Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 103-138

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ НА ОСНОВЕ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОГО ВРЕМЯ-КОРРЕЛИРОВАННОГО СЧЕТА ФОТОНОВ

^{© 2019 г.} В. И. ЩЕСЛАВСКИЙ^{1, 2}, М. В. ШИРМАНОВА², А. ЕЛЬЦОВ¹ и В. БЕККЕР¹

¹Бекер&Хикль ГмбХ, Берлин

² Приволжский Медицинский Исследовательский Университет, Нижний Новгород

I. Введение II. Принципы время-коррелированного счета фотонов. III. Люминесцентная микроскопия с временным разрешением: модификации FLIM систем. IV. Применения FLIM. V. Заключение: последние разработки и перспективы развития.

І. ВВЕДЕНИЕ

Методы, позволяющие детектировать люминесценцию (флуоресценцию и фосфоресценцию) с временным разрешением, находят широкое применение в различных областях биологии, химии и медицины. В первую очередь это связано с тем, что они «чувствительны» к протекающим в образцах биохимическим, молекулярным и физикохимическим процессам. Во-вторых, при правильно выбранных параметрах оптического возбуждения образцов, они являются неинвазивными. И, наконец, эти методы позволяют проводить измерения на разном уровне – от субклеточного до целого организма мелких лабораторных животных.

Люминесценция характеризуется следующими параметрами: интенсивностью, спектром и временем затухания (жизни) [1]. Каждый из этих параметров несет определенный объём информации. Поскольку

Принятые сокращения: TCSPC (Time-correlated single-photon counting, время-коррелированный счет фотонов), FLIM (Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением), PLIM (Фосфоресцентная микроскопия с временным разрешением), FRET (Förster Resonance Energy Transfer, Ферстеровская резонансная передача энергии), STED (Stimulated Emission Depletion, вынужденное насыщение эмиссии).

Адрес для корреспонденции: vis@becker-hickl.de

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-29-01022.

интенсивность сигнала люминесценции пропорциональна квантовому выходу люминофора и его концентрации, люминесцентный имиджинг позволяет определять пространственное распределение люминофора и, соответственно, исследовать структуру образца, а также проводить анализ относительного содержания люминофора.

Несмотря на то, что спектр является индивидуальной характеристикой люминофора, а его форма, в известных пределах, не зависит от концентрации люминесцирующих молекул, определение происхождения сигнала люминесценции не представляется возможным, если спектры излучения молекул сильно перекрываются. В частности, это затрудняет анализ эндогенных флуорофоров. Кроме того, спектр люминесценции эндогенных молекул зачастую не зависит или крайне слабо зависит от протекающих биохимических реакций и условий микроокружения. Время жизни люминесценции также индивидуально для каждого люминофора и в значительной степени зависит от его молекулярного окружения, но в известной степени не зависит от его концентрации. На время жизни люминесценции влияют различные факторы: конформация люминесцирующей молекулы, взаимодействие с другими окружающими ее молекулами, локальный pH, вязкость среды, температура, показатель преломления и другие параметры [2-6]. Таким образом, время жизни люминесценции позволяет судить не только о свойствах самой молекулы, но и о свойствах ее локального микроокружения. Следует отметить, что независимость времени жизни люминесценции от концентрации молекул позволяет проводить измерения без каких-либо калибровок измерительных систем, что дает возможность легко сравнивать данные, полученные на разных установках.

Для получения картины пространственного распределения времен жизни люминесценции в зависимости от пространственных координат (что есть по сути флуоресцентная/фосфоресцентная микроскопия с временным разрешением, или FLIM/PLIM) используются различные методы. С точки зрения оптики, системы регистрации времени жизни могут быть основаны на микроскопии широкого поля (при этом используются или позиционно-чувствительные фотоумножители, или электронно-оптические преобразователи, или ССD камеры), либо на сканировании образца лазерным пучком и конфокальном детектировании сигнала люминесценции с использованием фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) или лавинных диодов, работающих в режиме счета фотонов [7–10]. С точки зрения электроники, измерение времен жизни люминесценции возможно либо на основе измерений фазы и глубины модуляции люминесцентного сигнала, либо

на основе временных методов, когда измеряется временной профиль сигнала после лазерного импульса возбуждения [11]. В последнем случае, в свою очередь, измерения возможны либо посредством сканирования так называемых «временных окон» по профилю кривой затухания, либо посредством регистрации сигнала сразу во всех временных каналах [12, 13]. Наконец, возможен как аналоговый вариант детектирования, так и цифровой, когда регистрируются одиночные фотоны [14, 15]. Выбор того или иного метода регистрации затухания сигнала люминесценции зависит от многих факторов, таких как: требуемая точность измерений времен жизни, концентрация и свойства люминофоров, мощность лазеров и частота повторения импульсов.

