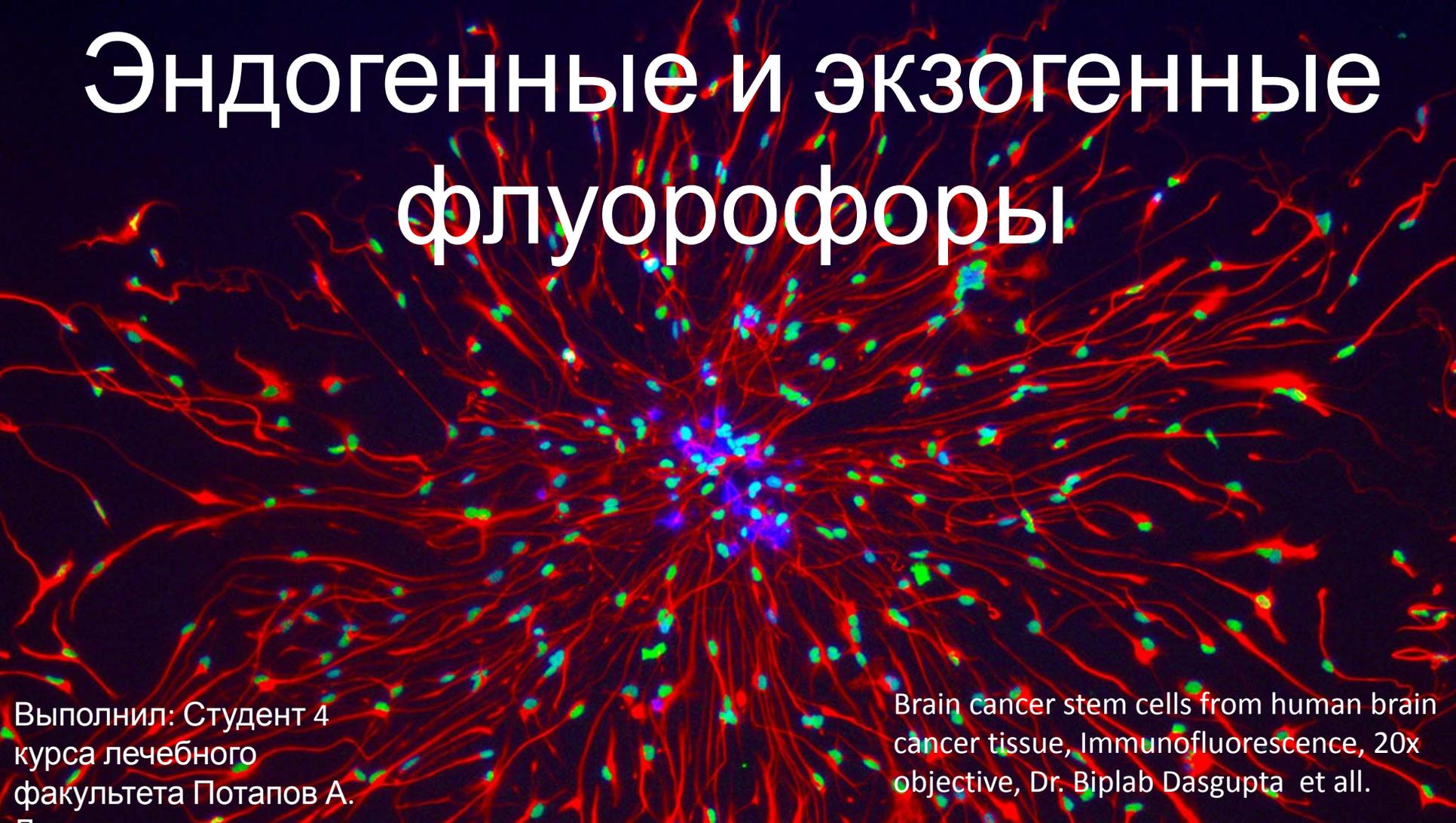


Эндогенные и экзогенные флуорофоры

The image displays a dense network of cells, likely brain cancer stem cells, stained with three different fluorescent dyes. The cytoplasm of the cells is stained red, forming a complex, interconnected web. The nuclei are stained with two different colors: green and blue. The blue-stained nuclei are concentrated in a central cluster, while the green-stained nuclei are more widely distributed throughout the network. The background is dark, making the fluorescent signals stand out prominently.

Выполнил: Студент 4
курса лечебного
факультета Потапов А.

Brain cancer stem cells from human brain
cancer tissue, Immunofluorescence, 20x
objective, Dr. Biplab Dasgupta et al.

