

Весьма эффективный инструмент



Конец прошлого и начало нынешнего века ознаменовалось стремительным ростом числа методов исследования, основанных на регистрации флуоресценции, которые все шире применяют как в фундаментальных работах для получения новых знаний о живом, так и в прикладных — биотехнологии, медицинской диагностике, фармакологии

СТРОГИЕ КРИТЕРИИ

Широкое распространение получило изучение различных биообъектов с помощью так называемых флуоресцентных меток и зондов. В исследовательской практике ковалентно присоединенный к макромолекуле флуоресцирующий компонент принято называть *флуоресцентной меткой*, а свободный флуорофор — *зондом*. Применяемые в микроскопии флуорофоры традиционно именуют *флуоресцентными красителями*. Наконец, флуорофоры, используемые в биологических исследованиях, некоторые авторы стали называть *биосенсорами*.

Для исследования белковых молекул в качестве меток используют большое количество различных флуоресцирующих соединений, среди которых наиболее известными являются 1-анилин-8-нафталинсульфонат-анион, 1-диметиламинонафталин-5-сульфонат-анион, родамин и флуоресцин. Для исследования нуклеиновых кислот в качестве меток чаще всего

применяют акридиновый оранжевый, профлавин, акрифлавин, этидий бромид. Соединение, используемое в качестве флуоресцентной метки, должно удовлетворять следующим критериям: 1) хорошо связываться с определенным участком исследуемой молекулы; 2) его флуоресценция должна быть чувствительна к изменению условий окружения; 3) оно не должно влиять на свойства исследуемой макромолекулы [1].

В исследовательской практике ковалентно присоединенный к макромолекуле флуоресцирующий компонент принято называть флуоресцентной меткой, а свободный флуорофор — зондом

«РЕПОРТАЖИ» ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ

Состояние электронов, участвующих в процессах флуоресценции, зависит как от физических факторов окружающей среды, так и от общей электронной конфигурации молекулы. Именно это обстоятельство и делает флуорофор *молекулярным репортером*, который на языке флуоресценции сообщает о физико-химических условиях своего окружения. Заметим, что перед молекулярным репортером, так же, как и перед газетным, ставятся сходные задачи: проникнуть

туда, куда поручили, и отправит репортаж с места событий. Однако если речь идет о молекулярном репортере, то слово «репортер» следует произносить с ударением на втором слоге.

«Языком», с помощью которого флуоресцентный репортер передает информацию, являются параметры флуоресценции (интенсивность, квантовый выход, анизотропия и др.), чувствительность которых к физическим свойствам микроокружения флуорофоров позволяет характеризовать состояние внутриклеточной среды, например, вязкость цитоплазмы или гидрофобного слоя биомембран, внутреннее содержимое органелл и т.д. Взаимодействие некоторых флуорофоров с биологическими мембранами зависит от разности электрических потенциалов на мембране: с помощью таких репортеров получают сведения о величине мембранного потенциала. Существуют даже репортеры для измерения внутриклеточной температуры!

ВПЕЧАТЛЯЮЩИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью флуоресцентных репортеров была экспериментально доказана модель жидкокристаллической структуры всех биологических мембран. Согласно этой модели при всей ее структурной целостности мембрана достаточно «жидкая», чтобы отдельные ее компоненты могли перемещаться в нужные стороны. Такое представление позволяет понять основные молекулярные механизмы функционирования мембран, а также свойства живых клеток в целом.

Жизнедеятельность клеток обеспечивается совокупностью скоординированных в пространстве и времени биохимических реакций, а за их координацию отвечают так называемые сигнальные системы. Основные компоненты этих систем были изолированы

и охарактеризованы с помощью методов традиционной биохимии и молекулярной биологии. Однако только подходы, основанные на применении флуоресцентных репортеров, показали, где протекают эти пути и как по ним проходят сигналы, благодаря чему стало возможным в реальном времени следить за взаимодействиями сигнальных белков или оценивать динамику экспрессии генов в отдельно взятой клетке. С помощью флуоресцентных репортеров удалось обнаружить и неизвестные ранее сигнальные компоненты, например, выявить роль ионов Ca^{+2} как сигнального посредника во многих регуляторных реакциях.

УДИВИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Другой, не менее важный подход — исследование собственной флуоресценции молекул тех биологических веществ, которые являются природными или естественными флуорофорами, например, белков. Установлено, что собственная флуоресценция белков обусловлена тем, что в составе их молекул содержится три флуоресцирующих вещества — остатки тирозина, триптофана и фенилаланина. Наиболее интенсивной флуоресценцией характеризуются триптофан и тирозин.

