

Измерение диффузии флуоресцентных молекул в живых клетках

С.А.Татаркова, К.Ллойд, Д.Берк

Продемонстрированы возможности использования метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии для исследования молекулярной динамики в живых клетках. Метод позволяет проводить точечные измерения концентрации флуоресцентных молекул и их диффузионных коэффициентов с высоким временным разрешением при ничтожно низкой концентрации флуоресцентных носителей в микроскопическом объёме, что особенно важно в фармакологических исследованиях. Рассмотрена биологическая модель взаимодействия липосом с клеточной мембраной. Коэффициенты диффузии флуоресцентных молекул измерены непосредственно в цитоплазме живых клеток.

Ключевые слова: флуоресцентная корреляционная спектроскопия, зелёный флуоресцентный протеин, липосомы.

1. Введение и основные понятия

В последние годы лазерные микротехнологии получили новое развитие, обусловленное уникальными достижениями в области биологии клетки и геномной инженерии. Лазерные микротехнологии позволяют проводить бесконтактные исследования биомолекул, не приводящие к их разрушению, осуществлять измерения *in vivo* в реальном времени и в реальных физиологических условиях. При этом измерения с высокой точностью могут проводиться в очень малых объёмах (порядка одного фемтолитра) и требуют присутствия всего нескольких флуоресцентных молекул.

Наиболее эффективная и широко распространённая технология – флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС) – основана на анализе флуоресценции, индуцированной лазерным излучением. Известная уже три десятка лет [1, 2], ФКС недавно получила новое развитие в исследованиях биологии клетки. Это развитие стало возможным благодаря созданию объективов с высокой числовой апертурой, а также синтезу качественно нового поколения флуоресцентных биомаркеров, способных вступать в прочные химические соединения практически с любым природным протеином, чей жизненный цикл и функции в живой клетке представляют интерес для исследования.

В основе метода ФКС лежит поглощение фотона флуоресцентной молекулой и переизлучение его на смещённой длине волны. Флуктуации интенсивности регистри-

руемого при этом сигнала возникают в результате броуновского движения флуоресцентных молекул в освещённом лазером объёме. Время, за которое молекула пересекает освещённый объём (рис.1,а), определяется коэффициентом диффузии, поэтому флуктуации интенсивности есть не что иное, как флуктуации числа флуоресцентных молекул, находящихся в освещённом объёме (рис.1,б). Эти флуктуации определяют и форму автокорреляционной функции (рис.1,в).

Функция распределения молекул в зависимости от их коэффициента диффузии или гидродинамического радиуса может быть получена из автокорреляционной функции в результате решения обратной задачи преобразованием Лапласа. Беспрецедентные пространственное разрешение и чувствительность ФКС являются следствием малого числа флуоресцентных молекул, необходимых для измерения и сокращения облучаемого лазером объёма до минимально допустимого дифракционным пределом значения. Параллельный лазерный пучок можно сфокусировать объективом микроскопа в пятно диаметром $d = 1.22\lambda/NA$, где λ – длина волны света, NA – числовая апертура объектива.

Современные объективы обеспечивают фокусировку в пятно с поперечными размерами порядка долей микрометра. Флуоресцентные фотоны, излучённые в направлении, противоположном распространению лазерного пучка, вместе со значительным количеством рассеянных лазерных фотонов собираются тем же объективом.

Однако флуоресценция возбуждается не только в фокальной плоскости объектива микроскопа, но и на всем пути распространения лазерного пучка. Чтобы отделить фотоны, испущенные вне фокального объема, и таким образом значительно уменьшить исследуемый объём, используется конфокальный принцип регистрации сигнала. Обычно это достигается с помощью диафрагмы, установленной перед фотодетектором и отсекающей параллельные либо слабосфокусированные пучки. Метод ФКС не требует усреднения по ансамблю идентичных молекул, как это принято, например, в светорассеянии. Их концентрация может быть настолько мала, что присутствия одной молекулы уже достаточно для измерения её

С.А. Татаркова. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410026 Саратов, ул. Астраханская, 83; адрес в настоящее время: School of Physics & Astronomy, University of St.Andrews, North Haugh, St.Andrews KY16 9SS, Fife, Scotland; tel: + 44 01334 463165, fax: + 44 01334 463104, e-mail: sat3@st-andrews.ac.uk

С. Lloyd, D. Berk. School of Pharmacy, Coupland III, University of Manchester, Oxford Road, Manchester, M13 9PL, UK; tel: + 44 0161 275 2375, fax: + 44 0161 275 2396, e-mail: clloyd@fs1.pa.man.ac.uk; D.Berk@man.ac.uk

Поступила в редакцию 21 мая 2002 г., после доработки – 16 октября 2002 г.