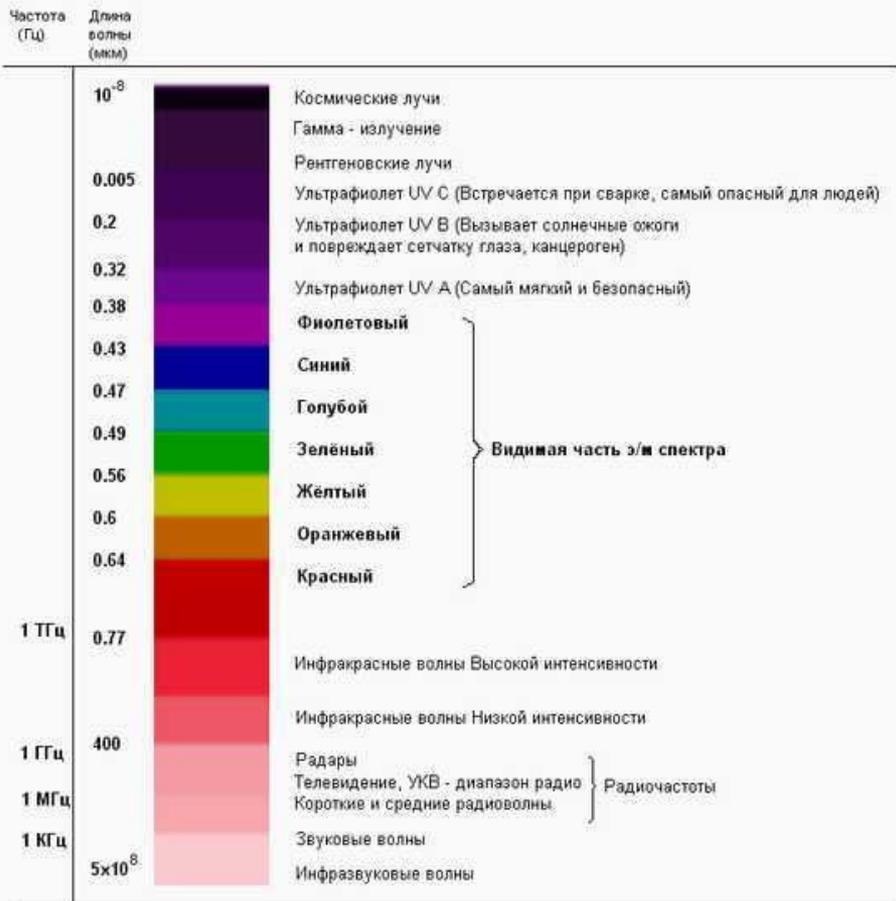
Введение:

Люминесценция – нетепловое свечение вещества, возникающее после поглощения им энергии возбуждения.

Фотолюминесценция – люминесценция возникающая при освещении молекул.



Шкала электромагнитного излучения



Длина волны: 1 мкм (1т) = 1/1000 мм

Частота: 1 Гц = число колебаний волны за секунду

Ультрафиолет:

Вакуумный 10нм – 200нм

УФ А 400нм – 315нм

УФ В 315нм – 280нм

УФ С 280нм – 100нм

Видимый свет: 400нм – 700нм

Инфракрасное излучение:

IR А – 700нм - 1400нм

IR В – 1400нм - 3000нм

IR С – 3000нм – 1мм

Характеристика люминесценции:

- Спектр поглощения
- Спектр излучения
- Выход люминесценции
- Кинетика процесса люминесценции

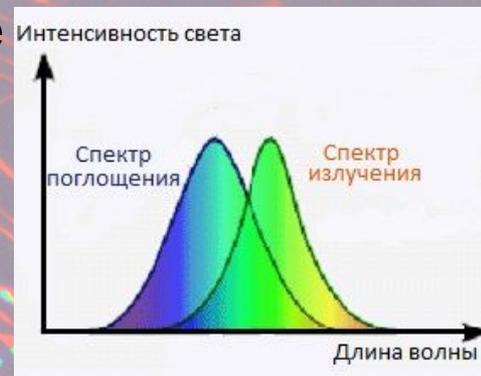
} Спектральный анализ

→ Время жизни флуоресценции (FLIM)

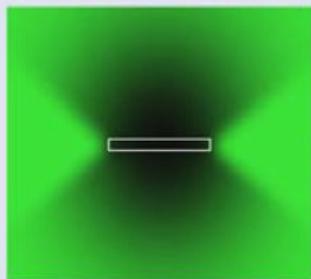
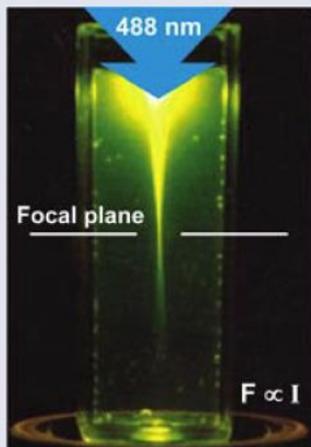
Правило Каша: Длина волны, спектр флуоресценции являются качественным оптическим паспортом вещества

Закон Вавилова: Квантовый выход (эффективность) флуоресценции для данного вещества, есть величина постоянная и является её количественным паспортом.

Закон Стокса: Длина волны излучения, как правило, больше поглощения.



A Single photon excitation



B Two photon excitation

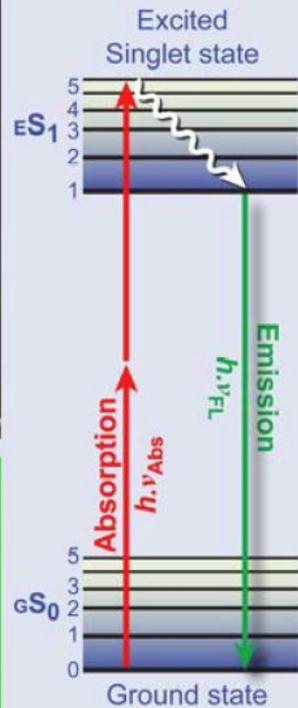
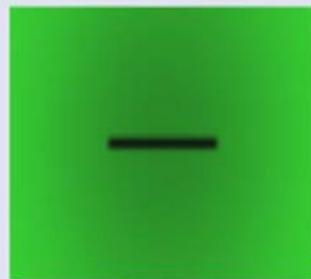
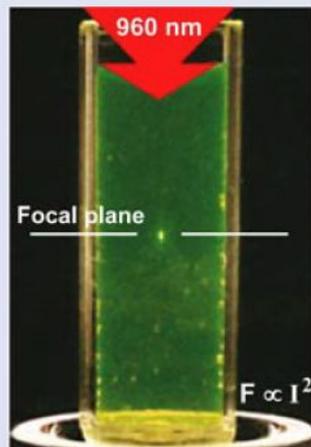


Рис. 1. Сравнение однофотонной и мультифотонной микроскопии.

