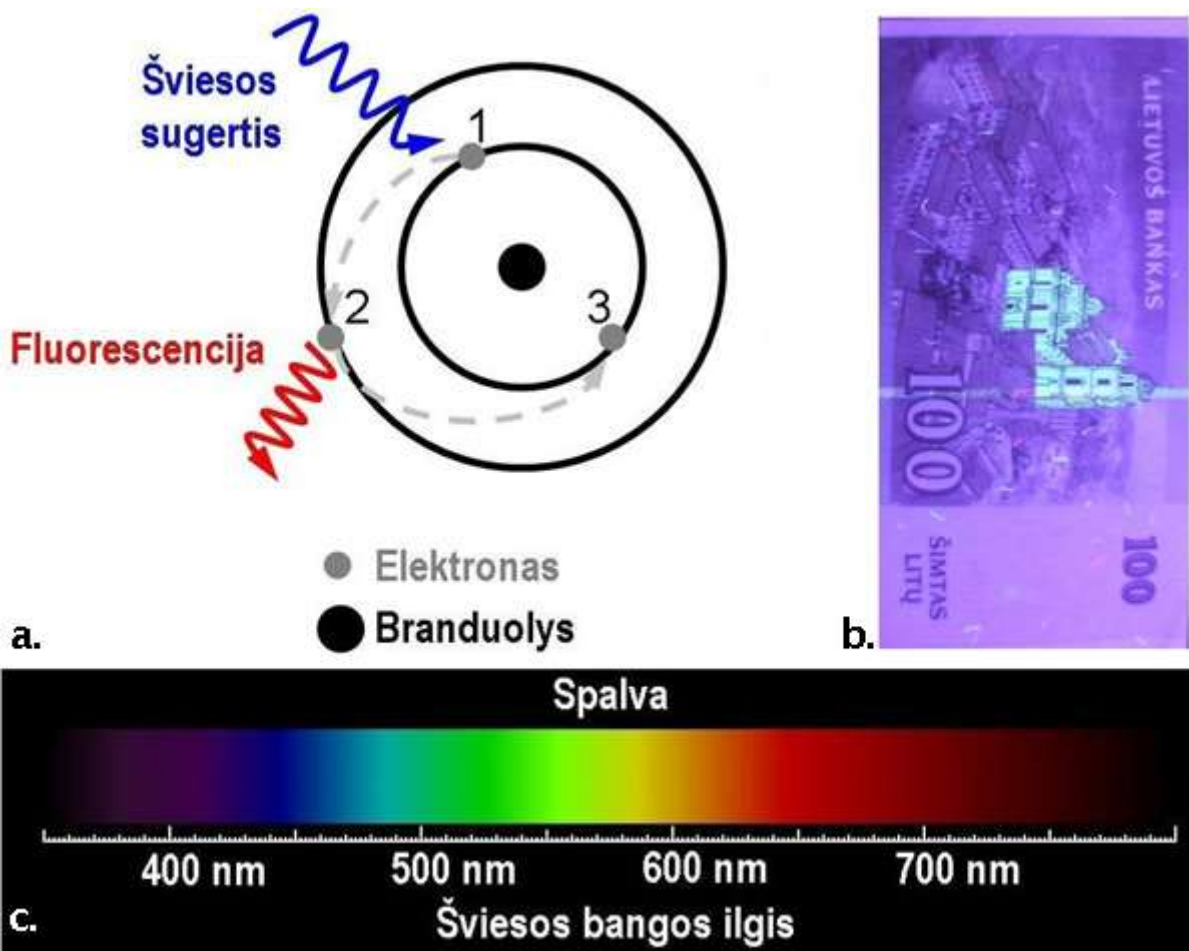


# Kas yra fluorescencija?

Vytautas Kulvietis

Šviesa – visiems įprastas dalykas, tačiau retai susimąstome, iš kur ji atsiranda. Tam, kad kūną sudarančios molekulės sugebėtų išskirti šviesą, jos turi iš kur nors gauti energijos. Pavyzdžiui, visi žinome, kad įkaitę kūnai švyti. Visgi šį kartą kalbėsime apie kitą spinduliavimo rūšį, vadinamą liuminescencija, kuri kyla dėl medžiagos molekulių nešiluminio sužadavimo. Pavyzdžiui, chemiluminescenciją sukelia cheminių reakcijų metu išsiskirianti energija, bioluminescencija (pvz., jonvabalių švytėjimas) vyksta biologiniuose objektuose dėl biocheminių reakcijų. Elektroluminescenciją sukelia elektros srovė, kristalų liuminescenciją – mechaninė kristalų deformacija.