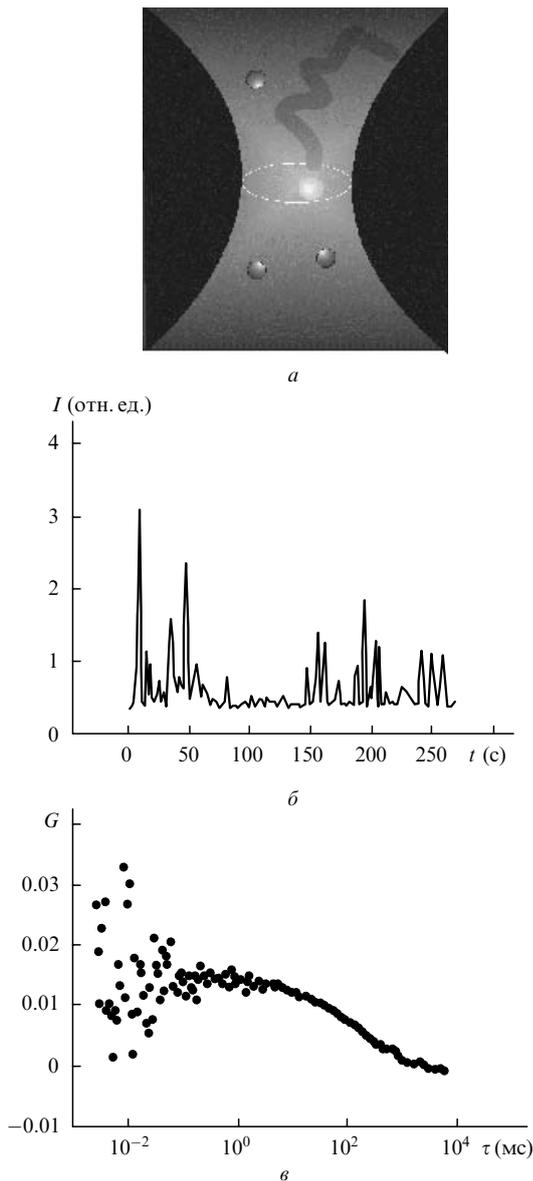


Рис.1. Схема диффузии флуоресцентных молекул в поле сфокусированного лазерного пучка (а), типичная временная реализация флуоресцентного сигнала в режиме «одной молекулы детектирования» (б) и типичная экспериментальная автокорреляционная функция диффузии флуоресцентных частиц с диаметром 100 нм в воде (в).

коэффициента диффузии. Для биологических экспериментов особенно важно, что из рассмотрения исключаются неподвижные молекулы, например те, которые взаимодействовали с внутренней структурой клетки – её цитоскелетом или поверхностью ячейки. Их вклад в автокорреляционную функцию будет нулевым!

Исследование внутриклеточных процессов крайне затруднено высокой молекулярной концентрацией и достаточно сложной внутренней структурой клетки. Хотя некоторые молекулы, такие как флавины, обладают собственной флуоресценцией в оптическом диапазоне, их квантовая эффективность довольно низка. Внесение «инородных» флуоресцентных молекул позволяет исследовать внутриклеточную структуру и взаимодействия между молекулами в реальных физиологических условиях. Уникальность метода ФКС в том, что он позволяет исследовать диффузию в объёме, который в сотни и тысячи раз меньше самой клетки.

Целью данной работы является возможность показать с помощью ФКС динамику внутриклеточной диффузии и определить подвижность молекул во внутриклеточном пространстве.

