

УДК 577.35+616-006.66

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ В СОСТАВЕ ПАРАМАГНИТНЫХ ЦЕНТРОВ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЕ

*П.В. Зеленихин, А.В. Макеева, А.А. Родионов, Е.А. Соколова,
И.Г. Гатауллин, О.Н. Ильинская*

Аннотация

Метод ЭПР-спектроскопии обладает весомым потенциалом для высокоэффективной диагностики и мониторинга развития злокачественных новообразований. Анализ изменений качественного и количественного состава парамагнитных центров применяется как для характеристики непосредственно опухолевых биоптатов, так и для определения специфических маркеров неоплазии в сыворотке крови. Ряд опухолей, в частности меланома, содержит стабильные специфические парамагнитно-активные радикалы, которые позволяют с высокой точностью диагностировать такие разновидности новообразований с помощью ЭПР-спектроскопии, в том числе и *in vivo*. Поиск характерных парамагнитных маркеров различных типов раковых опухолей, в том числе колоректальной карциномы, которая занимает одно из ведущих мест по частоте встречаемости среди онкологических заболеваний в развитых странах, является перспективным подходом для контроля данного типа патологий.

Впервые методом ЭПР-спектроскопии зарегистрированы специфические различия в качественном составе парамагнитных центров малигнизированного и неозлокачественного эпителий прямой кишки. Спектральные характеристики сигнала свидетельствуют о присутствии в опухолевой ткани нитроксильных радикалов. Специфические различия нормальной и малигнизированной тканей наблюдались только в образцах, замороженных в жидком азоте немедленно после отбора. Лиофилизация биоптатов приводила к исчезновению характерных для опухолевой ткани сигналов.

Ключевые слова: колоректальный рак, ЭПР, свободные радикалы.

Введение

Злокачественные перерождения тканей характеризуются изменениями тканевого метаболизма, физиологического состояния, а также изменением концентрации свободных радикалов пораженного участка, что открывает широкие возможности для применения метода ЭПР-спектроскопии для изучения динамических характеристик поведения парамагнитных центров в озлокачественных тканях [1].

Гипотеза о важной роли свободных радикалов в канцерогенезе была предложена в 60-70-х годах XX в., когда было установлено, что концентрация свободных радикалов меняется по мере развития опухоли как у животных, так и у людей, при этом ЭПР-спектроскопию использовали при сравнении образцов тканей в замороженном, лиофилизированном и «влажном» состояниях. В последующие годы целый ряд ученых, применив метод ЭПР, посвятил свои экспериментальные

и клинические исследования вопросу о различиях свободных радикалов и других парамагнитных частиц в опухолевых тканях [2–5]. Одним из признаков, отличающих клетки злокачественных новообразований от клеток нормальных тканей, способных быть охарактеризованными при помощи ЭПР, является редокс-статус. Известно, что изменения данного параметра характеризуют ответ опухоли на химиотерапевтические агенты, облучение и цитотоксины [6]. При регистрации ЭПР-сигналов, источником которых являлся глутатион, удалось выяснить, что ткани опухолей находятся в более восстановленном состоянии [7]. Об изменениях редокс-метаболизма злокачественных новообразований также свидетельствует ЭПР-визуализация свободных радикалов, локализованных в больной и здоровой слизистой желудка. Показано, что ткань опухоли сигналом не обладает, поскольку благодаря повышенному редокс-статусу спиновый зонд быстро восстанавливается до недетектируемого «тихого» состояния [8].

Важную информацию о развитии и физиологическом состоянии опухоли несут протеины и пептидные фрагменты, высвобождаемые озлокачествленными клетками в кровоток. К подобным ассоциированным с неоплазией маркерам относятся аллостерические модификации сывороточного альбумина, приводящие к изменениям в способности данного белка связывать и транспортировать жирные кислоты. Эти изменения легко диагностируются с помощью неинвазивной ЭПР-спектроскопии, причем точность уставленного данным методом диагноза составляла 87.4% [9].

