

ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССОВ МАЛИГНИЗАЦИИ В ТКАНЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ И ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ ПРОБ ЖЕЛЧИ И ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО СОКА

© 2017 г. К.М. Гираев, Н.А. Ашурбеков, М.А. Магомедов*,
А.А. Мургазаева, Р.Т. Меджидов**

Дагестанский государственный университет, 367021, Республика Дагестан, Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а

*Институт физики им. Х.И. Амирханова Дагестанского научного центра РАН,
367003, Республика Дагестан, Махачкала, ул. М. Ярагского, 94

**Дагестанская государственная медицинская академия, 367001, Республика Дагестан, Махачкала, пл. Ленина, 1

E-mail: nashurb@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.15 г.

После доработки 24.10.16 г.

Приведены результаты оптико-спектральных исследований в интервале длин волн 250–1500 нм и частот 6000–400 см⁻¹ для проб желчи и панкреатического сока по мере развития процессов малигнизации в тканях поджелудочной железы. Показано, что развитие дегенеративных процессов для исследуемых биосред приводит к росту интенсивности спектрального контура поглощения в области низких частот (1600–400 см⁻¹) и появлению пика вблизи частоты 840 ± 5 см⁻¹, образованного колебаниями О–О-групп алифатических и ароматических перекисей и перекисных кислот. Показано, что развитие злокачественных процессов для проб желчи приводит к увеличению, а для панкреатического сока – к уменьшению плотности и размеров частиц, что следует из возрастания и снижения коэффициентов поглощения и рассеяния света.

Ключевые слова: желчь, панкреатический сок, процессы малигнизации, спектрофотометрия, спектры поглощения, рассеяния, фактор анизотропии рассеяния, ИК-Фурье-спектрометрия, молекулярный состав, диагностика.

К настоящему времени методы оптической и инфракрасной (ИК) спектрометрии биообъектов получили широкое распространение вследствие их высокой информативности, возможности проведения *in vivo* исследований и простоты реализации (см., например, работы [1,2]). Так, применение метода спектрофотометрии интегрирующих сфер с последующим определением коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ_s и фактора анизотропии рассеяния g для исследования биообъектов при различных формах патологии позволяет оценить комплекс их физиологических, структурно-морфологических и биохимических параметров [3–5]. Использование же различных методов ИК-спектрометрии дает возможность выявить динамику компонентных свойств, молекулярной структуры и их конформационного взаимодействия [6–10]. На сегодняшний день изучению спектрально-оптических свойств био-

логических объектов посвящено большое количество работ, где детально исследованы различные формы патологий тканей головного мозга, органов брюшной полости, грудной клетки, сосудов, кожного покрова и др. Систематизированные данные результатов таких исследований приведены в многочисленных обстоятельных обзорах [3–15].

Согласно последним данным Всемирной организации здравоохранения одним из агрессивных типов онкологии, занимающих лидирующие позиции по распространенности, является рак поджелудочной железы. Данная ситуация обусловлена множеством этиологических и патогенетических факторов, к числу которых следует отнести отсутствие ярко выраженных симптомов течения заболевания, высокую чувствительность к воздействию неблагоприятных факторов (злоупотребление алкоголем, нерегулярное и несбалансированное питание, авитаминоз и др.) и процессам аутоагрессии, вовлечение в воспалительный процесс смежных органов и сложности в проведении дифференциальной ди-

Сокращение: ИК – инфракрасный.

агностики [16,17]. В этой связи первостепенную важность приобретает диагностика и лечение различных заболеваний поджелудочной железы, в том числе приводящих к процессам предракового состояния.

Существующие на сегодняшний день клинические методы исследования поджелудочной железы (томография, радионуклидное и ультразвуковое исследование и прицельная биопсия др.) позволяют с достаточной точностью осуществлять диагностику ее патологических состояний. Однако известные недостатки этих методов приводят к необходимости развития и совершенствования экспериментальных методов исследования и диагностики [16,17]. В то же время дополнить результаты традиционных методов диагностики и оценить степень заболевания поджелудочной железы можно посредством исследования спектрально-оптических свойств продукта ее экзокринной функции – панкреатического сока в комплексе с пищеварительным секретом печени – желчью. Это связано с тем, что любые патофизиологические нарушения в поджелудочной железе и печени приводят к взаимному нарушению их секреторной функции, проявляющейся в изменении химического состава, а также физико- и биохимических свойств их пищеварительных ферментов [16,17].

Целью данной работы является исследование влияния патологических процессов на оптические и физико-химические характеристики проб желчи и панкреатического сока. Были выполнены спектрофотометрические измерения и с использованием инверсного метода Монте-Карло определены спектры коэффициентов поглощения, рассеяния и фактора анизотропии рассеяния, а также измерены спектры поглощения в ИК-диапазоне для соответствующих биологических сред при различных формах и стадиях патологического поражения поджелудочной железы, включая процессы малигнизации. По результатам исследований определена динамика морфофункциональных свойств и состава молекулярных компонентов пищеварительных секретов по мере развития злокачественных новообразований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение спектрально-оптических свойств биологических сред было проведено на образцах желчи и панкреатического сока, полученных в Республиканской клинической больнице Республики Дагестан в ходе оперативного лечения или секционного исследования больных с различной формой патологического пораже-

ния поджелудочной железы. Гистоморфологический анализ послеоперационных тканей поджелудочной железы позволил из общего числа биологических сред отобрать по семь образцов желчи и панкреатического сока, соответствующих случаю хронического панкреатита, и по девять образцов желчи и панкреатического сока – для случая аденокарциномы. При этом биосреды, полученные для тканей поджелудочной железы с наименьшими гистоморфологическими изменениями, классифицировались как биосреды *в норме* или *при средней стадии поражения*, а образцы биосред, полученные для раковой опухоли, – как биосреды *при крайней стадии поражения*.

