

Fluorescenční spektroskopie v neurovědách

Zdeněk Fišar

Psychiatrická klinika
1. lékařská fakulta UK
Ke Karlovu 11
120 00 Praha 2
tel.: 224965313
e-mail: zfisar@lf1.cuni.cz

publikováno na Internetu v roce 2003
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/Default.htm>

OBSAH

1. PRINCIPY FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE	3
1.1. LUMINISCENCE.....	3
1.2. CHARAKTERISTIKY FLUORESCENCE	6
1.3. ANIZOTROPIE FLUORESCENCE	11
1.4. PŘENOS EXCITAČNÍ ENERGIE	15
1.5. SPEKTROFLUORIMETRIE	16
2. FLUOROFORY V BIOMEDICÍNĚ	18
2.1. VLASTNÍ FLUORESCENCE	18
2.2. NEVLASTNÍ FLUORESCENCE	20
2.2.1. <i>Fluorescenční značky</i>	20
2.2.2. <i>Fluorescenční sondy</i>	22
2.2.3. <i>Fluorescenční indikátory (chemické sondy)</i>	27
2.3. PŘÍKLADY POUŽITÍ	28
2.3.1. <i>Testování životnosti buněk, jejich proliferace a funkcí</i>	28
2.3.2. <i>Studium neurotransmiterových receptorů a iontových kanálů</i>	29
2.3.3. <i>Transdukce signálu</i>	31
2.3.4. <i>Reaktivní kyslík</i>	32
2.3.5. <i>Indikátory pro Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} a jiné kovové ionty</i>	32
2.3.6. <i>Indikátory pH</i>	34
2.3.7. <i>Membránový potenciál</i>	36
2.3.8. <i>Dynamika a uspořádání buněčných membrán</i>	38
3. EXPERIMENTY	42
3.1. POLARITA ROZPOUŠTĚDLA	43
3.2. VAZBA SOND NA BÍLKOVINY	45
3.3. DYNAMICKÝ STAV LIPIDOVÝCH MEMBRÁN	48
3.4. VLASTNÍ FLUORESCENCE BÍLKOVIN	53
3.5. FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ DNA	56
3.6. KALCIUM	59
3.7. MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL	64
3.8. ZMĚNY PH.....	71
3.9. PROPUSTNOST MEMBRÁN	74
3.10. SPECIÁLNÍ EXPERIMENTY	77
3.10.1. <i>Vazebné parametry receptorů</i>	77
3.10.2. <i>Vliv psychotropních látek</i>	82
3.10.3. <i>Vliv podávání antidepresiv</i>	84
LITERATURA.....	88

1. Principy fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech. V biomedicině se jedná především o identifikaci a dělení buněk v průtokové cytometrii, zobrazování buněčných složek ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu, studium změn konformací a dynamiky buněčných systémů, aplikace v různých testech jako je ELISA a další, kdy fluorescenční metody často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče. Tato práce je zaměřena na možnosti použití fluorescenční spektroskopie v lékařském výzkumu, především v oboru neurověd, kdy se využívá 1. závislosti emisních vlastností fluoroforu na prostředí, v němž se nachází; 2. přenosu elektronové excitační energie mezi donorem a fluoreskujícím akceptorem; 3. polarizované fluorescence. V první kapitole je shrnuta základní teorie fluorescence, v druhé kapitole uvádím stručný přehled fluoroforů používaných v biomedicině a třetí část je věnována popisu vybraných experimentů,

1.1. Luminiscence

Definice luminiscence:

1. Luminiscence je přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa v tom případě, má-li toto přebytečné záření konečnou dobu trvání, jež podstatně převyšuje periodu světelných kmitů.
2. Luminiscence je emise světla z nějaké látky a nastává z elektronových excitovaných stavů.

Luminiscence se dělí na:

1. fluorescenci
2. fosforescenci
3. zpožděnou fluorescenci

Definice fluorescence:

1. Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci.
2. Praktické kritérium: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).

Definice fosforescence:

1. Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina jedná se o fosforescenci.
2. Praktické kritérium: fosforescence má delší dobu dohasínání než fluorescence ($\gg 10^{-8}$ s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

Definice zpožděné fluorescence:

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu.

Stokesův zákon:

Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$).

Vavilovovy postuláty:

1. Při stokesovském buzení fotoluminiscence, kdy frekvence excitačního záření (ν_{ex}) je větší nebo rovna frekvenci průsečíku emisního a excitačního pásu, nemůže být energetický výtěžek luminiscence větší než 1.
2. Při antistokesovském buzení, kdy je ν_{ex} menší než frekvence průsečíku emisního a excitačního pásu, energetický výtěžek luminiscence klesá s růstem tohoto rozdílu, a to tím rychleji, čím je nižší teplota.

Většina složitých organických molekul nefluoreskuje; intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly) nazývané **fluorofory** nebo **fluorescenční barviva**. Typické fluorofory jsou např.:

- chinin (tonik)
- fluorescein, rhodamin B (nemrznoucí směsi, fluorescenční značení)
- POPOP (scintilátory)
- akridinová oranž (DNA)
- umbeliferon (ELISA)
- antracén, perylén (znečištění životního prostředí oleji)

Charakteristické je teplotní zhášení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou.

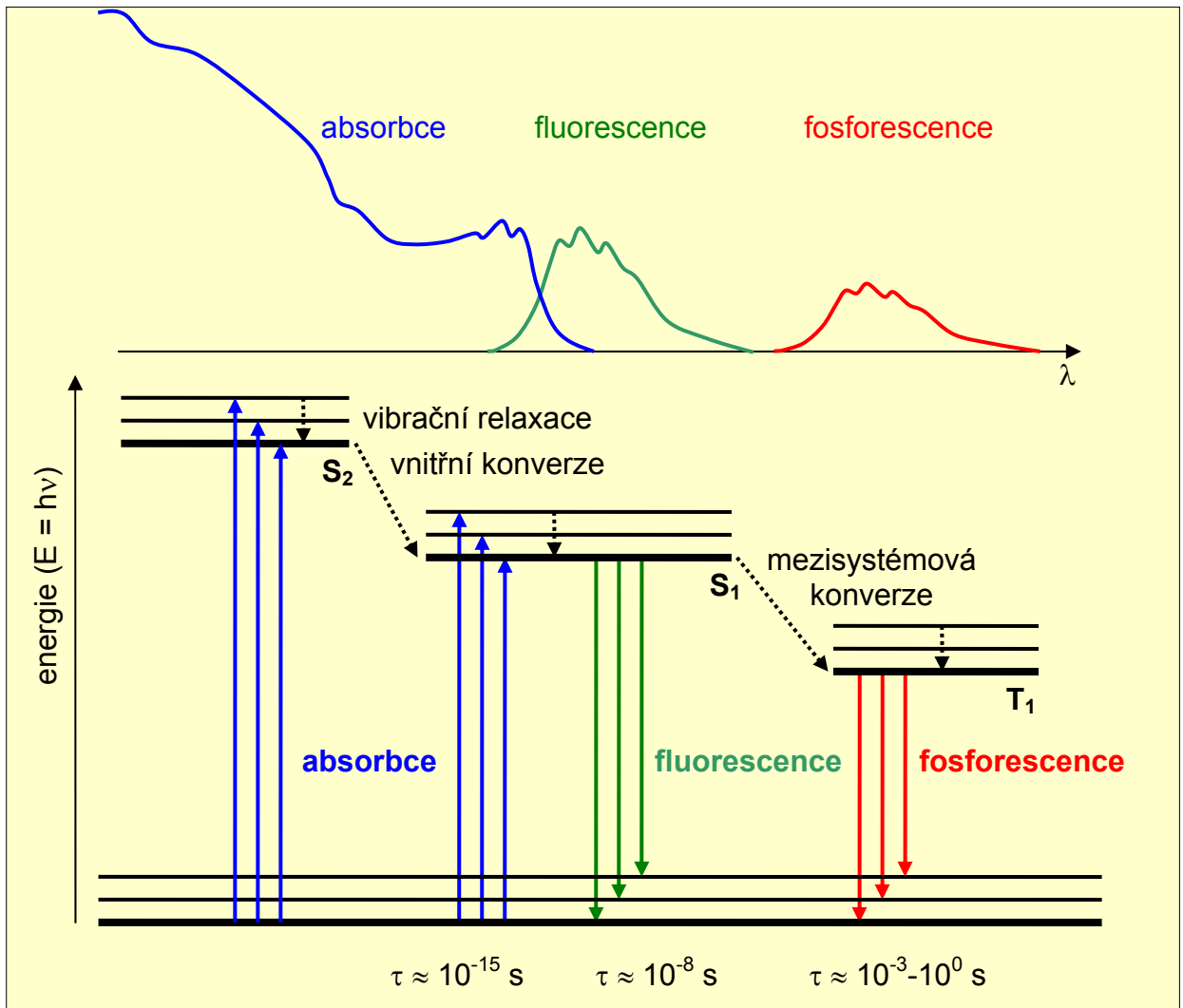
Na Obr. 1.1 je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter (λ - vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1, S_2, \dots a tripletních stavů T_1, T_2, \dots . Molekula obvykle přejde ze rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď **zářivými** přechody (luminiscence; viz zelené a červené šipky) nebo **nezářivými** přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{-12} s.

Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 .

Fosforescence je zářivý přechod z vyššího (T_1) do energeticky nižšího stavu o rozdílné multiplicitě (S_0).

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Doba dohasínání zpožděné fluorescence je přibližně rovna době dohasínání fosforescence měřené za stejných podmínek. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je totožné s emisním spektrem okamžité fluorescence.

Obr. 1.1 Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu).

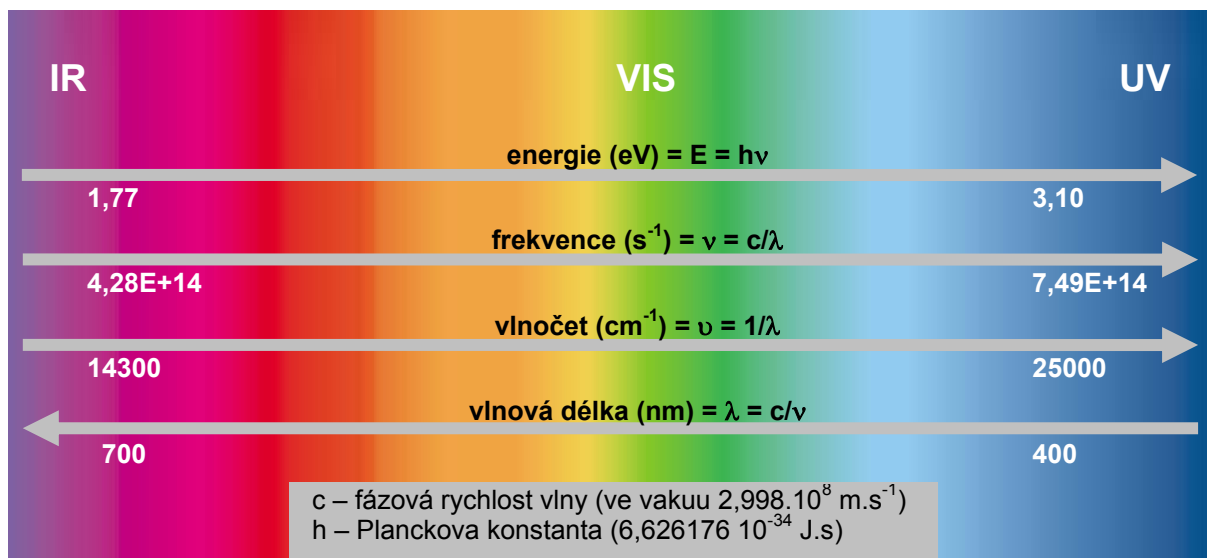


1.2. Charakteristiky fluorescence

Hlavní charakteristiky fluorescence jsou:

1. **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
2. **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
3. **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
4. **doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
5. **koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln

Obr. 1.2 Základní spektrální charakteristiky.



Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření.

Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Kashovo pravidlo:

Před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 .

Vavilovův zákon:

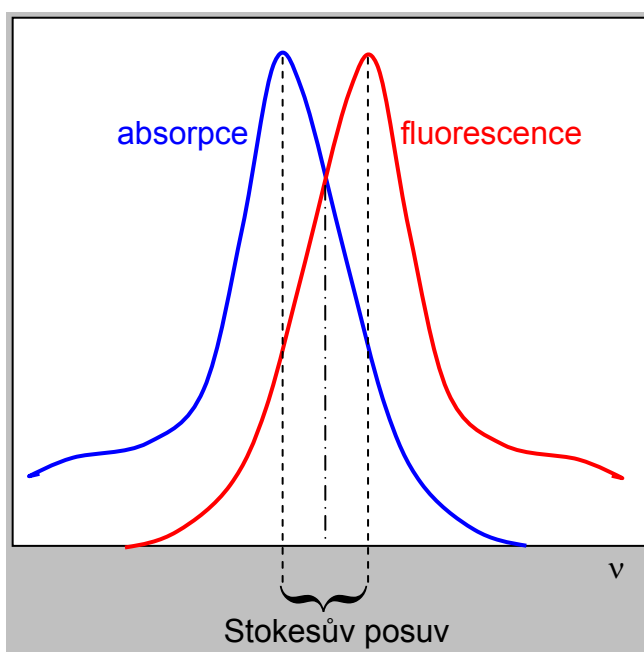
Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence: **Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.**

Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem:

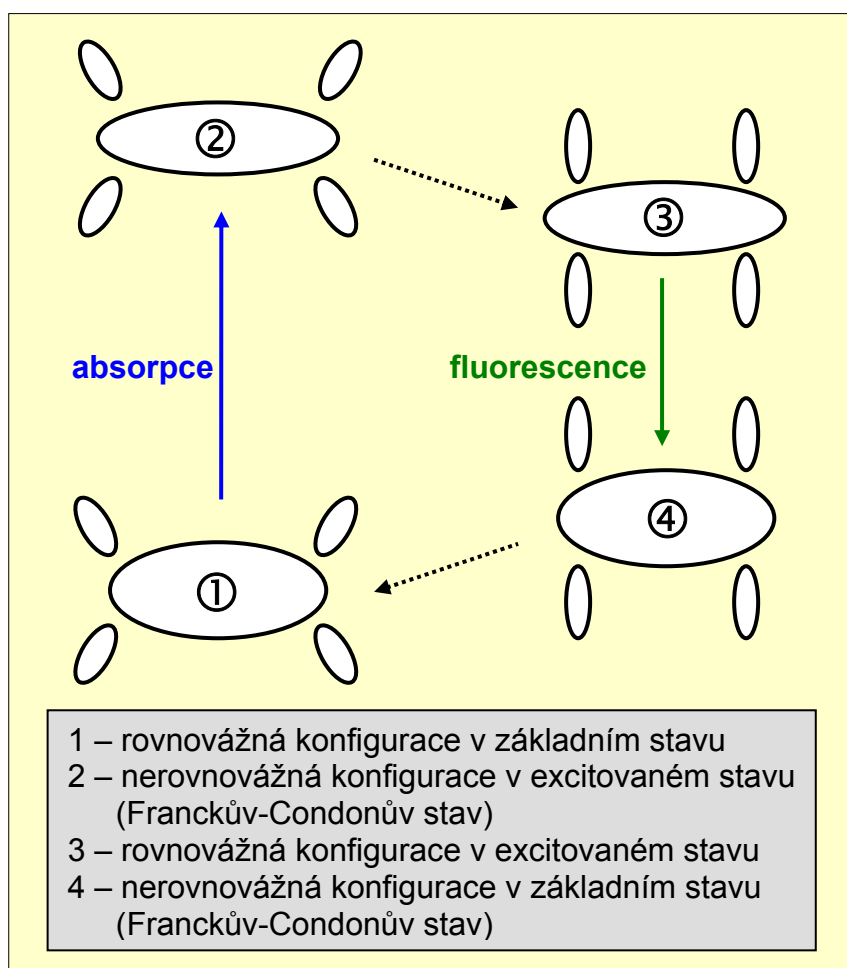
Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem (Obr. 1.3) platí pro velké množství organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 na vyšší vibrační hladinu stavu S_1 , poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 (v čase 10^{-12} - 10^{-13} s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu S_0 a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu S_0 . Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká **Stokesův posuv**. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.

Obr. 1.3 Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního pásu.

**Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra**

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul (Obr. 1.4). Protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnosti, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé solvatace molekul. Doba potřebná pro molekulární relaxace je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu.

Obr. 1.4 Solvatace fluoroforu při absorpci a emisi v roztocích.



Proces fluorescence je cyklický. Pokud není fluorofor nevratně zničen v excitovaném stavu (jev fotovybělování, **fotobleaching**), potom tentýž fluorofor může být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření. To je základ vysoké citlivosti fluorescenčních technik.

Kvantový výtěžek

Definice kvantového výtěžku fluorescence (v ustáleném stavu):

1. **Kvantový výtěžek** je poměr počtu světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu.
2. Nepřímo lze kvantový výtěžek definovat jako poměr pozorované střední doby dohasínání fluorescence (τ) a vnitřní (radiální) doby života excitovaného stavu bez zhašecích mechanismů (τ_0).

Intenzita fluorescence

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence. Jestliže fluorescenci měříme pod „magickými“ úhly $54^\circ 44' 8''$ nebo $125^\circ 15' 51''$ ke směru excitačního paprsku, potom není její intenzita ovlivněna případnou anizotropií emise systému. Při použití citlivých fotonásobičů pro detekci fluorescenčního záření a při buzení intenzivním světlem lze detekovat koncentrace rozpuštěných látek až 10^{-12} mol/l, což je alespoň o 4 řády vyšší citlivost, než pro absorpční měření. Protože kvantový výtěžek fluorescence roztoků složitých molekul je obvykle nezávislý na vlnové délce budícího záření, je excitační

spektrum fluorescence zředěných roztoků přesnou replikou jejich absorpčního spektra a lze tak spektrofluorimetricky získat absorpční spektrum fluoreskující látky při daleko nižších koncentracích, než při přímém měření absorpce na spektrofotometru.

Efekt vnitřního filtru je chyba vznikající při měření intenzity fluorescence v důsledku skutečnosti, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část budícího záření je absorbována povrchovými vrstvami. Tato chyba se projevuje jen u silněji absorbujících roztoků, ale při přesném měření kvantových výtěžků je nutno ji vždy uvažovat a korigovat.

Doba života excitovaného stavu

Doba života excitovaného stavu (τ) je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Obecně je doba života fluorescence kolem 10^{-8} s. Při jednoduchém exponenciálním dohasínání se 63% molekul vrátí do základního stavu v čase $t < \tau$ a 37% v čase $t > \tau$. Doba života fluoroforu za nepřítomnosti neradiačních zhášecích procesů se nazývá **vnitřní** (též přirozená, radiační) doba života (τ_n). Vnitřní dobu života lze v principu spočítat z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a fluorescenčního spektra. Za určitých podmínek lze vnitřní dobu života spočítat také jako poměr změřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence.

Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů. **Srážkové (dynamické) zhášení** nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od **statického zhášení**, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří nefluorescenční komplex. **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké denzitě značení.

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno Sternovou-Volmerovou rovnicí:

$$(1.1) \quad \Phi_0/\Phi = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

kde je Φ_0 – kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla, Φ – totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci C_q , τ_0 – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla, τ – doba dohasínání v přítomnosti zhášedla, k_q – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

Nejčastějším zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární **kyslík** (O_2). Dále fluorescenci zhášejí (v důsledku mezisystémové konverze) atomy halogenů jako je **bróm** a **jód**.

Fotovybělování (photobleaching) je jev odlišný od zhášení fluorescence, neboť při něm dochází k nevratné destrukci excitovaného fluoroforu. Tento jev často omezuje možnost použití intenzivnějšího buzení fluorescence.

Excimerová luminiscence

Excimer je excitovaný dimer; v případě dvou různých molekul se jedná o exiplex.

Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k větším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul. Objevuje se někdy spolu s koncentračním zhášením.

Polarizovaná fluorescence

Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace (**fotoselekce**). Je-li průměrná rotační relaxační doba (charakterizující rotační difúzi v roztocích) mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom také výsledná fluorescence bude polarizována. Bude-li naopak průměrná rotační relaxační doba mnohem kratší než doba dohasínání fluorescence, potom anizotropie systému klesne ještě před emisí na limitní hodnotu (v izotropním systému o malé viskozitě až na nulu). Pokud jsou doba dohasínání fluorescence a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází. Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je moduluje, např.:

- fluidita membrán
- interakce ligand-receptor
- proteolýza
- interakce protein-DNA
- kontrakce svalů
- aktivita proteinkináz

Ustálená a časově rozlišená fluorescence

Parametry fluorescence lze měřit buď v ustáleném stavu, nebo s časovým rozlišením jejich průběhu. **Ustálená fluorescence** se měří při buzení kontinuálním zářením a dostáváme potom časovou střední hodnotu intenzity či polarizace fluorescence. **Časově rozlišená fluorescence** se měří pomocí pulzní excitace (délka pulzu je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku) nebo fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů, především anizotropie fluorescence.

1.3. Anizotropie fluorescence

Veličiny charakterizující polarizaci fluorescence:

1. Stupeň polarizace

$$(1.2) \quad p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

kde I_{\parallel} a I_{\perp} jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé ke směru polarizace budícího záření.

2. Anizotropie fluorescence

$$(1.3) \quad r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$$

3. Depolarizační faktor

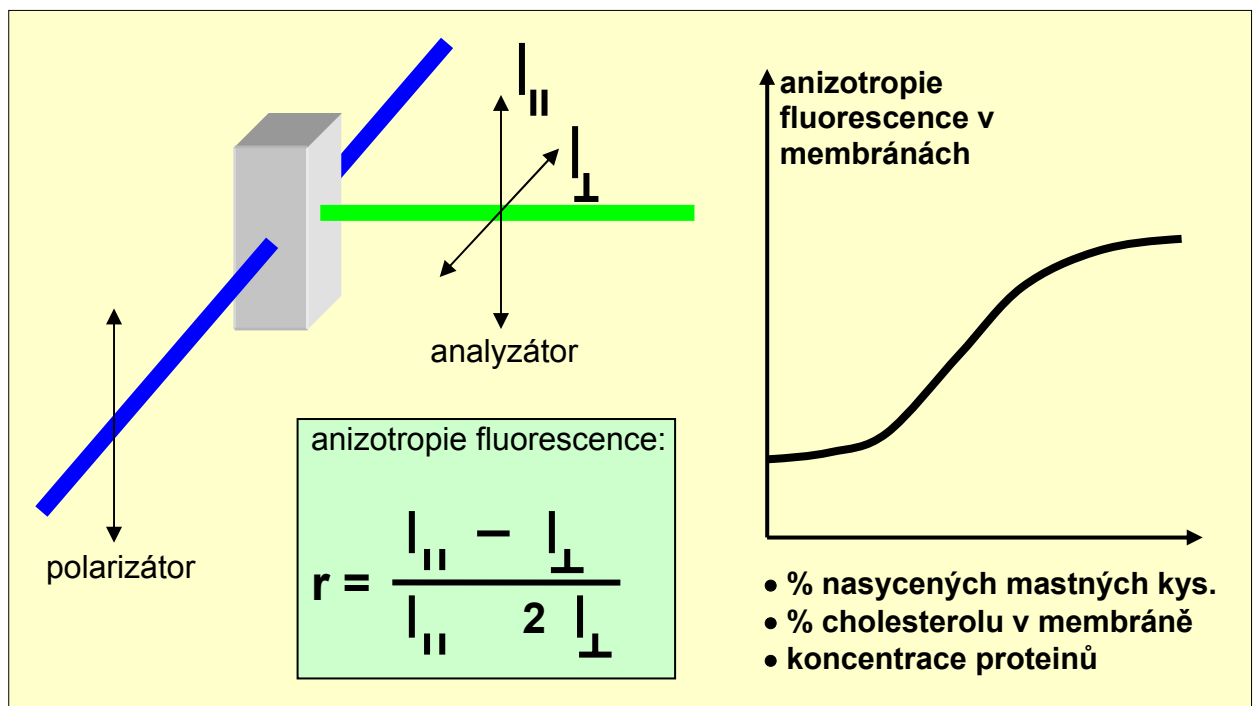
$$(1.4) \quad \delta = I_{\perp} / I_{\parallel}$$

Uvedené veličiny lze mezi sebou převádět:

$$(1.5) \quad r = 2 p / (3 - p) = (1 - \delta) / (1 + 2 \delta)$$

$$(1.6) \quad p = 3 r / (2 + r) = (1 - \delta) / (1 + \delta)$$

Obr. 1.5 Uspořádání při měření polarizované fluorescence.



Z teorie depolarizace fluorescence vyplývá, že intenzita fluorescence pozorovaná pomocí analyzátoru, který je otočen o úhel α od směru rovnoběžné polarizace je

$$(1.7) \quad I_{\alpha}(t) = \cos^2 \alpha I_{\parallel}(t) + \sin^2 \alpha I_{\perp}(t)$$

a pro časovou závislost anizotropie platí

$$(1.8) \quad r(t) = (3 \cos^2 \gamma(t) - 1)/5$$

kde γ je úhel dipólové reorientace v čase od 0 do t .

Ze vztahu (1.7) vyplývá, že bude-li analyzátor otočen o „magický“ úhel $54,74^{\circ}$ ($=54^{\circ}44'8''$), potom je

$$(1.9) \quad I_{54,7}(t) = I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)$$

V roztocích, kde je doba dohasínání fluorescence srovnatelná s rotační relaxační dobou je nutno měřit celkovou intenzitu fluorescence pomocí analyzátoru otočeného o $54,7^{\circ}$, čímž se získají hodnoty dohasínání fluorescence neovlivněné molekulárními rotacemi.

Ze vztahu (1.8) plyne, že za nepřítomnosti depolarizace (např. ve zředěných zmrzlých roztocích za nepřítomnosti depolarizačních mechanismů a za předpokladu, že jsou přechodové momenty absorpce a emise rovnoběžné) je mezní hodnota anizotropie fluorescence buzené polarizovaným zářením dána pouze fotoselekcí

$$(1.10) \quad r_0 = 2/5$$

a mezní hodnota stupně polarizace

$$(1.11) \quad p_0 = 1/2$$

Rozptýlené světlo je zcela polarizováno ($r = 1$).

Mezi hodnotami polarizace fluorescence buzené nepolarizovaným zářením (p_{nepol}) a polarizovaným zářením (p_{pol}) platí vztah

$$(1.12) \quad p_{\text{nepol}} = p_{\text{pol}}/(2 - p_{\text{pol}})$$

Polarizační spektra

Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.

Za předpokladu, že přechodové momenty absorpce a emise nejsou rovnoběžné, ale svírají úhel β , je mezní hodnota stupně polarizace fluorescence buzené polarizovaným zářením snížena dle vztahu

$$(1.13) \quad p_0 = (3 \cos^2 \beta - 1)/(\cos^2 \beta + 3)$$

Zobecněný vztah (1.8) pro časovou závislost anizotropie potom je

$$(1.14) \quad r(t) = (3 \cos^2\beta - 1)(3 \cos^2\gamma(t) - 1)/5$$

kde je β pevný úhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem a $\gamma(t)$ je úhel, o který se natočí emisní dipól za dobu od 0 do t .

Měřením stupně polarizace excitačních spekter potom umožňuje oddělit překrývající se absorpční pásy, které odpovídají různým elektronovým přechodům s různými úhly β .

Perrinovy rovnice (pro sférické částice)

V případě kulovité částice, kdy depolarizační rotace jsou symetrické a izotropní, má časová závislost anizotropie fluorescence fluoroforu exponenciální průběh

$$(1.15) \quad r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_r)$$

kde τ_r je **rotační korelační čas** ($\tau_r = 1/6D_r$) zavedený pomocí **rotační difúzní konstanty** D_r , pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah

$$(1.16) \quad D_r = kT/6V\eta$$

kde je V – objem částice, η – viskozita prostředí, k – Boltzmannova konstanta ($=1,380662 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T – absolutní teplota.

Při měření ustálené fluorescence (buzení kontinuálním zářením) měříme časovou střední hodnotu anizotropie

$$(1.17) \quad r = r_0 (1 + (\tau/\tau_r))^{-1}$$

kde je r_0 – mezní hodnota anizotropie, τ - doba života fluorescence, τ_r - rotační korelační čas. Tato **Perrinova rovnice** se používá v různých formách, např. s použitím rovnice (1.16)

$$(1.18) \quad r_0/r = 1 + \tau/\tau_r = 1 + 6D_r\tau = 1 + kT\tau/V\eta$$

Časově rozlišená anizotropie fluorescence

Měření časově rozlišené anizotropie fluorescence při pulzním buzení poskytuje mnohem více informací o rotačních pohybech fluoroforu, než ustálená fluorescence. Ustálená fluorescence poskytuje zprůměrované hodnoty měřených parametrů a pro jejich interpretaci je nutno provádět řadu měření při různých teplotách; oproti tomu metodou časově rozlišené polarizace fluorescence získáme potřebné údaje již z měření při konstantní teplotě.

Při použití metody časově rozlišené anizotropie fluorescence se měří časově závislé složky intenzity $I_{||}(t)$ a $I_{\perp}(t)$. Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ přitom nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^\circ$ (viz výše).

Časový průběh anizotropie fluorescence $r(t)$ je v těchto experimentech (pulzní buzení) závislý pouze na rotačním pohybu fluoroforu. Lze získat informace o velikosti, tvaru a ohebnosti částice. Pro sférické částice dohasíná anizotropie exponenciálně

$$(1.19) \quad r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_r)$$

kde je r_0 – hodnota anizotropie v čase nula, τ_r - rotační korelační čas pro tuhou kouli. Pro asymetrické nebo flexibilní fluorofory je analýza dohasínání anizotropie fluorescence složitější a je popsána v literatuře uvedené v sekci Odkazy.

1.4. Přenos excitační energie

Přenos elektronové energie se uskutečňuje mechanismy zářivými nebo nezářivými.

K **zářivému (triviálnímu) přenosu** energie dochází, když excitovaná molekula donoru emituje záření, které je následně reabsorbováno molekulou akceptoru.

K excitaci **nezářivým přenosem** energie (**fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET**) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které v budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie tedy nedochází k emisi světla donorem.

Rezonanční přenos energie lze charakterizovat rychlostní konstantou (k_{DA}), která vyjadřuje pravděpodobnost přenosu; určující složkou je dipól-dipólový přenos energie, pro nějž byl odvozen Försterův vzorec (v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra) např. v této formě

$$(1.20) \quad k_{DA} = (1/\tau_D) (R_0/R_{DA})^6$$

kde je τ_D – doba dohasínání fluorescence donoru, R_0 – vzdálenost ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly, R_{DA} – vzdálenost mezi donorem a akceptorem. Rezonanční přenos energie je tedy silně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru.