Регистрируемая в процессе измерения автокорреляционная функция описывается уравнением

$$G(\tau) - 1 = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (1)$$

где $\delta I(t)$ – регистрируемые фотодетектором флуктуации интенсивности; угловые скобки означают усреднение по времени. Автокорреляционная функция может быть непосредственно преобразована в функцию распределения коэффициентов диффузии с помощью специального алгоритма CONTIN [3]. В то же время существует достаточно много теоретических моделей для описания диффузии в разных экспериментальных условиях, являющихся тем или иным приближением решения диффузионного уравнения с соответствующими начальными и граничными условиями. Решение диффузионного уравнения обеспечивает получение автокорреляционной функции, которая описывает диффузию молекулы в трёхмерном объёме, освещённом сфокусированным гауссовым пучком, и удовлетворяет уравнению [4]

$$G(\tau) - 1 = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{K^2 \tau_d} \right)^{-1/2}, \quad (2)$$

где N – среднее число молекул в освещённом объёме; τ_d – время диффузии; K – поправка, учитывающая форму этого объёма (несмотря на конфокальность, на фотодетектор попадает также часть фотонов, испущенных из близлежащих областей), которая является отношением продольного размера детектируемого объёма к поперечному, т. е. к радиусу пятна в фокусе. Значение K определяется для каждой экспериментальной установки отдельно. Зная время диффузии, можно определить коэффициент диффузии D из соотношения

$$\tau_d = \frac{r^2}{4D}, \quad (3)$$

где r – радиус гауссова пучка в перетяжке. Полезным следствием соотношения (2) является также соотношение, описывающее диффузию молекулы в двумерном плоском слое [5]:

$$G(\tau) - 1 = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d} \right)^{-1}. \quad (4)$$

Дополнительно можно учесть факторы, ответственные за нестационарность флуоресценции во времени вследствие нелинейного отклика на лазерное возбуждение и насыщение, которая проявляется как изменение времени жизни триплетного состояния.

2. Экспериментальная установка

Экспериментальная установка (рис.2) была создана на основе флуоресцентного микроскопа E800 (Nikon, Япония). Используемая схема позволяет расширить возможности микроскопа с точки зрения проведения высококачественного анализа флуоресцентных изображений, полученных при освещении образца ртутной лам-

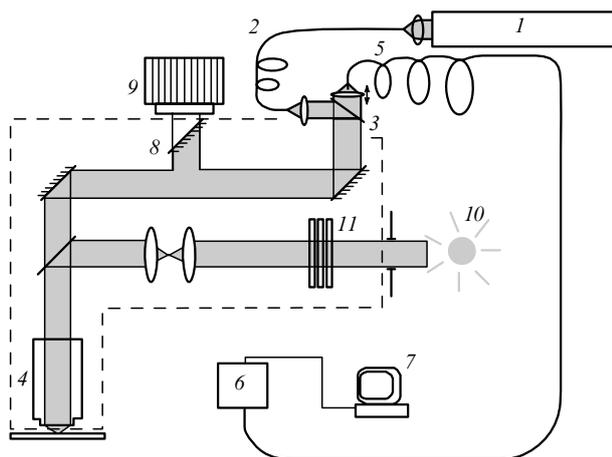


Рис.2. Экспериментальная установка для реализации метода ФКС: 1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – дихроичный делитель пучка; 4 – объектив микроскопа; 5 – многомодовое волокно; 6 – фотодетектор (лавинный фотодиод); 7 – коррелятор; 8 – блокирующее зеркало; 9 – цифровая камера; 10 – ртутная лампа; 11 – нейтральные фильтры.

пой, и в то же время сочетать анализ с точечными ФКС-измерениями.

Излучение аргонового ($\lambda = 488$ нм) или диодного ($\lambda = 635$ нм) лазера 1 с помощью короткофокусной линзы проецируется на одномодовое волокно 2 длиной 3 м с диаметром сердцевины 4 мкм. На другом конце волокна излучение преобразуется линзой в параллельный пучок с поперечными размерами, слегка превышающими заднюю апертуру объектива микроскопа 4 (40X/0.60, Plan Fluor). Затем пучок проходит через дихроичный делитель 3 и фокусируется в фокальной плоскости объектива в пятно, размер которого определяется его дифракционным пределом.

Излучение флуоресценции образца на обратном пути проходит через дихроичный делитель, отделяется от лазерного излучения и фокусируется на многомодовое волокно 5 длиной 5 м с диаметром сердцевины 50 мкм, соединенное с лавинным фотодиодом 6 (SPCM-AQ-121, EG&G); сигнал с фотодиода подается на электронную плату коррелятора 7 (ALV-5000, Германия), установленного в персональном компьютере. Сопутствующее программное обеспечение преобразует электронные импульсы фотодиода в автокорреляционную функцию в реальном времени. Параллельно с получением стационарного изображения всего образца на CCD-камере 9 (MicroMax, 5MHz System, RS Princeton Instrument) методом ФКС оно может быть получено при блокировании излучения лазера зеркалом 8 и освещении образца ртутной лампой 10.

