

УДК 535.372:611.018.5

## Методи низькоенергетичної індукованої флуоресценції та спектрофотометрії для дослідження клітин крові

Вікторія Думенко

Вінницький державний педагогічний університет імені Михайла Коцюбинського,  
кафедра фізики і методики навчання фізики, астрономії, м. Вінниця, Україна  
[viktoriya.dumenko@gmail.com](mailto:viktoriya.dumenko@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-1569-3677>

---

*Анотація.* У статті описано реалізацію методу низькоенергетичної індукованої флуоресцентної мікроскопії з використанням в якості джерела випромінювання лазера з довжиною хвилі 635 нм та методу спектрофотометрії для аналізу спектрів поглинання флуоресцентних зондів. Представлено результати теоретичних та експериментальних досліджень клітин крові здорових людей та із захворюванням хронічний мієлолейкоз методом флуоресцентної мікроскопії.

*Ключові слова:* флуоресценція, флуоресцентний зонд, низькоенергетична індукована флуоресцентна мікроскопія, спектрофотометрія, зразки крові, мієлолейкоз.

---

### 1. Вступ

Важливе значення на сьогодні в різних галузях біомедичних досліджень, а особливо в онкології мають квантові низькоенергетичні технології на основі яких базуються методи флуоресцентної діагностики. Ці методи мають ряд переваг, зокрема для діагностики біологічних рідин, володіють високою інформативністю завдяки існуючим взаємозв'язком між особливостями їх спектральних характеристик і функціональним станом окремих клітинних структур; дають можливість отримати інформацію про стан живих систем, не пошкоджуючи їх, і не потребують великої кількості біологічного матеріалу [1].

Квантові технології застосовуються в поєднанні методів флуоресцентної діагностики та фотодинамічної терапії. При фотодинамічній нетоксичний фотосенсибілізуючий засіб, такий як фотофрин, вводять внутрішньовенно за 48 годин до транспаплярного або черезшкірного опромінення світлом певної довжини хвилі. Внаслідок накопичення в неопластичній тканині фотосенсибілізуючий агент генерує активні кисневі радикали після поглинання світла, що призводить до руйнування пухлинних клітин [2].

На сьогодні значно розширилась ідея про функціональну систему крові. Відомо, що розвиток злякисних утворень, хвороби печінки та інші патологічні процеси викликають в плазмі і сироватці крові ряд відхилень від норми. Для виявлення захворювань крові використовують методи флуоресцентної діагностики [3; 4].

Для спостереження флуоресценції еритроцитів використовують флуоресцентні зонди (флуорофори), тобто речовини, молекули яких поглинаються клітинами крові і випромінюють люмінесцентний спектр при збудженні електромагнітним випромінюванням певного спектрального діапазону.

Для конкретного прикладного застосування розроблено певні флуорофори, зокрема фотосенс, радохлорин, фотолон та інші [5; 6].

Спектр випромінювання флуоресценції  $I(\lambda)$  специфічний для кожного флуорофора і тому містить докладну інформацію про флуоресціюючі молекули, їх конформації, зв'язки і взаємодії в клітинах і тканинах [7].

З використанням лазерних джерел світла можливості флуоресцентної діагностики значно розширились, серед таких методів варто виділити лазерну мікро-флуориметрію і лазерну скануючу мікроскопію [8; 9].

## 2. Постановка проблеми

Багато флуорофорів характеризуються близькими областями поглинання і флуоресценції, які перекриваються, в результаті випромінювання, яке виходить з тканини має складний спектральний склад. Тому виникає необхідність вибору довжини хвилі збудження і довжини хвилі флуоресценції для кожного конкретного флуоресцентного зонда.

Для діагностики хвороб крові пропонується в якості флуоресцентного зонда використати *methylenum coeruleum*.

*Мета статті:* виконати експериментальні дослідження зразків крові методом низькоінтенсивної індукованої флуоресцентної мікроскопії та обґрунтувати можливість використання методу для діагностики захворювань крові та прикладі захворювання хронічний мієлолейкоз.

## 3. Результати досліджень

Розглянемо фізичний механізм флуоресценції.