Данный обзор посвящен люминесцентной микроскопии, основанной на время-коррелированном счете одиночных фотонов, и описывает возможные применения данной техники в биологических исследованиях.

II. ПРИНЦИПЫ ВРЕМЯ-КОРРЕЛИРОВАННОГО СЧЕТА ФОТОНОВ

ОДНОМЕРНЫЙ ВРЕМЯ-КОРРЕЛИРОВАННЫЙ СЧЕТ ОДИНОЧНЫХ ФОТОНОВ

Время-коррелированный счет одиночных фотонов (TCSPC, time-correlated single photon counting) основан на детектировании одиночных фотонов, излучаемых молекулами при возбуждении периодическими импульсами света, измерении времени детектирования фотонов и последующей реконструкции кривой затухания флуоресценции или фосфоресценции [11, 14, 16]. По сути, идея TCSPC заимствована из техники временных корреляционных измерений, давно используемой для определения времени жизни нестабильных ядер в ядерной физике и известной как методика задержанных совпадений [17].

В TCSPC существенным моментом является то, что при низкой мощности возбуждающего импульсного излучения вероятность детектирования более одного фотона за период следования импульсов описывается Пуассоновской статистикой и пренебрежимо мала. Таким образом, скорость детектирования фотонов флуоресценции (в дальнейшем мы будем говорить только о ней, за исключением особых случаев) существенно ниже частоты повторения возбуждающих импульсов. В этом случае сигнал с детектора представляет из себя последовательность электрических импульсов, вероятность распределения которых относительно возбуждающего оптического импульса представляет из себя кривую затухания люминесценции.



Рис. 1. Принцип одномерного время-коррелированного счета фотонов (TCSPC).

При таких условиях построение распределения фотонов от времени становится тривиальной задачей. Флуоресценция образца возбуждается лазерными импульсами, следующими с большой частотой повторения. При детектировании фотона измеряется время его регистрации относительно времени возбуждающего импульса. С каждым новым импульсом происходит накопление все большего числа фотонов и, в результате, строится статистическая диаграмма распределения фотонов в пределах периода следования импульсов [11] (рис. 1).

Данный метод регистрации кривых затухания флуоресценции весьма эффективен, поскольку все фотоны «задействованы» в построении распределения. Это позволяет определять времена затухания флуоресценции с высокой временной точностью, ограниченной лишь временными характеристиками детектора. Данным классическим TCSPC, когда статистка фотонов является функцией только одного параметра – времени, активно пользуются при измерениях затухания флуоресценции в точке, для измерения времен затухания анизотропии флуоресценции или для изучения свойств одиночных излучателей фотонов [18-20]. Однако этот подход оказывается неэффективным, когда речь заходит об измерениях времени затухания флуоресценции в зависимости, например, от длины волны или от положения возбуждающего лазерного пучка на образце. В последнем случае возникает необходимость медленного сканирования образца. Скорость сканирования должна быть такой, чтобы статистики фотонов в каждом пикселе изображения было достаточно для формирования полноценных кривых затухания флуоресценции. Более того, данные по каждому пикселю должны успевать считываться с памяти платы



Рис. 2. Принцип многопараметрического время-кореллированного счета фотонов.

на компьютер и сохраняться там в процессе сканирования. Такой подход на базе классического TCSPC использовался в ранних работах по флуоресцентной микроскопии с временным разрешением [16]. Однако в современных быстрых лазерных сканирующих микроскопах использование одномерного TCSPC представляется проблематичным.

