



УДК 535.372:577.(352.33+336)

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЛИПИДНЫЕ ЗОНДЫ: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

© 1999 г. Юл. Г. Молотковский<sup>#</sup>*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 22.03.99 г. Принята к печати 25.03.99 г.

Рассмотрены флуоресцентные липидные зонды: характеристики флуорофоров, основные методы синтеза зондов, их возможности и области применения при исследовании биологических систем (клетки, мембраны и их модели, ферменты липидного метаболизма и др.). Особое внимание обращено на “липидную специфичность” зондов, т. е. соответствие их физико-химических свойств и поведения в биологических системах свойствам и поведению природных липидов.

*Ключевые слова:* флуоресцентные липидные зонды; характеристики; клетки; мембраны; модельные мембраны.

Применение флуоресцентных зондов (ФЗ) липидного характера при изучении мембран началось сравнительно недавно, сообщением Ньютона в 1954 г. [1]; серьезные исследования в этой области следует отнести к началу 70-х годов. С тех пор флуоресцентные зонды позволили получить большой объем информации о липидном метаболизме, структуре мембран и происходящих в них процессах. Широкое применение ФЗ обусловлено их высокой чувствительностью и доступностью метода – см., например, монографии Лаковича [2] и Добрецова [3], обзор Игерабайда и Фостера [4]. Возможности флуоресцентного зондирования расширились после распространения поточной цитофлуорометрии [5, 6] и конфокальной флуоресцентной микроскопии [7], что сделало более доступным изучение метаболизма липидов, путей их движения в клетках и тканях [8, 9]. Применяя лазерное возбуждение и компьютерную обработку данных, можно следить за поведением зонда внутри единичной живой клетки и регистрировать параметры его флуоресценции в малых объемах. Однако этот метод уже трудно назвать доступным.

Другая значительная сфера применения липидных ФЗ – изучение биохимии липидов, прежде всего ферментов липидного метаболизма; флуоресцентномеченые субстраты обеспечивают здесь

высокую чувствительность метода, сравнимую с чувствительностью радиоактивно меченых, и возможность во многих случаях применять непрерывное слежение за системой – см. обзор [10].

Первые мембранные ФЗ имели мало общего с компонентами биомембран – использовались подходящие по спектральным характеристикам липофильные соединения. Некоторые из них, например 1,6-дифенилгексатриен или перилен, имеют применение и сейчас; сведения о такого рода ФЗ можно найти в обзорах [4, 11, 12]. Со временем обнаружилось недостаток нелипидных ФЗ, прежде всего неодинаковое по сравнению с природными липидами поведение в изучаемом объекте, например неопределенность их положения в мембране и, как следствие, неадекватность изменения параметров флуоресценции изменению состояния мембраны – см., например, [13]. Теперь хорошо известна гетерогенная (доменная) структура биологических мембран, необходимая для их функционирования [14, 15], применение здесь нелипидных ФЗ малопродуктивно. Кроме того, многие нелипидные ФЗ могут искажать структуру мембран [16] и вмешиваться в их функции.

Поэтому с 70-х годов началось конструирование ФЗ более близких по своему строению природным соединениям. Главный подход при этом – введение флуорофоров в молекулы природных липидов. Если неполярный флуорофор присоединен к гидрофобной цепи липида, то в мембране флуорофор погружен в глубину слоя, где в наименьшей степени влияет на функции молекулы липида, которые в первую очередь обусловлены строением полярной головки. Такие ФЗ имеют наибольшее подобие исходным природным липидам. Л.Д. Бергельсон предложил называть эти

Сокращения: биманил – 3,6,7-триметил-4-метил-1,5-диабензобисцикло[3,3,0]окта-3,6-диен-2,8-дион; дансил – 5-диметиламинонафталин-1-сульфонил; люцифер желтый – 4-амино-3,6-дисульфо-1,8-нафталимидил; РПЭ – резонансный перенос энергии возбуждения; ФЗ – флуоресцентный зонд; AV – 9-антрилвинил; BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диазо-5-индаценил; DPH – [6-фенил-(1E,3E,5E)гексатриенилфенил]; NBD – 7-нитробенз-2,1,3-оксадиазол-4-ил.

<sup>#</sup> Факс (095) 330-66-01; e-mail: jgmol@ibch.siobc.ras.ru.

зонды липидспецифическими [17]. Следует отметить, что степень “липидной специфичности”, т.е. соответствия поведения липидного ФЗ поведению исходного природного липида должна быть предметом рассмотрения в каждом конкретном случае – например для ганглиозидов, которые обладают объемистой, далеко распространяющейся в водную фазу полярной головкой, введение в нее полярного флуорофора, как полагают, не изменяет существенно физических свойств и функций этих гликолипидов [18]. В то же время во многих исследованиях, например при изучении процессов мембранной агрегации и слияния, соответствие применяемого ФЗ какому-либо природному мембранному компоненту не требуется.

Цель настоящего обзора – дать краткое сравнительное описание флуоресцентных липидных зондов, прежде всего липидспецифических, – методов получения, свойств и области применения. Охватить всю информацию по данному вопросу в небольшом объеме невозможно, поэтому ссылки даны только на наиболее важные для понимания предмета работы, прежде всего обзоры. Хорошим источником данных по применению ФЗ является составленный Хоглендом каталог-справочник фирмы Molecular Probes (США), в 5-м издании которого [19] можно найти почти всю библиографию по вопросу включая 1992 г.

### ФЛУОРОФОРЫ\*, СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Общие требования к флуорофору – удобные длины волн возбуждения ( $\lambda_{ex}$ ), которые обычно совпадают с одним из максимумов поглощения ( $\lambda_{max}$ ) и испускания ( $\lambda_{em}$ ), высокий квантовый выход ( $\Phi$ ) и чувствительность (параметр, характеризующий эмиссионную способность флуорофора и пропорциональный его поглощению на длине волны возбуждения и квантовому выходу), короткое время жизни возбужденного состояния ( $\tau$ ), что позволяет эффективно применять регистрацию анизотропии флуоресценции, минимальный размер, высокая фото- и химическая устойчивость, доступность; часто требуется также неполярность. Оптика большинства приборов имеет ограниченные возможности в УФ-диапазоне, а многие компоненты биологических систем флуоресцируют в коротковолновой области (белки, флавиновые нуклеотиды, кинуренин и др. – см. обзор [20]), поэтому желательно, чтобы длина волны возбуждения зонда была не менее 360 нм, а длина волны испускания – в области ~500 нм, где человеческий глаз имеет наибольшую чувствитель-

ность. Однако выбор в каждом случае индивидуален: например, применение метода резонансного переноса энергии возбуждения (РПЭ) (см. обзоры [6, 21]) требует согласования для донорно-акцепторной пары  $\lambda_{em}$  донора и  $\lambda_{ex}$  акцептора. Для зондов, применяемых при сортировке клеток и конфокальной флуоресцентной микроскопии, желательны узкие диапазоны поглощения (поскольку возбуждение лазерное) и испускания (чтобы увеличить чувствительность при цветоделинии испускания). Если флуорофор имеет незначительную чувствительность к полярности среды, это облегчает интерпретацию данных РПЭ и анизотропии флуоресценции; в то же время зависимость параметров спектра испускания флуорофора от полярности окружения дают дополнительную информацию об изучаемой системе, например уровне гидратации мембраны (о взаимодействии флуорофора и среды см. [22]).

В обзоре, как правило, не рассматриваются синтезы флуорофоров; для введения же последних в молекулы зондов к настоящему времени решительно возобладали методы модифицирования природных липидов. При синтезе производных глицеро- и сфинголипидов (нейтральных, глико- и фосфолипидов) природное вещество дезацилируют, а освободившуюся гидроксильную или аминную группу реагируют флуоресцентно меченой кислотой. Так, природный фосфатидилхолин (обычно яичный) дезацилируют по *sn*-2-положению фосфолипидной А<sub>2</sub>, а образовавшийся лизофосфатидилхолин реагируют меченой кислотой [23] (схема А). Из меченого фосфатидилхолина реакцией трансфосфатидилирования, катализируемой фосфолипидом D, можно получить большинство других глицерофосфолипидов: фосфатидовую кислоту, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилсерин [23, 24] и даже фосфатидилинозит [25]. Производные сфингомиелина и простых сфинголипидов получают аналогичным образом – щелочным дезацилированием природного вещества и последующим реагированием лизо соединения, обычно с помощью *N*-гидроксисукцинимидного эфира меченой кислоты [26, 27].

Более трудная задача – синтез флуоресцентно меченых по ацильному остатку ганглиозидов, поскольку при дезацилировании природных ганглиозидов кроме жирнокислотного отщепляется также *N*-ацетильная (гликолильная) группа сиалового остатка. Акуоти и др. [28] нашли условия преимущественного ацилирования сфингозиновой NH<sub>2</sub>-группы, что открыло удобный путь получения флуоресцентно меченых ганглиозидов (схема Б). Более сложный путь, с промежуточной защитой сфингозиновой аминной группы предложили Шварцман и Зандхоф [29].