Флуоресценція виникає після поглинання світла і пов'язана з електронним переходом із збудженого стану молекули в основний стан. Її інтенсивність виражається:

$$I_F(\lambda) = I_0 \ln 10 - \varepsilon_{\lambda} c_{ab} d \eta_F \frac{\Omega}{4\pi}. \quad (1)$$

Інтенсивність флуоресценції пропорційна концентрації і квантовому виходу флуоресценції поглинаючих молекул. Енергії електронних станів молекули є складними функціями між'ядерних відстаней, зазвичай утворюють «потенціальні ями», як показано на рис. 1 а для основного ( $S_0$ ) і першого збудженого ( $S_1$ ) стану. Кожна «потенціальна яма» містить велику кількість коливальних рівнів енергії  $\nu_i$ , кожен з яких розщеплений на численні обертальні підрівні. Електронний перехід між енергетичними рівнями відбувається по «вертикалі», так як за короткий проміжок часу такого переходу положення ядер не встигає змінитись. Електронні переходи зазвичай відбуваються з основних вібро-станів (для збудження  $S_0$  і  $\nu_0$ , для флуоресценції  $S_1$  і  $\nu_0$ ). Імовірність кожного переходу пропорційна квадрату дипольного моменту переходу і визначається перекриванням відповідних коливальних хвильових функцій в основному і збудженому електронному стані молекули. Таким чином, спектри поглинання і флуоресценції

виходять в результаті накладення декількох переходів, що часто призводить до утворення широких спектральних смуг. Так званий 0-0-перехід між найнижчими коливальними рівнями лише злегка виражений, оскільки перекривання відповідних хвильових функцій мале. З цієї причини спектр флуоресценції завжди зміщується в бік більш низьких енергій  $\Delta W$ , що відповідає великим довжинах хвилі  $\lambda = \frac{\Delta W}{hc}$ , в порівнянні зі спектром поглинання, або збудження.

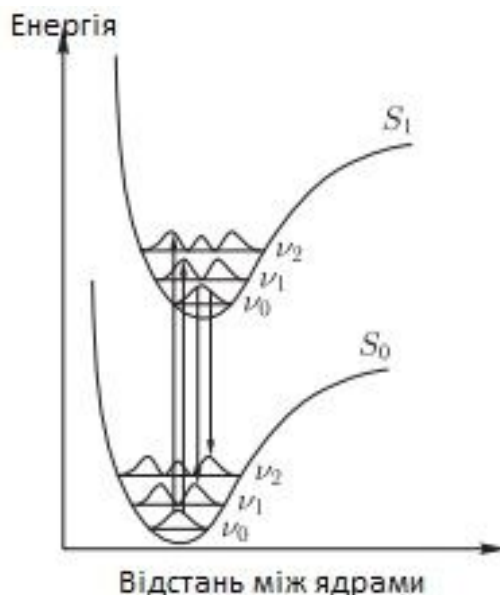


Рис. 1. Формування спектрів флуоресценції: діаграма потенціалів електронних станів  $S_0, S_1$  і коливальних рівнів  $\nu_i$ ; показані коливальні хвильові функції і оптичні переходи (збудження:  $S_0\nu_0 \rightarrow S_1\nu_n$ ; флуоресценція:  $S_1\nu_0 \rightarrow S_0\nu_n$ ).

В якості флуоресцентного зонда запропоновано використати Methylene coeruleum (methylthioninium chloride)  $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$  - органічний барвник, відомий як ефективний фотогенератор синглетного кисню, органічний барвник групи тіозінових барвників.

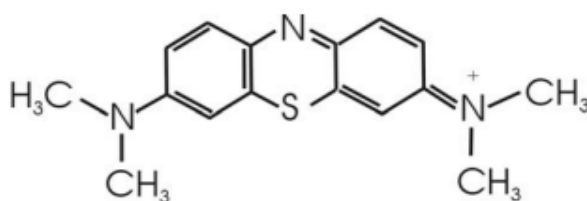


Рис.2. Хімічна формула флуоресцентного маркера "Methylene coeruleum"

Діаграма енергетичних рівнів Methylene coeruleum зображена на рис. 3.

