

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Люминесценция крови в норме и патологии**  
**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 4 курса 434 группы  
направления 03.03.02 «Физика»  
физического факультета  
Козловой Екатерины Алексеевны

Научный руководитель

профессор, д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

  
подпись, дата

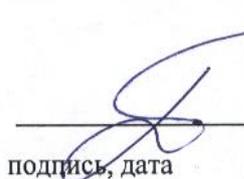
В.И. Кочубей

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

  
подпись, дата

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2017

## ВВЕДЕНИЕ

При взаимодействии излучения с живыми организмами наблюдаются такие эффекты, как отражение, рассеяние, поглощение, генерация акустического поля, нелинейные эффекты, флуоресценция и т.д.[1]. Свет, отраженный от клетки живого организма, несет информацию о ее структуре и о наличии собственных или введенных извне флуорохромов. Успешное применение люминесцентной спектроскопии достигается благодаря аутофлуоресцентным свойствам различных тканей органов. В настоящее время известно большое число видов биологических веществ, являющихся природными или естественными флуорофорами. Собственными флуорофорами крови являются: порфирины, билирубин, гемоглобин, NADH, флавины, липопигменты. [2,3,4,5] Все эти вещества в сумме должны давать сложный спектр, форма которого зависит от соотношения их концентраций.

Одной из наиболее сложных проблем в хирургии остаётся лечение абдоминальных гнойно–воспалительных заболеваний и их осложнений. В структуре хирургической заболеваемости перитонит и вызывающие его деструктивные поражения органов брюшной полости занимают одно из первых мест.

**Актуальность проблемы** диагностирования перитонита определяется несколькими факторами:

1. Широкой распространенностью патологии. Перитонит – заболевание, которое по статистическим данным диагностируется у 15 – 20 % пациентов, состояние которых требует экстренного хирургического вмешательства.

2. Высокой летальностью при распространенном перитоните, по данным разных авторов от 18 до 60%.

3. Сложностью и многочисленностью нарушений гомеостаза при перитоните, недостаточно изученным патогенезом этого заболевания.

Перитонит, как всякое тяжелое нагноительное заболевание, сопровождается нарушением многих функций организма. При патологии в организме идет накопление NADH, порфиринов, билирубина, гемоглобина.

Но на начальных этапах развития болезни идет увеличение оксигенации ткани и крови[6,7,8,9,10]

**Цель работы.** Отсутствие надежного метода, позволяющего быстро определить наличие перитонита, в значительной степени снижает эффективность лечения. Следует отметить, что, несмотря на значительное количество клинических и экспериментальных исследований, методы ранней диагностики перитонита практически не разработаны. Поэтому целью исследований является создание такого метода диагностики, который был бы очень точным, неинвазивным, легко выполнимым и не потребует много времени и средств.

В ходе работы были поставлены и успешно решены такие **задачи** как регистрация спектров люминесценции мазков и плазмы крови крыс в норме и при наличии патологии, изучение и анализ поведения этих спектров.

Данная работа посвящена развитию применения люминесцентной спектроскопии для диагностики ранних стадий заболеваний.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на 10 белых лабораторных крысах-самках линии «Вистар» массой около 200 г. Возраст животных составлял 9 месяцев. Для создания перитонита в эксперименте использовалась модель разлитого перитонита по Милькову Б.О.

Регистрация спектров поглощения и люминесценции образцов производилась при помощи спектрометра LS 55 (Perkin Elmer, USA) и спектрометра QEPro (Ocean Optics, USA)

**Описание структуры ВКР** (количество глав и их названия). Работа состоит из трех глав. 1 Теоретическая часть: 1.1 Формирование спектров поглощения и люминесценции молекул, 1.2 Биохимический состав крови, 1.3. Собственная люминесценция биомолекул. Основные собственные флуорофоры, 1.4 Люминесцентная диагностика патологии органов. 2 Экспериментальная часть: 2.1 Материалы и методы эксперимента, 2.2 Регистрация спектров люминесценции и поглощения. 3. Обработка результатов и их обсуждение.