Интенсивность и другие параметры флуоресценции остатков аминокислот в значительной степени зависят от микроокружения (типа растворителя, pH раствора, наличия других молекул или соседних групп в составе полипептида), поэтому измерение параметров флуоресценции дает ценную информацию о конформации белковых молекул. Такой подход позволил добиться огромных успехов в изучении структуры и свойств столь сложных объектов. Революционное влияние флуоресцентных

Експерт рослинних ліків



Vishpha
фабрика ліків



Беліса — обирай спокій у будь-якій ситуації!

Беліса — заспокійливий рослинний засіб, який застосовується при нервовому напруженні, неспокої, головних болях, порушеннях сну, легких формах артеріальної гіпертензії

БЕЛІСА

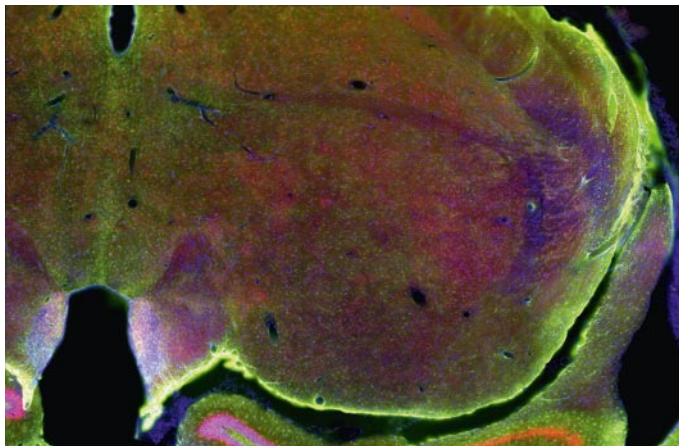
- ЗАСПОКОЮЄ
- НОРМАЛІЗУЄ СОН
- ЗНИЖУЄ ТИСК
- ПОКРАЩУЄ САМОПОЧУТТЯ



Склад: діючі речовини: 1 мл препарату містить водно-спиртового екстракту (1:3) (екстрактент — етанол 40%) із суміші: пасифлори трави (Passiflorae herba) 100 мг; липи квіток (Tiliae flores) 100 мг; материнки трави (Origanii herba) 66,7 мг; шавлії листя (Salviae officinalis folia) 33,3 мг; меліси трави (Melissae herba) 33,3 мг; допоміжні речовини: крім екстрактенту, відсутні.
Лікарська форма. Основні фізико-хімічні властивості: рідина темного червоноувато-оранжевого кольору зі специфічним ароматним запахом; при зберіганні допускається утворення осаду.
Показання. У складі комплексної терапії захворювань нервової системи (неврастенії, головному болю, порушеннях сну, астеничному стані); при артеріальній гіпертензії (легкій та помірній формі).
Спосіб застосування та дози. Перед застосуванням збовтати. Внутрішньо по 10–20 крапель, розводячи невеликою кількістю води (30–50 мл), тричі на добу за 30 хв. до їди або через 1 годину після прийому їжі. Курс лікування залежить від тяжкості перебігу захворювання, а також від характеру супутньої терапії і триває від 14 днів до 1 місяця. У разі необхідності курс терапії можна повторити.
Діти. Белісу не застосовувати дітям віком до 12 років.

Інформація для професійної діяльності медичних та фармацевтичних працівників.

РП МОЗ України №УА/14682/01/01



АКТИВНО РАЗРАБАТЫВАЮТСЯ МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ *IN VIVO* [4]. В ЧАСТНОСТИ, СОЗДАНЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ, КОТОРЫЕ СЕЛЕКТИВНО ОКРАШИВАЮТ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОБРАЗОВАНИЯ И ПОМОГАЮТ ВЫЯВЛЯТЬ ИХ ВО ВРЕМЯ ЭНДОСКОПИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ИЛИ ТОМОГРАФИИ [5]. ТАКЖЕ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ОКРАСКИ ТКАНЕЙ РАЗРАБОТАНЫ НОВЕЙШИЕ МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

белков на современную биологию и биотехнологию оказало открытие белка, известного в научном мире под названием GFP (от англ. *green fluorescence protein*), или зеленый флуоресцентный белок, выделенный при изучении биолюминесценции медузы *Aequorea victoria*. После открытия GFP начались интенсивные исследования его структуры и был клонирован его ген. Оказалось, что этот ген сравнительно несложно экспрессировать в клетках других организмов. Можно также соединить его с геном другого белка и внедрить этот гибридный ген в клетку — тогда она начнет синтезировать белок с флуоресцентной меткой. Позднее у некоторых морских беспозвоночных (кораллов и полипов) обнаружили аналогичные белки с другими спектрами флуоресценции. Методы молекулярной биологии позволили сконструировать гены, кодирующие модифицированные формы флуоресцентных белков с широким диапазоном спектральных характеристик, а также фоторегулируемые варианты, свечение которых можно включать и выключать с помощью ультрафиолетового излучения.