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ ВРЕМЯ-КОРРЕЛИРОВАННЫЙ СЧЕТ ОДИНОЧНЫХ ФОТОНОВ

Как уже обсуждалось выше, в случае одномерного TCSPC распределение фотонов строится относительно одного параметра – времени после возбуждающего импульса. Однако, если тем или иным способом к фотонам «привязать» дополнительные параметры, например, длину волны, поляризацию, время от начала эксперимента, или пространственные координаты, то однопараметрический TCSPC превращается в многопараметрический. Принцип многопараметрического TCSPC в лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ) проиллюстрирован на рис. 2.

В ЛСМ образец сканируется сфокусированным пучком импульсного лазера (обычно фемтосекундного или пикосекундного). При этом в отличии от одномерного TCSPC, электроника подсчитывает не только количество фотонов в каждом периоде лазерных импульсов и время их регистрации детектором, но и определяет местоположение лазерного пучка. На основе этих параметров – количества фотонов, их времени регистрации и пространственных координат, строятся пространственно-временные гистограммы фотонов, которые есть суть флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging). Если помимо регистрации пространственных координат будут также регистрироваться, например, длины волн фотонов, используя спектральные приборы, то мы получим вариант трехпараметрической, или спектральной, флуоресцентной микроскопии с временным разрешением [21, 22].

В.И.Щеслав	зский и соавт.
------------	----------------

Среди различных методов регистрации флуоресцентных изображений, TCSPC обеспечивает наиболее высокое временное разрешение и наиболее эффективное использование излученных образцом фотонов [11, 14]. С точки зрения биологических задач существенно, что FLIM, основанный на TCSPC, позволяет идентифицировать кривые со сложным (многоэкспонентным) профилем затухания флуоресценции. Важно также, что данный метод «нечувствителен» к флуктуациям интенсивности лазера и полностью совместим с быстрым сканированием, реализуемым в современных ЛСМ: сканирование продолжается до тех пор, пока не будет набрана статистика фотонов, достаточная для получения достоверных результатов анализа изображений. Следует отметить, однако, что в то время, как в стандартной флуоресцентной микроскопии статистика фотонов не так критична, в микроскопии с временным разрешением количество фотонов является решающим фактором для точного анализа данных.

Разумеется, чем более сложным экспоненциальными законами описываются кривые затухания, тем больше фотонов должно быть набрано для корректного анализа времен жизни. Таким образом, времена сбора данных во FLIM, основанной на TCSPC, превышают времена сбора данных в стандартной ЛСМ.

При этом скорость счета в системах на базе TCSPC ограничена так называемыми эффектами накопления, а также мертвым временем электроники и возможностями детекторов [11]. Мертвое время электроники связано с ограничением скорости процессинга сигналов, когда счетчик фотонов не может зарегистрировать следующий фотон после предыдущего в течении определенного времени. В настоящее время стандартное мертвое время для электроники составляет от десяти до сотни наносекунд. Суть эффектов накопления заключается в том, что если на образец падает очень мощное лазерное излучение и скорость эмиссии фотонов флуоресценции очень большая, вероятность в течении одного лазерного периода получить на детекторе второй фотон, который будет «проигнорирован» электроникой, возрастает. Это может привести к изменению профиля кривой затухания. Чтобы этого не произошло, скорость излучения образцом фотонов не должна превышать 10% от частоты повторения лазерных импульсов. В большинстве случаев в ЛСМ реализуется именно такой режим для предотвращения эффектов фотодеструкции биологических образцов.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ АНАЛИЗА ДАННЫХ FLIM

Данные FLIM, основанной на TCSPC, представляют из себя матрицу пикселей, которые содержат одну или несколько кривых затухания с большим количеством временных каналов, каждый из которых соответствует определенному времени после лазерного импульса.

В каждом из этих каналов хранится определенное количество фотонов. Для анализа кривых затухания может использоваться несколько подходов. Первый основан на итеративном подходе – последовательной свертке (конволюции) аппаратной функции и подходящей модели затухания с дальнейшим нелинейным фиттингом кривой (рис. 3). Если модель затухания флуоресценции представить в виде суммы экспонент с соответствующими весами (вкладами) a_1, a_2, \ldots, a_n :

$$F(t) = \sum_{i=1}^{n} a_i e^{-t/\tau_i},$$
(1)

то измеряемая в эксперименте интенсивность флуоресценции I(t) будет определяться сверткой F(t) и аппаратной функцией R(t):

$$I(t) = F(t) * R(t).$$
 (2)