С помощью ЭПР-спектроскопии представляется возможным получать количественную информацию о таких белках плазмы крови, как церулоплазмин, трансферрин и метаглобин. Сравнительный анализ ЭПР-спектров, полученных от вышеперечисленных белков крови пациентов с урогенитальными злокачественными новообразованиями и здоровых людей, показал, что общая интенсивность сигнала церулоплазмينا в крови онкологических больных в 1.9–2.5 раза превышала верхнюю границу для контрольной группы, концентрация метаглобина была снижена в 1.8–2.9 раз, а содержание трансферрина и у опытной, и у контрольной групп находилось в одинаковых пределах. Таким образом, повышенное содержание в крови церулоплазмينا на фоне пониженного уровня метаглобина может служить потенциальным маркером канцерогенеза [10].

ЭПР-спектроскопия обладает также широкими возможностями для характеристики меланомы *in vivo*, поскольку меланиновый пигмент, содержащий свободный радикал, продуцирует специфичный ЭПР-сигнал, благодаря чему пораженные меланомой участки с легкостью детектируются. Данный метод позволяет довольно точно охарактеризовать границы опухоли, форму, степень фрагментации и ее пространственное расположение, которые, в свою очередь, характеризуют инвазивность новообразования [11]. Последние исследования в данной области позволили подтвердить принадлежность наблюдаемого ЭПР-сигнала опухоли: при сравнении спектров ткани невуса с меланомой были выявлены значительные различия в характере сигналов, что, по мнению авторов исследования [12], может послужить надежным маркером при постановке диагноза.

Таким образом, характеристика различий параметров опухолевых и нормальных тканей методом ЭПР является технологичным и высокоэффективным способом диагностики и мониторинга развития злокачественных новообразований.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилась ЭПР-характеристика биоптатов колоректальной карциномы человека и нормального эпителия прямой кишки, а также сравнительный анализ качественных различий в спектрах ЭПР-сигналов от образцов нормальной и малигнизированной тканей.

1. Материалы и методы исследования

Был проведен ЭПР-анализ биоптатов слизистой прямой кишки 10 пациентов, перенесших операцию по удалению колоректальной опухоли. Образцы тканей были получены и исследованы в соответствии с Разрешением этического комитета КГМА (протокол № 4 от 7 мая 2009 г.). Они предоставлены нам на основании сотрудничества с оперирующим хирургом профессором И.Г. Гатауллинным и врачом-колопроктологом П.В. Мальцевым.

Забор тканей производился непосредственно во время операции. Образцы опухоли отбирали непосредственно из участка озлокачествленной ткани, в то время как пробы нормального эпителия отбирали со здоровой стенки кишки выше зоны малигнизации. Биоптаты отбирали стерильно, помещали в эппендорфы и немедленно замораживали в жидком азоте. Необходимость применения низких температур обусловлена малым временем жизни некоторых парамагнитных центров при комнатной температуре. Образцы тканей представляли собой цилиндры высотой 30 мм и диаметром 4 мм. Такие размеры образца позволяли поместить его в сосуд Дьюара с внутренним диаметром 4.5 мм. Благодаря малому расстоянию между границей образца и внутренней стенкой сосуда кипение азота вокруг образца не влияло на частоту и согласование резонатора. Часть образцов перед анализом подвергали лиофилизации на сушке Martin Christ (Германия) при температуре $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0.001 Бар до полного высыхания, остальные исследовали непосредственно в замороженном состоянии.

ЭПР-эксперименты проводили на стационарном спектрометре ESP-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 9.4–9.9 ГГц, напряженностью магнитного поля 20–1600 мТ (погрешность – не более 0.01 мТ), частотой модуляции 100 кГц при мощности СВЧ-излучения 2–20 мВт.

Спектры замороженных образцов регистрировали при 77 К. Лиофилизованные образцы исследовали при 15 К с помощью гелиевого проточного криостата Oxford-9 (Великобритания), контроль температуры осуществляли с применением прибора ITS 4 Oxford (Великобритания).

