

© А.И.ЖУРАВЛЕВ, 1995

УДК 616.62/.63+616.152/153]=074:543.426

А.И.ЖУРАВЛЕВ

### **СПОНТАННАЯ БИОХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЧИ В КЛИНИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Московская ветеринарная академия

Спонтанное свечение без каких-либо физических или химических воздействий, т.е. прижизненная спонтанная биохемилюминесценция (СБХЛ) обнаженных тканей млекопитающих — мозга, печени, а также сыворотки крови, было открыто Б.Н.Тарусовым в 1961 г. [1].

В том же 1961 г. А.И.Журавлевым была обнаружена спонтанная хемилюминесценция на воздухе всех типов ненасыщенных липидов [15,19,20].

Явление СБХЛ является следствием процессов метаболизма и отражает кинетику этих процессов [7,8,12,14]. СБХЛ показывает участие в метаболизме электронных возбужденных состояний (ЭВС) и излучаемых ими квантов в диапазоне  $\lambda=360-1100$  нм. Для биологии и медицины особое значение имеет уровень энергии этого диапазона  $E \approx 30-120$  ккал/м [1,3]. Порций (квантов) этой энергии ЭВС достаточно для разрыва и синтеза прочных — ионных и ковалентных — связей в первичной структуре биополимеров: белков, углеводов, нуклеиновых кислот.

Прямое определение ЭВС по СБХЛ является основой квантовой биологии [5,8,9,25]. На базе явления СБХЛ созданы десятки диагностических и исследовательских методов. В клиническом анализе измеряется пока суммарная СБХЛ. Тем не менее динамика суммарной СБХЛ дает информацию, которую другими методами получить не удастся [12,13].

#### **СБХЛ и предпатология**

В норме каждое животное и человек имеют определенный уровень интенсивности (I) СБХЛ. Так, I СБХЛ сыворотки крови  $\approx n \cdot 10^2$  квант/с, I СБХЛ мочи  $\approx n \cdot 10^3$  квант/с, попадающих на фотокатод фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) биохемилюминометра [10,12]. Значительное от-

клонение от нормы характерно при различных видах патологии. Незначительные отклонения свидетельствуют о начале нарушений метаболизма в предпатологических состояниях: при длительном эмоциональном стрессе, ожирении, воспалении.

**Стресс.** Нами установлено кратковременное, обратимое усиление СБХЛ сыворотки крови и мочи при всех исследованных видах стресса [12].

Болевой стресс — прокол иглой грудной клетки крыс — приводил к увеличению СБХЛ сыворотки крови с 3,0 до 5,5 имп/с. Тепловой стресс — помещение кроликов в теплую, 39°C, ванну — вызывал увеличение интенсивности СБХЛ сыворотки крови кроликов с 2,2 до 3,9 имп/с.

Химический стресс — перекармливание кроликов холестерином — способствовал увеличению СБХЛ сыворотки крови с 2,2 до 6,6 имп/с.

Транспортный стресс — перевозка телят в неприспособленных кузовах грузовиков — инициировал увеличение СБХЛ мочи с 9,5 до 31 имп/с на фоне уменьшения массы тела, повышения температуры и учащения дыхания. Возвращение уровня СБХЛ мочи телят к норме характеризовало окончание стрессорного воздействия [22].

**Ожирение,** несомненно, является предпатологическим состоянием, снижающим иммунитет, работоспособность и воспроизводство, т.е. жизнеспособность в целом.

Ранее было показано, что алиментарное ожирение крыс в эксперименте увеличивало СБХЛ сыворотки крови с 1,8 до 6,3 имп/с.

У ожиревших свиноматок СБХЛ повышалась до 6,0 имп/с по сравнению с 3,5 имп/с у нормальных свиноматок.

**Физические нагрузки.** Повышение СБХЛ сыворотки крови и мочи является суммарным тестом на неблагополучие в организме в заданных условиях. Это положение иллюстрируется двумя типами реакции организма на физическую нагрузку: стрессорной и нормальной. При нагрузке неадекватно большой для данного состояния больного или здорового человека наблюдается стрессорная реакция — повышение интенсивности СБХЛ сыворотки крови и мочи. Так, в начале учебно-тренировочных сборов команды кандидатов в мастера по академической гребле было дано задание достичь максимальной мощности 2500 кгм/мин. У 10 из 16 спортсменов СБХЛ увеличивалась с 8,2 до 10,9 имп/с.

При адекватной нагрузке наблюдается нормальная реакция — снижение СБХЛ. Величина адекватной нагрузки увеличивается после курса физических упражнений или после постоянной физической работы. В конце сбора после 15 дней тренировок СБХЛ в ответ на ту же нагрузку снижалась у 13 из 16 кандидатов в мастера спорта с 10,9 до 7,3 имп/с [2].