Аппаратная функция определяется свойствами системы (оптикой, электроникой и детекторами) при воздействии непосредственно на нее лазерного импульса. Она может быть либо измерена на образцах, у которых отсутствует флуоресценция, либо рассчитана программым образом на основе переднего фронта кривой затухания. В процессе фиттинга оптимизируются параметры выбранной модели до тех пор, пока кривая фиттинга не ляжет на экспериментальные точки наилучшим образом. Критерием качества подгонки кривой является близость к единице среднеквадратичного отклонения экспериментальных данных от модельной функции (χ^2) и малость флуктуации невязки. Данный подход используется уже в течении достаточно длительного времени при анализе кривых затухания, измеренных в одной точке [16].

Альтернативным методом анализа кривых является метод моментов. Первый момент (или математическое ожидание) позволяет быстро оценить среднее время жизни флуоресценции. При этом первый момент не зависит от выбора модели затухания и слабо зависит от количества зарегистрированных фотонов, что делает данный метод незаменимым в случае, когда собранная статистика фотонов не позволяет делать разумный нелинейный фиттинг кривых затухания. Преимущество данного метода состоит также в том, что в нем относительно легко оценить точность измерений времен жизни флуоресценции. Первый момент рассчитывается согласно формуле 3 [11]:

$$M_1 = \frac{\sum N_i t_i}{N},\tag{3}$$

где N_i – количество фотоотсчетов во временном канале *i* электронной платы счета одиночных фотонов, t_i – время, соответствующее каналу *i*, N – общее количество фотонов. M_i можно рассматривать как среднее время регистрации фотонов в TCSPC.

В.И.Щеславский и соавт.



Рис. 3. Анализ FLIM на основе время-коррелированного счета фотонов.

(A). Интенсивность флуоресценции. Каждый пиксель содержит кривую затухания флуоресценции с большим количеством временных каналов.

(Б). Кривая затухания флуоресценции в одном пикселе изображения. Аппаратная функция показана зеленым цветом, экспериментальные данные-синим, модельная функция (фит) – красным.

(В): Флуоресцентное изображение с временным разрешением в псевдо-цветовой шкале.

Из измерения первых моментов аппаратной функции и затухания флуоресценции можно определить среднее время жизни:

$$<\tau>=M_{1}^{\Phi}-M_{1}^{A\Phi},$$
 (4)

где M_1^{Φ} – первый момент распределения фотонов флуоресценции, $M_1^{A\Phi}$ – первый момент аппаратной функции. Если стандартное отклонение времени регистрации фотонов при

Если стандартное отклонение времени регистрации фотонов при измерении аппаратной функции равно $\sigma_{A\Phi}$, то стандартное отклонение первого момента аппаратной функции σ_{M1} выражается следующим образом:

$$\sigma_{M1} = \sigma_{A\Phi} / \sqrt{N},\tag{5}$$

где N – количество фотонов при регистрации аппаратной функции.

Тогда для стандартного отклонения времени жизни флуоресценции получается выражение:

$$\sigma_{\tau} = \sqrt{(\tau^2 + \sigma_{M1}^2)} / \sqrt{N},\tag{6}$$

где Nф – количество фотонов флуоресценции.

Недостатком данного метода является то, что он не позволяет определять достоверно времена жизни флуоресценции в системах с несколькими флуорофорами или в случаях, если флурофор существует в нескольких конформациях с разными временами жизни.

Данные, полученные с помощью TCSPC, могут быть также проанализированы в частотном представлении. Трансформация из временного представления в частотное посредством преобразования Фурье дает два параметра для каждой кривой – фазу и глубину модуляции. Такие данные анализируются с помощью так называемого фазорного анализа [23]. Каждому пикселю изображения соответствует точка на фазорной диаграмме, при этом угол вектора проведенного в данную точку из центра диаграммы соответствует фазе, а амплитуда соотносится с глубиной модуляции оптического излучения. Таким образом, различные флуорофоры характеризуются различными фазорами (векторами). Преимущество фазорного анализа перед методами, основанными на фиттинге кривых затухания, состоит в том, что он позволяет быстро получать наглядную информацию о флуорофорах, содержащихся в образце. Более подробная информация об этом элегантном методе анализа содержится в работах группы Энрико Граттона [23, 24].

III. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ: МОДИФИКАЦИИ FLIM СИСТЕМ

ОДНОКАНАЛЬНАЯ FLIM

Если для регистрации затухания флуоресценции в системе задействован один детектор и одна плата счета фотонов, такая модификация FLIM называется одноканальной. Данная система позволяет регистрировать сигнал только на одной длине волны. Следует отметить, что регистрация сигнала только на одной длине волны во FLIM не является проблемой, в отличие от стандартной флуоресцентной микроскопии, основанной только на регистрации интенсивности флуоресценции. В последнем случае необходима регистрация флуоресценции в различных спектральных интервалах для того, чтобы избежать проблем, связанных с концентрационными

В.И.Щ	еславский	и	соавт.
-------	-----------	---	--------

эффектами. Иначе говоря, требуется нормировка. С другой стороны, сигнал затухания флуоресценции во FLIM не зависит от концентрации и спектральной чувствительности детектора. Следовательно, дополнительные измерения в различных спектральных интервалах не требуются. Таким образом, по своей сути такая модификация FLIM является рациометрической: время затухания флуоресценции может рассматриваться как отношения интенсивностей флуоресценции в различные времена времени после возбуждающего импульса. Это позволяет эффективно использовать одноканальный FLIM в различных задачах, описанных ниже.

МНОГОКАНАЛЬНАЯ FLIM

Несколько каналов регистрации FLIM сигнала требуются тогда, когда есть необходимость провести одновременные измерения времен жизни флуоресценции нескольких флуорофоров с различными спектральными свойствами. Также многоканальная система необходима, когда требуется разделение сигнала флуоресценции по поляризации, например, в случае анизотропного имиджинга, где сигналы от одиночного флуорофора разделяются по поляризации при регистрации.

Одновременная регистрация сигналов в различных каналах обычно осуществляется либо посредством так называемой роутерной техники, которая использует одну плату и несколько детекторов, подключенных к роутеру, либо с использованием нескольких независимых плат счета фотонов, каждая из которых подключена к своему единственному детектору [25].

Хотя роутеры являются весьма бюджетным решением для реализации многоканальной системы, счет фотонов, регистрируемых с их помощью, ограничен несколькими миллионами фотоотсчетов в секунду. Этого достаточно для большинства задач, связанных с измерениями сигналов флуоресценции в биологии, однако в случаях, когда в эксперименте надо зарегистрировать большее количество фотонов, предпочтительней использовать несколько плат счета фотонов. Преимущество данной конфигурации состоит в том, что все каналы являются независимыми, поэтому насыщение одного канала никак не влияет на другие. В настоящее время стандартная комплектация FLIM включает два независимых канала. При необходимости, FLIM на основе TCSPC легко позволяет использовать от четырех до восьми каналов одновременно [26, 27].

Одной из реализаций многоканальной FLIM является спектральная FLIM. Спектральная FLIM использует длину волны как дополнительный параметр в распределении фотонов. Спектр сигнала



Рис. 4. Спектральная FLIM.

Эксперимент выполнен на микроскопе Zeiss LSM 710 и системе Simple-Tau 150 (BBecker&Hickl GmbH) с использованием 16-канального спектрального детектора. Возбуждение фемтосекундным Ti:Sa лазером, длина волны возбуждения 850 нм. Флуоресценция регистрировалась в указанных спектральных интервалах.

флуоресценции распределяется по различным каналам многоканального детектора. Для каждого фотона определяется его время регистрации после возбуждающего импульса, спектральный канал в который он попадает и координаты лазерного пучка на образце. Эта информация используется для построения распределения фотонов как функции от времени, длины волны и координат места, где был зарегистрирован фотон. Пиксели спектрального изображения с временным разрешением содержат несколько кривых затухания флуоресценции для каждой из регистрируемых длин волн, при этом каждая кривая содержит большое количество временных каналов, которые, в свою очередь, содержат определенное количество фотонов. Пример спектральной FLIM представлен на рис. 4. Измерения с применением спектральной многоканальной FLIM описаны подробно в работах [28–30].

Интересным вариантом FLIM является FLIM с регистрацией изображений в зависимости от времени – так называемые временные серии. Данный подход широко используется для изучения отклика клеток на электромагнитное облучение, химическое, температурное или электрическое воздействие. Важным применением здесь является наблюдение клеточного метаболизма после внешнего воздействия на клетку. Например, в физиологии растений возможно наблюдение переходных процессов в хлорофилле, которые являются индикатором метаболизма растения [31, 32].