2. Результаты и их обсуждение

Анализ ЭПР-спектров лиофилизованных образцов не позволил выявить значимых различий в структуре сигналов парамагнитных центров нормальных и опухолевых тканей (рис. 1). Несмотря на то что лиофилизация биологических образцов увеличивает чувствительность метода ЭПР-спектроскопии [13], параметры сигналов от парамагнитных центров биоптатов опухолевой ткани оставались в пределах изменений характеристик спектров препаратов нормального эпителия. Вероятно, длительность процесса лиофилизации опосредовала элиминацию из образцов парамагнитных центров с малым сроком жизни, что и не позволило зафиксировать различия в спектрах препаратов малигнизированного и нормального эпителий.

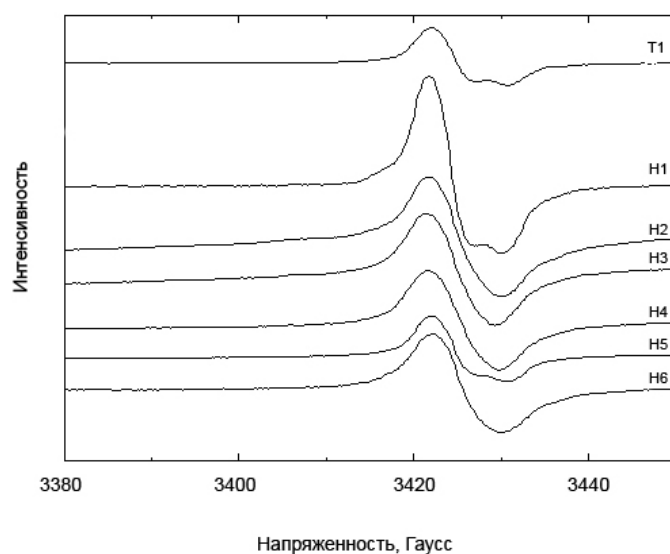


Рис. 1. Сравнительный анализ ЭПР-спектров лиофилизированных образцов эпителия кишечника: Т – типичный спектр образца малигнизированной ткани, Н (1–6) – спектры препаратов нормального эпителия. Интенсивность нормирована на единицу массы образцов. Рабочая частота 9.6 ГГц, мощность СВЧ-излучения 2 мВт, амплитуда модуляции 2.5 Э

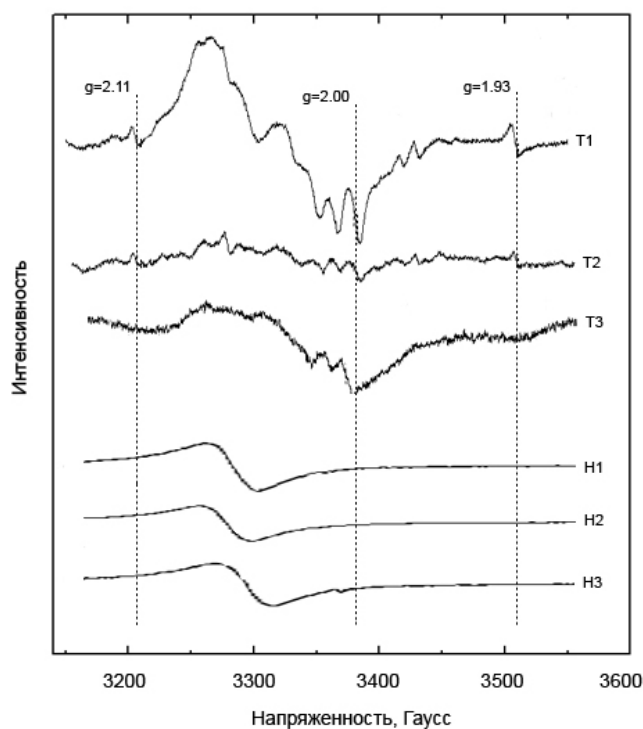


Рис. 2. Сравнительный анализ ЭПР-спектров замороженных образцов эпителия кишечника: Т (1–3) – спектры образцов малигнизированной ткани, Н (1–3) – спектры препаратов нормального эпителия. Рабочая частота 9.6 ГГц, мощность СВЧ-излучения 50 мВт, амплитуда модуляции 5 Э

Заморозка в жидком азоте позволяет увеличить время жизни парамагнитных центров, но в то же время препятствует нормированию образцов по массе, что не позволяет провести количественный анализ содержания парамагнитно-активных молекул в препарате. Однако сравнение ЭПР-спектров замороженных образцов позволило зафиксировать уникальный тип сигнала, характерный лишь для опухолевой ткани при $g = 2.00$ (рис. 2).