## Основная часть

Обработка экспериментально полученных спектров проводилась с помощью OriginPro7.0. Все полученные спектры были сглажены по 20 точкам. Так же полученные спектры больных и здоровых крыс были усреднены.

**Мазки крови.** На рисунках 2 и 3 представлены экспериментально полученные спектры люминесценции мазков больной и здоровой крови крысы при возбуждении на длине волны 330,340нм и 405,415нм.

На спектрах люминесценции мазка при возбуждении на 330нм видны минимумы на 470 нм, 490нм, 540-580нм и пики на 460нм, 480нм, 505нм, небольшая неоднородность на 520нм и 440-460нм.

Спектры люминесценции были проверены на искажение Рамановским рассеянием. При возбуждении на 340нм появляется резонансный Раман на 450нм, вероятно, что это объясняет небольшую неоднородность на 440-450 нм при возбуждении на 330нм.

Для того, чтобы показать, что изменения в спектрах люминесценции связано с изменением в флуорофорах, а не в хромофорах, регистрировались спектры поглощения образцов.

На спектре поглощения мазка (рис.1) крови видны альфа и бета полосы поглощения гемоглобина(540 и 580 нм), полосу Core (400-420нм) и неоднородность на 450 нм, которая может быть объяснена наличием билирубина.

Можно сделать вывод, что структура экспериментальной полосы имеет природу: широкая полоса люминесценции белков на которую накладывается полоса Core (400-420нм),поглощение гемоглобина (540-560нм), полоса люминесценции на 510 нм (характерно для билирубина) и полоса 480нм,которую нельзя определить однозначно(витамин А, предметное стекло, НАДН).