Измерения времен жизни на шкале времен в несколько миллисекунд возможны посредством техники, основанной на периодическом стимулировании образца и дальнейшем сканировании вдоль одной линии (FLITS) [33]. В данном случае строится распределение фотонов



Рис. 5. Визуализация кальциевого сигнала в нейроне с помощью FLIM. (A): Стандартное FLIM изображение.

(Б): Измерение концентрации Ca²⁺ с помощью сенсора Oregon Green BAPTA 1-АМ с момента стимуляции нейронов электрическими импульсами.

Сканирование осуществлялось вдоль красной линии, показанной на (А). Видно, что рост концентрации Са²⁺ происходит практически мгновенно.

в зависимости от времени относительно возбуждающего импульса, положения лазерного пучка на линии и времени относительно стимуляции образца. Особенно актуальны подобные измерения в нейробиологии, например, для регистрации быстрых кальциевых сигналов (рис. 5).

Наконец, одной из важных конфигураций многопараметрических измерений является комбинация флуоресцентой и фосфоресцентной микроскопии с временным разрешением [34]. Данный метод основан на модулировании излучения лазера, работающего на высокой частоте повторения импульсов и регистрации времени прибытия фотона не только относительно возбуждающего импульса, но и относительно модулирующего импульса. Принцип таких измерений показан на рис. 6(А). Для возбуждения образца используется лазер с высокой частотой повторения, однако импульсы идут не непрерывно, как в обычной FLIM, а циклами. Сначала в течении определенного времени пикселя лазер включен, затем он выключается. В то время, когда лазер включен, собирается сигнал флуоресценции. Когда лазер выключается, система начинает регистрировать сигнал фосфоресценции, накопленный в период, когда лазер был включен. Времена относительно лазерного импульса используются для построения кривых затухания флуоресценции, а времена относительно начала



Рис. 6. FLIM/PLIM.

(А) Принцип одновременного измерения времен жизни флуоресценции и фосфоресценции. Времена регистрации фотонов определяются как по отношению к лазерному импульсу в каждом периоде их повторения, так и по отношению к началу модулирующего импульса.

(Б) Флуоресцентное изображение эндогенного флуорофора НАД(Ф)Н в клетках НЕК с временным разрешением.

(В) Фосфоресцентное изображение палладиевого комплекса (TCPP-Pd), отражающее кислородный статус клеток

модулирующего импульса используются для построения кривых затухания фосфоресценции. На рисунке 6 (Б, В) представлены данные по одновременному измерению времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н и фосфоресценции от палладиевого комплекса TCPP–Pd, являющегося сенсором молекулярного кислорода, в клеточной культуре [34]. Таким образом, комбинированная FLIM/PLIM позволяет одновременно исследовать метаболизм клеток и их кислородный статус.

IV. ПРИМЕНЕНИЯ FLIM

ИЗМЕРЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКРООКРУЖЕНИЯ МОЛЕКУЛ

Существует большое количество физических и химических эффектов, влияющих на времена жизни флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров [35, 36]. Этот факт лежит в основе применения метода FLIM для измерения различных параметров микроокружения флуорофора, в числе которых концентрация ионов, pH, локальная вязкость, показатель преломления, температура. Хотя эти факторы оказывают неспецифическое влияние на время жизни флуоресценции любых флуоресцирующих молекул, включая эндогенные флуорофоры, изменения времени жизни обычно малы при вариации параметров в физиологических пределах. Поэтому для измерения отдельных показателей микроокружения внутри клетки в естественных условиях используются специально синтезированные химические или генетически-кодируемые сенсоры, или индикаторы.