Эндогенные флуорофоры



Флуоресциру

ют:

- Аминокислоты (Три, Тир, Фен)
- Денатурированные белки
- Липид-связанные белки
- Восстановленные пиридиннуклеотиды и окисленные флавопротеины

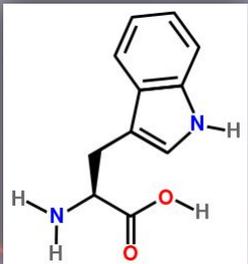
□ Флуоресцентные белки

Не

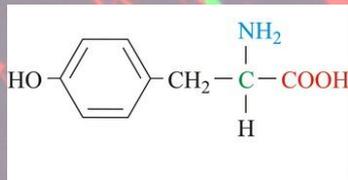
флуоресцируют:

- Нуклеиновые кислоты
- нуклеотиды
- Нативные белки, ферменты*
- Нуклеопротеиды

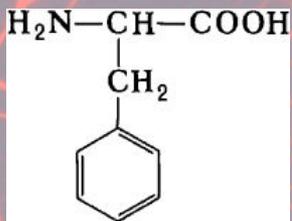
Ультрафиолетовая флуоресценция клеток



Триптофа



Тирозин



Фенилалани

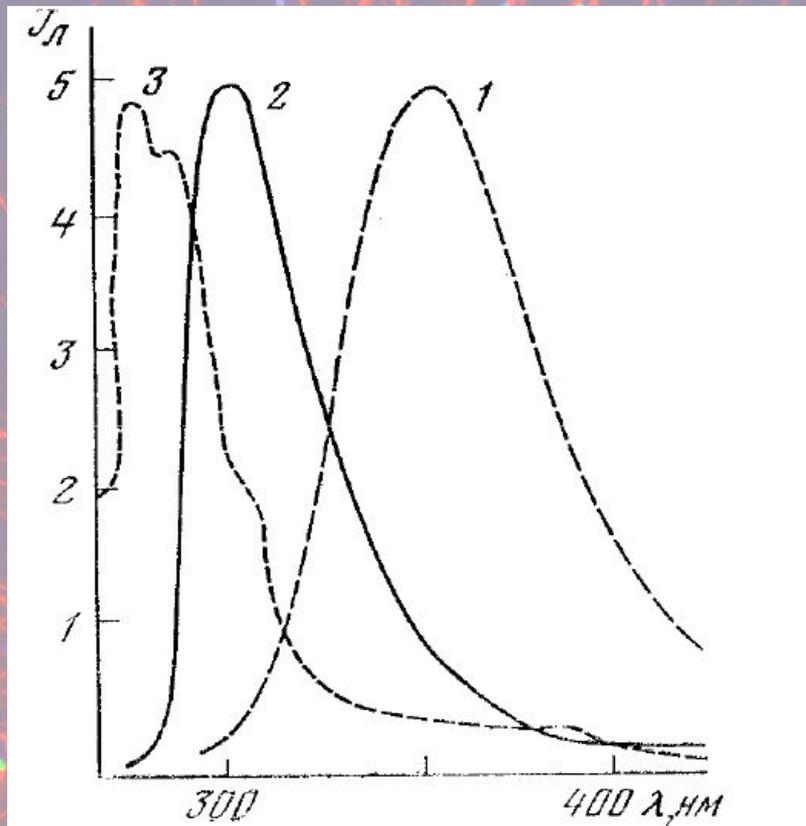


Рис.2. Спектры люминесценции аминокислот в водном растворе при комнатной температуре .

1 – Триптофан

2 – Тирозин

3 - Фенилаланин

Флуоресценция в синей и желтой области спектра

Cytokeratins	Intracellular fibrous proteins	(280-325 nm) / (495-525 nm)	Spectral shape and emission amplitude
Collagen/Elastin	Extracellular fibrous proteins	(330-340 nm) / (400-410 nm) (350-420 nm) / (420-510 nm)	Excitation light birrefringence effects spectral shape and emission amplitude, depending on maturation degree in elderying and fibrosis
NAD(P)H	Coenzymes of key enzymes in redox reactions	(330-380 nm) / (440, 462 nm, bound, free)	Spectral shape, emission amplitude
Flavins	Coenzymes of key enzymes in redox reactions	(350-370;440-450 nm) / (480/540 nm)	$(\text{NAD(P)H})_{\text{bound/free}}$, $\text{NAD(P)H}_{\text{total/oxidized}}$ flavins ratios, depending on aerobic/anaerobic energetic metabolism, antioxidant defense, inflammation, carcinogenesis
Fatty acids	Accumulated lipids	(330-350 nm) / (470-480 nm)	Spectral shape, emission amplitude and photosensitivity, depending on altered lipid metabolism
Vitamin A	Retinols and carotenoids	(370-380 nm) / (490-510 nm)	Spectral shape, emission amplitude and photosensitivity, depending on multiple functions including antioxidant and vision roles, and altered retinol metabolism