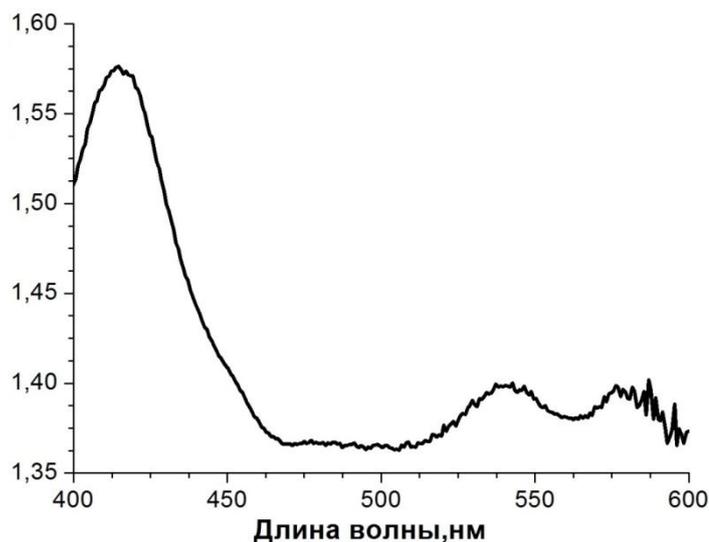


Рисунок 1- Спектр поглощения здорового мазка крови

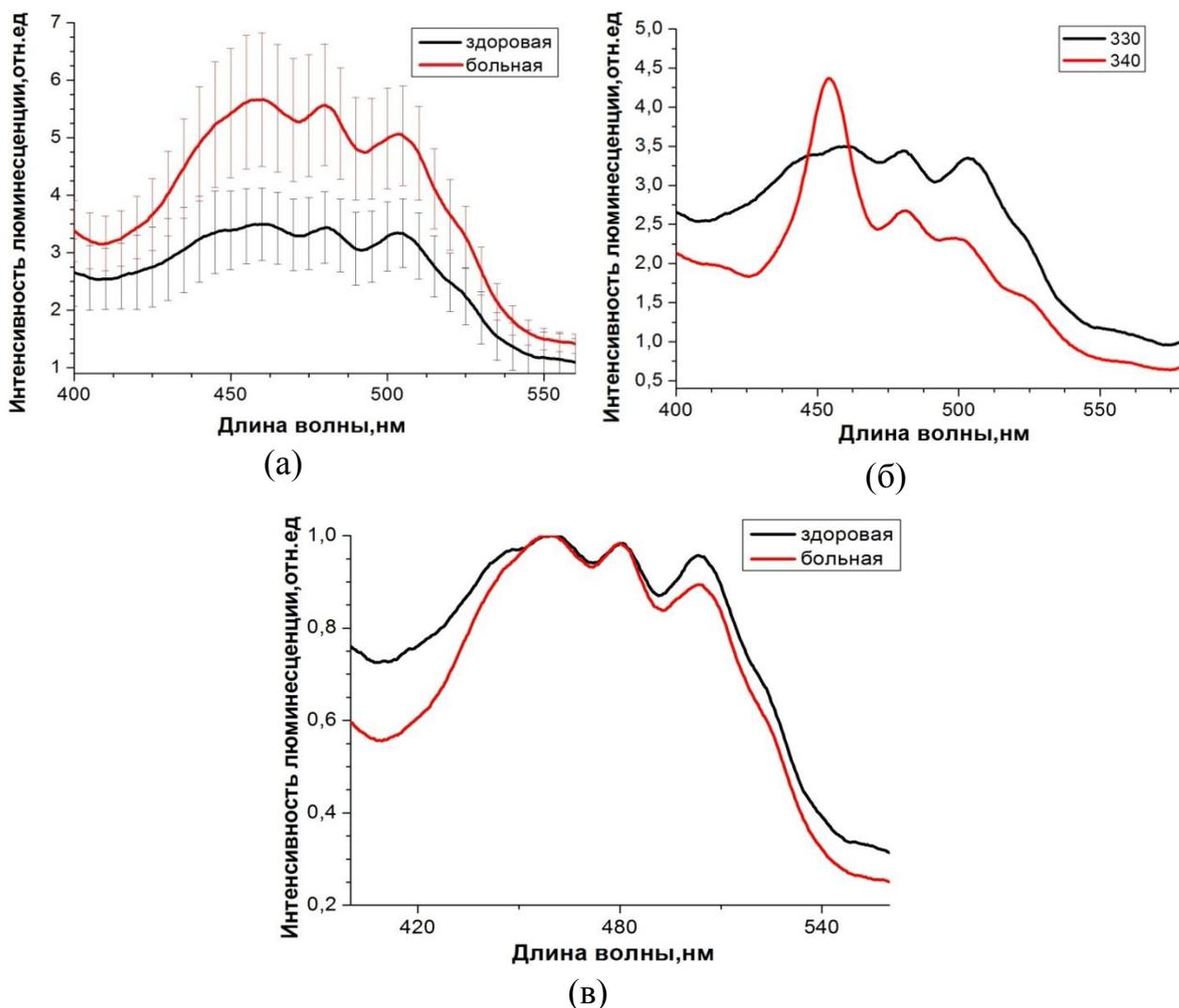


Рисунок 2- Спектры люминесценции мазков крови (а)-больных и здоровых крыс при возбуждении на 330нм, (б)- здоровых крыс при возбуждении на 330нм и 340 нм,(в)-нормированные спектры больных и здоровых крыс при возбуждении на 330нм.

Сравнение норма и патология:

На спектрах больной крови наблюдается общее увеличение интенсивности из-за общего увеличения количества белка. Так же при сравнении нормированных спектров можно заметить, что при патологии более выражена полоса Соре и поглощение гемоглобина, что объясняется увеличением оксигенации.

При проверке на Рамановское рассеяние при возбуждении 405нм и 415нм стабильна по положению только полоса люминесценции на 480 нм. Остальные искажаются Рамановским рассеяние, анализ затруднен.