Измерения концентраций ионов и наблюдение их изменений представляет большой интерес в клеточной биологии и физиологии [37]. Наиболее важными ионами являются Ca²⁺, Na⁺, K⁺, и Cl⁻. Многие ионы при связывании с флуорофором изменяют квантовый выход и время жизни его флуоресценции, что используется для определения концентрации ионов в клетках [38-40]. В основе изменений лежит тушение флуоресценции сенсора при взаимодействии с ионом. Время жизни флуоресценции сенсора в связанной с ионом форме обычно длиннее времени жизни того же сенсора в свободной форме. Соответственно, с повышением концентрации ионов времена жизни флуоресценции сенсора увеличиваются. Такие измерения проводились, например, для различных сенсоров на ионы Ca²⁺, Cl⁻, Na⁺ [41-44]. В работе [38] в качестве флуоресцентной метки использовался сенсор МОАЕ, который тушился ионами хлора Cl⁻. В этом случае, наоборот, с увеличением концентрации время жизни флуоресценции сенсора уменьшалось. Используя двухфотонную FLIM авторы смогли получить изображения распределения концентраций Cl- в дендритах до глубины 150 мкм. Изменения концентрации ионов Clв нейронах при их развитии и воспалении исследовалось в работах Гильберта и Функа [39, 45]. Анализ ионов Ca²⁺ в нейронах проводится с применением химического сенсора Oregon Green BAPTA-1 [33]. Этот же сенсор использовался для двухфотонной микроскопии кальцевого гомеостаза в астроцитах мыши с болезнью Альцгеймера [46]. Для количественной оценки ионов Na⁺ предложен сенсор Sodium Green, время жизни флуоресценции которого существенно растет с

ростом концентрации ионов. На его основе стала возможной оценка концентрации ионов Na⁺ в диапазоне от 0.5 до 50 mM в буферном растворе [44].

Еще одной важной группой FLIM сенсоров являются сенсоры на рН. В основе их работы – наличие протонированной и депротонированной форм, отличающихся друг от друга временами жизни [47]. Примеры химических рН-сенсоров для время-разрешенных измерений – BCECF, SNARF, SNAFL. FLIM на основе SNARF, например, использовался для измерения внутриклеточного рН в культурах клеток [48, 49]. Двухфотонный FLIM на базе BCECF позволяет получать карты распределения рН на различных глубинах биологических образцов, что не представляется возможным в случае использования неоптических методов. Относительно недавно в качестве сенсоров на pH были использованы квантовые точки [50]. Преимущество их использования состоит в том, что они обладают длинными временами жизни флуоресценции (от 9 нс при pH 6 до 15 нс при рН 8), что, в свою очередь, позволяет легко дифференцировать сигнал квантовых точек от автофлуоресценции, у которой времена жизни существенно более короткие. В настоящее время достигнут значительный прогресс в использовании генетически-кодируемых pH-сенсоров для измерений pH в живых клетках и тканях in vivo [51]. Хотя среди них сенсоры для время-разрешенных измерений немногочисленны, перспектива мониторинга рН, используя все преимущества FLIM перед стандартной флуоресцентной микроскопией, заставляет исследователей активно заниматься их разработкой. FLIM с использованием зеленого флуоресцентного белка EGFP в качестве сенсора на рН был реализован в работе Накабаяши и его коллег [5]. Авторы показали, что среднее время жизни флуоресценции белка увеличивается с увеличением рН. Это было использовано для измерения pH в диапазоне от 4.5 до 7.5 в клетках HeLa. Некоторые GFPподобные белки, используемые как рациометрические рН сенсоры на основе измерения интенсивности флуоресценции, также могут быть использованы для измерений pH на основе FLIM. Батисти и др. продемонстировали работу Е²GFP для определения внутриклеточного pH [52]. Производные цианинового флуоресцентного белка СFP и красного флуоресцентного белка mKeima (pHRed) также показали зависимость времени жизни флуоресценции от рН [53, 54].

Еще одним фактором, влияющим на времена жизни флуоресценции, является локальная вязкость [55]. Для ее измерения с помощью FLIM используются, так называемые, флуоресцентные молекулярные роторы. Принцип работы этих молекул заключается в том, что в