1.5. Spektrofluorimetrie

Přístroje založené na měření fluorescence jsou čtverého typu:

1. **spektrofluorimetrie** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
2. **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
3. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
4. **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací

Existují však i další přístroje, které jako detekci používají fluorescenci.

Spektrofluorimetrie mají zdroj budícího záření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Pro měření ustálené fluorescence se běžně používají vysokotlaké výbojky, přístroje pro měření časově rozlišené fluorescence využívají jako zdroj budícího záření obvykle pulzní laser. Budící záření prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek (obvykle temperovaná kyveta s roztokem). Nejčastěji ve směru kolmém k budícímu paprsku se měří emitované fluorescenční záření, které nejprve prochází emisním monochromátorem a je detekováno pomocí fotonásobiče. Používá se uspořádání s jedním emisním monochromátorem (uspořádání „L“) nebo se dvěma protilehlými emisními monochromátory (uspořádání „T“). Při měření polarizované fluorescence jsou za excitační monochromátor a před emisní monochromátor zařazeny polarizátory, které jsou otočné kolem osy paprsku jimi procházejícího.

Při měření **emisních** spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření **excitačních** spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují ještě šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření.

Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie** fluorescence se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / (I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V)$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H / I_{\parallel}^H$. U fluoroforů s dlouhou dobou života v roztocích o malé viskozitě je faktor G při měření excitačního spektra konstantní.

Pro analýzu neznámých vzorků nebo směsí fluoroforů se používá měření **úplné fluorescence** (též **excitačně emisní matice**, **maticové skenování**). Excitačně emisní matice vzniká spojením excitačního a emisního spektra směsi fluoroforů do trojrozměrného obrazu, kde je na jedné ose excitační vlnová délka, na druhé ose je emisní vlnová délka a na svislé ose je vynesena intenzita fluorescence.

Synchronní luminiscence může být vhodná pro analýzu směsí látek; tato metoda je založena na současném běhu obou monochromátorů, přičemž je nastaven konstantní rozdíl vlnových délek mezi excitačním a emitovaným zářením (synchronní excitace) – výsledkem je konvoluce emisního a excitačního spektra.

Metody měření relaxačních časů

Pro měření časově rozlišené fluorescence se používají jednak pulzní metody, jednak metoda fázového posuvu. Pulzní metody používají k excitaci fluoroforu pulzní lasery nebo výbojky a fluorescence se detekuje ve známých časových úsecích od krátkodobé excitace. Metoda fázového posuvu používá k buzení fluorescence modulované světlo a měří se fázový posuv fluorescence vůči excitačnímu záření. Pro měření v dohasínání pikosekundovém oboru se používají další speciální metody, zde neuváděné.

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je technika při níž jsou měřeny spontánní fluktuace intenzity fluorescence v mikroskopickém objemu (kolem 10^{-15} l) určeném fokusovaným excitačním laserovým paprskem. Malé, rychle difundující fluorofory způsobují rychlé fluktuace intenzity fluorescence – oproti konvenční fluorimetrii nedochází ke způměrování těchto difúzně závislých fluktuací. Časová závislost intenzity fluorescence je potom analyzována pomocí dočasné autokorelační funkce, která obsahuje informaci o rovnovážných koncentracích, reakčních kinetikách a difúzních rychlostech molekul ve vzorku. Mezi aplikace fluorescenční korelační spektroskopie patří:

- fragmentace nukleových kyselin
- hybridizace nukleových kyselin
- tvorba produktů PCR
- laterální oddělení lipidů v dvojvrstvách
- difúze molekul v jádře a cytoplazmě
- interakce protein-protein
- vazebná rovnováha pro léčiva a jiné ligandy
- shlukování (clustering) membránových receptorů

2. Fluorofory v biomedicíně

Fluorofory se dělí do dvou obecných tříd:

- **vnitřní (vlastní, intrinsic)** – vyskytují se přirozeně
- **vnější (nevlastní, extrinsic)** – jsou přidány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti

2.1. Vlastní fluorescence

Vlastní fluorescence buněk je dána především těmito složkami:

- **proteiny** – fluorescence v ultrafialové oblasti
- **reduované formy nikotinamadendinukleotidu (NADH), nikotinamadendinukleotid fosfátu (NADPH), oxidované formy flavoproteinů, vitamin A** – fluorescence ve viditelné oblasti (modrá až žlutá)
- **cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin, chlorofyl** – fluorescence ve viditelné oblasti (červená)

Fluorescence proteinů

V proteinech jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny **tryptofan** (Try), **tyrozin** (Tyr) a **fenylalanin** (Phe). Jejich absorpční pás leží mezi 240 a 300 nm, emise je rovněž v ultrafialové oblasti (Tabulka 2.1). Dominantním fluoroforem je tryptofan, resp. jeho indolová skupina, neboť má mnohem širší emisní spektrum než tyrozin, jehož fluorescenci umožňuje jeho fenolový kruh. Fenylalanin se na celkové fluorescenci bílkovin prakticky nepodílí.

Fluorescence tryptofanu je velmi citlivá na vlastnosti jeho okolí a lze ji proto použít pro sledování konformačních změn proteinů (např. při vazbě ligandů nebo při interakcích protein-protein).

Tabulka 2.1 Fluorescenční parametry tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtěžek	doba života (ns)
tryptofan	295	353	0,13	3,1
tyrozin	275	304	0,14	3,6
fenylalanin	260	282	0,02	6,8

(Podle: Lakowicz 1999.)

Existuje několik tříd proteinů, které mají vlastní fluorescenci při delších vlnových délkách:

- **fykobiliproteiny** (z cyanobakterií a modro-zelených a červených řas), které absorbují od 470 do 650 nm (tj. v oblasti, kde neabsorbuje chlorofyl); jako fluorofory mají řadu výhod:
 - intenzivní dlouhovlnná excitace a emise (neinterferují s vlastní fluorescencí jiných biologických molekul)
 - relativně velký Stokesův posuv a vysoký kvantový výtěžek emise
 - fluorescence není zhasena vnějšími zhasedly
 - vysoká rozpustnost ve vodě
 - homogenní struktura s definovanou molekulovou hmotností
 - vícero míst pro stabilní konjugaci s mnoha biologickými i syntetickými látkami

- **zelený fluorescentní protein** (green fluorescent protein, GFP) z bioluminiscentní medúzy
- **fytofluory** – fluorescenční sondy odvozené od fytochromů (proteinů citlivých na světlo, které jsou přítomny ve fotosyntetizujících organismech)

Fluorescence enzymových kofaktorů

- **NADH** silně fluoreskuje ($\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} \cong 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} \cong 460 \text{ nm}$), zatímco jeho oxidovaná forma NAD^+ nikoli; fluoreskující skupinou je redukovaný nikotinamidový kruh. Po vazbě NADH k proteinům se jeho fluorescence obvykle několikanásobně zvyšuje (ale může se i snížit), zřejmě v závislosti na omezení kontaktu fluoreskující nikotinamidové skupiny a adeninu, který fluorescenci částečně zhasí.
- **Pyridoxal fosfát** je rovněž fluorofor; jeho fluorescenční parametry závisí na jeho chemické struktuře v proteinu.
- **Flavin adenin dinukleotid (FAD)**, **riboflavin** a **flavin mononukleotid (FMN)** absorbují kolem 450 nm a emitují kolem 525 nm. Fluorescence flavinu je zhasena adeninem. Fluorescenční vlastnosti mají oxidované formy flavinů, nikoli redukované, jako je tomu u NADPH.

2.2. Nevlastní fluorescence

Vnější, neboli nevlastní fluorofory se používají mnohem více než vnitřní. Přidávají se ke studovanému vzorku a pokud se na něj váží kovalentně, nazývají se **fluorescenční značky**, pokud se váží nekovalentně jedná se **fluorescenční sondy**.

Nevlastní fluorofory lze dělit do dvou skupin:

1. látky, jejichž kvantový výtěžek fluorescence se nemění po jejich zavedení do biologického systému - jedná se o fluorescenční barviva používaná v klasické fluorescenční cytochemii (např. fluorescein, akridinová oranž, eozin, ...)
2. látky, jejichž kvantový výtěžek fluorescence se silně mění při vazbě na buněčné struktury a závisí na bezprostředním okolí fluoroforu (např. 1-anilinonaftalén-8-sulfonát, 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien, ...)

Kromě požadavku na specifickou vazbu nevlastního fluoroforu k buněčným složkám a citlivosti emise fluoroforu na změny v okolí, je důležité, aby zavedením fluoroforu do bílkovin, nukleových kyselin, membrán apod. nedošlo k narušení funkce těchto biologických systémů.

2.2.1. Fluorescenční značky

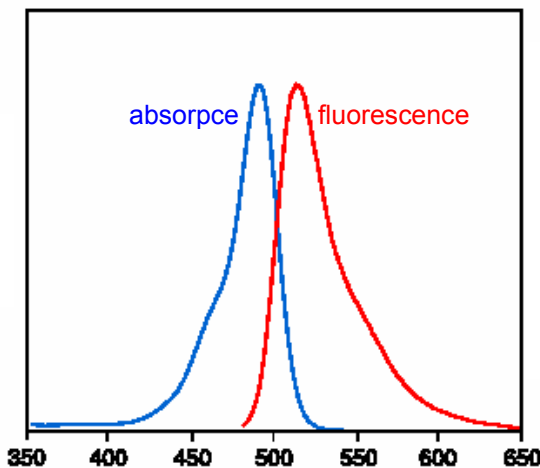
Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. Různé aplikace v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii apod. využívají také vysokou afinitu a specifitu interakcí avidin-biotin a protilátka-hapten, kdy je studovaná molekula (protilátka, lektin, léčivo, polynukleotid, polysacharid, receptor) označena biotinem nebo haptinem a poté detekována fluorescenčně značenou protilátkou k biotinu nebo haptenu.

Mezi významné fluorescenční značky patří:

- fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)
- dansyl chlorid (DNS-Cl; 5-dimethylaminonaftalén-1-sulfonyl chlorid)
- 5-jodoacetamidofluorescein (5-IAF)
- tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát (TRITC)
- 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl; 4-chloro-7-nitrobenzofurazan)
- 6-akryloyl-2-dimethylaminonaftalén (akrylodan)

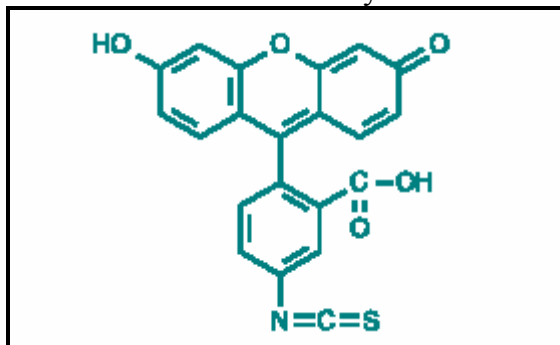
Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou **fluoresceinizothiokyanát** (FITC) a **tetrametylrhodaminizothiokyanát** (TRITC), které se používají v imunofluorescenčních metodách. Jejich fluorescenční parametry jsou uvedeny v tabulce 2.2. **Eosin** (2',4',5',7'-tetrabromofluorescein) a **erytrosin** (2',4',5',7'-tetrajodofluorescein) se obvykle používají jako fosforescenční sondy.

Obr. 2.1 Absorpční a fluorescenční spektrum fluoresceinu (pH 9,0)



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Obr. 2.2 Fluorescein-5-izothiokyanát



Další často používanou fluorescenční značkou je **dansyl chlorid** (DNS-Cl), který stejně jako FITC reaguje s volnými aminoskupinami proteinů. Může být excitován při 350 nm (tj. mimo oblast vlastní absorpce proteinů) a emituje kolem 520 nm, přičemž jeho emisní spektrum je silně závislé na polaritě prostředí.

Nová skupina fluorescenčních značek, jejichž fluorofor obsahuje bór, je zavedena pod značkou **BODIPY**. Jejich výhodou je vysoký kvantový výtěžek fluorescence, možnost použít různé deriváty s emisí v širokém rozsahu 510-675 nm, vysoký extinkční koeficient, nezávislost na polaritě okolí a na pH. Jejich nevýhodou je malý Stokesův posuv. Používají pro značení proteinů, nukleotidů, oligonukleotidů a dextranů, enzymových substrátů, mastných kyselin, fosfolipidů, lipopolysacharidů, receptorových ligandů (viz kap. 3.10.1) a polystyrénových mikrokuliček.

Akrylodan je reaktivní forma prodanu (6-propionyl-2-dimethylaminonaftalenu), jehož fluorescenční vlastnosti jsou vysoce závislé na polaritě okolního prostředí (na rozdíl od FITC, TRITC, BODIPY).

Pro detekci a kvantifikaci nízkomolekulárních aminů (např. řady léčiv) lze použít značky, které fluoreskují poté, co vytvoří konjugát s amino skupinou. Např. **fluorescamin** nebo **NBD chlorid** reagují rychle s aminy a teprve poté fluoreskují.

Tabulka 2.2 Fluorescenční parametry vybraných fluorescenčních značek

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtěžek	doba života (ns)
FITC	492	516-525	0,3-0,85	4,5
TRITC	535-545	570-580		2,0
DNS-Cl	340-350	510-560	0,1-0,3	10-15
NBD	470	550		
Fluorecamin	380	464		
Lucifer Yellow	430	540	0,2	3,3
Eosin	524	544		
Erythrosin	530	555		
Alexa Fluor 350	346	442		
BODIPY FL	505	513		
BODIPY R6G	528	550		
BODIPY TMR	542	574		
BODIPY 576/589	576	590		
BODIPY TR	589	617		

(Podle: 1. Lakowicz 1999; 2. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Další možností je syntéza chemického analogu molekuly, který zachovává chemické vlastnosti původní molekuly, ale na rozdíl od ní vykazuje fluorescenci. Například adenosin trifosfát (ATP) nefluoreskuje, ale jeho analog **etheno-ATP** je fluorofor, i když některé vlastnosti ATP jsou narušeny. Také byly syntetizovány fluorescenční analogy bazí DNA, adeninu (**2-aminopurin**) a guaninu (**izoxantopterin**). Pro studium interakcí steroidů s membránami mohou být využity fluorescenční analogy cholesterolu (**dehydroergosterol**) nebo estradiolu (**azatetrahydrochrysen**). Existují i sondy, které fluoreskují pouze ve viskózním prostředí (např. **9-(2-karboxy-2-cyanovinyl)julolidin, CCVJ**) a mohou být použity pro studium viskozity membrán a rigidity vazebných míst na proteinech.

2.2.2. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Jsou známy tisíce sond, jejichž relativně nejúplnější přehled lze nalézt na webových stránkách firmy [Molecular Probes](#), avšak podrobnější informace jsou dostupné jen v primární literatuře.

Iontové fluorofory, jejichž kvantový výtěžek fluorescence a někdy i spektrální vlastnosti se mění po navázání na bílkoviny, membrány nebo nukleové kyseliny se používají pro studium změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu, viskozity prostředí apod. Vliv okolního prostředí na emisní vlastnosti takových fluoroforů je dán velkým zvýšením jejich dipólového momentu v excitovaném stavu; během doby života excitovaného stavu potom dochází k reorientaci obklopujících je molekul a tím k posuvu fluorescenčního spektra (viz Obr. 1.4).

Fluorescenční sondy pro polaritu prostředí

Typickými sondami pro dynamickou polaritu jsou **1-anilinonaftalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát (TNS)**. Z tabulky 2.3, kde jsou uvedeny fluorescenční parametry ANS v různých rozpouštědlech vyplývá, že s rostoucí polaritou rozpouštědla se emisní maximum fluorescence ANS posouvá do červené oblasti a současně klesá kvantový výtěžek a doba dohasínání. Při vazbě ANS k apomyoglobinu se ANS váže do nepolárního vazebného místa pro hem a λ_{em}^{max} se posouvá na 454 nm a kvantový výtěžek fluorescence vzrůstá na 0,98. Tímto způsobem lze studovat strukturu a stupeň polárnosti různých vazebných míst na proteinech včetně případného vytěsňování fluorescenčních sond z této vazby nebo změny vyvolané např. aktivací enzymu apod. ANS bylo použito např. pro studium polarity vazebného místa pro hem v apomyoglobinu a apohemoglobinu, nebo konformačních změn ve svalech a v nervových zakončeních během akčního potenciálu. TNS bylo využito např. pro studium konformačních změn po aktivaci chymotrypsinogenu a změn konformace nervové membrány. Demonstrační příklady vlivu polarity rozpouštědla na fluorescenci sondy 2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonátu (TNS) a změna fluorescence ANS po vazbě k albuminu jsou uvedeny v kapitolách 3.1 a 3.2.

Tabulka 2.3 Parametry fluorescence sondy 1-anilinonaftalén-8-sulfonátu (ANS) při různé polaritě rozpouštědla

rozpouštědlo	λ_{em}^{max} (nm)	kvantový výtěžek	doba dohasínání (ns)
oktanol	464	0,646	12,3
propanol	466	0,476	10,2
metanol	476	0,216	6,05
voda	515	0,004	0,55

(Podle: Prosser a kol. 1989)

Membránové fluorescenční sondy

Membrány obvykle nemají vlastní fluorescenci a jsou proto značeny sondami, které se vážou v oblasti jejich nepolárních uhlovodíkových řetězců (zbytků mastných kyselin). Pomocí řady fluorescenčních sond jsou studovány především tyto vlastnosti biologických systémů související s buněčnými membránami:

- transport a metabolismus lipidů v živých buňkách
- recyklace synaptosomů
- přenos signálu zprostředkovaný lipidy
- membránový potenciál (viz kapitola 3.7)
- interakce léčiv s membránou (viz kapitola 3.10.2)
- transport membránou
- mikroviskozita membrán a teplotní fázové přechody (viz kapitola 3.3)

Membránové sondy lze rozdělit do dvou skupin:

1. fluorescenční analogy přirozených lipidů (fosfolipidy, sfingolipidy, mastné kyseliny, triglyceridy, steroidy)
2. malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory

ad 1. Důležitou skupinu membránových sond tvoří **lipidové sondy**, jejichž hloubku zanoření do lipidových dvojvrstev lze měnit délkou různých řetězců připojených k fluoroforu (např. různé antroyl mastné kyseliny nebo BODIPY mastné kyseliny). Pyrén připojený k lipidům může být použit pro studium difúzních procesů v membránách na základě měření jeho excimerové

fluorescence. Rovněž připojením fluoresceinu nebo rhodaminu k dlouhým acylovým řetězcům nebo k celým fosfolipidům lze získat vhodné membránové lipidové sondy. Lze shrnout, že:

- Fluoroforem značícím **mastné kyseliny** může být např. nitrobenzoxadiazol (NBD), BODIPY, pyrén nebo dansyl. Přirozeně se vyskytující polynenasycená mastná kyselina **cis-parinaric acid**, jejíž dvojně vazby jsou konjugované, je fluorofor (max. absorpce při 300 a 320 nm, Stokesův posuv kolem 100 nm) vhodný pro řadu měření (peroxidace lipoproteinů, hodnocení antioxidantů, interakce mastná kyselina-protein, fosfolipid-přenašeč, shlukování lipidů, ...).
- **Fosfolipidy** mohou být značeny řadou fluoroforů jak v oblasti polárních hlaviček (dansyl, NBD, BODIPY, fluorescein, tetrametyl-rhodamin, Oregon blue, Oregon green, Texas red a dalšími), tak zbytků mastných kyselin (DPH, NBD, pyrén, BODIPY). Rovněž byly připraveny fluorescenční analogy **sfingolipidů, steroidů, triglyceridů, lipopolysacharidů**.

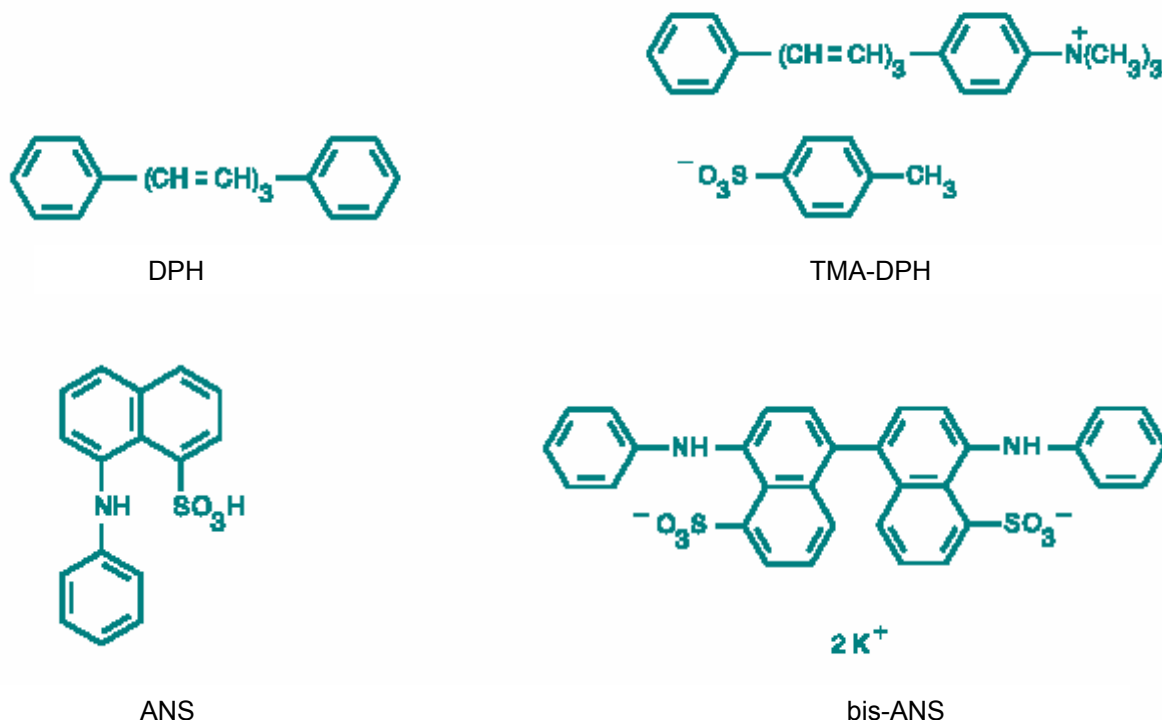
Tabulka 2.4 Vlastnosti některých lipidových sond

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	vlastnosti
Pyrén	340	376	citlivost na zhášení kyslíkem; nefluoreskuje ve vodě; excimerová emise (470 nm) při vysokých koncentracích
DPH	360	430	nefluoreskuje ve vodě; samozhášení při vyšších koncentracích
NBD	470	530	nefluoreskuje ve vodě; samozhášení při vyšších koncentracích
BODIPY FL	507	513	fluoreskuje ve vodě i v membráně; excimerová emise (620 nm) při vysokých koncentracích

(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

ad 2. Malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory podávají informaci o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita a uspořádání lipidů. Pro značení membrán se nejčastěji používá nepolární sonda **DPH** (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), která je ve vodě prakticky nerozpustná, takže veškerá fluorescence pochází z nepolárního prostředí biologických membrán kam se nekovalentně váže. Příklad jejího použití je popsán např. v kap. 3.3. Připojením trimetylamoniové skupiny k molekule DPH byly získána fluorescenční sonda **TMA-DPH** (1-(4-trimetylamoniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien *p*-toluénsulfonát), která je v membránách lokalizována v blízkosti rozhraní membrána-voda. Mezi membránové fluorescenční sondy citlivé na prostředí patří např. **1,8-ANS** (1-anilinaftalén-8-sulfonová kyselina), **bis-ANS** (4,4'-dianilino-1,1'-binaftyl-5,5'-disulfonová kyselina), **2,6-TNS** (2-(*p*-toluidinyl)naftalén-6-sulfonová kyselina), **prodan** (6-propionyl-2-dimetylaminaftalén), **laurdan** (6-dodecanoyl-2-dimetylaminaftalén) a další.

Obr. 2.3 Fluorescenční sondy difenylhexatrien (DPH) a jeho trimetylamoniový derivát (TMA-DPH); 1-anilino-naftalén-8-sulfonová kyselina (ANS) a 4,4'-dianilino-1,1'-binaftyl-5,5'-disulfonová kyselina, dvojdraselná sůl (bis-ANS)



Tabulka 2.5 Některé membránové fluorescenční sondy

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	MW	rozpustné	rozpouštědlo
DPH	350	452	232,32	DMF, MeCN	MeOH
TMA-DHP	355	430	461,62	DMF, DMSO	MeOH
ANS	372	480	299,34	pH>6, DMF	MeOH
bis-ANS	395	500	672,85	pH>6	MeOH
TNS	318	443	335,35	DMF	MeOH
Prodan	361	498	227,31	DMF, MeCN	MeOH
Laurdan	364	497	353,55	DMF, MeCN	MeOH

DMF – dimethylformamid, MeCN – acetonitril, DMSO – dimetylsulfoxid, MeOH – metanol
(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Sondy pro membránový potenciál

Významnou skupinu membránových sond tvoří sondy citlivé na membránový potenciál. Patří se např. merocyanin 540, karbocyaniny (např. 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodid, DiOC₆(3), viz kap. 3.7) a styrylové sondy (kap. 2.3.7).

Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

Nukleotidy a nukleové kyseliny obecně nefluoreskují. Výjimkou je kvasinková tRNA^{PE}, která obsahuje vysoce fluorescentní bázi známou jako Y_T-báze ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} \cong 470$ nm). DNA je tedy jen slabě fluorescentní nebo nefluorescentní. Pro vizualizaci a identifikaci chromozomů se proto používá řada fluorescenčních sond jako jsou **akridinová oranž**, **ethidium bromid**, **propidium**

jodid, Hoechst 33342, 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloride (DAPI) a další. Kromě těchto klasických barviv se používají také **cyaninová barviva** pro stanovení nukleových kyselin v roztocích, gelech a blotech, procházející či neprocházející membránou živých buněk (Tabulka 2.6)

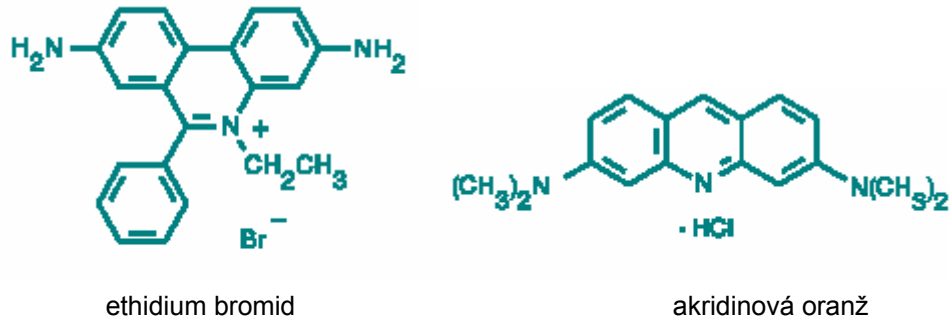
Tabulka 2.6 Některé fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
Propidium jodid	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
DAPI	358	461	částečně prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
Hoechst 33342	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...
PicoGreen	502	523	ultracitlivá kvantifikace roztoků dsDNA
OliGreen	498	518	ultracitlivá kvantifikace roztoků ssDNA a oligonukleotidů
RiboGreen	500	520	ultracitlivá kvantifikace roztoků RNA
TOTO-1	514	533	neprostupuje membránu; vysoká afinita pro nukleové kyseliny
SYTO 85 orange	567	583	prostupuje membránou

(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Po vazbě k dvouřetězcovým nukleovým kyselinám se silně zvyšuje např. kvantový výtěžek fluorescence sondy **2,7-diamino-10-etyl-9-fenylfenanthridium bromid (ethidium bromid, EB)** s $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 605$ nm. Výraznou červenou fluorescenci této sondy vázané do buněčných jader lze velmi dobře pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu i měřit na spektrofluorimetru (viz experiment popsáný v kapitole 3.5). Další často používanou sondou pro stanovení nukleových kyselin je **akridinová oranž**, která v monomerní formě fluoreskuje s $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 530$ nm, v dimerní formě (při vyšších koncentracích) s $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 640$ nm. Zelená monomerová fluorescence pochází z komplexů monomerů s dvouřetězcovými DNA nebo RNA, zatímco oranžová fluorescence pochází od komplexů dimerů sondy s jednořetězcovými nukleovými kyselinami. Spektrální parametr daný poměrem intenzit oranžové a zelené fluorescence (I_{640}/I_{540}) akridinové oranže charakterizuje stupeň spirálnosti nukleových kyselin. Např. ve zralých diferencovaných buňkách lymfocytů z periferní lidské krve je možno zanedbat podíl jednořetězcových DNA na oranžové fluorescenci a parametr I_{640}/I_{540} charakterizuje poměr RNA/DNA v buňkách.

Obr. 2.4 Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny



Fluorescenční sondy pro přenos energie

Pomocí fluorescenčních sond lze studovat přenos energie od absorbujícího donoru k emitujícímu akceptoru, který se nalézá ve vzdálenosti R_{DA} od donoru (viz kapitola 1.4). Lze tak ze změny spekter fluoroforu určovat vzdálenost mezi skupinami (v oblasti 1,5-6,5 nm) a studovat přenos energie v proteinech. Vhodné je pro tato měření použití časově rozlišené fluorescence.

2.2.3. Fluorescenční indikátory (chemické sondy)

Jako **fluorescenční indikátory** jsou označovány fluorofory jejichž spektrální vlastnosti jsou citlivé na určitou látku. V současné době jsou dostupné fluorescenční indikátory pro řadu látek, včetně vápníku, hořčíku, sodíku, chlóru, kyslíku, fosfátu, aminů a pro pH. Obvykle tyto indikátory buď

1. vykazují spektrální posuv v závislosti na přítomnosti dané látky, jejíž koncentrace se potom určuje z poměru intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise,
2. nebo se jedná o indikátory, které vykazují zvýšení intenzity fluorescence v přítomnosti dané látky, aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu.

Příklady:

- ***N*-(etoxykarbonylmetyl)-6- metoxyquinolinium bromid (MQAE)** je srážkovým mechanismem zhášen chlórem a tuto sondu lze tedy použít pro měření změn koncentrací Cl^-
- **PBFI** je fluorescenční indikátor citlivý na draslík
- **Fura-2** je indikátor vykazující spektrální posuv v přítomnosti Ca^{2+}
- **Calcium green** vyazuje zvýšenou intenzitu fluorescence v přítomnosti Ca^{2+} , aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu
- **SNARF-5F** je indikátor pH (viz kap. 3.8)

Pro studium živých buněk jsou užitečné **acetoxymetylové (AM)** a **acetátové estery** fluorescenčních indikátorů, protože zatímco původní indikátor neprochází buněčnou membránou, jeho AM nebo acetátový ester tak snadno činí (nenabitá molekula). Uvnitř buňky vzniká působením nespecifických esteráz původní indikátor. Příkladem je fluorescein diacetát, Quin-2 AM, Fura-2 AM a další.