Установлена также более сложная природа сигнала от онкотрансформированного эпителия, что свидетельствует о наличии в озлокачественной ткани нескольких типов парамагнитных центров. Однако непостоянство состава радикалов нормальных и опухолевых тканей трудно верно интерпретировать из-за отсутствия парамагнетиков, дающих предельно точно идентифицируемые ЭПР-сигналы. Тем не менее ранее в ряде работ уже было показано присутствие отчетливого сигнала в опухолевых тканях крыс вблизи $g = 2.00$ [14].

Полученные нами данные позволяют сделать заключение о присутствии в образцах опухолевой ткани специфических парамагнетиков, предположительно являющихся нитроксильными радикалами. Схожая картина триплетно расщепленных спектров сверхтонкой структуры нитроксильных радикалов была получена ранее для замороженных образцов саркомы селезенки и нейробластомы мыши [15], гепатомы и саркомы человека [16], тканей печени животных, подвергнутых длительному воздействию ионизирующего излучения низкой мощности [17], однако для колоректальной карциномы демонстрируется впервые.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 12-04-31022-мол_a и 12-04-01226-a).

Литература

1. *Rhodes C.J.* Electron spin resonance. Part one: a diagnostic method in the biomedical sciences // *Sci. Prog.* – 2011. – V. 94, Pt. 1. – P. 16–96.
2. *Mulay I.L., Mulay L.N.* Magnetic susceptibility and electron spin resonance absorption spectra of mouse melanomas S91 and 591A // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1967. – V. 39, No 4. – P. 735–743.
3. *Dodd N.J.* Some EPR signals in tumour tissue // *Br. J. Cancer.* – 1973. – V. 28, No 3. – P. 257–262.
4. *Mailer C., Swartz H.M., Konieczny M., Ambegaonkar S., Moore V.L.* Identity of the paramagnetic element found in increased concentrations in plasma of cancer patients and its relationship to other pathological processes // *Cancer Res.* – 1964. – V. 34, No 3. – P. 637–642.
5. *Gutierrez P.L., Swartz H.M.* Paramagnetic changes in cancer: growth of Walker 256 carcinoma studied in frozen and lyophilized tissues // *Br. J. Cancer.* – 1979. – V. 39, No 1. – P. 24–34.
6. *Schafer F.Q., Buettner G.R.* Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 30, No 11. – P. 1191–1212.
7. *Kuppusamy P., Li H., Ilangovan G., Cardounel A.J., Zweier J.L., Yamada K., Krishna M.C., Mitchell J.B.* Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62, No 1. – P. 307–312.