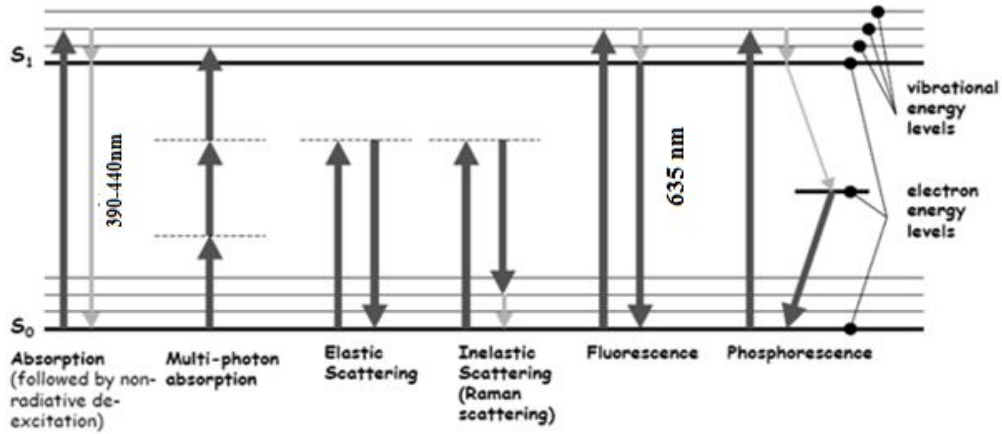


Рис. 3. Діаграма енергетичних рівнів флуоресцентного маркера "Methylenum coeruleum"

При використанні флуоресцентних зондів важливим є дослідження спектрів поглинання і вибір відповідної довжини лазерного джерела. Спектри поглинання (рис.4) досліджувались за допомогою спектрофотометра.

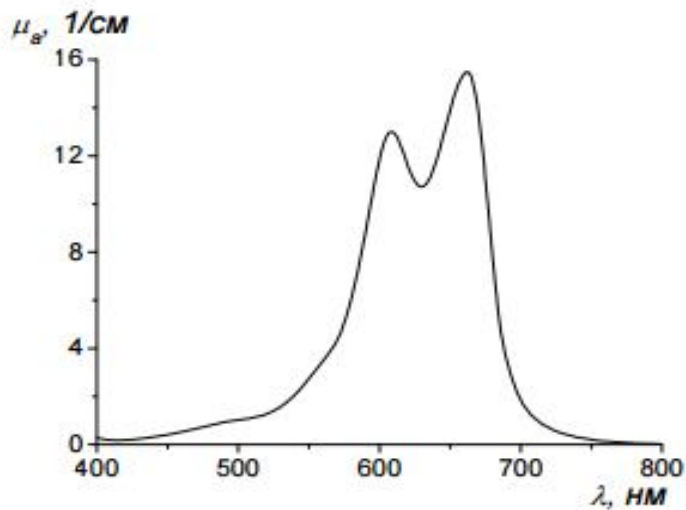


Рис. 4. Залежність коефіцієнта поглинання від довжини флуоресцентного зонда

Було отримано і проведено порівняльний аналіз флуоресцентних зображень крові здорових людей (рис. 5) та із захворюванням хронічний мієлолейкоз (рис.6).

