ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ФІЗИЧНОЇ КУЛЬТУРИ

Кафедра біохімії та гігієни

Сибіль М.Г.

Люмінесцентні методи в медицині та біології

Лекція з навчальної дисципліни «Медична та біологічна фізика»

Галузь знань 22«Охорона здоров'я»

Спеціальність 227 Фізична терапія, ерготерапія

Факультет фізичної терапії та ерготерапії

"ЗАТВЕРДЖЕНО"

на засіданні кафедри

біохімії та гігієни

„31" серпня 2018 р. протокол № 1

Зав.каф _____ Борецький Ю.Р.

Лекція «Люмінесцентні методи в медицині та біології»

План

1. Люмінесценція. Люмінофори
2. Види люмінесценції
3. Флуоресценсія
4. Механізм виникнення люмінесценції
5. Закони і характеристики люмінесценції
6. Метод флуорисцентрих зондів

Люмінесценція

Люмінесценція — нерівноважне випромінювання, надлишкове над тепловим випромінюванням тіла, тривалість Якого більша, ніж період світлових коливань (T > 10~15 с).

Люмінофори

Речовини, які здатні під дією різного виду збуджень давати люмінесцентне світіння, називають люмінофорами. Природні люмінофори можуть бути як неорганічного походження (мінерали), так і органічного (насіння, квіти, нафтопродукти). Різниця між ними полягає у тому, що неорганічні дають люмінесцентне світіння тільки у твердому стані, а органічні — у твердому, рідкому та газоподібному станах (люмінесцентне світіння дають де які молекули). Медики та біологи найбільше стикаються з люмінесценцією органічних сполук.

Прикладами люмінесценції є світіння газів під час електричного розряду, фосфору під час окиснення в повітрі, світіння екранів телевізорів, осцилографів. Це світіння пов’язане з переходом молекул (із збудженого стану в основний.

Види люмінесценсії

Залежно від способу збудження розрізняють такі види люмінесценції:

• фотолюмінесценція — світіння під впливом хвиль оптичного діапазону;

• електролюмінесценція — світіння під впливом електричного поля;

• тріболюмінесценція — світіння під час розтирання або розколювання деяких кристалів (цукру);

• катодолюмінесценція — світіння під дією швидких електронів;

• радіолюмінесценція — світіння під впливом продуктів радіоактивного розпаду;

• хемілюмінесценція — світіння, яке зумовлене хімічними пере твореннями. Окремим видом хемілюмінесценції є біолюмінесценція — світіння живих організмів.

Флуоресценсія

Залежно від тривалості світіння розрізняють два види люмінесценції речовин: флуоресценція — світіння, яке зникає майже відразу після припинення дії збуджувального світла (10-8... Ю”9 с); фосфоресценція — світіння, тривалість якого становить від 10-8 с до декількох годин . Ці два види люмінесценції відрізняються не лише тривалістю світіння, а й тим, що кванти світла випромінюються з різних енергетичних рівнів збудженої молекули. Дослідження дали змогу з ’ясувати, що в більшості випадків люмінесцентне світіння дають ті органічні молекули, до складу як и х входять атоми вуглецю з одинарними й подвійними зв ’язками , що чергуються (вітамін А, хлорофіл).

Механізм виникнення люмінесценції

Резонансна флуоресценсія

Під час поглинання фотона атом переходить у флуоресценція збуджений стан, тобто на вищий енергетичний рівень, на якому він може перебувати приблизно 10“8 с. Повернутись до основного стану атом може декількома способам и. Зокрема, можливий прямий перехід електрона, коли атом випромінює так у саму енергію, яку він поглинув. Це явище називають резонансною флуоресценцією , але смуги випромінювання і поглинання зміщені в часі.

Сенсибілізована флуоресценсія

Можливі безвипромінювальні переходи, коли люмінесценція відбувається обмін енергією між молекулами в результаті їх взаємодії. Якщо при цьому одна молекула отримує енергію від іншої і здатна випромінювати, то таку люмінесценцію називають сенсибілізованою.

Закони і характеристики люмінесценції

Стоксове випромінювання

Кількісні дослідження люмінесценції проводив Дж. Стокс. Він сформулював таке правило: довжина хвилі люмінесцентного випромінювання більша від довжини хвилі світла, яке зумовило люмінесценцію (стоксове випромінювання).