Полученные образцы желчи и панкреатического сока равномерно наносились вдоль всей поверхности кварцевых пластин размером $2,5 \times 4,0$ см и подвергались термической (при температуре $40,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) и вакуумной (при давлении $5 \cdot 10^{-6}$ мм рт. ст.) дегидратации, что позволило свести к минимуму влияние полос поглощения воды на спектрально-оптические свойства исследуемых веществ. Этот процесс повторяли многократно до получения пленок биосред с толщиной $d = 100,0 \pm 10,0$ мкм. При этом измерение толщины проб осуществляли посредством микрометра, а их показатель преломления принимали близким к значению показателя преломления для биотканей ($\bar{n}_{\text{tiss}} \approx 1,4$); для кварцевых пластин использовали показатель преломления $n_{\text{glass}} \approx 1,55$.

Для исследования спектров инфракрасного поглощения подготовку проб биосред осуществляли методом прессования таблеток, заключающимся в тщательном перемешивании тонкоизмельченных соскобов пленок биосред (примерно 10–15 мг) с порошком KBr и последующим прессованием смеси в пресс-форме.

Регистрацию инфракрасных спектров поглощения (с оптической плотностью $A = \ln(T^{-1})$, где T – коэффициент пропускания) для проб желчи и сока поджелудочной железы проводили на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием 64-проходного сканирования в спектральном диапазоне волновых чисел $7800\text{--}350$ cm^{-1} при спектральном разрешении $2,0$ cm^{-1} .

Измерение спектральных характеристик коэффициентов полного отражения R_t , полного пропускания T_t и диффузного пропускания T_d для проб биосред проводили по стандартной методике (см., например, работы [1–3]) на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) с интегрирующей сферой LISR-3100. Исследовательский комплекс представлял собой автома-

тизированный двухлучевой спектрометр на базе дифракционного монохроматора, позволяющий проводить спектрофотометрические измерения рассеивающих сред в диапазоне длин волн 250–2500 нм со спектральным разрешением 0,1 нм и скоростью сканирования 5 нм/с при размере светового пучка $6,0 \times 6,0$ мм.

Определение оптических спектров коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ_s и фактора анизотропии рассеяния g осуществляли при помощи инверсного метода Монте-Карло, алгоритм которого включает реализацию следующих этапов (см., например, работы [1–3,18]). На первом этапе проводили вычисление начальных приближений параметров μ_a , μ_s и g с использованием экспериментальных данных R_t^{exp} , T_t^{exp} и T_d^{exp} при помощи аналитических выражений, предложенных в работе [19]. На втором этапе вычисляли расчетные значения коэффициентов R_d^{calc} , T_t^{calc} и T_d^{calc} по значениям начальных приближений μ_a , μ_s и g с использованием метода Монте-Карло. Далее строили целевую функцию $F(\mu_a, \mu_s, g) = [T_t^{\text{exp}} - T_t^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)]^2 + [T_d^{\text{exp}} - T_d^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)]^2 + [R_d^{\text{exp}} - R_d^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)]^2$ и выполняли процедуру ее минимизации на основе симплексного метода Нелдера–Мида [20] до выполнения условия $\frac{|T_t^{\text{exp}} - T_t^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)|}{T_t^{\text{exp}}} + \frac{|T_d^{\text{exp}} - T_d^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)|}{T_d^{\text{exp}}} + \frac{|R_d^{\text{exp}} - R_d^{\text{calc}}(\mu_a, \mu_s, g)|}{R_d^{\text{exp}}} \leq 0,01$.

Для каждой пробы желчи и панкреатического сока проводили по три серии измерений. Окончательный результат оптических параметров μ_a , μ_s и g , а также поглощения исследуемых биосред определяли путем усреднения серийных измерений, используя среднеквадратичное отклонение $\delta = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\bar{\xi} - \xi_i)^2 / n(n-1)}$, где n –

число серий измерений, ξ – спектры параметров μ_a , μ_s , g и поглощения для i -й пробы биосреды, $\bar{\xi}$ – среднее значение оптических параметров, найденное как $\sum_{i=1}^n \xi_i / n$. Таким образом, каждые из представленных в работе спектральных данных есть усредненное значение статистического материала, отобранного и систематизированного по видам биосред (желчь и панкреатический сок) и стадиям их патологического поражения (норма и крайняя стадия поражения).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные спектры оптических коэффициентов поглощения μ_a , рассеяния μ_s и фактора анизотропии рассеяния g , характерные для проб желчи и панкреатического сока при средней и крайней стадии поражения тканей поджелудочной железы, показаны соответственно на рис. 1 и 2. Анализ спектральной зависимости коэффициентов μ_a , μ_s и g позволяет выявить ряд важных факторов и общих закономерностей в исследовании пищеварительных ферментов. В частности, сравнение полученных результатов с литературными данными (см., например, работы [21–25]) позволяет предположить, что форма спектрального контура μ_a для проб желчи (рис. 1а) образована наличием пигментов билирубина и биливердина, на длинах волн поглощения которых (280 ± 5 , 410 ± 5 и 630 ± 15 нм) коэффициент μ_a образует максимумы. В сравнении с этим спектральный контур μ_a для проб панкреатического сока (рис. 2а) образован поглощением комплекса аминокислот (триптофана, тирозина и др.), входящих в состав панкреатического фермента, и характеризуется единственным максимумом вблизи 280 ± 5 нм. С ростом длины волны коэффициент поглощения монотонно снижается и на спектральном участке 800–1500 нм достигает минимума, уменьшаясь более чем в 100 раз.

Подобная спектральная зависимость наблюдается и для коэффициента рассеяния μ_s (рис. 1б и 2б) и фактора анизотропии рассеяния g (рис. 1в и 2в), которые достигают максимальных значений в спектральном интервале 250–500 нм и с ростом длины волны монотонно спадают. Однако, в отличие от μ_a , коэффициент рассеяния для исследуемых биосред образует спектральные минимумы на длинах волн поглощения желчных пигментов (280 ± 5 , 410 ± 5 и 640 ± 15 нм) и аминокислот (280 ± 5 нм). Факт обратной симметрии полос поглощения и рассеяния может быть вызван как ростом неоднородности мнимой составляющей комплексного показателя преломления среды вблизи полос сильного поглощения, так и ростом поглощения в области сильного рассеяния, когда вследствие увеличения числа актов взаимодействия с эндогенными хромофорами на длине свободного пробега уменьшается количество фотонов многократного рассеяния. Упомянутые вкратце механизмы широко используются для интерпретации результатов спектрально-оптических исследований биологических объектов и более подробно описаны в работах [18,26].

