

СПЕКТРАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

©2007 г.

А. В. ФЕОФАНОВ

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Традиционная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ). III. Метод ЛСКМ с использованием спектрального анализа. IV. Применения спектральной ЛСКМ в биологических исследованиях. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Оптическая микроскопия уже более 300 лет находит все более разнообразное и широкое применение. Анализ окрашенных срезов тканей и клеток в проходящем белом свете – наиболее простое, но весьма информативное применение оптической микроскопии и сегодня остается неотъемлемой частью клинических и медико-лабораторных исследований. Данный подход основан на использовании различий в интенсивности и цвете естественной или искусственной окраски

Принятые сокращения: АЛК – 5-аминолевулиновая кислота; АОСУ – акусто-оптическое светоделительное устройство; БАС – биологически активные соединения; ДЗ – дихроичное зеркало; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ФЭУ – фотоэлектронный умножитель; А – числовая апертура объектива; ВаРуг – бензо[а]пирен; ВЕСЕФ – 2',7'-бис(2-карбоксиитил)-5(6)-карбоксии-флуоресцеин; DOX – доксорубин; FRET – индуктивно-резонансный (Фёрстеровский) перенос энергии; МИТО – митоксантрон; K562R – клетки эритролейкоза человека K562 с множественной лекарственной устойчивостью; $\Delta Z_{\text{сп}}$ – толщина оптического слоя вблизи фокуса объектива, от которого измеряется сигнал; $\lambda_{\text{возб}}$ – длина волны лазера, возбуждающего флуоресценцию; $\lambda_{\text{фл}}$ – длина волны испускания флуоресценции; $\lambda_{\text{ми}}$ – длина волны максимума испускания флуоресценции.

Адрес для корреспонденции: 117997 г. Москва, ул.Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН; e-mail: alexei@nmr.ru.

определенных веществ в клетках и тканях в комбинации с анализом морфологических признаков. Разработка оптических систем для реализации методов темного поля, фазового и дифференциального интерференционного контраста открыла исследователям возможность наблюдения и исследования микроструктур в неокрашенных и слабоконтрастных биологических объектах, таких как живые клетки. Создание флуоресцентных микроскопов позволило на фоне огромного числа разнообразных молекул избирательно наблюдать флуоресцирующие, и стимулировало развитие новых методов для изучения структуры и функции клеток.

Изобретение конфокальной системы фильтрации сигнала обеспечило измерение флуоресцентных сигналов с трёхмерным субмикронным разрешением и существенно расширило возможности неразрушающего анализа прозрачных образцов. Еще два изобретения 20 века – лазер и компьютер – послужили мощным стимулом для бурного развития новых методов лазерной флуоресцентной микроскопии: лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ), микроспектроскопии, многофотонной микроскопии [1], микроскопии на основе измерения времени жизни флуоресценции [2], микроскопии с применением эффекта полного внутреннего отражения и 4Pi микроскопии [3]. Несмотря на значительное усложнение техники измерений и обработки результатов, новые методы получили широкое распространение. Развитие генной инженерии, протеомики, биотехнологии, современной фармацевтики и биомедицины способствовало быстрому внедрению новых методов оптической микроскопии.

В настоящем обзоре рассмотрен метод ЛСКМ с акцентом на те возможности, которые открывает исследователям его применение в комбинации со спектральным анализом.

II. ТРАДИЦИОННАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Конфокальная флуоресцентная микроскопия отличается от обычной флуоресцентной микроскопии, в первую очередь, улучшенным разрешением вдоль оптической оси объектива (ось Z), которое достигается за счет использования принципа конфокальной фильтрации флуоресценции, излучаемой образцом. Рис. 1 поясняет этот принцип. Если в обычных флуоресцентных микроскопах в качестве источника света, возбуждающего флуоресценцию, используется ртутная или ксеноновая лампа, то в современных конфокальных

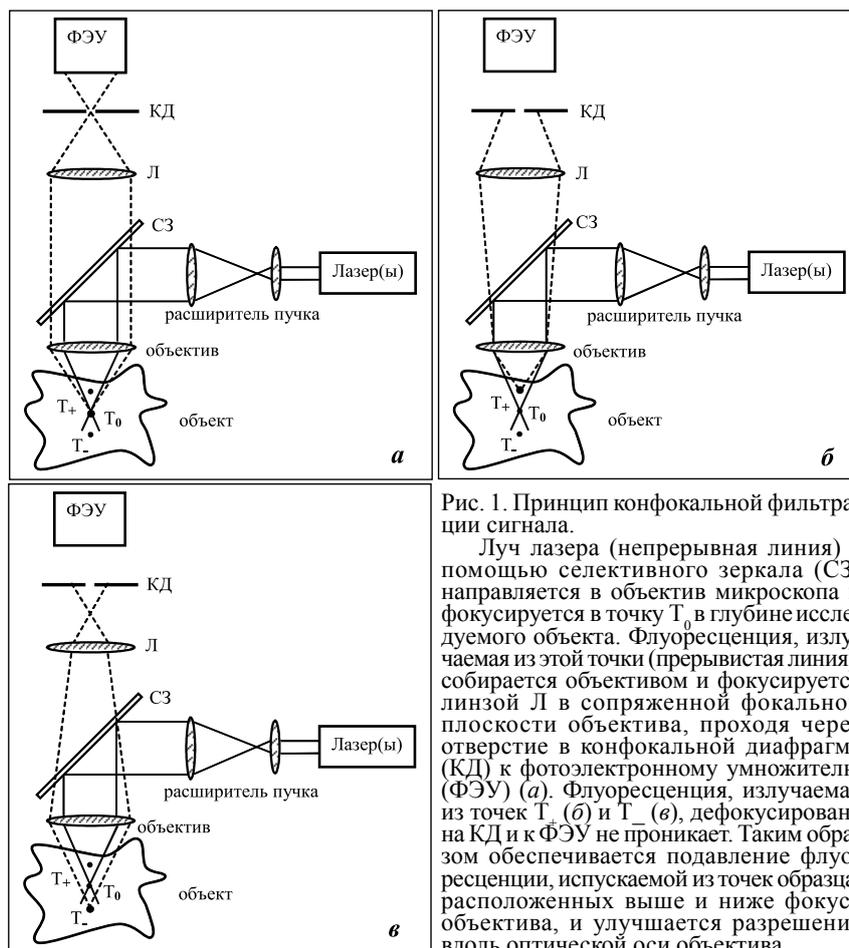


Рис. 1. Принцип конфокальной фильтрации сигнала.

Луч лазера (непрерывная линия) с помощью селективного зеркала (СЗ) направляется в объектив микроскопа и фокусируется в точку T_0 в глубине исследуемого объекта. Флуоресценция, излучаемая из этой точки (прерывистая линия), собирается объективом и фокусируется линзой Л в сопряженной фокальной плоскости объектива, проходя через отверстие в конфокальной диафрагме (КД) к фотоэлектронному умножителю (ФЭУ) (а). Флуоресценция, излучаемая из точек T_+ (б) и T_- (в), дефокусируется на КД и к ФЭУ не проникает. Таким образом обеспечивается подавление флуоресценции, испускаемой из точек образца, расположенных выше и ниже фокуса объектива, и улучшается разрешение вдоль оптической оси объектива.

микроскопах – это лазер (рис. 1). Преимущество лазеров по сравнению с ламповыми источниками света – это монохроматичность генерируемого света (ширина линии генерации значительно меньше 1 нм) и малая расходимость (т.е. высокая параллельность) пучка света. Монохроматичность возбуждающего флуоресценцию света дает возможность расширить спектральный диапазон регистрируемой флуоресценции и улучшить подавление светорассеяния на длине волны возбуждения. Малая расходимость пучка света способствует более эффективной работе оптической системы микроскопа, уменьшает число бликов, связанных с отклонением света от расчет-

ного оптического пути, улучшает точность фокусировки пучка света и уменьшает объем, в который можно сфокусировать свет на образце. Луч лазера заводится на образец через объектив с использованием, так называемого, селективного зеркала (СЗ, рис. 1). Специальное многослойное напыление из диэлектрических материалов обеспечивает высокоэффективное отражение света на длине волны генерации лазера и почти 100% пропускание света в остальном спектральном диапазоне. На образце лазер освещает не все поле зрения, как в ламповом флуоресцентном микроскопе, а фокусируется в точку. Флуоресцентное излучение, возбуждаемое лазером, собирается тем же объективом. СЗ отражает рассеянный образцом лазерный свет, пропуская через себя к системе детекции (фотоэлектронный умножитель, ФЭУ) флуоресцентное излучение, очищенное от паразитного светорассеяния. Очевидно, что лазерный луч возбуждает флуоресценцию во всех слоях образца, через которые он проходит (рис. 1). Флуоресценция, излучаемая слоями, расположенными выше и ниже фокальной плоскости, если она попадает на ФЭУ, регистрируется вместе с основным сигналом из фокуса объектива и ухудшает разрешение оптической системы. Чтобы улучшить разрешение, используется конфокальная диафрагма, которая помещается в сопряженной фокальной плоскости объектива, точнее, в той плоскости, где микроскоп фокусирует флуоресценцию, собранную из фокуса объектива (рис. 1). Через диафрагму проходит только та флуоресценция, которая излучается из небольшого объема вблизи фокуса лазерного луча под объективом (рис. 1, а). Флуоресценция, испускаемая слоями выше и ниже фокуса, оказывается дефокусированной на конфокальной диафрагме и через нее к ФЭУ не проникает (рис. 1, б, в). Диаметр конфокальной диафрагмы D , как правило, можно варьировать, тем самым изменяя толщину оптического слоя $\Delta Z_{\text{сл}}$ вблизи фокуса объектива, от которого измеряется сигнал.

Оценить $\Delta Z_{\text{сл}}$ можно по формуле [4]:

$$\Delta Z_{\text{сл}} = ([0,88 \times \lambda_{\text{фл}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5})]^2 + 2 \times n^2 \times (D/\Gamma)^2 / A^2)^{0,5},$$

где $\lambda_{\text{фл}}$ – длина волны испускания флуоресценции, A – числовая апертура объектива, n – показатель преломления иммерсионной среды между объективом и покровным стеклом препарата, Γ – увеличение оптической системы микроскопа между фокальной плоскостью объектива и сопряженной фокальной плоскостью, в которой расположена конфокальная диафрагма, $\lambda_{\text{сп}}$ – характерная средняя длина волны.

$$\lambda_{\text{ср}} = 1,41 \times \lambda_{\text{фл}} \times \lambda_{\text{возб}} / (\lambda_{\text{фл}}^2 + \lambda_{\text{возб}}^2),$$

где $\lambda_{\text{возб}}$ – длина волны излучения лазера, возбуждающего флуоресценцию.

Очевидно, что чем больше числовая апертура объектива, тем меньше $\Delta Z_{\text{сл}}$. Наибольшей апертурой обладают иммерсионные объективы. Именно они используются для ЛСКМ высокого разрешения.

Уменьшение D уменьшает $\Delta Z_{\text{сл}}$, но при этом снижается и интенсивность флуоресценции, которую диафрагма пропускает к ФЭУ. При исследовании биологических объектов интенсивность флуоресценции, как правило, не очень велика, что вынуждает искать компромисс между диаметром диафрагмы (т.е. $\Delta Z_{\text{сл}}$) и отношением сигнал/шум в конфокальных изображениях. Типичная для реального эксперимента величина $\Delta Z_{\text{сл}}$ (при $A = 1,3$, $n=1,5$, $\lambda_{\text{ср}} = 0,5$ мкм, $\lambda_{\text{фл}} = 0,54$ мкм) составляет 1,06 мкм.

В этих условиях разрешение ЛСКМ в плоскости объекта XY остается таким же, как у обычного флуоресцентного микроскопа [4]:

$$\Delta X = \Delta Y = 0,51 \times \lambda_{\text{фл}} / A.$$

При $A = 1,3$ и $\lambda_{\text{фл}} = 0,54$ мкм разрешение составляет 0,22 мкм.

Если интенсивность флуоресценции позволяет уменьшить D еще в 4–5 раз, то появляется возможность улучшить также и разрешение в плоскости XY сканируемого объекта [4]. В этом случае ЛСКМ обеспечивает разрешение $\Delta X = \Delta Y = 0,14$ мкм, $\Delta Z_{\text{сл}} = 0,45$ мкм.

На рис. 2 представлена принципиальная схема трехканального лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Для ЛСКМ используют лазеры с непрерывной генерацией света и дискретным набором длин волн генерации: 351 и 364 нм – ионный Ar лазер с резонатором на УФ диапазон; 458, 476, 488, 496 и 514,5 нм – ионный Ar лазер с резонатором на видимый диапазон; 543, 594 или 632,8 нм – газовые HeNe лазеры; 647 нм – ионный Kr лазер; 532 нм – твердотельный Nd³⁺-YAG лазер; 405 нм – диодный лазер; 442 нм – HeCd лазер и некоторые другие. Импульсное излучение способствует более интенсивному протеканию нежелательных деструктивных фотохимических процессов в образце. Поэтому импульсные лазеры применяются только в тех методах, которые нельзя реализовать на основе непрерывных лазеров: в многофотонной микроскопии, микроскопии на основе измерения времени жизни флуоресценции и 4Pi микроскопии.