Пример полного синтеза ФЗ – получение триглицерида, содержащего остатки пиренилмеченой

\*При характеристике флуорофоров максимумы поглощения указаны только для длинноволновых областей; величины времен жизни возбужденного состояния и квантовые выходы – для условий без деаэрации.

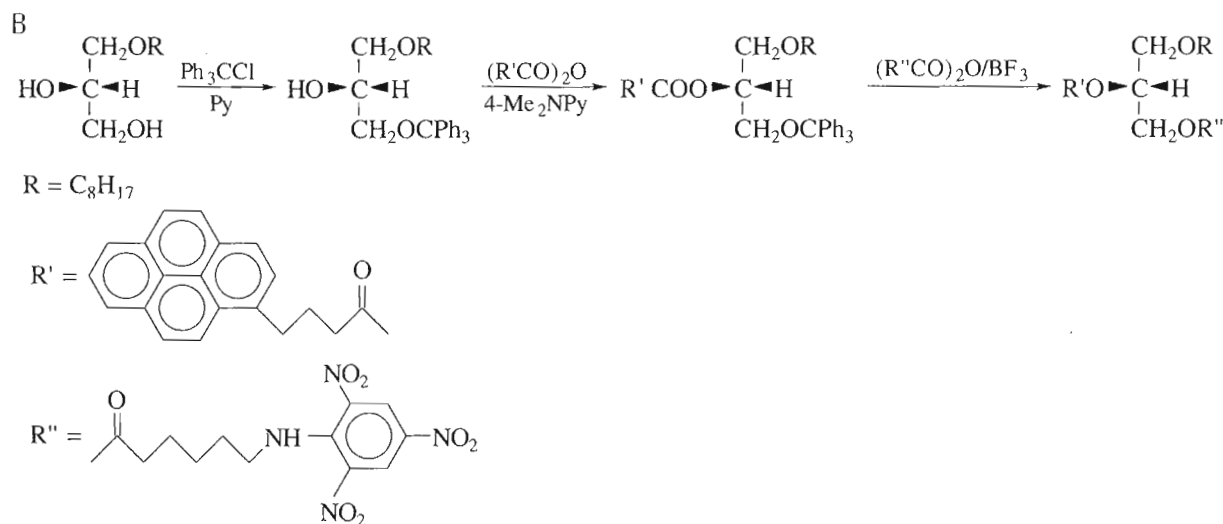
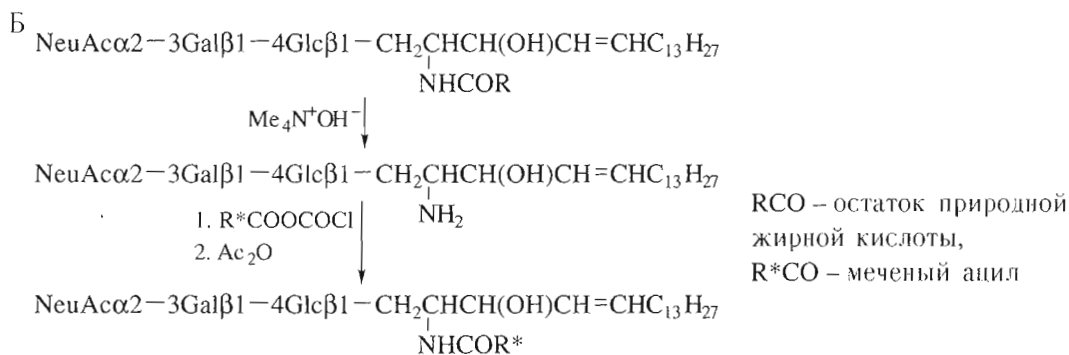
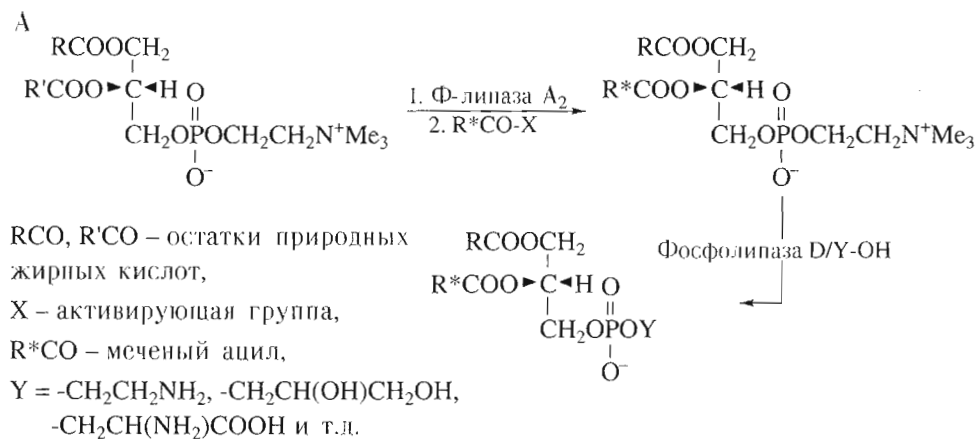


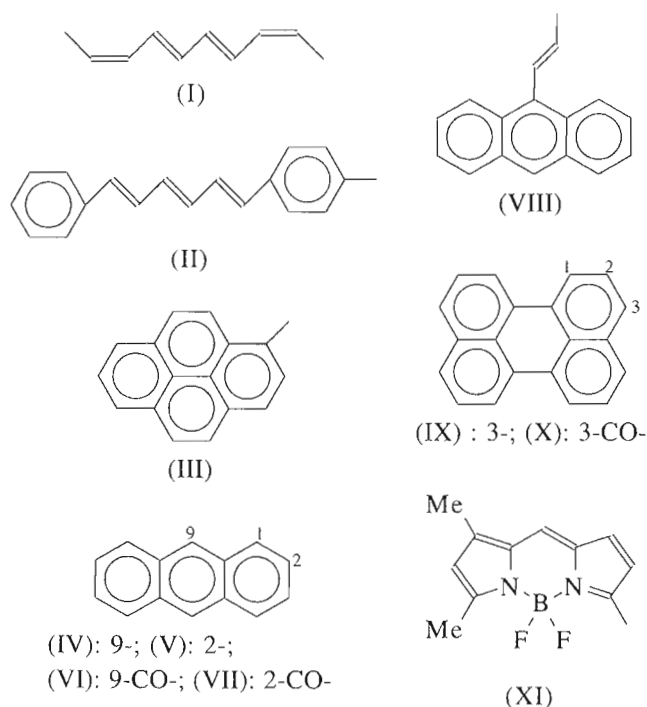
Схема. Синтезы флуоресцентных липидных зондов.

и тринитрофенилмеченой (тушитель флуоресценции) кислот (схема В) и предназначенного для непрерывного определения активности липазы [30].

В отдельных случаях целесообразно введение флуорофора в полярную головку амфифильного липида, например для изучения процессов в полярной области мембраны; такие зонды будут рассмотрены ниже. Следует иметь в виду, что, на-

ходясь в полярной головке, флуорофор (а это всегда довольно объемистая, а часто и заряженная группа) заметно нарушает ее свойства, в мембране же такой зонд искажает ее упаковку в большей степени, чем зонд с флуорофором в гидрофобной области молекулы.

Еще один, биосинтетический способ получения липидных ФЗ состоит во включении в мета-



близость используемой системы (культура дрожжей, клеток млекопитающих и др.) предшественника ФЗ (обычно меченая жирная кислота) и последующем выделении флуоресцентномеченых липидов из биоматериала [31, 32]. Метод представляется привлекательным, особенно для получения ФЗ сложного строения, однако широкого применения он не получил, видимо, из-за трудоемкости и малых выходов целевых веществ.

### ФЗ С НЕПОЛЯРНЫМИ ФЛУОРОФОРАМИ

В разделе рассматриваются флуорофоры, природа которых обуславливает их локализацию в гидрофобной зоне мембран и аналогичных систем.

(1Z,3E,5E,7Z)-Октатетраеновый флуорофор (I) входит в состав природной  $\alpha$ -паринаровой кислоты; ее изомеризацией получают *полностью-транс*  $\beta$ -паринаровую кислоту. Обе имеют близкие спектральные свойства:  $\lambda_{\max} \sim 300, 313\text{--}318$  ( $\epsilon \sim 80000$ ) нм,  $\lambda_{\text{em}} 413\text{--}418$  нм (в метаноле),  $\tau \sim 30$  нс,  $\Phi \sim 0.3$  (в липосомах) [33, 34]. Впервые паринаровые кислоты и липиды, их содержащие, были применены Склейром и сотр. [33]; известны многочисленные синтезы паринароилмеченых липидов: фосфо- [23, 33] и гликолипидов [35], ганглиозида GM1 [36] и др. В мембране паринароильный остаток располагается параллельно гидрофобным цепям, т.е. перпендикулярно поверхности бислоя. Преимущества таких зондов – высокая чувствительность и близкое подобие соответствующим природным липидам, вследствие чего они очень

мало нарушают структуру мембраны; более подробно об этих зондах см. обзоры [11, 34]. Однако чрезвычайная неустойчивость паринароильных зондов (сопряженная тетраеновая система легко окисляется) сильно ограничивает их применение. Известны также [37] хорошие спектральные характеристики *полностью-транс*-8,10,12,14,16-октапентаеновой кислоты и ее (8Z)-изомера (получены синтезом):  $\lambda_{\max} 344\text{--}348$  ( $\epsilon \sim 100000$ ) нм,  $\lambda_{\text{em}} 480\text{--}520$  нм,  $\Phi \sim 0.15$  (в этаноле); данных о применении этих зондов пока нет.