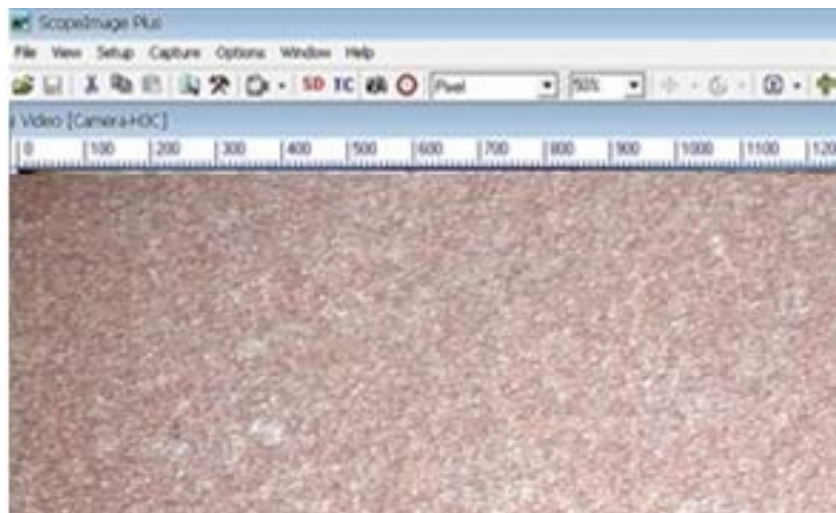
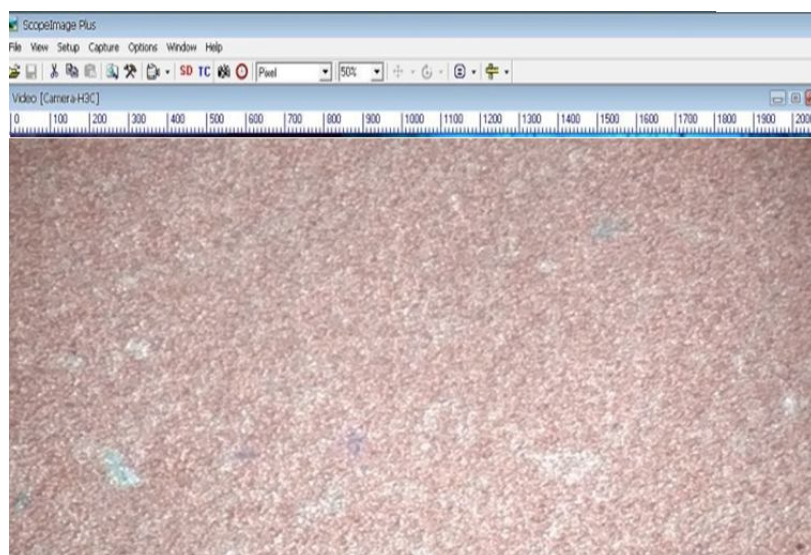
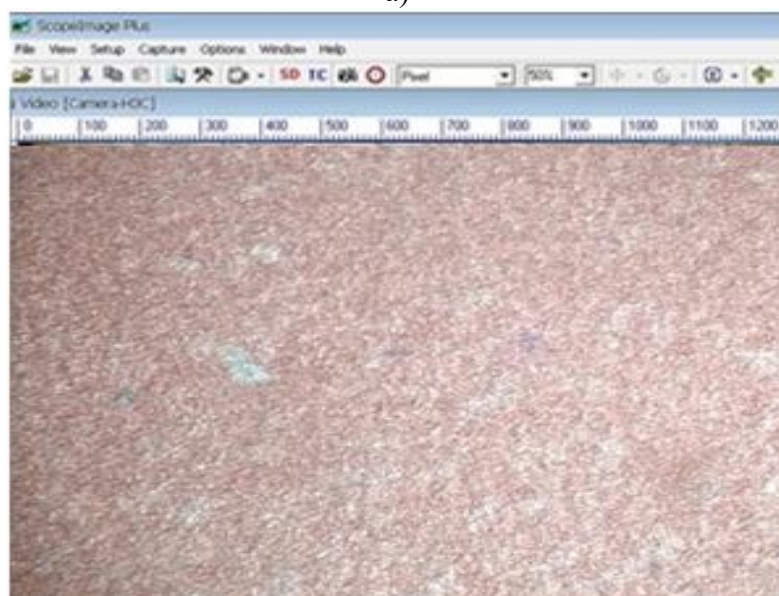


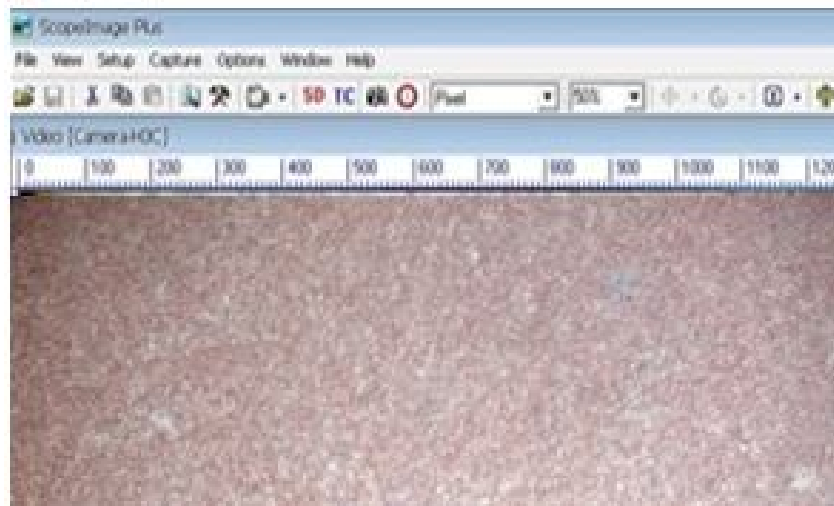
Рис. 5. Флуоресцентне зображення зразків крові здорової людини