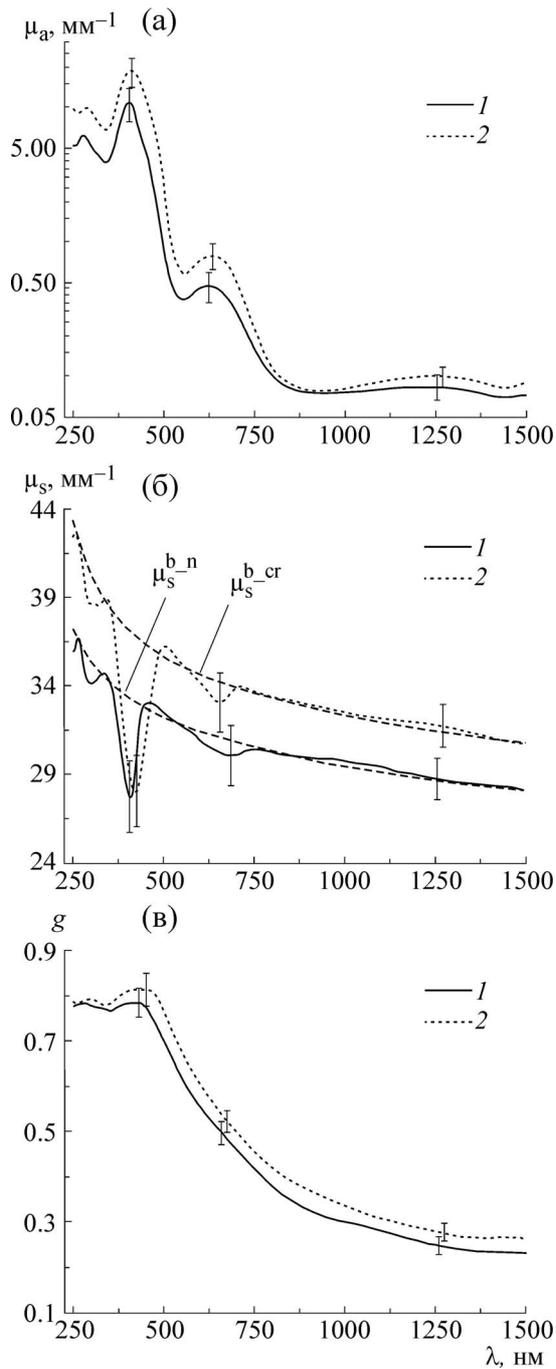


Рис. 1. Спектры оптических коэффициентов поглощения μ_a (а), рассеяния μ_s (б) и фактора анизотропии рассеяния g (в) для проб желчи в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Пунктирные линии – результат аппроксимации коэффициента рассеяния μ_s двухстепенной функцией, вертикальные отрезки – стандартная ошибка.

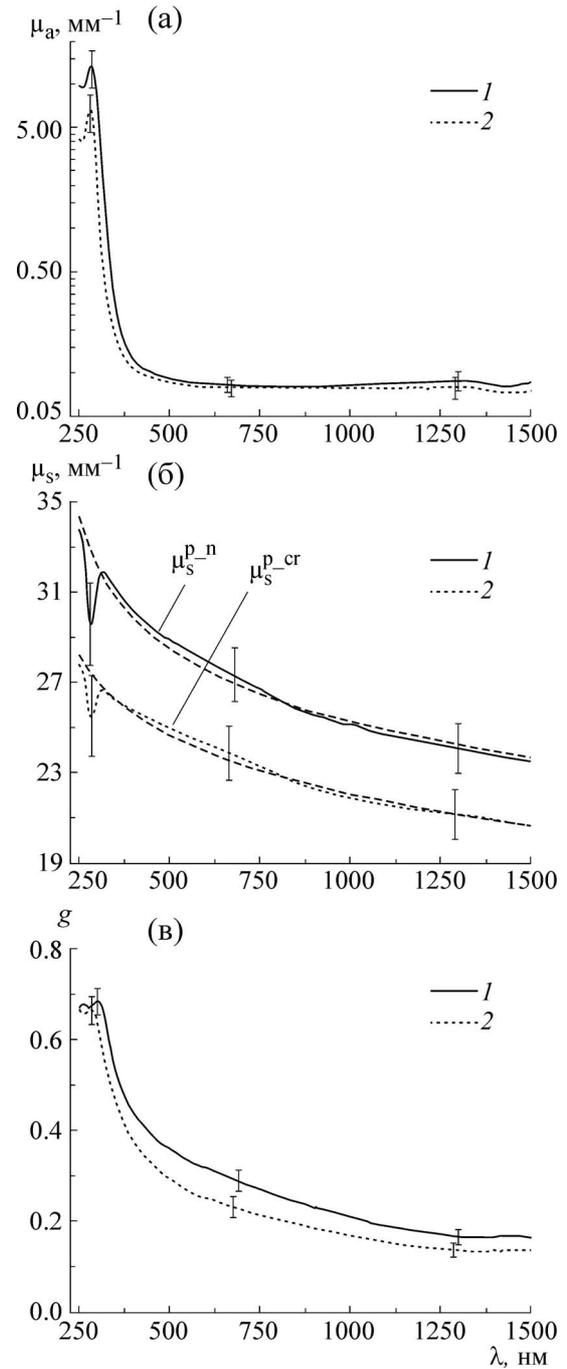


Рис. 2. Спектры оптических коэффициентов поглощения μ_a (а), рассеяния μ_s (б) и фактора анизотропии рассеяния g (в) для проб панкреатического сока в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Пунктирные линии – результат аппроксимации коэффициента рассеяния μ_s двухстепенной функцией, вертикальные отрезки – стандартная ошибка.