4-[6-Фенил-(1E,3E,5E)гексатриенил]фенильный (DPH) флуорофор (II). Исходный дифенилгексатриен, в качестве ФЗ предложенный Шиницким и Баренхольцем [38], широко применяется в мембранных исследованиях и ныне (см. обзоры [11, 39, 40]), что обусловлено его хорошими спектральными качествами:  $\lambda_{\max} 334, 351$  ( $\epsilon \sim 80000$ ), 370 нм,  $\lambda_{\text{em}} 453$  нм (в гексане),  $\tau \sim 8$  с (в липосомах),  $\Phi \sim 0.8$  (в циклогексане) [40, 41]. Кроме того, анизотропия зонда, стационарная и с временным разрешением, благодаря форме молекулы (жесткий стержень) весьма чувствительна к физическому состоянию окружения. В мембране дифенилгексатриен располагается всегда в гидрофобной зоне, главным образом параллельно цепям, однако часть молекул зонда может находиться между листками бислоя параллельно поверхности, что затрудняет интерпретацию данных. Был получен ряд полярных производных дифенилгексатриена: соль 3-DPH-пропилтриметиламмония, 3-DPH-пропионовая кислота и содержащие ее фосфолипиды [42, 43]. Их спектральные характеристики близки таковым дифенилгексатриена. У этих производных флуорофор локализован только перпендикулярно поверхности бислоя [44]. Фотоустойчивость DPH-зондов невысока [11], что в ряде случаев препятствует их применению [45]. Положение максимумов испускания (их три) не зависит от параметров среды, но соотношение интенсивностей пиков и квантовый выход зависят от среды сложным образом [41]. Время жизни возбужденного состояния флуорофора зависит от полярности окружения, что позволяет с помощью DPH-меченых липидов определять степень гидратации бислоя в зоне ацильных цепей, а из данных по времязрешенной анизотропии тех же зондов – упорядоченность цепей [46]. Благодаря эффективному перекрытию спектров испускания остатков триптофана и тирозина и со спектрами возбуждения DPH-зондов, эти зонды могут применяться в качестве акцепторов белковой флуоресценции при изучении липид-белковых взаимодействий методом РПЭ [47], однако они же могут быть донорами в парах с другими флуорофорами, например флуоресцеиновым [48], у которых спектры возбуждения перекрываются с испусканием DPH.

1-Пиренильный флуорофор (III). Пирен и его производные довольно давно нашли применение в качестве мембранных зондов [49, 50]. Будучи неполярным, пиренильный остаток располагается в гидрофобной области бислоя [51]. Спектральные характеристики пирена и его производных близки между собой:  $\lambda_{\max}$  310, 327, 340–343 (ε 3–8 × 10<sup>4</sup>) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  378, 400, 420 нм (в метаноле),  $\tau > 100$  нс,  $\Phi \sim 0.6$  [19]. Пиренильный флуорофор отличается большим временем возбужденного состояния (потому регистрация его анизотропии дает мало информации) и способностью образовывать эксимеры (возбужденные димеры) с  $\lambda_{\text{исп}}$  470–490 нм и заметным квантовым выходом [49, 52]. Степень эксимеризации зависит от концентрации флуорофора и коэффициента диффузии в системе, на чем основано применение пиренильных зондов для определения микровязкости мембран [53, 54] и параметров диффузии в них [50]. Однако здесь нужна осторожность – есть данные, что эксимеризация флуорофора не зависит прямо от диффузии [55]. От полярности среды положение пиренильных максимумов испускания не зависит, но зависит соотношение их интенсивностей, что предлагают использовать при изучении профилей полярности в биологических системах [56].

Пиренильный флуорофор – хороший акцептор энергии возбуждения остатков триптофана [57]. Пиренилмеченые липиды получили довольно широкое применение; синтезирован ряд липидов, содержащих пиренилмеченые кислоты, – нейтральных [30], фосфолипидов [24, 58–60], ганглиозидов [29] и др. Оригинальный одностадийный синтез пиренилмеченых (и антримеченых – см. ниже) глицерофосфолипидов предложили Швец и сотр. [61, 62]: природный фосфолипид обрабатывают пиреном в условиях реакции Фриделя–Крафтса. Флуорофор (в этом случае 4-пиренил) присоединяется по двойным связям в соответствии с их распределением в молекуле, т.е. главным образом в *sn*-2-ацильные цепи. Интересен фосфатидилхолин, содержащий два остатка 10-(3-пиренил)декановой кислоты: он образует внутримолекулярный эксимер, причем степень эксимеризации зависит от состояния окружения зонда, но не от его концентрации [63]. Зонды с пиренильным остатком в полярной головке, например *N*-(3-пиренилсульфо)фосфатидилэтанолламин [64], заметного применения не получили.

9-Антримильный флуорофор (IV). Штоффель и Михаэлис получили (путем довольно сложного синтеза) ряд ω-антримильных жирных кислот и содержащих их нейтральных и фосфолипидов [65]. Флуорофор обладает невысокой чувствительностью ( $\lambda_{\max}$  335, 350, 370 (ε 6–9 × 10<sup>3</sup>) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  395, 416, 442 нм (в метаноле),  $\tau$  3.5–5.2 нс,  $\Phi \sim 0.3$ ) и хорошей устойчивостью; находясь на конце жирнокислотной цепи, гидрофобный 9-антримильный

флуорофор локализован в глубине бислоя и мало нарушает ее упаковку [65]. Известен целый набор 9-антримильных липидов – нейтральных [19] и фосфолипидов [66–68]. Зонды были применены при изучении биосинтеза липидов [69], для исследования процессов РПЭ в модельных системах [70].

2-Антримильный флуорофор (V) по своим свойствам близок 9-изомеру ( $\lambda_{\max}$  342, 358 (ε ~ 4000), 378 (ε 3.4–3.9 × 10<sup>3</sup>) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  385, 408, 430 нм (в этаноле),  $\tau$  2.3 нс,  $\Phi \sim 0.2$  [3, 71]). 2-Метилантрацен в качестве мембранного зонда предложили Шиницкий и др. [72]; 2-антримиль как метку для липидных ФЗ применили Швец и сотр. [71]. Интересная особенность 2-антримильного хромофора – способность димеризоваться при интенсивном облучении с  $\lambda$  360 нм; обратная диссоциация происходит при фотолизе с  $\lambda$  260 нм. Этот феномен предложено применять для изучения диффузионных процессов в мембране [73]. В бислое флуорофор локализован в гидрофобной области на максимальной глубине, которую допускает цепь, к которой он присоединен [74]. Описаны синтезы ряда 2-антримильных жирных кислот и фосфолипидов [25, 71, 75]. Также антримильные глицерофосфолипиды получали, подобно пиренилмеченым (см. выше), путем алкилирования природных веществ антраценом по Фриделю–Крафтсу [61, 62]. Следует заметить однако, что при этом получается сложная смесь 1-, 2- и 9-антримильных производных по соседним С-атомам, где первоначально находилась двойная связь.

9-Антроильный флуорофор (VI):  $\lambda_{\max}$  330, 350 (ε 7.3–7.9 × 10<sup>3</sup>), 380 нм,  $\lambda_{\text{em}}$  ~ 445 нм (в метаноле),  $\tau$  9–10 нс (в липосомах) [12, 19],  $\Phi \sim 0.4$  [76]. Самые распространенные зонды с этим флуорофором – (9-антроилокси)производные жирных кислот – пальмитиновой, олеиновой и др.; получены целые наборы зондов, с различным расстоянием от флуорофора до карбоксильной группы [12, 19]. Описаны фосфо- [77] и гликолипиды [78] с остатками (9-антроилокси)жирных кислот; были также получены 11-(9-антроил)аминоундекановая кислота и фосфатидилхолин, ее содержащий, однако квантовый выход *N*-антроильной группировки оказался невысоким [79]. Флуорофор этих зондов в бислое находится на той глубине, где располагается соответствующий С-атом немодифицированной жирной кислоты [51, 80], а положение  $\lambda_{\text{em}}$  9-антроилоксигруппы зависит от полярности окружения [81]. Благодаря этим качествам 9-антроильные зонды неоднократно применялись при изучении структуры модельных мембран [12, 82].