Совместное использование в одном микроскопе нескольких лазеров (рис. 2) позволяет перекрыть весь спектральный диапазон, необходимый для возбуждения исследуемых флуорофоров. Световые

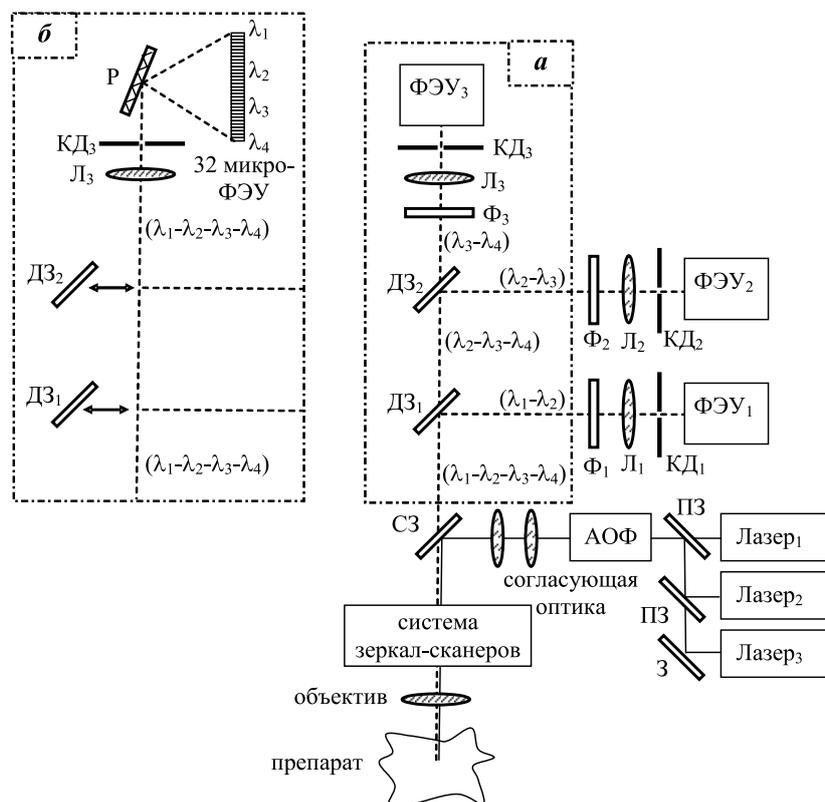


Рис. 2. *а.* Принципиальная схема трёхканального лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

б. Отличия в схеме лазерного сканирующего конфокального микроскопа фирмы Zeiss (Германия) со спектральным модулем от обычного трёхканального лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Часть исходной схемы (*а*), претерпевающая изменение, обведена штрих-пунктирной линией. Остальные элементы схемы остаются без изменений.

Луч лазера обозначен сплошной линией. Флуоресценция, испускаемая препаратом в диапазоне длин волн $\lambda_1 - \lambda_4$, обозначена прерывистой линией. АОФ-акустооптический фильтр, ДЗ₁ и ДЗ₂ – дихроичные зеркала, которые отражают свет с длиной волны короче λ_2 и λ_3 соответственно и пропускают через себя более длинноволновый свет, то есть делят флуоресценцию в области длин волн $\lambda_1 - \lambda_4$, на три широких спектральных диапазона $\lambda_1 - \lambda_2$, $\lambda_2 - \lambda_3$ и $\lambda_3 - \lambda_4$, З – зеркало, КД₁, КД₂ и КД₃ – конфокальные диафрагмы, Л₁, Л₂ и Л₃ – фокусирующие линзы, ПЗ – полупрозрачное зеркало, Р – интерференционная решетка, раскладывающая флуоресценцию препарата в спектр, СЗ – селективное зеркало, Ф₁, Ф₂ и Ф₃ – оптические фильтры, ФЭУ₁, ФЭУ₂ и ФЭУ₃ – фотоэлектронные умножители.

Пояснения по работе обычного трехканального лазерного сканирующего конфокального микроскопа и микроскопа со спектральным модулем даны в тексте.

пучки от разных лазеров с помощью системы, состоящей из зеркала (З) и полупрозрачных зеркал (ПЗ) сводятся в один соосный пучок и через перестраиваемый акустооптический фильтр (АОФ) заводятся в оптическую систему микроскопа. АОФ за счет быстро-изменяемой пропускающей способности на заданных длинах волн пропускает в микроскоп только то лазерное излучение, которое используется в данный момент для возбуждения флуоресценции, блокируя свет на остальных лазерных длинах волн. При необходимости АОФ способен пропускать свет сразу на нескольких длинах волн, обеспечивая одновременное возбуждение нескольких флуорофоров, значительно отличающихся по спектрам возбуждения и испускания флуоресценции.

Как описано выше, луч лазера, отразившись от СЗ (имеется несколько сменных СЗ для разных лазеров), проходит через объектив, фокусируется в заданную точку образца и возбуждает в ней флуоресценцию. Между СЗ и объективом установлена система из двух зеркал-сканеров (рис. 2), которая позволяет направить лазерный луч в любую точку в плоскости препарата ХУ в пределах поля зрения объектива.

Предположим, что образец излучает флуоресценцию в диапазоне длин волн λ_1 – λ_4 . Излучение, собранное объективом и прошедшее через СЗ, разводится с помощью дихроичных зеркал ДЗ₁ и ДЗ₂ по трем направлениям (трем каналам). ДЗ₁ и ДЗ₂ устроены так, что отражают свет с длиной волны короче λ_2 и λ_3 соответственно и пропускают через себя более длинноволновый свет, то есть делят флуоресценцию в области длин волн λ_1 – λ_4 на три широких спектральных диапазона λ_1 – λ_2 , λ_2 – λ_3 и λ_3 – λ_4 . Сменные ДЗ имеют различные граничные длины волн λ_2 и λ_3 , что позволяет по-разному в зависимости от задачи делить испускаемую образцом флуоресценцию.

В каждом канале устанавливается дополнительный оптический фильтр Φ_1 (Φ_2 , Φ_3), который выделяет из широкого диапазона нужный исследователю более узкий спектральный участок. Для каждого канала предусмотрено несколько сменных фильтров с разными спектральными характеристиками. Выделенное фильтром излучение фокусируется линзой на конфокальную диафрагму КД₁ (КД₂, КД₃), и интенсивность той доли света, которая прошла через эту диафрагму, измеряется соответствующим ФЭУ (рис. 2).

Распределение флуоресценции в плоскости ХУ исследуемого объекта регистрируется следующим образом. С помощью системы зеркал-сканеров лазерный луч последовательно перемещается от точки к точке в плоскости ХУ: одно зеркало отклоняет луч вдоль оси Х, а другое – вдоль оси Y. По мере сканирования сигнал, поступаю-

щий с ФЭУ, преобразуется в компьютере в двумерное изображение, описывающее распределение интенсивности флуоресценции в плоскости XY. Если сигнал поступает в компьютер с трех ФЭУ сразу (случай трёхканального микроскопа), то одновременно регистрируются три изображения одной и той же области образца, характеризующие распределение интенсивности флуоресценции в трёх спектральных диапазонах, выбранных с помощью соответствующих дихроичных зеркал ДЗ₁, ДЗ₂ и фильтров Ф₁, Ф₂ и Ф₃ (рис. 2, а).

Поскольку конфокальная система фильтрации сигнала позволяет исследователю регистрировать сигнал, испускаемый только из фокальной плоскости, то, перестраивая фокус объектива, можно, не нарушая целостности исследуемого объекта, измерить распределение флуоресценции в любом оптическом сечении вдоль оси Z. Исследуемый препарат должен быть достаточно прозрачным, чтобы свет мог проникнуть на заданную глубину. Но даже для прозрачных препаратов эффекты светорассеяния, поглощения возбуждающего света и перепоглощения испускаемой флуоресценции ограничивают возможности ЛСКМ глубиной порядка 100 мкм от поверхности сканируемого объекта.

Перестройка фокуса объектива по оси Z достигается вертикальным перемещением объектива или предметного столика. Детальная серия изображений оптических сечений XY, измеренных с небольшим шагом по оси Z, дает исследователю информацию о трёхмерном распределении флуорофоров в изучаемом объекте. Эта серия доступна для анализа в виде двумерных изображений в сечениях XY, ZX и YZ, в виде наложения проекций всех сечений вдоль оси Z на плоскость XY или в виде трёхмерной модели распределения интенсивностей, которую можно вращать вокруг любой оси на экране компьютера.

Исследования методом ЛСКМ могут проводиться на фиксированных и живых клетках [5–7], на тонких срезах тканей растительного и животного происхождения [7, 8], и даже на небольших организмах [7, 9].

Для экспериментов на живых объектах разработаны специальные инкубаторы, которые монтируются прямо на микроскоп и позволяют при необходимости вести многочасовые исследования, поддерживая заданную температуру, содержание CO₂ и кислорода, обеспечивая возможность смены среды и проведения микроинъекций.

Чувствительность микроскопов и скорость лазерного сканирования достаточно велики, чтобы изучать динамические и кинетические изменения, происходящие в живых объектах. При интенсивном сигнале современные сканирующие микроскопы позволяют измерить изображение размером 512 × 512 точек за 200 мс. Менее детальные изображения регистрируются еще быстрее. А при исследовании очень быстрых процессов в клетках, например флуктуаций концентрации

свободных ионов кальция, профиль флуоресцентного сигнала вдоль линии образца можно измерить за 0,3–0,6 мс. Недавно выпущенный в производство лазерный сканирующий микроскоп LSM5-Live (Zeiss, Германия), специально разработанный для максимально быстрого сканирования, способен измерить изображение размером 512×512 точек за 8,3 мс, а профиль сигнала вдоль линии – за 17 мкс. Такая скорость достигнута за счет фокусировки лазерного луча на образце не в точку, а в линию с помощью цилиндрической оптики и параллельного измерения сигнала сразу от всех точек этой линии. Вместо конфокальной диафрагмы круглой формы для пространственной фильтрации сигнала в микроскопе LSM5-Live используется набор щелевых диафрагм. Из-за этого, очевидно, ухудшается пространственное разрешение и, в частности, параметр $\Delta Z_{\text{сл}}$.

ЛСКМ является многомерной микроскопией: трехмерный массив данных XYZ формируется при регистрации пространственного распределения флуорофора; повторные измерения трехмерного распределения во времени дают четырехмерный массив данных XYZt. Дополнительные возможности и соответственно еще одно, пятое, измерение появляются при использовании спектрального подхода к анализу сигналов флуоресценции.

III. МЕТОД ЛСКМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА. ПРИБОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

Если собранное микроскопом излучение флуоресценции разложить в спектр, то появляется возможность идентификации флуорофоров и анализа их состояния по характеристичным особенностям исследуемых спектров. Этот метод получил название микро-спектрофлуориметрии.

Описания конструкций первых лабораторных микроспектрофлуориметров появляются в работах отечественных [10–14] и иностранных исследователей [15–18] с начала 60-х годов прошлого столетия. Эти приборы измеряли спектры целых клеток или одного-двух участков в клетке. Совершенствование микроспектрофлуориметров шло по пути уменьшения времени записи спектра за счет использования многоканальных детекторов [19, 20] и разработки систем для одновременного измерения серии спектров вдоль выбранной линии образца [21, 22]. С появлением лазеров, облегчающих фокусировку возбуждающего света в пятно диаметром около 0,5 мкм, стало доступным измерять и анализировать спектры нескольких точек цитоплазмы и нескольких точек ядра. Конфокальная система фильтрации сигнала

обеспечила возможность измерения спектров из произвольных микрообъемов внутри образца с пространственным разрешением порядка $0,5 \text{ мкм}^3$. Компьютерное управление сканированием образца и записью спектров позволило перейти к измерению и анализу больших массивов спектров. Объединение разработок в области микроспектрофлуориметрии и традиционной ЛСКМ привело к созданию современных спектральных лазерных сканирующих конфокальных микроскопов, в которых помимо традиционной системы регистрации сигнала на основе оптических фильтров и ФЭУ имеется спектральный модуль (рис. 2, б).

Здесь и далее, термин спектральная ЛСКМ будет использоваться для измерений, при которых в каждой точке сканируемого оптического сечения измеряется спектр. Термин традиционная ЛСКМ будет обозначать измерения, проводимые в нескольких удаленных друг от друга спектральных диапазонах с использованием фильтров (рис. 2, а). Термин микроспектрофлуориметрия будет применяться для обозначения дискретных измерений спектров отдельных точек исследуемого образца, как правило, без использования конфокальной системы фильтрации сигнала.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЛАЗЕРНЫЕ СКАНИРУЮЩИЕ КОНФОКАЛЬНЫЕ МИКРОСКОПЫ

Спектральные лазерные сканирующие конфокальные микроскопы разработаны на основе нескольких оригинальных оптических схем, каждая из которых имеет свои преимущества.