Применение метода среднеквадратичного отклонения для статистического анализа оптических параметров позволило установить, что максимальный разброс значений для μ_a наблю-

дался на длинах волн поглощения билирубина и аминокислот и достигал 35–40%, тогда как разброс значений для μ_s и g не превышал 5–10% по всему их спектру.

Вместе с этим спектрам оптических коэффициентов исследуемых биосред (в норме и при соответствующих патологиях) присущи явные отличительные особенности. Так, например, помимо формы спектральных контуров исследуемые вещества обнаруживают существенные различия в интенсивностях коэффициентов поглощения и рассеяния, которые для проб нормальной желчи в полтора раза превышают значения таковых для проб панкреатического сока, а в крайней стадии – в два–три раза. При этом развитие процессов малигнизации в тканях поджелудочной железы приводит для проб желчи к увеличению коэффициентов μ_a и μ_s до полутора раз в коротковолновой области спектра, тогда как фактор анизотропии g претерпевает незначительный рост и длинноволновой сдвиг спектрального максимума. Для проб панкреатического сока эта зависимость носит обратный характер: по мере развития патологии происходит уменьшение коэффициента поглощения и рассеяния до двух раз, а фактор анизотропии рассеяния существенно не меняется.

Отдельный интерес представляет сравнительный анализ коэффициентов рассеяния μ_s и фактора анизотропии g по мере развития патологии. Характер их спектральной зависимости свидетельствует о том, что с ростом длины волны для исследуемых биосред существенно растет вклад рэлеевского рассеяния и снижается роль рассеяния Ми. В пользу этого утверждения свидетельствует результат аппроксимации коэффициента рассеяния двухстепенной функцией (см., например, работы [2,3,18,27]), которая для проб желчи в норме и крайней стадии поражения принимает соответственно вид $\mu_s^{b-n}(\lambda) = 2,669 \cdot 10^8 \lambda^{-3,293} + 68,517 \lambda^{-0,124}$ и $\mu_s^{b-cr}(\lambda) = 2,621 \cdot 10^8 \lambda^{-3,148} + 73,194 \lambda^{-0,122}$ (см. рис. 1б), а для различных форм патологии панкреатического сока – $\mu_s^{p-n}(\lambda) = 3,478 \cdot 10^8 \lambda^{-3,544} + 72,325 \lambda^{-0,147}$ и $\mu_s^{p-cr}(\lambda) = 3,411 \cdot 10^8 \lambda^{-3,702} + 66,976 \lambda^{-0,149}$ (см. рис. 2б). При этом двухстепенной вид данных функций указывает на формирование спектров коэффициента рассеяния как минимум двумя типами рассеивателей: малыми (близкими к рэлеевским рассеивателям), для которых волновой экспонент $w \rightarrow 4$, и крупными частицами (рассеиватели Ми) – при $w \leq 1$. Выполненные ранее электронномикроскопические исследования [28] показали, что пробы исследуемых веществ представляют собой коллоидные среды, где в качестве малых рассеивателей выступают гранулы размером 100–400 нм, а в качестве крупных – их агрегаты диаметром 2 мкм и более, образовавшиеся в результате окислительной аг-

регации биосред. В то же время сравнение степенных функций показывает, что развитие процессов малигнизации для проб желчи приводит к увеличению, а для проб панкреатического сока – к уменьшению размеров рассеивающих частиц, тогда как их концентрация меняется незначительно. Данный факт также находит свое подтверждение в динамике спектральной зависимости фактора анизотропии рассеяния g (см. рис. 1в и 2в) и в результатах микроскопических исследований [28].

Типичные спектры инфракрасного поглощения, представленные в виде нормированной и усредненной по сериям измерений оптической плотности для проб желчи и панкреатического сока в норме и при крайней стадии патологического поражения, показаны соответственно на рис. 3 и 4. Как видно из рисунков, характер спектрального распределения ИК-поглощения для исследуемых биосред и соответствующих форм патологии во многом схож. Сопоставление полученных результатов с известными литературными и справочными данными по колебательной спектроскопии (см., например, работы [13–15,29]), а также данными о химическом составе биосред (см., например, работы [16,17,25]) позволило установить, что спектры их оптической плотности сформированы комплексом полос молекулярного поглощения нуклеиновых кислот различной конформации (А- и В-формы), включая ароматические аминокислоты, а также структурных белков, углеводов, липидов и жирных кислот, спектральные вклады которых существенно меняются в зависимости от вида биосред и стадии их патологического состояния. При этом поглощение биосред в спектральном диапазоне 3700–2500 см^{-1} определяется полосами валентных симметричных и ассиметричных колебаний вблизи частот для $\nu(\text{OH})$ -групп – $3420 \pm 5 \text{ см}^{-1}$, для $\nu(\text{NH})$ -групп – 3295 ± 3 , 3203 ± 3 и $2680/2635 \text{ см}^{-1}$, из которых первые две полосы связаны с поглощением амида А и В, а также для $\nu(\text{CH})$ -групп – $3095 \pm 5 \text{ см}^{-1}$, $\nu(\text{CH}_3)$ -групп – 2965 ± 5 и $2874 \pm 2 \text{ см}^{-1}$ и $\nu(\text{CH}_2)$ -групп – 2930 ± 3 и $2855 \pm 5 \text{ см}^{-1}$.

