

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Участники издания | 9 |
| Список сокращений и условных обозначений | 10 |
| Предисловие | 12 |
| Введение | 13 |
| Глава 1. История развития медицинской микробиологии до изобретения времяпролетной масс-спектрометрии | 19 |
| 1.1. Микроорганизмы — причина инфекционных болезней | 19 |
| 1.2. Изобретение микроскопа | 20 |
| 1.3. Выделение микроорганизмов в чистой культуре | 21 |
| 1.4. Разработка питательных сред для культивирования различных микроорганизмов | 22 |
| 1.5. Становление иммунологии | 22 |
| 1.6. Становление молекулярной биологии | 23 |
| 1.7. Современная микробиологическая диагностика с применением инновационных технологий | 23 |
| 1.7.1. Микроскопия | 23 |
| 1.7.1.1. Простой микроскоп | 23 |
| 1.7.1.2. Сложный световой микроскоп | 24 |
| 1.7.1.3. Темнопольный микроскоп | 24 |
| 1.7.1.4. Фазово-контрастный микроскоп | 24 |
| 1.7.1.5. Флуоресцентный микроскоп | 25 |
| 1.7.1.6. Микрометрия | 29 |
| 1.7.1.7. Фотомикроскопия | 29 |
| 1.7.2. Фенотипическая идентификация бактерий и грибов | 30 |
| 1.7.2.1. Культуральный анализ | 30 |
| 1.7.2.2. Неавтоматизированные платформы, наборы и тесты | 31 |
| 1.7.2.3. Автоматизированные бактериологические анализаторы | 33 |
| 1.7.3. Методы идентификации, не связанные с фенотипом | 35 |
| 1.7.3.1. Молекулярно-биологические методы | 35 |
| 1.7.3.1.1. Методы амплификации нуклеиновых кислот | 36 |
| 1.7.3.1.2. Методы на основе гибридизации нуклеиновых кислот | 56 |
| 1.7.3.1.3. Секвенирование ДНК | 64 |

| | |
|---|----|
| 1.7.3.2. Иммунологические методы | 72 |
| 1.7.3.2.1. Иммунофлуоресценция | 72 |
| 1.7.3.2.2. Иммуноферментный анализ | 73 |
| 1.7.3.2.3. Радиоиммунный анализ | 73 |
| 1.7.3.2.4. Использование моноклональных антител | 73 |
| 1.7.3.2.5. Экспресс-тесты | 74 |
| 1.7.4. Диагностика бактериемии и фунгемии | 78 |
| 1.7.4.1. Культуральные методы диагностики бактериемии и фунгемии | 78 |
| 1.7.4.1.1. Критические факторы, влияющие на результативность микробиологического исследования крови | 80 |
| 1.7.4.1.2. Питательные среды и добавки для гемокультивирования | 83 |
| 1.7.4.1.3. Неавтоматизированные системы гемокультивирования | 84 |
| 1.7.4.1.4. Автоматизированные системы гемокультивирования | 85 |
| 1.7.4.2. Методы обнаружения патогенов в крови без этапа культивирования | 87 |
| 1.7.4.2.1. Суррогатные маркеры сепсиса | 87 |
| 1.7.4.2.2. Методы выявления бактериемии и фунгемии на основе амплификации нуклеиновых кислот | 87 |
| 1.7.4.2.3. Методы выявления бактериемии и фунгемии на основе гибридизации нуклеиновых кислот | 89 |
| 1.7.4.2.4. Методы обнаружения патогенов в крови на основе выявления антигенов и антител | 90 |
| 1.7.4.3. Прямое исследование чувствительности гемокультур к антимикробным препаратам | 91 |
| 1.7.4.4. Контроль качества в диагностике бактериемии и фунгемии | 92 |