Прибор фирмы Dilog (Франция), схема которого представлена на рис. 3 [23–25], ориентирован на проведение измерений с высоким спектральным разрешением, а флуоресцентные изображения образцов реконструируются только на основе записанных спектров. Лазерный луч вводится в микроскоп с помощью светоделительной пластины нейтральной оптической плотности (пропускание 50%). Первый сканер отклоняет лазерный луч, периодически перемещая сфокусированное объективом световое пятно вдоль линии $a-b-v$ на образце (рис. 3). Излучение образца собирается объективом, фильтруется с помощью конфокальной диафрагмы, а светорассеяние на длине волны возбуждения подавляется с помощью узкополосного голографического фильтра (коэффициент подавления 10^5). Второй сканер колеблется синхронно по фазе с первым сканером и распределяет излучение флуоресценции опять вдоль линии. Затем с сохранением пространственного разрешения сигнал раскладывается дифракционной решеткой в спектр и фокусируется на двумерном детекторе: спектры от различных точек вдоль линии $a-b-v$ образца

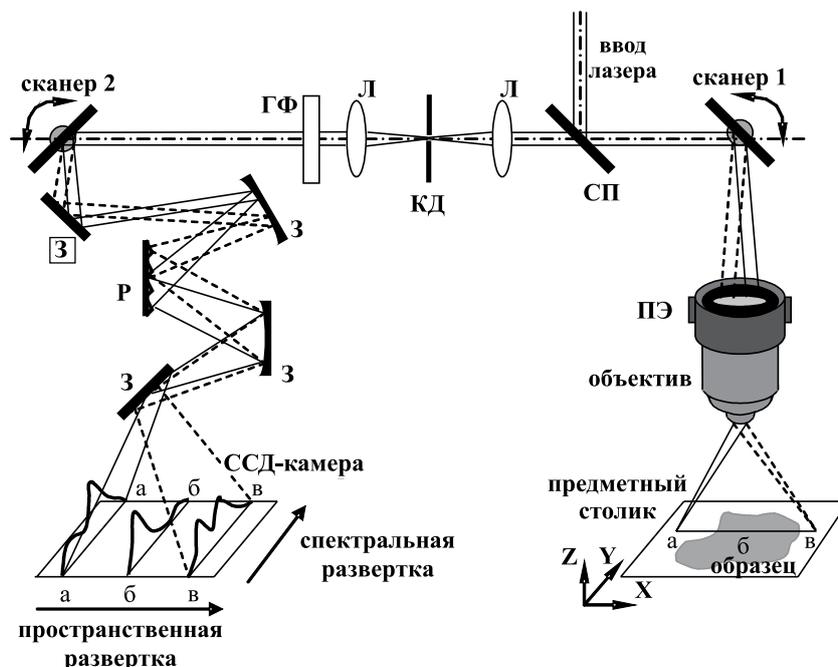


Рис. 3. Принципиальная схема линейного сканирования, используемая в спектральном лазерном сканирующем конфокальном микроскопе фирмы Dilor (Франция). Пояснения по работе данного прибора даны в тексте.

ПЭ – пьезо-электрический элемент, СП – светоделительная пластина нейтральной оптической плотности (50:50), Л – линза, КД – конфокальная диафрагма, ГФ – узкополосный голографический фильтр, З – зеркало, Р – дифракционная решетка, раскладывающая сигнал в спектр, ССД-камера – двумерный детектор на основе прибора с зарядовой связью.

проецируются на различные ряды фоточувствительных элементов двумерного детектора на основе прибора с зарядовым сопряжением, более известного пользователям цифровой фото- и видео- техники, как ССД матрица (рис. 3). Прибор позволяет измерять параллельно до 240 спектров вдоль линии образца, а автоматическое перемещение предметного столика обеспечивает сканирование образца линия за линией. Использование охлаждаемого ССД-детектора существенно улучшает отношение сигнал/шум, облегчая регистрацию и анализ слабых сигналов. Для возбуждения используется только одна длина волны лазера, а ее смена требует перенастройки прибора.

Пространственное разрешение этого прибора $\Delta X = \Delta Y = 0,3 \text{ мкм}$, $\Delta Z_{\text{ст}} = 2 \text{ мкм}$. Спектральное разрешение – 1 нм. При этом разрешении

9600 спектров флуоресценции, формирующих основу изображения размером 120×80 точек (область сканирования 36×24 мкм) могут быть измерены и переданы в память компьютера за 45 с.

В конфокальном микроскопе «Radiance Rainbow» фирмы Bio-Rad излучение флуоресценции разделяется дихроичными зеркалами на несколько спектральных диапазонов по числу каналов детекции. В каждом канале установлены два 8-ми позиционных диска с набором светофильтров, парные комбинации которых обеспечивают пропускание на ФЭУ сигнала в пределах выбранной узкой (≈ 10 нм) спектральной полосы. Для этого на одном диске закреплены фильтры, с различным длинноволновым пропусканием, а на другом – фильтры с различным коротковолновым пропусканием. Комбинация двух фильтров определяет итоговую полосу пропускания. Регистрация спектрального массива данных проводится путем последовательного измерения в выбранном оптическом сечении двумерных конфокальных изображений образца с разными комбинациями фильтров и занимает несколько минут [26].

В микроскопе «LSM510-META» фирмы Zeiss (рис. 2, б) помимо двух-трех обычных конфокальных каналов детекции с наборами фильтров предусмотрен дополнительный канал, в котором сигнал от образца разлагается дифракционной решеткой в спектр и проецируется на линейку из 32 микро-ФЭУ [26]. На каждый ФЭУ в этой линейке проецируется фиксированная спектральная область ($\approx 10,7$ нм). В процессе измерений сигналы регистрируются со всех 32 микро-ФЭУ или с их части по выбору. Полный спектральный массив данных можно измерить в течение одного цикла сканирования, что при интенсивном сигнале занимает от нескольких секунд до десятков секунд. Конфокальная диафрагма КД₃ (рис. 2, б) является общей для всех 32 микро-ФЭУ.

Фирма Leica в конфокальных микроскопах серии «TCS SP» (рис. 4) полностью отказалась от использования оптических фильтров, построив оптическую схему на спектральном принципе [26]. Излучение флуоресценции, собранное от исследуемого образца объективом, пройдя через акустооптическое светоделительное устройство (АОСУ), фильтруется с помощью конфокальной диафрагмы и разлагается в спектр призмой. Спектр флуоресценции распределяется на пять ФЭУ с помощью системы регулируемых щелей, поверхность которых сделана зеркальной. Каждая щель пропускает к расположенному за ней ФЭУ спектральную полосу, определяемую шириной щели, а остальную часть спектра отражает на следующие щель и ФЭУ.

Ширина щелей регулируется, и они выполняют функцию фильтров, перестраиваемых по ширине и диапазону длин волн пропуска-

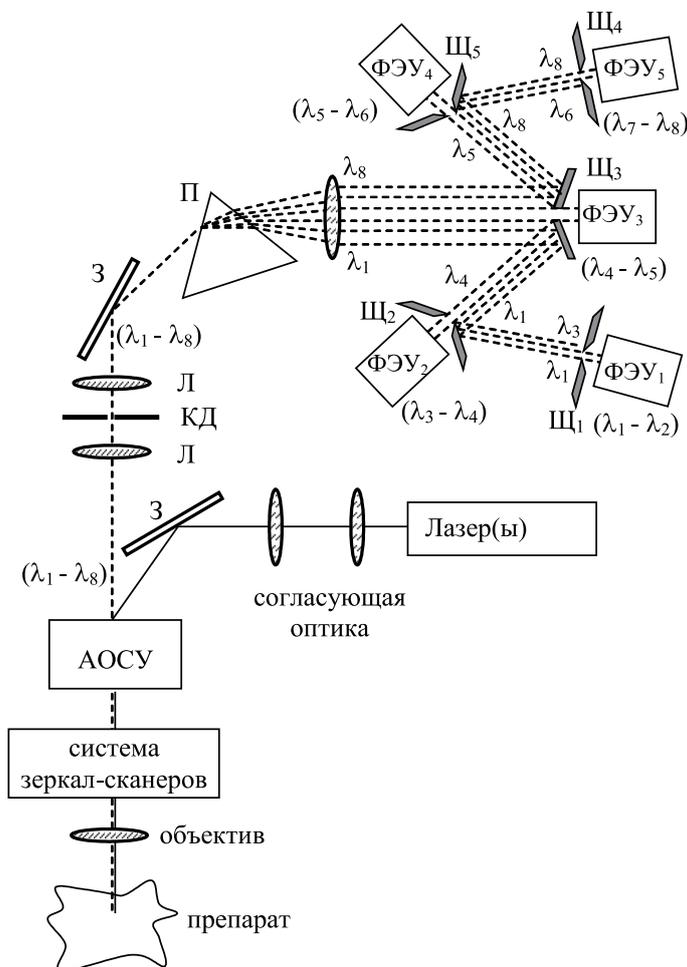


Рис. 4. Принципиальная схема спектрального лазерного сканирующего конфокального микроскопа фирмы Leica (Германия).

Луч лазера обозначен сплошной линией. Флуоресценция (прерывистая линия), излучаемая препаратом в диапазоне длин волн $\lambda_1-\lambda_8$, раскладывается призмой П в спектр. Часть спектра $\lambda_4-\lambda_5$ пропускается щелью Щ₃ к ФЭУ₃. Не используемые в этом канале области спектра $\lambda_1-\lambda_4$ и $\lambda_5-\lambda_8$ отражаются от зеркальной поверхности щели Щ₃ к ФЭУ₂ и ФЭУ₄. Зеркальные щели Щ₂ и Щ₄ пропускают к ФЭУ₂ и ФЭУ₄ спектральные полосы $\lambda_3-\lambda_4$ и $\lambda_5-\lambda_6$, отражая оставшиеся области спектра на ФЭУ₁ и ФЭУ₅. Щели Щ₁ и Щ₅ в свою очередь позволяют выбрать узкие спектральные полосы для измерения с помощью ФЭУ₁ и ФЭУ₅.

АОСУ – акустооптическое светоделительное устройство, З – зеркало, КД – конфокальная диафрагма, Л – линза, ФЭУ – фотоэлектронный умножитель.

ния. Предельное спектральное разрешение этого прибора составляет 5 нм. Полный спектральный массив данных регистрируется путем проведения серии повторных сканирований выбранного оптического сечения образца с последовательным сдвигом щелей вдоль спектра. Конфокальная диафрагма в этом микроскопе одна, общая для всех ФЭУ. АОСУ (рис. 4) выполняет роль дихроичного зеркала ДЗ₁, используемого в обычных конфокальных микроскопах (рис. 1). По данным разработчиков это устройство характеризуется более высоким пропусканием, чем дихроичные зеркала, и позволяет с микросекундным быстродействием переключаться с одной комбинации длин волн возбуждения на другую.

Другие возможные способы достижения спектрального разрешения при измерении флуоресцентных изображений под микроскопом рассмотрены в работе [27] и включают в себя применение акустооптического перестраиваемого фильтра, жидкокристаллического перестраиваемого фильтра [28] или Фурье-интерферометра [29]. Но поскольку формально эти системы не относятся к конфокальным, они в данном обзоре не рассматриваются.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ДАННЫХ, ИЗМЕРЕННЫХ МЕТОДОМ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛСКМ

С помощью спектрального конфокального микроскопа можно измерить спектр флуоресценции в каждой точке объемного образца, что дает четырехмерный массив данных XYZλ, а повторные измерения во времени формируют пятимерный массив данных XYZλt.

Спектральный массив данных XYλ, измеренный в некотором оптическом сечении образца, можно рассматривать как набор двумерных изображений, описывающих распределение в этом сечении интенсивности флуоресценции на разных длинах волн. С другой стороны, этот массив представляет собой набор спектров флуоресценции, измеренных в каждой точке сканируемого сечения, и позволяет анализировать сигналы нескольких флуорофоров, присутствующих в исследуемом образце, а также изучать изменения в этих сигналах, вызванные взаимодействием флуорофоров с микроокружением.

Имея в своем распоряжении спектральный массив данных XYλ, можно несколькими способами создавать новые двумерные изображения (спектральные изображения), выявляя особенности распределения изучаемых соединений. Спектральные изображения могут быть созданы на основе: (i) суммирования интенсивностей сигнала в выбранном непрерывном спектральном диапазоне; (ii) сложения, вычитания, деления или умножения сигналов в различных

областях спектра; (iii) представления спектров, измеренных в каждой точке сканируемого сечения в виде линейной комбинации спектров исследуемых флуорофоров.

При сложении изображений, измеренных в соседних спектральных полосах (например, $\lambda_4-\lambda_5$ и $\lambda_5-\lambda_6$; $\lambda_8-\lambda_9$, $\lambda_9-\lambda_{10}$ и $\lambda_{10}-\lambda_{11}$; и т.п.), получают новые спектральные изображения, как бы измеренные с более широкополосным фильтром (в наших примерах – $\lambda_4-\lambda_6$ и $\lambda_8-\lambda_{11}$). Суммарная интенсивность сигнала рассчитывается в заданной области спектра для каждой точки образца и определяет яркость (рис. 5, б–ж) или цвет (рис. 5, з) соответствующего элемента двумерного изображения. Этот способ по сути аналогичен использованию полосового фильтра в обычном конфокальном сканирующем микроскопе. Отличительным преимуществом является то, что, имея полные спектры, ширину и положение полосы пропускания «фильтра» можно варьировать в широких пределах. Иными словами, в распоряжении исследователя находится «многоканальный» конфокальный сканирующий микроскоп, число каналов в котором ограничено только логикой анализа сигналов, присутствующих в спектрах и спектральным разрешением спектрального модуля.

Арифметические действия с изображениями, измеренными в различных областях спектра (рис. 5, ж), позволяют провести, например, нормировку изменяющегося сигнала (измеряется в одном спектральном диапазоне) на опорный сигнал сравнения (измеряется в другом спектральном диапазоне) или использовать изменение формы спектра (сдвиг максимума, уширение), вызванное неким процессом в клетке (например, изменение рН, концентрации ионов) для его регистрации и оценки величины. При этом возможность выбора спектральных диапазонов намного шире, чем в случае обычного конфокального микроскопа с фиксированным набором фильтров.