Интенсивная область спектра оптической плотности в частотном диапазоне 1800–1480 см^{-1} образована, по-видимому, множеством полос поглощения кратных связей, соответствующих группам амида I – 1800–1600 см^{-1} и амида II – 1600–1480 см^{-1} . При этом доминирующее (более 80%) поглощение в группе амида I обусловлено валентными колебаниями сильной $\nu(\text{CO})$ -связи неупорядоченной ($1658 \pm 2 \text{ см}^{-1}$), α -закрученной спиральной ($1653 \pm 2 \text{ см}^{-1}$)

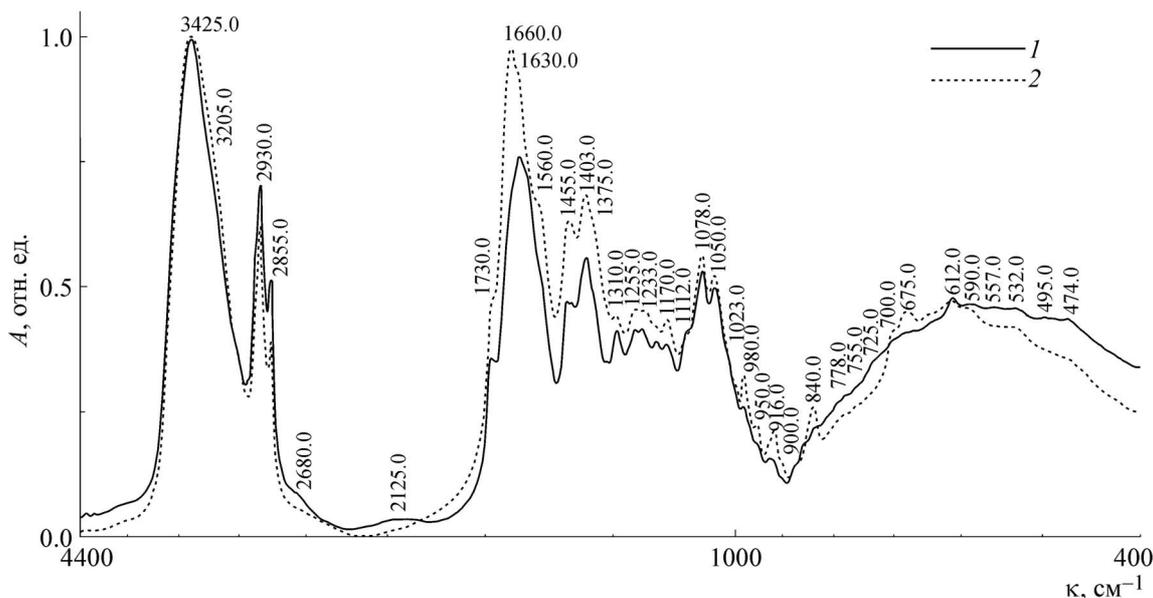


Рис. 3. ИК-спектры оптической плотности – *A* для проб желчи в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Цифры – волновые числа, соответствующие спектральным пикам поглощения.

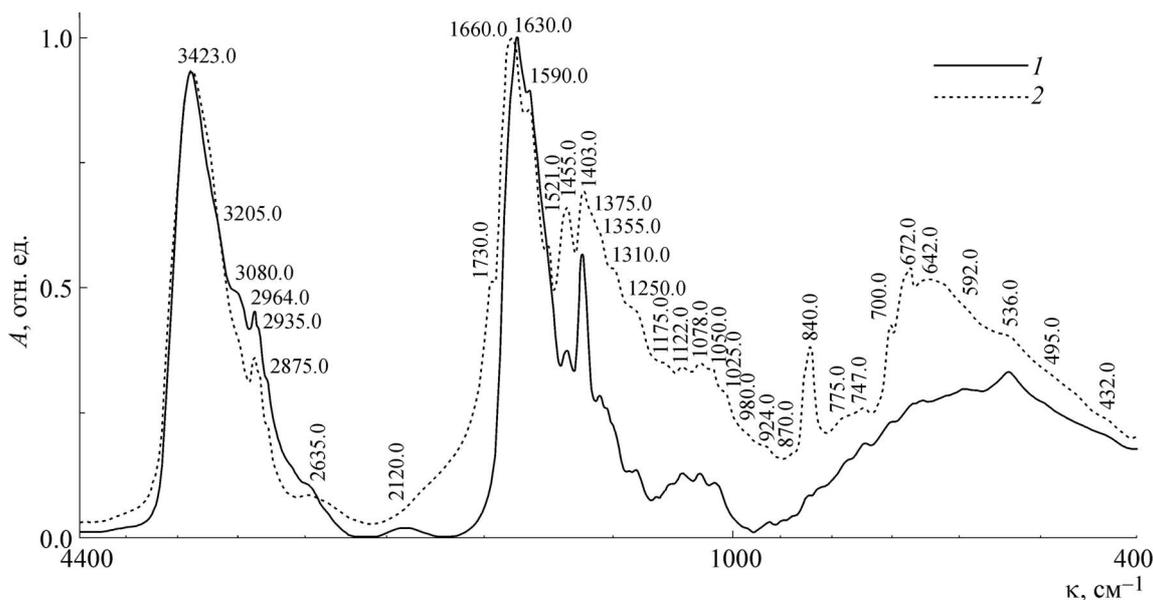


Рис. 4. ИК-спектры оптической плотности для проб панкреатического сока в норме (1) и при крайней форме патологии (2). Цифры – волновые числа, соответствующие спектральным пикам поглощения.

и параллельного β -сдвига ($1633 \pm 2 \text{ см}^{-1}$) структуры, в то время как роль колебаний $\nu(\text{CN})$ - и $\nu(\text{NH})$ -связей незначительна (менее 10%). Дополнительно к этому хорошо различимы полосы валентных колебаний карбонильных соединений при частотах $1730 \pm 5 \text{ см}^{-1}$ и кольца $\nu(\text{CC})$ -групп – $1632 \pm 2 \text{ см}^{-1}$. В сравнении с этим спектр поглощения амида II является результатом сложных, преимущественно планар-

ных изгибных деформационных колебаний кратной связи $\nu(\text{NH})$ -групп (около 60%), а также валентных колебаний $\nu(\text{CN})$ - и $\nu(\text{CC})$ -групп (более 40%), что проявляется наличием спектральных компонентов вблизи частот 1592 ± 3 , 1560 ± 3 и $1520 \pm 2 \text{ см}^{-1}$. Следует заметить, что характер спектральной зависимости этих амидов является чувствительным индикатором структурной геометрии соответствующих моле-

кул и водородных связей пептидной группы, наличие которых приводит к значительным частотным сдвигам и уширению полос поглощения.