**Глава 2. История развития времяпролетной
масс-спектрометрии 95**

| | |
|--|----|
| 2.1. Эксперименты с разреженными газами (XIX в.) | 95 |
| 2.1.1. Гипотеза Праута | 96 |
| 2.1.2. Опыты Майкла Фарадея | 96 |
| 2.1.3. Трубки Гейслера | 96 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.4. Густав Кирхгоф и Роберт Бунзен. Начало спектрального анализа | 97 |
| 2.1.5. Катодные и анодные лучи | 97 |
| 2.2. Изобретение масс-спектрометра (начало XX в.) | 98 |
| 2.2.1. Открытие изотопов. Опыты Джозефа Томсона | 98 |
| 2.2.2. Масс-спектрометр Фрэнсиса Астона | 100 |
| 2.2.3. Масс-спектрометр Артура Демпстера | 101 |
| 2.2.4. Схема устройства и принцип работы масс-спектрометра | 102 |
| 2.2.5. Решение проблемы ускорения заряженных частиц. Изобретение циклотрона | 103 |
| 2.2.6. Решение проблемы оптимального разделения ионов. Создание масс-спектрометра с двойной фокусировкой . . | 104 |
| 2.2.7. Расшифровка структуры молекул | 107 |
| 2.2.8. Решение проблемы ионизации металлов. Изобретение искровой ионизации | 109 |
| 2.2.9. Разработка концепции времяпролетного масс-спектрометра | 109 |
| 2.2.10. Разработка концепции хромато-масс-спектрометрии . . | 110 |
| 2.2.11. Развитие методов ионизации | 111 |
| 2.2.11.1. Ионизация электронным ударом | 111 |
| 2.2.11.2. Изобретение химической ионизации | 112 |
| 2.2.11.3. Ионизация электроспреем | 113 |
| 2.2.11.4. Полевая десорбция | 115 |
| 2.2.11.5. Плазменная десорбция | 116 |
| 2.2.11.6. Лазерная десорбция | 116 |
| 2.2.12. История развития методов ионизации | 116 |
| 2.2.13. Детекторы ионов | 120 |
| 2.2.14. Представление масс-спектров | 122 |
| 2.2.15. Дальнейшее усовершенствование анализаторов в масс-спектрометре | 122 |
| 2.2.15.1. Масс-спектрометрия с ионным циклотронным резонансом | 122 |
| 2.2.15.2. Технология орбитальной ионной ловушки | 124 |
| Глава 3. MALDI-TOF MS в медицинской микробиологии | 125 |
| 3.1. Принцип метода | 125 |
| 3.2. Матрица | 126 |
| 3.3. Масс-спектры | 128 |
| 3.4. Способы обработки данных | 138 |
| 3.5. Пробоподготовка биологического материала | 141 |
| 3.5.1. Прямое белковое профилирование | 141 |

| | |
|---|-----|
| 3.5.2. Пробоподготовка биологического материала с предварительным экстрагированием белков | 142 |
| 3.5.3. Пробоподготовка биологических жидкостей | 143 |
| 3.6. Видовая идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS | 144 |
| 3.6.1. Первые попытки идентификации микроорганизмов | 144 |
| 3.6.2. Стандартизация метода | 148 |
| 3.6.3. Особенности идентификации грамотрицательных бактерий | 149 |
| 3.6.4. Особенности идентификации грамположительных бактерий | 150 |
| 3.6.5. Особенности идентификации анаэробных и микроаэрофильных бактерий | 153 |
| 3.6.6. Особенности идентификации <i>Mycobacterium tuberculosis</i> и нетуберкулезных микобактерий | 155 |
| 3.6.7. Особенности идентификации дрожжевых и плесневых грибов | 156 |
| 3.6.8. Прямая идентификация микроорганизмов в биологических жидкостях | 159 |
| 3.6.8.1. Прямая идентификация микроорганизмов в образцах мочи | 159 |
| 3.6.8.2. Прямая идентификация микроорганизмов в гемокультурах | 160 |
| 3.6.8.3. Диагностика грибковых патогенов в крови | 162 |
| 3.6.8.4. Диагностика туберкулеза в крови | 162 |
| 3.6.8.5. Диагностика вирусных инфекций в крови | 163 |
| 3.6.9. Детекция резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам | 163 |
| 3.6.10. Типирование бактерий и грибов | 169 |
| 3.6.11. Применение MALDI-TOF MS в вирусологии | 176 |
| 3.6.12. Применение MALDI-TOF MS в экологии | 178 |
| 3.6.13. Применение MALDI-TOF MS в изучении микробных сообществ | 178 |
| 3.7. Платформы для MALDI-TOF MS-идентификации микроорганизмов | 180 |
| 3.8. Дальнейшие перспективы | 184 |
| Заключение | 187 |
| Список литературы | 188 |
| Предметный указатель | 189 |