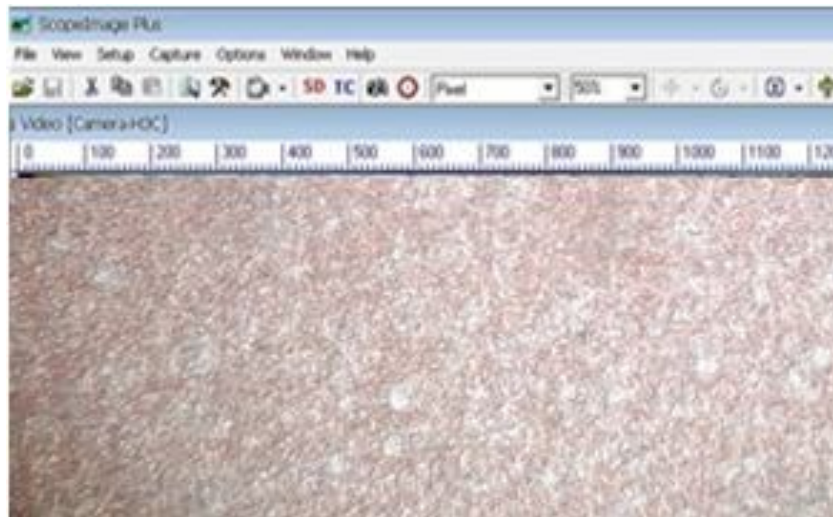
a)



b)



c)



d)

Рис.6. Флуоресцентні зображення зразків крові із захворюванням хронічний мієлолейкоз з додаванням флуоресцентного зонда

Проаналізувавши залежність інтенсивності спектрів флуоресценції клітин крові здорових людей та із захворюванням мієлолейкоз (рис.7) було виявлено, що інтенсивність флуоресценції суттєво зростає при патології.