Спектральная область оптической плотности, лежащая в интервале частот 1480–1350 см^{-1} , связана с поглощением метиловых и метиленовых групп, представленных планарными деформационными симметричными и асимметричными колебаниями простых связей для $\delta(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ -групп – 1458 \pm 3 и 1378 \pm 3 см^{-1} и для $\delta(\text{C}(\text{CH}_3)_2)$ -групп – 1403 \pm 3 и 1355 \pm 2 см^{-1} . В то же время в диапазоне частот 1350–1180 см^{-1} проявляется поглощение группы амида III в виде полос валентных колебаний простых связей $\nu(\text{CN})$ -групп (около 10%) и внеплоскостных деформационных колебаний $\nu(\text{NH})$ -групп (более 30%) – 1267 \pm 3, 1250 \pm 5 и 1192 \pm 2 см^{-1} со значительным вкладом верных и крутильных деформационных колебаний $\delta(\text{CH}_3/\text{CH}_2)$ -групп (более 40%) вблизи 1330 \pm 3, 1313 \pm 3 и 1235 \pm 3 см^{-1} .

В области более низких частот (1200–400 см^{-1}) спектр оптической плотности биосред сформирован множеством полос поглощения (1172 \pm 3, 1152 \pm 3, 1123 \pm 2, 1112 \pm 3, 1079 \pm 2, 1050 \pm 5 и 1020 \pm 5 см^{-1}), представленных преимущественно скелетно-валентными колебаниями колец простых связей $\nu(\text{C}-\text{C})$ и $\nu(\text{C}-\text{O})$, а также деформационными колебаниями $\delta(\text{C}-\text{OH})$ -групп. Дальнейшее понижение частоты приводит к появлению в спектрах поглощения сложного комплекса сильно перекрывающихся полос поглощения, вызванных скелетно-валентными колебаниями α -спиральной конформации ароматических колец $\nu(\text{C}-\text{C})$ -связей и деформационными колебаниями $\rho(\text{CH}_3)$ - и $\delta(\text{CCH})$ -групп на частотах 977 \pm 5, 923 \pm 2, 915 \pm 2, 870 \pm 2, 852 \pm 3, 825 \pm 5, 750 \pm 3 и 725 \pm 2 см^{-1} . Примерно на этих же частотах проявляются полосы внеплоскостных крутильных скелетно-деформационных колебаний $\delta(\text{C}-\text{C})$ -связей – 647 \pm 5 и 620 \pm 3 см^{-1} ; $\delta(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ -связей – 937 \pm 5, 895 \pm 3, 873 \pm 5 и 850 \pm 5 см^{-1} ; $\delta(\text{C}-\text{N})$ -связей – 717 \pm 5 см^{-1} и $\delta(\text{C}-\text{OH}_3)$ -связей – 493 \pm 3 и 472 \pm 3 см^{-1} , а также полосы валентных колебаний транс-конформации $\nu(\text{C}-\text{S})$ -связей – 735 \pm 2, 725 \pm 2, 700 \pm 5, 675 \pm 5, 665 \pm 3, 640 \pm 5 и 437 \pm 5 см^{-1} и $\nu(\text{S}-\text{S})$ -связей – 535 \pm 5 и 510 \pm 2 см^{-1} . Кроме того, особенности химического состава исследуемых веществ указывают на высокую вероятность поглощения фосфатных эфиров, образованных комплексом полос симметричных и асимметричных валент-

ных колебаний групп фосфатных ионов $\nu(\text{PO}_2^-)$ и $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ в интервале частот 1200–500 см^{-1} , поглощения холестерина вблизи 615 \pm 5, 550 \pm 3, 535 \pm 5 и 432 \pm 3 см^{-1} , а также вкладов полос валентных колебаний галогенпроизводных групп сильной $\nu(\text{C}-\text{Cl})$ -связи в диапазоне низких частот 800–600 см^{-1} [29,30].

Наряду с общими характеристиками инфракрасным спектрам оптической плотности исследуемых биосред и соответствующих патологий присущи ярко выраженные индивидуальные особенности, что указывает на возможность использования методов ИК-Фурье-спектрометрии с целью диагностики и дифференциации патологических процессов. Развитие дегенеративных процессов в тканях поджелудочной железы приводит к изменениям как интенсивности, так и формы спектрального контура поглощения в области низких частот (1600–400 см^{-1}), преимущественно для проб панкреатического сока, хотя спектральные отличия для проб желчи также могут быть различимы (см. рис. 3 и 4). В частности, сравнительный анализ полученных результатов и данных из работ [4–15] позволяет предположить, что важная роль при дифференциации спектров поглощения может быть отведена карбонильным и метиловым группам структурных белков, обнаруживающих для патологических биосред дополнительный рост интенсивности поглощения при частотах 1667 \pm 2, 1453 \pm 3, 1260 \pm 5, 1175 \pm 3, 890 \pm 3 и 820 \pm 3 см^{-1} . В свою очередь, тот факт, что желчные пигменты являются продуктом катаболизма гемоглобина и то, что производные гематопорфиринов выступают в качестве индикаторов степени развития процессов малигнизации, может свидетельствовать о причастности эндогенных порфиринов к увеличению интенсивности полос поглощения вблизи частот 1554 \pm 3, 1523 \pm 3, 1372 \pm 5, 1120 \pm 5, 955 \pm 3, 752 \pm 5 и 672 \pm 3 см^{-1} , что также находит свое подтверждение в работах [10, 14,31]. В дополнение к этому, усиление поглощения в области спектральных полос – 1242 \pm 3, 1085 \pm 3 и 1075 \pm 3 см^{-1} , согласно работам [13,32–34], может быть обусловлено колебаниями фосфатных групп (фосфат I и II) нуклеиновых кислот.