Третий, наиболее широко применяемый способ создания спектральных изображений основан на представлении спектров, измеренных в каждой точке сканируемого сечения, в виде линейной комбинации n спектров (спектров сравнения) флуорофоров, присутствующих в образце [27, 30]:

$$I_{\text{ex}}(\lambda) = \sum_i a_i \times I_i(\lambda),$$

где $I_{\text{ex}}(\lambda)$ – экспериментальный спектр, измеренный в отдельной точке образца (зависимость интенсивности флуоресценции I_{ex} от длины волны λ), $I_i(\lambda)$ – спектр i -ого флуорофора, присутствующего в образце (i меняется от 1 до n), a_i – коэффициент разложения, соответствующий вкладу i -ого спектра сравнения $I_i(\lambda)$ в экспериментальный спектр. Подбор коэффициентов a_i ведется методом наименьших квадратов

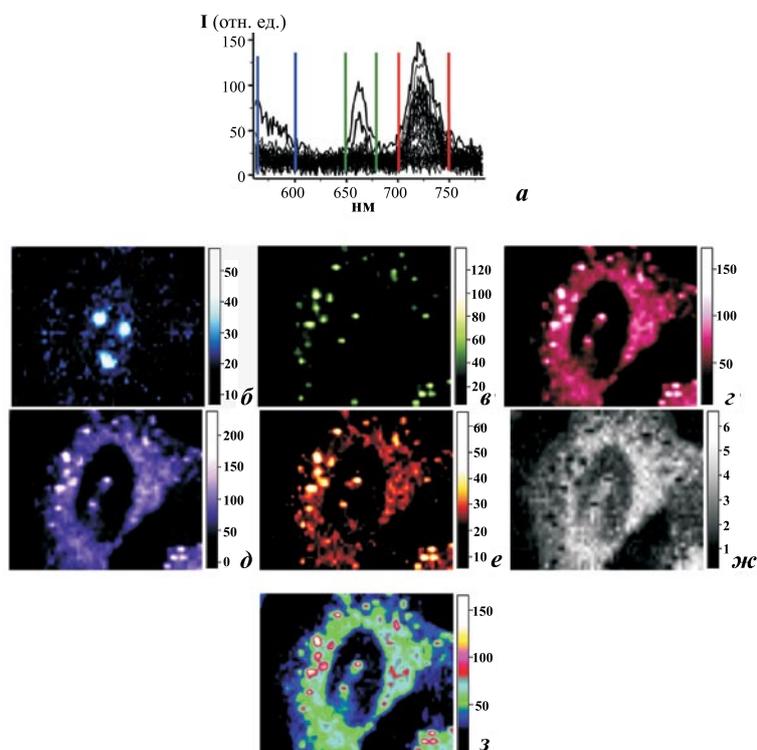


Рис. 5. Примеры реконструкции спектральных изображений на основе массива данных ХУЛ. Клетки A549 аденокарциномы легкого человека окрашены тремя флуорофорами. Методом спектральной ЛСКМ измерен двумерный набор спектров флуоресценции, описывающих распределение этих флуорофоров в одном из оптических сечений живой клетки.

(а) Выборка из измеренных спектров, характеризующая вид спектров в разных точках оптического сечения. Пары вертикальных курсоров отмечают три области спектра, в которых рассчитываются суммарные интенсивности сигнала для каждой точки образца. Эти суммарные интенсивности определяют яркость (б–ж) или цвет (з) соответствующего элемента изображения.

(б–з) Спектральные изображения одной и той же клетки, созданные на основе суммарного сигнала в области 560–600 нм (б), 650–680 нм (в), 700–750 нм (г), интенсивности сигнала на длине волны 720 нм (д), интегральной интенсивности всего спектра в области 560–780 нм (е), отношения интенсивности сигнала в области 700–750 нм к интенсивности сигнала в области 650–680 нм (ж), вновь на основе интегрального сигнала в области 700–750 нм, но здесь разные интенсивности представлены разным цветом (з).

Реконструкция изображений осуществляется в любое время любым способом на основе анализа полных спектров, которые хранятся в компьютере в виде трехмерного массива данных ХУЛ.

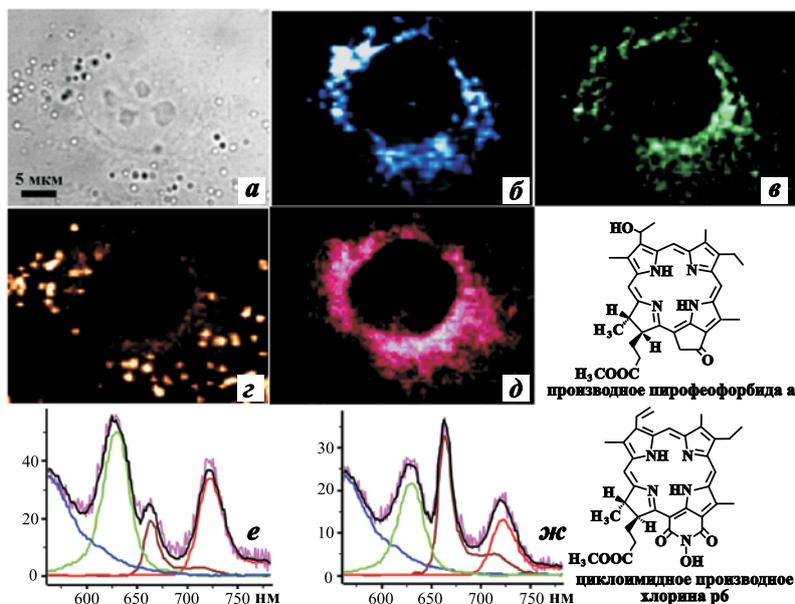


Рис. 6. Спектральная ЛСКМ позволяет изучать взаимное внутриклеточное распределение нескольких соединений с перекрывающимися спектрами флуоресценции.

Клетки A549 были проинкубированы с VODIPY-церамидом и двумя фотосенсибилизаторами, а именно, с производным пиррофеофорбида *a* и циклоимидным производным хлорина *рб*. В конце инкубации клетки были дополнительно окрашены родамином 6Ж.

(*a*) микрофотография клетки; (*б-д*) конфокальные спектральные изображения распределения митохондрий, окрашенных Р6Ж (*б*), аппарата Гольджи, окрашенного VODIPY-церамидом (*в*), производного пиррофеофорбида *a* (*з*) и циклоимидного производного хлорина *рб* (*д*); (*з, и*) примеры представления экспериментальных спектров (розовые) в виде линейной суперпозиции спектров Р6Ж (синий), VODIPY-церамида (зеленый), производного пиррофеофорбида *a* (коричневый) и циклоимидного производного хлорина *рб* (красный). Расчетный спектр (черный) перекрывается с экспериментальным спектром (розовый). $\lambda_{возб} = 543$ нм.

до наилучшего совпадения расчетного спектра с экспериментальным в каждой точке сканируемой области.

В результате разложения каждого экспериментального спектра на *n* составляющих (рис. 6) создаются *n* спектральных изображений. В *i*-м спектральном изображении каждой точке образца поставлена в соответствие расчетная интегральная интенсивность (вклад) *i*-го спектра сравнения в этой точке (рис. 6).

В качестве спектров сравнения могут выступать: спектры исследуемых флуорофоров, измеренные от растворов (микрорекристаллов, волокон, аморфных состояний); спектры, измеренные от других образцов, в которых флуорофоры присутствуют по отдельности; спектры, извлеченные из спектрального массива, записанного от анализируемого образца, или результаты их математической обработки (после вычитания базовой линии и/или вклада примесей, сглаживания, фильтрования, коррекции и т.п.).

Если спектры присутствующих в образце флуорофоров известны заранее, то разложение измеряемых спектров на спектры сравнения может проводиться уже в процессе сканирования образца с выдачей результирующих спектральных изображений на экран в реальном времени. Такой режим получил название «дактилоскопических» измерений, т.е. измерений по «отпечаткам пальцев» (fingerprinting). Альтернативно, подбор спектров сравнения и реконструкция спектральных изображений может проводиться в любое время и разными способами после эксперимента. В отличие от традиционной ЛСКМ, где записанные изображения уже нельзя изменить, спектральная ЛСКМ сохраняет всю спектральную информацию об исследуемом объекте и позволяет исследователю в любой момент вновь вернуться к ее анализу и изменить параметры спектральных изображений (набор спектров сравнения) на основе новых идей, не проводя повторных измерений.

IV. ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛСКМ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Степень комбинирования спектрального анализа и методик традиционной ЛСКМ варьирует широко – от микроспектрофлуориметрических измерений в отдельных точках образца до исследований на основе измерения конфокальных спектральных массивов данных $X\Upsilon\lambda$, $X\Upsilon\lambda t$, $X\Upsilon Z\lambda$. Это связано, как с доступным для исследователя приборным обеспечением, так и с характером решаемых задач. Ниже приведена довольно условная классификация микроспектральных исследований по степени объединения спектроскопии и методик ЛСКМ, и на характерных примерах рассмотрено, как и какие задачи позволяет решать спектральная ЛСКМ.

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ В ОТДЕЛЬНЫХ ТОЧКАХ ОБРАЗЦА

В основе данного типа микроспектральных исследований лежит измерение спектров в выбранных участках образца (например, в

ядре и цитоплазме клетки, в различных клетках или структурах среза ткани) и анализ их особенностей. Статистическая достоверность достигается проведением измерений на выборке однотипных образцов, например, на выборке клеток или аналогичных срезов тканей нескольких особей, растений и т.п. Повторное измерение спектров в одних и тех же точках (зонах) через заданные промежутки времени позволяет изучать развитие исследуемого процесса в отдельном образце, например, образование и выведение метаболитов в клетках. Такой экспериментальный подход очень широко применялся до середины 90-х годов, что связано со слабой автоматизацией эксперимента, и его продолжают успешно использовать в ряде лабораторий. Важно отметить, что многие направления, в которых перспективно применение спектральной ЛСКМ, были выявлены в ранних работах по микроспектрофлуориметрии, и они требуют более детальной разработки с использованием современной приборной базы. Представленные в данном разделе результаты микроспектрофлуориметрических исследований – это ориентиры для возможного развития спектральной ЛСКМ.

Микроспектрофлуориметрия ксенобиотиков

Многие ксенобиотики и/или продукты их клеточного метаболизма флуоресцируют. В микроспектрофлуориметрических исследованиях показано, что химическая модификация структуры, образование ковалентных и нековалентных комплексов приводит к характеристичным изменениям в спектрах флуоресценции ксенобиотиков [31], что делает их привлекательными объектами для дальнейшего изучения методом спектральной ЛСКМ.

Микроспектрофлуориметрический анализ позволяет выявить способность канцерогенов накапливаться в цитоплазме и ядре клеток [32], зарегистрировать образование метаболитов на фоне собственной клеточной флуоресценции и флуоресценции исходного соединения и идентифицировать их [33]. С применением микроспектрального подхода можно измерить кинетику накопления и метаболизма канцерогена в клетках [34], сравнить интенсивность его метаболизма в разных клеточных линиях [33], выявить различия в скорости детоксикации клеток, обработанных разными канцерогенами [35].

Исследования многих канцерогенных полициклических ароматических углеводородов требуют УФ возбуждения и измерения спектров флуоресценции в диапазоне 370–450 нм. При УФ возбуждении в клетках наблюдается интенсивная собственная флуоресценция в области 450 нм, зависящая от концентрации NADH и NADPH,

что делает невозможным использование традиционной ЛСКМ для идентификации и анализа слабых сигналов метаболитов полициклических ароматических углеводородов и требует применения спектрального анализа.

Ароматические амины и ароматические полициклические углеводороды – это канцерогены непрямого действия. В клетке они подвергаются химической модификации, переводящей молекулу в более реакционно-способную форму, которая затем вступает в реакции с макромолекулами. Поэтому возможность распознавания флуоресценции метаболитов является особенно важной для исследования таких канцерогенов.

С использованием микроспектрофлуориметрии продемонстрирована перспективность применения микроспектрального анализа к изучению ксенобиотиков, используемых (разрабатываемых) в медицинских целях и обладающих антипсориазной [36, 37], фотодинамической [19, 20, 38, 39], противоопухолевой (цитостатической) [30, 40–45] активностью. Существенно облегчается исследование внутриклеточной локализации противоопухолевых соединений, чьи спектры (например, топотекан и гиматекан) значительно перекрываются с клеточной флуоресценцией NADH и NADPH [40]. В отдельных случаях, как, например, при изучении эллиптицина, по спектрам удается характеризовать состояние соединения (протонированное/депротонированное) в различных отделах клетки и в составе комплексов с ДНК [41].

Микроспектральный подход позволяет изучать первичные эффекты фотоиндуцированного воздействия фотосенсибилизаторов на клеточные структуры [20, 38], обнаружить образование липофусцин-подобных пигментов в результате фотоиндуцированного перекисного окисления липидов [38], зарегистрировать формирование внутриклеточных агрегатов фотосенсибилизаторов [19, 39], а в случае многокомпонентных фотосенсибилизаторов – выяснить относительную способность компонентов проникать в клетки [19].

На основе микроспектрофлуориметрии предложены методики оценки концентрации доксорубицина [30] и даунорубицина [45] в ядрах живых клеток. Отличия формы спектров позволяют распознать свободное соединение и его комплексы с ДНК в ядрах клеток и рассчитать концентрацию с учетом многократного уменьшения квантового выхода флуоресценции соединения при связывании с ДНК. Концентрации DOX, измеренные в ядрах методом микроспектрофлуориметрии, хорошо согласуются с данными измерений радиоактивно-меченого DOX [30].

*Микроспектрофлуориметрия в исследованиях собственной
флуоресценции клеток*

Во всех клетках имеются собственные флуорофоры, обладающие характерными спектрами флуоресценции. Эндогенная флуоресценция, как правило, представляет собой помеху при исследовании экзогенных флуоресцентных биологически активных соединений и флуоресцентно-меченных молекул, но она несет в себе и полезную информацию о метаболизме клетки, о функциональном состоянии отдельных клеточных органелл и ферментных систем.