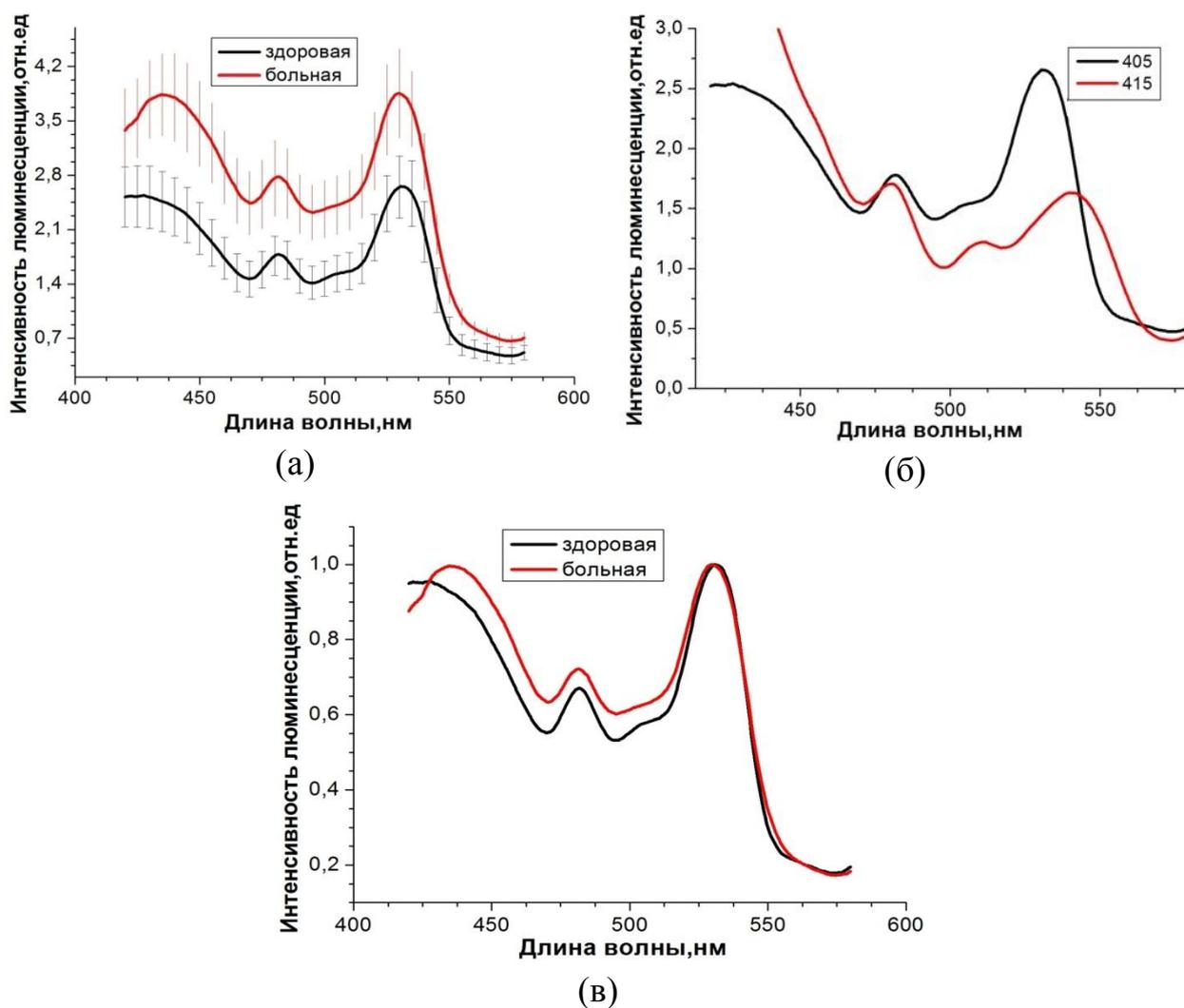


Рисунок 3- Спектры люминесценции мазков крови (а)-больных и здоровых крыс при возбуждении на 405нм, (б)- здоровых крыс при возбуждении на 405 нм и 415 нм,(в)-нормированные спектры больных и здоровых крыс при возбуждение на 415нм.