Антистоксове випромінювання

Проте можливе також випромінювання з меншою довжиною хвилі (антистоксове випромінювання).

Закон Стокса-Ломмеля

Закон Стокса — Ломмеля: спектр випромінювання загалом і його максимум зміщені відносно спектра поглинання та його максимуму в бік довших хвиль. Цей закон можна пояснити за допомогою квантових уявлень.

Квантовий вихід люмінесценсії

Характеристиками люмінесценції є квантовий і люмінесценції енергетичний виходи. Квантовим виходом (В) люмінесценції називають відношення кількості випромінених квантів до кількості поглинутих.

Окрім стоксових втрат енергії, під час люмінесценції відбувають ся деякі інші втрати. Із підвищенням температури вихід люмінесценції зменшується. Це пояснюється збільшенням амплітуди коливань молекул, внаслідок чого атоми передають свою надлишкову енергію окремим частинам молекули і переходять в основний стан без випромінювання світла. Отже, збільшення температури зумовлює згасання люмінесценції.

Концентраційне згасання

Із підвищенням концентрації речовини інтенсивність люмінесценції зростає, а за високих концентрацій — зменшується. Таке концентраційне згасання люмі-есценції пояснюється утворенням у концентрованих розчинах асоціатін, які складаються з двох і більше молекул. Ці асоціати, поглинаючи світлову енергію, не дають люмінесцентного світіння. За даними про люмінесценцію можна судити про запас енергії, накопиченої в молекулі, розрахувати розміщення енергетичних рівнів молекули, визначити час життя молекул у збудженому стані за швидкістю виникнення люмінесценції, дослідити стан речовини.

Хелюмінесценсія у діагностиці

Молекули можуть переходити у збуджений стан не лише під час поглинання енергії, а й унаслідок хімічної взаємодії з іншими молекулами. Повернення таких молекул до основного стану супроводжується світінням — хемілюмінесценцією. Відомі три види хемілюмінесценції: мітогенетичне світіння, біолюмінесценція і надслабке світіння. Умовою будь-якого виду хемі-люмінесценції є хімічна реакція окислення.

Мітогенетичне світіння

Мітогенетичне світіння — ультрафіолетове випромінювання (290...320 нм), субстратом якого є білки і вуглеводи. Це світіння стимулює поділ клітин.

Біолюмінесценсія

Біолюмінесценція — випромінювання, властиве багатьом живим організмам (бактеріям, деяким рибам, грибам тощо). Біолюмінесценція є результатом ферментативного окиснення особливих речовин — люциферинів, молекули яких внаслідок окиснення можуть переходити у збуджений стан. Фермент, що каталізує окиснення люциферинів, називають люциферазою. Природа люциферину в різних організмах різна.

Надслабке світіння

Надслабке світіння — це світіння живих організмів, тканин, клітин у видимій та інфрачервоній ділянках спектра. Надслабке світіння супроводжує більшість реакцій у біологічних об'єктах. Воно виникає внаслідок озеленювальних реакцій екзотермічного характеру. Доведено, що інтенсивність світіння пропорційна швидкості рекомбінації вільних радикалів. Під час взаємодії двох радикалів їхні неспарені електрони утворюють хімічний зв'язок. При його утворенні надлишок електронної енергії висвічується. Продукти вільнорадикального окиснення можуть негативно впливати на всі системи і структури клітин.

В організмі вільнорадикальпе окиснення гальмується системою тканинних антиокислювачів, до якої входять аскорбінова кислота, адреналін, сульфгідрильні сполуки, каротиноїди, фосфоліпіди. Вільнорадикальпе окиснення в тканинах є патогенетичною основою де яких захворювань; надслабке світіння тканин може бути діагностичним тестом. Зміна інтенсивності світіння свідчить про порушення первинних фізико-хімічних процесів в організмі. Здійснено дослідження світіння плазми і сироватки крові в умовах стресу і деяких захворювань. Під час стресу інтенсивність світіння плазми крові збільшується, що засвідчує зростання активності вільнорадикального окиснення. Продукти окиснення порушують фізико-хімічні процеси в клітинах.

Виявлено, що запальні процеси в легенях супроводжуються зростанням інтенсивності вільнорадикального окиснення, що виявляється у посиленні світіння сироватки крові. Інтенсивність світіння залежить від стадії запального процесу.