Спектральные характеристики NADH, NADPH ($\lambda_{\text{ми}} = 465\text{--}480$ нм) и флавопротеинов ($\lambda_{\text{ми}} = 510\text{--}570$ нм) детально исследованы для использования их в микроспектральном анализе, как индикаторов активности энергетического аппарата клетки [14, 46]. Продемонстрирована возможность изучать механизмы регуляции окисления-восстановления митохондриальных и немитохондриальных никотинадениндинуклеотидов под действием различных метаболитов и модификаторов [47]. В живых клетках удается исследовать регуляцию и локализацию в органоидах биоэнергетических путей, а также сравнивать уровни метаболического отклика в различных клетках. По изменениям спектров собственной клеточной флуоресценции можно изучать способность различных соединений вызывать генерацию свободных радикалов и окислительный стресс [48], анализировать химические/структурные изменения, происходящих в клетках при старении и окислительном стрессе [14, 49, 50].

В клетках и тканях животных в области 450–580 нм можно обнаружить флуоресценцию различных витаминов, в том числе каротиноидов, пиридоксалаей, фолиевой кислоты и ее производных [14].

Порфирины являются источником флуоресценции клеток в красной области спектра, но ее интенсивность в норме не очень велика, так как большая часть порфиринов хелатирована с атомом железа, тушащим эту флуоресценцию. Некоторые нарушения в обмене гемсодержащих соединений приводят к усилению характеристичной флуоресценции порфиринов, что может быть использовано для диагностических целей [51].

В клетках растений и водорослей широко распространены хлорофиллы и фикобилины, которые флуоресцируют в области 570–700 нм, и набор этих флуорофоров в клетках разных видов отличается. Спектры собственной клеточной флуоресценции растений и водорослей чувствительны к изменению условий окружающей среды, что позволяет использовать микроспектральный подход для биомониторинга [52, 53].

Микроспектрофлуориметрия при измерениях внутриклеточных концентраций ионов и pH

Микроспектрофлуориметрия позволила оптимизировать методики и улучшить точность измерения клеточных концентраций ионов Ca^{2+} с использованием красителя Indo-1 [54, 55] и ионов Mg^{2+} с применением красителя Mag-indo-1 [56, 57].

Измеряя внутриклеточные спектры зондов на Ca^{2+} (fura-2) и pH (BCECF), можно дополнительно использовать интенсивность флуоресценции в изобестической точке (450 нм для fura-2 и 358 нм для BCECF), которая не чувствительна к концентрации ионов, для контроля за изменением объема клетки под действием различных стимулов [58].

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОСНОВЕ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОСПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИИ И ТРАДИЦИОННОЙ ЛСКМ

Логика данного типа исследований заключается в следующем. С помощью микроспектрофлуориметрии измеряют спектры отдельных областей образца, чтобы на основе спектрального анализа понять происхождение сигналов и их форму. Используя результаты микроспектрального анализа, выбирают подходящие фильтры, позволяющие регистрировать сигналы различного происхождения, и затем применяют традиционную ЛСКМ с этим набором фильтров.

Анализ интенсивности и формы спектров собственной флуоресценции (NADH и NADPH) клеток цервикального мальпигиевого эпителия в био-пробах пациентов выявил, что комбинация двух параметров, общей интенсивности цитоплазматической флуоресценции и отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 525 и 425 нм позволяют распознать нормальные, воспаленные клетки цервикального мальпигиевого эпителия, а также случаи сквамозного внутри-эпителиального повреждения различной тяжести [59]. Предложено использовать данный подход в качестве нового способа ранней диагностики рака шейки матки, который может быть реализован на основе микроспектрального подхода или традиционной ЛСКМ.

В исследованиях на моделях клеток меланомы, клеток хронических заболеваний и ген-дефективных клеток показано, что комбинация микроспектрофлуориметрии и измерения флуоресцентных изображений позволяет выявить спектральные и топографические особенности, характеризующие структурные и функциональные изменения, связанные с цитопатологией [60].

На основе микроспектрального анализа удалось подобрать комбинацию фильтров для максимально контрастного измерения

распределения трех типов собственной флуоресценции в биопсийных пробах из лимфо-узлов пациентов с лимфо-аденопатией различного происхождения [61]. Изображения, измеренные с этими фильтрами, позволяют без проведения гистохимического окрашивания различить злокачественные и нормальные тканевые структуры.

Микрофлуоресцентный анализ позволил понять происхождение флуоресцентных сигналов в листьях *Phillyrea latifolia* при различных длинах волн возбуждения, обнаружить отличия в экспрессии флавиноидов при изменении освещенности листа в процессе роста и подобрать оптимальную конфигурацию фильтров для измерения детальных флуоресцентных изображений с максимальным контрастом по флавиноидам [62]. По этим изображениям удалось выявить и охарактеризовать отличия в распределении флавиноидов в разных структурах листа в зависимости от освещенности в процессе роста. Периленхины были идентифицированы с помощью микроспектрофлуориметрии в лишайниках, растущих на коре деревьев, и их трехмерное распределение было охарактеризовано методом ЛСКМ [63].

Микроспектральный анализ позволяет более детально охарактеризовать в клетках и срезах тканей новые флуоресцентные метки и сенсоры, например, квантовые точки [64] и сенсоры для измерения активности каспаз [65], собственную флуоресценцию микроорганизмов [66], исследуемых археологических образцов тканей [67] и, следовательно, более корректно проводить исследования методом ЛСКМ.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОСНОВЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛСКМ

Спектральная ЛСКМ в исследованиях соединений с перекрывающимися спектрами флуоресценции

В основе данного типа исследований лежит измерение и анализ конфокальных спектральных массивов данных ХУλ, ХУλt и ХУZλ. При изучении биологических образцов, содержащих несколько флуоресцирующих соединений, наибольшую сложность для традиционной ЛСКМ представляет частичное перекрытие спектров исследуемых соединений. Если спектры поглощения и флуоресценции двух соединений лежат в близких спектральных диапазонах, то оба флуорофора будут возбуждаться одной и той же длиной волны лазера, а через фильтр, выбранный для регистрации флуоресценции одного из соединений, будет проходить и часть сигнала второго флуорофора. Это порождает сомнения в достоверности измеряемого распределения каждого из таких соединений, требует дополнительных контрольных экспериментов и накладывает ряд ограничений на выбор флуоресцентных меток и проб для совместного использования в исследованиях.

Таблица.
Применимость спектральной ЛСКМ^а для разделения сигналов пар флуоресцентных меток с максимумами флуоресценции в области 509–531 нм (по данным работы [68]).

	Dio ^о	eGFP	Alexa 488	ФИТЦ	Oregon green	Sytox green
eGFP ^б	нет	–	да	да	да	да
Alexa 488 ^б	нет данных	да	–	нет	да	да
ФИТЦ ^б	нет данных	да	нет	–	да	да
Oregon green ^б	нет данных	да	да	да	–	нет
Sytox green ^б	да	да	да	да	нет	–
ToPro-1 ^б	да	нет данных	да	да	да	да

^а Использовался микроскоп LSM510META (Zeiss, Германия).

^б Усиленный зеленый флуоресцирующий белок (enhanced green fluorescent protein).

^в Коммерческие названия широко используемых флуоресцентных меток фирмы Invitrogen.

^г Флуоресцеин изотиоцианат.

^о Dio – 3,3'-диоктадецилоксакарбокисианин

Представление измеряемых сигналов в виде линейной комбинации спектров анализируемых флуорофоров, которое реализуется в спектральной ЛСКМ, позволяет полностью разделить перекрывающиеся спектры и реконструировать спектральные изображения, описывающие истинное распределение исследуемых соединений в образце (рис. 6). Как результат, спектральный анализ увеличивает максимальное число корректно распознаваемых сигналов и снимает ряд ограничений на выбор флуорофоров. Измерения [68], проведенные для семи часто применяемых в клеточных исследованиях флуоресцентных меток с максимумами испускания в области 509–531 нм, позволили выявить пары меток, флуоресценция которых может быть надежно разделена с помощью спектральной ЛСКМ (табл.). На сайтах фирм-производителей спектральных конфокальных микроскопов можно найти изображения, демонстрирующие, что спектральная ЛСКМ позволяет разделить до 8 сигналов флуоресцирующих соединений с частично перекрывающимися спектрами. Для иммунофлуоресцентного окрашивания срезов тканей также удалось разработать протокол с одновременным использованием восьми флуорофоров [69]. Следует отметить, что интенсивность сигнала флуорофоров в таких экспериментах должна быть достаточно большой,

чтобы собственные шумы ФЭУ не искажали форму измеряемых спектров. В работе [70] показано, что с применением спектральной ЛСКМ можно успешно анализировать результаты флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в нейронах среза ткани мозга, контрастируя ядра клеток с помощью флуорофора DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) и выявляя параллельно распределение и уровень экспрессии 4 типов мРНК.

Анализ перекрывающихся спектров собственной клеточной флуоресценции NADH, NADPH и липоамидной дегидрогеназы, проведенный с помощью спектральной ЛСКМ, обеспечил возможность более детального исследования особенностей метаболических изменений при стимуляции островковых клеток поджелудочной железы пируватом [71]. Установлено, что пируват вызывает образование в клетках NADPH, но не меняет уровень NADH. Выдвинуто предположение, что неспособность экзогенного пирувата активировать образование NADH в митохондриях является причиной отсутствия синтеза АТФ, необходимого для стимулированной секреции инсулина.

Изучение локализации и функции в клетке многообразия белков, кодируемых геномом, во многих случаях осуществляется на основе экспрессии в клетках исследуемого белка X, слитого генно-инженерным способом в одну молекулу с флуоресцирующим белком. Для расщепления клеточных процессов, в которых участвует белок X, необходимо параллельно экспрессировать один или несколько других белков, локализация и функция которых уже известны, или же белков, предположительно образующих комплексы с белком X. Для распознавания эти белки-партнеры также должны быть слиты с флуоресцирующими белками. На сегодняшний день наиболее подходящие для этих целей флуоресцирующие белки, циановый, желтый и зеленый (CFP, YFP и GFP), имеют сильно перекрывающиеся спектры флуоресценции. Разделение их сигналов с помощью оптических фильтров в принципе возможно, но при этом значительная часть сигнала теряется, что ухудшает предел детекции, требует большей концентрации молекул, большей мощности возбуждающего света, усиливает проблему фотовыгорания (фотоокисления) исследуемых и собственных клеточных хромофоров. Спектральная ЛСКМ полностью решает проблему перекрывающихся спектров флуоресцирующих белков и позволяет с высокой чувствительностью и достоверностью проводить исследование пространственного распределения нескольких белков слияния [72–74] или белков слияния и флуоресцентно меченных молекул [75] в клетках. В работе [76] четыре разными флуоресцирующими белками удалось пометить мигрирующие птичьи клетки нервного гребня, когда они

уходят от нервной трубки зародыша, а применение спектральной ЛСКМ обеспечило возможность различать отдельные клетки и проследить траектории их движения, встречи и расхождения.

Экспрессируя в клетках CFP- или YFP-меченые белки, способные избирательно связываться с фосфатидилинозитол-4,5-дифосфатом и фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом, и используя в качестве маркеров внутриклеточной локализации GFP-меченые белки, авторы работы [77] применили спектральную ЛСКМ для разделения сигналов CFP/GFP и GFP/YFP, наглядно продемонстрировав, что повышенная генерация H_2O_2 в митохондриях активирует интенсивное образование фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата на плазматической мембране клеток.

Для изучения молекулярных взаимодействий белков в клетках широко используются методики ЛСКМ на основе эффекта индуктивно-резонансного (Ферстеровского) переноса энергии (fluorescence resonance energy transfer, FRET), в основе которых лежит увеличение интенсивности спектра флуорофора-акцептора с одновременным уменьшением интенсивности спектра флуорофора-донора за счет безызлучательного переноса энергии с возбужденного состояния донора на близко (< 5 нм) расположенный акцептор [78]. Спектральная ЛСКМ значительно облегчает применение методик FRET в комбинации с флуоресцирующими белками слияния [69, 72, 75, 79–81].

Так, измерение уменьшения FRET между $G_{\alpha 2}$ и $G_{\beta \gamma}$ субъединицами G-белка слитыми с флуоресцирующими белками CFP и YFP позволило охарактеризовать динамические характеристики диссоциации G-белка в живых клетках, вызываемой взаимодействием G-белок сопряженных рецепторов хемоаттрактантов с cAMP [81]. Две субъединицы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов $\alpha 4$ и $\beta 2$ слитые с YFP и CFP послужили основой для разработки клеточных систем, на основе которых с применением спектральной ЛСКМ показана возможность измерять уровень $\alpha 4\beta 2$ -рецепторов и изучать процессы их сборки-диссоциации под воздействием различных стимулов [80].

В работе [82], где авторам удалось обнаружить осцилляции цитоплазматического pH в глиальных клетках, с удовлетворением отмечено высокое временное, пространственное и спектральное разрешение, с которым спектральная ЛСКМ позволяет изучать гетерогенность и временные флуктуации pH в различных отделах цитоплазмы клеток.

Спектральная ЛСКМ имеет особо важное значение для исследований в области клеточной биологии растений, так как позволяет спек-

тально различать флуоресцирующие пигменты, которых особенно много в растениях, и кроме того дает возможность более надежно регистрировать сигналы флуоресцирующих белков слияния и флуоресцентно-меченных молекул на фоне перекрывающихся с ними спектров собственной флуоресценции пигментов [26]. Корректно учесть вклад собственной флуоресценции клетки, какой бы сложной ни была форма спектра, важно не только при исследовании клеток растительного, но и животного происхождения [83]. Эта задача весьма актуальна при анализе малых внутриклеточных концентраций флуоресцирующих биологически активных соединений (БАС) и слабо флуоресцирующих молекул, а также при изучении взаимодействий лиганд-рецептор и антиген-антитело, когда количество рецепторов и антигенов на мембране клеток мало (рис. 7).