2-Антроильный флуорофор (VII):  $\lambda_{\max}$  345, 362 (ε 2400), 386 (ε 2300), 404 (ε 2200) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  ~ 476 нм (в этаноле) [83],  $\tau$  10 нс (в липосомах),  $\Phi \sim 0.5$  [3]. Флуорофор обладает невысокой чувствительностью, положение максимума испускания зависит

от полярности окружения [71]. В бислое флуорофор  $\omega$ -(2-антроил)жирных кислот погружен на максимально возможную глубину в случае длинной ацильной цепи (10  $\text{CH}_2$ -групп) или расположен вблизи поверхности (2 или 5  $\text{CH}_2$ -групп) [74]. Синтезированы фосфо- [25, 83, 84] и гликолипиды [85] с остатками  $\omega$ -(2-антроил)жирных кислот.

**9-Антривинильный (AV) флуорофор (VIII).** 9-Винилантрацен был одним из первых мембранных зондов [72]; позднее в нашей лаборатории были синтезированы AV-меченые липиды [79], их спектральные свойства близки между собой:  $\lambda_{\text{max}}$  350, 368 ( $\epsilon$  7900), 386 ( $\epsilon$  7100) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  420 нм (в этаноле), 412, 430 нм (в липосомах),  $\tau$  7 нс,  $\Phi \sim 0.6$  (в этаноле) [17, 86]. Будучи неполярной, в мембране AV-группа располагается в гидрофобной области бислоя и поэтому мало нарушает структуру системы; она отличается высокой химической и фотоустойчивостью; положение и интенсивность  $\lambda_{\text{em}}$  флуорофора не зависят от полярности окружения [17, 87]. Значительное перекрытие спектров, возбуждения AV-группы и испускания белков, позволяет изучать липид-белковые взаимодействия с помощью AV-зондов методом РПЭ; с другой стороны, AV-флуорофор образует эффективную донорно-акцепторную пару с 3-периленоильным флуорофором (см. ниже), что создает возможности для исследования липид-липидных взаимодействий [17, 87]. Синтезирован ряд AV-меченых фосфолипидов [17, 67, 79, 88–90], гликолипидов [91, 92] и ганглиозидов [93], которые были применены для изучения структуры, липид-белковых и липид-липидных взаимодействий в липопротеинах человека [94–96], эритроцитарной мембране [97] и вирусе гриппа [98, 99], для исследования фазовых процессов в модельных мембранных системах [100–102] и функционирования гликолипидпереносящего белка [103].

**3-Периленильный флуорофор (IX).** Сам периленил был применен как мембранный зонд Шиницким и сотр. [72], он имеет хорошие спектральные свойства:  $\lambda_{\text{max}}$  410 ( $\epsilon \sim 3 \times 10^4$ ), 430 ( $\epsilon \sim 4 \times 10^4$ ) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  440, 475, 500 нм,  $\tau$  5.5 нс,  $\Phi \sim 0.9$  (в метаноле) [12, 104]. Высокая чувствительность этого зонда, устойчивость и доступность обусловили его многократное использование, хотя неоднозначная локализация перилена в мембране, подобно дифенилгексатриену [12], затрудняет интерпретацию данных. Описаны синтезы периленилмеченых липидов (их спектральные характеристики близки таковым перилена): триглицерида с остатком периленилмеченой кислоты [105], (3-периленил)меченых фосфолипидов [106] и модельного вещества, предназначенного для изучения закономерностей РПЭ, – бистероида, несущего на противоположных концах молекулы остатки (3-периленил)метилфосфата [68]; фирма Molecular Probes предлагает 12-(3-периленил)додекановую

кислоту (в каталоге изображена структура 1-периленил-изомера) [19]. Следует сказать, что несмотря на хорошую чувствительность флуорофора и высокие величины анизотропии в мембране [106], периленилмеченые липиды адекватного применения пока не получили.

**3-Периленоильный флуорофор (X)** ( $\lambda_{\text{max}}$  447 ( $\epsilon$   $2.4 \times 10^4$ ), 430 ( $\epsilon \sim 4 \times 10^4$ ) нм,  $\lambda_{\text{em}}$  479 (в гексане), 533 (в метаноле) нм,  $\tau \sim 5$  нс,  $\Phi \sim 0.6$  (в метаноле) [104, 107]) обладает значительной чувствительностью; в бислое он погружен в гидрофобную зону [87] и удовлетворительно устойчив. Синтезирован широкий набор нейтральных и фосфолипидов [90, 107, 108], гликолипидов [91] и ганглиозидов [93], которые были применены в ряде биологических исследований [90, 99, 109, 110]. Зависимость положения и формы спектра испускания флуорофора от полярности окружения позволила применить 3-периленоилмеченые липиды для сравнительного определения гидратации бислоев различного состава [108].

**Флуорофор BODIPY (4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индаценил).** Первый раз BODIPY-меченое вещество было синтезировано в 1968 г. [111]; его выдающиеся флуоресцентные характеристики привлекли внимание позднее [112]. Были исследованы свойства BODIPY-группы и синтезированы реагенты для ее введения [113, 114], а также содержащие ее жирные кислоты и ряд фосфолипидов [114]. В настоящее время основной источник BODIPY-зондов – фирма Molecular Probes [115]. BODIPY – целое семейство флуорофоров, различающихся заместителями в положениях 1, 3, 5, 7 и 8 (2- и 6-заместители уменьшают квантовый выход флуоресценции, как и отсутствие заместителей) и местом присоединения к молекуленосителю [112, 114]. Спектральные данные для 3,5,7-замещенной системы (XI):  $\lambda_{\text{max}}$  503 нм ( $\epsilon$   $9.8 \times 10^4$ ),  $\lambda_{\text{em}}$  508 нм,  $\tau$  5.5 нс,  $\Phi$  0.94 (в метаноле) [114, 116], при высокой концентрации флуорофор образует эксимеры с испусканием в красной области [114]; величины  $\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}$  BODIPY-зондов зависят от заместителей и охватывают диапазон 495/503–588/616 нм [115]. Обращает на себя внимание малый стоксов сдвиг флуорофора и его высокая чувствительность, узкие основные полосы возбуждения и испускания. BODIPY обладает удовлетворительной устойчивостью, его флуоресценция не зависит от полярности и pH среды; в бислое группа может находиться как в неполярной зоне, если ее там удерживает ацильный остаток [114], так и в зоне полярных головок [116, 117]. К недостаткам BODIPY-зондов следует отнести предпочтение ими в мембране жидкокристаллической фазы [114], а также сложный синтез. Тем не менее, положительные качества преобладают, и BODIPY-зонды применяются все шире, прежде

всего для изучения метаболизма и путей миграции липидов в клетках – см. обзоры [9, 118].

Можно отметить и другие неполярные флуорофоры, примененные в липидных ФЗ, но не получившие заметного распространения.

**9-Карбазолильный флуорофор.** Лакович и Хоген синтезировали фосфолипиды, меченные 9-карбазолилом по ацильным остаткам и полярным головкам [119]. Отметим существенное перекрытие его спектров поглощения и испускания ( $\lambda_{\max}$  295 ( $\epsilon$  16000), 330, 345 нм ( $\epsilon$  5000),  $\lambda_{\text{em}}$  350, 365 нм) со спектрами триптофана и невысокую чувствительность. Хлорированные углеводороды тушат флуоресценцию 9-карбазолила, что предложено использовать для изучения поведения пестицидов в мембранах [119].

**2-Винилнафтильный флуорофор.** Получен фосфатидилхолин с 12-(2-нафтил)-11-додеценильным остатком [120]; ввиду почти полного перекрытия спектров возбуждения и испускания флуорофора со спектрами триптофана (при невысокой чувствительности), зонд может быть применен только в модельных системах.

**Флуоренильную группу** (по C2 и C7) включали в цепь жирных кислот; такие зонды с различным расстоянием между флуорофом и карбоксилем были применены при изучении изменения физических параметров бислоя с глубиной [121]. Надо полагать, что эти зонды затруднительно применять для изучения биологических систем: их спектры возбуждения и испускания тесно перекрываются белковыми. Описан также синтез фосфатидилхолина с остатком 11-(2-флуоренил)-10-ундециновой кислоты и сдвоенного фосфатидилхолина, где две глицерофосфохолиновых группировки ацилированы 11,11'-(2,7-флуоренил)-бис(10-ундециновой) кислотой; оба зонда предназначены для мембранных исследований, их флуоресцентные параметры не приведены [122].

### ФЗ С ПОЛЯРНЫМИ ФЛУОРОФОРАМИ

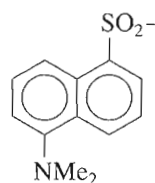
При модифицировании полярным флуорофором липида, как правило, существенно изменяются его свойства – заряд, объем, полярность. Это всегда необходимо учитывать при использовании таких зондов в биологических исследованиях.