Глава 1

История развития медицинской микробиологии до изобретения времяпролетной масс-спектрометрии

1.1. МИКРООРГАНИЗМЫ — ПРИЧИНА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

В конце XIX в. эксперименты французского микробиолога Луи Пастера и английского физика Джона Тиндаля окончательно опровергли теорию самозарождения жизни, безоговорочно принимавшуюся на протяжении многих столетий. Результаты экспериментов положили начало технологиям пастеризации (и тиндализации: дробной пастеризации — неоднократных воздействий повышенной температурой $<60\text{ }^{\circ}\text{C}$ с суточными интервалами при $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ для прорастания спор), без которых дальнейшее развитие медицинской микробиологии было бы невозможно.

Еще в 1813 г. показано, что определенные грибы могут вызывать болезни пшеницы и ржи, а в 1845 г. М. Беркли доказал, что поражение картофеля, приведшее в Ирландии к катастрофическим последствиям, вызвано грибом. Уже в 1836 г. А. Басси установил, что грибы могут приводить к заболеваниям животных (шелковичного червя в Италии). Через несколько лет И. Шенлейн показал, что некоторые кожные болезни человека также имеют грибковую природу. Однако лишь немногие медики того времени соглашались признать, что именно микроорганизмы повинны в инфекционных болезнях.

Луи Пастер в результате проведенных им экспериментов по изучению брожения, вызываемого различными микроорганизмами, доказал, что причина порчи пива и вина заключена именно в них, и 30 апреля 1878 г. сделал доклад во Французской академии наук, в котором утверждал, что причиной инфекционных болезней являются микроорганизмы. Эту дату можно считать днем рождения медицинской микробиологии.

Несколько позже в институте, руководимом Пастером, были разработаны фильтры, способные задерживать клетки бактерий. Это дало возможность получать не содержащие бактерий фильтраты. Инфекционные жидкости часто проверяли на присутствие в них болезнетворных бактерий, пропуская их через такие фильтры. Если фильтрат был неинфекционным, это означало, что в исходной жидкости содержится бактерия-возбудитель.

В 1892 г. русский ученый Д. Ивановский использовал этот метод для изучения инфекционного экстракта из растений табака, пораженных мозаичной болезнью. К своему удивлению, он обнаружил, что фильтрат полностью сохранял свою инфекционность. Микроорганизмы, способные проходить через бактериальные фильтры, в дальнейшем были названы *вирусами*, а открытие Ивановского положило начало новому направлению микробиологии — вирусологии.

1.2. ИЗОБРЕТЕНИЕ МИКРОСКОПА

Если основы медицинской микробиологии были заложены только в конце XIX в., то история развития микробиологии как науки, то есть имеющей доказательную базу, а не опирающейся на умозрительные заключения, берет свое начало еще в конце XVI в. с изобретения первого микроскопа голландскими производителями очков Захариусом и Хансом Дженсеннами. Тем не менее всему миру известно имя другого изобретателя микроскопа Левенгука, так как он не только создал свой прибор, но и первым стал наблюдать за объектами микромира и даже попытался их классифицировать. Антони ван Левенгук (1632–1723) родился в Голландии в семье пивовара и к миру науки отношения не имел. Образования он не получил и знал лишь один голландский язык, не употреблявшийся в научной среде того времени. На протяжении жизни он работал то в мануфактурной лавке, то привратником в городской ратуше. Однако именно он благодаря увлечению всей жизни — шлифованию стекол — впервые увидел с помощью своих линз мельчайшие существа в капле воды.