Biomedicinoje plačiai taikoma fluorescencija. Ją skleidžia medžiagos, sužadintos elektromagnetinės spinduliuotės. Trumpai aptarkime, kaip tai vyksta (1 pav.). Kiekvienas atomas sudarytas iš branduolio ir aplink jį skriejančių elektronų. Apšvietus tokį atomą, elektronas sugeria šviesos kvantą ir iš pagrindinės būsenos (paveiksle pažymėta „1“) pereina į sužadintąją būseną (pažymėta „2“). Tokia būseną nėra stabili ir elektronas praranda perteklinę energiją. Dalis jos virsta šiluma, o kita dalis yra išspinduliuojama naujo šviesos kvanto pavidalu ir elektronas grįžta į pagrindinę būseną. Elektronai dalį energijos „iššvaisto“ šiluminiams virpesiams, todėl išspinduliuojamas kvantas visada yra mažesnės energijos negu sugertasis. Ši energijos pokytį galime stebėti kaip skirtingos spalvos šviesą. Kiekybiškai jį išreiškia elektromagnetinės bangos ilgio pokytis, nes šviesos kvanto energija atvirkščiai proporcinga jo bangos ilgiui,  $E = hc/\lambda$  ( $h$  – Planko konstanta,  $c$  – šviesos greitis,  $\lambda$  – šviesos bangos ilgis). Pavyzdžiui, mėlynos šviesos (bangos ilgis ~400 nm) kvanto energija yra didesnė negu raudonos (~600 nm). Dažnas matė, kaip švyti ultravioletine lempa apšviesti tikrinami pinigų banknotai: apšvietus sukeliama specialių į banknotą įterptų dažų fluorescencija.



Taigi fluorescenciją sukelti gana paprasta. Tereikia turėti šviesos šaltinį: UV lempą, mėlyną šviesą skleidžiantį šviesos diodą. Patyrinėkite savo aplinką: ar fluorescuoja dantų plomba, nešvari ranka, palyginti su švaria, randai, maisto trupiniai ant stalo, drabužiai, flomasteriai ir kitokie daiktai. Įsidėmėkite, kad ultravioletinė spinduliuotė žalinga mūsų akims, todėl venkite ilgiau žiūrėti tiesiogiai į šviesą arba dėvėkite apsauginius akinius.

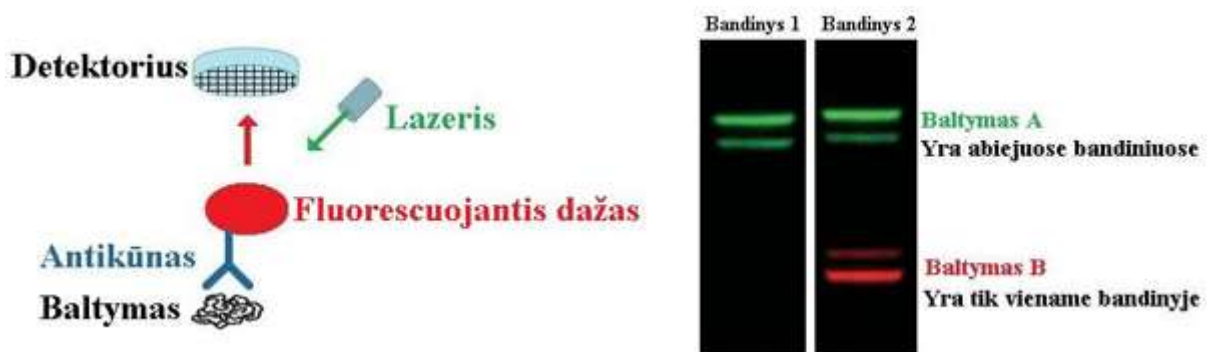
## Fluorescencijos taikymas medicinoje

Kam naktį švyti jonvabalai? Biologų nuomone, taip patelės vilioja patinėlius. Ar negalėtų švytėti pažeistas audinys? Tam, kad priviliotų gydytoją 😊. Šiame straipsnyje aptarsime fluorescencijos taikymą moksliniuose tyrimuose ir naudą medicinai. Paminėsime tokių taikymo pavyzdžių skirtingo lygio biologiniams objektams, t. y. molekulėms, ląstelėms, audiniams ir visam organizmui, vaizdinti.