2.3. Příklady použití

Některé příklady použití fluorescenčních sond a značek byly uvedeny již v předchozí kapitole. V oblasti neurověd se nejčastěji jedná o využití fluorescenční spektroskopie při sledování změn nitrobuněčných iontů a pH, membránového potenciálu, polarity okolí, „fluidity“ membrán, přenosu energie mezi molekulami, sledování enzymových reakcí, analýze DNA a při použití imunochemických (značené protilátky) a radiochemických (scintilační roztoky) metod.

2.3.1. Testování životnosti buněk, jejich proliferace a funkcí

Testování životnosti buněk, jejich proliferace a funkcí (včetně apoptózy, adheze buněk, chemotaxe, multidrug rezistence, endocytózy, sekrece a přenosu signálu) lze provádět pomocí fluorescenčních testů, které jsou mnohem citlivější než testy kolorimetrické a bezpečnější a levnější než testy využívající radionuklidy.

Testování **životnosti** a **cytotoxicity** je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Jako sondy životnosti buněk slouží:

1. Fluorogenní substráty esteráz, které mohou pasivně pronikat do buněk a měří jednak zachování enzymatické aktivity buněčných esteráz, které je převádí na fluoreskující produkt, jednak membránovou integritu, která zajišťuje nitrobuněčnou retenci jejich fluoreskujících produktů. Obecně se postupuje tak, že acetátový nebo acetoxymetylový ester vhodného fluoroforu se rozpustí v DMSO (dimetylsulfoxid) v koncentraci 1-10 mmol/l a poté se přidá k buňkám v konečné koncentraci 1-25 $\mu\text{mol/l}$. Jednou z prvních sond pro toto použití byl **fluorescein diacetát (FDA)**. Mezi nejlepší indikátory životnosti buněk patří **calcein AM** (díky vysokému záchytu v živých buňkách a silné fluorescenci). Dalšími vhodnými indikátory životnosti jsou např. **2',7'-bis-(2-karboxyetyl)-5-(a 6)-karboxyfluorescein, acetoxymetyl ester (BCECF, AM), karboxyeosin diacetát, karboxyfluorescein diacetát, ...**
2. Barviva pro nukleové kyseliny, která neprostupují membrány živých buněk (viz Tab. 2.6) a lze je proto použít pro detekci mrtvých buněk. Mezi takové indikátory patří např. **ethidium bromid, ethidium homodimer-1, propidium jodid, SYTOX Green, cyaninová barviva, jako TOTO**, a další. Používají se často v kombinaci s nitrobuněčnými substráty esteráz, membránově propustnými barvivy nukleových kyselin, sondami citlivými na membránový potenciál, sondami pro orgány nebo indikátory propustnosti membrán.
3. Sondy, které jsou aktivními buňkami oxidovány nebo redukovány a umožňují tak měřit redox potenciál buněk jako znak jejich životnosti; např. **resazurin, tetrazoliové soli**.
4. Sondy citlivé na transmembránový potenciál, pH nebo Ca^{2+} (viz kap. 2.3.5-7).

Tabulka 2.7 Fluorescenční sondy pro měření životnosti buněk

fluorofor	MW	rozpustné	vlastnosti v buňkách	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm) (po reakci, pH 9)
Fluorescein diacetát (FDA)	416,39	DMSO	slabě udržován v buňkách; pH citlivá fluorescence; nenákladný	490/513
Calcein AM	994,87	DMSO	velmi dobře udržován; uvolňován při cytolyze; fluorescence závislá na pH	494/514
BCECF AM	~615	DMSO	velmi dobře udržován; uvolňován při cytolyze; fluorescence závislá na pH	501/527
Karboxyfluorescein diacetát (CFDA)	460,40	DMSO	středně dobře zadržován; fluorescence závislá na pH	492/518
Karboxyfluorescein diacetát, acetoxyethyl ester (CFDA, AM)	532,46	DMSO	snadněji se dostává do buněk než CFDA; středně dobře zadržován; fluorescence závislá na pH	492/518
Chloromethyl SNARF-1, acetát	499,95	DMSO	dobře zadržován reakcí s thioley; neúplně uvolňován při cytolyze; fluorescence dlouhodobá a závislá na pH	576/639

(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Testování **proliferace** buněk je založeno na měření růstové rychlosti buněčné populace nebo na detekci dceřiných buněk v rostoucí populaci. Běžně neexistuje fluorofor, který by se specificky inkorporoval do buněk během dělení. Proliferační testy obvykle určují počet buněk z inkorporace [³H]-thymidinu nebo 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU, thymidinový analog). Fluorescenčně lze měřit např. změny v obsahu nukleových kyselin pomocí fluorescenčních sond (viz kap. 2.2.2) nebo pomocí fluorescenčně značených protilátek (např. anti-BrdU).

Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je geneticky kontrolované odstraňování buněk během vývoje. Apoptóza je odlišná od nekrózy jak biochemickými, tak morfologickými změnami, které ji charakterizují. Fluorescenčně lze apoptózu testovat např.:

- s použitím sond pro nukleové kyseliny
- s použitím konjugátů annexinu V
- měřením aktivity specifických proteáz
- měřením změn mitochondrií, peroxidace lipidů, změn nitrobuněčného pH a iontů

2.3.2. Studium neurotransmiterových receptorů a iontových kanálů

Funkce neurotransmiterových receptorů a iontových kanálů je klíčová v transdukcii nervového signálu studovaného v neurovědách. Existuje řada fluorescenčně značených ligandů (agonistů i antagonistů) pro tyto receptory (Tabulka 2.8) a iontové kanály nebo iontové přenašeče (Tabulka 2.9). Fluoroforem jsou např. fluorescein, tetrametylrhodamin, Alexa Fluor 488, BODIPY FL,

Oregon Green 514, Alexa Fluor 594 a Texas Red, které jsou obvykle fotostabilní a poskytují silnou fluorescenci (Tabulka 2.10). Fluorescenční metody lze při studiu membránových receptorů využít také pomocí imunohistochemických metod (značené protilátky) – viz. kap. 2.2.1.

Tabulka 2.8 Příklady receptorů, k nimž jsou dostupné fluorescenčně značené ligandy

typ receptoru	značený ligand	účinky na receptor
nikotinové acetylcholinové receptory	α-bungarotoxin	antagonista
muskarinové acetylcholinové receptory	pirenzepin	antagonista M ₁
α_1 -adrenoceptory	prazosin	antagonista
β -adrenoceptory	CGP 12177	agonista
GABA _A receptory	muscimol	agonista
neurokininové receptory	látka P, neuromedin C, angiotensin II	agonisté
mí opioidní peptidové receptory	naloxon, naltrexon	antagonisté

Tabulka 2.9 Příklady iontových kanálů, k nimž jsou dostupné fluorescenčně značené ligandy

typ iontového kanálu	značený ligand	účinky na kanál
L-typ Ca ²⁺ kanálů	dihydropyridiny, verapamil	blokáda
Ca ²⁺ kanály necitlivé na IP ₃	ryanodinové sondy	aktivace (ryanodinového receptoru)
Ca ²⁺ kanály	eosinové deriváty	blokáda
napěťově řízené Na ⁺ kanály	tetrodotoxin	blokáda
Na ⁺ /K ⁺ ATPáza	ouabain, dogoxigenin	blokáda
K ⁺ kanály	glibenklamid	blokáda
Cl ⁻ kanály otevírané glutamátem	ivermectin	zvýšená propustnost
transport anionů	stilbene disulfonáty	blokáda

Tabulka 2.10 Fluorofory vázané k ligandům pro receptory a iontové kanály

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	poznámka
Fluorescein	494	518	
Tetrametyrhodamin	553	577	často používaný
Alexa Fluor 488	495	519	fotostabilní; intenzivní fluorescence
Oregon Green 514	512	530	velmi fotostabilní
BODIPY FL	507	513	
Alexa Fluor 594	590	617	vhodné pro kombinaci se zeleně fluoreskujícími značkami
Texas Red	593	613	vhodné pro kombinaci se zeleně fluoreskujícími značkami

(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

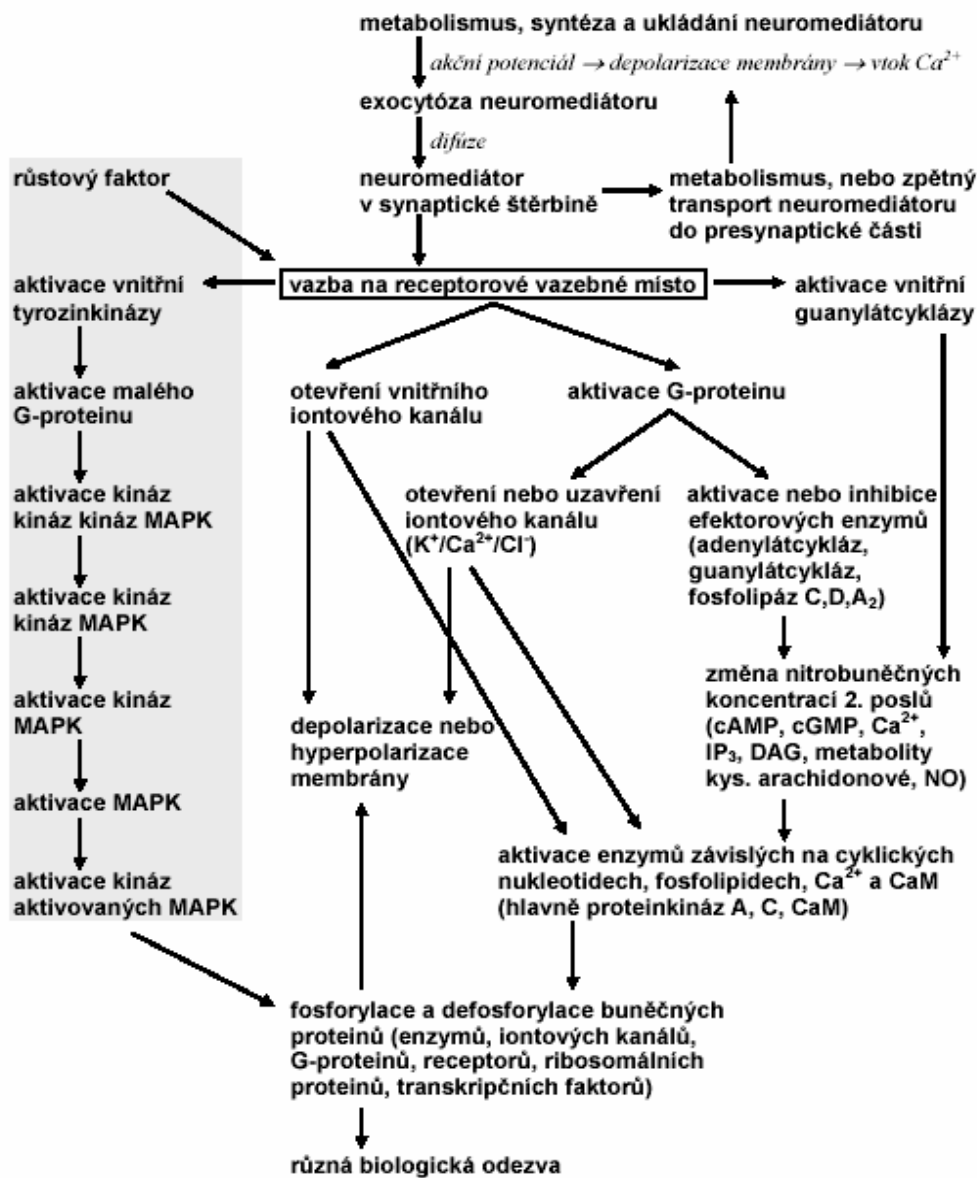
2.3.3. Transdukce signálu

Nitrobuněčným přenosem nervového signálu se rozumí všechny procesy v postsynaptické nebo presynaptické buňce následující po aktivaci membránového receptoru neuromediátorem nebo jiným agonistou. Kaskáda těchto procesů obvykle zahrnuje aktivaci G-proteinů, efektorových enzymů, proteinkináz a fosfatáz a je zakončena změnou membránového potenciálu cílové buňky nebo změnou funkce a aktivity určitých buněčných proteinů (Obr. 2.5).

Vzhledem ke složitosti procesů zapojených do transdukce signálu existuje mnoho možností jak je sledovat pomocí fluorescenčních sond a fluorescenčně značených látek. Pozornost je věnována především

- **regulaci koncentrací nitrobuněčného kalcia**
- **sledování aktivity a inhibice proteinkináz a fosfoproteinfosfatáz**
- **lipidovému metabolismu**

Obr. 2.5 Mezibuněčný a nitrobuněčný přenos signálu



MAPK – proteinkinázy aktivované mitogenem, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, cGMP – cyklický guanosinmonofosfát, IP₃ – inositol-1,4,5-trifosfát, DAG – diacylglycerol, CaM - kalmodulin

2.3.4. Reaktivní kyslík

Existuje řada fluorescenčních sond umožňujících detekovat nebo generovat různé druhy reaktivního kyslíku, včetně singletového kyslíku, superoxidu, hydroxy radikálů a peroxidů (Tabulka 2.11). Tyto formy reaktivního kyslíku jsou fyziologicky produkovány v procesech jako je Alzheimerova choroba, apoptóza nebo fagocytóza a oxidují různé buněčné složky, jako NADH, NADPH, histidin, kyselinu askorbovou, tryptofan, tyrozin, cystein, glutathion, proteiny a nukleové kyseliny, a rovněž cholesterol a nenasycené mastné kyseliny (peroxidace lipidů).

Tabulka 2.11 Druhy reaktivního kyslíku

druh reaktivního kyslíku	struktura	příklady detekčních látek
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	Dihydroxycalcein AM, Dihydrorhodamin 6G, Luminol, Lucigenin
Hydroxylový radikál	HO·	Proxyl fluorescamin, TEMPO-9-AC, CM-H ₂ DCFDA
Kyselina chlorná	HOCl	Dihydrorhodamin 123, Luminol
Oxid dusnatý	NO	DAF-FM, DAA, Luminol
Peroxylový radikál	HOO·	BODIPY FL EDA, Luminol, <i>cis</i> -Parinaric acid
Peroxynitritový anion	ONOO ⁻	H ₂ DCFDA, Coelenterazine, Dihydrorhodamin 123, Luminol
Singletový kyslík	¹ O ₂	<i>trans</i> -1-(2'-metoxyvinyl)pyrén
Superoxidový anion	·O ₂ ⁻	Coelenterazine, Dihydroethidium, Lucigenin, Luminol, TEMPO-9-AC

(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

2.3.5. Indikátory pro Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ a jiné kovové ionty

Fluorescenční měření změn nitrobuněčných iontů je možné díky sondám, které mění své spektrální vlastnosti po vazbě daného iontu. Nejčastěji se měří Ca²⁺, kterému je věnována řada knih. Indikátory jsou obvykle deriváty chelátorů Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ nebo K⁺ jako je EGTA, APTRA a BAPTA, které mají vhodnou afinitu pro studovaný iont. Při výběru vhodného indikátoru bereme v úvahu:

- **formu indikátoru** (sůl, acetoxymetyl ester, dextranový konjugát), která ovlivňuje způsob, jakým se dostává do buňky (mikroinjekce, elektroporace, infúze z patch-pipety, pasivní difúze) a nitrobuněčnou distribuci
- **způsob měření** – některé indikátory vykazují po vazbě iontu spektrální posuv absorpce nebo emise (měří poměr intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise), jiné změnu intenzity fluorescence
- **disociační konstantu** – musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu (koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu)

Koncentrace sondy je v těchto měřeních mnohem menší, než koncentrace stanovované látky (analytu), neboť jinak by docházelo ke zkreslení koncentrací volného analytu. Pro sondy, které vykazují změnu intenzity fluorescence, ale nikoli spektrální posuv (jako je Calcium Green, Fluo-3, Rhod-2, Quin-2) je koncentrace analytu c_a dána vztahem:

$$(2.1) \quad c_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$

kde je K_d – disociační konstanta vazebného místa pro analyt na indikátoru, I_{\min} – intenzita fluorescence indikátoru, když není navázán žádný analyt, I_{\max} – intenzita fluorescence plně obsazeného indikátoru, I – intenzita fluorescence ve vzorku, kde je jen část vazebných míst indikátoru obsazena analytem. Změny v intenzitě fluorescence jsou typicky způsobeny změnou kvantového výtěžku fluorescence po navázání analytu, spíše než změnou v absorpci. Měření I_{\max} a nitrobuněčná kalibrace indikátorů se dělá pomocí ionoforů nebo uvolněním indikátoru do media o známé koncentraci analytu lýzou buněk.

Pro sondy, které vykazují spektrální posuv v absorpčním nebo emisním spektru po vazbě analytu se koncentrace analytu určuje z poměru intenzit nezávisle na celkové koncentraci sondy. Při měření poměru intenzit fluorescence při dvou různých excitačních vlnových délkách, je koncentrace analytu určována ze vztahu:

$$(2.2) \quad c_a = K_d (S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2)) (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

kde $R = I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$ je poměr intenzit pro dvě excitační vlnové délky λ_1 a λ_2 , R_{\min} a R_{\max} jsou poměry pro sondu volnou a plně obsazenou analytem, $S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2) = \varepsilon_F \Phi_F / \varepsilon_B \Phi_B$, ε - extinkční koeficienty, Φ - kvantové výtěžky sondy excitované při λ_2 .

Při měření poměru intenzit fluorescence při dvou různých emisních vlnových délkách lze použít rovnici analogickou rovnicí (2.2), přičemž $S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2) = I_F/I_B$ je poměr intenzit volné a vázané formy.

Vybrané fluorescenční indikátory pro Ca^{2+} jsou uvedeny v Tabulce 2.12. Fluorescenčním indikátorem pro Mg^{2+} je např. Mag-Fura-2 nebo Mag-Indo-2; pro zinek FuraZin-1, IndoZin-1, FluoZin-1, pro Na^+ je to sodík vázající benzofuran izoftalát (SBFI) a sodík vázající benzofuran oxazol (SBFO), pro K^+ např. draslík vázající bezofuran izoftalát (PBFI).

Tabulka 2.12 Vybrané fluorescenční indikátory Ca²⁺

Ca ²⁺ indikátor	excitace $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	emise $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	způsob měření	disociační konstanta (nmol/l)
Fura-2	362(335)	518(510)	Ex 340/380	145
Fura-5F			Ex 340/380	400
Fura-6F			Ex 340/380	5300
Fura-FF			Ex 340/380	5500
Indo-1	349(331)	482(398)	Em 405/485	230
Indo-5F			Em 405/485	470
Fluo-3	504	526	Em 525	390
Fluo-4			Em 520	345
Fluo-5F			Em 520	2300
Fluo-5N			Em 520	90000
Quin-2	356(336)	500(503)	Em 495	60
Rhod-2	550	581	Em 580	570
Rhod-FF			Em 580	19000
Rhod-5N			Em 580	320000
Oregon Green BAPTA-1	494	523	Em 520	170
Oregon Green BAPTA-2	494	523	Em 520	580
Oregon Green BAPTA-6F			Em 520	3000
Oregon Green BAPTA-5N	494	521	Em 520	20000
Calcium Green-1	506	534	Em 530	190
Calcium Green-2	506	536	Em 535	550
Calcium Green-5N	506	536	Em 530	14000

λ_F – vlnová délka pro volnou formu sondy, λ_B – vlnová délky pro vázanou formu sondy; Ex – značí měření při uvedené vlnové délce excitace, Em – značí měření při uvedené vlnové délce emise, dvojice čísel oddělená lomítkem značí poměrné měření při dvou různých vlnových délkách

(Podle: 1. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products; 2. Lakowicz 1999.)

2.3.6. Indikátory pH

Fluorescenční sondy citlivé na pH umožňují měření pH **uvnitř** buněk s velkou citlivostí. Nitrobuněčné pH je obecně v cytosolu mezi 6,8 a 7,4 a v kyselých organelách mezi 4,5 a 6,0. Je tedy potřeba měřit změny pH v oblasti desetin jednotek pH. Hlavní skupiny indikátorů pH jsou uvedeny v Tabulce 2.13. Příklad měření se sondou SNARF-5F je popsán v kapitole 3.8.

Fluorescein byl použit jako jeden z prvních indikátorů pH, především pro měření nitrobuněčných hodnot. Protože fluorescein se poměrně snadno z buněk uvolňuje jsou často používány jeho vysoce nabitě deriváty, jako **5(6)-karboxyfluorescein** nebo **2',7'-bis-(2-karboxyetyl)-5-(a 6)-karboxyfluorescein (BCECF)**. Do živých buněk se tyto sondy snadno dostávají jako acetoxymetylové (AM) nebo acetátové estery.

Fluorescein samotný je středně vhodná sonda. Poměr intenzit fluorescence změřené při dvou excitačních vlnových délkách ($\lambda_1=450$ nm, $\lambda_2=495$ nm) se zvyšuje se zvyšujícím se pH. Nevýhodou fluoresceinu je skutečnost, že jeho pK_a je kolem 6,5, tedy mimo optimální rozsah běžných fyziologických pH.

Jako sonda pro poměrné měření fluorescence při dvou různých vlnových excitačních vlnových délkách je vhodnější sonda **8-hydroxypyrén-1,3,6-trisulfonát (HPTS; pyranin)**, kdy se měří poměr intenzit fluorescence při buzení $\lambda_1=420$ nm a $\lambda_2=450$ nm. Zdánlivá pK_a této sondy je kolem 7,5.

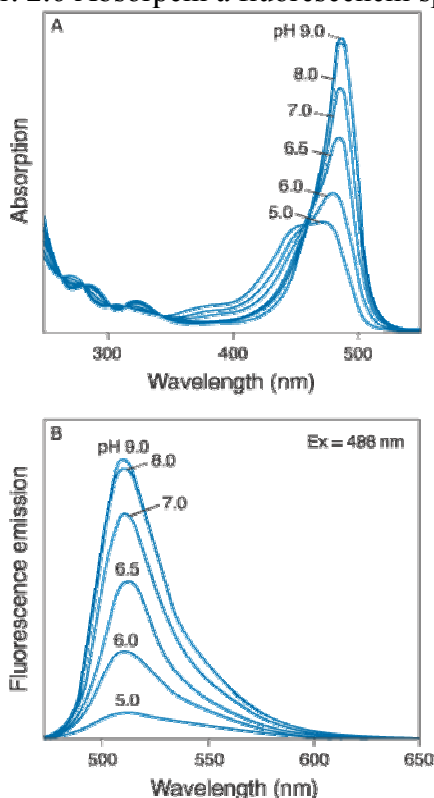
Novější skupinou pH sond jsou **seminaftofluoresceiny (SNAFL)** a **seminaftorhodafluory (SNARF)**. Vyznačují se tím, že mají velký posuv jak v absorpčním, tak v emisním spektru a mohou být tedy použity pro poměrná měření jak pro dvojici excitačních, tak pro dvojici emisních vlnových délek.

Tabulka 2.13 Fluorescenční indikátory pH

fluorofor	rozsah pH	způsob měření
SNAFL indikátory	7,2-8,2	Ex 490/540 nebo Em 540/630
SNARF indikátory	6,0-8,0	Em 580/640
HPTS (pyranin)	7,0-8,0	Ex 450/405
BCECF	6,5-7,5	Ex 490/440
Fluoresceiny a karboxyfluoresceiny	6,0-7,2	Ex 490/450
LysoSensor Green DND-189	4,5-6,0	Em 520
Oregon Green indikátory	4,2-5,7	Ex 510/450 nebo Ex 490/440
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	3,5-6,0	Em 450/510

Ex – značí měření při uvedené vlnové délce excitace, Em – značí měření při uvedené vlnové délce emise, dvojice čísel oddělená lomítkem značí poměrné měření při dvou různých vlnových délkách (Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Obr. 2.6 Absorpční a fluorescenční spektra fluoresceinu při různých hodnotách pH



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

2.3.7. Membránový potenciál

V důsledku nerovnoměrného rozdělení iontů, především Na^+ , K^+ a Cl^- mají buněčné plazmatické membrány transmembránový potenciál kolem -70 mV (negativní uvnitř buňky). Depolarizace a hyperpolarizace membrán má klíčovou úlohu v řadě buněčných procesů, především v přenosu nervového signálu. **Potenciometrické sondy** umožňují měřit membránový potenciál i v organelách a buňkách, které jsou příliš malé pro zavedení mikroelektrod.

Potenciometrické sondy lze rozdělit do dvou skupin:

1. **Sondy s rychlou odezvou:** vlivem změny okolního elektrického pole dochází ke změnám intramolekulární distribuce jejich náboje, což se projeví v rychlé změně jejich fluorescenčních parametrů (spektra nebo intenzity) - velikost této změny je často malá (2-10% na 100 mV). Jsou dostatečně rychlé pro měření potenciálových změn v excitovatelných buňkách.
2. **Sondy s pomalou odezvou:** jsou to lipofilní aniony nebo kationy, které se přemísťují přes membránu elektroforetickým mechanismem a vykazují potenciálově závislé změny ve své transmembránové distribuci, která je provázena fluorescenčními změnami – velikost změny je typicky 1% na 1 mV. Patří sem kationtové karbocyaniny a rhodaminy a aniontové oxonoly. Jsou vhodné na měření změn průměrného membránového potenciálu neexcitovatelných buněk, způsobených respirační aktivitou, propustností iontových kanálů, vazbou léčiv a jinými faktory.

Tabulka 2.14 Potenciometrické fluorescenční sondy

sonda	struktura	odezva	použití
Di-4-ANEPPS Di-8-ANEPPS Di-2-ANEPEQ Di-8-ANEPPQ Di-12-ANEPPQ	styryl	rychlá; Ex 440/505 se snižuje při hyperpolarizaci membrány	<ul style="list-style-type: none"> mapování membránového potenciálu podél neuronů a svalových vláken kombinace potenciometrických a Ca^{2+} nebo elektrofyziologických měření detekce změn membránového potenciálu v odezvě na farmaceutický stimul
RH 237 RH 414 RH 421 RH 795	styryl	rychlá; fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány	<ul style="list-style-type: none"> zobrazování membránových potenciálů funkční sledování neuronů detekce synaptické aktivity
RH 155	hybrid oxonol	rychlá; mění se absorbance při cca 720 nm	<ul style="list-style-type: none"> neurony bezobratlých membránové potenciály v svalové a nervové tkáni napětově řízené Ca^{2+} kanály
DiOC₂(3) DiOC₅(3) DiOC₆(3) DiSC₃(5) DiIC₁(5)	karbocyanin	pomalá; fluorescenční odezva na depolarizaci závisí na koncentraci a detekční metodě	<ul style="list-style-type: none"> kalciové kanály aktivita mitochondrií neurony a mozková tkáň průtoková cytometrie membránový potenciál v kvasinkách
JC-1 JC-9	karbocyanin	pomalá; Em 585/520 se zvyšuje při hyperpolarizaci membrány	<ul style="list-style-type: none"> apoptická mitochondriální depolarizace Ca^{2+} regulace mitochondriemi mitochondriální odezva na glutamátovou excitotoxicitu
Tetrametylrhodamin metyl a etyl estery	rhodamin	pomalá	<ul style="list-style-type: none"> membránový potenciál v mitochondriích Ca^{2+} regulace mitochondriemi
Oxonol V Oxonol VI	oxonol	pomalá; fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány	<ul style="list-style-type: none"> rostlinná fyziologie iontové kanály a elektrogenní pumpy liposomy
DiBAC₄(3) B-24570 DiBAC₂(5) DiSBAC₂(3)	oxonol	pomalá; fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány	<ul style="list-style-type: none"> kalcium a membránový potenciál životnost buněk průtokovou cytometrií konfokální mikroskopie
Merocyanin 540	merocyanin	rychlá/pomalá (dvoufázová odezva)	<ul style="list-style-type: none"> membránový potenciál v mitochondriích a svalecth membránový povrch asymetrie membránových lipidů fotodynamická terapie

Ex – značí měření při uvedené vlnové délce excitace, Em – značí měření při uvedené vlnové délce emise, dvojice čísel oddělená lomítkem značí poměrné měření při dvou různých vlnových délkách
(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

2.3.8. Dynamika a uspořádání buněčných membrán

Biologické membrány jsou heterogenní systémy charakterizované přítomností fyzikálních rozdílností a topologicky nepravidelných lipidových a proteinových domén. Není proto možné úplně analyticky popsat distribuci a pohyb jejich molekul a makromolekul. Vychází se vždy z určitých modelů a přibližných vztahů, jejichž parametry lze experimentálně určit. Laterální pohyblivost molekul v rovině membrány je charakterizována **laterálním difúzním koeficientem**, pro rychlost reorientace určitých molekul v membráně se používají **parametry pořádku a rotační korelační časy** nebo **rotační difúzní koeficient**. Pomocí fluorescenční spektroskopie lze tyto parametry měřit za použití vhodných sond a časově rozlišené fluorescence (viz kap. 1.3). Nicméně i při měření **anizotropie fluorescence** za použití metody ustálené fluorescence, která je v současné době dostupnější, lze získat určité informace o relativních změnách dynamiky a uspořádání membránových složek. Používají se membránové fluorescenční sondy popsané v kap. 2.2.2. Konkrétní příklady této aplikace jsou uvedeny v kapitolách 3.10.2 a 3.10.3.

Parametry pro popis dynamických vlastností membrán, jako izotropních systémů

V prvním přiblížení se lze dívat na vnitřek lipidové dvojvrstvy biologické membrány jako na homogenní neasociovanou izotropní nestlačitelnou kapalinu, jejíž vlastnosti jsou charakterizovány jedinou konstantou. V analogii s mechanikou kontinua je tato konstanta označována jako **viskozita** nebo **fluidita**, resp. **tekutost**. V případě lipidových dvojvrstev bylo zavedeno označení **mikroviskozita**. Protože viskozitu vnitřního prostředí dvojvrstvy nelze měřit přímo, je experimentálně určován parametr, který je s ní v přímé souvislosti. Je jím obvykle **difúzní konstanta D**, **korelační čas τ_c** nebo **relaxační čas σ** . Převodní vztah mezi těmito parametry je tento

$$(2.3) \quad D = 1/6\tau_c = 1/2\sigma$$

Difúzní koeficient látky rozpuštěné v nekonečném izotropním kontinuu je určen klasickým Stokesovým-Einsteinovým vztahem

$$(2.4) \quad D = kT/f$$

kde je k – Boltzmannova konstanta, T – absolutní teplota, kT – tepelná energie, f – viskózní tření. Pro kouli o poloměru r je rotační viskózní tření dáno vztahem

$$(2.5) \quad f_r = 8\pi\eta r^3$$

a translační viskózní tření vztahem

$$(2.6) \quad f_t = 6\pi\eta r$$

kde je η - koeficient viskozity. Fluidita je definována jako převrácená hodnota viskozity.