Микроскопы Левенгука были мало похожи на привычные нам устройства и представляли собой короткофокусную линзу почти сферической формы, закрепленную между двумя небольшими металлическими пластинами. Исследуемый объект располагался на кончике короткой толстой иглы, прикрепленной к задней пластине, и его приводили в фокус вращением двух винтов, изменявших положение иглы относительно линзы. Такое устройство, несмотря на свою простоту, позволяло достичь увеличения от 50 до 300 раз в зависимости от фокусного расстояния линзы.

Благодаря своим увеличительным устройствам Левенгук открыл существование сперматозоидов и эритроцитов, описал капилляры и кро-

воображение, но самое главное, он открыл мир микробов — *animalcules* (анималькулюсов), как он их назвал. Им были описаны представители всех основных групп одноклеточных организмов, известных нам сейчас, — простейшие, водоросли, дрожжи и бактерии.

Однако в течение последующих ста лет после смерти Левенгука научный мир не продвинулся в изучении мира микроорганизмов существенным образом. Лишь в XIX в. благодаря созданию более сложных микроскопов, близких по конструкции современным, возобновилось изучение анималькулюсов, их роли в круговороте веществ и в возникновении болезней.

1.3. ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ

Первоначально микробиологи работали со смесью разных микроорганизмов, однако к 1870 г. начали понимать, что правильно оценить внешнюю форму и значимость микроорганизма можно, лишь имея его чистую культуру, то есть отделив его от прочих видов и вырастив самостоятельно. Главными сторонниками использования чистых культур были два выдающихся миколога — А. де Бари и О. Брефельд. Брефельд культивировал грибы на твердых средах, добавляя в них желатин. Однако с бактериями, имевшими гораздо меньшие размеры, так работать оказалось невозможно. Бактериологам требовались другие методы. И. Шретер заметил, что на таких субстратах, как картофель, клейстер, хлеб и яичный белок, бактерии вырастают в виде отдельных скоплений — колоний, которые отличаются друг от друга, но в пределах каждой колонии все бактерии были одинаковыми. Роберт Кох сначала также попробовал работать со стерильными срезами картофеля, но быстро понял, что гораздо проще найти какое-нибудь прозрачное вещество, способное сделать твердыми уже имевшиеся жидкие среды. В качестве гелеобразователя Кох использовал тот же желатин. Однако вскоре стало понятно, что желатин легко плавится при температуре выше 28 °С, а также легко расщепляется многими микроорганизмами. Поэтому в дальнейшем микробиологи стали пользоваться другим гелеобразователем — агар-агаром, который плавится только при температуре около 100 °С, а будучи расплавленным затвердевает лишь при температуре приблизительно 44 °С, что позволяет использовать его для глубинного посева. Кроме того, разрушить агар способны лишь очень немногие бактерии. Найти искусственный заменитель агара так и не удалось, поэтому этот гелеобразующий агент используется в микробиологии для получения плотных сред и по сей день.

1.4. РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для выращивания микроорганизмов, вызывающих брожение, Пастер использовал простые жидкие среды определенного состава. Для выделения патогенных бактерий Кох со своими сотрудниками предложил использовать среду, наиболее близкую к той, в которой микроорганизм находится в тканях хозяина. Так появились питательный бульон и плотные питательные агаризованные среды, соответственно, содержащие пептон (ферментативный перевар мяса) и мясной экстракт (концентрат водорастворимых компонентов мяса), используемые в микробиологии и в наше время для культивирования неприхотливых микроорганизмов. Для выращивания более требовательных бактерий в эту среду могут быть введены различные добавки (например, дрожжевой экстракт, углеводы, кровь или сыворотка). В дальнейшем были созданы селективные среды, поддерживающие рост только определенных микроорганизмов и ингибирующие размножение прочих имеющихся в образце бактерий или грибов.