При возбуждении на длине волны 405 нм наблюдаются минимумы на 470, 490-510, 560-580 нм, максимумы на 480, 530 нм и небольшая неоднородность на 510нм. На спектрах больной крови менее заметна неоднородность на 510 нм.

Сравнение нормы и патологии:

Интенсивность полосы на 480нм увеличивается при патологии. Кроме общего изменения величины сигнала, появления новых полос или изменения относительной интенсивности нет. Таким образом, анализ при возбуждении на 405 нм затруднен из-за сильного Рамановского рассеяния.

**Плазма крови.** На рисунках 5 и 6 представлены экспериментально полученные спектры люминесценции плазмы больной и здоровой крови крысы при возбуждении на длине волны 330,340нм и 405,415нм.

На спектре поглощения плазмы крови (рис.4) наблюдается выраженный пик на 450-460 нм, характерный для билирубина и небольшой пик на 415нм, видимо принадлежит гемоглобину.

На спектрах люминесценции плазмы при возбуждении на 330нм минимумы люминесценции на 470 нм, 490нм, 540-570нм, пики люминесценции на 480нм, 505нм, небольшие неоднородности в областях 445-460нм,520нм. На больных спектрах пропадает неоднородность в области 480-490нм и менее заметен минимум в области 450нм. Общая интенсивность больных спектров меньше здоровых.

При возбуждении на длине волны 405 нм наблюдаются минимумы люминесценции на 470, 490, 560-580 нм и максимумы люминесценции на 430-450нм,480нм, 530 нм и небольшая неоднородность на 505нм. На больных спектрах пропадает неоднородность в области 470-490нм, пик на 530нм, пик в области 430-450 нм становится более узким.

При смещении длины волны возбуждения на 10 нм спектры люминесценции не искажаются Рамановским рассеянием.

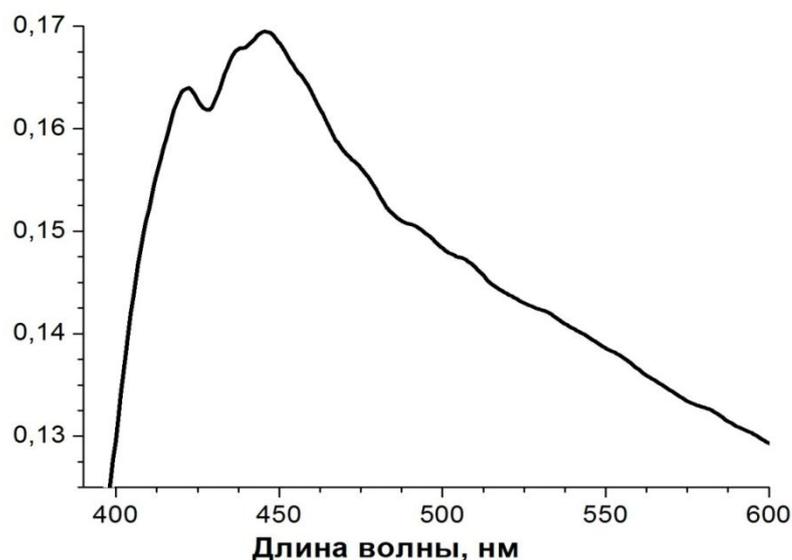


Рисунок 4- Спектр поглощения плазмы крови.