## Surask baltymą – surasi ligą

Kodėl mums gali prireikti vaizdinti molekules? Pasirodo, pakitęs tam tikrų molekulių kiekis ar jų atsiradimas organizme gali suteikti informacijos apie audinių sutrikimus ir ligos pradžią. Žinoma, jog ląstelės vienos kitoms siunčia signalus, t. y. biomolekules. Vienas tokių signalų yra kraujagyslių augimo veiksnys VEGF (angl. *vascular endothelial growth factor*). Šį signalą priima ląstelės, kurios savo išorėje turi VEGF receptorius. Gavusiose šį signalą ląstelėse prasideda pokyčiai, skatinantys kraujagyslių sienelių ląsteles dalytis ir augti. Taip organizme susidaro nauji kraujo indai embriono vystymosi metu arba po sužeidimo. Tačiau pastebėta, kad navikinės ląstelės turi daugiau šio signalinio VEGF baltymo receptorių ir todėl navikas sugeba greitai ir efektyviai išvystyti naują kraujagyslių tinklą, teikiantį jam maisto medžiagas ir padedantį plisti organizme (metastazuoti). Taigi šiuo atveju padidėjęs VEGF receptoriaus kiekis ląstelėse gali būti vėžinių procesų indikatorius [2].

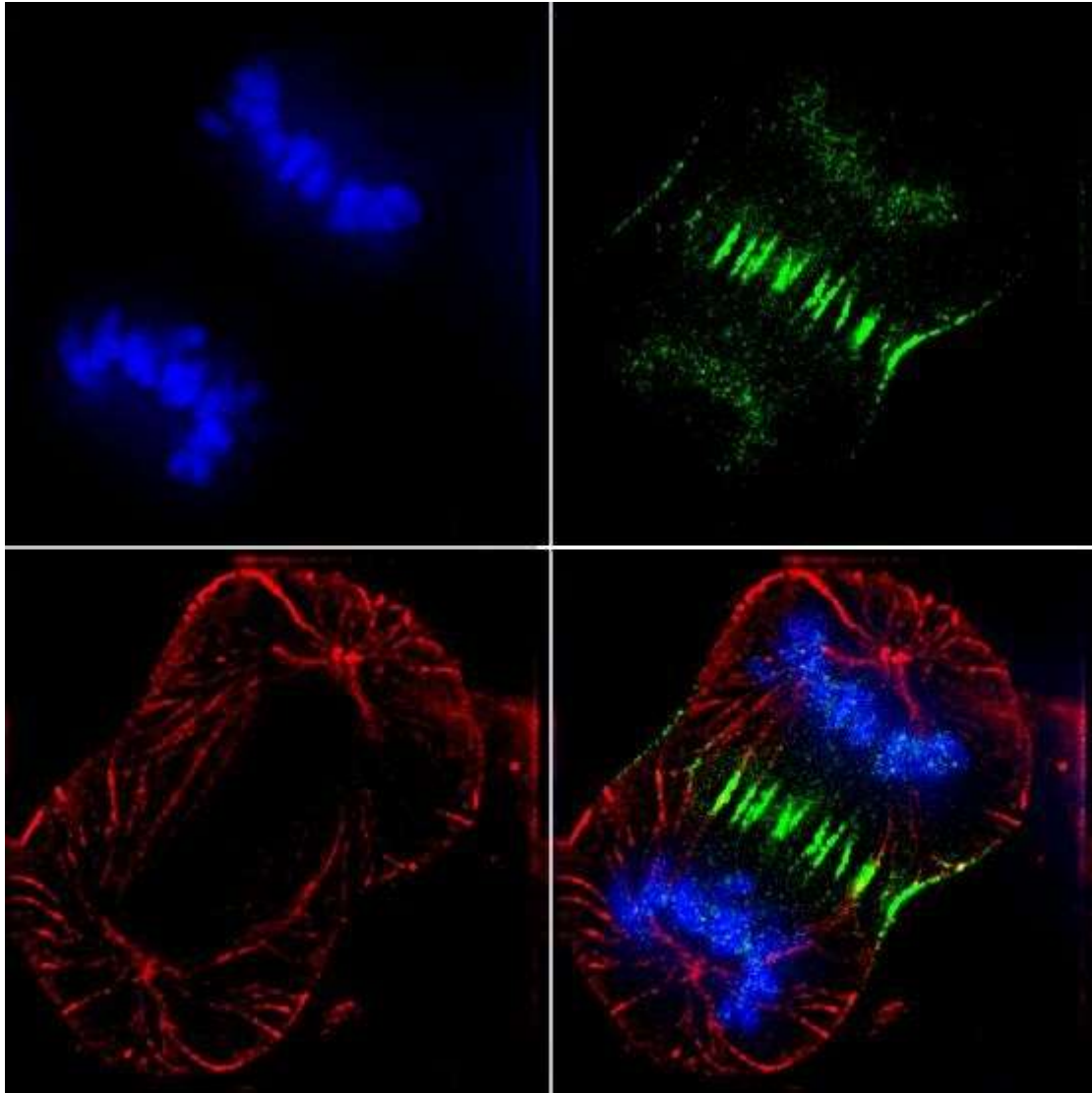
Būtent todėl svarbūs metodai, leidžiantys aptikti specifinius baltymus ar kitas biomolekules, kad laiku nustatytume ligą. Biochemijos mokslas siūlo daug būdų ieškomai molekulei aptikti. Vienas jų yra elektroforezė: iš ląstelės išskirtas baltymų mišinys išskleidžiamas elektriniame lauke ir baltymai „išrikiuojami“ pagal dydį (2 pav.). Žinodami ieškomo baltymo struktūrą galime parinkti jam giminingą antikūną – kitą polipeptidą, kuris atpažintų tiriamąjį baltymą ir prisijungtų tik prie jo. Jei antikūnas turės fluorescencinį žymiklį, tai apšvietus jį atitinkama spinduliuote lengvai galėsime pasakyti, ar mūsų bandinyje yra tiriamojo baltymo, ir netgi nustatyti jo kiekį. Panašiu principu aptinkamos ir specifinės DNR sekos (genai) bandinyje [3].