8. *Mikuni T., He G., Petryakov S., Fallouh M.M., Deng Y., Ishihara R., Kuppusamy P., Tatsuta M., Zweier J.L.* In vivo detection of gastric cancer in rats by electron paramagnetic resonance imaging // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64, No 18. – P. 6495–6502.
9. *Kazmierczak S.C., Gurachevsky A., Matthes G., Muravsky V.* Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring // *Clin. Chem.* – 2006. – V. 52, No 11. – P. 2129–2134.
10. *Ибрагимова М.И., Чушников А.И., Мусеев В.Н., Петухов В.Ю., Желов Е.П.* Мониторинг состояния онкологических больных методом ЭПР // *Альм. клин. мед.* – 2008. – Т. 17, Ч. 2. – С. 216–234.
11. *Godechal Q., Leveque P., Marot P., Baurain J.F., Gallez B.* Optimization of electron paramagnetic resonance imaging for visualization of human skin melanoma in various stages of invasion // *Exp. Dermatol.* – 2012. – V. 21, No 5. – P. 341–346. – doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01461.x.
12. *Cesareo E., Korkinal L., D'Errico G., Vitiello G., Aguzzi M.S., Passarelli F., Pedersen J.Z., Facchiano A.* An endogenous electron spin resonance (ESR) signal discriminates nevi from melanomas in human specimens: a step forward in its diagnostic application // *PLoS One.* – 2012. – V. 7, No 11. – P. e48849-1–e48849-11. – doi: 10.1371/journal.pone.0048849.
13. *Ажупа Я.И.* Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. – М.: Наука, 1983. – 528 с.
14. *Vithayathil A.J., Ternberg J.L., Commoner B.* Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis // *Nature.* – 1965. – V. 207. – P. 1246–1249.
15. *Brennan M.J., Cole T., Singley J.A.* A unique hyperfine ESR spectrum in mouse neoplasms analysed by computer simulation // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1966. – V. 123, No 3. – P. 715–718.
16. *Emanuel N.M., Saprin A.N., Shabalkin V.A., Kozlova L.E., Krugljakova K.E.* Detection and investigation of a new type of ESR signal characteristic of some tumour tissues // *Nature.* – 1969. – V. 222. – P. 165–167.
17. *Сидорик Е.П., Бурлака А.П.* Молекулярные механизмы нарушений в клетках при хроническом действии ионизирующего излучения низкой мощности дозы в связи с аварией на ЧАЭС // *Эксперим. онкол.* – 2000. – Т. 22, № 4. – С. 179–185.

Поступила в редакцию
02.10.13

Зеленихин Павел Валерьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: pasha_mic@mail.ru

Макеева Анна Владимировна – аспирант кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: annam.ksu@gmail.com

Родионов Александр Александрович – младший научный сотрудник кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: rodionovshurik@yandex.ru

Соколова Евгения Александровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры управления качеством, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: zhenya_mic@mail.ru

Гатауллин Ильгиз Габдуллович – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии и хирургии, Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия.

E-mail: *ilgizg@list.ru*

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@kpfu.ru*

* * *

CHANGES IN COMPOSITION OF PARAMAGNETIC CENTERS OF EPITHELIAL TISSUE DURING COLORECTAL CARCINOMA

*P.V. Zelenikhin, A.V. Makeeva, A.A. Rodionov,
E.A. Sokolova, I.G. Gataullin, O.N. Ilinskaya*

Abstract

EPR spectroscopy possesses high potential for efficient diagnostics and monitoring of malignant tumor development. The analysis of qualitative and quantitative changes in the composition of paramagnetic centers is applied for characterization of tumor biopsy material as well as for definition of the specific markers of neoplasia in blood serum. A number of tumors (melanoma in particular) are known to contain stable specific paramagnetic radicals. The presence of these radicals allows diagnosing accurately certain types of malignant tumors using EPR spectroscopy, including in vivo. Colorectal carcinoma was shown to occupy one of the leading places according to the frequency of occurrence among oncological diseases in the developed countries. Therefore, searching for the specific paramagnetic markers of various types of cancer tumors, including colorectal carcinoma, is a promising approach to control these pathologies.

For the first time, specific distinctions in the qualitative composition of the paramagnetic centers of malignant and normal rectal epithelium have been recorded using EPR spectroscopy. The spectral characteristics indicated the presence of nitroxyl radicals in tumor tissue. Specific distinctions between normal and malignant tissues were observed only in the samples frozen in liquid nitrogen immediately after preparation. Lyophilization of biopsy material led to the disappearance of signals typical for tumor tissue.

Keywords: colorectal carcinoma, EPR, free radicals.