Установка была прокалбрована стандартным способом. Время диффузии молекул родамина 6G в водном растворе измерялось для разных экспериментальных условий (типа растворителя, его концентрации, скорости счёта фотонов), а параметры пучка (радиус пятна и поправка K) оценивались исходя из известного для родамина коэффициента диффузии $D = 2.8 \times 10^{-6}$ см²/с.

3. Биологическая модель

Исследовалась биологическая модель взаимодействия липосом с мембраной клеток. Липосомы – это натуральные биологические мембраны, которые часто используются в фармакологии для транспортировки био-

логических молекул к живым клеткам. Строительный материал, из которого сделаны липосомы, аналогичен мембране живой клетки. Это определяет их относительно низкую токсичность и безопасность. Несмотря на свой размер (от 50 до 800 нм), они способны свободно проходить через мембрану. Это весьма важно, поскольку одной из проблем, тормозящих развитие генной инженерии, является поиск эффективных методов транспортировки макромолекул (таких как ДНК) с молекулярным весом и размерами, превышающими молекулярный вес и размеры молекул традиционных препаратов (например, аспирин) в сотни и тысячи раз, которые из-за их высокой биохимической активности могут быть транспортированы лишь посредством того или иного «нейтрального» носителя.

Способ приготовления липосом во многом определяет их свойства [6]. Для получения липосом плоская липидная пленка (DcChol : DOPE = 1:1), образованная плотно упакованными в два слоя молекулами фосфолипида таким образом, что вода вытесняется из пространства между слоями, продавливается через мембрану с порами. Липосомы при этом сами себя закупоривают, формируя сферообразную оболочку, содержащую воду только внутри и снаружи. Полученные таким образом липосомы будут однородными по размеру и устойчивыми к разрушению. В то же время между слоями можно упаковать достаточное количество молекул флуоресцентного красителя. Это позволяет в дальнейшем обнаруживать липосомы по характерному флуоресцентному сигналу. В качестве флуоресцентного красителя мы использовали молекулы красителя DiC₁₈(5) (длина волны возбуждения 644 нм, излучения – 665 нм) или DiC₁₈(3) (соответственно 549 и 565 нм).

4. Результаты и обсуждение

В первую очередь были исследованы свойства липосом – их однородность и устойчивость против агрегации. Водный раствор липосом, приготовленных путём продавливания липидных структур через мембрану с порами диаметром 50, 100 и 200 нм, исследовался методом ФКС. Экспериментальные автокорреляционные функции обрабатывались с помощью алгоритма CONTIN, а также аппроксимацией экспериментальных данных к численному решению (2) с помощью алгоритма, приведенного в работе [7]. Результаты представлены на рис.3,а. Коэффициент диффузии определялся по формуле (3), а соответствующий гидродинамический радиус R оценивался из соотношения Эйнштейна – Стокса:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}. \quad (5)$$

Полученные нами результаты сравнивались с независимо полученными экспериментальными данными по светорассеянию. Однако прямое сравнение здесь не совсем корректно, поскольку в светорассеянии необходимая концентрация образца и его объём значительно выше, чем в методе ФКС. Например, для ФКС было достаточно всего 20–25 мкл образца и всего несколько липосом, в то время как в светорассеянии для наполнения ячейки требовались несколько миллилитров раствора и достаточно высокая для получения удовлетворительного отношения сигнал/шум концентрация. В связи с этим усреднение проводилось по гораздо большему ан-