V konečném neizotropním prostředí je viskózní tření odlišné od izotropní kapaliny. Pro difúzi molekul proteinů v lipidové dvojvrstvě bylo zjištěno, že viskózní tření pro rotační pohyb se podstatně neliší od hodnoty pro izotropní prostředí splňující Stokesův-Einsteinův vztah, zatímco translační viskózní tření je podstatně menší, než pro izotropní systém. Translační i rotační difúzi

v membránách lze souhrnně popsat pomocí difúzivity. Experimentálně je však často sledován jen jeden typ difúzního pohybu molekul v membráně. Nejčastěji se pro tato měření používají spektroskopické metody (elektronová spinová rezonance, jaderná magnetická rezonance, fluorescence, Ramanův rozptyl). Tyto metody jsou založeny na měření určitého signálu (rezonanční absorpce energie vysokofrekvenčního magnetického pole, fluorescenční nebo rozptýlené záření apod.) molekul, skupin či atomů lokalizovaných v membráně. Tyto zpravodajské skupiny jsou buď membráně vlastní, nebo jsou do ní vneseny (spinové sondy, radionuklidem značené molekuly, fluorescenční sondy a značky, rezonanční značky pro Ramanův rozptyl atd.) a musí splňovat základní podmínky:

1. jsou to částice citlivé na mikrookolí, které po zavedení do určité oblasti systému dávají informace o změnách svého mikrookolí prostřednictvím odpovídajícího detektoru;
2. fyzikální vlastnosti, které umožňují detekovat zpravodajskou skupinu se musí výrazně odlišovat od vlastností sledovaného systému;
3. při zavedení sondy smí dojít jen k malému (lépe žádnému) ovlivnění biologického systému.

Měření ukázala, že rotační pohyb membránových molekul je velmi rychlý a při jeho sledování se pohybujeme v nanosekundovém oboru. Oproti tomu se při detekci translačních pohybů dostáváme až do oboru milisekund. Podle rychlosti sledovaného pohybu je nutno vybrat vhodnou metodu a sondu. Fluorescenční měření postihují oblast 10^{-7} - 10^{-10} s, fosforescence 10^{-3} - 10^2 s, metoda spinových sond 10^{-7} - 10^{-10} s, metoda elektronové spinové rezonance s přenosem nasycení prodlužuje škálu do 10^{-4} s. V dalším textu bude vysvětlován význam a možnosti stanovení difúzních koeficientů, korelačních časů a parametrů pořádku pomocí metod fluorescenční spektroskopie.

Rotační difúze v izotropním systému

Měření koeficientu viskozity, resp. mikroviskozity biologických membrán fluorescenčními metodami spočívá obvykle v měření rotační depolarizace fluorescence vhodných molekul (sond) vázaných v membráně. K depolarizaci fluorescence těchto molekul buzených polarizovaným zářením dochází rotací molekul (tepelným Brownovým pohybem) v době mezi absorpcí a emisí. Tato doba je pro každou sondu jiná, pohybuje se však vesměs v oblasti nanosekund, a je jí určen rozsah rychlostí detekovaných jevů v membráně.

Experimenty jsou prováděny dvěma základními způsoby:

1. stacionární metodou (ustálená fluorescence) s kontinuálním buzením a snímáním fluorescence;
2. kinetickou metodou (časově rozlišená fluorescence) s pulzním buzením fluorescence a měřením průběhu jejího dohasínání.

Obvyklé uspořádání těchto experimentů je na Obr. 1.5 v kapitole 1.3, kde jsou také definice základních pojmů, které zde nicméně zopakují:

stupeň polarizace

$$(2.7) \quad p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) = 3r / (2 + r) = (1 - \delta) / (1 + \delta)$$

anizotropie fluorescence

$$(2.8) \quad r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) = 2p / (3 - p) = (1 - \delta) / (1 + 2\delta)$$

depolarizační faktor

$$(2.9) \quad \delta = I_{\perp}/I_{\parallel}$$

kde I_{\parallel} a I_{\perp} jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé ke směru polarizace budícího záření.

V kinetické metodě jsou měřeny zvlášť dvě křivky dohasínání $I_{\parallel}(t)$ a $I_{\perp}(t)$ a anizotropie fluorescence je časově závislá. Pro sférickou molekulu v izotropním prostředí je tato časová závislost popsána jednoduchou exponenciálou

$$(2.10) \quad r(t) = (I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t))/(I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)) = r_0 \exp(-t/\tau_r)$$

$$(2.11) \quad I(t) = I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$$

kde je r_0 – limitní hodnota anizotropie při vyloučení tepelného pohybu molekuly, I_0 – počáteční hodnota intenzity fluorescence, τ - doba života fluorescence (doba dohasínání), τ_r - **rotační korelační čas** ($\tau_r = 1/6D_r$) zavedený pomocí **rotační difúzní konstanty** D_r , pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah (viz rovnice 2.4 a 2.5)

$$(2.12) \quad D_r = kT/6V\eta$$

kde je V – objem částice, η – viskozita prostředí, k – Boltzmannova konstanta ($=1,380662 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T – absolutní teplota.

Při určování rotačního korelačního času sférické molekuly v izotropním prostředí z měření ustálené fluorescence lze použít **Perrinovu rovnici**, kterou dostaneme jednoduchým zprůměrováním $r(t)$ přes čas a intenzitu

$$(2.13) \quad r_0/r = 1 + \tau/\tau_r = 1 + 6D_r\tau = 1 + kT\tau/V\eta = 1 + C(r)T\tau/\eta$$

kde je $C(r)$ – parametr rotující molekuly, který je slabě závislý na r a pro nesyfické molekuly se musí experimentálně určit. Měřené hodnoty anizotropie ustálené fluorescence r tedy mohou sloužit ke sledování kvalitativních změn fluidity nejbližšího okolí (kolem 10 nm) fluoreskující molekuly. Vyšší hodnota anizotropie znamená nižší fluiditu a naopak. Závislost r na η je však nelineární a pouze kolem hodnoty $r_0/2$ lze dostatečně přesně detekovat změny η . Ve většině případů jsou změny $C(r)$ a τ v závislosti na r malé a působí proti sobě. Perrinův vztah (2.13) potom lze při konstantní teplotě zjednodušit

$$(2.14) \quad ((r_0/r)-1)^{-1} = K \cdot \eta$$

kde K je konstanta. Pro sledování relativních změn mikroviskozity tedy není nezbytné měření dob dohasínání fluorescence, které vyžaduje složitější aparaturu.

Stanovení změn fluidity buněčných membrán na základě měření anizotropie ustálené fluorescence vhodné sondy je pro svou jednoduchost velmi rozšířeno. Problém spočívá v tom, že Perrinův vztah byl odvozen pro sondu v izotropním prostředí, což lipidová dvojvrstva buněčných membrán v žádném případě není. **Pojem fluidity či mikroviskozity buněčných membrán potom ztrácí fyzikální význam a v těchto měřeních se jedná pouze o kvalitativní postižení změn uspořádání mikrookolí sondy a její pohyblivosti v membráně.** Pomocí časově rozlišené

fluorescence bylo potvrzeno, že anizotropie fluorescence určená stacionární metodou v sobě obsahuje jak informaci o pohyblivosti membránových molekul, tak informaci o jejich průměrném uspořádání. Kvantitativní zastoupení těchto dvou informací nelze z měření ustálené fluorescence určit.

Parametry pro popis dynamických vlastností membrán, jako anizotropních systémů

Vztahy uvedené výše platí pouze pro izotropní prostředí a sférickou molekulu sondy. V druhém přiblížení bereme biologické membrány jako částečně anizotropní – tj. pohyb v membráně je omezený a rozlišujeme pohyb v rovině lipidové dvojvrstvy a kolmo k ní. Anizotropie fluorescence $r(t)$ v tomto kapalně-krytalickém prostředí nedohasíná k nule, jako je tomu u izotropní tekutiny (viz vztah 2.10), ale k určité limitní hodnotě $r(\infty)$

$$(2.15) \quad r(t) = r(\infty) + (r(0) - r(\infty)) \exp(-t/\tau_r)$$

Hodnota $r(\infty)$ je vztahována k průměrné orientaci podélné osy molekuly sondy vzhledem k určitému směru (kolmici k rovině membrány). Pro interpretaci $r(\infty)$ tyčinkovité molekuly membránové sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) byl vytvořen tzv. model kolísání v kuželu a byly zavedeny **parametry orientačního pořádku**. Pro $r(0)$ i $r(\infty)$ byly odvozeny obecné vztahy, zde neuváděné. Zatímco počáteční hodnota $r(0)$ je závislá pouze na úhlu mezi absorpčním a emisním pásem (viz vztahy 1.13, 1.14), limitní hodnota pro dlouhé časy $r(\infty)$ obsahuje informace o uspořádání lokálního mikrookolí sondy. Z obecných vztahů lze získat výrazy pro speciální případy, např. pro sondu s válcovou symetrií, jako je DPH.

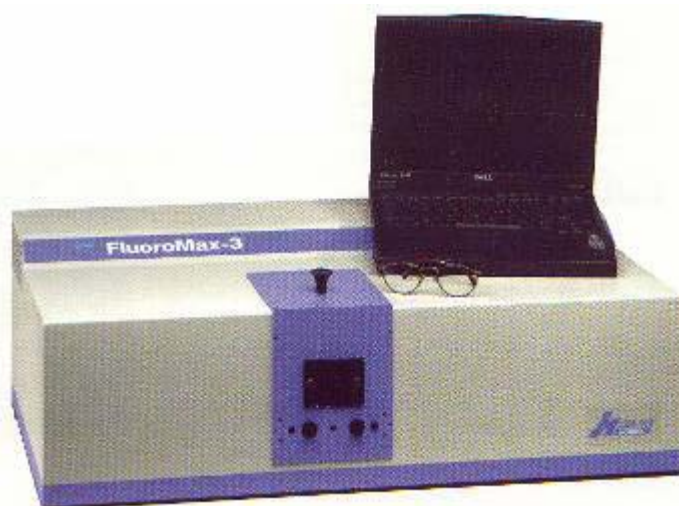
Výrazy pro časovou závislost anizotropie fluorescence $r(t)$ v anizotropním systému byly získány jen aproximativně, např. pro sondu s válcovou symetrií s momenty přechodu rovnoběžnými s podélnou osou molekuly při použití různých modelů pohybu částice v membráně (difúzního modelu, modelu silných srážek). Obvykle se ale pro $r(t)$ používá fenomenologický výraz

$$(2.16) \quad r(t) = r(\infty) + (r(0) - r(\infty)) \exp(-t/\tau_a)$$

který často vyhovuje pro krátké časy a kde je τ_a – určitý druh korelačního času charakterizující anizotropní rotační pohyb (zdánlivý rotační korelační čas). Zprůměrováním $r(t)$ přes čas a intenzitu dostaneme výrazy pro anizotropii ustálené fluorescence r (měřenou při kontinuálním buzení vzorku), kdy jsou hodnoty r závislé jak na molekulárním uspořádání mikrookolí sondy, tak na jejím molekulárním pohybu.

3. Experimenty

V této kapitole jsou uvedeny protokoly vybraných experimentů využívajících fluorescenční spektroskopii. Kromě vlastního fluorescenčního měření jsou popsány i některé další metody související s popisovaným experimentem (především přípravou vzorků a zpracováním výsledků). Všechna měření lze provést na běžném spektrofluorimetru vybaveném polarizačním zařízením, ale předpokládají znalost základních biochemických a biofyzikálních postupů. Prezentované výsledky byly získány na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s programovým vybavením DATAMAX a GRAMS/32.



Nehledě na typ fluorimetru, je pro citlivost a přesnost měření důležitá čistota fluorimetrických kyvet. Pro skleněné a křemenné kyvety je doporučen tento způsob mytí:

1. ponechat alespoň 24 hod namočené v kyselině chromsírové
2. omýt deionizovanou vodou
3. namočit na 5 hodin (ne déle!!!) do čistícího roztoku (20 tablet KOH/100 ml metanolu)
4. omýt deionizovanou vodou
5. namočit do koncentrované kyseliny dusičné až do použití, před nímž se kyvety vypláchnou deionizovanou vodou

3.1. Polarita rozpouštědla

V tomto demonstračním experimentu je ukázán vliv polarity rozpouštědla na fluorescenci sondy kyseliny 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonové (TNS) rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích obsahujících různé procento etanolu.

Vlastnosti fluorescenční sondy kyseliny 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonové (TNS):

- MW = 313,88
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 318 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $26000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 443 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle

Materiál:

- kyselina 6-(p-toluidino)-2-naftalénsulfonová (TNS, Fluka)
- etanol pro UV spektroskopii (Lachema)
- destilovaná voda
- skleněné zkumavky
- mikropipety

Postup:

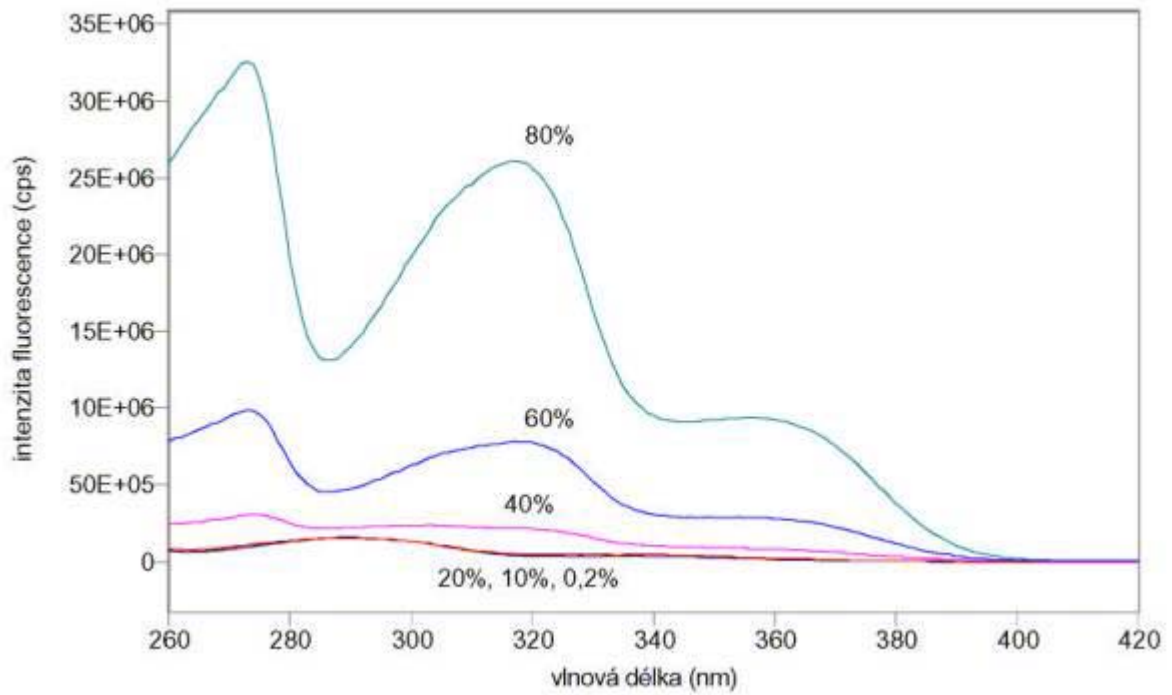
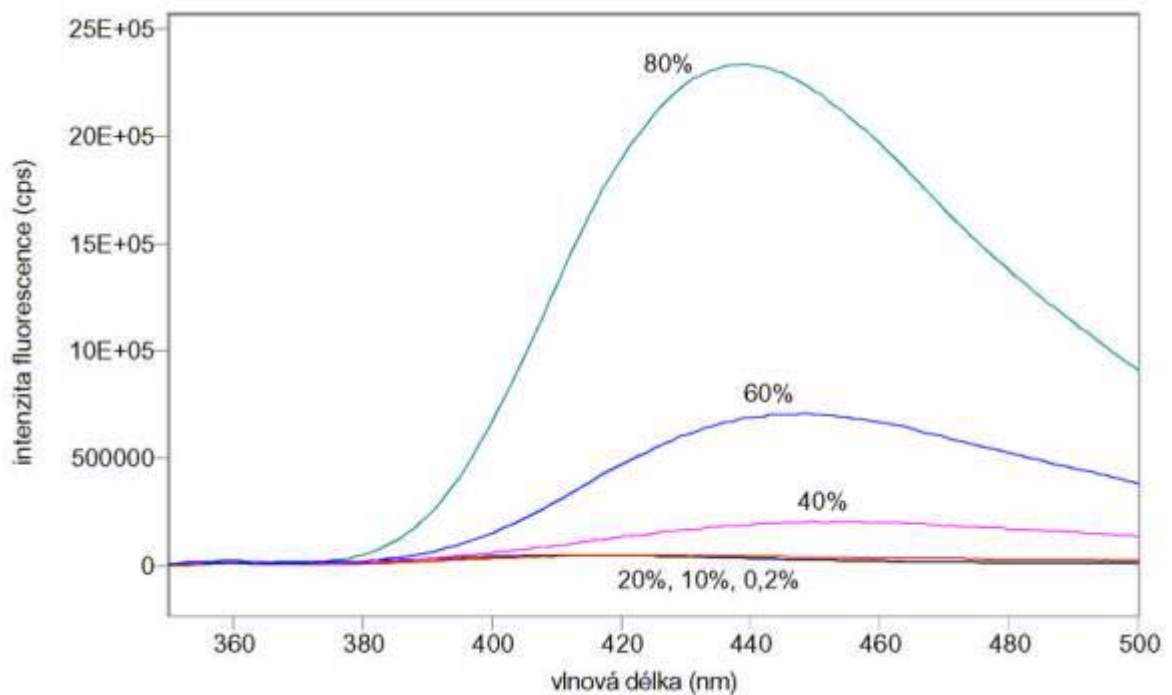
1. Připravte zásobní roztok TNS: odvažte cca 3 mg TNS a rozpusťte nejprve v 96% etanolu a poté upravte na koncentraci 2 mmol/l v 80% etanolu.
2. Připravte vzorky dle Tabulky 3.1, tak aby výsledná koncentrace TNS byla 5 $\mu\text{mol/l}$.
3. Změřte excitační spektra vzorků při $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$
4. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$

Tabulka 3.1

č. vzorku	dest. voda (μl)	etanol (80%) (μl)	TNS (2 mmol/l) (μl)	výsledné % etanolu
1	3990	0	10	0,2
2	3500	490	10	10
3	3000	990	10	20
4	2000	1990	10	40
5	1000	2990	10	60
6	0	3990	10	80

Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy TNS jsou na obr. 3.1 a 3.2. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.1 Excitační spektra TNS ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) v roztocích obsahujících 0,2 – 80% etanolu.Obr. 3.2 Emisní spektra TNS ($\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$) v roztocích obsahujících 0,2 – 80% etanolu.

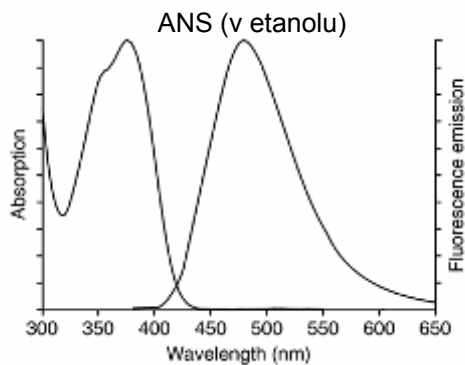
3.2. Vazba sond na bílkoviny

V tomto demonstračním experimentu je ukázán vliv vazby sondy ANS na albumin na její fluorescenci a zhášení fluorescence jódem.

Vlastnosti fluorescenční sondy 1-anilinaftalén-8-sulfonátu sodného (ANS):

- MW = 321,33
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 372 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $7800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 480 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle
- podrobný popis vlastností ANS lze nalézt v práci [Slavík J.: Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 1-25 (1982)]

Obr. 3.3 Fluorescenční spektra sondy ANS v etanolu



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- 1-anilinaftalén-8-sulfonát sodný (ANS, ICN Pharmaceuticals)
- lidský albumin (MW = 69000)
- jodid draselný (MW = 166,00)
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

1. Připravte zásobní roztoky 2,5 mmol/l ANS, 0,25 mmol/l albuminu a 5 mol/l KJ.
2. Připravte vzorky dle Tabulky 3.2, tak aby výsledné koncentrace ANS a albuminu byly 5 $\mu\text{mol/l}$ a výsledné koncentrace KJ 20 až 100 mmol/l
3. Změřte excitační a spektra vzorků při $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$
4. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$

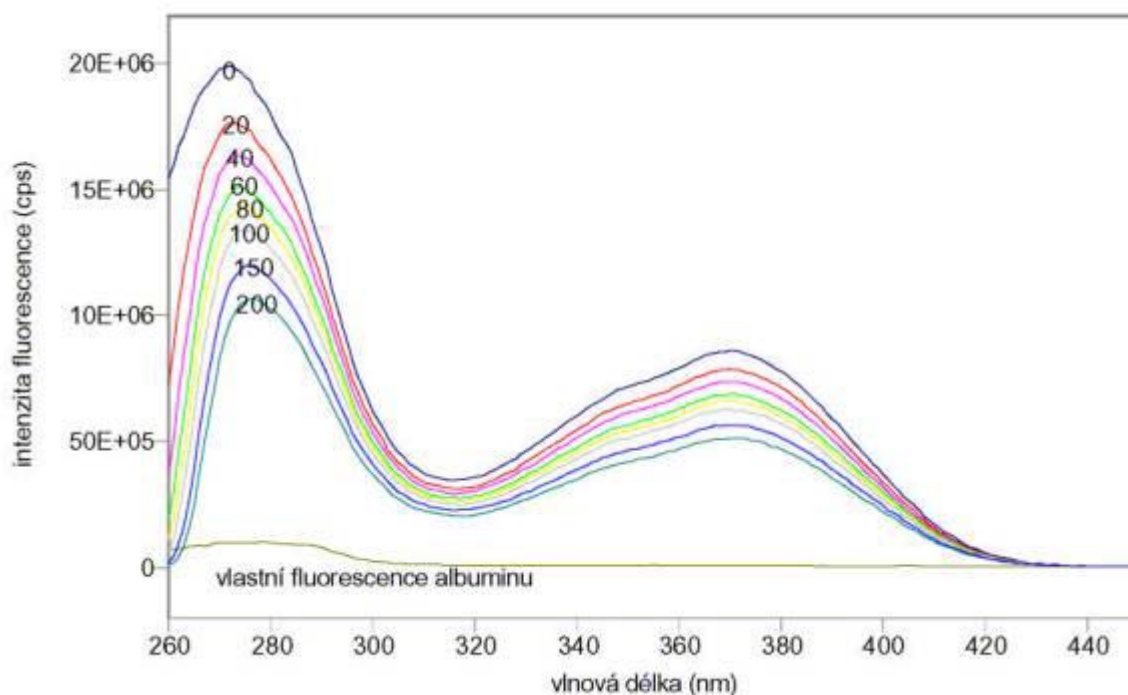
Tabulka 3.2

č. vzorku	pufr A (μl)	albumin (μl)	ANS (μl)	KJ (μl)	výsledná koncentrace KJ (mmol/l)
0	4900	100	0	0	0 (vlastní fluorescence albuminu)
1	4890	100	10	0	0
2	4870	100	10	20	20
3	4850	100	10	40	40
4	4830	100	10	60	60
5	4810	100	10	80	80
6	4790	100	10	100	100
7	4740	100	10	150	150
8	4690	100	10	200	200

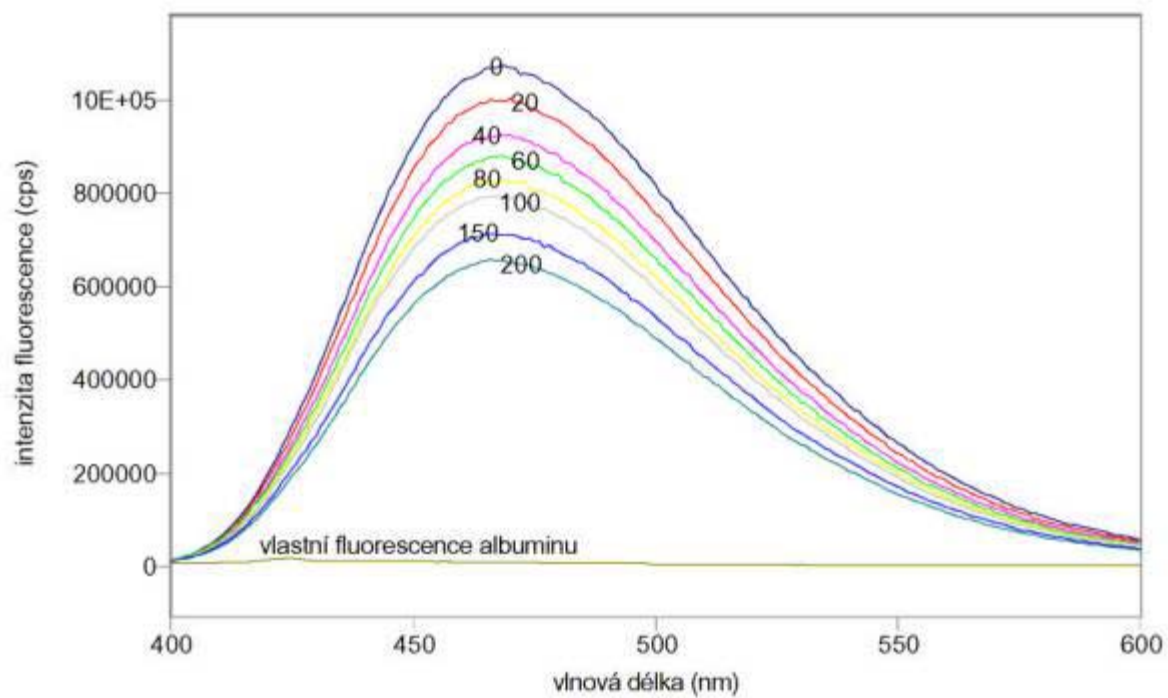
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy ANS vázané k albuminu v přítomnosti různých koncentrací jodidu draselného jako zhašedla jsou na obr. 3.4 a 3.5. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.4 Excitační spektra ANS ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$) vázaného na albumin v roztocích obsahujících 0 – 200 mmol/l jodidu draselného.



Obr. 3.5 Emisní spektra ANS ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$) vázaného na albumin v roztocích obsahujících 0 – 200 mmol/l jodidu draselného.



3.3. Dynamický stav lipidových membrán

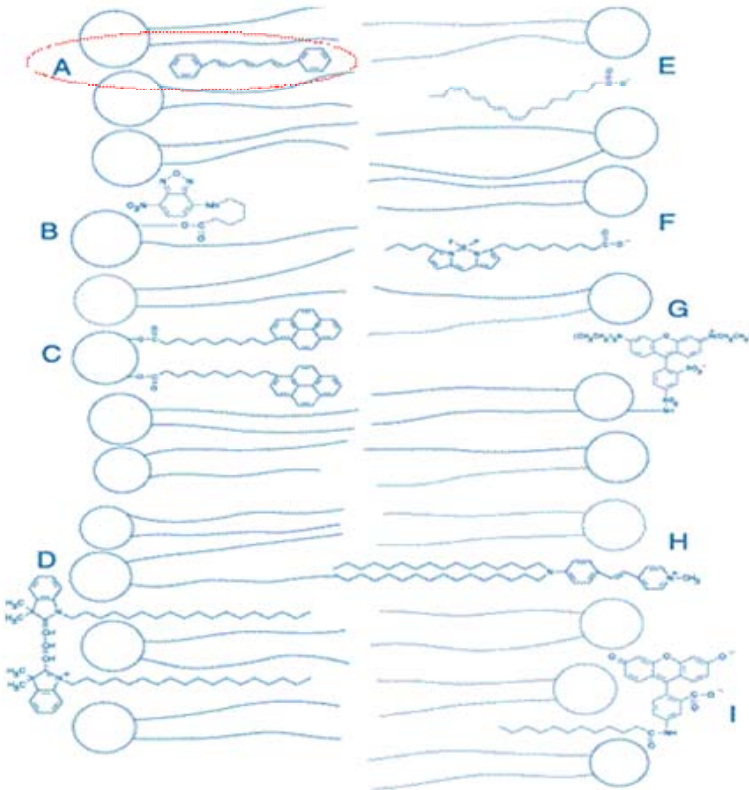
V tomto experimentu jsou ukázány možnosti měření polarizované fluorescence v ustáleném stavu (tj. při kontinuálním buzení). Jsou testovány možnosti fluorescenční membránové sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH) pro stanovení změn dynamického stavu lipidových dvojvrstev. Měření je provedeno jednak v modelových membránách, liposomech, jednak v erytrocytárních membránách. Je proto uveden také postup přípravy velkých jednovrstevných liposomů a erytrocytárních ghostů.

Vlastnosti fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH):

- MW = 232,32
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF), acetonitril (MeCN)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH), aceton
- zásobní roztoky DPH se často připravují v tetrahydrofuranu (THF); dlouhodobé skladování v THF se však nedoporučuje kvůli možné tvorbě peroxidů v tomto rozpouštědle
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $88000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 452 \text{ nm}$
- DPH a jeho deriváty prakticky nefluoreskují ve vodě. Absorpční a emisní spektra mají více píků; vlnová délka, rozlišení a relativní intenzita těchto píků závisí na prostředí. Uvedené hodnoty $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ a $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ jsou pro nejintenzivnější pík v metanolu.