**Дансильная (5-диметиламинонафталин-1-сульфонильная) группа** (XII) одной из первых была применена для модифицирования природных липидов [123]. Спектральные характеристики *N*-дансильной группы –  $\lambda_{\max}$  335 нм ( $\epsilon \sim 5000$ ),  $\lambda_{\text{em}}$  464 (в гексане), 515 (в метаноле, липосомах), 545 нм (в воде),  $\tau \sim 12$  нс,  $\Phi \sim 0.4$  (в метаноле) [19, 123] (имеются и липидные зонды с *O*-дансилом [85]) – показывают, что флуорофор имеет умеренную чувствительность, значительный стоксов сдвиг, положение его максимума испускания

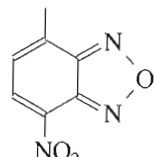
сильно зависит от полярности среды. Флуоресценция *N*-дансила тушится водой; в бислое эта группа, присоединенная к концу жирнокислотной цепи, перемещается в более полярную зону глицериновых остатков [88, 124], где она заметно нарушает упаковку бислоя [87]. Однако флуорофор *N,N*-дигексадецил-*N*-дансиламина может располагаться и в гидрофобной зоне [125]. Синтезирован ряд *N*-дансилмеченых фосфо- и гликолипидов как по полярной головке [123, 125], так и по гидрофобным цепям [88, 124]. Эти зонды неоднократно применялись в биофизических и биохимических исследованиях.

**7-Нитробенз-2,1,3-оксадиазол-4-ильный (NBD) флуорофор** (XIII) ( $\lambda_{\max}$  464 нм ( $\epsilon \sim 25000$ ),  $\lambda_{\text{em}}$  490–550 нм (в разных средах),  $\tau$  6–8 нс,  $\Phi$  0.3 (в липосомах) [19, 126]). Впервые для мечения липидов по аминогруппе был применен более 20 лет назад (*O*- и *S*-NBD-производные имеют низкий квантовый выход) [127]. Положение  $\lambda_{\text{em}}$  и величина  $\Phi$  зависят от окружения сложным образом, на них влияют полярность и pH среды, ее способность к образованию водородных связей. Фотоустойчивость флуорофора невысока (см. обзор [126]). Вода сильно тушит флуоресценцию NBD [115]; в качестве тушителей применяют ионы  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , а также нитроксильные спиновые зонды [125]. NBD образует эффективные пары для РПЭ в качестве как акцептора (с 9-антроилоксигруппой), так и донора (с родамином) [115]. *N*-NBD-группа, присоединенная к концу гидрофобной цепи, в бислое перемещается в полярную зону [128]. Описан ряд синтезов NBD-меченых липидов – см., например, [27, 45, 126, 129], которые применялись в многочисленных биофизических [126, 130, 131] и других биологических (обзоры [9, 118]) исследованиях. Малая фотоустойчивость флуорофора нашла применение для определения диффузии NBD-меченых липидов в мембранах методом восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (FRAP) [132]. Используется и способность NBD-группы легко восстанавливаться. При добавлении к мембранному препарату непроницающего иона дитионита ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ) восстанавливаются, становясь нефлуоресцирующими, только NBD-группы, расположенные в наружном листке бислоя, что позволяет регистрировать трансмембранное распределение зонда (см., например, [133]). NBD-меченые липиды остаются в употреблении, хотя в последние годы их вытесняют BODIPY-зонды.

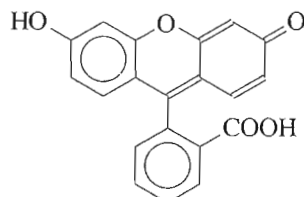
**Флуоресцинильный флуорофор** (XIV) ( $\lambda_{\max}$  495 нм ( $\epsilon \sim 80000$ ),  $\lambda_{\text{em}}$  520 нм (в разных средах),  $\tau$  4 нс,  $\Phi$  0.5 (в этаноле) [19, 134]) давно и часто применяется для мечения различных биополимеров [19, 115], главным образом по аминогруппе с помощью соответствующего 6(5)-изотиоцианата. Флуорофор имеет высокую чувствительность и



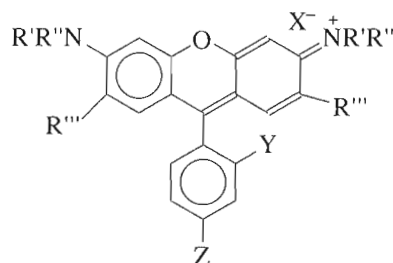
(XII)



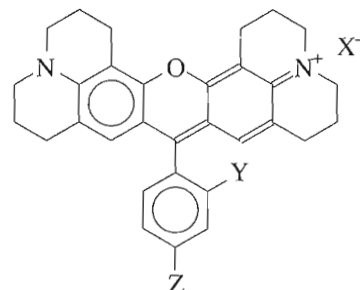
(XIII)



(XIV)

(XV): R', R'' = H, Et, R''' = Me, Y = COO<sup>-</sup>, Z = H

(XVI): R' = R'' = Me, R''' = H, Y = COOH, Z = NHC(S)NH-

(XVII): R' = R'' = Et, R''' = H, Y = COO<sup>-</sup>, Z = H(XVIII): R' = R'' = Et, R''' = H, Y = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Z = SO<sub>2</sub><sup>-</sup>(XIX): Y = COO<sup>-</sup>, Z = H(XX): Y = SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Z = SO<sub>2</sub><sup>-</sup>

благоприятный спектральный диапазон; к недостаткам следует отнести невысокую фотоустойчивость и зависимость спектральных свойств от pH среды (последнее свойство, однако, предлагают применять для измерения pH на мембране [135]). В бислое флуоресцеинил локализован в полярной зоне [136]. При мечении липидов флуоресцеиновый (и производные, например эозиновый) флуорофор был применен как для фосфолипидов (по полярной головке) [134, 137], так и для нейтральных [138] липидов; широкого распространения эти зонды не получили, по-видимому, из-за конкуренции более устойчивых родамин меченых ФЗ (см. ниже).

*Родаминильные* флуорофоры – семейство производных (3,6-диамино)-3*H*-ксантена – также очень широко используются для мечения природных веществ. Применяемые для мечения липидов (указаны  $\lambda_{\max}/\lambda_{\text{em}}$ , нм) – родаминил 6G (родаминил 19) (XV, 530/555), тетраметилродаминил (XVI, 540/566), родаминил В (XVII, 558/580), сульфородаминил В (лиссамин-родаминил В) (XVIII, 560/581), родаминил 101 (XIX, 578/600) и сульфородаминил 101 (техасский красный) (XX, 582/601) [19, 139] – охватывают почти всю красную часть спектра. Все родаминильные производные отличаются высоким молярным поглощением при  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon > 80000$ ),  $\tau$  2–4 нс и  $\Phi$  0.5–1.0 [19, 68, 139, 140]. Эти параметры зависят от свойств среды и строения молекулы-носителя. Родаминильные флуорофоры отличаются высокой чувствительностью и устойчивостью, в мембране локализо-

ваны в полярной зоне [136, 141]; они могут быть использованы как акцепторы энергии возбуждения в парах с рядом флуорофоров, например с NBD [130, 142]. Синтезировано значительное число родаминил меченых липидов – по полярным головкам [68, 131, 134, 139] и по ацильным остаткам [142]. Те и другие едва ли можно считать липидспецифическими, кроме, видимо, ганглиозида GM1, меченного по сиалильному остатку [18]. В большинстве своем эти зонды используют, когда липидная специфичность малосущественна: при изучении активности ферментов [10], клеточной сортировке [109], изучении топографии и характеристик мембран и процессов слияния [90, 130, 131], изучении процессов миграции энергии возбуждения [143] и др. Чаще других применяются *N*-(лиссамин-родамин В-сульфонил)фосфатидилэтаноламин [130, 144, 145] и октадециловый эфир родамин В (R18) [146, 147]. Важная особенность этих зондов – пренебрежимо малая скорость межмембранной миграции через водную фазу [146], хотя предполагается, что R18 способен мигрировать между мембранами при их контакте [148]. Следует также иметь в виду, что R18 в ряде случаев распределяется в мембране неравномерно [149].

Заслуживают упоминания и некоторые другие полярные флуорофоры, реже применяемые в липидных ФЗ.

*Биманил* (3,6,7-триметил-4-метил-1,5-диабцикло[3,3,0]окта-3,6-диен-2,8-дион) ( $\lambda_{\max}$  358/389 нм ( $\epsilon$  6100/5400),  $\lambda_{\text{em}}$  412/459 нм (в гепта-



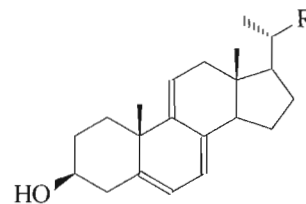
не-метаноле) [150],  $\Phi$  0.1–0.3 [115]) применяется для модификации белков и других природных веществ по тиольным группам [115]. Описаны: биманильное производное тиохолестерина [150], фосфатидилхолина, сфингомиелин и цереброзиды с остатками (биманилтио)жирных кислот [45, 151], а также *N*-биманил-*N,N*-диметилфосфатидилэтанолламин [152]. Отмечены невысокая чувствительность биманильного флуорофора и сильная зависимость положения  $\lambda_{em}$  от полярности среды [45].