Проблема учета эндогенной флуоресценции стоит особенно остро при исследовании локализации БАС в срезах тканей животных и человека. Собственная флуоресценция клеток ткани может давать значительный вклад в измеряемый сигнал даже при возбуждении в красной области спектра. Вклад эндогенной флуоресценции и количество отличающихся по происхождению и форме сигналов резко возрастает по мере сдвига длины волны возбуждения в область короче 630 нм. Распределение эндогенной флуоресценции неоднородно и зависит от типа клеток и тканевых структур. Количество БАС, которое вводится в организм человека или животного, жестко ограничено нетоксичными дозами, и концентрация БАС в исследуемых тканях, как правило, не велика. Спектральная ЛСКМ позволяет достоверно разделить эндогенные сигналы и флуоресценцию БАС, интенсивность которой мала (рис. 8), и провести анализ распределения исследуемого БАС в различных тканевых структурах [84, 85]. Учет вклада эндогенной флуоресценции позволяет значительно улучшить достоверность исследования срезов ткани при проведении иммунофлуоресцентного анализа с использованием нескольких флуоресцентно-меченных антител [69].

*Исследование молекулярных взаимодействий БАС в клетках
и количественный анализ на основе спектральной ЛСКМ*

Молекулярные взаимодействия, в которых участвует БАС, могут вызывать заметные изменения его спектров флуоресценции. Как рассмотрено выше, измерение внутриклеточных спектров БАС методом микроспектрофлуориметрии открывает путь к идентификации и изучению молекулярных взаимодействий и микроокружения БАС в живых клетках. Регистрация внутриклеточных моле-

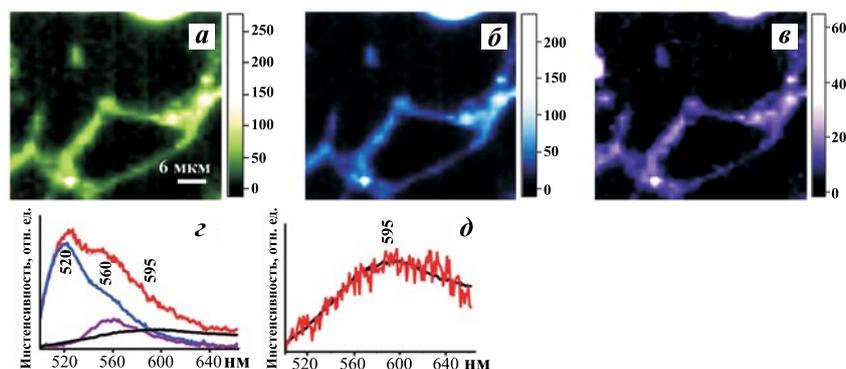


Рис. 7. Выявление распределения лектинов на мембране клеток с помощью флуоресцентно-меченных углеводных зондов. Сравнение результатов измерений на основе традиционной и спектральной ЛСКМ.

(а) Распределение флуоресцентного сигнала в клетках OAT75, проинкубированных с зондом $\text{GlcNAc}_2\text{-PAA-Flu}$. Результат измерения методом ЛСКМ с использованием широкополосного анализирующего фильтра с пропусканием 500–575 нм.

(б, в) Реальные вклады флуоресценции зонда (б) и собственной клеточной флуоресценции (в) в интегральный сигнал (в диапазоне 500–575 нм) по данным спектральной ЛСКМ.

Шкалы интенсивности позволяют сравнить интенсивности интегральной флуоресценции (а), флуоресценции зонда (б) и собственной клеточной флуоресценции (в) в диапазоне 500–575 нм.

(г, д) Примеры клеточных спектров (красная линия) и результаты представления их в виде суперпозиции модельных спектров $\text{GlcNAc}_2\text{-PAA-Flu}$ (синяя линия), собственной клеточной флуоресценции с максимумами 560 нм (пурпурная линия) и 595 нм (черная линия). Интенсивность модельных спектров соответствует их вкладу в экспериментальный спектр. Расчетный спектр показан голубой линией.

$\text{GlcNAc}_2\text{-PAA-Flu}$ – флуоресцеин-меченный полиакриламидный полимер конъюгированный с углеводом $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$. $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм.

кулярных взаимодействий БАС, относящихся к лекарственным препаратам, – это ключ к пониманию механизмов их функциональной активности. Очевидно, что спектральная ЛСКМ обеспечивает более полный анализ таких взаимодействий, чем дискретные микро-спектрофлуориметрические измерения в выбранных участках образца. Следует отметить, что анализ молекулярных взаимодействий часто требует сравнительно высокого спектрального разрешения (1–2 нм), а многие спектральные лазерные сканирующие конфокальные

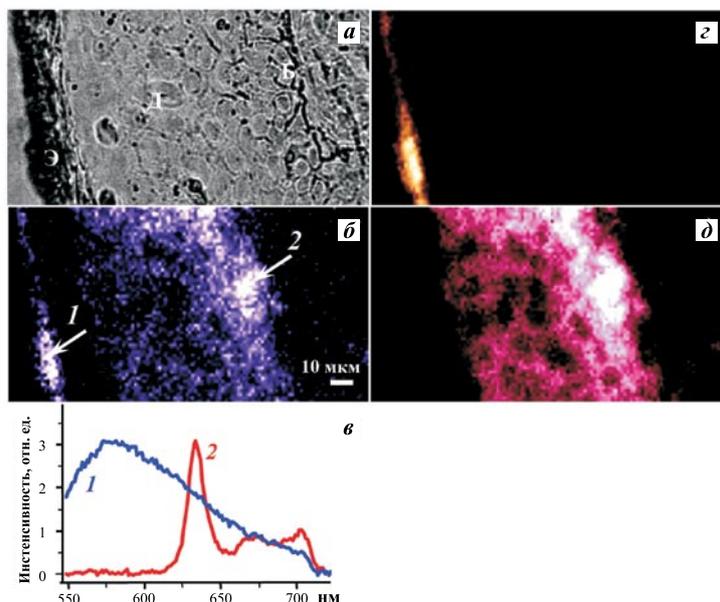


Рис. 8. Распределение АЛК-индуцированного протопорфирина IX в ткани базалиомы человека после местного нанесения АЛК в виде мази.

(а) Изображение неокрашенного среза (толщина 10 мкм) кожи пациента в проходящем белом свете. Э – эпидермис; Д – дерма; Б – базалиома; (б) распределение флуоресцентного сигнала, измеренное традиционной ЛСКМ ($\lambda_{\text{возб}} = 514,5$ нм) с использованием анализирующего фильтра с пропусканием 610–660 нм; (в) вид спектров флуоресценции в точках среза 1 и 2 (точки отмечены стрелками на изображении б).

(г–д) Результаты исследования среза методом спектральной ЛСКМ: (г) распределение эндогенной флуоресценции с максимумом 580 нм; (д) распределение протопорфирина IX. Срез ткани подготовлен для исследований специалистами МНИОИ им. П.А. Герцена.

микроскопы обеспечивают разрешение лишь 5–10 нм. Необходимость измерения спектров с высоким разрешением неизбежно приводит к значительному увеличению времени, затрачиваемому на регистрацию детальных спектральных изображений. Однако совершенствование программного обеспечения и конструктивных особенностей спектральных микроскопов со временем позволит в значительной степени решить эту проблему.

Изучение внутриклеточных взаимодействий и микроокружения БАС с применением спектральной ЛСКМ основано на измерении полных спектров флуоресценции в каждой точке живой клетки с трех-

мерным субмикронным разрешением. Условия эксперимента (мощность лазера и время накопления спектров) выбираются таким образом, чтобы в процессе измерения не происходило фотоиндуцированного изменения распределения БАС, его фотообесцвечивания и (или) изменения спектров. Это контролируется сравнением результатов последовательных повторных измерений. При анализе измеренного массива спектров сначала выявляются отличия во внутриклеточных спектрах изучаемого БАС и, по возможности, локализация соединения с измененными спектрами. Затем в растворах проводится детальное исследование влияния на спектры различных молекулярных взаимодействий БАС, а также изменений параметров микроокружения (гидрофобность, полярность, рН среды). Измерения спектров от растворов выполняются с помощью спектрального лазерного сканирующего конфокального микроскопа при той же длине волны возбуждения, что и клеточные эксперименты. Молекулярные взаимодействия и влияние микроокружения могут вызывать сдвиг, изменение формы, усиление или тушение интенсивности спектров. Сдвиг и изменение формы учитываются автоматически при разложении экспериментальных спектров на базисные, а поправка на тушение/ усиление интенсивности вводится после реконструкции спектральных изображений, путем умножения шкалы интенсивности изображения на соответствующий коэффициент.

В результате такого анализа выявляются комплексы и микроокружение БАС, реализующиеся в клетках и распознаваемые по спектрам, а также определяется базисный набор спектров сравнения, наиболее точно описывающий внутриклеточные состояния и взаимодействия изучаемого соединения. При необходимости в базисный набор спектров сравнения включается также спектр(ы) собственной флуоресценции клетки. Если в клетках наблюдаются сигналы, которые не описываются модельными спектрами исходного БАС и не относятся к эндогенной клеточной флуоресценции, исследуется вопрос о возможном образовании флуоресцирующих продуктов метаболизма.

В конечном итоге двумерный массив клеточных спектров раскладывается на линейную комбинацию базисных спектров сравнения. Интенсивность базисных спектров характеризует в каждой точке клетки состояние (микроокружение) исследуемого соединения и присутствие его различных комплексов. Реконструированные карты распределения по клетке этих состояний и комплексов (спектральные изображения) описывают накопление, микроокружение и взаимодействия изучаемого соединения в различных клеточных доменах и структурах.

Такая методика исследования создает основу для измерения концентрации БАС и их комплексов в живых клетках. С использованием одного из модельных растворов БАС должна быть измерена калибровочная зависимость интегральной интенсивности спектра от концентрации мономерной формы БАС в растворе. Это измерение должно проводиться на том же приборе, с той же $\lambda_{\text{возб}}$, при той же мощности лазера и с тем же разрешением $\Delta Z_{\text{сл}}$, что и измерения на клетках. Время накопления спектров может быть любым, но тогда интенсивность калибровочных спектров подлежит коррекции, с учетом времени накопления внутриклеточных спектров. Количественный анализ осуществляется для реконструированных спектральных изображений путем умножения интенсивности каждого спектрального изображения на свой коэффициент, обеспечивающий пересчет интенсивности сигнала в концентрацию. Этот коэффициент определяется на основе калибровочной зависимости с учетом поправки на относительный коэффициент усиления/тушения флуоресценции для соответствующего спектра сравнения.

Подобрав в модельных экспериментах условия, в которых происходят изменения формы спектров БАС, точно и адекватно отражающие изменения формы спектров БАС в клетках, полагают, что и интенсивности сигналов эквивалентных количеств БАС в клетке и в модельных условиях будут одинаковыми. Тогда, сравнивая интенсивности одинаковых по форме спектров от равных микрообъемов клетки и модельного раствора с известной концентрацией БАС, можно оценить концентрацию БАС (его комплексов) в микрообъеме клетки.

Важно отметить, что количественный анализ возможен только при проведении измерений с трехмерным пространственным разрешением (т.е. с использованием конфокальной схемы фильтрации сигнала). При этом толщина оптического сечения $\Delta Z_{\text{сл}}$ должна быть меньше, чем толщина исследуемых клеток, а оптический слой $\Delta Z_{\text{сл}}$, от которого измеряется сигнал, должен находиться внутри объема клетки.

Если необходимо использовать фиксированные клетки, то предварительно должны быть выполнены сравнительные контрольные эксперименты на живых и фиксированных клетках. Первая цель этих экспериментов – определить на живых клетках набор спектров сравнения и проверить сохранение точности и адекватности анализа с использованием этого набора на фиксированных клетках. Вторая цель – сравнить результаты количественного анализа на живых и фиксированных клетках, показав их совпадение.

В результате количественного анализа в каждом микрообъеме сканируемого оптического сечения клетки измеряется концентрация мономерной флуоресцирующей формы БАС. Агрегаты БАС во многих случаях теряют способность флуоресцировать, и их концентрация в живых клетках методом спектральной ЛСКМ не определяется. Если БАС образует в клетках эксимеры или флуоресцирующие агрегаты, то для их количественного анализа (если он вообще возможен) требуется проведение детальных исследований в растворах с целью установления взаимосвязи между интенсивностью флуоресценции и концентрацией БАС в таких состояниях. В настоящее время нет разработанных методик для оценки концентрации эксимеров или флуоресцирующих агрегатов БАС в клетках. Частично или полностью избежать проблемы агрегатов можно, проводя исследования при низких концентрациях БАС в клетках и во внешней среде. При таких условиях в общем случае обеспечивается доминирование мономерной формы БАС.

Чтобы обеспечить статистически достоверный анализ, для каждого режима инкубации клеток с исследуемым веществом выполняются измерения на ограниченной выборке клеток (10–20 клеток). Большинство режимов инкубации воспроизводится несколько раз, и средняя концентрация в итоге определяется по 30–60 измеренным клеткам.

С помощью подходящей программы (например, Image J, National Institute of Health, США) можно обвести границу клетки, ядра и/или каких-то локализованных клеточных структур и определить в пределах обведенных зон средние концентрации БАС и его комплексов. Таким образом удается определить средние концентрации соединения и его комплексов в цитоплазматической области, в ядре, в нуклеолах, а также в среднем по клетке.