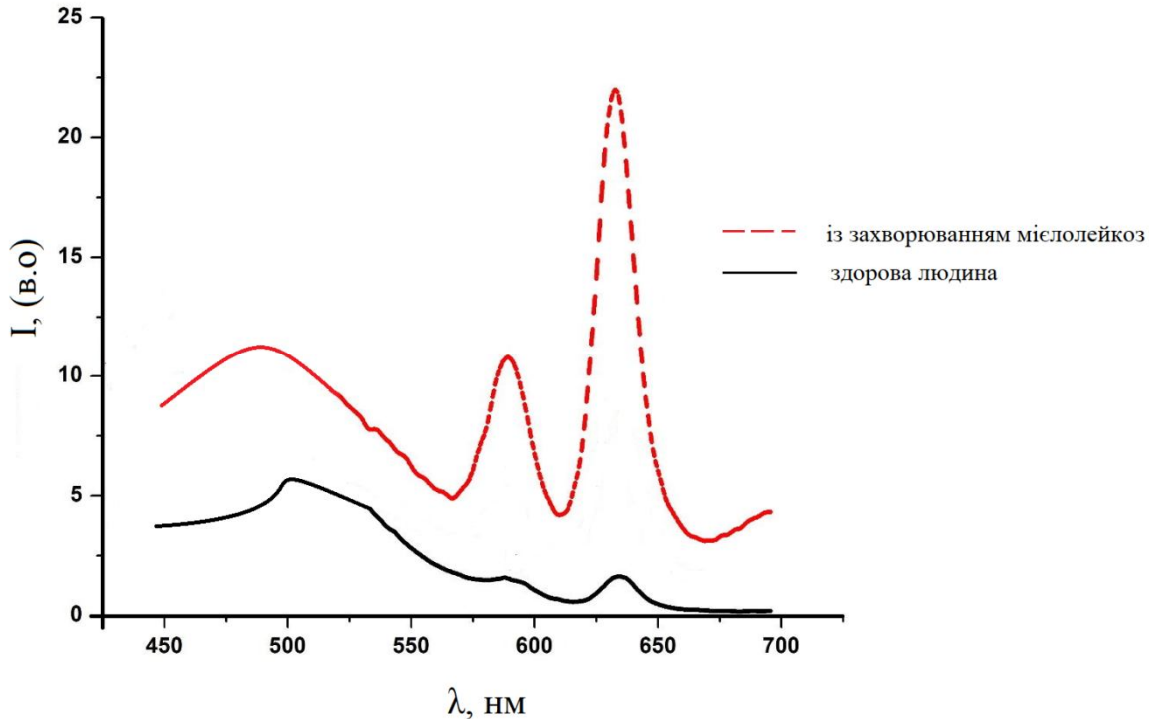


Рис. 7. Спектри флуоресценції клітин крові

**Висновки.** Порівнюючи люмінесцентні зображення клітин крові здорових людей та із захворюванням хронічний мієлолейкоз, було виявлено, що інтенсивність флуоресценції збільшується в 10 разів при захворюванні, що пов'язано зі збільшенням порфіринів у гемоглобіні крові. Метод флуоресцентної мікроскопії має ряд переваг: висока інформативність при невеликій кількості зразка, не вимагає використання дорого вартісного обладнання, ефективність методу зростає при використанні флуоресцентного зонда, який має максимум поглинання на довжині хвилі лазерного джерела випромінювання, може бути використаний для діагностики захворювань крові на ранніх стадіях.

**Конфлікт інтересів і етика.** Автор заявляє про відсутність конфліктів інтересів і повне дотримання всіх правил етики журнальних статей.

**Подяки.** Автор заявляє про відсутність спеціального фінансування цієї роботи.

### Список використаних джерел

1. Павлов С. В., Кожем'яко В. П., Колесник П. Ф., Козловська Т. І., Думенко В. П. Фізичні основи біомедичної оптики. Вінниця: ВНТУ, 2010. 150 с.
2. Wentrup R., Winkelmann N., Mitroshkin A., et. al. Photodynamic therapy plus chemotherapy compared with photodynamic therapy alone in hilar nonresectable cholangiocarcinome. *Gut Liver*. 2016. Vol 10 (3). P. 470-475. DOI: <https://doi.org/10.5009/gnl15175>
3. Kozlovska T. I., Sander S. V., Zlepko S. M., Vasilenko V. B., Pavlov V. S., Klapouschak A. Yu., Dumenko V. P., Maciejewski M., Dzierzak R., Surtel W. Device to determine the level of peripheral blood circulation and saturation. *Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments. - International Society for Optics and Photonics*. 2016. 100312Z-100312Z-6
4. Abugo O. O., Herman P., Lakowicz J. R. Fluorescence properties of albumin blue 633 and 670 in plasma and whole blood. *J. Biomed. Opt.* 2001. Vol. 6, № 3. P. 359-365. DOI: <https://doi.org/10.1117/1.1381053>

5. Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P. M., Leveque-Fort S., D Webb S. E., Davis D. M. Imaging the environment of green fluorescent protein. *Biophys. J.* 2002. Vol. 83. P. 3589-3595. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75359-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75359-9)
6. Gannot I., Garashi A., Gannot G., Chernomordik V., Gandjbakhche A. In vivo quantitative three-dimensional localization of tumor labeled with exogenous specific fluorescence markers. *Appl. Opt.* 2003. Vol. 42 (16). P. 3073-3080. DOI: <https://doi.org/10.1364/AO.42.003073>
7. Думенко В. П. Сучасні лазерні люмінесцентні методи дослідження злоякісних новоутворень в біологічних тканинах. *Сучасні проблеми фізико-математичної освіти і науки: збірник матеріалів конференції* (Київ, 25-26 травня 2017 року). Київ: НПУ ім. М. П. Драгоманова. С. 27-28.
8. Soukos N. S., Som S., Abernethy A. D., Ruggiero K., Lee J. , Dunham C., Doukas A. G., Goodson J. M., Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49. P. 1391-1396. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1391-1396.2005>
9. Schneckenburger H., König K., Dienersberger T., Hahn R. Time-gated microscopic imaging and spectroscopy in medical diagnosis and photobiology. *Opt. Eng.* 1994. Vol. 33. P. 3156-3167. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.177101>

UDC 535.372:611.018.5

## Methods of low-energy induced fluorescence and spectrophotometry for the researching of blood cells

Victoria Dumenko

*Abstract.* The article describes the implementation of the method of low-energy induced fluorescence microscopy using a laser with a wavelength of 635 nm as a source of radiation and the spectrophotometry method for analyzing the absorption spectra of fluorescent probes. The results of theoretical and experimental studies of blood cells of healthy people and chronic myelogenous leukemia by fluorescence microscopy are presented.