*Люцифер желтый (4-амино-3,6-дисульфо-1,8-нафталиимидил)*:  $\lambda_{max}$  432 нм ( $\epsilon$  12000),  $\lambda_{em}$  517–582 нм (в разных средах),  $\Phi$  0.25 [153]. Этим высокополярным флуорофором модифицировали холестерин (по гидроксигруппе) и фосфатидилэтанолламин (по  $NH_2$ ) [153], а также сиалильный остаток ганглиозида GM1 [18]. Заметим, что данный флуорофор уступает по чувствительности флуоресцеинильному и родаминильным, не имея перед последними заметных преимуществ в качестве метки для липидных ФЗ.

*3-(4-Аминофенил)-7-диэтиламино-4-метилкумариновая [45] и 3-аминокарбонил-7-диметиламинокумариновая группы [151]* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  (в липосомах): 390–396/473–477 и 400/460 нм соответственно) были употреблены для мечения по ацильным остаткам фосфатидилхолина. Зонды отличаются хорошей чувствительностью (в несколько раз выше чувствительности NBD-производных) [45]; их применяли для изучения кинетических процессов в липидных системах [45, 151].

*2-Диметиламино-6-(алкилкарбонил)нафтильный* ( $\lambda_{max}$  370 нм ( $\epsilon$  29500),  $\Phi$  0.34 (в этаноле),  $\lambda_{em}$  484 (в гексане), 530 нм (в воде)) был включен в гидрофобную цепь аналога фосфатидилхолина, предназначенного для изучения фосфолипазы  $A_2$  [154]. Флуорофор, чьи  $\lambda_{em}$  и квантовый выход зависят от полярности окружения, – составная часть цепи катионного детергента, предназначенного для мембранных исследований [155], а также 2-диметиламино-6-додеканоилнафталина (Laurdan), весьма популярного среди мембранологов ФЗ [19], однако к данным, полученным с его помощью, советуют подходить критически [156].

Можно отметить также сообщение [157] о синтезе фосфолипида с присоединенным к полярной головке хелатной системой, включающей ион тербия:  $\lambda_{ex}$  310 нм,  $\lambda_{em}$  490, 545, 590 и 625 нм,  $\tau$  1.6 мс. Последняя величина намного превышает времена жизни возбужденного состояния других ФЗ и природных флуорофоров (как правило  $<0.1$  мс); при флуоресцентной микроскопии с временным разрешением, клеток, меченных этим зондом, можно наблюдать только его флуоресценцию [157].



(XXI): R =  $CH=CHCHMeCHMe_2$

(XXII): R =  $(CH_2)_3CHMe_2$

## АНАЛОГИ ХОЛЕСТЕРИНА

Холестерин среди липидов занимает особое положение; его молекула весьма чувствительна к модификациям структуры, которые могут решительно изменять поведение аналога в биологических системах. Поэтому получение высокочувствительных ФЗ, достоверно имитирующих холестерин, – трудная, пока не решенная задача – см. обзоры [158, 159]. Наибольшее применение в этом качестве имеют дегидроэргостерин (XXI, DHE) (природное вещество) и холеста-5,7,9(11)-триен-3 $\beta$ -ол (XXII; получен синтезом) [160, 161, 162], их спектральные характеристики почти одинаковы:  $\lambda_{max}$  ~ 325 ( $\epsilon$  ~ 11000),  $\lambda_{em}$  ~ 370 нм (в этаноле),  $\tau$  0.2–5 нс,  $\Phi$  0.01–0.6 (в разных средах) [159, 162, 163]. Оба зонда не имеют флуорофора в виде отдельной группы, им является триеновая система, включенная в циклическую структуру стерина; она весьма близко имитирует поведение холестерина в биологических системах [158, 164]. Их недостатками следует признать флуоресценцию в УФ-области и невысокую чувствительность (в большинстве систем квантовый выход низок). Благодаря большей устойчивости и доступности DHE применяется гораздо чаще; недавно удалось использовать его как зонд при конфокальной флуоресцентной микроскопии живой клетки, что потребовало применения специальной аппаратуры [165].

Модифицирование алифатической цепи холестерина вносит наименьшие (хотя все равно заметные) нарушения в его функции (см., например, [166]). Был осуществлен ряд синтезов холестериновых ФЗ с флуорофором в боковой цепи: *(2-нафтил)амидным* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  365/387–408 нм) и *(3-пиренил)амидным* [167], с *N-NBD* [168] и *(1-пиренил)метоксикарбонильным* [169]. Эти зонды, имеющие в боковой цепи полярную группу, заметного применения не имели; так оказалось, что NBD-аналог весьма существенно отличается от DHE по своему поведению в живой клетке [165]. Были синтезированы также аналоги с неполярными *6-фенилгексатриеновым* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  332/390 нм) и *4-(2-нафтил)тетрадиеновым* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  332/407 нм) флуорофорами [170]; о степени их липидной специфичности по

имеющимся данным судить трудно. Нами получены изомерные аналоги холестерина с 9-антривинильным (см. выше) флуорофором [171], которые показали в модельных экспериментах хорошую степень соответствия холестерину [172].

Производные холестерина, эфиры, несущие флуорофор (пиренил, NBD и др.) в ацильной или алкильной цепи, стеринами аналогами считать нельзя; они упоминаются выше при описании флуорофоров, см. также обзоры [158, 159]. В обзоре [158] можно найти также сведения о флуоресцентных производных стероидных гормонов.

Завершая этот краткий обзор, можно констатировать, что флуоресцентные липидные зонды показали себя в биологических исследованиях действенным инструментом; их применение расширяется и идет поиск новых зондов. Последнее зависит в первую очередь от конструирования новых флуорофоров (или привлечения пока не востребованных старых). Это особенно актуально для создания эффективного флуоресцентного аналога холестерина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Newton B.A.* // *J. Gen. Physiol.* 1954. V. 10. P. 491–499.
2. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.
3. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989.
4. *Yguerabide J., Foster M.C.* // *Molecular Spectroscopy* / Ed. E. Grell. Berlin: Springer, 1981. P. 199–269.
5. *Petit J.M., Denis-Gay M., Ratinaud M.H.* // *Biol. Cell.* 1993. V. 78. P. 1–13.
6. *Damjanovich S., Gáspár R., Jr., Pieri C.* // *Quart. Rev. Biophys.* 1997. V. 30. P. 67–107.
7. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* / Ed. J.B. Pawley. N.Y.: Plenum Press, 1990.
8. *Van Meer G.* // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1989. V. 5. P. 247–275.
9. *Pagano R.E., Chen C.S.* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. V. 845. P. 152–160.
10. *Hendrickson H.S.* // *Analyt. Biochem.* 1994. V. 219. P. 1–8.
11. *Lentz B.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 64. P. 99–116.
12. *Davenport L.* // *Methods Enzymol.* 1997. V. 278. P. 487–512.
13. *Kleinfeld A.M., Dragsten P., Klausner R.D., Pjura W.J., Matayoshi E.D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. V. 649. P. 471–480.
14. *Edidin M.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. V. 7. P. 528–532.
15. *Brown D.A., London E.* // *J. Membr. Biol.* 1998. V. 164. P. 103–114.
16. *Krishnan K.S., Balaram P.* // *FEBS Letters.* 1975. V. 60. P. 419–422.
17. *Bergelson L.D., Molotkovsky J.G., Manevich Y.M.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1985. V. 37. P. 165–195.
18. *Spiegel S.* // *Methods Enzymol.* 1987. V. 138. P. 313–318.
19. *Haugland R.P.* *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* 5<sup>th</sup> Ed. / Ed. K.D. Larison. Eugene (OR): Molecular Probes, 1992.
20. *Davidson R.S., Hilchenbach M.M.* // *Photochem. Photobiol.* 1990. V. 52. P. 431–438.
21. *Wu P., Brand L.* // *Analyt. Biochem.* 1994. V. 218. P. 1–13.
22. *Weber G.* // *Methods Enzymol.* 1997. V. 278. P. 1–15.
23. *Tsai A., Hudson B.S., Simoni R.D.* // *Methods Enzymol.* 1981. V. 72. P. 483–485.
24. *Massey J.B., Gotto A.M., Pownall H.J.* // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 5444–5448.
25. *Каплун А.П., Шрагин А.С., Лютик А.И., Швец В.И., Евстигнеева Р.П.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. С. 350–351.
26. *Ahmad T., Sparrow J.T., Morrisett J.D.* // *J. Lipid. Res.* 1985. V. 26. P. 1160–1165.
27. *Marchesini S., Preti A., Aleo M.F., Casella A., Dagan A., Gatt S.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1990. V. 53. P. 165–175.
28. *Acquotti D., Sonnino S., Masserini M., Casella L., Fronza G., Tettamanti G.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1986. V. 40. P. 71–86.
29. *Schwarzmann G., Sandhoff K.* // *Methods Enzymol.* 1987. V. 138. P. 319–341.
30. *Duque M., Graupner M., Stütz H., Wicher I., Zechner R., Paltauf F., Hermetter A.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1996. V. 37. P. 868–876.
31. *Tecoma E.S., Sklar L.A., Simoni R.D., Hudson B.S.* // *Biochemistry.* 1977. V. 16. P. 829–835.
32. *Welby M., Tocanne J.F.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 689. P. 173–176.
33. *Sklar L.A., Hudson B.S., Peterson M., Diamond J.* // *Biochemistry.* 1977. V. 16. P. 813–819.
34. *Hudson B., Cavalier S.* // *Spectroscopic Membrane Probes* / Ed. L.M. Loew. Boca Raton (FL): CRC Press, 1988. P. 43–62.
35. *Rintoul D.A., Redd M.B., Wendelburg B.* // *Biochemistry.* 1986. V. 23. P. 1574–1579.
36. *Song W., Rintoul D.A.* // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 4194–4200.
37. *Mateo C.R., Souto A.A., Amat-Gueri F., Acuña U.* // *Biophys. J.* 1996. V. 71. P. 2177–2191.
38. *Shinitzky M., Barenholz Y.* // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 240. P. 2652–2657.
39. *Shinitzky M., Barenholz Y.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 515. P. 367–394.
40. *Lentz B.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1989. V. 50. P. 171–190.
41. *Dupuy B., Montagu M.* // *Analyst.* 1997. V. 122. P. 783–786.
42. *Morgan C.G., Thomas E.W., Moras T.S., Yianni Y.P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 692. P. 196–201.
43. *Beck A., Heissler D., Duportail G.* // *Chem. Phys. Lipids.* 1990. V. 55. P. 13–24.
44. *Kaiser R.D., London E.* // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 8180–8190.