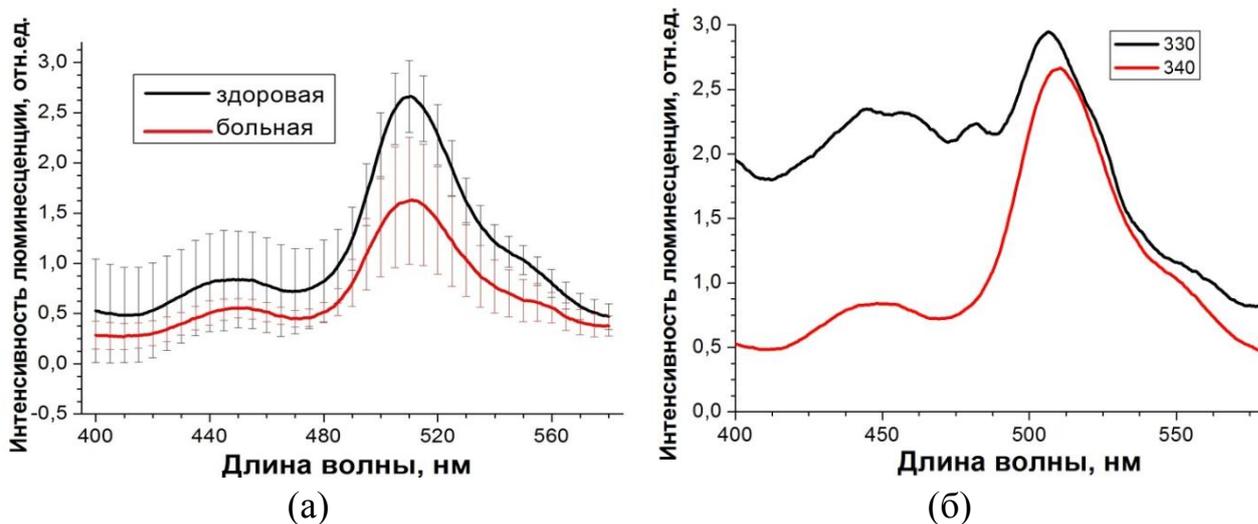


Рисунок 5- Спектры люминесценции плазмы крови (а)- больных и здоровых крыс при возбуждении на 340нм, (б)- здоровых крыс при возбуждении на 330 нм и 340 нм.

При возбуждении 330 и 340 смещение и искажение спектра происходит только для здоровых и 330 нм. В остальных случаях полосы не смещаются, только изменяются по амплитуде. Можно сделать вывод, что спектр здоровой крови при 330нм искажен и его сложно принимать во внимание.

Нормализация спектров при возбуждении на 340нм показывает полную идентичность без изменения соотношений полос. Так как в спектре проявляются полосы поглощения гемоглобина(540-570нм), есть возможность и того, что минимум в области 470нм это перепоглощение в плазме.