В работе [86] по результатам исследования молекулярных взаимодействий в растворах и детального анализа внутриклеточных спектров противоопухолевого соединения митоксантрона (МИТО) определен базисный набор спектров сравнения (рис. 9), который позволяет идентифицировать и изучать в живых клетках следующие состояния и комплексы МИТО: (а) свободный или связанный через аминоалкиламинные боковые цепи с молекулами клетки мономерный МИТО, находящийся в полярном внутриклеточном окружении ($\text{МИТО}_{\text{моно}}$); (б) МИТО связанный с гидрофобными клеточными структурами ($\text{МИТО}_{\text{фоб}}$); (в) три типа комплексов с нуклеиновыми кислотами, которые дают идентичные спектры флуоресценции-МИТО-ДНК, тройные комплексы МИТО-ДНК-ДНК топоизо-

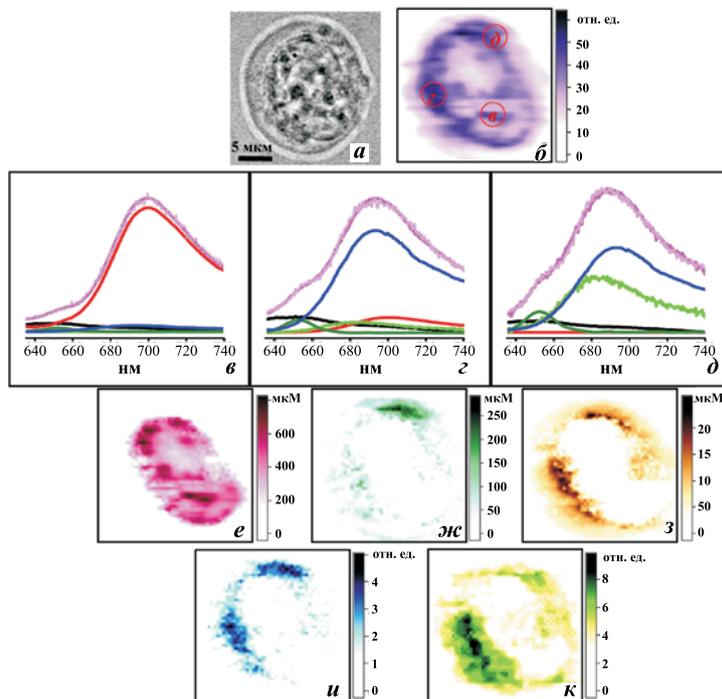


Рис. 9. Анализ внутриклеточных спектров МИТО с использованием спектральной ЛСКМ и реконструкция спектральных изображений клеточного распределения МИТО.

(а) Изображение клетки в проходящем белом свете.

(б) Внутриклеточное распределение интегральной флуоресценции МИТО, измеренное традиционной ЛСКМ.

(в–д) Примеры представления спектров МИТО (светло розовый), измеренных в ядре (в) и в разных областях цитоплазмы (з, д) живой клетки K562, в виде линейной комбинации базисных спектров сравнения МИТО_{нк} (красный), МИТО_{фоб} (синий), МИТО_{моно} (ярко зеленый), НХМ (темно зеленый) и спектра собственной клеточной флуоресценции (черный). Перекрывающиеся спектры показывают степень совпадения экспериментальных (светло розовый) и расчетных (темно розовый) спектров. Интенсивности спектров сравнения соответствуют их вкладу в расчетные спектры. На рисунке (б) красными буквами в кружках отмечены области, где были измерены соответствующие спектры.

(е–к) Спектральные изображения, описывающие внутриклеточное распределение МИТО_{нк} (е), МИТО_{моно} (ж), МИТО_{фоб} (з), НХМ (и) и собственной клеточной флуоресценции (к). Шкалы «интенсивности» на рисунках (е–з) представлены в единицах концентрации. Клетки инкубировали с 10 мкМ МИТО в течение 1 ч.

Следует обратить внимание, что обычное ЛСКМ-изображение (б) дает искаженное представление о распределении МИТО, т.к. не учитывает усиление флуоресценции МИТО в гидрофобном окружении и тушение сигнала МИТО при интеркаляции в ДНК.

мераза II и комплексы двуцепочечная РНК- МИТО (МИТО_{НК}); (г) нафтохиноксалиновый метаболит (НХМ), образующийся в результате окислительного действия клеточных ферментов и связанный с акцепторными группами молекул клетки. В базисный набор был включен также и спектр собственной флуоресценции клетки. С использованием базисного набора спектров сравнения проведен количественный анализ внутриклеточного распределения и молекулярных взаимодействий МИТО в клетках эритролейкоза человека K562 [87], их изменений (особенностей) на разных стадиях клеточного цикла [88] и в клетках с МЛУ [89]. Изучен вопрос о взаимосвязях между чувствительностью раковых клеток к химиотерапии, внутриклеточным распределением и метаболизмом МИТО [90].

Модельные эксперименты выявили, что в гидрофобном окружении происходит двукратное усиление флуоресценции, а при образовании комплексов с нуклеиновыми кислотами – почти двукратное тушение флуоресценции МИТО [86]. В связи с этим распределение внутриклеточной флуоресценции, измеренное с помощью традиционной ЛСКМ, не отражает истинную картину внутриклеточного распределения МИТО. Спектры флуоресценции МИТО и его комплексов перекрываются настолько значительно, что разделить эти сигналы не удастся даже с помощью узкополосных анализирующих фильтров. Таким образом, только анализ полных спектров флуоресценции позволяет корректно описать состояние МИТО в каждой точке клетки, учесть влияние различных факторов на интенсивность спектров испускания, и установить реальное распределение МИТО, а также его комплексов в клетках (рис. 9).

Аналогичная ситуация характерна и для других противоопухолевых агентов антрациклинового ряда, что делает спектральную ЛСКМ незаменимым методом анализа противоопухолевых флуоресцирующих соединений в живых клетках. Методом спектральной ЛСКМ показано, что спектры флуоресценции пирарубицина в цитоплазме клеток K562, СЕМ и LR73 сходны со спектром этого соединения в водном окружении и отличаются от спектров пирарубицина в аналогичных клетках с МЛУ [91]. Трансфекция клеток LR73 геном *mdr1*, то есть перевод клеток в состояние с МЛУ, приводила к характерным для МЛУ-клеток изменениям спектров пирарубицина. Снижение МЛУ с помощью хинина, верапамила или соединения S9788 приводило к исчезновению особенностей спектров пирарубицина в МЛУ-клетках, усилению прониновения пирарубицина в ядро и, соответственно, вызывало усиление ингибирования роста клеток пирарубицином. Данные спектральной ЛСКМ позволили предположить, что более высо-

кий градиент рН или липидные структуры могут быть вовлечены в механизмы МЛУ посредством захвата и изоляции антрациклинов.

Анализ концентрации антрациклинов в ядрах клеток методом спектральной ЛСКМ во многих случаях позволяет разрешить противоречие между изменениями в клеточном накоплении и цитотоксичностью этих соединений при развитии у клеток МЛУ: цитотоксичность в первую очередь коррелирует с концентрацией антрациклинов в ядре, а не в целом по клетке, вне зависимости от фенотипа МЛУ и структуры антрациклинов [92].

Количественные методики спектральной ЛСКМ успешно применяются для исследования концентрационных и временных зависимостей клеточного накопления, распределения и выведения флуоресцентно-меченных БАС [93, 94] и различных фотосенсибилизаторов [95–98]. При этом в исследованиях производных фталоцианина, хлорина и бактериохлорина [84, 85, 95–98] сформировался обобщенный подход к изучению взаимосвязей между структурой фотосенсибилизаторов их ключевыми свойствами, определяющими фотодинамический эффект в растворах, клетках и живых организмах. Данный подход на основе методов оптической спектроскопии и спектральной ЛСКМ включает в себя: изучение склонности к агрегации в водных растворах и влияния агрегации на проникновение фотосенсибилизаторов в клетки; исследование способности фотосенсибилизаторов образовывать комплексы с биологическими молекулами в водных растворах и влияния комплексообразования на процессы агрегации/диссоциации; изучение способности фотосенсибилизаторов к фотоиндуцированному образованию активных форм кислорода в различных состояниях; изучение образования внутриклеточных молекулярных комплексов и метаболитов; оценка внутриклеточной концентрации активной формы фотосенсибилизаторов и выявление факторов, влияющих на этот параметр; изучение внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов и избирательности их накопления в определенных клеточных структурах/органоидах; исследование кинетических характеристик клеточного накопления и удержания фотосенсибилизаторов; исследование распределения фотосенсибилизаторов в опухоли и окружающих тканях в сравнении с нормальными тканями; изучение особенностей тканевого распределения в зависимости от времени после введения фотосенсибилизаторов в организм.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектральная ЛСКМ применима для решения широкого круга задач биофизики, молекулярной и клеточной биологии, включая изучение механизмов клеточного транспорта, внутриклеточной локализации и механизмов действия биологических молекул, а также для исследований, проводимых на срезах тканей. Метод позволяет идентифицировать и разделять в исследуемых образцах перекрывающиеся сигналы нескольких флуоресцирующих соединений и/или белков слияния, а также учитывать вклад эндогенной флуоресценции, что существенно повышает чувствительность, надежность и точность анализа по сравнению с традиционной ЛСКМ.

Анализ полных спектров флуоресценции дает возможность изучать молекулярные взаимодействия флуоресцирующих БАС в живых клетках с трехмерным субмикронным пространственным разрешением. Спектральная ЛСКМ позволяет измерять концентрации БАС и их комплексов в живых клетках, оценивать средние концентрации БАС в органоидах, клеточных доменах, в среднем по клетке, а также проводить статистически достоверный анализ клеточных концентраций БАС на ограниченной выборке клеток.

Спектральная ЛСКМ является уникальным дополнением к традиционным методам флуоресцентной микроскопии, и для ее дальнейшего развития имеется мощное приборное обеспечение, разработанное крупнейшими производителями биологических лазерных сканирующих конфокальных микроскопов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Piston, D.W.* (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**, 66–69. Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 239–279.
2. *Elangovan, M., Day, R.N., Periasamy, A.* (2002) *J. Microsc.*, **205**(1), 3–14.
3. *Egner, A., Hell, S.W.* (2005) *Trends Cell Biol.*, **15** (4), 207–215.
4. *Wilhelm, S., Grubler, B., Gluch, M., Heinz, H.* (2003) *Confocal laser scanning microscopy. Principles.* Jena: Carl Zeiss, 37 p.
5. *Murray, J.M.* (2005) *Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination methods. In Live Cell Imaging-A Laboratory Manual* (Goldman, R.D., Spector, D.L., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 239–279.
6. *Furuno, T., Nakanishi, M.* (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(9), 1551–1559.
7. *Paddock, S. (ed.)* (1999) *Methods Mol. Biol.* Totowa, NJ: Humana Press Inc., **122**, 446 p.
8. *Transidico, P., Bianchi, M., Carpa, M., Pelicci, P.G., Faretta, M.* (2004) *Microsc. Res. Tech.*, **64**, 89–95.
9. *Becker, B.E., Gard, D.L.* (2006) *Methods Mol. Biol.*, **322**, 69–86.
10. *Агроскин Л.С., Королев Н.В.* (1961) *Биофизика*, **6**(1), 478–485.

11. Максимовский Л.Ф. (1964) Цитология, **6(2)**, 255–256.
12. Каминир Л.Б., Хруст Ю.Р., Емельянова Л.А., Долгов А.И. (1966) Вестник АН СССР, **8**, 127–135.
13. Розанов Ю.М., Селиванов Г.В., Боровиков Ю.С. (1969) Цитология, **11(7)**, 910–915.
14. Карнаухов В.Н. (1978) Люминесцентный спектральный анализ клетки. М.:Наука, 173 с.
15. Olson, R.A. (1960) Rev. Scient. Instrum., **31**, 844–849.
16. Runge, A. (1966) Science, **156**, 1499–1451.
17. Pearse, A.G.E., Rost, F.W.D. (1969) J. Microsc., **89**, 312–328.
18. Kohen, E., Kohen, C., Thorell, B. (1976) Exper. Cell. Res., **101**, 47–54.
19. Blais, J., Amirand, C., Ballini, J.P., Debey, P., Foultier, M.T., Patrice, T. (1995) J. Photochem. Photobiol. B, **27**, 225–231.
20. Santus, R., Kohen, C., Kohen, E., Reyfmann, J.P., Morliere, P., Dubertret, L., Tocci, P.M. (1983) Photochem. Photobiol., **38**, 71–77.
21. Gadella, T.W. Jr., Vereb, G. Jr., Hadri, A.E., Rohrig, H., Schmidt, J., John, M., Schell, J., Bisseling, T. (1997) Biophys. J., **72**, 1986–1996.
22. Shah, K., Gadella, T.W. Jr., van Erp, H., Hecht, V., de Vries, S.C. (2001) J. Mol. Biol., **309**, 641–655.
23. Feofanov, A., Sharonov, S., Valisa, P., Da Silva, E., Nabiev, I., Manfait, M. (1995) Rev. Sci. Instrum., **66**, 3146–3158.
24. Sharonov, S., Nabiev, I., Chourpa, I., Feofanov, A., Valisa, P., Manfait, M. (1994) J. Raman Spectrosc., **25**, 699–707.
25. Sharonov, S., Chourpa, I., Morjani, H., Nabiev, I., Manfait, M., Feofanov, A. (1994) Anal. Chim. Acta., **290**, 40–47.
26. Berg, R.H. (2004) J. Microsc., **214**, 174–181.
27. Hiraoka, Y., Shimi, T., Haraguchi, T. (2002) Cell Struct. Funct., **27(5)**, 367–374.
28. Levenson, R.M., Mansfield, J.R. (2006) Cytometry A., **69(8)**, 748–758.
29. Rothmann, C., Bar-Am, I., Malik, Z. (1998) Histol. Histopathol., **13(3)**, 921–926.
30. Gigli, M., Doglia, S.M., Millot, J.M., Valentini, L., Manfait, M. (1988) Biochim. Biophys. Acta., **950**, 13–20.
31. Vigny, P., Amirand-Perchard, C. (1989) Cell structure and function by microspectrofluorometry. (Kohen, E., Hirschberg, J.G., eds.) New York: Academic Press, 229–268.
32. Kohen, E., Kohen, C., Hirschberg, J.G. (1983) Histochemistry, **79**, 31–52.
33. Lautier, D., Anthelme, B., Lahmy, S., Salmon, J.M., Viallet, P. (1986) C. R. Acad. Sci III., **302**, 297–302.
34. Sureau, F., Chinsky, L., Duquesne, M., Laigle, A., Turpin, P.Y., Amirand, C., Ballini, J.P., Vigny, P. (1990) Eur. Biophys. J., **18**, 301–307.
35. Lahmy, S., Salmon, J.M., Viallet, P. (1987) J. Histochem. Cytochem., **35**, 197–201.
36. Moreno, G., Salet, C., Kohen, C., Kohen, E. (1982) Biochim. Biophys. Acta., **721**, 109–111.
37. Kohen, E., Kohen, C., Morliere, P., Santus, R., Reyfmann, J.P., Dubertret, L., Hirschberg, J.G., Coulomb, B.A. (1986) Cell. Biochem. Funct., **4**, 157–168.
38. Reyfmann, J.P., Kohen, E., Morliere, P., Santus, R., Kohen, C., Mange, I., Dubertret, L., Hirschberg J.G. (1986) Photochem. Photobiol., **44**, 461–469.
39. Chernyaeva, E.B., Vardanyan, A.G., Koroteev, N.I., Kamalov, V.F., Lobanov, O.V., Mironov, A.F., Rumyanzeva, V.D. (1991) J. Photochem. Photobiol. B., **10**, 239–248.
40. Croce, A.C., Bottiroli, G., Supino, R., Favini, E., Zuco, V., Zunino, F.