2 pav. Baltymų fluorescencinio aptikimo principai. Specifinis antikūnas (prie kurio prijungta dažiklio molekulė) atpažįsta tiriamąjį baltymą ir prie jo prisijungia. Apšvietus antikūno dažiklį atitinkama spinduliuote, sukeliama jo fluorescencija, kuri užregistruojama detektoriumi (pvz., CCD kamera). Dešinėje pateikti baltymų elektroforezės rezultatai, rodantys baltymo B atsiradimą „2 bandinyje“.

## Ką gali pasakyti švytinčios ląstelės?

Kita labai svarbi ir populiari fluorescencijos taikymo sritis yra mikroskopija. Šiuo metodu galima tirti biologines sistemas ląstelės lygmeniu. Fluorescencinėje mikroskopijoje naudojami specialūs dažikliai, kuriais pažymimos tam tikros ląstelės dalys (3 pav.). Ką galime pasakyti apie ląstelę žvelgdami pro mikroskopą? Visų pirma, galime nusakyti jos tipą, nustatyti, ar ji turi kokių nors pakitimų (pvz., padidėjusį dominančio baltymo kiekį), stebėti, kaip ji auga, dalijasi, kurie ląstelės elementai ir molekulės yra atsakingos už kiekvieną procesą [4].



3 pav. Nudažyta besidalijanti žmogaus navikinė ląstelė matoma fluorescenciniu mikroskopu. Skirtingais mikroskopo detektoriais stebima skirtingų dažiklių fluorescencija: mėlynai pažymėtas branduolys, žaliai – vidinis centromerų baltymas (INCENP, prie kurio prijungtas žaliai fluorescuojantis baltymas), raudonai – mikrovamzdeliai. Sudėjus gautus vaizdus gaunamas bendras daugiaspalvis ląstelės atvaizdas [5]. F. Lamiot nuotrauka