Работа Роберта Коха «К вопросу об исследовании патогенных микроорганизмов», посвященная культивированию микроорганизмов на плотных средах, была опубликована в 1881 г., а один из его сотрудников Юлиус Рихард Петри предложил для выделения бактерий использовать особую стеклянную посуду — чашку, впоследствии названную его именем.

Кроме того, необходимо отметить, что Роберт Кох предложил также способы окраски бактерий анилиновыми красителями, а также усовершенствовал технику микроскопии, добавив к микроскопу конденсор Аббе и иммерсионный объектив.

1.5. СТАНОВЛЕНИЕ ИММУНОЛОГИИ

В неразрывной связи со становлением микробиологии идет развитие иммунологии, зарождение которой уходит корнями еще к I тысячелетию до н.э., когда в Китае и Индии было предложено вводить содержимое оспенных папул здоровым людям для их защиты от тяжелого течения оспы.

В 1883 г. русский ученый Илья Ильич Мечников обнаружил и описал фагоциты, заложив основы клеточной теории иммунитета, а в 1891 г. немецкий ученый Пауль Эрлих вводит понятие «антитело» и создает основу гуморальной теории иммунитета. В дальнейшем, уже в XX в., на основе реакции антиген–антитело были разработаны диагностические панели, в том числе для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

1.6. СТАНОВЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Открытие в 1953 г. Джеймсом Уотсоном и Фрэнсисом Криком двойной спирали ДНК положило начало бурному развитию молекулярной биологии, одним из применений которой является диагностика инфекционных заболеваний на основе детекции последовательности нуклеотидов в цепи ДНК.

1.7. СОВРЕМЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

1.7.1. Микроскопия

Проблема необходимости идентификации микроорганизмов и характеристики их свойств возникла, как только стала понятна взаимосвязь бактерий с инфекционными заболеваниями. На протяжении ста лет после смерти Роберта Коха микробиологическая диагностика оставалась практически неизменной. В классическом варианте предварительную идентификацию микроорганизмов, выделенных из образцов биологического материала путем культивирования в лабораторных условиях, проводили и проводят с помощью световой микроскопии, изучая преимущественно морфологические и тинкториальные свойства микроорганизмов. Окраска по Граму чаще всего обеспечивает однозначную верификацию грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, что позволяет провести первую корректировку в антибактериальной терапии. Эта процедура обычно занимает несколько минут. Вместе с тем в настоящее время доступны и более сложные методики микроскопии [43, 44]. Остановимся на них подробнее.

1.7.1.1. Простой микроскоп

В комплектацию простого микроскопа входят двояковыпуклые линзы, утолщенные в центре. Увеличенное изображение создается в той же ориентации, что и исходный предмет, чем простой микроскоп отличается от сложного. Простые микроскопы имеют ограниченное разрешение и кратность увеличения из-за низкой числовой апертуры (способности концентрировать световые лучи линзами или конденсором). Большинство коммерчески доступных приборов дают кратность увеличения от 2 до 30 раз, а лучшие линзы дают разрешение около 10 мкм. Простые микроскопы в настоящее время нашли применение для препарирования, оценки бактериальных колоний и интерпретации реакции агглютинации. Примерами простых микроскопов являются ювелирные лупы, устройства визуализации фотодиапозитивов и простые увеличительные стекла.

1.7.1.2. Сложный световой микроскоп

Впервые такие микроскопы были созданы около 1590 г. голландскими производителями очков Захариусом и Хансом Дженссенами. Их устройство состояло из линз объектива, которые помещались вблизи образца и линз окуляра, которые располагались вблизи глаза. Линзы находились на противоположных концах трубы. Они проектировали увеличенное изображение в трубу, и окуляр увеличивал спроектированное изображение, таким образом давая двухэтапное увеличение. Такое расположение линз до сих пор используется в современных сложных микроскопах.

Стереоскопический микроскоп объединяет два сложных микроскопа, для каждого глаза в отдельности. При наложении двух изображений в мозге возникает трехмерный стереоскопический эффект. Стереоскопические микроскопы могут быть как с отраженным, так и с проходящим освещением, однако отсутствие конденсора ограничивает их числовую апертуру и разрешение. Такие устройства применяют для изучения морфологии колоний культур бактерий, грибов и клеток.