Надслабке світіння Сироватки крові при злоякісних новоутвореннях дає змогу визначити фазу розвитку чи розпаду пухлини. Коли пухлина росте, то в ній накопичуються антиокиснювачі, які транспортуються кров'ю з інших органів.

У результаті зменшується інтенсивність світіння сироватки крові. У фазі розпаду пухлини вміст антиокиснювачів у сироватці крові нижчий, ніж у нормі, тому світіння посилюється порівняно з нормою.

Доведено, що злоякісні пухлини здатні накопичувати деякі люмінофори. Після введення у вену флуоресцеїну здоровим людям він цілком виводиться з організму за 50...70 год, а у хворих може виводитися протягом 2000 год. Це явище використовують під час опера* цій на легенях. За 3...4 год до операції хворий вживає флуоресцеїн (1 г). На операційному столі під світлом УФ-лампи в пацієнта виявляється чітка межа між тканиною пухлини, яка дає жовто-коричневе світіння, і здоровою тканиною, яка дає сіро-голубе світіння.

Для успішного люмінесцентного контролю за функціонуванням різних органів людини потрібно знати характер природного світіння цих органів. Майже усі тканини і клітини організму, за винятком гемоглобіну і пігментованої шкіри, дають люмінесцентне світіння під дією УФ-випромінювання. Інтенсивність світіння тканин визначається їхньою структурою та ступенем насичення гемоглобіном. Яскравість люмінесценції шкірних покривів залежить від їх крово-наповнення, товщини рогового шару, віку та ін. Згідно із сучасними уявленнями, колір й інтенсивність світіння біологічних систем можуть визначатися як наявністю в них сполук, які дають люмінесцентне світіння (типу порфіринових похідних), так і хемілюмінесцентними процесами. Джерелом слабкого світіння, особливо в синьо- зеленій ділянці спектра, може бути окиснення ліпідних структур клітин, яке відбувається повільно.

Характер люмінесценції тканин і органів помітно змінюється внаслідок деяких захворювань. Наприклад, гнійні кірки дають у мигдаликах інтенсивне оранжеве світіння. Темно-бурі плями з коричневим відтінком, виявлені під час освітлення ротової порожнини УФ-променями, свідчать про наявність жовтяниці. Зуби дають інтенсивну люмінесценцію, але при карієсі світіння відсутнє (діагностична ознака).

Внутрішньовенне або підшкірне введення люмінофору дає змогу вивчати функціональний стан органів. Для цього найчастіше використовують флуоресцеїн, який у невеликій дозі (декілька грамів) не шкідливий для організму. Наприклад, якщо ввести концентрований розчин люмінофору в ліктьову вену, то він швидко поширюється по всьому тілі. Через декілька секунд на губах, у тканинах очей і слизової оболонки рота з’являється жовто-зелене світіння. Це використовують для визначення часу кровообігу в організмі та виявлення ділянок із послабленим кровопостачанням. Вводять флуоресцеїн під шкіру часто для дослідження функціональної активності печінки і нирок, а також нервової системи.

Люмінесцентний аналіз

Застосуванню люмінесцентного аналізу для контролю за вживанням ліків і виявленню їх у тканинах сприяє те, що більшість лікарських препаратів має власну яскраву люмінесценцію або здатна світитися після певної хімічної обробки.

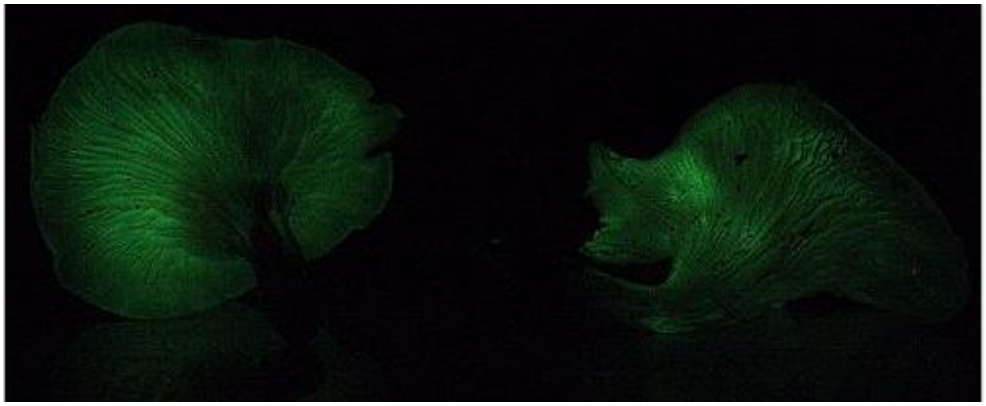
Причиною порушення життєвої діяльності клітин, розвитку захворювань найчастіше є зміни в біологічних мембранах. Мембрани першими реагують на несприятливі умови, у які потрапила тканина під дією зовнішніх чинників або внаслідок порушення внутрішньо клітинних процесів. Більшість гормонів, токсинів, ліків утворюють сполуки з біологічними мембранами, змінюють їх проникність та інші властивості, впливають на структуру мембрани і діють на клітину загалом.