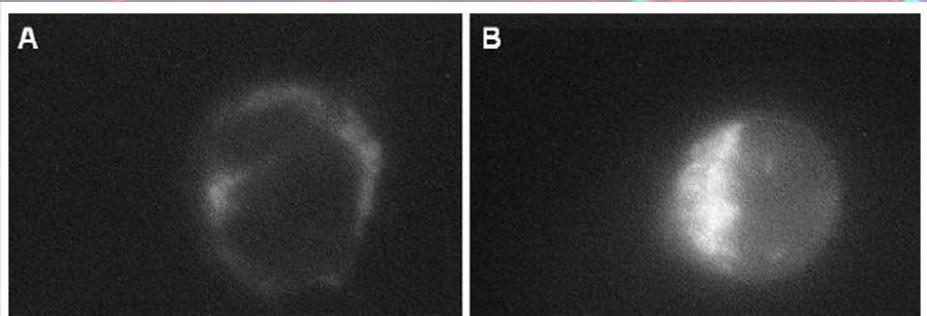


Рис. 3. Автофлуоресценция клетки HL60, небработанной (А) и обработанной (В) ротеноном. Увеличение флуоресценции происходит из-за блокировки транспорта электронов и накопления NAD(P)H. Возбуждение светом 365нм.

Флуоресценция в красной области

Protoporphyrin IX and porphyrin derivatives	Protein prostetic group	(405 nm) / (630-700 nm)	Spectral shape, emission amplitude and photosensitivity, depending on heme and iron altered metabolism
Lipofuscins/ Lipofuscin like-lipopigments/ceroids	Miscellaneous (proteins, lipids, retinoids)	(UV, 400-500 nm) / (480-700 nm)	Spectral shape, emission amplitude depending on eldering, oxidation degree, cell stemness degree

Autofluorescence differential analysis

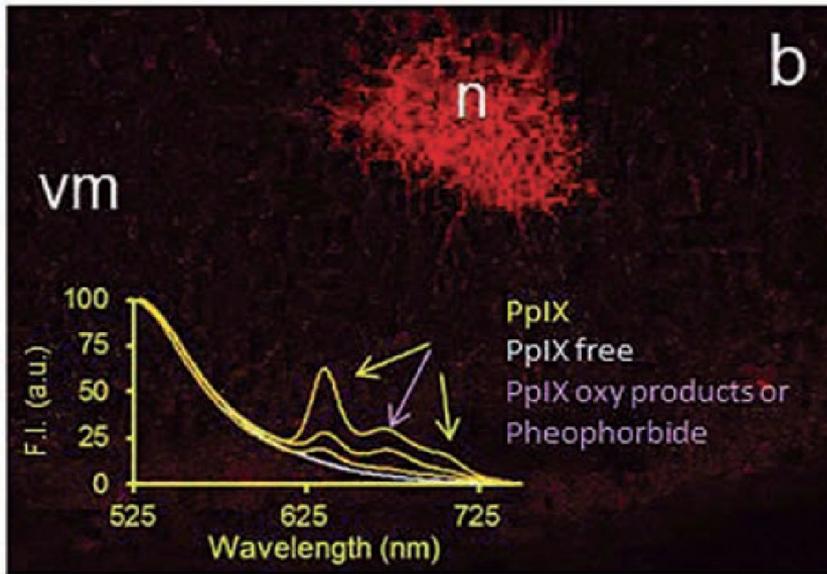


Рис. 4. Флуоресценция протопорфирина в некротизированной ткани опухоли молочной железы. Возбуждение светом 405нм.