*Keywords:* fluorescence, fluorescent probe, low-energy induced fluorescence microscopy, spectrophotometry, blood samples, myeloid leukemia.

### References

1. Pavlov, S. V., Kozhemiako, V. P., Kolesnik, P. F., Kozlovska, T. I., Dumenko, V. P. (2010). *Physical principles of biomedical optics*, VNTU, Vinnytsya. [in Ukrainian]
2. Wentrup, R., Winkelmann, N., Mitroshkin, A., et. al. (2016). Photodynamic therapy plus chemotherapy compared with photodynamic therapy alone in hilar nonresectable cholangiocarcinome, *Gut Liver*, **10** (3), 470-475. <https://doi.org/10.5009/gnl15175>
3. Kozlovska, T. I., Sander, S. V., Zlepko, S. M., Vasilenko, V. B., Pavlov, V. S., Klapouschak, A. Yu., Dumenko, V. P., Maciejewski, M., Dzierzak, R., Surtel, W. (2016). *Device to determine the level of peripheral blood circulation and saturation*, Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments. - International Society for Optics and Photonics. 100312Z-100312Z-6.
4. Abugo, O. O., Herman, P., Lakowicz, J. R. (2001). *Fluorescence properties of albumin blue 633 and 670 in plasma and whole blood*, *J. Biomed. Opt.*, **6** (3), 359-365. <https://doi.org/10.1117/1.1381053>
5. Suhling, K., Siegel, J., Phillips, D., French, P. M., Leveque-Fort, S., D Webb S. E., Davis, D. M. (2002). *Imaging the environment of green fluorescent protein*, *Biophys. J.*, **83**, 3589-3595. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75359-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75359-9)
6. Gannot, I., Garashi, A., Gannot, G., Chernomordik, V., Gandjbakhche, A. (2003). *In vivo quantitative three-dimensional localization of tumor labeled with exogenous specific fluorescence markers*, *Appl. Opt.*, **42** (16), 3073-3080. <https://doi.org/10.1364/AO.42.003073>
7. Dumenko, V. P. (2017). *Modern laser luminescent methods of research of malignant neoplasms in biological tissues*, Modern problems of physical and mathematical education and science: collection of conference materials (Kyiv, May 25-26, 2017), Drahomanov NPU, Kyiv, 27-28. [in Ukrainian]
8. Soukos, N. S., Som, S., Abernethy, A. D., Ruggiero, K., Lee, J., Dunham, C., Doukas, A. G., Goodson, J. M. (2005). *Phototargeting oral black-pigmented bacteria*, *Antimicrob. Agents Chemother*, **49**, 1391-1396. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1391-1396.2005>



9. Schneckenburger, H., König, K., Dienersberger, T., Hahn, R. (1994). *Time-gated microscopic imaging and spectroscopy in medical diagnosis and photobiology*, *Opt. Eng.*, **33**, 3156-3167. <https://doi.org/10.1117/12.177101>

#### **Про авторів / About the authors**

**Вікторія Думенко**, кандидат технічних наук, доцент, кафедра фізики і методики навчання фізики, астрономії, Вінницький державний педагогічний університет імені Михайла Коцюбинського, вул. Острозького, 32, м. Вінниця, 21001, Україна;

**Victoria Dumenko**, Candidate of Science in Engineering, Associate Professor, Department of Physics and Teaching Methods of Physics, Astronomy, Vinnytsia Mykhailo Kotsiubynskyi State Pedagogical University, 32 Ostrozkyi Str., Vinnytsia 21001, Ukraine.

Отримано / Received 15.07.2024  
Доопрацьовано / Revised 17.08.2024