2008 metais Nobelio chemijos premija buvo suteikta už žaliai fluorescuojančio baltymo atradimą (angl. *green fluorescent protein*, GFP). Šis baltymas tapo populiarus, nes jį koduojantį geną galima įterpti į tiriamos ląstelės genomą genų inžinerijos metodais. Jei šį geną įterpsime ne bet kur, o šalia geno, koduojančio kitą mus dominantį baltymą (pvz., INCENP), tada ląstelei augant ir sintetinant baltymus iškart bus gaminamas šių baltymų (GFP ir INCENP) kompleksas. Fluorescenciniu mikroskopu stebint tokią ląstelę galima matyti, kur lokalizuojasi INCENP baltymas, prie kurio prisijungęs fluorescuojantis GFP baltymas (3 pav.). Naudojant skirtingomis spalvomis fluorescuojančius baltymus, galima pažymėti kelias tiriamąsias molekules ir tirti jų judėjimą, funkcijas bei tarpusavio sąveiką gyvoje ląstelėje.

Pavyzdžiui, fluorescencinės mikroskopijos metodu galima nustatyti, kokie baltymai yra atsakingi už navikinių ląstelių išaugų (invadopodijų) susidarymą. Šie navikinių ląstelių dariniai svarbūs, nes išskiria fermentus, kurie suardo aplinkinių sveikų ląstelių tarpląstelinį matriksą. Taip susilpninamas ląstelės

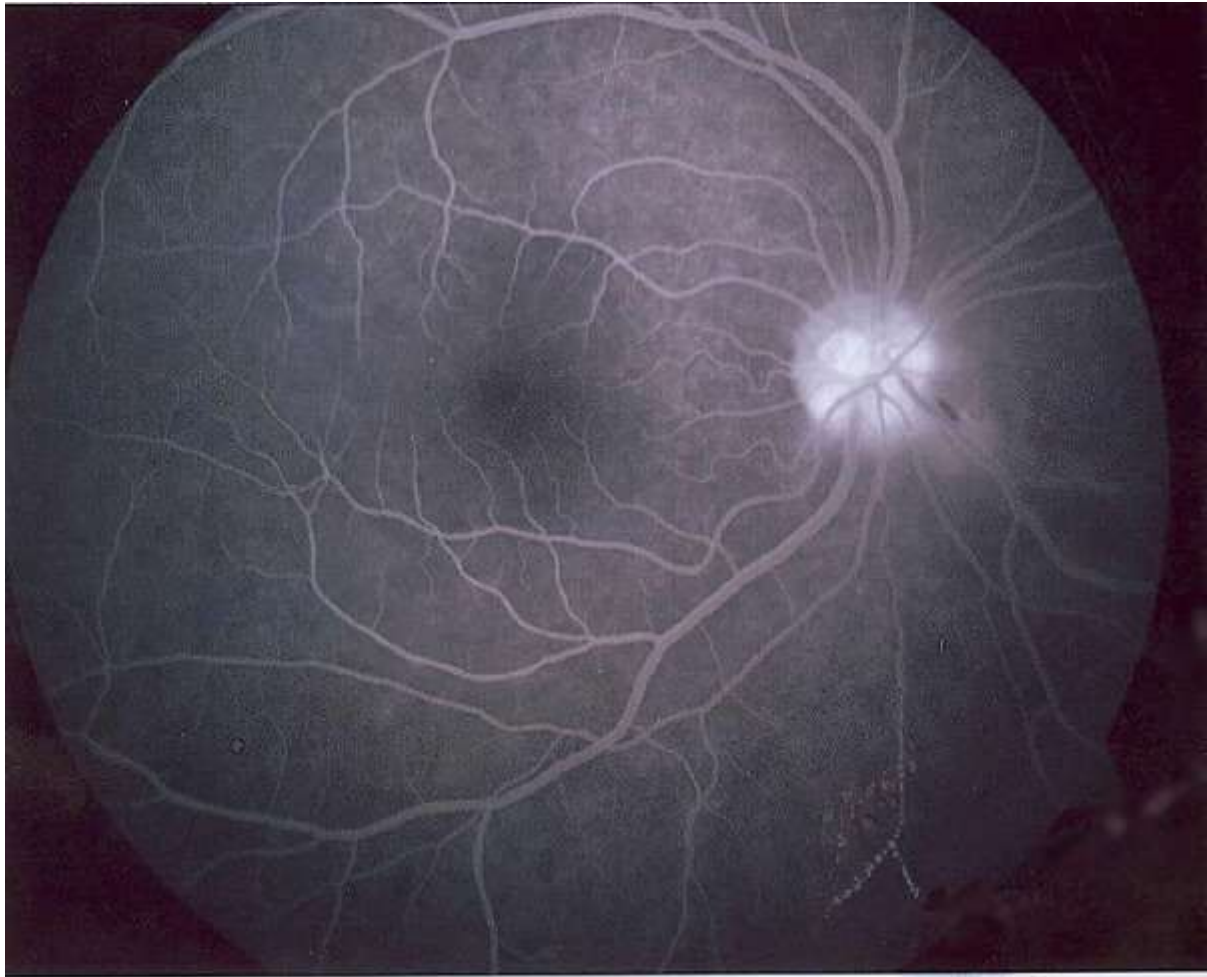
jungiantis tinklas ir navikinė ląstelė lengviau skverbiasi į sveiką audinį. Ji gali prasibrauti per kraujagyslių sieneles, patekti į kraujotakos sistemą ir plisti organizme. Taigi fluorescenciniu mikroskopu nustatę, kokie signaliniai baltymai yra atsakingi už invadavimą, galėtume sukurti vaistus, blokuojančius šį signalinį kelią ir sustabdančius tolimesnį naviko plitimą organizme [6].