Флуоресцентные белки

Ароматический флуорофор



Полипептид

Целентерамид-содержащие

GFP подобные

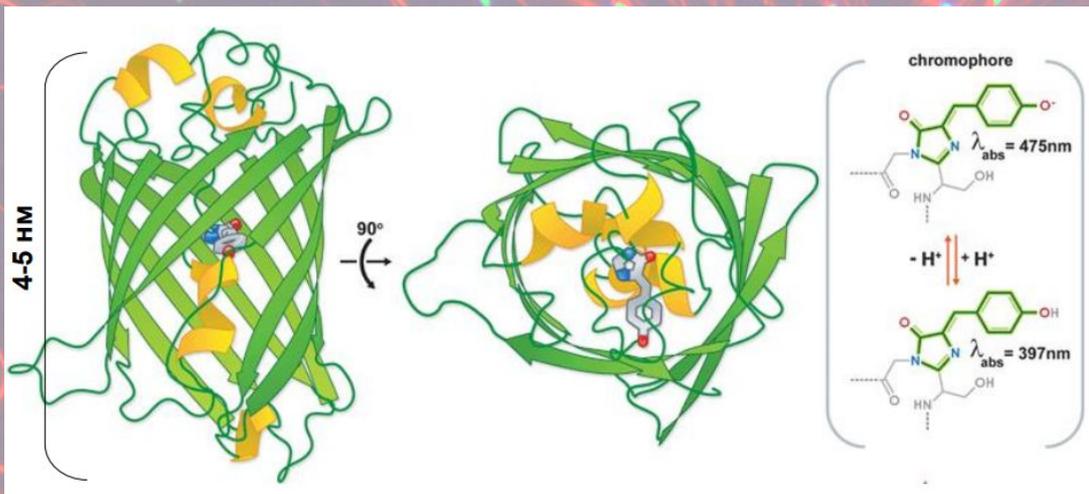


Рис. 5. Структура GFP белка



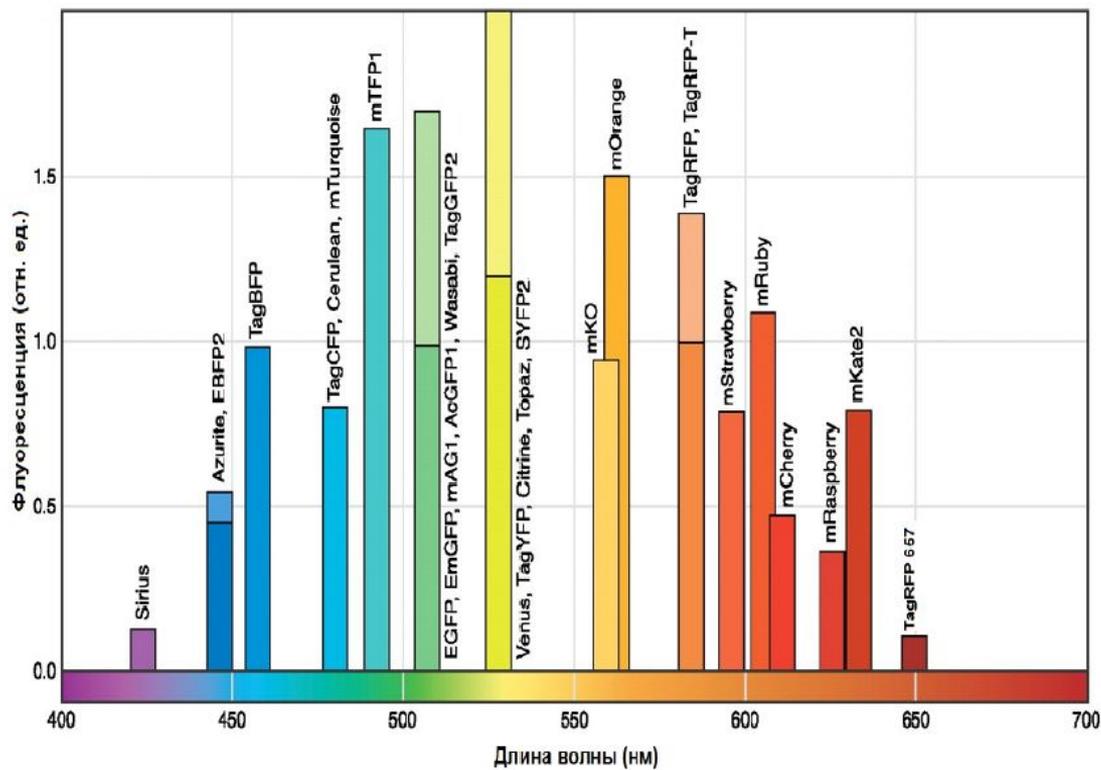
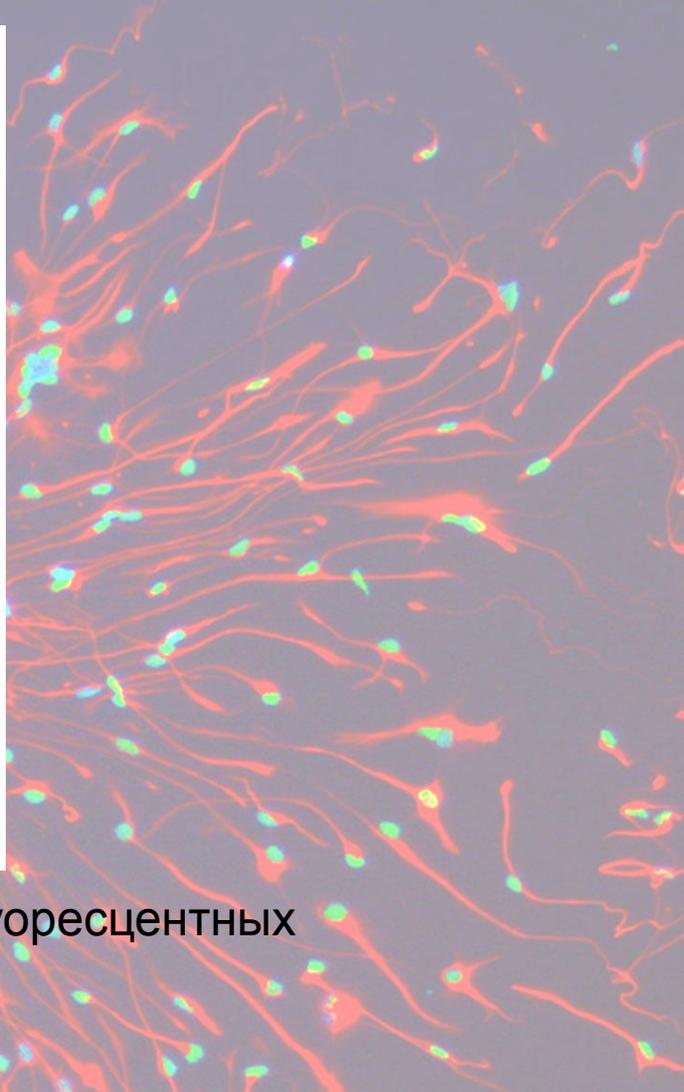