Метод флуорисцентрих зондів

Молекулярну організацію функціонування мембран вивчаютьлюмінесцентними методами, зокрема методом флуоресцентних зондів. Важливу роль відіграють люмінесцентні методи у дослідженні якості продуктів харчування: цими методами можна виявити хімічні консерванти, лікарські речовини, смакові та ароматизуючі додатки, пестициди, харчові барвники.

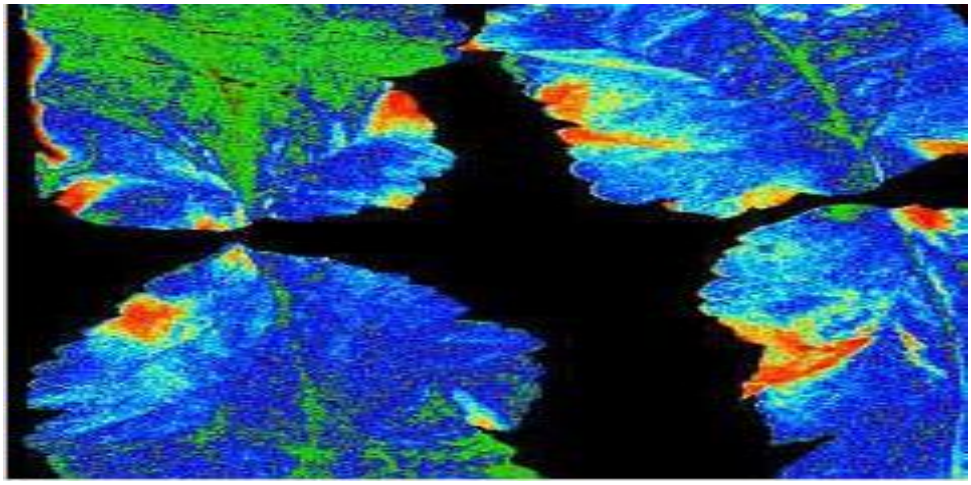
1.





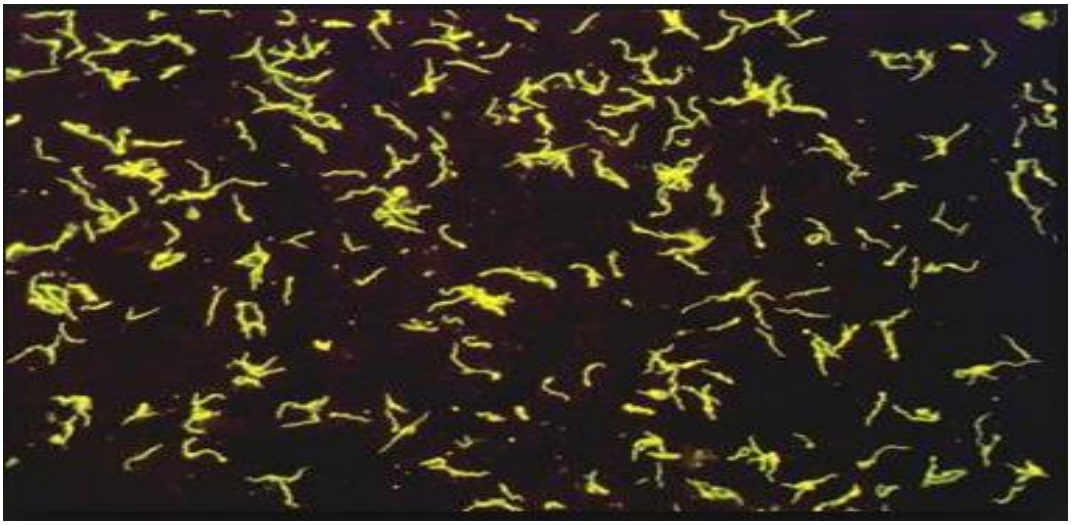
Omphalotus nidiformis, світяться при вимкнутому світлі

2.