45. *Silvius J.R., Leventis R., Brown P.M., Zuckermann M.* // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 4279–4287.
46. *Ho C., Slater S.J., Stubbs C.D.* // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 6188–6195.
47. *Gavilanes J.G., Lizarbe M.A., Municio A.M., Oñaderra M.* // *Biochemistry*. 1981. V. 20. P. 5689–5694.
48. *Teruel J.A., Gomez-Fernandez J.C.* // *Biochemistry Intern.* 1987. V. 14. P. 409–416.
49. *Brocklehurst J.R., Freedman R.B., Hancock D.J., Radda G.K.* // *Biochem. J.* 1970. V. 116. P. 721–731.
50. *Vanderkooi J.M., Callis J.B.* // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 4000–4006.
51. *Podo F., Blasie J.K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 1032–1036.
52. *Lehrer S.S.* // *Methods Enzymol.* 1997. V. 278. P. 286–295.
53. *Dembo M., Glushko V., Aberlin M.E., Sonenberg M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1979. V. 522. P. 201–211.
54. *Pownall H.J., Smith L.C.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1989. V. 50. P. 161–211.
55. *Blackwell M.F., Gounaris K., Barber J.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. V. 858. P. 221–234.
56. *Glushko V., Thaler M.S.R., Karp C.D.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1981. V. 210. P. 33–42.
57. *Hanicak A., Marezki D., Reimann B., Pap E., Visser A.J.W.G., Wirtz K.W.A.* // *FEBS Letters*. 1994. V. 348. P. 169–172.
58. *Galla H.-J., Theilen U.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1979. V. 23. P. 239–251.
59. *Pownall H.J., Hickson D., Gotto A.M., Massey J.B.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1982. V. 712. P. 169–176.
60. *Somerharju P.J., Virtanen J.A., Eklund K.K., Vainio P., Kinnunen P.K.J.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 2773–2781.
61. *Богомолов О.В., Каплун А.П., Якунина Н.Б., Швец В.И., Евстигнеева Р.П.* // *Докл. АН СССР*. Т. 279. С. 383–386.
62. *Kaplun A.P., Bogomolov O.V., Yakunina N.B., Kuzmina Y.V., Shvets V.I.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1998. V. 94. P. 193–208.
63. *Sunamoto J., Kondo H., Nomura T., Okamoto H.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 1146–1152.
64. *Owen C.S.* // *J. Membr. Biol.* 1980. V. 54. P. 287–290.
65. *Stoffel W., Michaelis G.* // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1976. V. 357. S. 7–19.
66. *Имбс А.Б., Смирнова М.М., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. С. 1135–1139.
67. *Имбс А.Б., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 11. С. 272–278.
68. *Grechishnikova I.V., Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1996. V. 81. P. 87–98.
69. *Stoffel W., Michaelis G.* // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1976. V. 357. S. 925–935.
70. *Johansson L.B.-Å., Bergström F., Edman P., Grechishnikova I.P., Molotkovsky J.G.* // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V. 92. P. 1563–1567.
71. *Каплун А.П., Башарули В.А., Шукина Л.Г., Швец В.И.* // *Биоорганическая химия*. 1979. Т. 5. С. 1826–1830.
72. *Shinitzky M., Dianoux A.-C., Gitler C., Weber G.* // *Biochemistry*. 1971. V. 10. P. 2106–2113.
73. *Ferrieres X., Lopez A., Altibelli A., Dupou-Cezanne L., Lagouanelle J.-L., Tocanne J.-F.* // *Biophys. J.* 1989. V. 55. P. 1081–1091.
74. *Добрецов Г.Е., Спиринов М.М., Чекрыгин О.В., Владимиров Ю.А., Каплун А.П., Башарули В.А., Швец В.И.* // *Биоорганическая химия*. 1981. Т. 7. С. 606–612.
75. *De Bony J., Tocanne J.-F.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1983. V. 32. P. 105–121.
76. *Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M.* // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 5585–5592.
77. *Mason J.T.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1994. V. 1194. P. 99–108.
78. *Lanelle G., Tocanne J.-F.* // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 109. P. 177–182.
79. *Молотковский Ю.Г., Дмитриев П.И., Никулина Л.Ф., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1979. Т. 5. С. 588–594.
80. *Abrams F.S., London E.* // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 10826–10831.
81. *Hutterer R., Schneider F.W., Lanig H., Hof M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1323. P. 195–207.
82. *Radda G.K., Vanderkooi J.M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1972. V. 265. P. 509–549.
83. *Каплун А.П., Башарули В.А., Швец В.И.* // *Биоорганическая химия*. 1978. Т. 4. С. 1567–1568.
84. *Perochon E., Tocanne J.-F.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1991. V. 58. P. 7–17.
85. *Андгуладзе М.К., Каплун А.П., Швец В.И.* // *Журн. орг. химии*. 1981. Т. 17. С. 2323–2329.
86. *Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1990. V. 53. P. 185–189.
87. *Molotkovsky J.G., Manevich Y.M., Babak V.I., Bergelson L.D.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 778. P. 281–288.
88. *Молотковский Ю.Г., Дмитриев П.И., Молотковская И.М., Бергельсон Л.Д., Маневич Е.М.* // *Биоорганическая химия*. 1981. Т. 7. С. 586–600.
89. *Молотковский Ю.Г., Смирнова М.М., Карюхина М.О., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1989. Т. 15. С. 686–689.
90. *Razinkov V.I., Hernandez-Jimenez E.I., Mikhalyov I.I., Cohen F.S., Molotkovsky J.G.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1329. P. 149–158.
91. *Молотковский Ю.Г., Имбс А.Б., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1983. Т. 9. С. 112–114.
92. *Имбс А.Б., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д.* // *Биоорганическая химия*. 1986. Т. 12. С. 527–532.
93. *Molotkovsky J.G., Mikhalyov I.I., Imbs A.D., Bergelson L.D.* // *Chem. Phys. Lipids*. 1991. V. 58. P. 199–212.
94. *Molotkovsky J.G., Manevich E.M., Gerasimova E.N., Molotkovskaya I.M., Polesky V.A., Bergelson L.D.* // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 122. P. 573–579.
95. *Bergelson L.D., Manevich E.M., Molotkovsky J.G., Muzya G.I., Martynova M.A.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 921. P. 182–190.