Fluorescencine mikroskopija plačiai naudojasi ir Lietuvos mokslininkai. Tokią tyrimų įrangą turi Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultetas, Fizikos fakultetas, Onkologijos institutas, Biochemijos institutas ir kitos institucijos. VU Onkologijos institute tiriama specifinių nanodalelių įsisavinimas ir tolimesnis jų likimas ląstelėse, nes nanodarinių kaupimosi ląstelėse dėsniumai yra svarbi šiuolaikinio mokslo problema.

### **Fluorescencijos taikymas audinių vaizdinimui**

Kokią naudą galime išpešti iš fluorescencijos metodo gydant žmogų? Pasirodo, žmogaus audiniams būdinga tam tikra fluorescencija, kitaip tariant, apšviesti ultravioletine spinduliuote mes švytime. Fluorescuoja audiniuose esančios aminorūgštys, baltymai (kolagenas, elastinas), kofermentai (NADH, FAD), pigmentai (lipofuscinas), porfirinai ir kitos medžiagos. Pastebėta, jog sergant tam tikromis ligomis, šių medžiagų kiekis pakinta, todėl keičiasi ir audinio fluorescencijos intensyvumas bei spektras, kurį užregistravę galime nusakyti ligos pradžią. Pavyzdžiui, ląstelėse skylant gliukozei susidaro fluorescencinėmis savybėmis pasižymintis kofermentas NADH. Jis yra svarbus mitochondrijų elektronų pernašos grandinės dalyvis ir gali būti laikomas medžiagų apykaitos greičio indikatoriumi. Navikinėse ląstelėse mitochondrijų fermentai yra pakitę, jos auga ir maitinasi sparčiau nei sveikos, todėl navikinėse ląstelėse susidaro gerokai daugiau NADH ir toks navikinis audinys fluorescuoja stipriau už aplinkinį sveiką audinį. Derindami fluorescencinės mikroskopijos ir spektroskopijos metodus JAV mokslininkai jau gali atskirti net pavienes krūties ląsteles nuo krūties navikinių ląstelių [7]. „Šis metodas neapsiriboja tik naviko nustatymu. Galime aptikti ir kitas ligas (pvz., neurodegeneracines), susijusias su mitochondrijų anomalijomis. Mūsų metodu galima nustatyti tiriamo vaisto poveikį mitochondrijų fermentų aktyvumui, kuris atspindi energijos gamybą ląstelėje“, – žurnalui *Science Daily* pasakojo tyrimą atlikusios laboratorijos profesorius A. Heikalas (Heikal) [7].