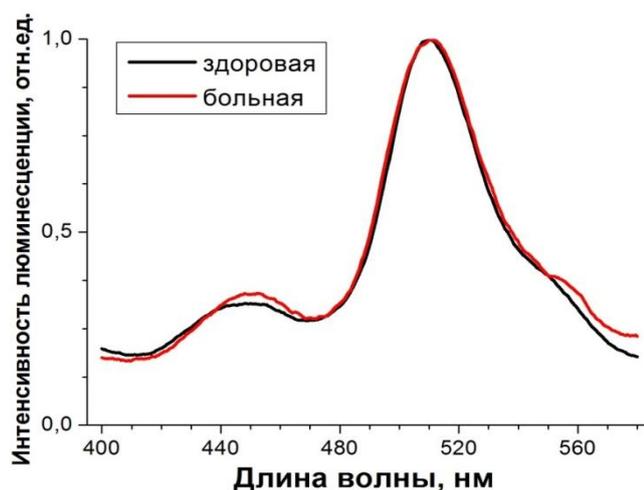
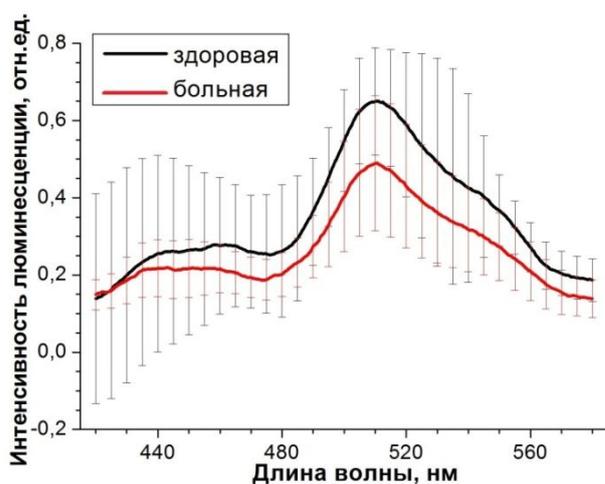
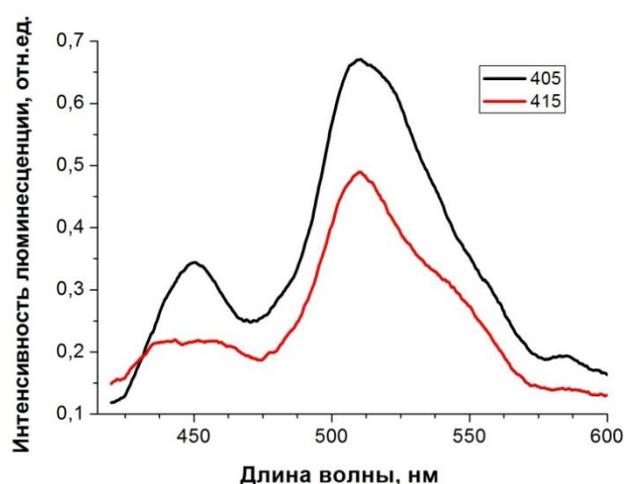


Рисунок 5(в)- Нормированные спектры люминесценции плазмы больной крови при возбуждении на 340нм.

Поведение спектров при возбуждении 405нм так же искажается, поэтому более целесообразно обсуждать спектры при возбуждении 415нм. Нормализация спектров при возбуждении на 415 нм так же показывает полную идентичность без изменения соотношений полос. Есть общее изменение величины сигнала. Поглощение на 470нм характерно для перепоглощения гемоглобина, на 560-580нм – поглощение гемоглобина. Предполагается, что люминесценция на 510нм может быть объяснена билирубином или же это сочетание поглощения и перепоглощения гемоглобина.

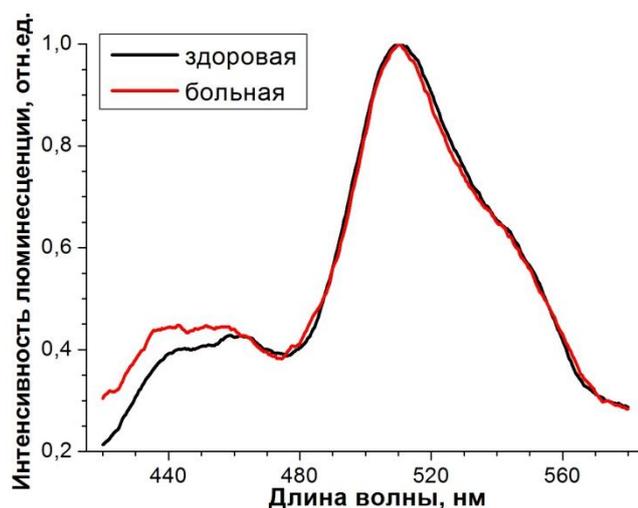


(а)



(б)

Рисунок 6- Спектры люминесценции плазмы крови (а)- больных и здоровых крыс при возбуждении на 415нм, (б)- здоровых крыс при возбуждении на 405 нм и 415 нм.



(в)

Рисунок 14(в)- Нормированные спектры люминесценции плазмы крови (возбуждение на 415нм).