1.7.1.3. Темнопольный микроскоп

Живые неокрашенные микроорганизмы позволяет изучать темнопольная микроскопия. Так, например, с ее помощью можно изучать спиралевидные бактерии (спирохеты и лептоспиры) и подтверждать подвижность других микроорганизмов. В темнопольной микроскопии высокого разрешения используется специальный кардиоидный конденсор с высокой числовой апертурой, который блокирует центральный световой поток и создает световой конус, направленный от линз объектива под наклоном. Бактерии на стекле имеют показатель преломления, несколько отличающийся от показателя преломления окружающей среды, и световые лучи, проходя через микроорганизм, отражаются на линзы объектива, создавая яркую окраску организма на фоне темного фона. Темнопольная микроскопия повышает разрешающую способность микроскопа до 0,1 мкм или меньше, тогда как в светлопольной микроскопии этот показатель составляет 0,2 мкм.

1.7.1.4. Фазово-контрастный микроскоп

Фазово-контрастная микроскопия помогает улучшить изображение при работе с неокрашенными биологическими образцами, прозрачными в светлом поле. Обычно для этого уменьшают размер диафрагмы конденсора, но это приводит к уменьшению разрешающей способности и появлению артефактов, вызванных дифракцией. Фазово-контрастная микроскопия улучшает контраст в таких образцах без значимой потери разрешения.

При работе с фазово-контрастным микроскопом под нижние линзы конденсора помещают кольцо для создания пучка света цилиндрической формы, пустого внутри. Этот световой пучок при прохождении через объектив существенно не изменяется и достигает задней части фокальной плоскости объектива в виде кольца. Свет, проходя через образец, отражается и замедляется так, что выходит из фазы, в которой находится неизменный пучок света примерно на $1/4$ длины волны. Этот световой пучок распространяется по всей фокальной плоскости. Свет, проходя через заднюю часть фокальной плоскости объектива, взаимодействует с кольцевидной фазовой пластиной, которая изменяет прямой световой путь на $1/4$ длины волны. При достижении прямым и отраженным светом плоскости изображения они выходят из фазы на $1/2$ длины волны. Этот вышедший из фазы свет действует таким образом, что образец становится просматриваемым в деталях в виде темной зоны на более светлом фоне. Поскольку расчет фазового сдвига основан на $1/4$ длины волны зеленого света, фазовое изображение имеет лучшее разрешение при размещении на пути света зеленого фильтра. Зеленые фильтры также позволяют использовать менее дорогие ахроматические линзы, которые сферически скорректированы под зеленый свет. Фазово-контрастная микроскопия позволяет работать с неокрашенными образцами, но имеет меньшую разрешающую способность, чем микроскопия в ярком поле окрашенных образцов [45].

Кроме того, просматриваемые объекты часто окружены ореолом, затемняющим контуры образца. Такой вид микроскопии не позволяет рассматривать толстые образцы, так как фазовый сдвиг может быть больше ожидаемого сдвига в $1/4$ длины волны.

1.7.1.5. Флуоресцентный микроскоп

Флуоресцентный микроскоп сконструирован в начале 1900-х гг. и сначала использовался для идентификации и локализации соединений, имеющих собственную флуоресценцию при облучении ультрафиолетом. С 1930-х гг. его стали применять вместе с флуоресцирующими соединениями для идентификации специфических компонентов тканей и инфекционных агентов, которые не обладали собственной флуоресценцией. Примеры таких флуоресцирующих соединений включают акридиновый оранжевый (встраивается в ДНК и рибонуклеиновую кислоту (РНК)), аурамин или родамин (для миколовых кислот), калькофлуор белый (для полисахаридов клеточной стенки грибов), голубой Эванса (для цитоплазмы зафиксированных клеток) и Hoechst 33258 (для минорных количеств АТ-богатых двухцепочечных ДНК).

