, а також фотоінактивацію білків і пошкодження клітинних мембран.

У роботі доведено можливість технічної реалізації запропонованого принципу на основі неруйнівних оптоелектронних методів і засобів, що мають враховувати одержані кількісні характеристики виявлених і біофізично обґрунтованих закономірностей.

Одержані результати та їх біофізичне обґрунтування свідчить про клінічну значимість пропозиції та очевидну їх важливість щодо створення на нових принципах перспективного технологічного засобу, що мав би допомагати лікареві приймати обґрунтовані рішення про достатність або доцільність проведення лікувальної процедури.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Новак В. Апаратура для проведення фотоферезу / В. Новак, О. Кожухар, М. Курган // Мат. II наук.-практ. конф. «Нетрадиційні методи діагностики та лікування». – К., 1997. – С. 100-101.
2. Характеристики оптоелектронних елементів для контролю змін оптичних властивостей крові після фотоферезу / З. Готра, О. Кожухар, М. Скіра, Є. Косий // Вісник Національного університету "Львівська політехніка", "Радіоелектроніка та телекомунікації". – 2010. – №680. – С. 235-242.
3. Патент України № 54889, МПК G01N 21/85. Оптоелектронний пристрій контролю рухомої рідини: / З.Ю. Готра, О.Т. Кожухар, М.С. Скіра, Ю.Я. Кузьо; заявник і власник патенту Національний університет "Львівська політехніка". – № u201006741; заявл. 01.06.2010; опубл. 25.11.2010, Бюл. № 22.
4. Фотобиофізика. Версія 1.0 [Електронний ресурс] : електрон. учеб. пособие / И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк, В.В. Межевикин и др. – Электрон. дан. (9 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 438 с. – ISBN 978-5-7638-0890-2.
5. Фотобиология / С.В. Конев, И.Д. Волоотовский. – изд. 2-е, перераб. и доп. – Минск : БГУ им. В.И. Ленинна, 1979. – 384 с.

Надійшла до редакції 19.06.2011р.

**КОЖУХАР О.Т** – д.т.н., професор, професор кафедри "Електронні прилади", Національний університет "Львівська політехніка", м. Львів, Україна

**КОСИЙ Є.Р.** – к.м.н, доцент, зав. кафедри анатомії, фізіології та патології, Львівський медичний інститут, м. Львів, Україна

**ІВАХ М.С.** – аспірант кафедри "Електронні прилади", Національний університет "Львівська політехніка", м. Львів, Україна