Рис. 6. Спектральное разнообразие мономерных флуоресцентных белков



Инфракрасный флуоресцентный белок - iRFP

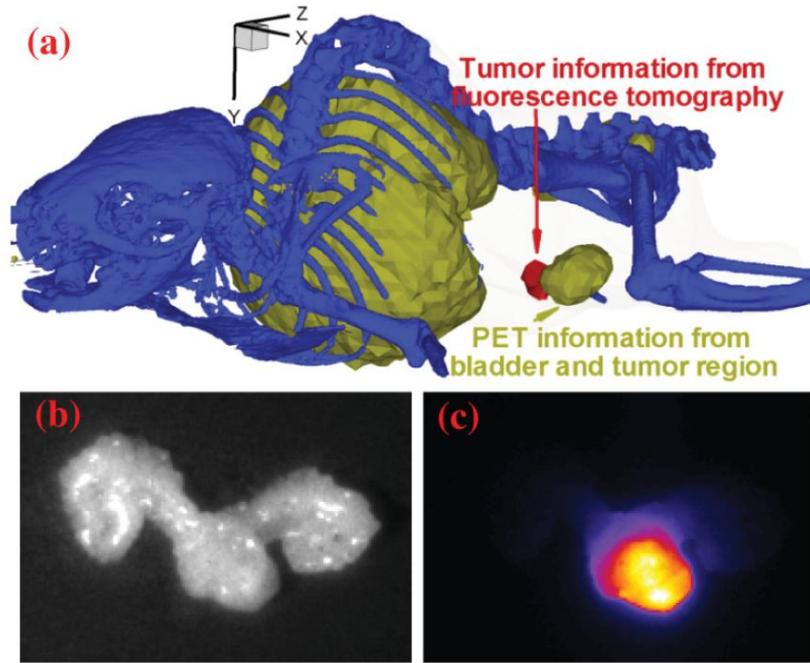


Рис. 7.

А - Флуоресцентная томография ортотопического рака простаты с iRFP геном репортером. Флуоресцентная томография наложена на КТ (синий цвет) и ПЭТ (желтый).

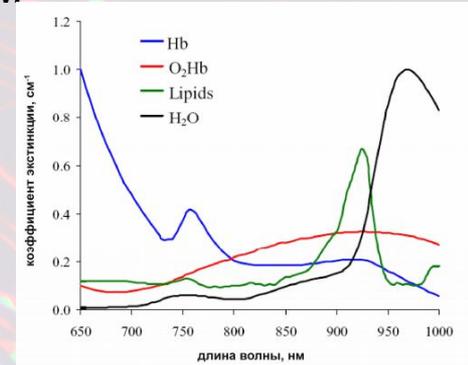
В - фото простаты ex vivo.

С - флуоресценция опухоли ex vivo.

Возбуждение - 690нм

Регистрация - 720нм

700 – 950 нм – минимальное поглощение тканями (глубина исследования до 10см)



Цитотоксические флуоресцентные белки

MiniSOG

KillerRED

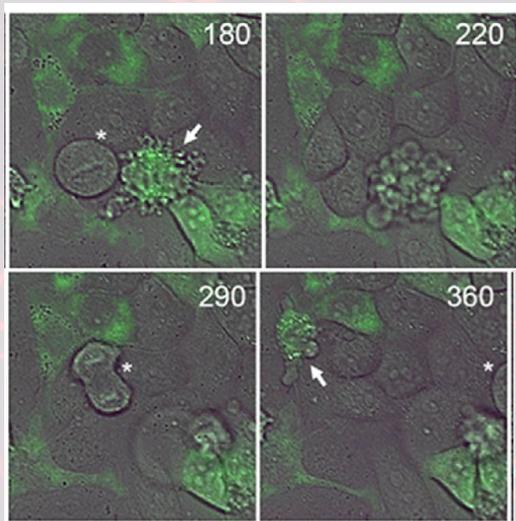
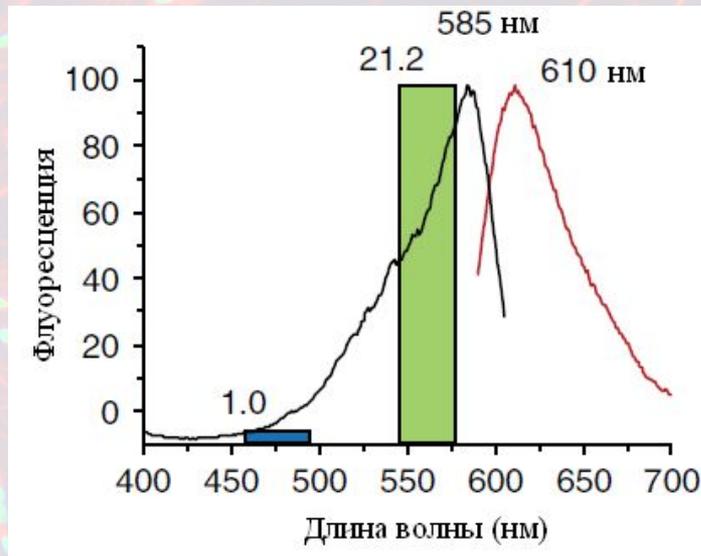
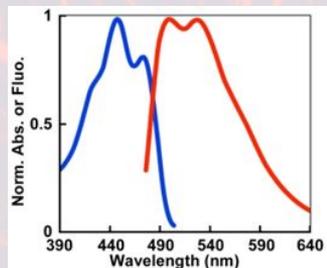
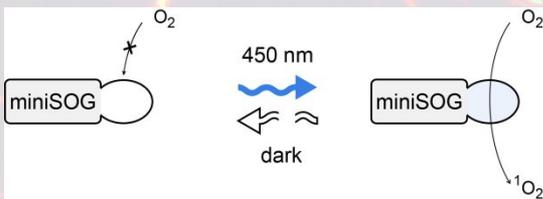


Рис. 8.
Апоптотическая
гибель клеток
HeLa Kyoto,
содержащих miniSOG
в митохондриях.
Видны
специфические для
апоптоза
пузырьковые