Аналогичный эффект — уменьшение степени повышения СБХЛ мочи и сыворотки крови — мы наблюдали у больных атеросклерозом в клинике после курса лечебной физкультуры [12].

Очевидно, недопустимы полная обездвиженность для больных, недостаточная физическая работа для здоровых и низкие физические нагрузки для спортсменов.

Если само по себе повышение СБХЛ свидетельствует о неблагополучии в организме, то в сочетании с другими клиническими тестами СБХЛ служит дополнительным и часто решающим диагностическим тестом.

### **СБХЛ в дифференциальной диагностике**

Впервые значение СБХЛ как дифференциального теста было показано в диагностике трудноразличимых начальных стадий туберкулеза и рака легких. И картина крови, и рентгенограмма в обоих случаях похожи.

Изменения СБХЛ сыворотки крови были противоположны: усиление при туберкулезе и ослабление при раке легких [12].

Дальнейшие исследования выявили более общую закономерность: СБХЛ усиливалась при всех типах воспаления. При внутриклеточном (с помощью прокола) введении кроликам слабого воспалительного агента — масляной эмульсии — с 8,5 до 12,2 имп/с; сильного агента — нитрата серебра — с 8,5 до 19,1 имп/с; токсичного продукта туберкулезных бактерий — 6,6-димиколат-трегалозы — с 8,6 до 20,2 имп/с. Этот показатель увеличивался также у больных хроническим простатитом — 10,9 имп/с по сравнению с 5,5 имп/с в норме (контроле). Сила и длительность воспалительного процесса коррелировали с усилением СБХЛ [12].

В тканях злокачественных опухолей [12], а также в сыворотке крови при лейкозе СБХЛ понижена [17].

Вместе с тем при наличии доброкачественной опухоли, например, аденомы простаты, интенсивность СБХЛ у людей не менялась.

### **Различие некоторых механизмов при предпатологии и патологии**

На модели холестеринового атеросклероза у кроликов выявлено различное изменение СБХЛ — повышение в период атерогенеза и снижение при атеросклерозе.

В период скормливания кроликам избытка холестерина в течение 50 дней, до появления клинических признаков атеросклероза, интенсивность СБХЛ сыворотки крови была повышенной с 2,2 до 6,6 имп/с.

На 80-е сутки, с появлением клинических признаков, т.е. с началом атеросклероза, СБХЛ понизилась с 6,6 до 3,3 имп/с.

Известно, что развитие атеросклероза сопровождается снижением окисляемости липидов за счет замены ненасыщенных жирных кислот на насыщенные и фосфолипидов на холестерин. Снижение и окисляемости липидов, и СБХЛ свидетельствует о торможении свободнорадикального (перекисного) окисления в тканях.

При канцерогенезе СБХЛ сыворотки крови увеличивалась, а при наличии злокачественных опухолей и при лейкозе — уменьшалась [12,17].

СБХЛ липидов дает представление о различии процессов, протекающих в ишемизированных органах — при завалах в шахтах, при землетрясениях, во время завала и после освобождения. При понижении парциального давления кислорода за счет его окисления в липидах в замкнутом сосуде СБХЛ резко снижается, стремясь к 0. Одновременно в таком относительном вакууме-аноксии происходит распад перекисных соединений, т.е. свободнорадикальное (перекисное) окисление липидов заторможено. При постаноксическом (постишемическом) пуске кислорода происходит резкое усиление СБХЛ, когда ее уровень многократно превышает первоначальный, до аноксии. Налицо различие механизма процессов, протекающих в период аноксий с преобладанием реакций диссоциации перекисей и накоплении свободных радикалов и в постаноксический период, когда развивается бурная реакция продуктов диссоциации с кислородом [25].

Очевидно, приведенными примерами не ограничиваются возможности СБХЛ в выявлении различных механизмов патогенеза на различных стадиях некоторых заболеваний.

#### СБХЛ в диагностике

При некоторых патологических состояниях можно использовать СБХЛ в диагностике, при наличии чувствительных биохемилюминометров (до  $10^{-2}$  квант/с).

**Криз отторжения почки.** Первичные и острые кризы отторжения трансплантированной человеку почки вызывают усиление СБХЛ мочи практически одновременно с началом криза.

Преимущества хемилюминесцентного метода диагностики в следующем: моча берется безболезненно и длительно каждые 2-3 ч; измерение СБХЛ быстрое, всего 3-5 мин. Самое главное в том, что изменения СБХЛ проявляются на 24-48 ч. раньше, чем другие — иммунологические или серологические — изменения. Более ранняя диагностика дает возможность в несколько раз уменьшить применяемую для подавления криза дозу иммунодепрессантов [16,23].

**Лекарственная аллергия.** Лекарственная аллергия возникает, как правило, на фоне стрессорной активации свободнорадикального (перекисного) окисления и приводит к окислительной деструкции липид-белковых комплексов.