- (2004) *Biochem Pharmacol.*, **67(6)**, 1035–1045.
41. *Sureau, F., Moreau, F., Millot, J.M., Manfait, M., Allard, B., Aubard, J., Schwaller, M.A.* (1993) *Biophys J.*, **65(5)**, 1767–1774.
 42. *Fiallo, M., Laigle, A., Borrel, M.N., Garnier-Suillerot, A.* (1993) *Biochem. Pharmacol.*, **45(3)**, 659–665.
 43. *Gigli, M., Rasoanaivo, T.W., Millot, J.M., Jeannesson, P., Rizzo, V., Jardillier, J.C., Arcamone, F., Manfait, M.* (1989) *Cancer Res.*, **49**, 560–564.
 44. *Millot, J.M., Rasoanaivo, T.D., Morjani, H., Manfait, M.* (1989) *Br. J. Cancer*, **60**, 678–684.
 45. *Benderra, Z., Trussardi, A., Morjani, H., Villa, A.M., Doglia, S.M., Manfait, M.* (2000) *Eur. J. Cancer*, **36**, 428–434.
 46. *Kohen, E., Thorell, B. Kohen, C., Salmon, J.M.* (1974) *Advances in biological and medical physics*. New York: Acad. Press, **15**, 271–297.
 47. *Kohen, E., Kohen, C., Hirschberg, J.G., Wouters, A.W., Thorell, B., Westerhoff, H.V., Charyulu, K.K.* (1983) *Cell. Biochem. Funct.*, **1**, 3–16.
 48. *Bondza-Kibangou, P., Millot, C., Dufer, J., Millot, J.M.* (2001) *Biol. Cell.*, **93**, 273–280.
 49. *Kohen, E., Kohen, C., Reyfmann, J.P., Morliere, P., Santus, R.* (1984) *Biochim. Biophys. Acta.*, **805**, 332–336.
 50. *Marzabadi, M.R., Sohal, R.S., Brunk, U.T.* (1990) *Anal. Cell. Pathol.*, **2(6)**, 333–346.
 51. *Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J.M.* (1997) *Photochem. Photobiol.* **65**, 235–251.
 52. *Hjorth, M., Mondolot, L., Buatois, B., Andary, C., Rapior, S., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Ravn, H.W.* (2006) *Pest. Manag. Sci.*, **62(6)**, 515–521.
 53. *Карнаухов В.Н.* (2001) Спектральный анализ в клеточном мониторинге состояния окружающей среды. М.: Наука, 186 с.
 54. *Millot, J.M., Pingret, L., Angiboust, J.F., Bonhomme, A., Pinon, J.M., Manfait, M.* (1995) *Cell Calcium*, **17**, 354–366.
 55. *Bancel, F., Salmon, J.M., Vigo, J., Viallet, P.* (1992) *Cell Calcium*, **13(1)**, 59–68.
 56. *Sebille, S., Millot, J.M., Maizieres, M., Arnaud, M., Delabroise, A.M., Jacquot, J., Manfait, M.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 743–749.
 57. *Morelle, B., Salmon, J.M., Vigo, J., Viallet, P.* (1994) *Anal. Biochem.*, **218(1)**, 170–176.
 58. *Eriksson, P.S., Nilsson, M., Wagberg, M., Ronnback, L., Hansson, E.* (1992) *Neurosci. Lett.*, **143(1–2)**, 195–199.
 59. *Millot, C., Bondza-Kibangou, P., Millot, J.M., Lallemand, A., Manfait, M.* (2003) *Histol. Histopathol.*, **18**, 479–485.
 60. *Kohen, E., Gatt, S., Schachtschabel, A., Schachtschabel, D.O., Kohen, C., Agmon, V., Hirschberg, J.G., Monti, M.* (2000) *Microsc. Res. Tech.*, **51(5)**, 469–480.
 61. *Rigacci, L., Alterini, R., Bernabei, P.A., Ferrini, P.R., Agati, G., Fusi, F., Monici, M.* (2000) *Photochem. Photobiol.*, **71(6)**, 737–742.
 62. *Agati, G., Galardi, C., Gravano, E., Romani, A., Tattini, M.* (2002) *Photochem. Photobiol.*, **76(3)**, 350–360.
 63. *Mathey, A., Lukins, P.B.* (2001) *Micron*, **32(2)**, 107–113.
 64. *Kahn, E., Vejux, A., Menetrier, F., Maiza, C., Hammann, A., Sequeira-Le, G.A., Frouin, F., Tourneur, Y., Brau, F., Riedinger, J.M., Steinmetz, E., Todd-Pokropek, A., Lizard, G.* (2006) *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **28(1)**, 14–26.
 65. *Kawai, H., Suzuki, T., Kobayashi, T., Sakurai, H., Ohata, H., Honda, K., Momose, K., Namekata, I., Tanaka,*

- H., Shigenobu, K., Nakamura, R., Hayakawa, T., Kawanishi, T. (2005) *J. Pharmacol. Sci.*, **97(3)**, 361–368.
66. Engel, R., Van Haastert, P.J., Visser, A.J. (2006) *Microsc. Res. Tech.*, **69(3)**, 168–174.
67. Maggiano, C., Dupras, T., Schultz, M., Biggerstaff, J. (2006) *Mol. Cell. Probes.*, **20(3–4)**, 154–162.
68. Dickinson, M.E. (2006) Basic methods in microscopy. Protocols and concepts from cells: a laboratory manual. (Spector, D.L., Goldman, R.D., eds.) Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 83–104.
69. Ecker, R.C., de Martin, R., Steiner, G.E., Schmid, J.A. (2004) *Cytometry A.*, **59(2)**, 172–181.
70. Chan, P., Yuen, T., Ruf, F., Gonzalez-Maeso, J., Sealfon, S.C. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33(18)**, e161.
71. Rocheleau, J.V., Head, W.S., Piston, D.W. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279(30)**, 31780–31787.
72. Zimmermann, T. (2005) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **95**, 245–265.
73. Zimmermann, T., Rietdorf, J., Pepperkok, R. (2003) *FEBS Lett.*, **546**, 87–92.
74. Dale, L.B., Seachrist, J.L., Babwah, A.V., Ferguson, S.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279(13)**, 13110–13118.
75. Haraguchi, T., Shimi, T., Koujin, T., Hashiguchi, N., Hiraoka, Y. (2002) *Genes Cells*, **7(9)**, 881–887.
76. Teddy, J.M., Lansford, R., Kulesa, P.M. (2005) *Biotechniques*, **39**, 703–710.
77. Connor, K.M., Subbaram, S., Regan, K.J., Nelson, K.K., Mazurkiewicz, J.E., Bartholomew, P.J., Aplin, A.E., Tai, Y.T., Aguirre-Ghiso, J., Flores, S.C., Melendez, J.A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280(17)**, 16916–16924.
78. Лакович, Дж. (1986) Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Москва, 306–313.
79. Faure, M., Barber, D.F., Takahashi, S.M., Jin, T., Long, E.O. (2003) *J. Immunol.*, **170(12)**, 6107–6114.
80. Nashmi, R., Dickinson, M.E., McKinney, S., Jareb, M., Labarca, C., Fraser, S.E., Lester, H.A. (2003) *J. Neurosci.*, **23(37)**, 11554–11567.
81. Xu, X., Meier-Schellersheim, M., Jiao, X., Nelson, L.E., Jin, T. (2005) *Mol. Biol. Cell.*, **16(2)**, 676–688.
82. Sanchez-Armass, S., Sennoune, S.R., Maiti, D., Ortega, F., Martinez-Zaguilan, R. (2006) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **290(2)**, C524–C538.
83. Galanina, O., Feofanov, A., Tuzikov, A.B., Rapoport, E., Crocker, P.R., Grichine, A., Egret-Charlier, M., Vigny, P., Le Pendu, J., Bovin, N.V. (2001) *Spectrochim. Acta*, **57**, 2285–2296.
84. Karmakova, T., Feofanov, A., Nazarova, A., Grichine, A., Yakubovskaya, R., Luk'yanets, E., Maurizot, J.-C., Vigny, P. (2004) *J. Photochem. Photobiol. B*, **75(1–2)**, 81–87.
85. Karmakova, T., Feofanov, A., Pankratov, A., Kazachkina, N., Nazarova, A., Yakubovskaya, R., Lebedeva, V., Mironov, A., Maurizot, J.-C., Vigny, P. (2006) *J. Photochem. Photobiol. B*, **82**, 28–36.
86. Feofanov, A., Charonov, S., Kudelina, I., Fleury, F., Nabiev, I. (1997) *Biophys. J.*, **73**, 3317–3327.
87. Feofanov, A., Charonov, S., Fleury, F., Kudelina, I., Nabiev, I. (1997) *Biophys. J.*, **73**, 3328–3336.
88. Feofanov, A., Charonov, S., Fleury, F., Kudelina, I., Nabiev, I. (1999) *Anticancer Res.*, **19**, 5341–5348.
89. Феофанов А.В., Гришин А.И., Куделина И.А., Шитова Л.А., Кармакова Т.А., Якубовская Р.И., Эгрет-Шарлье М., Вину П. (1999) *Биоорганическая химия*, **25(12)**, 892–902.
90. Vibet, S., Maheo, K., Gore, J., Dubois, P., Bougnoux, P., Chourpa, I. (2007) *Drug. Metab. Dispos.*, **35(5)**, 822–828.

91. *Belhoussine, R., Morjani, H., Millot, J.M., Sharonov, S., Manfait, M.* (1998) *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 1369–1376.
92. *Morjani, H., Millot, J.M., Belhoussine, R., Sebille, S., Manfait, M.* (1997) *Leukemia*, **11**, 1170–1179.
93. *Feofanov, A.V., Sharonov, G.V., Astapova, M.V., Rodionov, D.I., Utkin, Yu.N., Arseniev, A.S.* (2005) *Biochem. J.*, **390**, 11–18.
94. *Sharonov, G.V., Feofanov, A.V., Bocharova, O.V., Astapova, M.V., Dedukhova, V.I., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., Arseniev, A.S., Skulachev, V.P., Kirpichnikov, M.P.* (2005) *Apoptosis*, **10**, 797–808.
95. *Feofanov, A., Grichine, A., Karmakova, T., Kazachkina, N., Pecherskih, E., Yakubovskaya, R., Luk'yanets, E., Derkacheva, V., Egret-Charlier, M., Vigny, P.* (2002) *Photochem. Photobiol.*, **75(5)**, 527–533.
96. *Feofanov, A., Sharonov, G., Grichine, A., Karmakova, T., Pljutinskaya, A., Lebedeva, V., Ruziyev, R., Yakubovskaya, R., Mironov, A., Refregier, M., Maurizot, J.-C., Vigny, P.* (2004) *Photochem. Photobiol.*, **79(2)**, 172–188.
97. *Феофанов А.В., Назарова А.И., Кармакова Т.А., Плютинская А.Д., Гришин А.И., Якубовская Р.И., Лебедева В.С., Рузиев Р.Д., Миронов А.Ф., Моризо Ж.-К., Вини П.* (2004) *Биоорганическая химия*, **30(4)**, 417–428.
98. *Sharonov, G.V., Karmakova, T.A., Kassies, R., Pljutinskaya, A.D., Grin, M.A., Refregiers, M., Yakubovskaya, R.I., Mironov, A.F., Maurizot, J.-C., Vigny, P., Otto, C., Feofanov, A.V.* (2006) *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 407–419.