Фотоактивируемые флуоресцентные белки

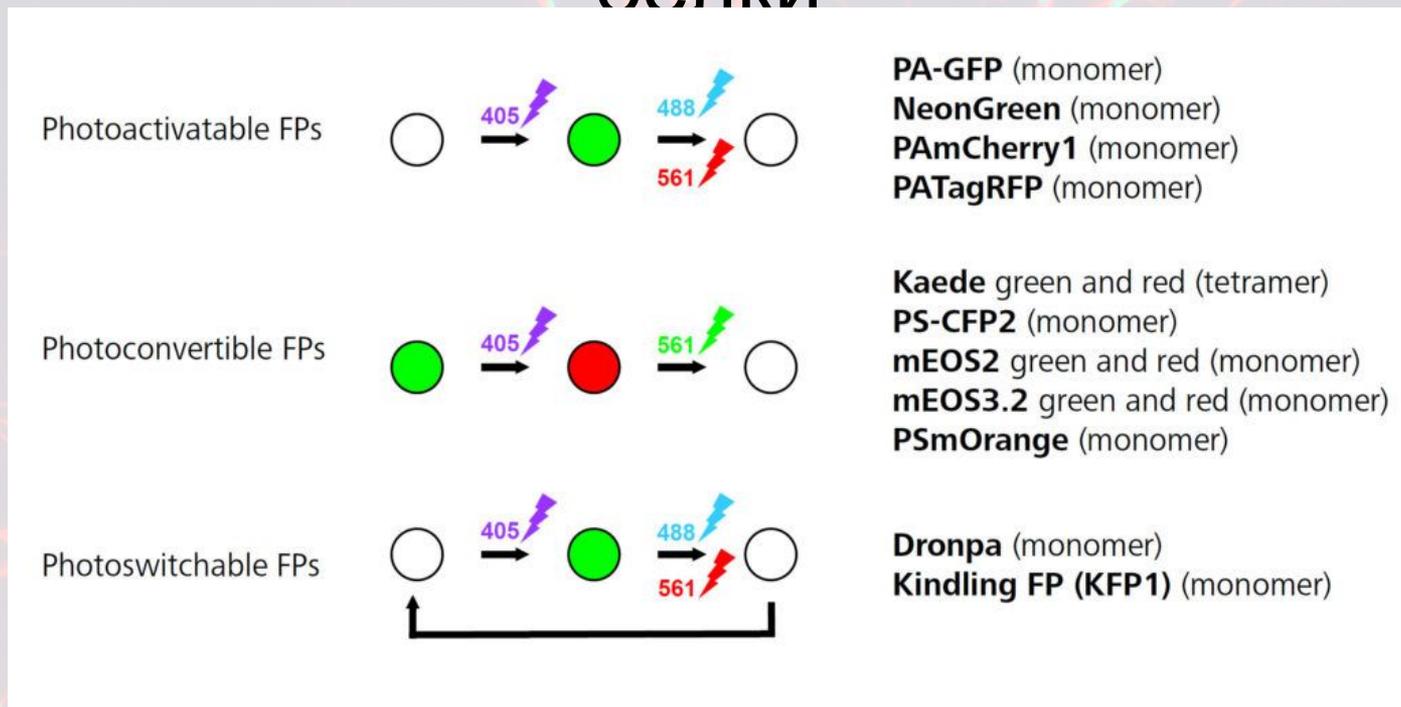
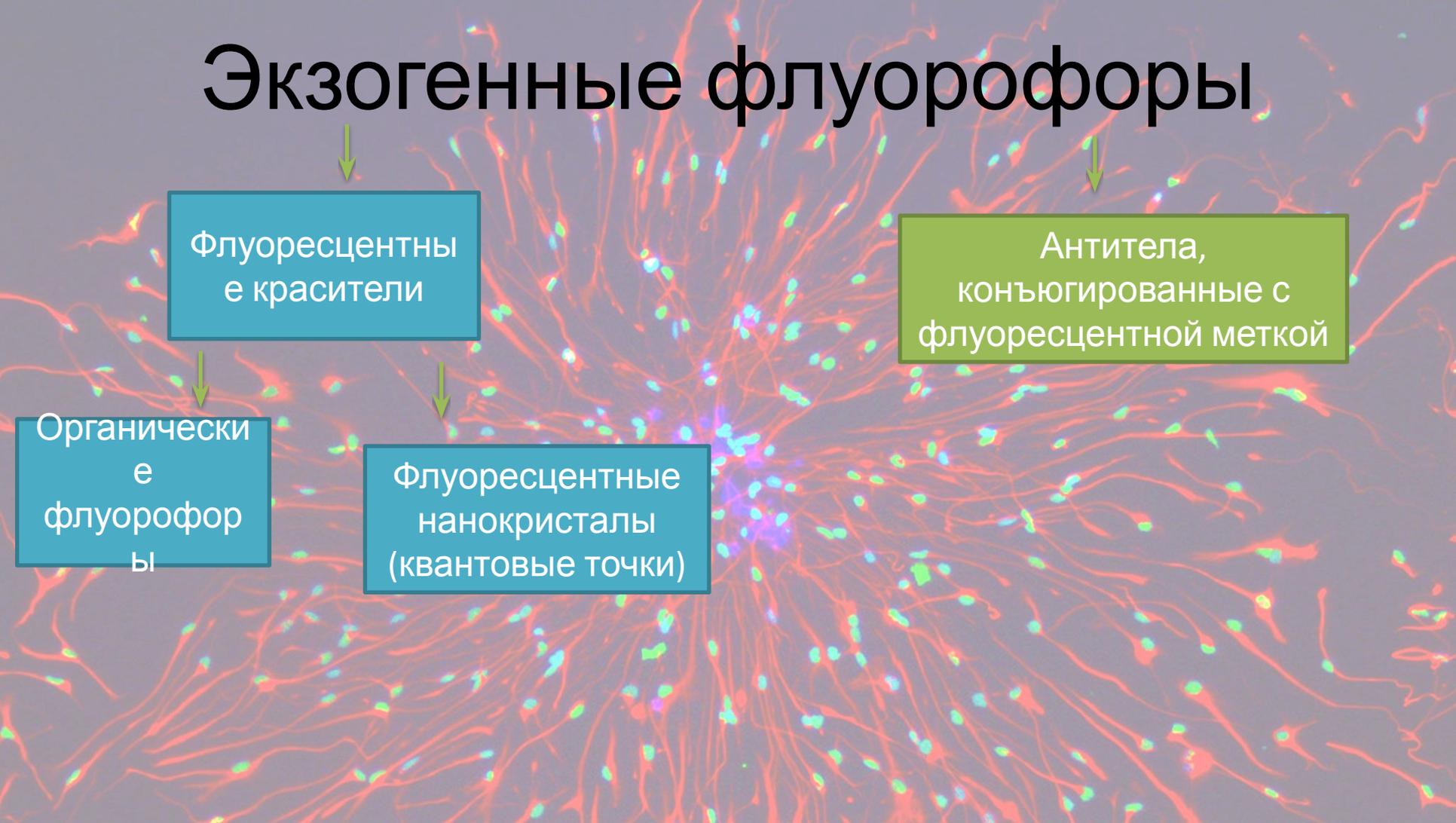