Созданы целые светящиеся животные (например, свиньи), у которых GFP внесен в геном и передается по наследству. Созданы также GFP-содержащие вирусные векторы, позволяющие локально вводить желаемый ген в организм животного и проследить экспрессируемый белок. За открытие и разработку методов использования зеленого флуоресцентного белка Осаму Симомура, Мартин Чалфи и Роджер Цянь в 2008 г. были удостоены Нобелевской премии по химии.

Сегодня на основе GFP созданы флуоресцентные белки всех цветов радуги с самыми разнообразными свойствами, и постоянно появляются новые.

В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И НЕ ТОЛЬКО

Развитие спектральной и компьютерной техники, а также появление широкого спектра доступных флуоресцирующих молекул и молекулярных комплексов, применяемых в качестве флуоресцентных меток и зондов, обусловили широчайшее использование флуоресцентных методов в фундаментальных исследованиях. В последние годы было разработано несколько новых подходов в области флуоресцентной микроскопии, которые позволили преодолеть дифракционный барьер оптического разрешения и достичь беспрецедентного разрешения ~10 нм. Эти методы стали объединять общим термином «флуоресцентная наноскопия». Можно предвидеть несколько приложений флуоресцентных наноскопических методов в биологии и медицине. Наноскопия позволяет напрямую изучать взаимодействия между белками, ДНК и РНК и, следовательно, может сыграть существенную роль в развитии геномики и протеомики, изучении физиологии клетки,

понимании патофизиологических механизмов, связанных с нарушением образования сложных белковых комплексов, и т.п. [2].

Начиная с середины XX в. аналитические методы, основанные на флуоресценции, широко используются в клинической химии и молекулярной диагностике. В частности, разработаны и внедрены чувствительные методы для быстрого анализа стероидных гормонов, порфиринов, катехоламинов, метаболитов ЛП и других диагностически важных химических веществ в моче и плазме крови [3]. С помощью иммуноферментного анализа с использованием флуорогенных субстратов проводят детекцию биомаркеров различных заболеваний.

Активно разрабатываются методы флуоресцентной диагностики *in vivo* [4]. В частности, созданы флуоресцентные зонды, которые селективно окрашивают злокачественные образования и помогают выявлять их во время эндоскопического обследования или томографии [5]. Также на основе флуоресцентной окраски тканей разработаны новейшие методики проведения хирургических операций для удаления злокачественных опухолей. Перед операцией раковую опухоль селективно окрашивают флуоресцентным красителем. Во время самой операции специальное оборудование регистрирует флуоресцентный сигнал, позволяя хирургу более точно отличать опухоль от здоровой ткани [6]. Конечно, приведенные примеры — лишь небольшая часть подобных подходов.

Таким образом, флуоресцентные методы исследования стали весьма эффективным инструментом как в фундаментальной науке, так и в практической медицине. Тем не менее, как полагают специалисты, работающие в данной области, учитывая возрастающие темпы совершенствования спектральных приборов и компьютерной техники, все увиденное нами в свете флуоресценции до сих пор — это только начало!

Подготовил Руслан Примак, канд. хим. наук

Литература

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
2. Peters R. From fluorescence nanoscopy to nanoscopic medicine // *Nanomedicine*. – 2008. – Vol. 3. – P. 1-4.
3. O'Haver T.C. Development of luminescence spectrometry as an analytical tool // *Journal of Chemical Education*. – 1978. – Vol. 55, No 7. – P. 423-428.
4. Hilderbrand S.A., Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to *in vivo* molecular imaging // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 14. – P. 71-79.
5. Kobayashi H., Ogawa M., Alford R. et al. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging // *Chemical Reviews*. – 2010. – Vol. 110, No 5. – P. 2620-2640.
6. Gioux S., Choi H.S., Frangioni J.V. Image-Guided Surgery using Invisible Near-Infrared Light: Fundamentals of Clinical Translation // *Molecular Imaging*. – 2010. – Vol. 9, No 5. – P. 237-255.