Однако наибольший интерес в спектрах оптической плотности малигнизированных биосред вызывает полоса интенсивного поглощения на частоте – 840 \pm 5 см^{-1} . Сопоставление с данными работы [35] позволяет идентифицировать этот пик с колебаниями остатков дезоксирибозы C_2 -эндо/анти- и C_3 -эндо/син-конформации левозакрученной Z-формы ДНК. В

пользу данного предположения свидетельствует наличие дополнительных спектральных компонентов при частотах 923 ± 5 , 868 ± 5 и 800 ± 5 см^{-1} , которые также могут соответствовать полосам поглощения Z-формы ДНК. В этой связи, несмотря на отсутствие в литературе полных сведений о функции Z-ДНК, следует заметить, что структура нуклеиновой кислоты этой конформации проявляется в результате роста биологической активности и активизации метиловых групп (см., например, работы [36,37]), характерных, как было показано выше, при развитии различных форм патологии, включая процессы малигнизации. Вместе с этим нельзя исключать, что выраженная полоса поглощения при 840 ± 2 см^{-1} может быть связана с валентными колебаниями слабой связи перекисных $\nu(\text{O}-\text{O})$ -групп, свойственных преимущественно алифатическим и ароматическим перекисям типа $\text{R}-\text{O}-\text{O}-\text{R}$, а также перекисным кислотам типа $\text{R}-\text{O}-\text{O}-\text{H}$, для которых характерно поглощение в интервале частот $890-830$ см^{-1} [29]. При этом известно, что перекисные соединения (мягкие окислители) являются одним из источников активного кислорода, играющего важную роль в активизации различных биохимических процессов, сопровождающих процессы патологии, включая развитие злокачественных новообразований [25].

В то же время сложность и многообразие физико- и биохимических процессов, сопровождающих экскреторную функцию печени и поджелудочной железы, а также развитие в них процессов малигнизации существенно осложняют проведение количественного анализа спектров инфракрасного поглощения пищеварительных ферментов. Поэтому для более точной идентификации спектральных полос и детальной интерпретации вкладов групп химических соединений в суммарный спектр поглощения необходимо проведение дополнительных исследований, например, с применением метода препаративной жидкостной хроматографии с последующей идентификацией компонентов по масс-спектрам.

В заключение следует заметить, что результаты спектрофотометрических исследований хорошо согласуются с данными по патофизиологии пищеварительных желез. Согласно этим сведениям (см., например, работы [16,17]), развитие хронического панкреатита часто приводит к сгущению панкреатического сока и увеличению концентрации в нем белка, что, в свою очередь, ведет к росту коэффициентов поглощения и рассеяния. В сравнении с этим при процессах малигнизации в тканях поджелудочной железы наблюдается атрофия экскреторной функции, с

сокращением до 90% образования пищеварительных ферментов и развитием различных форм гепатита. Это сопровождается разжижением панкреатического сока и сгущением желчи, что приводит к снижению коэффициентов μ_a и μ_s для первого секрета и возрастанию их – для второго. Однако отсутствие возможности исследовать биосреды в их нормальном состоянии, а также огромное многообразие биохимических процессов, сопровождающих процессы малигнизации, хоть и несколько снижают практическую значимость полученных результатов, в то же время существенно дополняют и расширяют результаты традиционных методов исследования поджелудочной железы. В частности, обнаруженная в работе динамика спектральной зависимости оптических коэффициентов (μ_a , μ_s и g) и инфракрасного поглощения биосред и, как следствие, их морфофункциональных свойств, молекулярной структуры и состава позволили бы установить биохимические механизмы развития процессов малигнизации и в конечном итоге обеспечить развитие научно-методических основ комплексной диагностики поджелудочной железы на ранних этапах развития злокачественных новообразований.

ВЫВОДЫ

Обобщение результатов оптико-спектральных исследований проб желчи и панкреатического сока при влиянии различных форм патологии поджелудочной железы, включая процессы малигнизации, позволяет сформулировать следующие выводы:

1. В ИК-области спектральные свойства биосред сформированы множеством сильно перекрывающихся полос молекулярного поглощения, из которых доминирующими являются колебания OH- , NH- , $\text{CC}(\text{C} = \text{H}, \text{C}, \text{N}, \text{O}, \text{S})$ - и PO -групп, характерных для нуклеиновых кислот, включая ароматические аминокислоты, а также структурных белков, углеводов, липидов и жирных кислот.

2. Развитие дегенеративных процессов в тканях поджелудочной железы приводит к росту интенсивности спектрального контура поглощения в области низких частот ($1600-400$ см^{-1}), преимущественно для проб панкреатического сока вблизи полос колебания карбонильных и метиловых групп структурных белков, а также фосфатных групп нуклеиновых кислот, при этом могут быть различимы и вклады холестерина и производных порфириновых групп. В то же время выраженный пик интенсивного поглощения вблизи частоты 840 ± 5 см^{-1} , ха-

рактерный для патологических биосред, может быть вызван как колебаниями перекисных О–О-групп, соответствующих алифатическим и ароматическим перекисям и перекисным кислотам, активность которых проявляется при развитии биохимических процессов, так и колебаниями левозакрученной Z-формы ДНК.

3. Спектр коэффициента поглощения для проб желчи обусловлен наличием билирубина и биливердина, а для проб панкреатического сока – комплексом аминокислот, на длинах волн поглощения которых (280 ± 5 , 410 ± 5 и 630 ± 15 нм) μ_a образует максимумы. С ростом длины волны коэффициент μ_a монотонно снижается и на спектральном участке 800–1500 нм достигает минимума, уменьшаясь более чем в 100 раз.

4. Пробы биосред представляют собой коллоиды, сформированные как минимум двумя типами рассеивателей: преимущественно малыми (рэлеевскими) частицами и их крупными агрегатами (рассеиватели Ми), образовавшимися при дегидратации и окислительной агрегации биосред. Это подтверждается спектральной зависимостью фактора анизотропии и коэффициента рассеяния, для которых с ростом длины волны наблюдается увеличение вклада рэлеевского рассеяния и снижение рассеяния Ми.

5. Развитие процессов малигнизации для проб желчи приводит к увеличению, а для проб панкреатического сока – к уменьшению плотности и размеров частиц, что находит свое отражение в динамике спектральной зависимости коэффициентов рассеяния и поглощения, которые для желчи растут в полтора раза, а для панкреатического сока – уменьшаются до двух раз, тогда как фактор анизотропии меняется несущественно.