Obr. 3.6 Lokalizace fluorescenčních sond v lipidové dvojvrstvě

Lokalizace a orientace vybraných fluorescenčních sond ve fosfolipidové dvojvrstvě: A) DPH, B) NBD-C₆-HPC, C) bis-pyrene-PC, D) DiI, E) *cis*-parinaric acid, F) BODIPY 500/510 C₄, C₉, G) *N*-Rh-PE, H) DiA, I) C₁₂-fluorescein



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

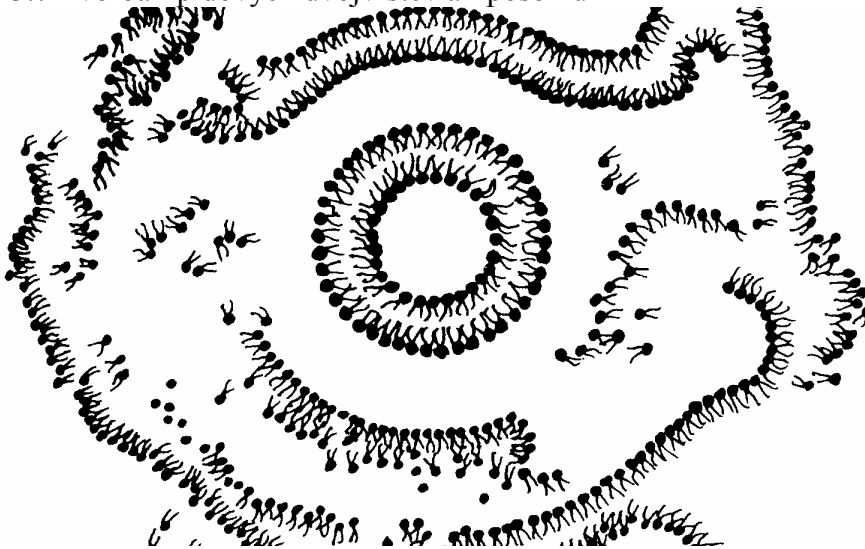
Materiál:

- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma)
- fosfatidylcholin izolovaný z hovězího mozku
- ACD roztok (0,8% kyselina citrónová, 2,2% citrát sodný ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 2,4% glukóza, pH 4,3)
- plná krev
- centrifuga
- zařízení LiposoFast-Basic
- skleněné zkumavky, mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- hypotonický pufr pro hemolýzu (izotonický pufr A se 20x naředí redestilovanou vodou a pH se upraví na 7.4 pomocí NaOH a HCl)

Postup:**Příprava velkých jednovrstevných liposomů (LUV)**

Liposomy jsou váčky (vezikuly) uzavírající vodný roztok membránou tvořenou především fosfolipidy. Tvoří se spontánně, když jsou fosfolipidy dispergovány ve vodném prostředí. V závislosti na způsobu přípravy mohou vzniknout liposomy 1. mnohovrstevné (multilamellar vesicles, MLV), 2. malé jednovrstevné (small unilamellar vesicles, SUV) nebo 3. velké jednovrstevné (large unilamellar vesicles, LUV). V našich experimentech jsme použili LUV o průměru cca 100 nm.

Obr. 3.7 Tvorba lipidových dvojvrstev a liposomů



Liposomy byly připravovány z fosfatidylcholinu (PC) izolovaného z bílé hmoty hovězího mozku. PC byl separován z hrubého extraktu lipidů sloupcovou chromatografií. Výsledná čistota fosfolipidů byla lepší než 95% (určeno dvourozměrnou tenkovrstevnou chromatografií). Fosfolipidy byly uchovávány v dusíkové atmosféře ve směsi chloroform/metanol (2 : 1, v/v) při -30 °C. Koncentrace fosfolipidů byla určena z měření koncentrace fosforu (viz níže). Nejprve byly připraveny velké mnohovrstevné liposomy (modifikovanou Banghamovou metodou) a z nich byly protlačováním přes polykarbonátové filtry pomocí zařízení Liposofast-Basic (Avestin, Inc.) připraveny LUV:

1. přenést 1 až 20 mg fosfolipidu ve směsi chloroform/metanol (2:1) do skleněné nádoby a rozpouštědlo odpařit proudem dusíku při teplotě kolem 40 °C tak, aby na stěně nádoby vznikla tenká vrstva fosfolipidu
2. nádobku umístit po několik hodin ve vakuu, aby byly odstraněny zbytky rozpouštědla
3. přidat 2 ml pufru A a vzorek inkubovat v 50 °C po dobu 5 minut
4. intenzivně třepat a nakonec krátce sonikovat (cca 5 s) v sonikátoru XL 2020 (Heat Systems - Ultrasonics) na stupni 4
5. inkubovat vzorek v 50 °C po dobu 30 minut a poté jej krátce protřepat a naředit pufrům A na požadovanou koncentraci fosfolipidu (např. 1 mmol PC/ml); tím jsou připraveny PC-MLV
6. zařízení Liposofast-Basic vyčistit etanolem
7. první polovinu držáku filtrů zasunout do krytu a vložit polykarbonátový filtr s póry 100 nm na „O“ ring
8. přidat druhou část držáku filtrů do krytu tak, aby „O“ ringy byly vidět pozorovacím otvorem
9. utáhnout ručně pevně tak abychom se vyhnuli zkroucení držáku a aby mrtvý objem byl co nejmenší (filtry jsou těsně stlačeny mezi „O“ ringy)
10. zatlačit a současně jemně zašroubovat speciální injekční stříkačky do držáku filtrů (jedna obsahuje MLV)
11. protlačit liposomy přes filtr alespoň 11 krát (lichý počet!!!)
12. odebrat LUV a naředit

Příprava erytrocytárních ghostů

Membrány z erytrocytů byly připraveny modifikovanou metodou dle Dodge et al. [Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.: The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130 (1963)]. Všechny operace se provádějí při 4°C:

1. krev (cca 4 ml) odebrat do ACD roztoku (0,5 ml) a centrifugovat v odběrové zkumavce při 200g (1000 až 1200 RPM na JK23, výkyvný rotor), 20°C, 15 min.
2. odebrat opatrně plazmu obohacenou trombocyty (PRP) i s horní vrstvičkou sedimentu (erymasy) a zbytek erymasy 3 x promýt pufrům A (4°C, 10 min, 1000 g = 3000 RPM na K23)
3. sediment z původních 4 ml krve se rozpipetuje do dvou 50 ml zkumavek, přidá se cca 30 ml hypotonického pufru, pečlivě se promíchá a potom centrifuguje (20000 g, 4°C, 40 min.)
4. ghosty se ještě alespoň 2x promyjí hypotonickým pufrům (poměr buňky:promývací roztok je asi 1:30); pečlivé odstraňování supernatantu je velmi důležité
5. po posledním točení se membrány roztřepou v cca 2 ml pufru A a převedou se do ependorfev v objemu odpovídajícím původnímu objemu krve
6. odebere se vzorek (20 µl) pro stanovení proteinů a fosforu a membrány se dají zamrazit.

Stanovení fosforu v membránách

Fosfát je určován metodou dle [Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234 (1959) 466-468; Wagner, H., Lissau, A., Holzi, J., Horammer, L.: The incorporation of ³²P into inositolphosphatides of the rat brain. J. Lipid Res. 3 (1962) 177-180].

Roztoky:

- 2,5% molybdenan amonný (25 g/l)
- 0,02 M KH₂PO₄ (272,2 mg/100 ml)
- 70% HClO₄
- 10% kyselina askorbová (vždy čerstvá)
- standard: 100x zředěný roztok 0,02 mol/l KH₂PO₄ (1ml+99 ml vody)

Postup:

1. vzorky odpařit pod dusíkem v kalibrovaných zkumavkách

2. vzorek, standard (S1 = 0,25 ml 0,2 mmol/l KH_2PO_4 ; S2 = 0,5 ml 0,2 mmol/l KH_2PO_4) nebo slepý vzorek + 0,30 ml HClO_4 (70%)
3. spalovat v pískové lázni 60 min při 180 °C (standarty se spalovat nemusí)
4. po vychladnutí doplnit do 2,0 ml redestilovanou vodou, třepat
5. přidat 0,25 ml molybdenanu amonného, třepat
6. přidat 0,25 ml kyseliny askorbové, třepat (výsledný objem je 2,5 ml)
7. 5 min vařit ve vodní lázni
8. 5 min chladit v ledové vodě
9. změřit absorbanci A_{vzorek} při 820 nm proti slepému vzorku
10. provést výpočet na základě skutečnosti, že ve standardu S1 je 0,05 μmol fosfátu (P_i), ve standardu S2 je 0,10 μmol P_i :
 - kalibrační faktor f pro 0,05 μmol P_i je:
(průměr z S1 + (průměr z S2/2))/2 = f
 - koncentrace P_i ve vzorku je:
 $c(\mu\text{mol } \text{P}_i/\text{ml}) = c(\text{mmol/l}) = (0,05 \cdot A_{\text{vzorek}})/(f \cdot V)$
kde je V – objem vzorku odebraného pro měření P_i v mililitrech
 - přibližnou koncentraci fosfolipidů ($\text{MW} \cong 752$) v mg/ml dostaneme vydělením této hodnoty $c(\text{mmol/l})$ koeficientem 1,33

Metoda fluorescenčních sond

Pro měření relativních změn fluidity plazmatických membrán byla použita metoda fluorescenčních sond s hydrofobní membránovou sondou 1,6-difeny-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma). DPH byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 6 mmol/l a tento zásobní roztok byl uložen v mrazničce. Pro měření byl připraven vždy čerstvý roztok v pufru A v koncentraci 6 μM DPH (injektováním pomocí Hamiltonovy stříkačky 10 μl za intenzivního míchání). Tento roztok byl smíchán s pufrem A a suspenzí liposomů nebo membrán tak, aby výsledná koncentrace DPH byla 2 μM a koncentrace fosfolipidů cca 100 $\mu\text{mol/l}$ v případě buněčných membrán a 50 $\mu\text{mol/l}$ v případě PC-LUV. Po 60 minutách inkubace v 37°C byla měřena polarizovaná fluorescence (anizotropie fluorescence) při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s polarizačním příslušenstvím. Měření daného vzorku bylo opakováno alespoň 10x a hodnoty byly zprůměrnovány. Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie fluorescence** se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / (I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V)$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H/I_{\parallel}^H$.

Výsledky:

Pro ilustraci jsou v tabulce uvedeny výsledky měření anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH}) v ghostech (při 37 °C) u starších osob trpících hypercholesterolémií. Byla změřena závislost r_{DPH} na době podávání léku snižujícího sérový cholesterol (simvastatinu). Současně byl v membránách změřen poměr cholesterolu k celkovým fosfolipidům (CH/PL). Jak je vidět z tabulky 3.3 bylo měření r_{DPH} mnohem přesnější, než stanovení CH/PL.

Tabulka 3.3 Anizotropie fluorescence sondy DPH v ghostech

SIMVASTATIN doba podávání léku snižujícího sérový cholesterol	GHOSTY						SÉRUM	
	r_{DPH}			poměr cholesterol/fosfolipidy v ghostech			celkový sérový cholesterol	
0	0,2382	±	0,0065	0,756	±	0,137	6,57	± 1,26
1 měsíc	0,2338	±	0,0062	0,804	±	0,111	6,20	± 0,89
2 měsíce	0,2320	±	0,0115	0,711	±	0,085	5,10	± 0,42
13-16 měsíců	0,2316	±	0,0062	0,788	±	0,209	5,02	± 0,39
zdravé kontroly	0,2280	±	0,0067	0,683	±	0,127	3,83 až 5,8	

Anizotropie fluorescence r_{DPH} v liposomech připravených z fosfatidylcholinu je mnohem menší, než r_{DPH} v ghostech. Pro ilustraci jsou v následující tabulce 3.4 uvedeny hodnoty r_{DPH} v PC-LUV (při 37°C) v závislosti na množství imipraminu (antidepresiva) přidaného k liposomům před inkubací s DPH.

Tabulka 3.4 Anizotropie fluorescence sondy DPH ve velkých jednovrstevných liposomech

PC-LUV	
koncentrace imipraminu ($\mu\text{mol/l}$)	r_{DPH}
0	0,08624
0,01	0,08513
0,1	0,08484
1	0,08484
10	0,08550
100	0,09156

3.4. Vlastní fluorescence bílkovin

Vlastní fluorescenci proteinů je způsobena aromatickými aminokyselinami v nich obsaženými: tryptofanem (Trp), tyrozinem (Tyr) a fenylalaninem (Phe). Dominující je fluorescence z tryptofanu, naopak prakticky vůbec se neuplatňuje fenylalanin (viz kap. 2.1). V tomto experimentu jsou změřena fluorescenční excitační a emisní spektra albuminu a čistého tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu.

Vlastnosti L-tryptofanu:

- MW = 204,23
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 295 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 353 \text{ nm}$
- emise Trp je vysoce závislá na polaritě a okolním prostředí

Vlastnosti L-tyrozinu:

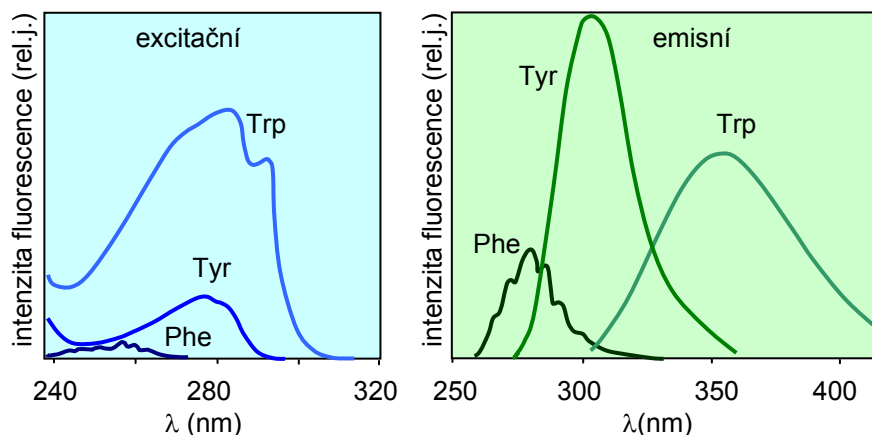
- MW = 181,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 275 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 304 \text{ nm}$
- emise Tyr je relativně málo citlivá na polaritu rozpouštědla

Vlastnosti L-fenylalaninu:

- MW = 165,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 260 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 282 \text{ nm}$
- emise Phe je strukturovaná

Fluorescence proteinů je obvykle excitována při 280 nm nebo při delších vlnových délkách, takže fenylalanin není ve většině experimentů excitován. Navíc je kvantový výtěžek fluorescence Phe velmi malý (kolem 0,02). Tryptofanovou fluorescenci v proteinech lze selektivně excitovat při 295-305 nm.

Obr. 3.8 Fluorescenční spektra tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr) a fenylalaninu (Phe)



(Podle: Lakowicz 1999.)

Materiál:

- L-tryptofan (Aldrich), L-tyrozin (Fluka), L-fenylalanin (Fluka)
- lidský albumin (MW = 69000)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

1. Připravte zásobní roztoky 10 mmol/l Trp, 10 mmol/l Tyr, 10 mmol/l Phe a 0,25 mmol/l albuminu v pufru A.
2. Pro vlastní měření je nařed'te puforem A na koncentrace 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp, 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr, 10 mmol/l Phe a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu.
3. Změřte excitační a emisní spektra vzorků za podmínek uvedených v tabulce 3.5

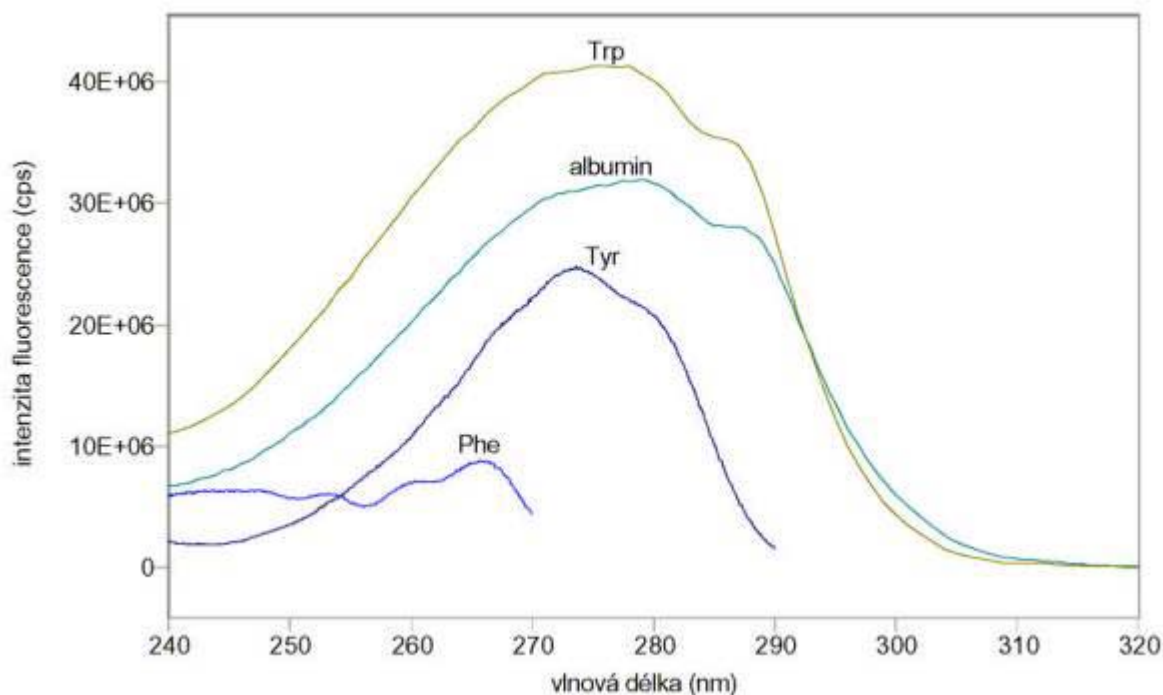
Tabulka 3.5

	excitační spektrum		emisní spektrum	
	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
L-tryptofan	350	240-320	280	300-420
L-tyrozin	300	240-290	270	280-360
L-fenylalanin	280	240-270	250	260-360
albumin	350	240-320	280	300-420

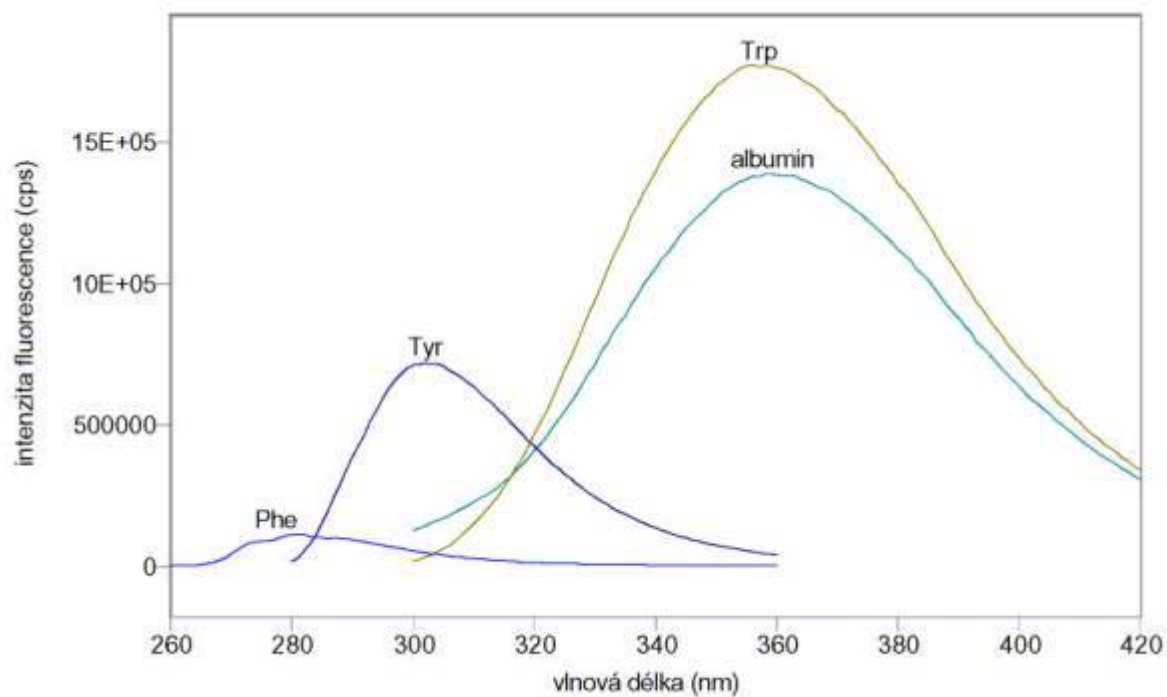
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra vlastní fluorescence tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr), fenylalaninu (Phe) a albuminu v pufru A jsou na obr. 3.9 a 3.10. Je vidět, že prakticky veškerá vlastní fluorescence albuminu pochází od tryptofanu. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.9 Excitační spektra 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp ($\lambda_{em} = 350$ nm), 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr ($\lambda_{em} = 300$ nm), 10 mmol/l Phe ($\lambda_{em} = 280$ nm) a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu ($\lambda_{em} = 350$ nm).



Obr. 3.10 Emisní spektra 20 $\mu\text{mol/l}$ Trp ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$), 100 $\mu\text{mol/l}$ Tyr ($\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$), 10 mmol/l Phe ($\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$) a 5 $\mu\text{mol/l}$ albuminu ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$).



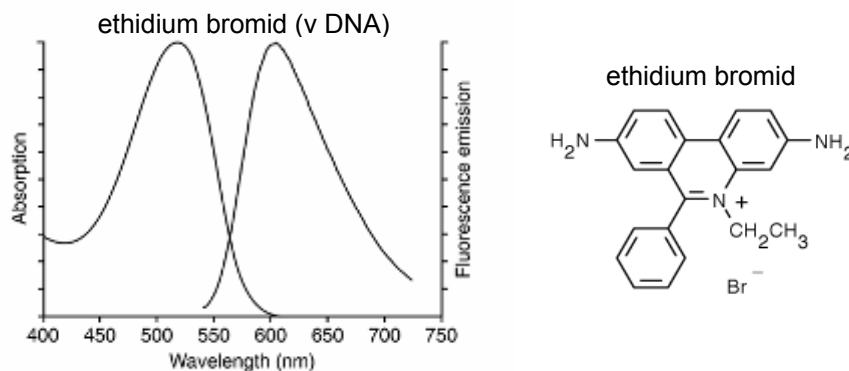
3.5. Fluorescenční značení DNA

Nukleotidy a nukleové kyseliny obecně nefluoreskují. Pro jejich vizualizaci a identifikaci se proto používá řada fluorescenčních sond (viz kap. 2.2.2 a Tabulka 2.6). V tomto experimentu je ukázána možnost použití sondy ethidium bromidu pro barvení jader neživých buněk granulocytů nebo lymfocytů.

Vlastnosti sondy ethidium bromidu:

- MW = 394,31
- dobře rozpustný ve vodě
- ve vodě fluoreskuje málo, po navázání k DNA se fluorescence zvyšuje asi 30 krát
- doba dohasínání fluorescence ve vodě je asi 1,7 ns, po vazbě k dvouřetězcové DNA se zvyšuje na 20 ns
- vazba k DNA se uskutečňuje vmezeřováním rovinného aromatického kruhu mezi páry bází dvouřetězcové DNA
- absorpční maximum v DNA: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 523 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum v DNA: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 604 \text{ nm}$

Obr. 3.11 Fluorescenční spektra ethidium bromidu



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- ethidium bromid (EB, Merck)
- plná krev
- dextran
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- centrifuga
- termostat
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- fosfátový pufr (PBS, pH 7,4)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- ACD roztok (0,8% kyselina citrónová, 2,2% citrát sodný (Na₃C₆H₅O₇), 2,4% glukóza, pH 4,3)

Postup:

Izolace granulocytů z krve

1. krev odebrat do ACD roztoku (v objemovém poměru 1:9)
2. v umělohmotné injekční stříkačce promíchat 4 díly krve a 1 díl 6% dextranu v PBS
3. nechat (stříkačku špičkou vzhůru) 30 minut v 37°C, potom vytlačit plazmu
4. promýt v PBS (centrifugace 20 min při 1500 RPM na JK23)
5. je-li příměs erytrocytů provést hypotonní lýzu (0,25 ml vzorku + 0,75 ml vody, při 37°C po 10 s, potom přidat koncentrovaný NaCl)

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 2 ml krve a 2 ml pufru A
3. přidat 3 ml Ficoll-Paque Plus do zkumavky a opatrně navrstvit 4 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C
5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 2 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7$ /ml

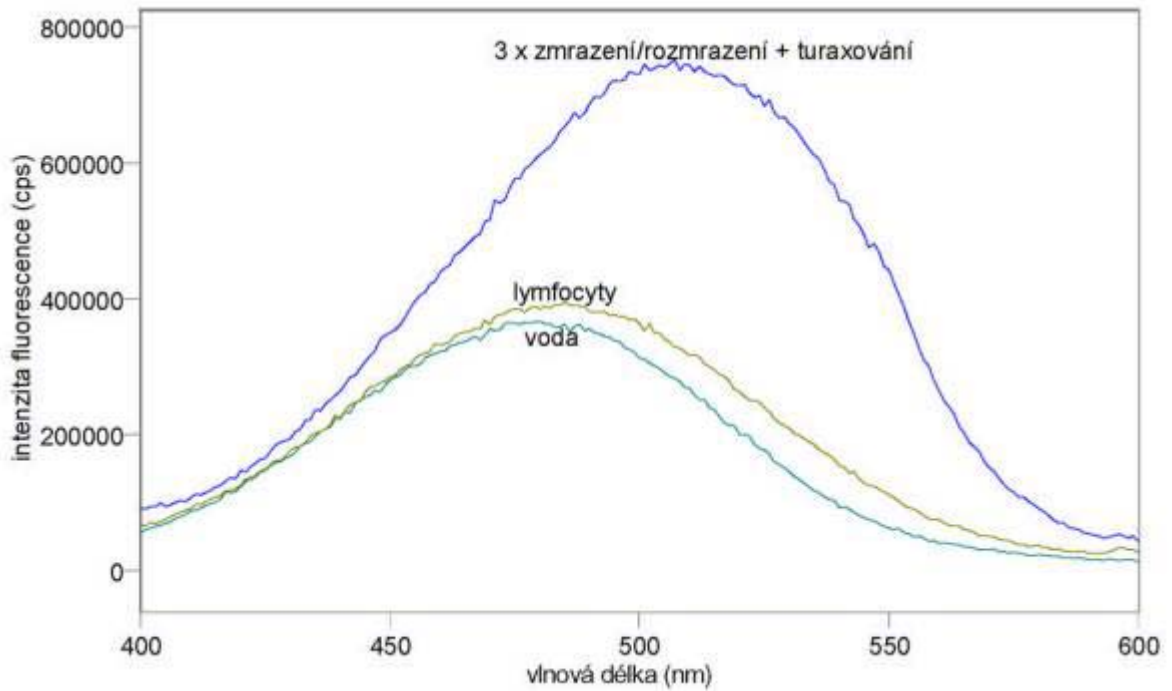
Barvení DNA ethidium bromidem:

1. připravit zásobní roztok ethidium bromidu ve vodě (2,5 mmol/l)
2. smíchat pufr A, granulocyty nebo lymfocyty a ethidium bromid, tak aby výsledné koncentrace byly cca 10^6 buněk/ml a 10 μ mol/l ethidium bromidu
3. změřit excitační fluorescenční spektrum při $\lambda_{em} = 610$ nm a emisní spektrum při $\lambda_{ex} = 520$ nm
4. vzorek několikrát rychle zmrazit a rozmrazit, krátce turaxovat a znovu měřit excitační a emisní spektra

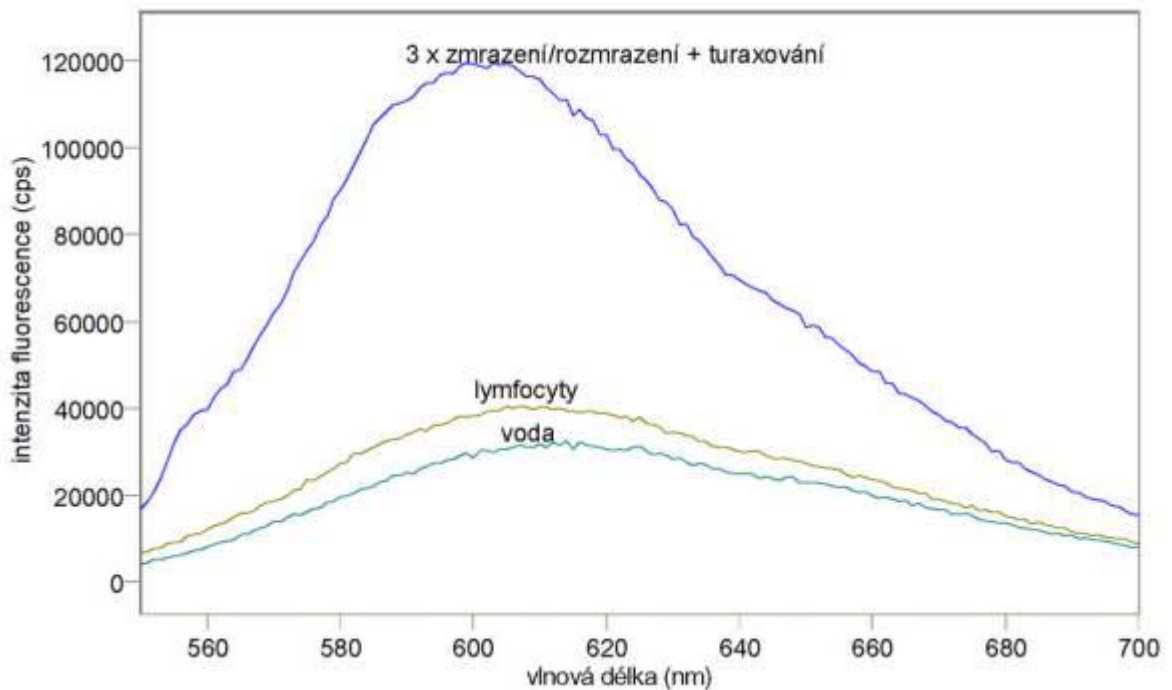
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra ethidium bromidu ve pufru A, po přidání lymfocytů a po vazbě k jejich DNA jsou uvedena na obr. 3.12 a 3.13. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Obr. 3.12 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ ethidium bromidu ve vodě a v DNA lymfocytů ($\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$).



Obr. 3.13 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ ethidium bromidu ve vodě a v DNA lymfocytů ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$).



3.6. Kalcium

Kalciové sondy jsou nejčastěji používané nitrobuněčné indikátory (viz kap. 2.3.5). Protože neprocházejí buněčnou membránou, dostávají se do buněk mikroinjekcí nebo elektroporací, nebo jako acetoxymetylestery (AM estery), které jsou uvnitř buňky štěpeny nitrobuněčnými esterázami za vzniku negativně nabitých sond.

V tomto experimentu jsou vyzkoušeny vlastnosti dvou sond pro měření Ca^{2+} : Fluo-3 a Quin-2. Po vazbě kalcia vykazuje Quin-2 jak změnu intenzity fluorescence, tak posuv absorpčního maxima, Fluo-3 téměř nefluoreskuje za nepřítomnosti Ca^{2+} . Jedná se tedy o sondy, pro něž je koncentrace Ca^{2+} dána vztahem (viz kap. 2.3.5):

$$(2.17) \quad c_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$

kde je K_d – disociační konstanta vazebného místa pro kalcium na indikátoru, I_{\min} – intenzita fluorescence indikátoru, když není navázán žádný vápník, I_{\max} – intenzita fluorescence plně obsazeného indikátoru, I – intenzita fluorescence ve vzorku, kde je jen část vazebných míst indikátoru obsazena Ca^{2+} . Měření I_{\max} vyžaduje lýzu buněk a titraci uvolněného indikátoru nebo použití ionoforů, aby došlo k saturaci nitrobuněčného indikátoru kalcie.

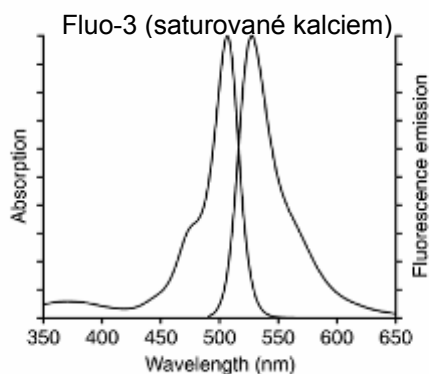
Vlastnosti sondy Quin-2:

- MW = 541,51 (pro bezvodou látku)
- mírná rozpustnost ve vodě (pH > 6)
- neprostupuje membránou, ale prodává se i AM ester (Quin-2, AM), který membránou prostupuje
- kvantový výtěžek fluorescence volné formy je 0,03; po navázání kalcia vzrůstá na 0,14
- doba dohasínání fluorescence volné formy je 1,35 ns, po vazbě Ca^{2+} se zvyšuje na 11,6 ns
- absorpční maximum volné formy 356 nm, vázané formy 336 nm
- fluorescenční emisní maximum volné formy 500 nm, vázané formy 503 nm
- disociační konstanta $K_d = 60,0 \text{ nmol/l}$

Vlastnosti sondy Fluo-3:

- MW = 769,5 (Fluo-3 tetraoctová kyselina)
- rozpustná ve vodě (pH > 6)
- neprostupuje membránou, ale prodává se i AM ester (Fluo-3, AM), který membránou prostupuje
- kvantový výtěžek fluorescence se po navázání kalcia zvýší asi 40 krát
- doba dohasínání fluorescence volné formy je 0,04 ns, po vazbě Ca^{2+} se zvyšuje na 1,28 ns
- absorpční maximum 504 nm
- fluorescenční emisní maximum 526 nm
- disociační konstanta $K_d = 390 \text{ nmol/l}$

Obr. 3.14 Absorpční a fluorescenční spektrum sondy Fluo-3 saturované kalcium



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- Quin-2 (Sigma), Fluo-3 (Fluka)
- CaCl_2 (MW = 110,99)
- EGTA
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

1. Quin-2 a Fluo-3 rozpusťte ve vodě (pH>6) v koncentraci 2 mmol/l
 2. CaCl_2 rozpusťte ve vodě v koncentracích 10 mmol/l a 10 $\mu\text{mol/l}$
 3. připravte 1 mmol/l EGTA ve vodě
 4. smíchejte vodu, sondu a CaCl_2 dle Tabulky 3.6 a změřte
 - excitační spektra Fluo-3 při $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$; emisní spektra Fluo-3 při $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$
 - excitační spektra Quin-2 při $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$; emisní spektra Quin-2 při $\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}$
- místo měření spekter můžete měřit jen intenzitu fluorescence:
- Fluo-3 při $\lambda_{\text{ex}} = 504 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$
 - Quin-2 při $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$

Tabulka 3.6

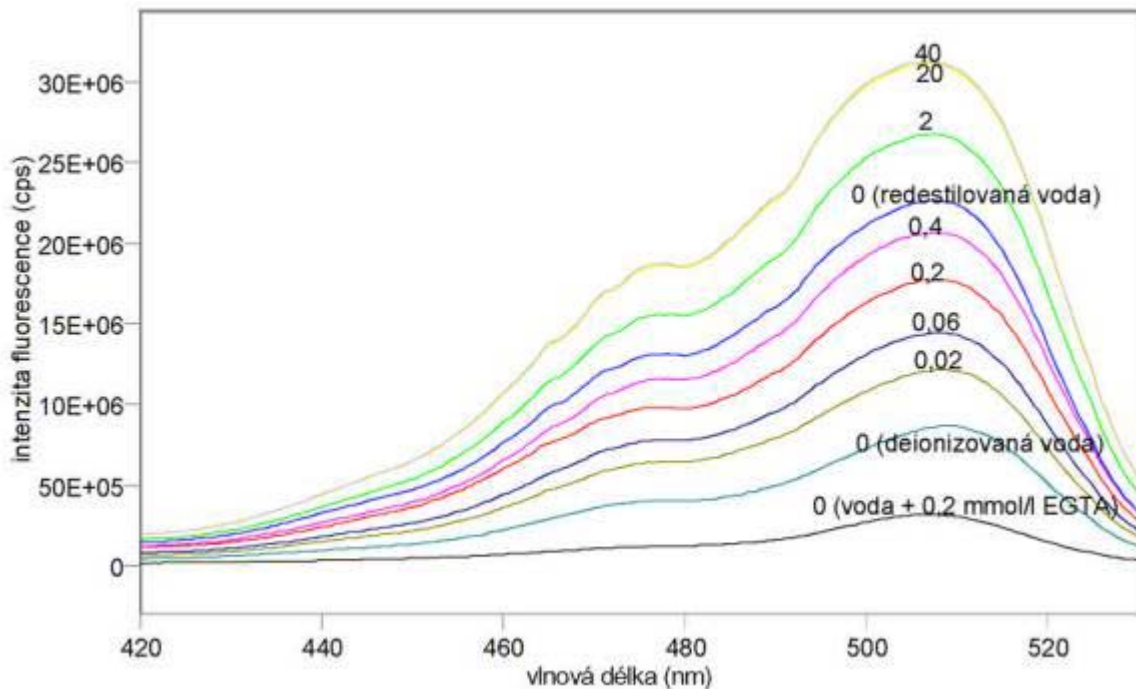
voda (μl)	Fluo-3 (μl)	Quin-2 (μl)	CaCl_2 10 $\mu\text{mol/l}$ (μl)	CaCl_2 10 mmol/l (μl)	EGTA 1 mmol/l (μl)	výsl. konc. Ca^{2+} ($\mu\text{mol/l}$)
3975	25	0	0	0	1000	0
4975	25	0	0	0	0	0
4945	25	0	30	0	0	0,06
4775	25	0	200	0	0	0,4
4974	25	0	0	1	0	2
4965	25	0	0	10	0	20
4955	25	0	0	20	0	40
4925	25	0	0	50	0	100
3975	0	25	0	0	1000	0
4975	0	25	0	0	0	0
4945	0	25	30	0	0	0,06
4965	0	25	0	10	0	20
4955	0	25	0	20	0	40

Poznámka: Do vzorku s nulovou koncentrací přidaného CaCl_2 byl přidán 0,2 mmol/l EGTA pro vychytání iontů Ca^{2+} .

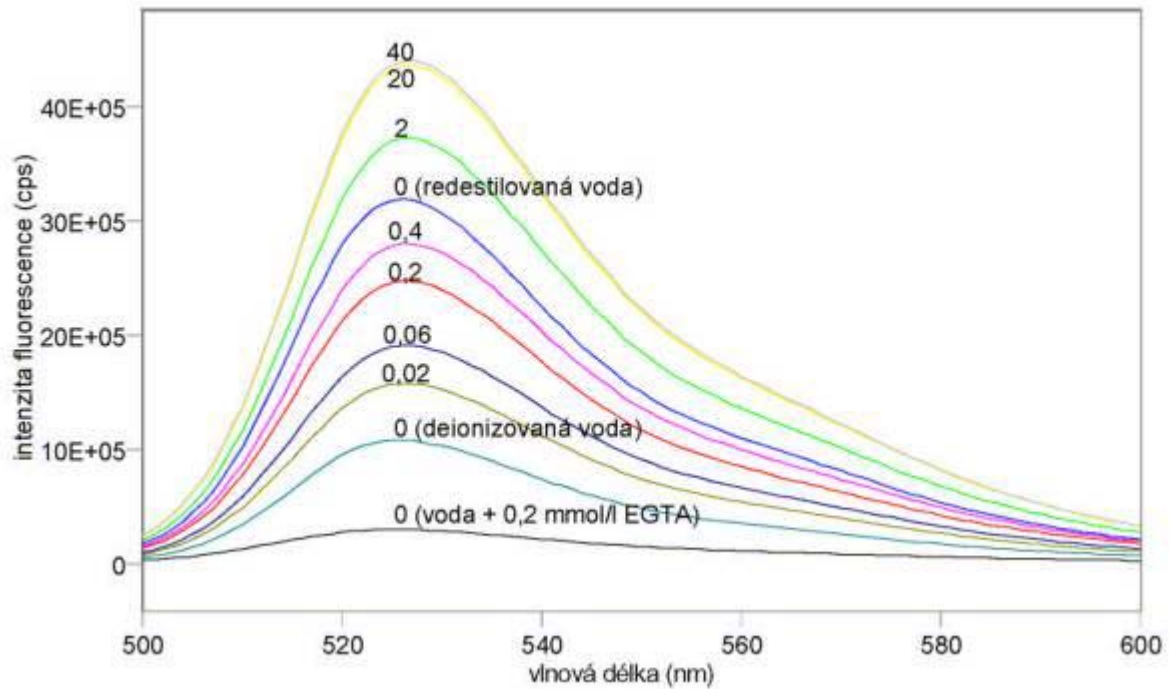
Výsledky:

Změřená excitační a emisní spektra sondy Fluo-3 při různých koncentracích kalcia jsou uvedena na obr. 3.15 a 3.16. Excitační a emisní spektra sondy Quin-2 při různých koncentracích kalcia jsou uvedena na obr. 3.17 a 3.18. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3. Výsledky mimo jiné ukazují, že v použité redestilované vodě byly přítomny ionty Ca^{2+} , které měření při nízkých koncentracích CaCl_2 zkreslily. Je vhodnější použít deionizovanou vodu. Jak se dalo předpokládat z hodnot disociačních konstant, je sonda Quin-2 citlivější na změny koncentrací kalcia při jeho nižších koncentracích (kolem 0,06 $\mu\text{mol/l}$), zatímco sonda Fluo-3 je nejcitlivější při vyšších koncentracích Ca^{2+} (kolem 0,4 $\mu\text{mol/l}$).

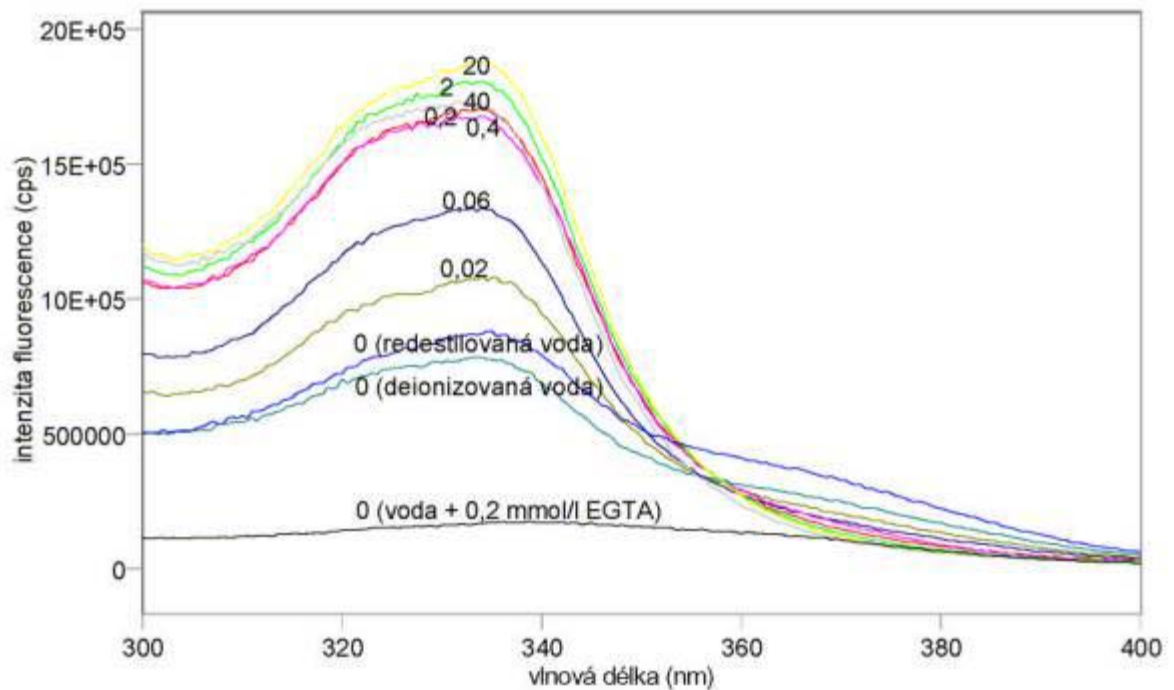
Obr. 3.15 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-3 ($\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



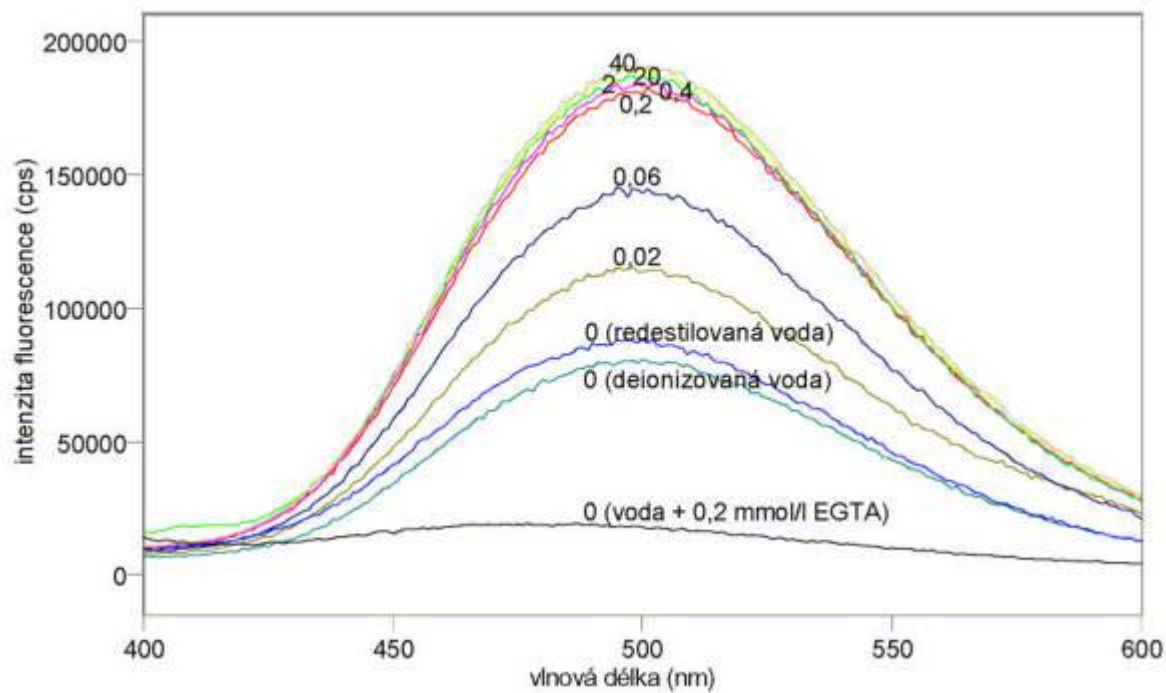
Obr. 3.16 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-3 ($\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



Obr. 3.17 Excitační fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Quin-2 ($\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



Obr. 3.18 Emisní fluorescenční spektra 10 $\mu\text{mol/l}$ Quin-2 ($\lambda_{\text{ex}} = 336 \text{ nm}$) při různých koncentracích CaCl_2 ($\mu\text{mol/l}$).



3.7. Membránový potenciál

V tomto experimentu je popsán jednoduchý způsob detekce změn membránového potenciálu živých buněk pomocí fluorescenčních sond citlivých na elektrický potenciál přes membránu (viz. kap. 2.3.7). Experiment je proveden s buňkami lymfocytů izolovaných z periferní krve a potenciálovou fluorescenční sondou 3,3'-dihexyloxakarbocyanin jodidem (DiOC₆(3)). Změna membránového potenciálu je indukována valinomycinem, vysokými koncentracemi mimobuněčného KCl, ouabainem a Tritonem X 100.

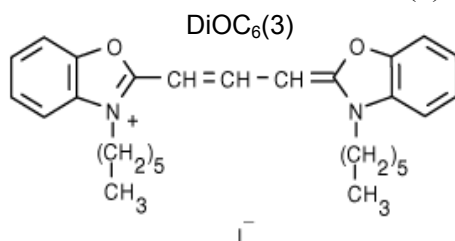
Triton X 100 je neiontový detergent, který rozpouští membrány a tvoří micely s membránovými lipidy a proteiny. **Ouabain** je inhibitor Na⁺K⁺-ATPázy. **Valinomycin** je ionofor přenašečového typu pro K⁺, tzn. zvyšuje permeabilitu membrán tím, že selektivně váže ion K⁺, difunduje membránou a uvolňuje K⁺ na druhé straně membrány (tento efekt se může uplatňovat jen do vyrovnání koncentrací iontů K⁺ na obou stranách membrány).

Sonda DiOC₆(3) je citlivá na membránový potenciál jak plazmatické membrány, tak i mitochondriální membrány [Salvioli et al.: FEBS Letters 411, 77-82, 1997]. Pro měření změn mitochondriálního membránového potenciálu se proto musí použít specifické mitochondriální inhibitory [Kalbacová et al.: Cytometry 52A, 110-116, 2003].

Vlastnosti sondy DiOC₆(3):

- MW = 572,53
- nízká rozpustnost ve vodě
- patří do skupiny karbocyaninových potenciometrických fluorescenčních sond s pomalou odezvou
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimetylsulfoxid (DMSO) nebo etanol (EtOH)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $154000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 501 \text{ nm}$
- pracovní koncentrace se udává 40-200 nmol/l
- prochází buněčnou membránou
- může být použita pro značení jak mitochondrií, tak endoplazmatického retikula (po uvolnění sondy z mitochondrií)

Obr. 3.19 Potenciálová sonda DiOC₆(3)



Materiál:

- DiOC₆(3) jodid (Sigma)
- valinomycin (MW = 1111,36, Sigma)

- ouabain (MW = 584,2, Sigma)
- Triton X 100 (Merck)
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- centrifuga
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4) s 1% glukózou
- pufr B (120 mmol/l NaCl, 120 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4) s 1% glukózou
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 10 ml krve a 10 ml pufru A
3. přidat 15 ml Ficoll-Paque Plus do průhledné centrifugační kyvety a opatrně navrstvit 20 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C
5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 10 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7$ /ml

Měření změn membránového potenciálu:

1. připravte zásobní roztok 10 mmol/l DiOC₆(3) jodidu v DMSO a z něj pracovní roztok 0,1 mmol/l v etanolu
2. připravte tyto zásobní roztoky: 1 mmol/l valinomycin v etanolu, 2 mmol/l ouabain v pufru A, 10% Triton X 100 v pufru A
3. proveďte tato měření:
 - A) časová závislost fluorescence sondy po přidání k lymfocytům:
 - připravte vzorky s výslednými koncentracemi 10 μmol/l DiOC₆(3), 10⁶ lymfocytů/ml
 - změřte excitační a emisní spektra DiOC₆(3) v samotném pufru A a v časech 1, 5, 10 a 30 minut po přidání lymfocytů
 - B) vliv depolarizace membrány na fluorescenci DiOC₆(3):
 - smíchejte jednotlivé složky podle Tabulky 3.7 ve výsledných koncentracích: 10⁶ lymfocytů/ml, 0,2 μmol/l DiOC₆(3), 1 μmol/l valinomycin, 100 μmol/l ouabain, 0,01% Triton X 100
 - inkubujte ve tmě 30 min v 37 °C
 - promyjte dvakrát v pufru A nebo B (centrifugací 10 min, 100 g, 20 °C) a sediment resuspendujte v původním objemu pufru A nebo B
 - s polarizátorem orientovaným svisle a analyzátozem pootočeným o „magický“ úhel 54,74° změřte excitační a emisní spektra nebo intenzitu fluorescence DiOC₆(3) při buzení $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 519 \text{ nm}$; při 37 °C
 - C) vliv Tritonu X 100 na fluorescenci DiOC₆(3):
 - změřte excitační a emisní spektra DiOC₆(3) v pufru A bez lymfocytů v přítomnosti 0,01% a 0,1% Tritonu X 100

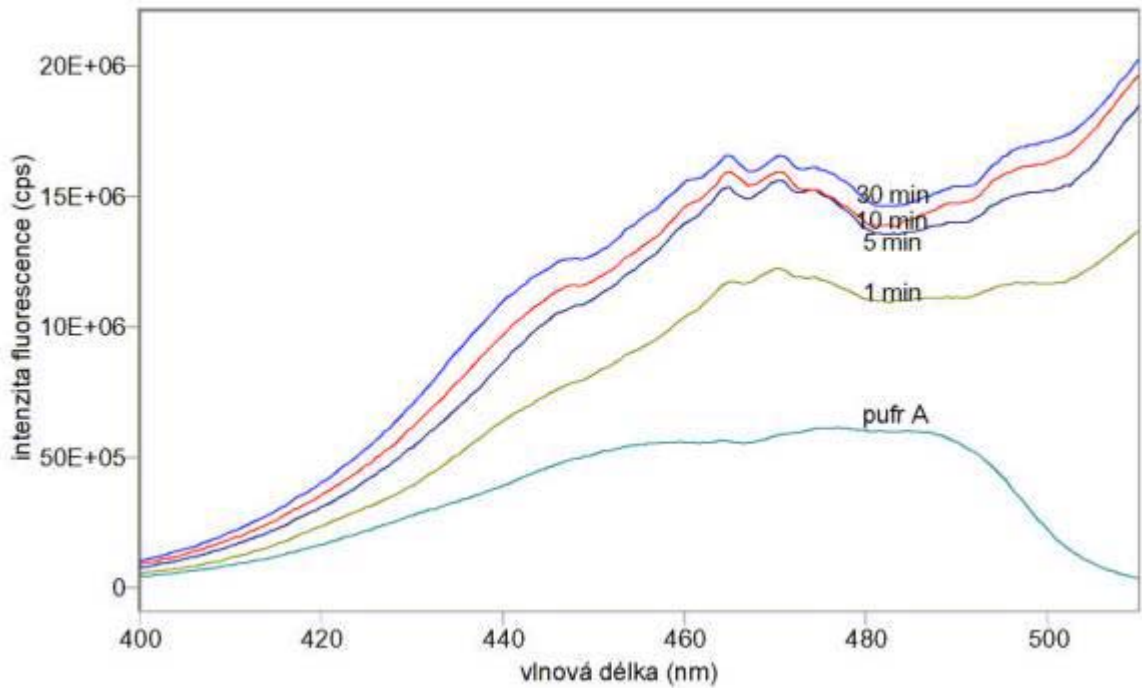
Tabulka 3.7

č.	pufr A	pufr B	lymfocyty	valinomycin	ouabain	Triton X 100	DiOC ₆ (3)
1	4890	0	100	0	0	0	10
2	4885	0	100	5	0	0	10
3	4640	0	100	0	250	0	10
4	4885	0	100	0	0	5	10
5	0	4890	100	0	0	0	10
6	0	4885	100	5	0	0	10

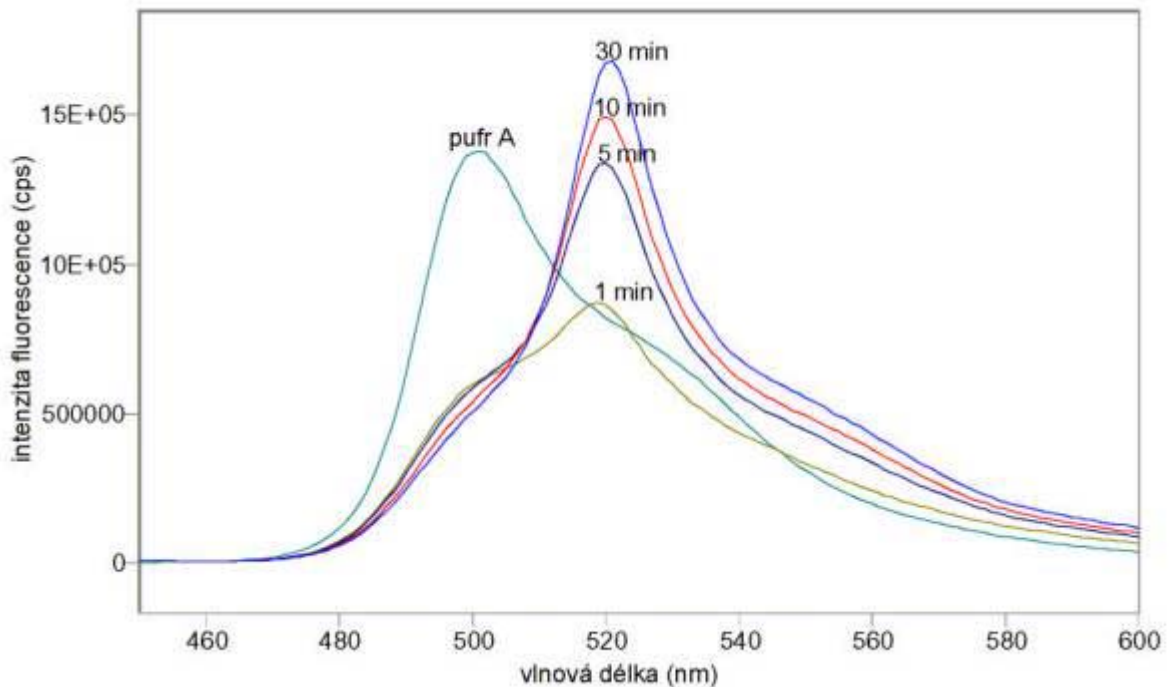
Výsledky:

- A) Na obr. 3.20 a 3.21 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) v koncentraci 10 μmol/l v samotném pufru A bez buněk a v různých časech po přidání lymfocytů v koncentraci 10⁶/ml. Na obr. 3.22 jsou emisní spektra téhož vzorku v různých časech po přidání 0,01% Tritonu X 100. Při těchto měřeních nebyla odstraňována volná sonda.
- B) Na obr. 3.23 a 3.24 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) přidané k lymfocytům v konečné koncentraci 200 nmol/l a vliv depolarizace membrány na tato spektra po přidání valinomycinu, ouabainu nebo Tritonu X 100 (dle Tabulky 3.7). Výsledky ukazují, že na fluorescenci DiOC₆(3) v lymfocytech nemá valinomycin výrazný vliv, zatímco depolarizace způsobená inkubací buněk s ouabainem nebo v pufru s vysokým obsahem K⁺ způsobuje výrazné snížení fluorescence této sondy. Největší změna byla způsobena Tritonem X 100, který ale buňky zcela likviduje. Ve všech případech byly lymfocyty po 30 minutové inkubaci v 37 °C dvakrát promyty puftrem pro odstranění mimobuněčné sondy.
- C) Na obr. 3.25 a 3.26 jsou excitační a emisní spektra sondy DiOC₆(3) přidané k pufru A (bez buněk) v konečné koncentraci 200 nmol/l před a po přidání různých koncentrací Tritonu X 100. Výsledky ukazují, že samotný detergent velmi zvyšuje kvantový výtěžek fluorescence sondy DiOC₆(3), což se musí brát v úvahu v experimentech, kdy Triton X 100 není dostatečně odmyt ze vzorku.

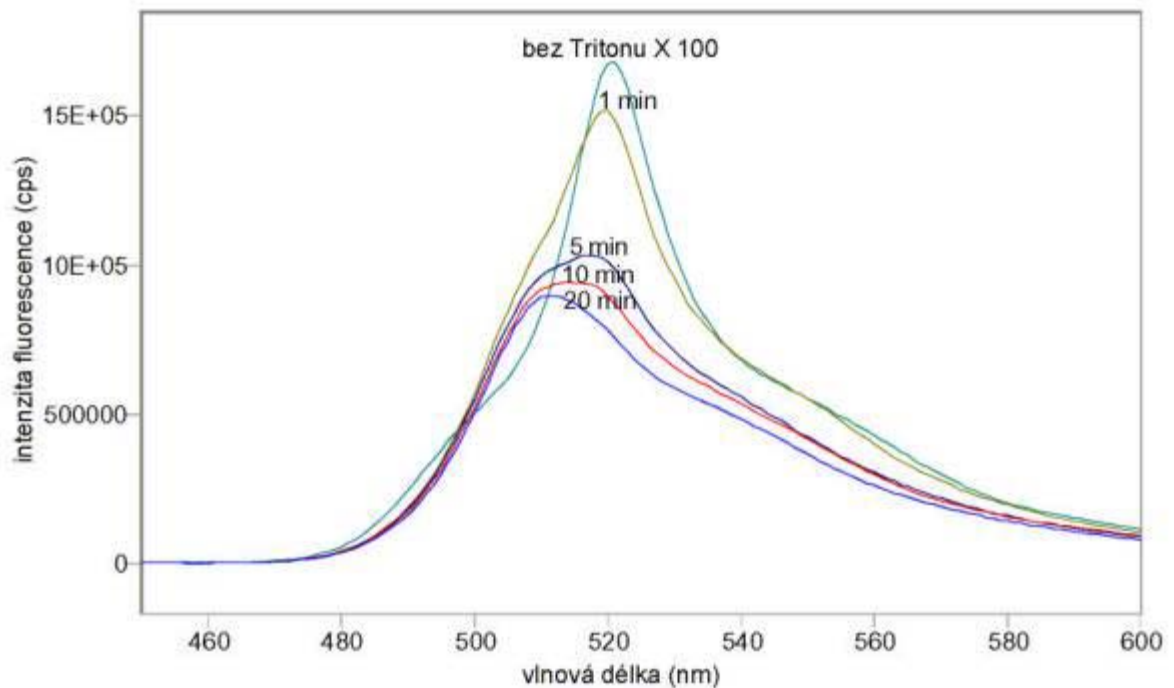
Obr. 3.20 Excitační spektra ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A před přidáním a v různých časech po přidání lymfocytů



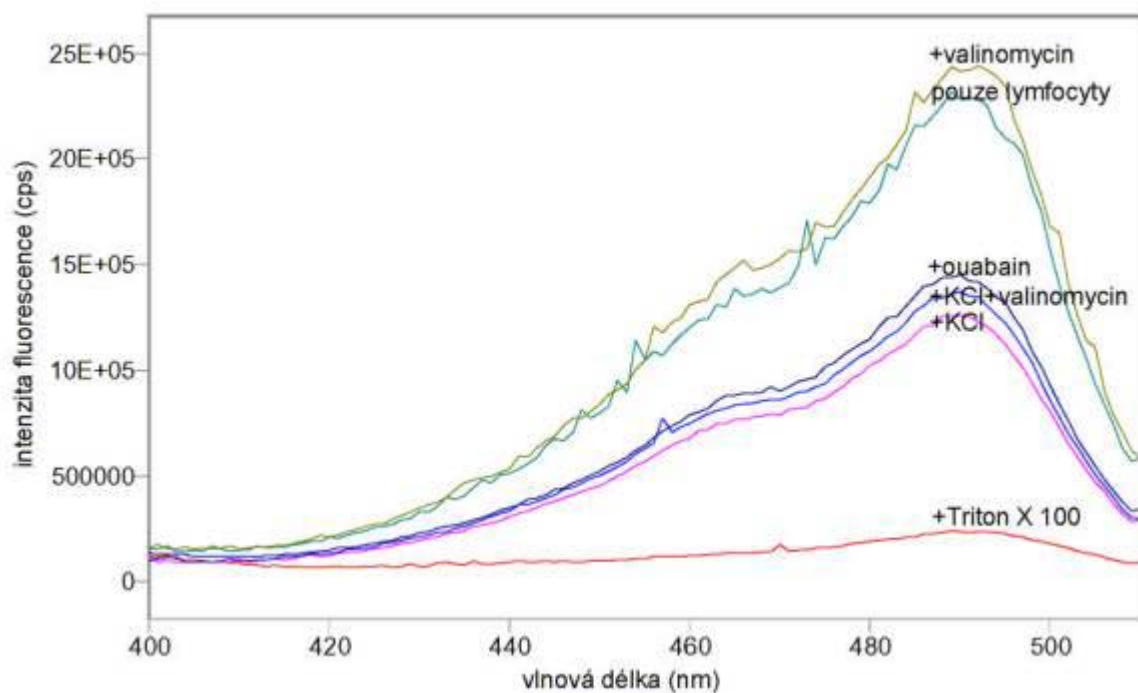
Obr. 3.21 Emisní spektra ($\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A před přidáním a v různých časech po přidání lymfocytů



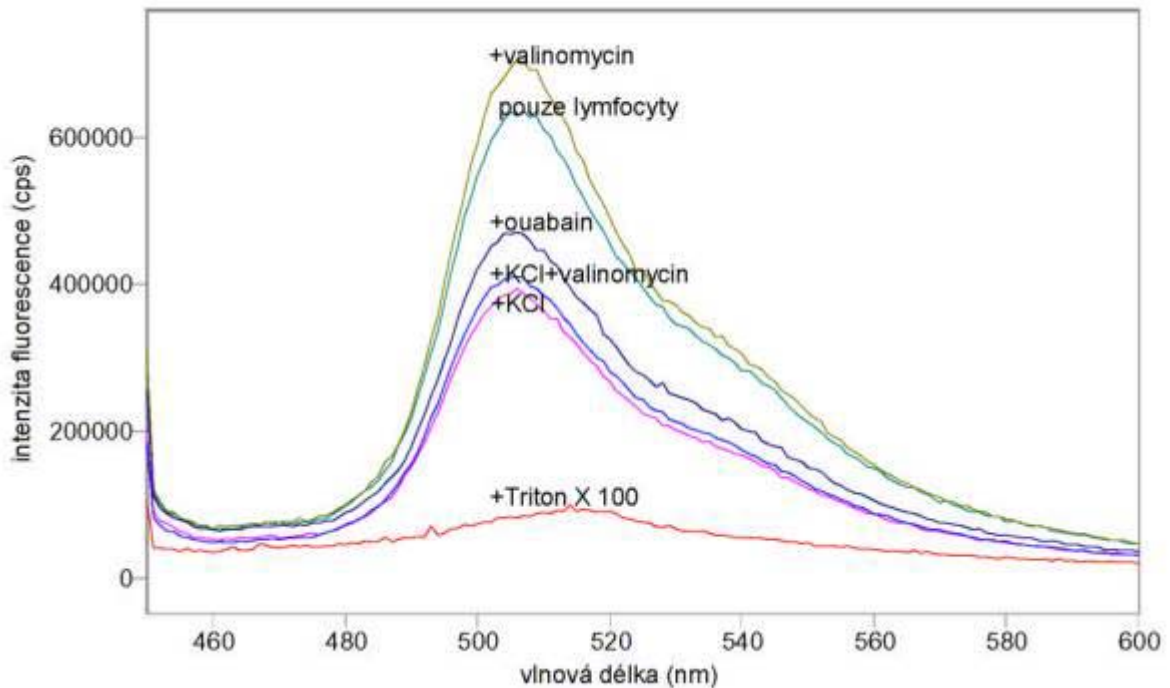
Obr. 3.22 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A s lymfocyty před přidáním a v různých časech po přidání 0,01% Tritonu X 100



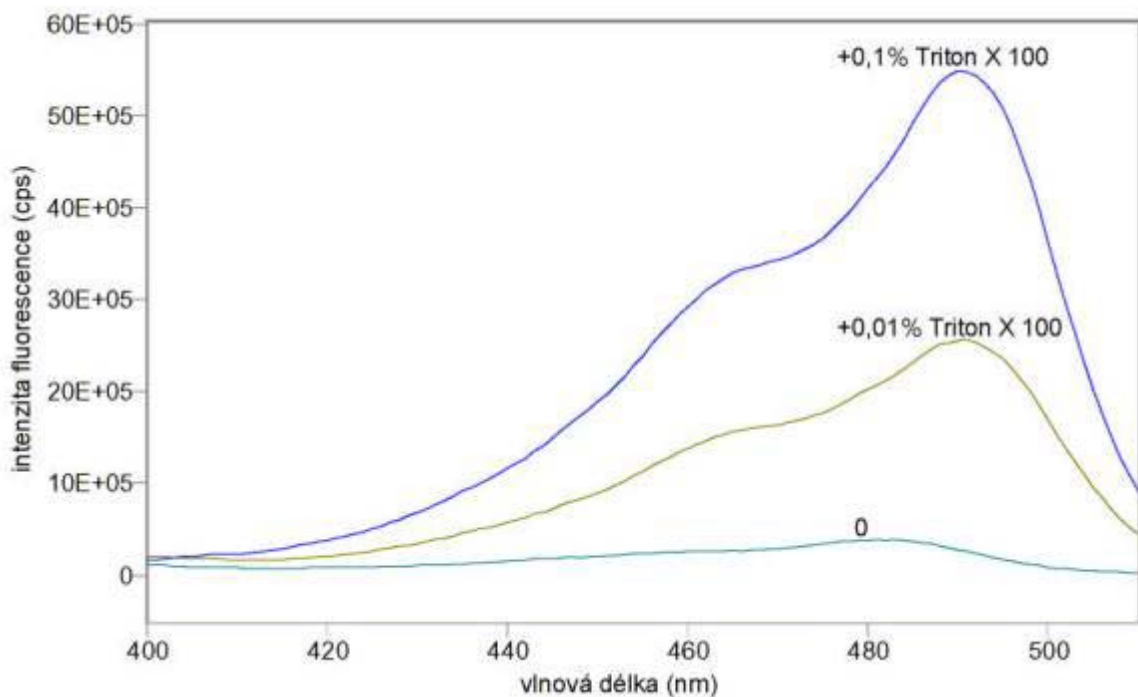
Obr. 3.23 Excitační spektra ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v lymfocytech inkubovaných: 1) v pufru A (pouze lymfocyty), 2) s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem v pufru A (+valinomycin), 3) se 100 $\mu\text{mol/l}$ ouabainem v pufru A (+ouabain), 4) s 0,01% Tritonem X 100 v pufru A (+Triton X 100), 5) v pufru B (+KCl) a 6) v pufru B s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem (+KCl+valinomycin)



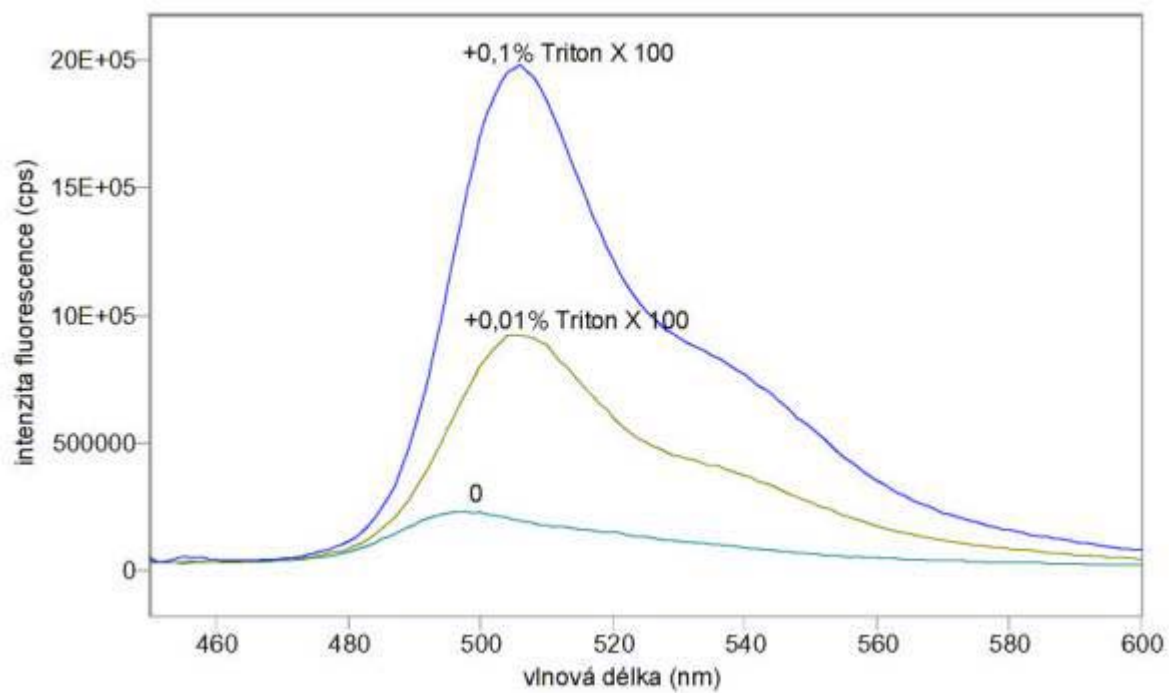
Obr. 3.24 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v lymfocytech inkubovaných: 1) v pufru A (pouze lymfocyty), 2) s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem v pufru A (+valinomycin), 3) se 100 $\mu\text{mol/l}$ ouabainem v pufru A (+ouabain), 4) s 0,01% Tritonem X 100 v pufru A (+Triton X 100), 5) v pufru B (+KCl) a 6) v pufru B s 1 $\mu\text{mol/l}$ valinomycinem (+KCl+valinomycin)



Obr. 3.25 Excitační spektra ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A při různých koncentracích Tritonu X 100



Obr. 3.26 Emisní spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) potenciálové sondy DiOC₆(3) v pufru A při různých koncentracích Tritonu X 100



3.8. Změny pH

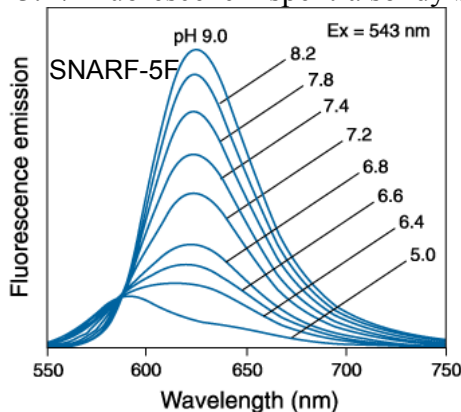
Sondy pro měření změn pH jsou popsány v kapitole 2.3.6..V tomto experimentu je ilustrována citlivost fluorescenčních sond pro měření pH. s použitím sondy SNARF-5F.

SNARF-5F patří do skupiny **seminaftorhodafluorů**, což je relativně nová skupina fluorescenčních indikátorů pH vyznačující se výraznými posuvy jak v absorpčním, tak v emisním spektru. Jedná se o sondy vhodné pro tzv. poměrná měření, kdy z poměru intenzit fluorescence měřené při dvou různých vlnových délkách emise lze zjistit pH okolního prostředí. Fluorescenční je jak kyselá, tak zásaditá forma těchto sond. Pro lepší prostupnost dovnitř živých buněk lze použít jejich acetoxymetylové (AM) nebo acetátové estery.

Vlastnosti sondy SNARF-5F:

- MW = 471,44
- nízká rozpustnost ve vodě
- zásobní roztok: pH>6
- patří do skupiny seminaftorhodafluorů
- absorpční maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 555 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $27000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 590 \text{ nm}$
- absorpční maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 579 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $49000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 630 \text{ nm}$
- $\text{pK}_a = 7,2$

Obr 3.27 Fluorescenční spektra sondy SNARF-5F při různých pH



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Materiál:

- SNARF®-5F 5-(a 6)-karboxylová kyselina (Molecular Probes)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...
- pufrů s upraveným pH 5 až 9

Postup:

1. připravte zásobní roztok 2 mmol/l SNARF-5F v DMSO (dimetylsulfoxid)
2. do 5 ml pufru (pH = 5 – 9) přidejte (Hamiltonovou stříkačkou) 10 μl sondy SNARF-5F v konečné koncentraci 4 $\mu\text{mol/l}$

3. změřte excitační fluorescenční spektra vzorků při $\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$
4. změřte emisní fluorescenční spektra vzorků při $\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$

Výsledky:

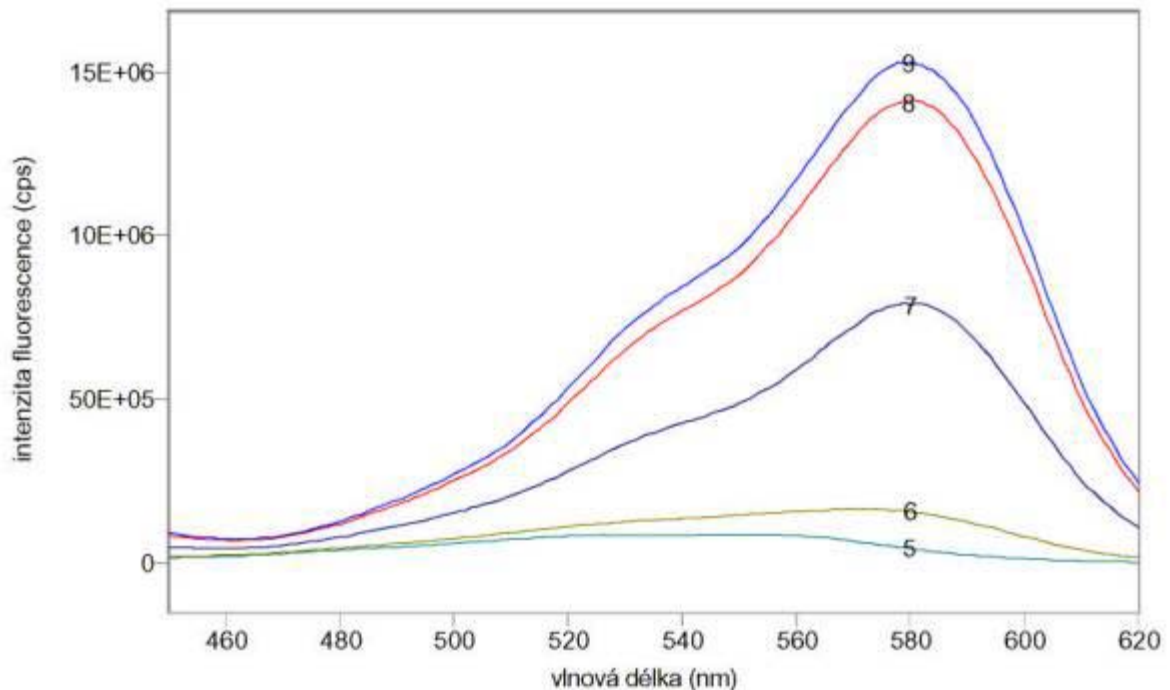
Změřená excitační a emisní spektra sondy SNARF-5F při různých pH jsou uvedena na obr. 3.28 a 3.29. Měření byla provedena na spektrofluorimetru FluoroMax-3.

Sondy typu SNARF lze použít pro měření pH změřením poměru intenzit fluorescence při emisních vlnových délkách 580 a 640 nm; závislost poměru emisních intenzit na pH není lineární, jak je vidět z obr. 3.30. Kalibraci fluorescenční odezvy SNARF-5F lze provést pomocí pufrů s různými pH, v nichž je měřen poměr intenzit fluorescence při dvou různých vlnových délkách ($\lambda_1=580 \text{ nm}$, $\lambda_2=640 \text{ nm}$):

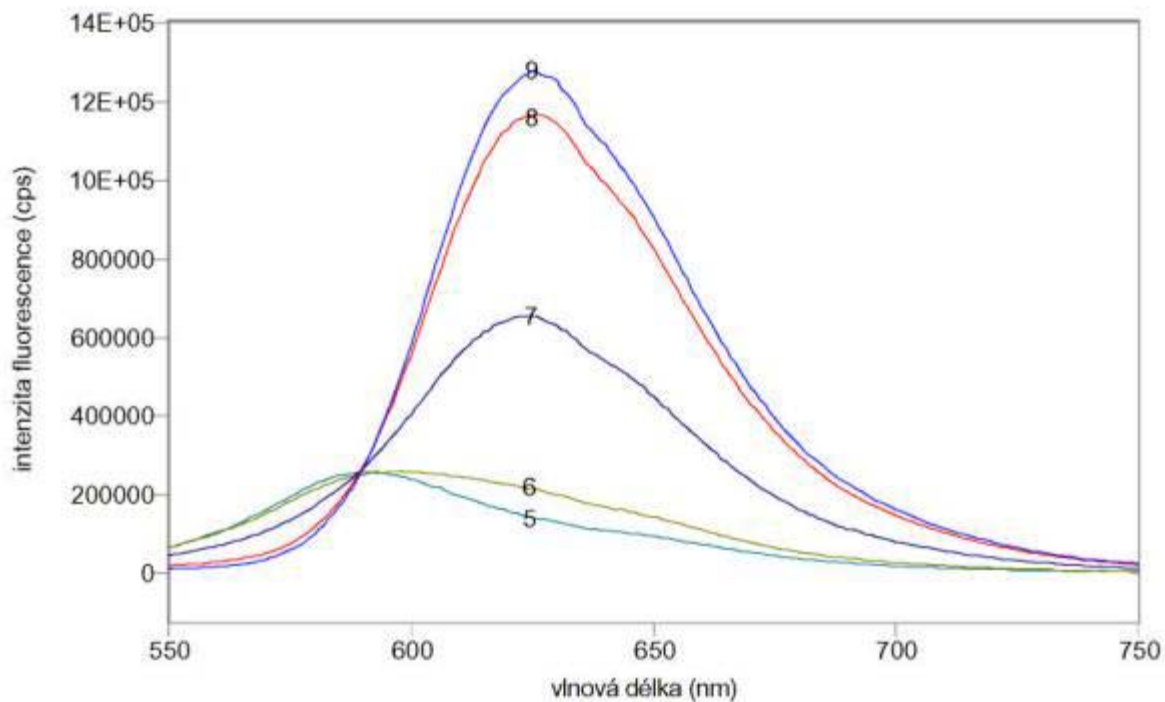
$$(3.1) \quad \text{pH} = \text{p}K_a - \log\left[\frac{(R-R_B)}{(R_A-R)} \cdot \frac{I_B(\lambda_2)}{I_A(\lambda_2)}\right]$$

kde je R poměr intenzit fluorescence při dvou různých vlnových délkách ($I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$), indexy A a B označují limitní hodnoty v kyselé a zásadité oblasti titrační křivky; pro SNARF-5F je $\text{p}K_a=7,2$. Korekce na fluorescenci pozadí musí provedena před výpočtem poměrů R.

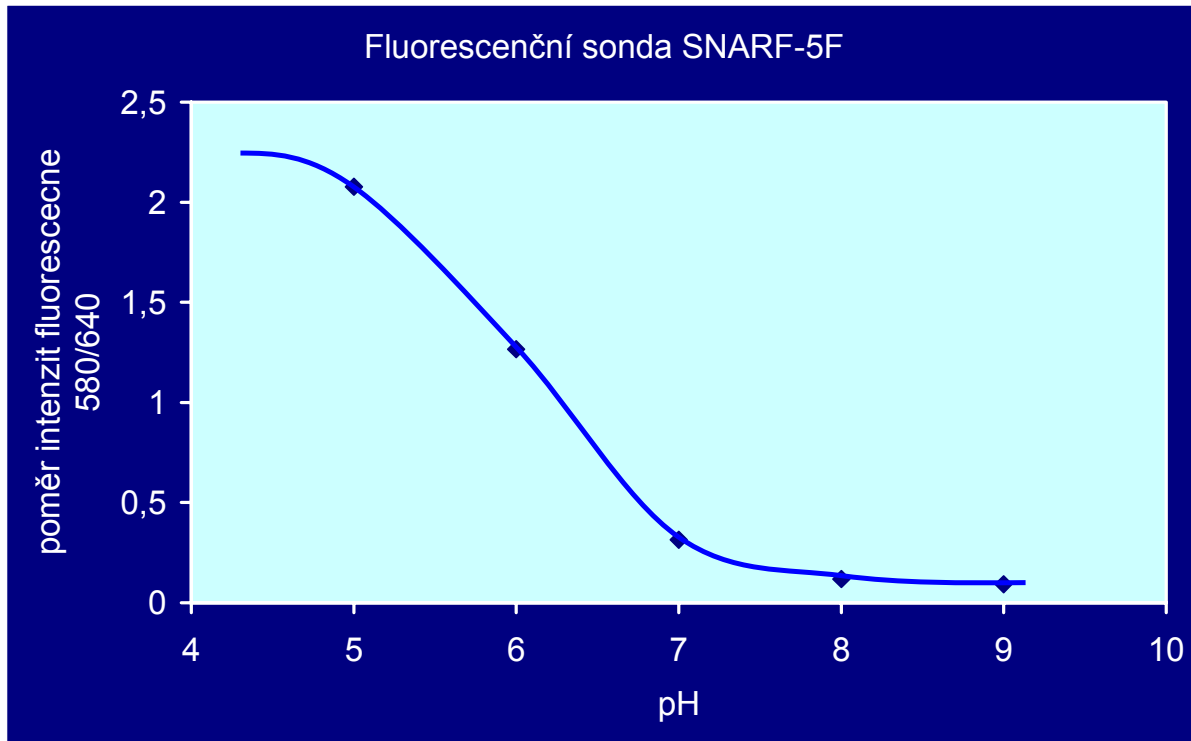
Obr. 3.28 Excitační fluorescenční spektra 4 $\mu\text{mol/l}$ SNARF-5F ($\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$) při různých hodnotách pH roztoku.



Obr. 3.29 Emisní fluorescenční spektra 4 $\mu\text{mol/l}$ SNARF-5F ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$) při různých hodnotách pH roztoku.



Obr. 3.30 Závislost poměru intenzit fluorescence sondy SNARF-5F měřených při 580 a 640 nm na pH



3.9. Propustnost membrán

Karboxyfluorescein nebo calcein jsou zadržovány uvnitř neporušených buněk nebo lipidových vesikul (viz též kap. 2.3.1). Fluorescence těchto látek je přitom >95% zhášena při koncentracích nad 100 mmol/l. Propustnost lipidových dvojvrstev pro takové fluorofory lze studovat tímto způsobem: koncentrovaný roztok fluoroforu ve vodě se uzavře v liposomech, které se potom oddělí od neuzavřeného barviva gelovou filtrací nebo centrifugací. Uvolňování fluoroforu z liposomů je potom provázáno zvyšováním intenzity fluorescence. Lze sledovat jak spontánní uvolňování, tak uvolňování vyvolané jinou látkou. Kompletní lýzu lze uskutečnit přidáním detergentu, Tritonu X-100.

Vlastnosti sondy 5-(a 6)-karboxyfluorescein (5(6)-FAM):

- MW = 376,32
- střední rozpustnost ve vodě; zásobní roztok v dimethylformamidu, pH>6
- absorpční maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $28000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v kyselém/neutrálním roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 517 \text{ nm}$
- absorpční maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 492 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $75000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v zásaditém roztoku: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 517 \text{ nm}$
- $\text{pK}_a = 6,4$

Materiál:

- 5-(a 6)-karboxyfluorescein (Fluka)
- fosfatidylcholin (Sigma)
- Triton X-100
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

Postup:

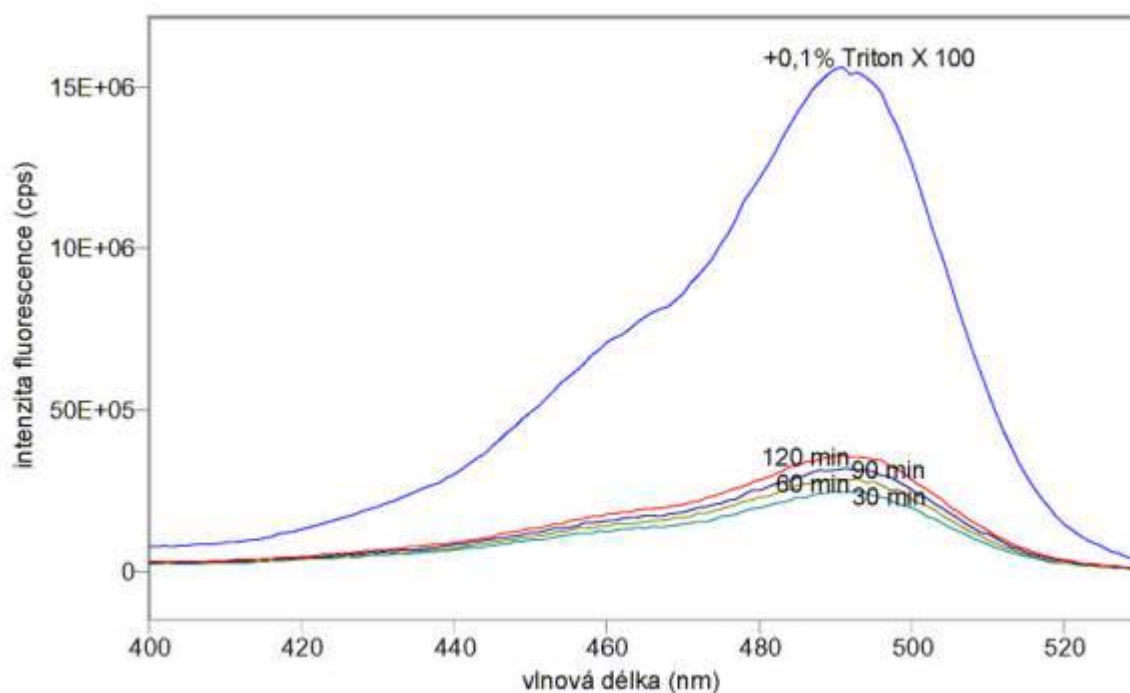
1. připravte roztok 100 mmol/l 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu v pufru A s pH zvýšeným na 9
2. připravte 10% roztok Tritonu-X v pufru A
3. připravte velké mnohvrstevné liposomy z fosfatidylcholinu, kdy jako vodný roztok použijte 100 mmol/l karboxyfluorescein:
 - přenést 2 mg fosfolipidu ve směsi chloroform/metanol (2:1) do skleněné nádoby a rozpouštědlo odpařit proudem dusíku při teplotě kolem 40 °C tak, aby na stěně nádoby vznikla tenká vrstva fosfolipidu
 - nádobku umístit po několik hodin ve vakuu, aby byly odstraněny zbytky rozpouštědla
 - přidat 2 ml 100 mmol karboxyfluoresceinu a vzorek inkubovat v 50 °C po dobu 5 minut
 - intenzivně třepat a nakonec krátce sonikovat (cca 5 s) v sonikátoru XL 2020 (Heat Systems - Ultrasonics) na stupni 4
 - inkubovat vzorek v 50 °C po dobu 30 minut a poté jej krátce protřepat
4. liposomy promyjte 2 krát pufr A (centrifugací při 30000 g, 15 min, 20 °C)
5. liposomy nařeďte pufr A na výslednou koncentraci fosfatidylcholinu 100 $\mu\text{mol/ml}$
6. v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů změřte excitační a emisní spektra nebo intenzitu fluorescence karboxyfluoresceinu při buzení $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$; při 20 °C; s polarizátorem orientovaným svisle a analyzátozem pootočeným o „magický“ úhel 54,74°

7. přidejte Triton X-100 v konečné koncentraci 0,1% a znovu změřte fluorescenci karboxyfluoresceinu

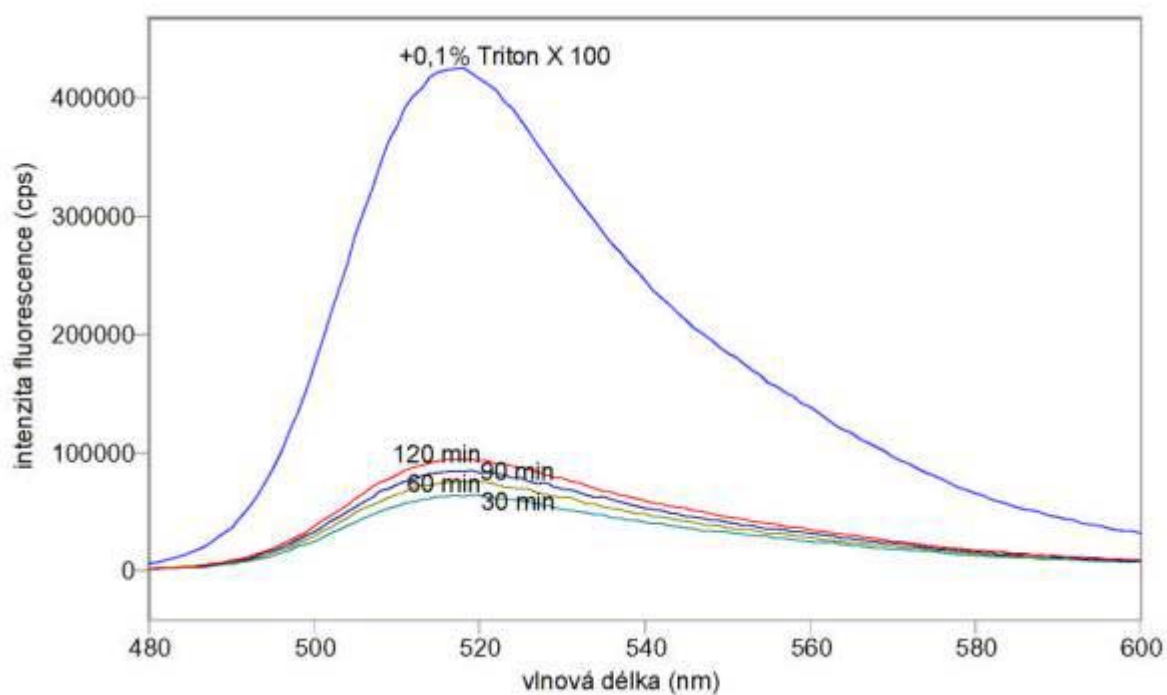
Výsledky:

Na obr. 3.31 a 3.32 jsou excitační a emisní spektra 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohovrstevných fosfatidylcholinových liposomů obsahujících koncentrovaný fluorofor jednak spontánně (v časech 30, 60, 90 a 120 min po naředění liposomů puřrem A), jednak po destrukci liposomů 0,1% Tritonem X 100.