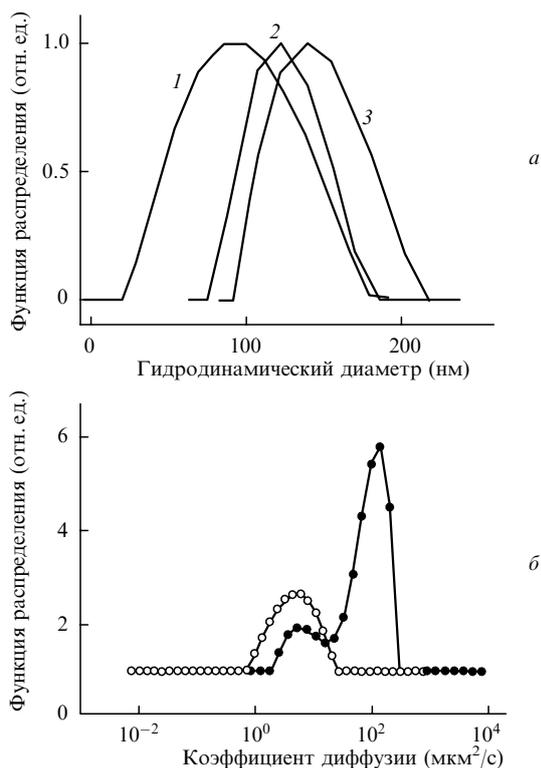


Рис.3. Функция распределения липосом в зависимости от их гидродинамического диаметра со средним значением 104 (1), 132 (2) и 163 нм (3) (а) и функция распределения молекул в зависимости от их коэффициента диффузии для двухкомпонентной смеси липосомы + свободный краситель (черные точки) и однокомпонентной смеси только липосомы (светлые точки) (б).

самблю молекул, и тем не менее результаты оказались весьма близкими. Например, средний диаметр липосом, полученных с мембраной с диаметром поры 50 нм, был равен 104 нм в ФКС-эксперименте и 85 нм – в светорассеянии, при диаметре пор 200 нм – 163 нм и 174 нм соответственно, а для пор диаметром 100 нм результаты оказались идентичными (132 нм). Следует напомнить, что точность методов также различна: в светорассеянии соотношение $\lambda \gg R$ должно быть соблюдено, в то время как для ФКС это не так критично.

Исследовалась также чувствительность нашего метода. Для этого использовалась смесь, состоящая из двух сортов молекул. Для нас было особенно важно выяснить, способен ли эксперимент отразить изменения в структуре липосом (их агрегацию или распад) через изменения коэффициента диффузии, и будет ли это достаточно надежным доказательством их трансформации в живых клетках, где вязкость среды отлична от вязкости воды, а концентрация молекул так высока, что свободная диффузия в значительной степени ограничена. Теоретические оценки [8] чувствительности метода ФКС показывают, что время диффузии каждого из компонентов и соответственно их коэффициенты диффузии должны различаться как минимум в 1.6 раза для того, чтобы оба компонента могли быть уверенно разрешены. Экспериментальные результаты, приведённые [8], не очень оптимистичны: авторы указывают на ряд условий, снижающих чувствительность метода ФКС, – различия в квантовых эффективностях и относительных концентрациях каждого компонента.

Мы исследовали смесь липосом (диаметром ~ 100 нм)

с молекулами того же красителя, который использовался для приготовления липосом, но находился в свободном состоянии. На рис.3,б представлены результаты экспериментов по диффузии однокомпонентной смеси (только липосомы) и двухкомпонентной смеси (липосомы и молекулы красителя в одном растворе). Значительное различие во временах диффузии (более чем в 10 раз) позволяет уверенно разделить оба компонента. Однако яркость флуоресценции свободных молекул красителя была выше, чем липосом. Двухкомпонентная смесь приготавливалась из расчёта примерно равного веса каждого из компонентов.

Экспериментально измеренное число молекул красителя оказалось, тем не менее, несколько большим, что частично могло быть результатом более высокой квантовой эффективности молекул красителя. Нужно также иметь в виду гидрофобные свойства данного красителя: известно, что в водном растворе отдельные молекулы красителя образуют устойчивые агрегатные состояния, поэтому его диффузия идет несколько медленнее, чем этого следовало бы ожидать.

Дальнейшим этапом эксперимента было исследование взаимодействия липосом с мембраной живых клеток и определение характерных параметров этого взаимодействия (рис.4). Использовалась культура клеток меланомы (KHT mice line, общее число $\sim 10^6$). В питательную среду клеток (DMEM, 4 мл) помещали липосомы со средним диаметром 163 нм (10–30 мкл) и оставляли на два часа для инкубации. После этого клетки дважды промывались физиологическим раствором, чтобы удалить оставшиеся липосомы, и исследовались под микроскопом.