References

1. Rhodes C.J. Electron spin resonance. Part one: a diagnostic method in the biomedical sciences. *Sci. Prog.*, 2011, vol. 94, Pt. 1, pp. 16–96.
2. Mulay I.L., Mulay L.N. Magnetic susceptibility and electron spin resonance absorption spectra of mouse melanomas S91 and 591A. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1967, vol. 39, no. 4, pp. 735–743.
3. Dodd N.J. Some EPR signals in tumour tissue. *Br. J. Cancer*, 1973, vol. 28, no. 3, pp. 257–262.
4. Mailer C., Swartz H.M., Konieczny M., Ambegaonkar S., Moore V.L. Identity of the paramagnetic element found in increased concentrations in plasma of cancer patients and its relationship to other pathological processes. *Cancer Res.*, 1964, vol. 34, no. 3, pp. 637–642.
5. Gutierrez P.L., Swartz H.M. Paramagnetic changes in cancer: growth of Walker 256 carcinoma studied in frozen and lyophilized tissues. *Br. J. Cancer*, 1979, vol. 39, no. 1, pp. 24–34.
6. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, vol. 30, no. 11, pp. 1191–1212.
7. Kuppusamy P., Li H., Ilangovan G., Cardounel A.J., Zweier J.L., Yamada K., Krishna M.C., Mitchell J.B. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, no. 1, pp. 307–312.

8. Mikuni T., He G., Petryakov S., Fallouh M.M., Deng Y., Ishihara R., Kuppusamy P., Tatsuta M., Zweier J.L. In vivo detection of gastric cancer in rats by electron paramagnetic resonance imaging. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, no. 18, pp. 6495–6502.
9. Kazmierczak S.C., Gurachevsky A., Matthes G., Muravsky V. Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring. *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 11, pp. 2129–2134.
10. Ibragimova M.I., Chushnikov A.I., Moiseev V.N., Petukhov V.Yu., Zheglov E.P. EPR monitoring of oncology patients. *Almanakh Klinichskoi Meditsiny*, 2008, vol. 17, part 2, pp. 216–234. (In Russian)
11. Godechal Q., Leveque P., Marot P., Baurain J.F., Gallez B. Optimization of electron paramagnetic resonance imaging for visualization of human skin melanoma in various stages of invasion. *Exp. Dermatol.*, 2012, vol. 21, no. 5, pp. 341–346. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01461.x.
12. Cesareo E., Korkinal L., D'Errico G., Vitiello G., Aguzzi M.S., Passarelli F., Pedersen J.Z., Facchiano A. An endogenous electron spin resonance (ESR) signal discriminates nevi from melanomas in human specimens: a step forward in its diagnostic application. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 11, art. e48849, pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0048849.
13. Azhipa Ya.I. Biomedical Aspects of Application of Electron Paramagnetic Resonance. Moscow, Nauka, 1983. 528 p. (In Russian)
14. Vithayathil A.J., Ternberg J.L., Commoner B. Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis. *Nature*, 1965, vol. 207, pp. 1246–1249.
15. Brennan M.J., Cole T., Singley J.A. A unique hyperfine ESR spectrum in mouse neo-plasms analysed by computer simulation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, vol. 123, no. 3, pp. 715–718.
16. Emanuel N.M., Saprin A.N., Shabalkin V.A., Kozlova L.E., Krugljakova K.E. Detection and investigation of a new type of ESR signal characteristic of some tumour tissues. *Nature*, 1969, vol. 222, pp. 165–167.
17. Sidarik E.P., Burlaka A.P. Molecular mechanisms of cell alterations caused by chronic exposure to low-intensity ionizing radiation due to Chernobyl accident. *Eksperimentalnaya Onkologiya*, 2000, vol. 22, pp. 179–185. (In Russian)

Received
October 2, 2013

Zelenikhin Pavel Valerevich – PhD in Biology, Associated Professor, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: pasha_mic@mail.ru

Makeeva Anna Vladimirovna – PhD Student, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: annam.ksu@gmail.com

Rodionov Aleksandr Aleksandrovich – Junior Research Fellow, Department of Quantum Electronics and Radiospectroscopy, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: rodionovshurik@yandex.ru

Sokolova Evgeniya Aleksandrovna – PhD in Biology, Associated Professor, Department of Quality Management, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: zhenya_mic@mail.ru

Gataullin Ilgiz Gabdullovich – Doctor of Medicine, Professor, Department of Oncology and Surgery, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia.

E-mail: ilgizg@list.ru

Ilinskaya Olga Nikolaevna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru