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
- **redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), nikotinamidadenindinukleotid 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	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{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 zhášena vnějšími zhášedly
  - 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 ($\lambda_{ex}^{max} \cong 340$ nm, $\lambda_{em}^{max} \cong 460$ 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 zháší.
- **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 zhášena 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

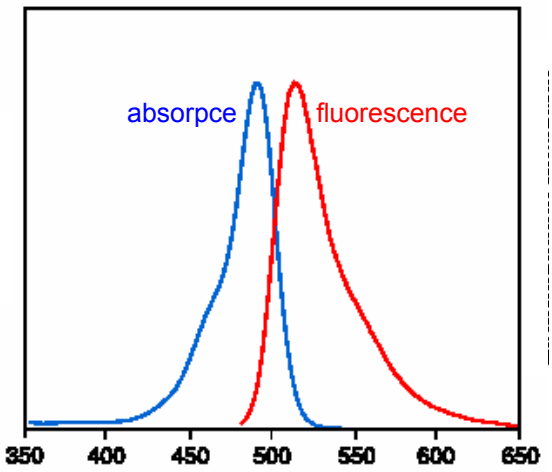
v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii apod. využívají také vysokou afinitu a specificitu interakcí avidin-biotin a protilátka-hapten, kdy je studovaná molekula (protilátka, lektin, léčivo, polynukleotid, polysacharid, receptor) označena biotinem nebo haptenem a poté detekována fluorescenčně značenou protilátkou k biotinu nebo haptenu.

Mezi významné fluorescenční značky patří:

- fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)
- dansyl chlorid (DNS-Cl; 5-dimetylaminonaftalén-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-dimetylaminonaftalén (akrylodan)

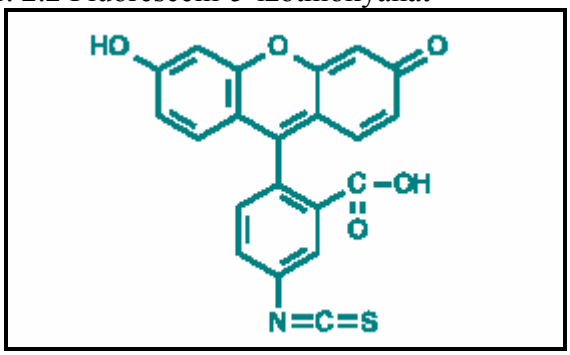
Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou **fluoresceinizothiokynát** (FITC) a **tetrametylrhodaminizothiokyanát** (TRITC), které se používají v imunofluorescenčních metodách. Jejich fluorescenční parametry jsou uvedeny v tabulce 2.2. **Eosin** (2´,4´,5´,7´-tetrabromofluorescein) a **erytrosin** (2´,4´,5´,7´-tetrajodofluorescein) 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, lipopolysycharidů, receptorových ligandů (viz kap. 3.10.1) a polystyrénových mikrokuliček.

Akrylodan je reaktivní forma prodanu (6-propionyl-2-dimetylaminonaftalénu), 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	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{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 posunuje 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 dvojné 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, tetrametylrhodamin, 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**.

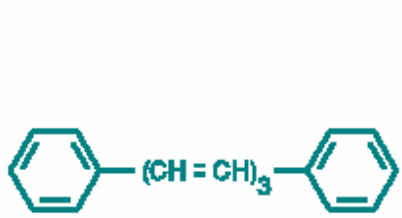
Tabulka 2.4 Vlastnosti některých lipidových sond

fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{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

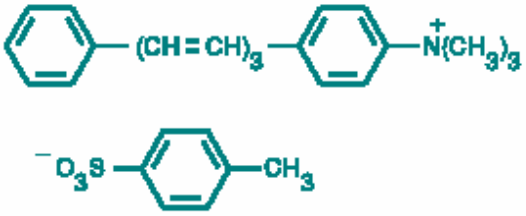
(Podle: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.)

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-anilinonaftalén-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-dimetylaminonaftalén)**, laurdan (**6-dodecanoyl-2-dimetylaminonaftalén) a další.

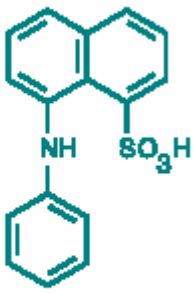
Obr. 2.3 Fluorescenční sondy difenylhexatrien (DPH) a jeho trimetylamoniový derivát (TMA-DPH); 1-anilinonaftalén-8-sulfonová kyselina (ANS) a 4,4'-dianilino-1,1'-binaftyl-5,5'-disulfonová kyselina, dvojdraselná sůl (bis-ANS)



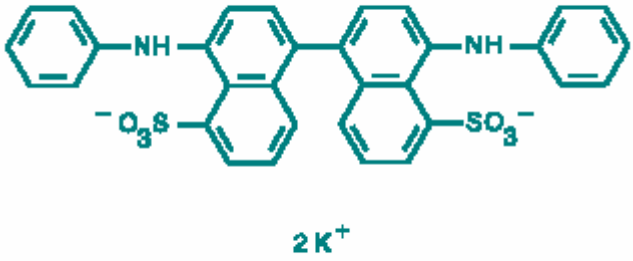
DPH



TMA-DPH



ANS



bis-ANS

Tabulka 2.5 Některé membránové fluorescenční sondy

fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{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 – dimetylformamid, 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, $DiOC_6(3)$, 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 ($\lambda_{em}^{max} \cong 470$ 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

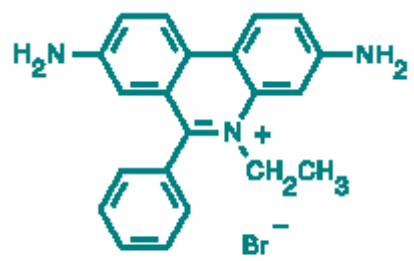
fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; …
Propidium jodid	535	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.)

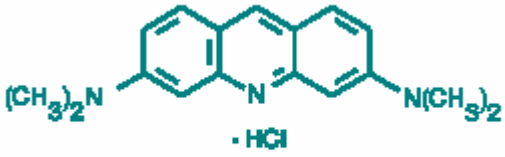
Po vazbě k dvouřetězcovým nukleovým kyselinám se silně zvyšuje např. kvantový výtěžek fluorescence sondy **2,7-diamino-10-etyl-9-fenylfenanthridium bromid (ethidium bromid, EB)** s $\lambda_{em}^{max} = 605$ nm. Výraznou červenou fluorescenci této sondy vázané do buněčných jader lze velmi dobře pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu i měřit na spektrofluorimetru (viz experiment popsaný v kapitole 3.5). Další často používanou sondou pro stanovení nukleových kyselin je **akridinová oranž**, která v monomerní formě fluoreskuje s $\lambda_{em}^{max} =$

530 nm, v dimerní formě (při vyšších koncentracích) s λ_{em}^{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



ethidium bromid



akridinová oranž

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** vykazuje 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 μmol/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 organely 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 cytolýze; fluorescence závislá na pH	494/514
BCECF AM	~615	DMSO	velmi dobře udržován; uvolňován při cytolýze; fluorescence závislá na pH	501/527
Karboxyfluorescein diacetát (CFDA)	460,40	DMSO	středně dobře zadržován; fluorescence závislá na pH	492/518
Karboxyfluorescein diacetát, acetoxymetyl ester (CFDA, AM)	532,46	DMSO	snadněji se dostává do buněk než CFDA; středně dobře zadržován; fluorescence závislá na pH	492/518
Chlorometyl SNARF-1, acetát	499,95	DMSO	dobře zadržován reakcí s thioly; neúplně uvolňován při cytolýze; fluorescence dlouhovlnná 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 [^{3}H]-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 transdukci 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	**ivermecin**	zvýšená propustnost
transport anionů	**stilbene disulfonáty**	blokáda

Tabulka 2.10 Fluorofory vázané k ligandům pro receptory a iontové kanály

fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{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.)

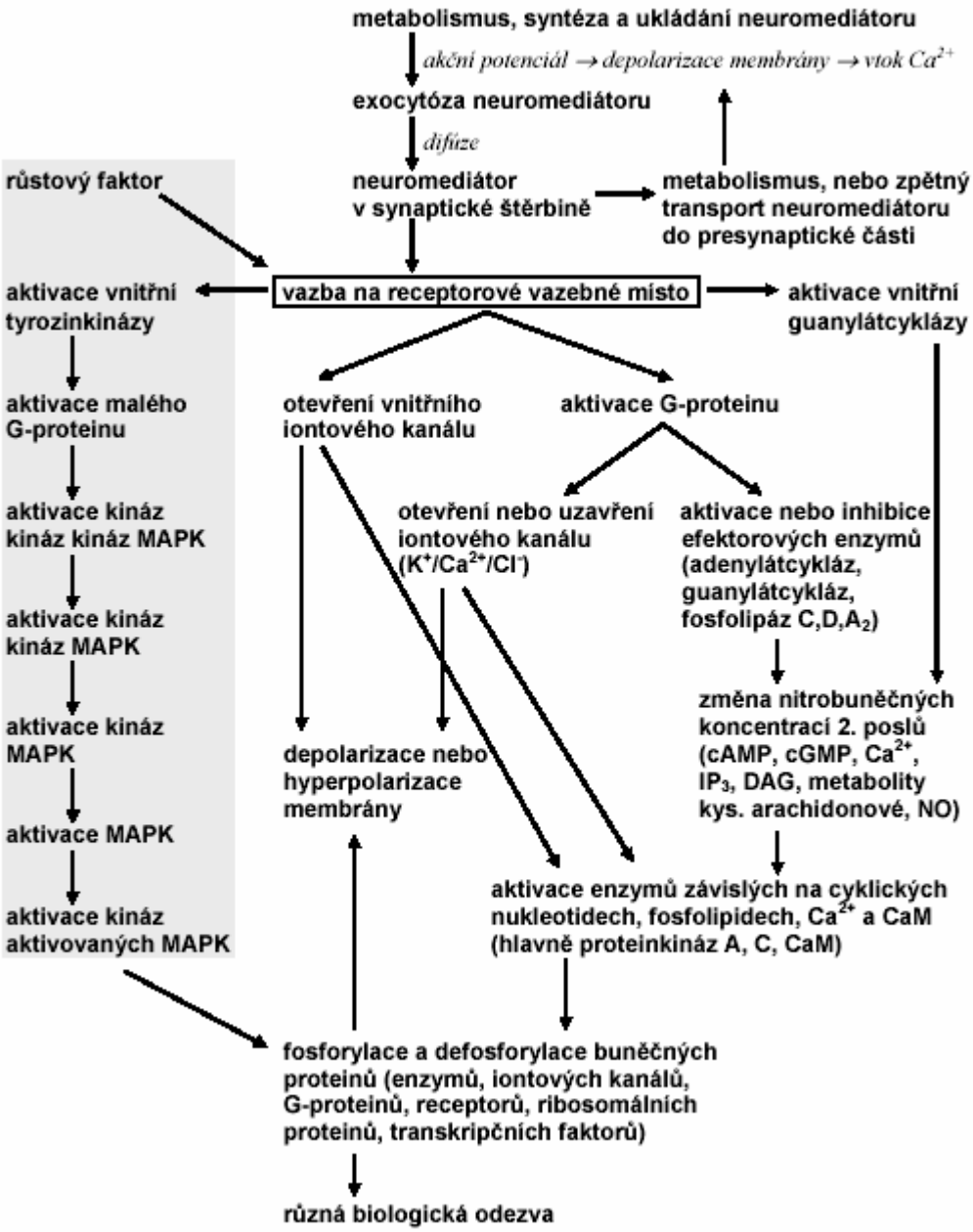
2.3.3. Transdukce signálu

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 aktivace 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, IP_3 – 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_2O_2	Dihydroxycalcein AM, Dihydrorhodamin 6G, Luminol, Lucigenin
Hydroxylový radikál	$HO\cdot$	Proxyl fluorescamin, TEMPO-9-AC, CM-H_2DCFDA
Kyselina chlorná	HOCl	Dihydrorhodamin 123, Luminol
Oxid dusnatý	NO	DAF-FM, DAA, Luminol
Peroxylový radikál	$HOO\cdot$	BODIPY FL EDA, Luminol, *cis*-Parinaric acid
Peroxynitritový anion	$ONOO^-$	H_2DCFDA, Coelenterazine, Dihydrorhodamin 123, Luminol
Singletový kyslík	$^1O_2$	*trans*-1-(2´-metoxyvinyl)pyrén
Superoxidový anion	$\cdot O_2^-$	Coelenterazine, Dihydroethidium, Lucigenin, Luminol, TEMPO-9-AC

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

2.3.5. Indikátory pro Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} a jiné kovové ionty

Fluorescenční měření změn nitrobuněčných iontů je možně díky sondám, které mění své spektrální vlastnosti po vazbě daného iontu. Nejčastěji se měří Ca^{2+}, kterému je věnována řada knih. Indikátory jsou obvykle deriváty chelátorů Ca^{2+}, Mg^{2+}, 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) $$c_a = K_d\,(I-I_{min})/(I_{max}-I)$$

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

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 rovnici (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 Ca^{2+}

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.

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.)

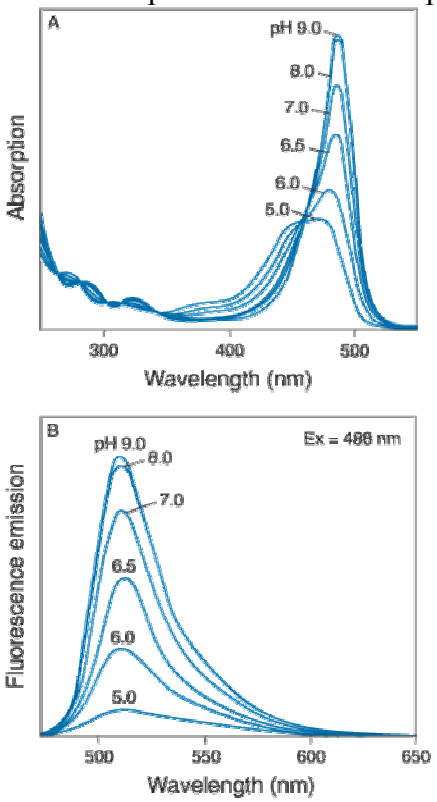
Fluorescein byl použit jako jeden z prvních indikátorů pH, především pro měření nitrobuněčných hodnot. Protože fluorescein se poměrně snadno z buněk uvolňuje jsou často používány jeho vysoce nabité deriváty, jako **5(6)-karboxyfluorescein** nebo **2',7'-bis-(2-karboxyetyl)-5-(a 6)-karboxyfluorescein (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 (λ_1=450 nm, λ_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 λ_1=420 nm a λ_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.

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.

Potencimetrické 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	• 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	• zobrazování membránových potenciálů • funkční sledování neuronů • detekce synaptické aktivity
RH 155	hybrid oxonol	rychlá; mění se absorbance při cca 720 nm	• neurony bezobratlých • membránové potenciály v svalové a nervové tkáni • napěťově řízené Ca^{2+} kanály
$DiOC_2(3)$ **$DiOC_5(3)$** **$DiOC_6(3)$** **$DiSC_3(5)$** **$DiIC_1(5)$**	karbocyanin	pomalá; fluorescenční odezva na depolarizaci závisí na koncentraci a detekční metodě	• 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	• apoptická mitochondriální depolarizace • Ca^{2+} regulace mitochondriemi • mitochondriální odezva na glutamátovou excitotoxicitu
Tetrametylrhodamin metyl a etyl estery	rhodamin	pomalá	• membránový potenciál v mitochondriích • Ca2+ regulace mitochondriemi
Oxonol V **Oxonol VI**	oxonol	pomalá; fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány	• rostlinná fyziologie • iontové kanály a elektrogenní pumpy • liposomy
$DiBAC_4(3)$ **B-24570** **$DiBAC_2(5)$** **$DiSBAC_2(3)$**	oxonol	pomalá; fluorescence se snižuje při hyperpolarizaci membrány	• kalcium a membránový potenciál • životnost buněk průtokovou cytometrií • konfokální mikroskopie
Merocyanin 540	merocyanin	rychlá/pomalá (dvoufázová odezva)	• membránový potenciál v mitochondriích a svalech • 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 případu 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) $$D = 1/6\tau_c = 1/2\sigma$$

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

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

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) $$f_r = 8\pi\eta r^3$$

a translační viskózní tření vztahem

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

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 difůzi 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 zopakuji:

stupeň polarizace

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

anizotropie fluorescence

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

depolarizační faktor

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

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

V kinetické metodě jsou měřeny zvlášť dvě křivky dohasínání $I_{||}(t)$ 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) $r(t) = (I_{||}(t) - I_{\perp}(t))/((I_{||}(t) + 2\ I_{\perp}(t)) = r_0\ \exp(-t/\tau_r)$

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

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) $D_r = kT/6V\eta$

kde je V – objem částice, η – viskozita prostředí, k – Boltzmannova konstanta (=1,380662.10^{-23} $J.K^{-1}$), 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) $r_0/r = 1 + \tau/\tau_r = 1 + 6D_r\tau = 1 + kT\tau/V\eta = 1 + C(r)T\tau/\eta$

kde je C(r) – parametr rotující molekuly, který je slabě závislý na r a pro nesférické 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) $((r_0/r)-1))^{-1} = K.\eta$

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-krystalickém prostředí nedohasíná k nule, jako je tomu u izotropní tekutiny (viz vztah 2.10), ale k určité limitní hodnotě r(∞)

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

Hodnota r(∞) je vztahována k průměrné orientaci podélné osy molekuly sondy vzhledem k určitému směru (kolmici k rovině membrány). Pro interpretaci r(∞) 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(∞) 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(∞) 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) $$r(t) = r(\infty) + (r(0)- r(\infty)) \exp(-t/\tau_a)$$

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.