96. Manevich E.M., Martynova M.A., Muzya G.I., Vodovozova E.L., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. V. 963. P. 302–310.
97. Manevich E.M., Lakin K.M., Archakov A.I., Li V.S., Molotkovsky J.G., Bezuglov V.V., Bergelson L.D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 815. P. 455–460.
98. Bukrinskaya A.G., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L., Manevich Y.M., Bergelson L.D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1987. V. 897. P. 285–292.
99. Slepishkin V.A., Starov A.I., Bukrinskaya A.G., Imbs A.B., Martynova M.A., Kogtev L.S., Vodovozova E.L., Timofeeva N.G., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 173. P. 599–605.
100. Gromova I.A., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // *Chem. Phys. Lipids*. 1992. V. 60. P. 235–246.
101. Polozov I.V., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. V. 69. P. 209–219.
102. Polozov I.V., Polozova A.I., Molotkovsky J.G., Epand R.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1328. P. 125–139.
103. Mattjus P., Molotkovsky J.G., Smaby J.M., Brown R.E. // *Analyt. Biochem.* 1999. V. 268. P. 297–304.
104. Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. V. 109. P. 7374–7381.
105. Zandonella G., Haalck L., Spener F., Faber K., Palttauf F., Hermetter A. // *Chirality*. 1996. V. 8. P. 481–489.
106. Гречишников И.В., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 70–76.
107. Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д. // *Биоорганическая химия*. 1982. Т. 8. С. 1256–1262.
108. Молотковский Ю.Г., Карюхина М.О., Бергельсон Л.Д. // *Биол. мембраны*. 1987. Т. 4. С. 387–394.
109. Tertov V.V., Sayadyan H.S., Kalantarov G.F., Molotkovsky J.G., Bergelson L.D., Orekhov A.N. // *J. Immunol. Methods*. 1989. V. 118. P. 139–143.
110. Смирнов О.Н., Сурин А.М., Асташкин Е.И., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биол. мембраны*. 1995. Т. 12. С. 174–184.
111. Treibs A., Kreuzer F.-H. // *Liebigs Ann. Chem.* 1968. B. 718. S. 208–223.
112. Vos de Wael E., Pardoën J.A., van Koeveeringe J.A., Lugtenburg J. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1977. V. 96. P. 306–309.
113. Worries H.J., Koek J.H., Lugtenburg J., Fokkens R., Driessen O., Mohn G.R. // *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*. 1985. V. 104. P. 288–291.
114. Johnson I.D., Kang H.C., Haugland R.P. // *Analyt. Biochem.* 1991. V. 198. P. 228–237.
115. Haugland R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Sixth Ed. / Ed. M.T.Z. Spence. Eugene (OR): Molecular Probes, 1996.
116. Karolin J., Johansson L.B.-Å., Strandberg L., Ny T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 7801–7806.
117. Kaiser R.D., London E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1375. P. 13–22.
118. Rosenwald A.G., Pagano R.E. // *Adv. Lipid Res.* 1993. V. 26. P. 101–118.
119. Lakowicz J.R., Hogen D. // *Chem. Phys. Lipids*. 1980. V. 26. P. 1–40.
120. Hendrickson H.S., Hendrickson E.R., Rustad T.J. // *J. Lipid Res.* 1987. V. 28. P. 864–872.
121. Lala A.K., Koppaka V. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 5586–5593.
122. Starck J.-P., Nakatani Y., Ourisson G. // *Tetrahedron*. 1995. V. 51. P. 2629–2638.
123. Waggoner S.S., Stryer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1970. V. 67. P. 579–589.
124. Bartlett D., Glaser M., Welti R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1328. P. 48–54.
125. Asuncion-Punzalan E., Kachel K., London E. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 4603–4611.
126. Chattopadhyay A. // *Chem. Phys. Lipids*. 1990. V. 53. P. 1–15.
127. Monti J.A., Christian S.T., Shaw W.A., Finley W.H. // *Life Sci.* 1977. V. 21. P. 345–356.
128. Chattopadhyay A., London E. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. P. 39–45.
129. Pagano R.E., Martin O.C. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 4439–4445.
130. Nichols J.W. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 1889–1896.
131. Wolf D.E., Winiski A.P., Ting A.E., Bocian K.M., Pagano R.E. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 2865–2873.
132. Vaz W.L.C., Criado M., Madeira V.M.C., Schoellmann G., Jovin T.M. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. P. 5608–5612.
133. Moss R.A., Bhattacharya S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 8688–8689.
134. Struck D.K., Pagano R.E. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5404–5410.
135. Knight C.G., Stephens T. // *Biochem. J.* 1989. V. 258. P. 683–689.
136. Kachel K., Asuncion-Punzalan E., London E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1374. P. 63–76.
137. Fung B. K.-K., Stryer L. // *Biochemistry*. 1978. V. 17. P. 5241–5248.
138. Falck J.R., Krieger M., Goldstein J.L., Brown M.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. V. 103. P. 7396–7398.
139. Молотковский Ю.Г. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 976–980.
140. Nakashima K., Fujimoto Y., Anzai T. // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61. P. 592–599.
141. Разинков В.И., Молотковский Ю.Г. // *Биол. мембраны*. 1993. Т. 10. С. 655–668.
142. Marchesini S., Demasi L., Cestone P., Preti A., Agmon V., Dagan A., Navon R., Gatt S. // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. V. 72. P. 143–152.
143. Medhage B., Mukhtar E., Kalman B., Johansson L.B.-Å., Molotkovsky J.G. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1992. V. 88. P. 2845–2851.
144. Massari S., Colonna R., Folena E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. V. 940. P. 149–157.
145. Mok K.W.C., Cullis P.R. // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 2534–2545.
146. Cohen F.C., Melikyan G.B. // *Methods: Comp. Methods Enzymol.* 1998. V. 16. P. 215–226.
147. MacDonald R.I. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 13533–13539.

148. Stegmann T., Orsel J.G., Jamieson J.D., Padfield P.J. // *Biochem. J.* 1995. V. 307. P. 875–878.
149. Stegmann T., Schoen P., Bron R., Wey J., Bartoldus I., Ortiz A., Nieva J.L., Wilschut J. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 11330–11337.
150. Knight C.G., Dugan G.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 860. P. 159–164.
151. Gardam M.A., Itovitch J.J., Silvius J.R. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 884–893.
152. Pryor C., Bridge M., Loew L.M. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 2203–2209.
153. Nothnagel E.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1989. V. 980. P. 209–219.
154. Hendrickson H.S., Dumdei E.J., Batchelder A.G., Carlson G.L. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 3697–3703.
155. Lakowicz J.R., Bevan D.R., Maliwal B.P., Cherek H., Balter A. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 5714–5722.
156. Bagatolli L.A., Maggio B., Sotomayor C.P., Fidelity G.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1325. P. 80–90.
157. Phimpivong S., Saavedra S.S. // *Bioconjugate Chem.* 1998. V. 9. P. 350–357.
158. Schroeder F. // *Prog. Lipid Res.* 1984. V. 23. P. 97–113.
159. Ланишин Е.Н., Курек Н.К. // *Укр. биохим. журнал.* 1989. Т. 61. С. 98–112.
160. Rogers J., Lee A.G., Wilton D.C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V. 552. P. 23–37.
161. Fischer R.T., Stephenson F.A., Shafiee A., Schroeder F. // *J. Biol. Phys.* 1985. V. 13. P. 13–24.
162. Fischer R.T., Stephenson F.A., Shafiee A., Schroeder F. // *Chem. Phys. Lipids.* 1984. V. 34. P. 1–14.
163. Smutzer G., Grawford B.F., Yeagle P.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 862. P. 361–371.
164. Schroeder F., Jefferson J.R., Kier A.B., Knittel J., Scallen T.J., Wood W.G., Hapala I. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991. V. 196. P. 235–252.
165. Mukherjee S., Zha X., Tabas J., Maxfield F.R. // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 1915–1925.
166. Vilcheze C., McMullen T.P.W., McElhaney R.N., Bittman R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1279. P. 235–242.
167. Kao Y.J., Soutar A.K., Hong K.Y., Pownall H.J., Smith L.C. // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 2689–2696.
168. Craig I.F., Via D.P., Mantulin W., Pownall N.J., Gotto A.M., Smith L.C. // *J. Lipid Res.* 1981. V. 22. P. 687–696.
169. Kao Y.J., Doody M.C., Smith L.C. // *J. Lipid Res.* 1986. V. 27. P. 781–785.
170. Drew J., Letellier M., Morand P., Szabo A.G. // *J. Org. Chem.* 1987. V. 52. P. 4047–4052.
171. Гречишников И.В., Молотковский Ю.Г. // *Био-орган. химия.* 1997. Т. 23. С. 422–427.
172. Grechishnikova I.V., Bergsröm F., Johansson L.B.-Å., Brown R.E., Molotkovsky J.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1420. P. 189–202.

## Fluorescent Lipid Probes: Properties and Application

Jul. G. Molotkovsky<sup>#</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

This review is devoted to fluorescent lipid probes: the characteristics of their fluorophores; the main methods of their synthesis; and the potentialities, scope, and limitations of their use in studies of biological systems (cells, membranes and their models, enzymes of lipid metabolism, etc.). Particular attention is paid to the lipid specificity of the probes, i.e., the correspondence of their physicochemical characteristics and behavior in biological systems to those of natural lipids.

*Key words: fluorescent lipid probes, characteristics; cells; membranes; model membranes*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 330-6601; e-mail: jgmol@ibch.siobc.ras.ru.