### Оксигенация

По спектрам люминесценции мазка крови при возбуждении на 330 нм была посчитана степень оксигенации крови. Для этого интенсивность люминесценции была переведена в оптическую плотность и по формуле (1) посчитан коэффициент оксигенации(Y)[11]:

$$Y = \left[ \frac{OD_{577} - OD_{556}}{\Delta\lambda_{34}} - \frac{OD_{556} - OD_{540}}{\Delta\lambda_{23}} \right]. \quad (1)$$

где OD- оптическая плотность, отн. ед.;

$\lambda$ -длина волны, нм.

Исходя из усредненных значений, степень оксигенации увеличивается, что характерно для начального протекания болезни.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Есть общее увеличение сигнала в мазке и уменьшение в плазме при патологии. Это может быть связано с тем, что общий белок увеличивается в мазке, а содержание внеклеточного белка в плазме уменьшается. В начальной стадии нет больших изменений в концентрации люминофоров (НАДН, флафины, билирубин), так как болезнь еще не успела развиваться. Однако более чувствительным методом может являться Рамановская спектроскопия, так как для отдельных животных наблюдался резкий рост Раманского рассеяния при патологии. Анализ биохимического состава в виду малого количества крови затруднен, поэтому с конкретными молекулами связать рассеяние не возможно. В спектрах брюшины *in vivo* Рамановского рассеяния нет. Возможно, это обусловлено геометрией сбора рассеянного излучения: в зондовом методе рассеяние идет только назад, в флуориметре - в широком угле вблизи 45 градусов. В связи с этим можно сделать вывод, что зондовый метод подходит лучше.

## Список использованных источников

1 Кузьмина А.Г., Применение метода флуоресцентного анализа для экспресс – диагностики антибиотикочувствительности у больных с абдоминальным сепсисом в послеоперационном периоде / Материалы УП Всероссийской 128 конференции общих хирургов с международным участием. Красноярск. 2012. 714-717с.

2 Новиков И.А., Осипова Е.А., Медико-биологические аспекты флуоресцентной диагностики [Электронный ресурс]. URL:[http://www.cancerplot.ru/mediko-biologicheskie\\_aspekty\\_fluorescentnoj\\_diagnostiki](http://www.cancerplot.ru/mediko-biologicheskie_aspekty_fluorescentnoj_diagnostiki) (дата обращения: 20.05.16.) Яз.рус.

3 Кочубей В.И., Конюхова Ю.Г. Методы спектральных исследований крови и костного мозга / Саратов: Изд. СГУ. 2000. 72 с.

4 Башкатов А. Н., Генина Э. А., Козинцева М. Д., Кочубей В. И., Городков С. Ю., Тучин В. В., Оптические свойства биологических тканей брюшины в спектральном диапазоне 350–2500 нм / Оптика и спектроскопия. 2016. Т.120, №1. 6-14с.

5 Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И., Спектральный люминесцентный анализ в медицине/ Наука и техника.1989. 141с

6 Шапошников В.И., Биохимические механизмы гомеостаза при перитоните/ Современные проблемы науки и образования. 2004. № 1. 91-92 с.

7 Савельев В. С., Сепсис в начале 21 века /М.: Литтерра, 2006. 176 с.

8 Гостищев В.К., Инфекции в хирургии/ ГЭОТАР-Медиа. 2007.470с.

9 Руднов В.А., Сепсис: терминология. Патогенез, оценка тяжести и интенсивная терапия/ Вестник интенсивной терапии. 1997. №4. 40-45с.

10 Рябов Г.А., Синдромы клинических состояний/М.: Медицина. 1994. 368с.

11 Ю.П.Синичкин, Л.Е.Долотов, Д.А.Зимняков, В.В.Тучин, С.Р.Утц  
Специальный практикум по оптической биофизике/ Изд-во Сарат. ун-та, 2003. – 159 с

27.06.2017