Э.Н.Солошенко провела исследование сыворотки крови. Для диагностики в каждый из образцов сыворотки крови больных, сенсibilизированных к одному из неизвестных аллергенов, последовательно добавляли по одному из набора 25 возможных лекарств-аллергенов. СБХЛ усиливалась на 40-300% только при контакте сыворотки с тем лекарством, к которому был сенсibilизирован больной [18].

Мы предполагаем, что аллергия является одной из форм квантовой патологии и определяется нарушением миграции энергии ЭВС в липид-белковых комплексах.

Именно СБХЛ при лекарственной аллергии привела нас к необходимости постулировать наличие такой новой формы патологии, как квантовая патология.

#### Механизмы СБХЛ

При подходе к рассмотрению механизмов СБХЛ следует учитывать, что главную роль в метаболизме будут играть не сами регистрируемые нами кванты, а излучающие их ЭВС белков, липидов или нуклеиновых кислот. Это определяется тем, что излучают не все, а только одно из  $10^3$  —  $10^6$  ЭВС, т.е. число ЭВС по крайней мере в  $10^3$  —  $10^6$  раз больше числа регистрируемых квантов СБХЛ [3,21].

В настоящее время известны 3 типа механизмов синтеза ЭВС в биологических структурах.

1. **Молекулярный** — за счет активации в тканях свободнорадикального (перекисного) окисления липидов [15,20].

Методами профилактики и терапии являются введение биоантиоксидантов, антиокислительных ферментов и снижение парциального давления кислорода в барокамерах. СБХЛ дает возможность изучить патогенез и эффективность лечения одной из групп молекулярных патологий —



свободнорадикальной [6,13].

2. **Квантовый.** Мы предложили гипотезу нормальной метаболической генерации энергии ЭВС в липид-белковых комплексах и функционирования биоэнергетики с участием порций энергии ЭВС  $\approx 40-120$  ккал/м [5,8,25]. Нарушение структур липид-белковых комплексов будет нарушать пути миграции энергии ЭВС и приводить к потере энергии в форме СБХЛ.

Методом профилактики и лечения в данном случае может быть применение тушителей — соединений, перехватывающих энергию ЭВС и безизлучательно переводящих ее в другие формы энергии. Это каротиноиды, витамин А, углекислый газ, железо — порфирины.

Участие ЭВС в метаболизме и является предметом изучения новой отрасли биологии — квантовой.

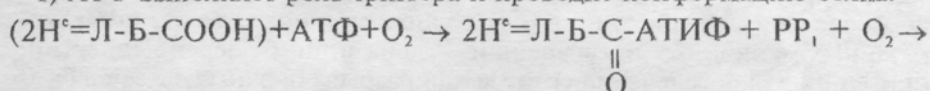
Применительно к липид-белковым комплексам мы предлагаем следующий механизм синтеза ЭВС белков в нормальном метаболизме.

#### Химически инициированный электронно-обменный синтез ЭВС (ХИЭОС-ЭВС) в липид-белковых комплексах, запускаемый АТФ

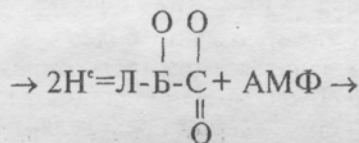
Липид-белковый комплекс ( $2H^e$ -липид-белок —  $COOH$ ;  $2H^e$ -Л-Б- $COOH$ ) содержит все компоненты, необходимые для ХИЭОС-ЭВС белка, это в первую очередь липид  $2H^e$ -Л как донор электронов и способные к образованию перекисей — акцепторы электронов аминокислоты, особенно триптофан.

В присутствии  $O_2$  и АТФ реакция может протекать следующим образом:

1) АТФ выполняет роль триггера и проводит конформацию белка:

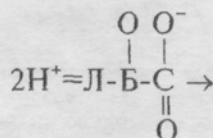


2) Эта конформация увеличивает сродство белка к кислороду с образованием перекисной диоксэтановой группировки с растянутой  $O-O$  связью:



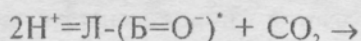
Вероятнее всего, АТФ действует как аллостерический активатор.

3) Та же конформация создает канал для внутрикомплексного одного электронного переноса от донора ( $2H^e$ -Л) на перекисную группировку с образованием катион-радикала липида и анион-радикала белка или липида:

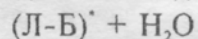


4) Перекисная связь после переноса на нее электрона и образования

анион-радикала сразу разрывается по классической схеме с образованием устойчивых карбонильных анион-радикалов в ЭВС и с декарбоксилированием:



5) Происходит обратный перенос электрона с анион-радикала белка или липида на катион-радикал липида, т.е. экзотермическая рекомбинация с перегруппировкой и выделением воды:



Белок (фермент) остается в ЭВС с наличием свободной энергии ЭВС  $\approx 40-120$  ккал/м, достаточной для одноактного (быстрого) разрыва или синтеза прочных ионных и ковалентных связей в биополимерах.

