

А.С. ГОЛОВКОВА, В.А. СЕДАКОВА

Беларусь, Могилев, МГУ имени А.А. Кулешова

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОНТАННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ**

Люминесценцией называют свойства веществ излучать свет под действием различных возбуждающих факторов. По определению С.И. Вавилова [1], люминесценция – это избыточное свечение тела над тепловым (температурным) излучением того же тела в данной спектральной области при данной температуре и при условии, что это избыточное свечение обладает длительностью 10^{-10} с и больше, т.е. превышает период световых колебаний. Для того чтобы вызвать люминесценцию вещества, к нему необходимо подвести извне определенное количество энергии. Частицы вещества, поглощая поступающую извне энергию, переходят в возбужденное энергетическое состояние. Возбужденные частицы довольно быстро теряют избыточную энергию и переходят в основное состояние. Таким образом, люминесцирующая частица является самостоятельным источником света, преобразующим поглощенную энергию возбуждения в собственное излучение [1].

Флуоресценция – это свечение, индуцированное светом. Интенсивность флуоресценции слишком мала по сравнению с вызывающим ее светом. Однако на сегодняшний день существуют приборы и методы, позволяющие не только выявлять, но и измерять различные параметры флуоресценции. Благодаря этим измерениям, можно получать уникальную информацию о молекулярной организации и функционировании биологических систем. За последние тридцать лет использование различных методов, основанных на регистрации флуоресценции, в биологических и медицинских

исследованиях стремительно возросло. Обусловлено это появлением как новых технических возможностей (в первую очередь компьютеров и лазеров), так и широкого спектра доступных флуоресцирующих молекул и молекулярных комплексов. Флуоресцентная методология обеспечила решение многих принципиальных задач биологии и медицины. Благодаря высокой чувствительности и сравнительной безопасности, она вытеснила многие традиционные методы, связанные с применением радиоактивных веществ. Методы флуоресцентного анализа используются в медицинской диагностике, криминалистике и многих других областях [2].

Целью настоящей работы стало исследование спонтанной люминесценции биологической ткани.

Объектом исследования являлась биологическая ткань (слизистая оболочка ректосигмоидного отдела толстой кишки), предоставленная УЗ «Могилевский областной онкологический диспансер» (договор о сотрудничестве № 11755). Подготовку образца проводили следующим образом: к навеске ткани массой 0,0496 г добавляли 1 000 мкл фосфатного буфера с $\text{pH} = 6,86$ и гомогенизировали. В предварительных экспериментах было установлено, что оптимальными условиями гомогенизации является встряхивание в течение 10 минут при частоте 50 Гц, массе навески 0,04–0,05 г и объеме буфера 1 000 мкл. Гомогенизацию проводили с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (Германия). Люминесценцию образцов ткани определяли с помощью спектрофлуориметра FP-8200 (Япония).

Для исследования спонтанной люминесценции 1,2 мл фосфатного буфера с $\text{pH} = 6,86$ смешивали с 5 мкл гомогенизата биологической ткани. Для определения длины волны биологической ткани были получены 3D спектры фосфатного буфера (рисунок 1) и фосфатного буфера с гомогенизатом (рисунок 2).

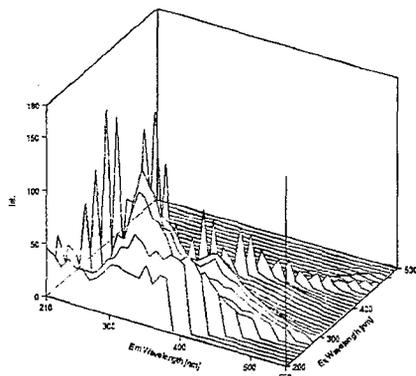


Рисунок 1 – 3D спектр фосфатного буфера

Из представленного спектра видно, что пик сверхслабого свечения фосфатного буфера наблюдается при длине волны 250 нм, интенсивность равна 173,115 (усл. ед. инт.) при чувствительности прибора Medium.

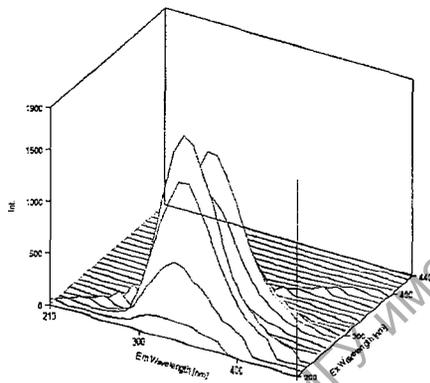


Рисунок 2 – 3D спектр фосфатного буфера с гомогенизатом

Из представленного спектра видно, что пик сверхслабого свечения фосфатного буфера с гомогенизатом наблюдается при длине волны 230 нм, интенсивность равна 1 838,920 (усл. ед.) при чувствительности прибора Medium.

Результаты измерения спонтанной хемилюминесценции одного из образцов биологической ткани представлены на рисунке 3.

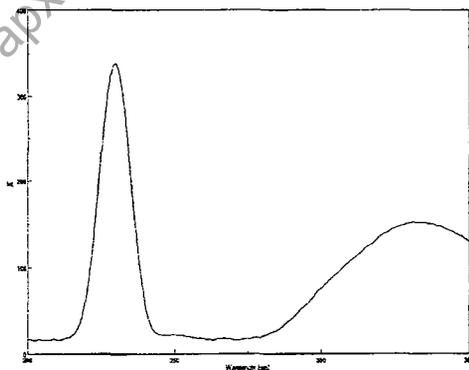


Рисунок 3 – Интенсивность спонтанной люминесценции гомогенизата

Из представленных данных видно, что интенсивность спонтанной люминесценции при длине волны 230 нм равна 337,82 (усл. ед.) при чувствительности прибора Verylow.

Для обработки экспериментальных данных были проведены три параллельных измерения одного образца биологической ткани. Результаты приведены в таблице.

Таблица – Интенсивность СХЛ образцов ткани при длине волны 230 нм

	Интенсивность спонтанной люминесценции	Отклонение от среднего значения по модулю	Относительная погрешность, %
1 измерение	337,820	0,513	0,152
2 измерение	339,819	1,486	0,437
3 измерение	337,361	0,972	0,288
Среднее значение	338,333	1,143	0,292

Отклонение от среднего значения интенсивности люминесценции составляет от 0,513 до 1,486 (усл. ед.). Относительная погрешность не превышает 0,44 %.

На основании полученных данных мы пришли к следующему заключению:

– гомогенизацию следует проводить в течение 10 минут при частоте встряхивания 50 Гц, масса навески ткани должна составлять 0,04–0,05 г и объем буфера 1 000 мкл;

– для измерения спонтанной люминесценции необходимо в кварцевую кювету ввести 1,2 мл фосфатного буфера, к нему добавить 5 мкл гомогенизата биологической ткани и определить люминесценции при 230 нм;

– указанные параметры позволяют провести измерение спонтанной люминесценции биологической ткани с относительной погрешностью не более 0,44 %.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Илларионова, Е. А. Флуориметрия. Теоретические основы метода. Практическое применение метода / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск, 2013. – 60 с.

2. Флуоресцентные репортеры и их репортажи [Электронный ресурс] // elementy.ru. – 2005. – Режим доступа: https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432507/Fluorescentnye_reportery_i_ikh_reportazhi. – Дата доступа: 26.11.2017.