Vis dėlto fluorescencinio vaizdinimo metu dažniau naudojami specialūs dažikliai. Suleidus tokių dažiklių molekulių galima gana efektyviai vaizdinti kraujagysles (fluorescencinė angiografija). Pavyzdžiui, operacijos metu gydytojui labai svarbu matyti širdies raumenį maitinančias vainikines arterijas, nes reikia aptikti ir sėkmingai pašalinti kraujagyslių defektus. Taip pat daug informacijos galima gauti iš akies kraujagyslių tinklo, nustatyti kraujagyslių užsikimšimo ar išsiplėtimo vietas (4 pav.).



4 pav. Fluorescencijos taikymo medicinoje pavyzdžiai. Kairėje: akies dugno kraujagyslių tinklas matomas pacientui suleidus fluorescencinio dažiklio [8]. L. Bacud nuotrauka

Fluorescuoja ne tik mūsų kūno dalys, bet ir jų svečiai, tiksliau – bakterijos. Jas taip pat galima aptikti fluorescenciniais metodais, pavyzdžiui, diagnozuojant dantų kariesą. Kompanija „Soprolife“ sukūrė specialų šviesos diodą odontologams, padedantį efektyviai, be skausmo ir gana paprastai aptikti ankstyvos stadijos dantų kariesą (žr. [Cosmetic Dentistry News](#) odontologijos naujienų žurnalas). Kariesas prasideda danties viduje ir įprastinės apžiūros metu pastebimas tik tada, kai išplinta ir pasiekia paviršių. O fluorescenciniu metodu galima aptikti audinio pokyčius, kuriuos sukelia karieso židinyje klestinčios bakterijos. Taigi šiuo metodu galima aptikti pažeidimą, kol jis dar glūdi gilesniuose sluoksniuose ir net ir patyręs odontologas jo nemato.

Tai tik keli fluorescencinių metodų taikymo biomedicininuose tyrimuose ir klinikinėje praktikoje pavyzdžiai. Svarbu tai, kad jie sparčiai vystosi tobulėjant lazerinėms technologijoms, kuriant vis pranašesnius detektorius ir vaizdų atpažinimo algoritmus. Galima tvirtinti, jog optinių metodų praktinis taikymas biomedicinoje tik užgimsta. Specialistai mano, kad dėl sąlyginai paprastos technologijos, kainos ir menko šalutinio poveikio organizmui fluorescenciniai metodai paplis diagnostikoje ir gydyme, galbūt net pakeis tradicinius jonizuojančiosios spinduliuotės metodus.

**Internete gausu interaktyviųjų programų, kurias galite išbandyti ir pavaldyti fluorescencinius reiškinius:**

- [Fluorescencinė mikroskopija](#)
- [Mikroskopas internete](#)
- [Fluorescencijos principai](#)



**Filmukai:**

1. [Širdies kraujagyslių vaizdinimas](#)
2. [Navikų fluorescencinis vaizdinimas](#)
3. [Paskaita apie fluorescenciją](#)
4. [Ląstelės dalijimasis 1](#)
5. [Ląstelės dalijimasis 2](#)
6. [Darbas fluorescenciniu mikroskopu](#)
7. [Natūralus žaliai fluorescuojantis baltymas](#)

**Straipsniai su iliustracijomis:**

1. [Fluorescencinis limfmazgių vaizdinimas operacijos metu](#)
2. [Fluorescencinė diagnostika \(lietuvių k.\)](#)
3. [Nanodariniai medicinai ir gydymui \(lietuvių k.\)](#)
4. [Dantų karieso \(ėduonies\) vaizdinimas](#)
5. [Fluorescencinių vaizdų galerijos](#)
6. [Apie žaliai fluorescuojantį baltymą \(GFP\)](#)
7. [Širdies kraujagyslių angiografija](#)

**Informacijos šaltiniai:**

1. [Wikipedia virtualioji enciklopedija](#)
2. [Genetech Biooncology kompanijos svetainė \(JAV\)](#)
3. [Thermo Scientific kompanijos svetainė \(JAV\)](#)
4. [Medintz I. L., Uyeda T., Goldman E. R., Mattoussi H. 2005, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. \*Nature Materials\*, 4, 435–446.](#)
5. [Wikipedia virtualioji enciklopedija](#)
6. [La Trobe universiteto svetainė \(Australija\)](#)
7. [Science Daily žurnalas](#)
8. [Wikipedia virtualioji enciklopedija](#)