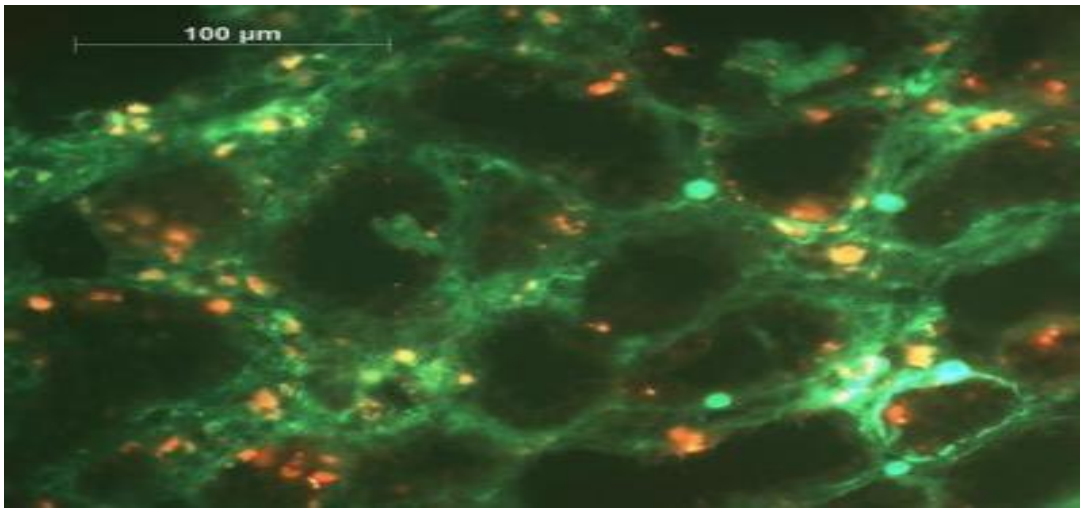
Флуоресценсія хлорофила в листях пастернаку (Pastinacca sativa)

3.



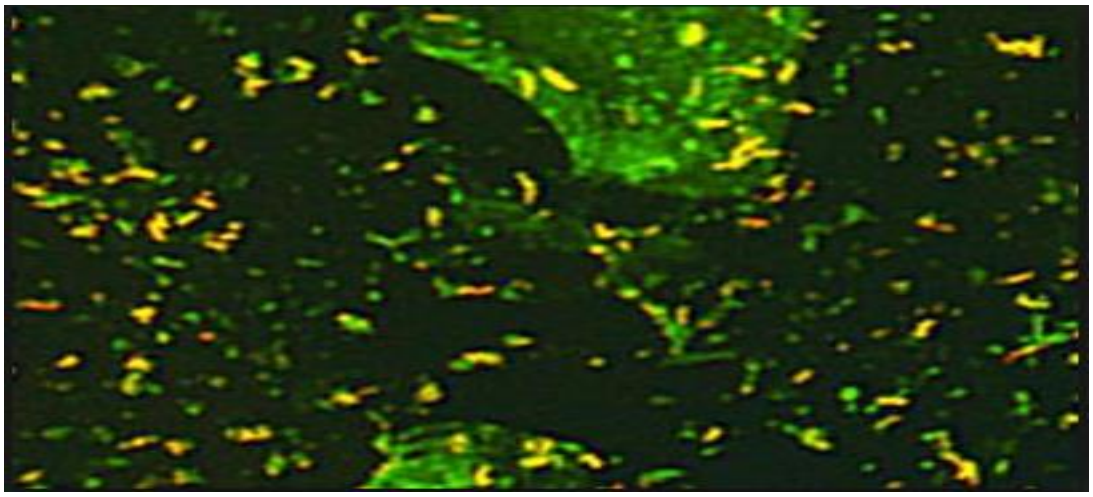
Мікробіологічна діагностика сифіліса

4.



Вторинна люминесценсія при виявленні раку

5.



Бактерія туберкульозу

6.



Спектрофлуориметр “*Флюорат-02-Панорама*”