Снимок флуоресценции клеток меланомы (рис.4,б) сделан с помощью объектива с 20-кратным увеличением и доказывает успешную трансфекцию клеток, в результате чего клетки можно обнаружить по яркой флуоресценции. Качественный анализ состояния липосом в цитоплазме клетки проводился с помощью точечных ФКС-измерений. Измерения осуществлялись при средней ско-

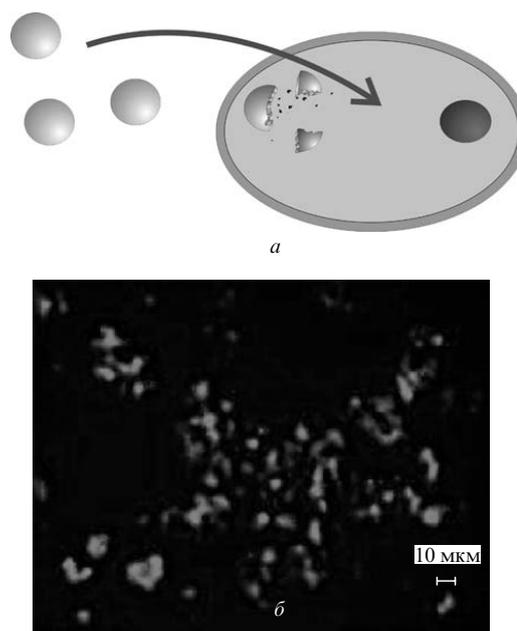


Рис.4. Схема взаимодействия липосом с мембраной живой клетки и разрушения их в цитоплазме (а), а также флуоресценция раковых клеток, полученная после их инкубации в растворе с липосомами, содержащими флуоресцентный краситель (б).

рости счёта фотонов 1–2 кГц, превышающей уровень шума детектора (350 Гц), и сопровождались характерными всплесками интенсивности, вызванными диффузией отдельных молекул через освещённый объём.

Серия измерений автокорреляционной функции показала, что основной вклад в корреляционный сигнал вносят быстрые молекулы. Попытки обнаружить диффузию более медленного компонента, которая предположительно могла бы соответствовать диффузии целых липосом внутри клетки, оказались безуспешными.

Существует предположение, что после прохождения мембраны липосомы расщепляются в цитоплазме и свободные молекулы липида смешиваются с мембраной самой клетки [9]. Мы предположили, что освободившиеся молекулы красителя накапливаются во внутриклеточном пространстве и их свободная диффузия регистрируется с помощью метода ФКС. Коэффициент диффузии, полученный с использованием двумерной модели (4), оказался равным (46 ± 5.9) $\mu\text{м}^2/\text{с}$. Целесообразность использования двумерной модели для описания диффузии в клетках подробно обсуждается в работе [10], выводы которой подтверждаются нашими экспериментами. Замедление диффузии в 2–3 раза происходит как из-за повышенной вязкости цитоплазмы по сравнению с вязкостью водного раствора, так и вследствие высокой молекулярной концентрации, затрудняющей свободную диффузию молекул во внутриклеточном пространстве.

Вероятной также представляется версия о деградации молекул красителя на органеллах клетки. Что касается вязкости цитоплазмы, то по оценкам [11] она может превышать вязкость воды не менее чем в 2.2 раза. Молекулярная концентрация липосом в клетках также достаточно высока, что не может не влиять на результаты оценки вязкости. С помощью метода ФКС удается продемонстрировать распад липосом в цитоплазме клетки и свободную диффузию молекул красителя в цитоплазме. Если предварительно оценить концентрацию красителя в отдельной липосоме, данный метод можно успешно использовать для строгой количественной оценки эффективности липосом при транспортировке молекул к клеткам.

Мы исследовали также эффективность использования липосом для транспортировки молекул ДНК [12], несущих специфический код, реакция клетки на который представляет собой интенсивный синтез собственного зелёного флуоресцентного протеина (ЗФП) (рис.5,а). При этом количество синтезированного протеина прямо пропорционально числу молекул ДНК, прошедших через мембрану клетки. Молекулы протеина свободно распределяются во внутриклеточном пространстве, и их диффузия также может быть исследована с помощью ФКС. Впервые диффузия ЗФП в клетках была исследована методом ФКС в работе [13]. Отмечена неоднородность концентрации ЗФП в цитоплазме и ядре клетки, а также зависимость скорости диффузии от положения протеина внутри клетки.