Работа выполнена с использованием приборного парка ЦКП «Аналитическая спектроскопия» и при финансовой поддержке проектной части Государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации в научной деятельности, проект 3.1262.2014К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. J. Welch and M. J. C. Van Gemert, *Optical-Thermal Response of Laser Irradiation Tissues*, 2nd ed. (Springer Science+Business Media B.V., 2011).
2. *Оптическая биомедицинская диагностика*, пер. с англ. под ред. В. В. Тучина (ФИЗМАТЛИТ, М., 2007).
3. A. N. Bashkatov, E. A. Genina, V. I. Kochubey, et al., *Med. Laser Application* **22**, 95 (2007)
4. В. А. Дубровский, И. Ю. Янина и В. В. Тучин, *Биофизика* **57**, 115 (2012).
5. Г. А. Залеская, *Биофизика* **60**, 534 (2015).
6. G. Bellisola and C. Sorio, *Am. J. Cancer Res.* **2**, 1 (2012).
7. A. Derenne, V. Van Hemelryck, D. Lamoral-Theys, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 46 (2013).
8. А. А. Красновский и А. С. Козлов, *Биофизика* **59**, 259 (2014).
9. С. С. Коваленко, Е. Ю. Паршина, А. И. Юсипович и др., *Биофизика* **59**, 1093 (2014).
10. Z. Huang, A. McWilliams, and M. Luietal., *Intern. J. Cancer* **107**, 1047 (2003).
11. S. L. Jacques, *Phys. Med. Biol.* **58**, R37 (2013).
12. A. N. Bashkatov, E. A. Genina, and V. V. Tuchin, *J. Innov. Optical Health Sci.* **4**, 9 (2011).
13. Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, *Appl. Spectroscopy Rev.* **43**, 134 (2008).
14. Z. Movasaghi, S. Rehman, and I. Rehman, *Appl. Spectroscopy Rev.* **42**, 493 (2007).
15. M. J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, et al., *Nature Protocols* **9**, 1771 (2014).
16. Н. Н. Блохин, А. Б. Итин и А. А. Клименков, *Рак поджелудочной железы и внепеченочных желчных путей* (Медицина, М., 1982).
17. И. В. Маев и Ю. А. Кучерявый, *Болезни поджелудочной железы: руководство* (ГЭОТАР-МЕДИА, М., 2009).
18. А. Н. Башкатов, Е. А. Генина, В. И. Кочубей и др., *Квант. электроника* **44**, 779 (2014).
19. S. A. Prael, M. J. C. Van Gemert, and A. J. Welch, *Appl. Optics* **32**, 359 (1993).
20. Б. Банди, *Методы оптимизации* (Радио и связь, М., 1988).
21. <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/136.html>.
22. F. Baldini, P. Bechi, F. Cianchi, et al., *J. Biomed. Optics* **5**, 321 (2000).
23. R. Nachabé, D. J. Evers, B. H. W. Hendriks, et al., *Biomed. Optics Express* **2**, 600 (2011).
24. T. Matsumoto and T. Kanno, *Amer. J. Physiol.* **254**, C727 (1988).
25. А. Ленинджер, *Биохимия* (Мир, М., 1976).
26. Г. С. Терентюк, А. В. Иванов, Н. И. Полянская и др., *Квант. электроника* **42**, 380 (2012).
27. I. S. Saidi, S. L. Jacquesand, and F. K. Tittel, *Appl. Optics* **34**, 7410 (1995)
28. К. М. Гираев, Н. А. Ашурбеков, М. А. Магомедов и др., *Оптика и спектроскопия* **119**, 162 (2015).
29. Б. Н. Тарасевич, *ИК спектры основных классов органических соединений* (Intertech Thermo, М., 2009).
30. C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, et al., *Spectrochim. Acta. Part A* **61**, 1529 (2005).
31. J. L. Deng, Q. Wei, M. H. Zhang, et al., *J. Raman Spectrosc.* **36**, 257 (2005).
32. W.-T. Cheng, M.-T. Liu, H.-N. Liu, *Microscopy Research and Technique* **68**, 75 (2005).
33. N. Fujioka, Y. Morimoto, T. Arai, et al., *Cancer Detection & Prevention* **28**, 32 (2004).

34. B. Rigas, S. Morgello, I. S. Goldman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 8140 (1999).
35. G. I. Dovbeshko, V. I. Chegel, and N. Y. Gridina, Biopolymer (Biospectroscopy) **67**, 470 (2002).
36. K. Mizobuchi, *Nucleic Acid Research: Future Development* (Elsevier, 2012).
37. R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, et al., Science **216**, 475 (1982).

Influence of Malignancy Processes in Pancreatic Tissue on the Formation of Optical and Infrared Spectra in Bile and Pancreatic Juice Samples

К.М. Giraev*, **Н.А. Ashurbekov***, **М.А. Magomedov****,
А.А. Murtazaeva*, and **Р.Т. Medjidov*****

**Dagestan State University, ul. Gadjeva 43a, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367021 Russia*

***Amirkhanov Institute of Physics, Dagestan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
ul. Yaragского 94, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367003 Russia*

****Dagestan State Medical Academy, pl. Lenina 1, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367001 Russia*

In this paper the results of measurements performed at wavelengths ranging from 250 to 1500 nm and over the frequency range from 6000 to 400 cm^{-1} for bile and pancreatic juice samples in the process of malignant transformation in the tissues of the pancreas are presented. It has been shown that the development of degenerative processes for the studied biological tissues leads to an increase in the intensity of spectral contour of absorption in the low frequency region (1600–400 cm^{-1}) and gives rise to a peak near the frequency of $840 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ formed by vibrations of O–O-groups of aliphatic and aromatic peroxides and peroxy acids. It has been shown that the development of malignant processes for bile samples leads to an increase, and for pancreatic juice – to a decrease in the particle size and density, which follows from the increase and decrease of the absorption and scattering coefficients.

Keywords: bile, pancreatic juice, malignant process, spectrophotometry, absorption spectra, scattering spectra, scattering anisotropy factor, FT-IR spectrometry, molecular structure, diagnostics