С 1940-х гг. стали применять конъюгаты флюорохром–антитело (иммунофлуоресценция). Впервые меченные флуоресцеином антитела для

детекции полисахаридных антигенов пневмококков в тканях зараженных мышей использовали Альберт Кунс и соавт. Окрашивание флюоресцирующими антителами нашло широкое применение после создания в 1950 г. флуоресцеинизоцианата и в 1958 г. его более стабильного производного — флуоресцеинизотиоцианата (FITC).

Относительно недавно появился новый класс флуоресцентных меток для биологии и медицины — квантовые точки. Эти новые флуоресцентные метки при конъюгации с антителами и другими биологическими лигандами лишены многих недостатков, свойственных традиционным флюорофорам, используемым в клинической диагностике. Они имеют хороший яркий сигнал, устойчивы к обесцвечиванию светом, и светом с одной и той же длиной волны может быть возбуждено множество флуоресцентных цветов. Последнее свойство делает флуоресцентную микроскопию со множеством цветов несложной в применении и при правильной установке длины волны дает количественную информацию о представленности лиганда. Квантовые точки нашли применение в окрашивании живых клеток, фиксированных клеток и тканей [46]. В настоящее время флуоресцентная микроскопия также используется совместно с гибридизацией нуклеиновых кислот для визуализации флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и многоцветных зондов для FISH [47–49].

Флуоресцентная микроскопия основана на способности флюоресцирующих веществ абсорбировать энергию, близкую к ультрафиолету, и переизлучать эту энергию (свет) с большей длиной волны. Флуоресцентный микроскоп должен облучать образец ультрафиолетовым светом возбуждения и отделять гораздо более слабый излучаемый свет от более яркого возбуждающего света, чтобы глаза улавливали только излучаемый свет. Полученное изображение состоит из ярко светящихся областей на темном фоне. В первых флуоресцентных микроскопах применялось освещение в темном поле или флуоресценция в проходящем свете [50].

Эти системы были громоздкими, трудоемкими в использовании и не обладали достаточным разрешением. В большинстве современных флуоресцентных микроскопов используется отраженный свет (эпифлуоресценция). В этих приборах возбуждающий свет направляется вниз через объектив на образец. Испускаемый свет и отраженный свет возбуждения собираются объективом и проходят через дихроматическое зеркало, которое удаляет свет возбуждения и позволяет излучаемому свету с большей длиной волны формировать изображение. При эпифлуоресценции объектив действует как конденсор, что устраняет проблемы выравнивания и смазывания, связанные с конденсором темного поля. Поле зрения ярче при эпифлуоресценции, разрешение выше, тушение флуоресценции происходит только в поле зрения [51].

Флуоресцентная микроскопия требует высокого уровня освещения, так как квантовый выход большинства традиционных флюорохромов низкий. Наиболее распространенные лампы, используемые во флуоресцентной микроскопии, — это лампы на основе паров ртути, работающие в диапазоне мощности от 50 до 200 Вт, или лампы на основе паров ксенона мощностью от 75 до 200 Вт. Следует отметить, что полезная яркость флуоресцентной лампы не всегда измеряется ее мощностью. 100-ваттная ртутная лампа в 4 раза ярче, чем 200-ваттная лампа, и в 11 раз ярче 150-ваттной ксеноновой лампы [52].

Лампы для флуоресцентной микроскопии находятся под высоким напряжением, и при работе с ними необходимо соблюдать осторожность во избежание их разрушения. Ни в коем случае нельзя прикасаться к этим лампам голыми руками, потому что жир на пальцах может вызвать травмирование или обесцвечивание стекла.