Согласно этой схеме, энергетическим фактором, определяющим биоэнергетику, оказывается липид; в полном соответствии с эффектом липидзависимости ферментов.

Белок-фермент сохраняет свою функциональную роль за счет энергии ЭВС.

АТФ отводится роль необходимого пускового — триггерного агента, энергии которого (6-12 ккал/м) достаточно лишь для конформации.

Сложность изучения этого механизма определяется тем, что ЭВС белка практически не излучают, превращая энергию ЭВС в другие виды энергии очень быстро ( $10^{-7}$  с) и с КПД, близким к 100%.

Только транспорт электрона по электронным возбужденным уровням в молекулярных структурах биологических систем (нервной, мышечной и др.) обеспечивает триединство, т.е. одновременно: а) волну структурных конформационных превращений — движений; б) перенос энергии, достаточной для обеспечения синтеза или разрыва прочных связей в биополимерах; в) перенос электрона для осуществления биохимических превращений с большой скоростью.

3. **Клеточный.** Хорошо изученный механизм, связанный с синтезом кислородных радикалов  $\text{NO}^\cdot$ ,  $\cdot\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  и др. при фагоцитозе [4,24].

Первоочередной задачей для изучения СБХЛ, т.е. квантовых явлений в тканях млекопитающих, будет создание более чувствительных биохемилюминометров, которые дадут возможность определять спектральный состав СБХЛ [10]. Это необходимо для решения главной клинко-диагностической проблемы — определения преобладания одного из трех указанных выше механизмов для каждой данной патологии, т.е. специфичности тех или иных электронных переходов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. // Биофизика. — 1961. — Т. 6, N 4. — С. 490-492.
2. Борисова И.Г., Журавлев А.И., Сейфулла Р.Д. // Теор. и практ. физ. культуры. — 1986. — N 2. — С. 26-28.
3. Васильев Р.Ф. // Изв. АН СССР. Сер. физ. — 1982. — Т. 46, N 2. — С. 323-329.
4. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток животных. — М., 1989.
5. Журавлев А.И. // Биоллюминесценция. — М., 1965. — С. 184-191.
6. Журавлев А.И. // Сверхслабое свечение в биологии. — М., 1972. — С. 17-32.
7. Журавлев А.И. // Теоретические и методические основы биохемилюминесценции. — М., 1986. — С. 3-11.
8. Журавлев А.И. // Успехи соврем. биол. — 1991. — N 1. — С. 144-153.

9. Журавлев А.И. // Квантовая биология. — М., 1993.
10. Журавлев А.И., Асанов М.А. // Биофизика. — 1991. — N 3. — С. 489-498.
11. Журавлев А.И., Веселовский В.А., Кошечко Н.Н. // Биолуминесценция. — М., 1965. — С. 19-50.
12. Журавлев А.И., Журавлева А.И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. — М., 1975.
13. Журавлев А.И., Пантюшенко В.Т. // Сельскохозяйств. биол. — 1989. — N 2. — С. 17-24.
14. Журавлев А.И., Тростников В.Н. Свечение живых тканей. — М., 1966.
15. Журавлев А.И., Филиппов Ю.Н., Симонов В.В. // Биолуминесценция. — М., 1965. — С. 75-89.
16. Журавлев А.И., Цыпин А.Б., Асанов М.А. и др. Способ диагностики криза отторжения трансплантированного органа: А. с. 457929 СССР.
17. Журавлев А.И., Шишков В.П., Макаров С.Н., Петровский Г.С. // Сельхоз. биол. — 1979. — N 4. — С. 463-467.
18. Солошенко Э.Н. // Биохемилуминесценция в медицине и сельском хозяйстве. — Ташкент, 1986. — С. 70-71.
19. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. // Радиобиология. — 1961. — Т. 1, N 1. — С. 150-151.
20. Тарусов Б.Н., Журавлев А.И. // Биолуминесценция. — М., 1965. — С. 125-133.
21. Федорова Г.Ф. Количественное исследование хемилуминесценции при окислении углеводородов в растворах: Автореф. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. — М., 1979.
22. Фигатнер Ю.Ю., Сопыев Б. // Проблемы молекулярной биологии и патологии. — М., 1977. — С. 41-44.
23. Цыпин А.Б., Бурдина Г.В., Травкин А.Г., Карнаух И.М. // Теоретические и методические основы биохемилуминесценции. — М., 1986. — С. 146-150.
24. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steel R.H. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1972. — Vol. 47. — P. 679-684.
25. Zhuravelev A.I. // Biological Luminescence. — Singapore, 1990. — P. 19-48.

Поступила 06.01.95