Obr 3.31 Excitační fluorescenční spektra ($\lambda_{em} = 540$ nm) 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohovrstevných liposomů spontánně v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů a po úplném uvolnění působením 0,1% Tritonu X 100.



Obr 3.32 Emisní fluorescenční spektra ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) 5-(a 6)-karboxyfluoresceinu uvolňovaného z mnohovrstevných liposomů spontánně v časech 30, 60, 90 a 120 minut po naředění liposomů a po úplném uvolnění působením 0,1% Tritonu X 100.



3.10. Speciální experimenty

3.10.1. Vazebné parametry receptorů

Membránové receptory pro neurotransmitery lze charakterizovat jejich afinitou K_a (nebo disociační konstantou $K_d = 1/K_a$) k neurotransmitteru či jinému ligandu a vazebnou kapacitou B_{max} . K_a charakterizuje sílu vazby ligandu ke specifickému vazebnému místu na receptoru a B_{max} odpovídá denzitě receptorů v membráně. Disociační konstanty neurotransmitterových receptorů leží obvykle v nanomolární oblasti a pro jejich měření tedy potřebujeme detekovat subnanomolární koncentrace vzájemících se látek. Vazebné parametry receptorů se proto běžně určují pomocí ligandů, které k nim mají specifickou vazbu a které jsou značeny radionuklidy (obvykle agonisté nebo antagonisté receptorů). Metoda vazby radioligandu je velmi dobře rozpracována a popsána (např. v monografii [Neurotransmitter Receptor Binding, Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J., eds., 2nd ed., Raven Press, New York, 1985]). Citlivost fluorescenční spektroskopie však umožňuje tato měření provádět i pomocí fluorescenčních ligandů (viz kap. 2.3.2), neboť za optimálních podmínek lze měřit i femtomolární koncentrace fluoroforů. Problém je dosud v nedostatečném počtu fluorescenčně značených ligandů pro neurotransmitterové receptory a větší pracnosti experimentu.

V tomto experimentu je popsán postup měření vazebných parametrů α_1 -adrenergických receptorů v lymfocytech pomocí jejich antagonisty - prazosinu fluorescenčně značeného látkou BODIPY FL. Postup je analogický postupu u metody vazby radioligandu, tj. měří se koncentrační závislost vazby ligandu k buněčným membránám. Pro oddělení volného a navázaného ligandu byla použita technika rychlé filtrace, která umožňuje velmi rychlé a snadné oddělení volného a vázaného ligandu za předpokladu, že použitý filtr je schopen zachytit částice, k nimž se ligand váže a současně je jeho propustnost dostatečná pro rychlý průchod promývací tekutiny. Pro záchyt lymfocytů jsme použili skleněné mikrovláknité filtry GF/C (Whatman), které byly impregnovány 0,1% polyetyleniminem pro snížení vazby volného ligandu na filtr. Vzorky byly naředěny 3 ml pufru A, filtrovány a filtry se zachycenými lymfocyty byly dvakrát promyty ledovým pufrům A (2 x 3 ml). Celková doba filtrace byla <10 sec., což umožňuje spolehlivé měření vazebných procesů s disociační konstantou $<10^{-8}$ mol/l. Filtry byly umístěny do zkumavek a zhomogenizovány v 5 ml metanolu. Po centrifugaci byly 4 ml metanolu měřeny na spektrofluorimetru ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 511$ nm).

Nespecifická vazba byla určena jako vazba BODIPY FL prazosinu v přítomnosti nadbytku (10 μ mol/l) neznačeného prazosinu. Tato vazba byla odečtena od celkové vazby a data byla vyhodnocena. Vyhodnocení dat je rovněž analogické jako při použití metody vazby radioligandu. Parametry vazebných izoterm B_{max} a K_d byly spočteny metodami nelineární regresní analýzy s použitím programu AccuFit Saturation Two-Site (Beckman). Bylo použito označení běžné pro ligand-receptorové studie:

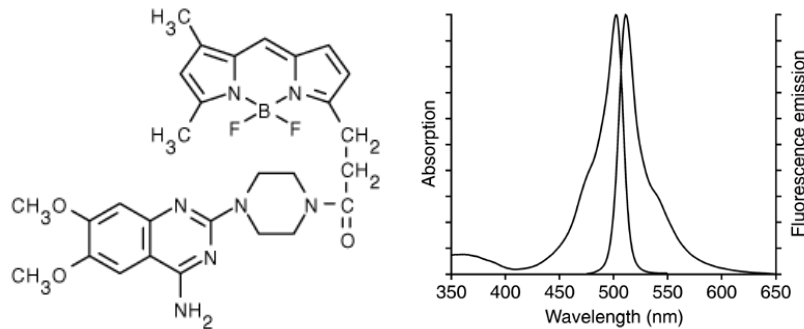
$$(3.2) \quad B = B_{max} \cdot F / (K_d + F)$$

kde je B - množství prazosinu navázaného k 10^6 lymfocytů, F - koncentrace volného prazosinu, B_{max} - maximální počet vazebných míst (vazebná kapacita) a K_d - rovnovážná disociační konstanta.

Vlastnosti BODIPY FL prazosinu:

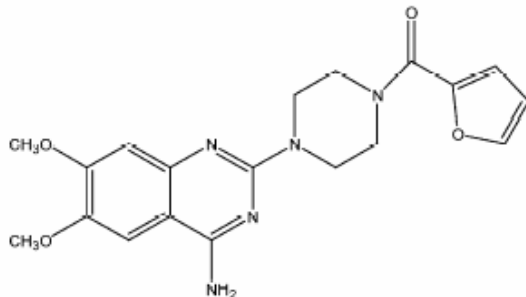
- MW = 563,41
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylsulfoxid (DMSO) nebo etanol (EtOH)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} = 504 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $77000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 511 \text{ nm}$
- rozpustnost ve vodě je nízká
- antagonist α_1 -adrenoceptorů

Obr. 3.33 BODIPY FL prazosin a absorpční e emisní fluorescenční spektrum BODIPY FL.



(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

Obr. 3.34 Vzorec prazosinu



Materiál:

- BODIPY FL prazosin (Molecular Probes)
- prazosin (MW = 419,9, Sigma; rozpustný ve vodě do 0,5 mg/ml, v metanolu do 6 mg/ml)
- skleněné mikrovláknité filtry Whatman GF/C
- filtrační zařízení
- Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences)
- metanol
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...
- centrifuga
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

Izolace lymfocytů z plné krve

1. krev odebrat do citrátového roztoku (nesrážlivá krev)
2. promíchat 2 ml krve a 2 ml pufru A
3. přidat 3 ml Ficoll-Paque Plus do zkumavky a opatrně navrstvit 4 ml zředěné krve
4. centrifugovat při 400g po dobu 30 min při 20 °C

5. odsát horní vrstvu (může být uchována pro pozdější použití)
6. přenést vrstvu s lymfocyty do centrifugační kyvety (cca 2 ml)
7. přidat alespoň 3 objemy pufru A, promíchat
8. centrifugovat při 60-100g po 10 min při 20 °C
9. odstranit supernatant a opakovat promytí
10. suspendovat lymfocyty v pufru A v koncentraci $5 \cdot 10^7$ /ml

Vazba prazosinu na lymfocyty

1. veškerá práce se dělá v ledové lázni (cca 2 °C)
2. připravit roztoky v pufru A:
 - 50 μ mol/l prazosin
 - 100 nmol/l BODIPY FL prazosin
 - 5 nmol/l BODIPY FL prazosin
3. do skleněných zkumavek pipetovat vzorky dle Tabulky 3.8; vazba se startuje přidáním BODIPY FL prazosinu
4. standardy: stejná množství BODIPY FL prazosinu jako byla přidána ke vzorkům pipetovat rovněž do prázdných vialek
5. nechat inkubovat 30 min ve 2°C a poté přidat 3 ml ledového pufru A a vzorek filtrovat přes GF/C filtry impregnované 0,1% polyetyleniminem
6. filtry ještě dvakrát promýt 3 ml pufru A a potom je umístit do skleněných vialek
7. k filtrům i ke standardům přidat 5 ml metanolu; filtry homogenizovat (turaxovat), nechat přes noc ve tmě, centrifugovat a odebrat supernatant pro měření
8. měřit fluorescenci BODIPY FL prazosinu v metanolu ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 511$ nm)
9. analýza dat: spočítat parametry K_d a B_{max} pomocí nelineární regrese (analogicky, jako se dělá v metodě vazby radioligandu)

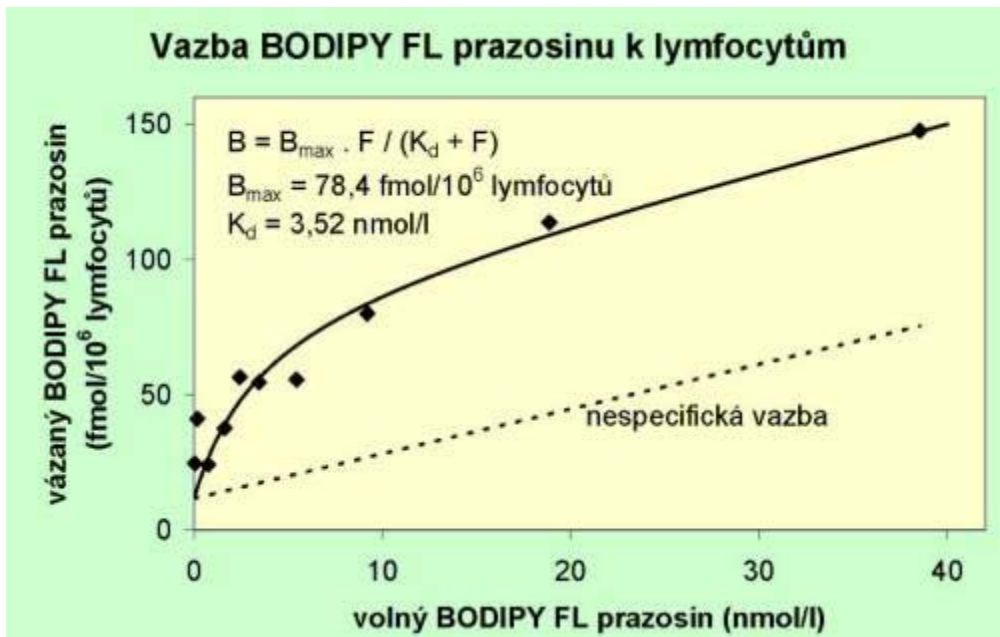
Tabulka 3.8

č. vzorku	pufř A	lymfocyty ($5 \cdot 10^7/\text{ml}$)	prazosin ($50 \mu\text{mol/l}$)	BODIPY FL prazosin (5 nmol/l)	BODIPY FL prazosin (100 nmol/l)	výsledná koncentrace BODIPY FL prazosinu (nmol/l)
celková vazba:						
1	185	50		15		0,3
2	170	50		30		0,6
3	150	50		50		1
4	100	50		100		2
5	50	50		150		3
6	190	50			10	4
7	185	50			15	6
8	175	50			25	10
9	150	50			50	20
10	100	50			100	40
nespecifická vazba:						
11	135	50	50	15		0,3
12	120	50	50	30		0,6
13	100	50	50	50		1
14	50	50	50	100		2
15	0	50	50	150		3
16	140	50	50		10	4
17	135	50	50		15	6
18	125	50	50		25	10
19	100	50	50		50	20
20	50	50	50		100	40
standardy:						
21				15		
22				30		
23				50		
24				100		
25				150		
26					10	
27					15	
28					25	
29					50	
30					100	

Výsledky:

Na obr 3.35 je vynesena závislost BODIPY FL prazosinu vázaného na lymfocyty proti koncentraci volného (nenavázaného) BODIPY FL prazosinu. Tečkovaně je znázorněna nespecifická vazba, tj. vazba v přítomnosti nadbytku neznačeného prazosinu. Plná čára odpovídá rovnici $B = 78,4 \cdot F / (3,52 + F)$, kde B označuje vázaný a F volný BODIPY FL prazosin. V tomto experimentu tedy vyšla hodnota disociační konstanty pro vazbu prazosinu k lymfocytům $K_d = 3,52 \text{ nmol/l}$ a vazebná kapacita $B_{\text{max}} = 78,4 \text{ fmol}/10^6 \text{ lymfocytů}$.

Obr. 3.35 Závislost BODIPY FL prazosinu vázaného k lymfocytům na koncentraci volného (mimobuněčného) BODIPY FL prazosinu.



3.10.2. Vliv psychotropních látek

Pro in vitro studium interakcí léčiv s lipidovou částí buněčných membrán jsou používány izolované buňky, membrány a modelové systémy. Rozdělení molekul mezi vodnou fází a buněčné membrány je modelováno třemi základními systémy: 1. jednoduché rozdělení v systému voda/organické rozpouštědlo; 2. chromatografické rozdělovací systémy; 3. liposomy. Liposomy jsou široce používaným modelem lipidové části buněčných membrán a umožňují měřit nejen rozdělovací koeficienty, ale i vazebné parametry. Liposomy jsou váčky (vezikuly) uzavírající vodný roztok membránou tvořenou především fosfolipidy. Tvoří se spontánně, když jsou fosfolipidy dispergovány ve vodném prostředí. V závislosti na způsobu přípravy mohou vzniknout liposomy 1. mnohvrstevné (multilamellar vesicles, MLV), 2. malé jednovrstevné (small unilamellar vesicles, SUV) nebo 3. velké jednovrstevné (large unilamellar vesicles, LUV). V našich experimentech jsme použili MLV, které jsou tvořeny vezikuly o velikosti 10^{-1} až 100 μm (příčměž každý váček je tvořen mnoha koncentrickými vrstvičkami lipidových dvojvrstev) a LUV o průměru cca 100 nm. V mnoha experimentech bylo prokázáno, že MLV a LUV jsou dobrým modelem lipidové části buněčných membrán.

Metodou fluorescenčních sond s použitím membránové sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) byl měřen vliv různých koncentrací (10 nmol/l – 100 $\mu\text{mol/l}$) psychotropních látek na mikroviskozitu lipidových membrán připravených z fosfatidylcholinu (PC-LUV, PC-MLV):

- imipramin (IMI)
- amitriptylin (AMI)
- dothiepin (PRO)
- citalopram (CIT)
- chlorpromazin (CPR)
- klozapin (KLO)
- anandamid (ANA)

Materiál:

- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma)
- fosfatidylcholin (PC, Sigma)
- psychotropní látky (různý původ)
- zařízení LiposoFast-Basic
- skleněné zkumavky
- mikropipety
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup:

Postup přípravy liposomů a měření se sondou DPH byl analogický jako je popsáno v kapitole 3.3.

Výsledky:

- výrazné snížení anizotropie fluorescence (zvýšení fluidity) bylo pozorováno při vyšších koncentracích anandamidu
- bez výrazné změny bylo přidání dothiepinu, amitriptylinu a citalopramu
- zvýšená anizotropie fluorescence DPH v membránách byla zjištěna vlivem imipraminu, chlorpromazinu a klozapinu

- s PC-MLV byly pozorovány podobné, pouze méně výraznější, změny r_{DPH} jako s PC-LUV

Tabulka 3.9 Relativní změny anizotropie fluorescence sondy DPH v PC-LUV vyvolané různými koncentracemi psychotropních látek (imipramin (IMI), amitriptylin (AMI), dothiepin (PRO), citalopram (CIT), chlorpromazin (CPR), klozapin(KLO), anandamid (ANA))

Procento změny anizotropie fluorescence DPH v PC-LUV při různých koncentracích psychotropních látek							
konc. ($\mu\text{mol/l}$)	IMI	AMI	PRO	CIT	CPR	KLO	ANA
0,01	-0,09%	-0,09%	-1,05%	-1,00%	-1,25%	-1,20%	0,19%
0,1	-0,03%	-0,34%	0,70%	-3,70%	0,27%	1,19%	-2,27%
1	-0,32%	0,34%	-0,45%	-2,46%	2,16%	2,57%	-2,62%
10	0,94%	1,00%	-2,23%	-3,95%	9,13%	7,01%	-8,41%
100	6,86%	-1,91%	-1,22%	-2,64%	50,50%	57,69%	-29,21%

3.10.3. Vliv podávání antidepressiv

Byly měřeny změny v lipidovém složení plazmatických membrán izolovaných z mozku a změny v jejich mikroviskozitě po dlouhodobém podávání antidepressiv. Laboratorním potkanům byla podávána antidepressiva s různými primárními biochemickými účinky (desipramin, maprotilin, citalopram, moklobemid a lithium) po dobu 4 týdnů. Byly izolovány plazmatické membrány z mozku. Chromatografickou analýzou lipidů z mozkových membrán bylo zjištěno významné snížení relativního zastoupení jednotlivých fosfolipidů vzhledem k celkovým lipidům (fosfolipidy + cholesterol) především po podávání maprotilinu, citalopramu a lithia. Toto snížení bylo způsobeno zvýšením koncentrací cholesterolu. Zvýšení obsahu cholesterolu v mozkových membránách může vést ke změnám v serotonergní neurotransmisí. Naše výsledky podporují hypotézu, že dlouhodobé podávání antidepressiv může způsobit změny v lipidovém složení buněčných membrán, které se mohou transformovat do procesů přímo ovlivňujících serotonergní neurotransmisí v mozku.

Biofyzikální vlastnosti synaptických membrán (strukturu, uspořádání, mikroviskozitu) určují do značné míry esenciální nenasycené mastné kyseliny, cholesterol a glykolipidy. Poměrně malé změny ve struktuře membrán způsobené cholesterolem a zastoupením ω -3, ω -6 a dalších nenasycených mastných kyselin potom mohou modulovat nejen metabolismus biogenních aminů, jejich vazbu nebo zpětné vychytávání, ale i transdukcí signálu, např. vlivem na aktivitu adenylátcykláz a jiných membránových enzymů. V tzv. biofyzikální hypotéze afektivních poruch se uvažuje především o úloze dokosahexaenové kyseliny (22:6 ω -3) a arachidonové kyseliny (20:4 ω -6) ve funkci neuronálních membrán. Byla formulována také hypotéza o vztahu mezi sérovými lipidy, depresí a aterosklerosou. Podle hypotézy o optimální fluiditě membrán závisí maximální receptorová odezva nejen na hustotě receptorových vazebných míst, ale i na jejich přístupnosti pro agonisty rozpuštěné ve vodné fázi a na difúzně kontrolované rychlosti, s níž může docházet ke vzájemným interakcím mezi jednotlivými membránovými složkami podílejícími se na přenosu signálu. Jak dostupnost, tak pohyblivost membránových proteinů přitom závisí na mikroviskozitě lipidové dvojvrstvy. Hypotéza o měnitelné afinitě receptorů vychází z pozorování, že k výrazným změnám v afinitě receptorů vedou rozdíly nejen v chemické struktuře receptoru, ale i v lokálním membránovém mikrookolí a v různých nitrobuněčných procesech. Změny v lipidovém složení plazmatických membrán tedy mohou ovlivňovat přenos signálu a podílet se na terapeutických účincích antidepressiv.

Změna lipidového složení membrán ovlivňuje také aktivitu membránového serotoninového přenašeče (SERT). Tomuto přenašeči je v serotoninových hypotézách afektivních poruch věnována značná pozornost, neboť primárním biochemickým účinkem dnes nejčastěji podávaných antidepressiv, selektivních inhibitorů reuptake serotoninu (SSRI), je inhibice jeho funkce. Bylo popsáno snížení aktivity, denzity a dostupnosti SERT při depresi, nicméně snížení počtu uptake míst pro 5-HT nelze považovat za prokázané. Obvykle jsou měřeny parametry kinetiky transportu 5-HT do trombocytů, o nichž se předpokládá, že odrážejí změny funkce serotonergního systému v mozku. Významným modulátorem funkce SERT je především membránový cholesterol, jehož nižší koncentrace vedou ke snížení aktivity SERT. Propojení změn vlastností buněčných membrán způsobených různým obsahem cholesterolu s aktivitou serotonergního systému by mohlo být mechanismem podílejícím se na zvýšení rizika vzniku deprese spojené se suicidálním chováním při nízkých hladinách sérového cholesterolu. Rovněž snížená spotřeba ω -3 nenasycených mastných kyselin koreluje se zvýšením rizika vzniku deprese.

Metody:

Desipramin, maprotilin, citalopram, moklobemid a lithium byly podávány žaludeční sondou v dávkách 10, 10, 5, 25 a 50 mg/kg.den po dobu 4 týdnů. Poté byla zvířata usmrcena a z mozku byly izolovány plazmatické membrány metodou dle Scottové a kol. (1993) s naší modifikací; obohacení vzorků plazmatickými membránami bylo kontrolováno stanovováním aktivity ekto-5'-nukleotidázy (Mitchell a Hawthorne 1965). Relativní změny fluidity membrán byly měřeny metodou fluorescenčních sond. Lipidová část membrán byla izolována modifikovanou Folchovou metodou (Folch et al. 1957; Koul a Prasad 1996). Lipidy byly analyzovány tenkovrstevnou chromatografií s plamenionizační detekcí (TLC-FID) na zařízení Iatrosan TH10 nebo dvourozměrnou tenkovrstevnou chromatografií na deskách s následným stanovením fosforu a cholesterolu.

Chemikálie a roztoky:

- pufr STM s inhibitory proteáz pro izolaci plazmatických membrán: 0,32 M sacharóza, 10 mmol/l TRIS-HCl, 1 mmol/l MgCl₂, 0,5 mmol/l PMSF, 0,5 mmol/l benzamidin HCl, 1 mmol/l EDTA, 2 mmol/l DTT (dithiothreitol), pH 7,4. Pufr byl připraven den předem, po úpravě pH filtrován přes 0,45 µM filtr a uložen ve 4°C.
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4).

Metoda fluorescenčních sond

Pro měření relativních změn fluidity plazmatických membrán byla použita metoda fluorescenčních sond s hydrofobní membránovou sondou 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH, Sigma) a se sondou 1-(4-trimetylamonium-fenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien (TMA-DPH, Molecular Probes). DPH byl rozpuštěn v acetonu v koncentraci 6 mmol/l a TMA-DPH v metanolu v koncentraci 3 mmol/l a tyto zásobní roztoky byly uloženy v mrazničce. Pro měření byly připraveny vždy čerstvé roztoky sond v pufru A v koncentraci 6 µM (injektováním pomocí Hamiltonovy stříkačky 10 µl za intenzivního míchání). Tyto roztoky byl smíchány s pufrem A a suspenzí liposomů nebo membrán tak, aby výsledná koncentrace sondy byla 2 µM a koncentrace fosfolipidů cca 100 µmol/l. Po 60 minutách inkubace v 37°C byla měřena polarizovaná fluorescence (anizotropie fluorescence) při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 450 nm na spektrofluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba) s polarizačním příslušenstvím. Měření daného vzorku bylo opakováno alespoň 10x a hodnoty byly zprůměrnovány. Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie** fluorescence se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / (I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V)$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H / I_{\parallel}^H$.

Izolace membránových lipidů

Pro izolaci membránových lipidů byla použita modifikovaná metoda podle Folch a kol. (1957) a Koul a Prasad (1996). Stručný postup: vzorky byly turaxovány a po odebrání částí na stanovení koncentrace fosforu (Bartlett 1959, Wagner a kol. 1962) a proteinů (Lowryho et al. 1951) byly centrifugovány 10 min., 20000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet roztřepán ve 20 objemech směsi dichlormetan:metanol (2:1, v/v) okyselené 0,25% HCl. V dusíkové atmosféře byly zkumavky jemně míchány v suché lázni při pokojové teplotě po dobu 15-30 min. Denaturované

proteiny byly odstraněny filtrací přes gázu a filtrát (cca 5 ml) byl převeden do kalibrované zkumavky, přidány 0,2 objemu vody (cca 1 ml) a promícháno. Centrifugací 5 min. při 1000 g se oddělily fáze. Horní vrstva byla pečlivě odstraněna, čistá dolní fáze přenesena do předvážené očíslované lahvičky a odpařena pod dusíkem. Lahvičku se vzorkem byla zvážena a dána do mrazničky pod dusíkem. V celém postupu je nutno se vyhnout použití umělých hmot a minimalizovat přístup kyslíku (proublávat dusíkem).

Analýza membránových lipidů

Pro analýzu membránových lipidů byla použita tenkovrstevná chromatografie, a to buď dvourozměrná chromatografie na skleněných deskách s následným stanovením fosforu a cholesterolu, nebo chromatografie na tyčinkách Chromarods 3 s plamenoionizační detekcí (TLC-FID) na zařízení Iatroscan TH10 (Iatron Laboratories).

Pro dvourozměrnou chromatografii byly použity tyto vyvíjecí směsi: a) pro 1. směr – chloroform : metanol : NH₄OH : H₂O v poměru 70 : 25 : 4 : 1; b) pro 2. směr – chloroform : metanol : aceton : kyselina octová : H₂O v poměru 70 : 12,5 : 17,5 : 10 : 4,5. Chromatografické desky byly připraveny nanesením 0,5 mm vrstvy směsi 45 g silikagelu H + 5 g magnonu + 126 ml vody. Desky byly vyvíjeny v prvním směru po dobu 1 hod. 20 min. a poté ve druhém směru po dobu 1 hod. 30 min. Detekce byla provedena v parách jódu, skvrny označeny a poté vyškrábány do zkumavek pro stanovení fosforu a cholesterolu.

Pro chromatografii s plamenoionizační detekcí byly použity tyto vyvíjecí směsi: a) pro neutrální lipidy - hexan : éter : kys. mravenčí v poměru 45 : 15 : 0,3; b) pro fosfolipidy I - chloroform : metanol : izopropanol : voda : etylacetát v poměru 20 : 6 : 17 : 4 : 12; c) pro fosfolipidy II - chloroform : metanol : 7 N NH₄OH v poměru 40 : 20 : 3. Po nanesení 1 µl vzorku byly vyvíjeny tyčinky nejprve v soustavě pro neutrální lipidy po dobu 2 x 20 minut a po vyvinutí spáleny na zařízení Iatroscan asi 0,75 cm od startu; byly tak získány píky pro cholesterol; poté byly tyčinky dále vyvíjeny v soustavě pro fosfolipidy I po dobu 2 x 60 minut a potom v soustavě pro fosfolipidy II po dobu 30 minut. Po vysušení byly tyčinky spáleny na zařízení Iatroscan a vyhodnoceny píky pro jednotlivé fosfolipidy.

Výsledky:

Vybrané výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 3.10 a 3.11. Jejich podrobnější analýza je předmětem diskuze v připravené publikaci.

Tabulka 3.10 Relativní zastoupení molárních koncentrací jednotlivých fosfolipidů nebo cholesterolu v plazmatických membránách izolovaných z mozku laboratorních potkanů po 4-týdenním podávání různých antidepresiv (vztaženo k celkové molární koncentraci fosfolipidů a cholesterolu).

skupina	PC	PE	SM	PI	PS	SUM	CH
KONTROLY	0.208	0.042	0.075	0.044	0.043	0.412	0.369
DESIPRAMIN	0.202	0.036	0.076	0.038	0.033	0.386	0.331
MAPROTILIN	0.167	**0.019	0.065	0.036	*0.023	*0.311	0.373
CITALOPRAM	0.181	*0.024	0.061	0.041	0.047	0.353	0.402
MOCLOBEMID	0.186	*0.024	0.068	0.039	0.048	0.364	0.374
LiCO ₃	0.166	0.031	0.063	0.033	0.040	0.333	0.419

Průměry byly spočteny z 15 hodnot pro kontrolní skupinu a z 6 hodnot pro každou další skupinu. PC - fosfatidylcholin; PE - fosfatidyletanolamin; SM - sfingomyelin; PI - fosfatidylinositol; PS - fosfatidylserin; SUM - suma molárních koncentrací (PC+PE+SM+PI+PS); CH - cholesterol. Suma cholesterolu a celkových fosfolipidů (CH+PL) byla použita jako 100%. Jsou označeny hodnoty statisticky významně odlišné od kontrol (*p<0.05; **p<0.01; Mannův-Whitneyův U test)

Tabulka 3.11 Anizotropie fluorescence DPH a TMA-DPH v plazmatických membránách izolovaných z mozků laboratorních potkanů po 4-týdenním podávání různých antidepresiv.

skupina	r_{DPH}	$r_{TMA-DPH}$
KONTROLY	0.2074	0.2547
DESIPRAMIN	*0.2043	0.2529
MAPROTILIN	0.2055	0.2540
CITALOPRAM	0.2090	0.2570
MOCLOBEMID	0.2079	0.2560
LiCO₃	0.2054	0.2534

Průměry byly spočteny z 15 hodnot pro kontrolní skupinu a z 6 hodnot pro každou další skupinu. DPH - 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien; TMA-DPH - 1-(4-trimetylamoniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5-hexatrien. Je označena hodnota statisticky významně odlišná od kontroly (* $p < 0.05$; Mannův-Whitneyův U test)

Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition, Kluwer Academic/Plenum Publ., New York, 1999**
- Gore M.G.: Spectrophotometry and Spectrofluorimetry. A Practical Approach. Oxford Univ. Press, 2000**
- Haugland R.P.: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Ninth Edition, Molecular Probes, 2002**
- Prosser V. a kol.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha, 1989**
- Bartlett, G.R., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- Folch J.L.M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Koul, A., Prasad, R., 1996. Extraction of membrane lipids. In: *Manual on membrane lipids*, Prasad, R. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 37-51.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mitchell, R.H., Hawthorne, J.N., 1965. The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 333-338.
- Scott, L., Schell, M.J., Hubbard, A.L., 1993. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 19, Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Wagner, H., Lissau, A., Holzi, J., Horammer, L., 1962. The incorporation of ³²P into inositolphosphatides of the rat brain. *J. Lipid Res.* 3, 177-180.