Флюорохромы должны возбуждаться светом определенной длины, чтобы генерировать максимальное количество излучаемого света. Поэтому для оптимизации квантового выхода флюорофора используются специальные комбинации возбудителя и барьерного фильтра. Возбуждающие фильтры используются для выбора необходимой длины световой волны из спектра света, генерируемого лампой. Возбуждающие фильтры поставляются с узкой, средней и широкой полосой пропускания — узкий, средний и широкий диапазоны световых частот, соответственно. Барьерные фильтры блокируют более короткие волны света и пропускают более длинные волны через фильтр. Барьерные фильтры важны, потому что они удаляют высокоинтенсивный возбуждающий свет, который может подавлять излучаемый свет низкой интенсивности. Барьерные фильтры также предотвращают попадание ультрафиолетового излучения в глаза, где оно может вызвать катаракту и повреждение сетчатки. Барьерные фильтры с широкой полосой пропускания обычно дают более яркие изображения, но необходимо соблюдать осторожность, чтобы предотвратить появление фонового света, который может подавлять излучаемый свет. Эпифлуоресцентные микроскопы также имеют дихроматическое зеркало (расщепитель луча), которое отражает входящий в объектив свет возбуждения и позволяет излучаемому свету проходить к барьерному фильтру и объективам [53].

У большинства современных эпифлуоресцентных микроскопов барьерный фильтр, возбуждающее зеркало и светоделитель размещены в съемных оптических блоках, причем в микроскоп можно установить сразу несколько таких блоков. Эта конфигурация позволяет использовать фильтры возбуждения и барьеры для различных флюорохромов. Следует соблюдать осторожность при выборе оптических блоков. Возбуждающий фильтр должен соответствовать длине волны возбуждения флюорофора,

а эмиссионный барьер должен позволять испускаемому свету пройти через него. Например, при прямом флуоресцентном тестировании антител на вирусные антигены в мазках клеток обычно используются антитела, меченные FITC, и контрастное окрашивание синего Эванса. Выбор оптического блока с фильтром возбуждения от 450 до 490 нм и широкополосным барьерным фильтром 515 нм обеспечит яркое поле зрения, а контрастно окрашенные клетки будут казаться оранжево-красными. При выборе более узкополосного барьерного фильтра (от 520 до 560 нм) поле зрения будет темнее, а красный свет, излучаемый синей краской Эванса, не будет виден. Изображения, создаваемые этим оптическим блоком, будут более контрастными, так как фон темнее. Обе комбинации фильтров подходят для этой задачи, но окончательный выбор будет зависеть от предпочтений пользователя.

Одной из основных проблем при использовании и изучении флуоресцентных микроскопических изображений является тенденция традиционных флуорофоров терять флуоресценцию при воздействии возбуждающего света в течение нескольких минут. Эта потеря флуоресценции вызывается двумя механизмами: фотообесцвечиванием и тушением. Фотообесцвечивание (выцветание) — это необратимая потеря флуоресценции, вызванная химическим повреждением флуорофора [54].

Тушение вызвано наличием свободных радикалов, солей тяжелых металлов или соединений галогенов. Тушение также может быть вызвано передачей энергии испускаемого света другим флуоресцентным молекулам, находящимся в непосредственной близости от флуорофора, в процессе, называемом *флуоресцентным резонансным переносом энергии* (FRET). Для уменьшения этого эффекта препараты следует хранить в темноте при температуре от 2 до 8 °С. Кроме того, пользователь должен блокировать путь возбуждающего света, когда не просматривает и не фотографирует образец. Для этой цели большинство эпифлуоресцентных микроскопов имеют затвор на пути света. Тушение может быть серьезной проблемой при фотографировании флуоресцентных изображений, так как затвор может быть открыт в течение минуты или более. Тушение можно несколько уменьшить, добавив к раствору поглотители свободных радикалов, такие как п-фенилендиамин, 1,4-диазабцикло-(2,2,2)-октан (DABCO) или н-пропилгаллат. п-Фенилендиамин и н-пропилгаллат можно использовать для уменьшения тушения в FITC и родамине. DABCO немного менее эффективен, чем п-фенилендиамин, для флуоресценции FITC, но, в отличие от п-фенилендиамина, DABCO не темнеет при воздействии света и более безопасен в использовании. Основным преимуществом флуорофоров с квантовыми точками является их устойчивость к фотообесцвечиванию.