Рис. 9. Типы фотоактивируемых флуоресцентных белков.

1. Фотоактивируемые белки
2. Фотоконвертируемые белки
3. Фотопереключаемые

Экзогенные флуорофоры

A fluorescence microscopy image showing a dense network of cells. The cells are stained with various exogenous fluorophores, resulting in a complex pattern of colors including red, green, blue, and purple. The background is a dark, muted blue.

↓

Флуоресцентны
е красители

↓

Антитела,
конъюгированные с
флуоресцентной меткой

↓

Органически
е флуорофор
ы

↓

Флуоресцентные
нанокристаллы
(квантовые точки)

Квантовые точки

Свойства квантовых точек:

- Узкий симметричный пик флуоресценции, положение которого регулируется выбором размера нанокристалла и его составом.
- Широкая полоса возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения.
- высокая яркость флуоресценции.
- уникально высокая фотостабильность, что позволяет использовать источники возбуждения высокой мощности.

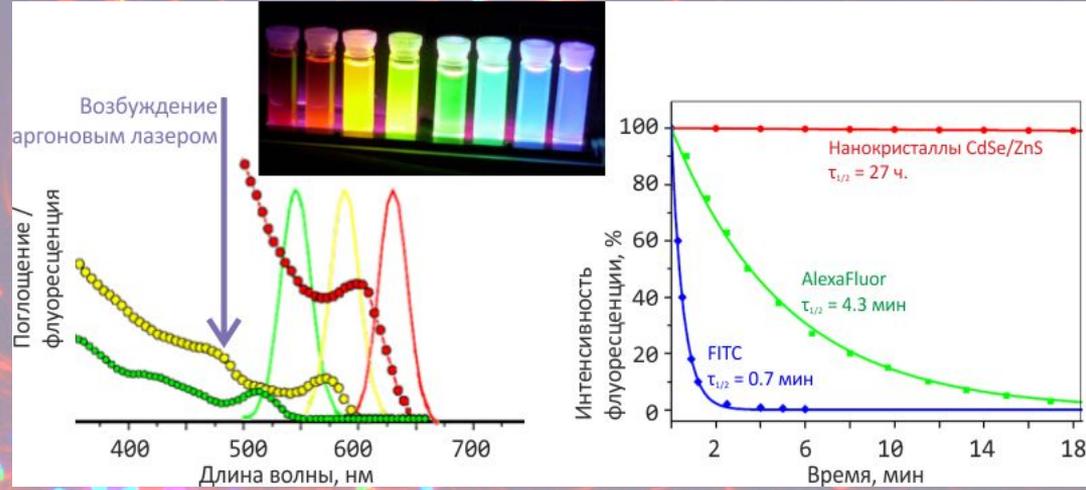


Рис. 10. Свойства квантовых точек

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ литературы

- Hellen C. Ishikawa-Ankerhold, Richard Ankerhold and Gregor P. C. Drummen, Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM, *Molecules*, 10.3390/molecules17044047, **17**, 12, (4047-4132), (2012).
- Irina N. Druzhkova, Marina V. Shirmanova, Maria M. Lukina, Varvara V. Dudenkova, Nataliya M. Mishina & Elena V. Zagaynova (2016) The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts – coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide, *Cell Cycle*, 15:9, 1257-1266
- Monici, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 227–56 (2005).
- Lu Y., Darne C.D., Tan I.C., Wu G., Wilganowski N., Robinson H., Azhdarinia A., Zhu B., Rasmussen J.C., Sevick-Muraca E.M. (2013). *In vivo* imaging of orthotopic prostate cancer with far-red gene reporter fluorescence tomography and *in vivo* and *ex vivo* validation. *J. Biomed. Opt.* **18**, 101305;
- В.Н. Карнаухов. Люминесцентный анализ клеток, Пуццино, 2002.
- А.И. Журавлев. Квантовая биофизика животных и человека.