«Посредничество» специальных макромолекул при транспортировке молекул ДНК в цитоплазму клетки совершенно необходимо. Поскольку большие молекулы ДНК не могут самостоятельно пройти через мембрану клетки, для этого используют макромолекулы, называемые липоплексами [12]. Липоплексы – это молекулярные соединения, образовавшиеся в результате спонтанного взаимодействия положительно заряженных липосом с

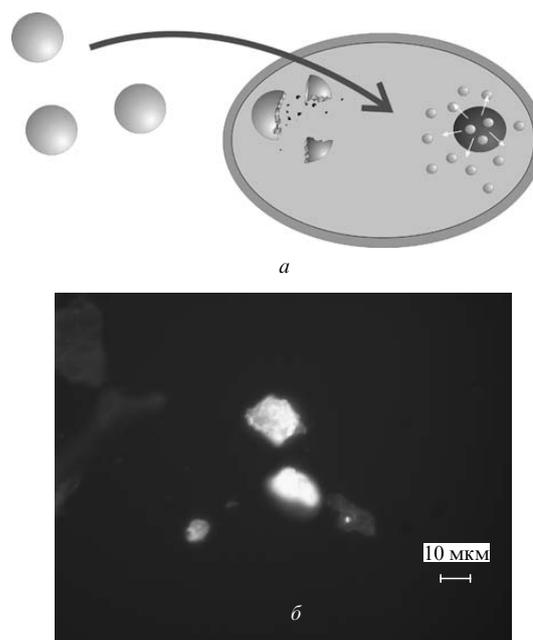


Рис.5. Схема транспортировки молекул ДНК через мембрану в клетку и синтеза молекул ЗФП (а) а также флуоресцентное изображение раковых клеток, полученных с 40-кратным увеличением (б).

отрицательно заряженными молекулами ДНК. Благодаря «посредничеству» липоплексов молекула ДНК оказывается заключённой между слоями липида, что препятствует её взаимодействию с другими молекулами. Появление соединения с липосомами ведёт к существенной нейтрализации образовавшихся макромолекул, обеспечивая их устойчивость и однородность [12].

Мы использовали липоплексы со средним диаметром 275 нм. Транфекция клеток липоплексами проводилась аналогично описанной выше трансфекции с помощью липосом. Раствор липоплексов (0.75 мкл липосом +5 мкг молекул ДНК в растворе объемом 500 мкл) добавляли в питательную среду клеток и оставляли для инкубации на несколько часов. Затем промывые в физиологическом растворе клетки исследовали под микроскопом. На рис.5,б представлен снимок флуоресценции синтезированного клеткой ЗФП, демонстрирующий неоднородность его распределения.

Мы использовали также метод ФКС для измерения коэффициента диффузии ЗФП в цитоплазме клеток, который в свободном состоянии составил (87 ± 11) $\mu\text{м}^2/\text{с}$ [13]. Данный протеин характеризуется высокой квантовой эффективностью. Однако под действием возбуждающего света с $\lambda = 488$ нм (аргоновый лазер) происходят нелинейные изменения его флуоресценции, в результате чего он «обесцвечивается». Следствием этого эффекта является уменьшение интенсивности ФКС-сигнала во времени. Мы отмечали снижение среднего уровня сигнала с 3 кГц до 2.5 кГц. Чтобы ограничить этот эффект, для возбуждения флуоресценции были использованы более низкие интенсивности света. Измеренные автокорреляционные функции анализировались с помощью двумерной модели диффузии и/или методом CONTIN.

Было установлено, что коэффициент диффузии варьируется в широких пределах, даже если он измерен в разных частях одной клетки. Каждое отдельное измерение проводилось 3 раза в одном и том же месте внутри клетки, а полученные результаты усреднялись. Опреде-

лённое таким образом среднее значение времени диффузии (с разбросом 5 % – 10 %) сравнивалось с другими, полученными в других клетках или внутри той же клетки, но при новом положении детектора. Общее число измерений, таким образом, достигало 50. В отличие от результатов работы [13], мы использовали для анализа диффузии однокомпонентную модель и получили три характерных диапазона коэффициента диффузии ЗФП в цитоплазме. Наши измерения носили выборочный характер, поскольку сканирование по длине клетки не проводилось и все измерения осуществлялись вдали от её границ. Относительно быстрая диффузия с коэффициентом (12.95 ± 1.05) мкм²/с была близка к полученной в работе [13]. Её можно отнести к свободной диффузии в цитоплазме клетки, т. к. данных, указывающих на вероятность более быстрой диффузии, у нас нет.

Тем не менее быстрая диффузия молекул ЗФП протекает более чем в 3 раза медленнее диффузии молекул красителя, освобожденных после распада липосом. Это прежде всего определяется разностью их гидродинамических размеров. Однако мобильность молекул в клетке не является линейной функцией их размеров. В нескольких недавних публикациях отмечено, что диффузия протеина в клетке может быть связана с его функцией (например, с использованием для передачи сигнала); возможно также его направленное движение. Подвижность может быть в значительной степени ограничена цитоскелетом или другими молекулами, присутствующими в клетке.

Кроме того, мы наблюдали более медленную диффузию (с коэффициентом (9.0 ± 0.4) мкм²/с), а также сверхмедленную $((1.83 \pm 0.22)$ мкм²/с). Эти значения, как и значение быстрой диффузии, получены в отдельных сериях измерений, а не являются результатом разбиения автокорреляционной функции на двухкомпонентное решение, как это сделано в работе [13]. По нашим данным, наличие двух медленных процессов вполне вероятно, поскольку замедление сопровождается увеличением концентрации протеина в детектируемом объёме. В среднем концентрация ЗФП в клетках не превышала 10 нМ. Кроме того, мы получили несколько промежуточных значений коэффициентов диффузии, которые здесь не приводятся. В случае их пересчёта по двухкомпонентной модели они распадаются на две диффузионные составляющие, близкие к полученным выше. Экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что диффузия биологически активных молекул неоднородна внутри клетки и во многом зависит от положения протеина и его функций в клетке.

5. Заключение

Уникальная особенность метода ФКС – способность регистрировать флуктуации интенсивности, вызванные

колебаниями числа молекул в ограниченном объёме, делает его наиболее приемлемым для исследования внутриклеточной динамики. При этом временное разрешение составляет доли микросекунды, а пространственное достигает четверти микрометра. Нами продемонстрированы возможности метода при его использовании для решения задач биологии клетки. Коэффициенты диффузии флуоресцентных молекул были измерены непосредственно в цитоплазме живых клеток.

Проведенные эксперименты позволяют сделать вывод о распаде липосом в цитоплазме клеток, а также опередить подвижность свободных флуоресцентных молекул внутри неё. Полученные коэффициенты диффузии ЗФП в цитоплазме подтверждают данные работы [13]. Существенное замедление диффузии молекул внутри клетки является следствием повышенной вязкости среды и высокой молекулярной концентрации, а также зависит от размера молекулы и её функций.

Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о «замедлении» диффузии молекул красителя в 2–3 раза в цитоплазме и о сильной зависимости диффузии ЗФП от его положения внутри клетки. Такая сложная зависимость мобильности протеина определенно связана с его функциями в клетке. Детальное исследование диффузионных процессов в клетке может пролить свет на многие вопросы клеточной самоорганизации и саморегуляции, а также открыть новые пути развития генной терапии.

Авторы выражают благодарность аспирантке школы фармакологии Сатвиндер Хайра за образцы, предоставленные для исследования, Фонду биологических исследований Великобритании (BBSRC) за финансирование проекта исследования в рамках программы «Bioimaging Initiative» и Саратовскому государственному университету за персональную финансовую поддержку одного из авторов.

1. Magde D., Elson E., Webb W.W. *Phys. Rev. Lett.*, **29**, 705 (1972).
2. Elson E.L., Magde D. *Biopolymers*, **13**, 1 (1974).
3. Provencher S.W. *Comput. Phys. Commun.*, **27**, 229 (1982).
4. Rigler R., Mets U., Widengren J., Kask P. *Eur. Biophys. J.*, **22**, 169 (1993).
5. Gennerich A., Schild D. *Biophysical J.*, **79**, 3294 (2000).
6. Pramanik A., Thyberg P., Rigler R. *Chem. Phys. Lipids*, **104**, 35 (2000).
7. Marquardt D.W. *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, **11**, 431 (1963).
8. Meseth U., Wohland T., Rigler R., Vogel H. *Biophysical J.*, **76**, 1619 (1999).
9. Mui B., Ahkong Q.F., Chow L., Hope M.J. *Biochim. Biophys. Acta*, **1467**, 281 (2000).
10. Gennerich A., Schild D. *Biophysical J.*, **79**, 3294 (2000).
11. Yoshida N., Kinjo M., Tamura M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **280**, 312 (2001).
12. Meidan V.M., Cohen J.S. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1464**, 251 (2000).
13. Wachsmuth M., Waldeck W., Langowski J. *J. Mol. Biol.*, **298**, 677 (2000).