возбужденном состоянии происходит вращение один из сегментов относительно одной из одиночных связей с образованием скрученной конформации. Скорость этого внутримолекулярного вращения сильно зависит от вязкости окружающей флуорофор среды. При этом излучательный переход молекулярного ротора конкурирует с безызлучательной релаксацией, связанной с внутримолекулярным вращением в возбужденном состоянии. В вязкой среде вращение замедляется, и, таким образом, время жизни флуоресценции ротора удлиняется, а квантовый выход флуоресценции возрастает. Среди молекулярных роторов соединения на основе BODIPY наиболее распространены в качестве сенсоров вязкости благодаря высокой чувствительности в широком диапазоне вязкостей (10-5000 сП), хорошему динамическому диапазону изменения времен жизни, независимости сигнала от температуры, простоте химической модификации и моноэкспоненциальному затуханию флуоресценции, позволяющему легко интерпретировать данные о временах жизни и переводить их в значения вязкости [56]. Измерения вязкости данным методом продемонстрированы на модельных мембранах, живых эукариотических и бактериальных клетках, а также модельных опухолях мышей in vivo [56-60]. Поскольку вязкость является одним из ключевых параметров регуляции морфологического и физиологического состояния клетки, ее визуализация с помощью FLIM привлекает все большее внимание исследователей.

Еще одним из фундаментальных физических параметров, который влияет на время жизни флуоресценции, является температура [61, 62]. Внутриклеточные температурные градиенты отражают термодинамику и функционирование клеточных компонент, поэтому измерение температуры на субклеточном уровне представляет большой интерес [63]. В работе Окабе и др. описаны новые чувствительные к температуре сенсоры, основанные на полимерах [2]. Принцип их работы заключается в том, при низких температурах чувствительный элемент сенсора находится в развернутом состоянии и его флуоресценция тушится молекулами воды. При высоких же температурах, этот элемент сворачивается (сжимается), освобождая молекулы воды, что приводит к усилению сигнала флуоресценции и увеличению ее времени жизни. Эти сенсоры были использованы во FLIM для картирования температуры в живых клетках с точностью 0.18°С.

Время жизни флуоресценции зависит и от показателя преломления среды, в которой находится флуорофор. Такие зависимости показаны, например, для флуоресцентных белков GFP, CFP и YFP [64–66]. Причина кроется в том, что константа скорости излучательного

перехода молекулы из возбужденного в основное состояние зависит от показателя преломления микроокружения. Показано, что из-за большего показателя преломления в мембране по сравнению с цитоплазмой, время жизни флуоресценции GFP укорачивается, если белок имеет мембранную локализацию [67]. Интересное исследование времени жизни флуоресценции GFP и tdTomato в зависимости от фаз клеточного цикла было проведено Плиссом и коллегами [68]. Они показали, что наибольшие времена жизни регистрируются в процессе митоза, однако по окончании клеточного деления они сильно укорачиваются. Возможной причиной для этого могли быть изменения в концентрации макромолекул в клетке и связанные с этим вариации показателя преломления. Эти работы указывают на то, что при интерпретации результатов, полученных с помощью FLIM флуоресцентных белков, показатель преломления среды, в которой находится белок, следует принимать во внимание.

Помимо вышеперечисленного, на время жизни флуоресценции влияет наличие поблизости наночастиц или металлических поверхностей [69]. В этом случае изменения времен жизни гораздо более сильные, нежели в случаях, перечисленных выше. В зависимости от положения флуорофора относительно металлической поверхности, времена жизни и квантовый выход флуоресценции могут либо увеличиваться, либо уменьшаться. Данный факт может быть использован для получения информации о расположении молекул относительно поверхностей не прибегая к сканирующей микроскопии ближнего поля (SNOM) или микроскопии, основанной на полном внутреннем отражении (TIRF) [70]. Это может быть полезно при исследованиях интернализации рецепторов при эндоцитозе [71].

Времена жизни фосфоресценции также зависят от окружения молекулы. Поскольку в фосфоресценции задействовано триплетное состояние молекулы, которое сильно взаимодействует с молекулярным кислородом, большинство фосфоресцентных комплексов могут быть использованы как кислородные сенсоры [72–76].

Необходимо учитывать, что измерения локальных параметров среды посредством люминесцентной микроскопии с временным разрешением достаточно просты, если речь идет об измерении их относительных изменений. Абсолютные измерения усложняются необходимостью выполнения калибровки сенсоров в условиях, максимально приближенных к биологическому образцу или непосредственно в биологическом объекте, например, на клеточной культуре.

ФЕРСТЕРОВСКИЙ РЕЗОНАСНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ (FRET)

Олним из важных применений FLIM на основе время-коррелированного счета фотонов является наблюдение межмолекулярных взаимодействий посредством Фёрстеровского резонансного переноса энергии FRET (Förster resonance energy transfer) [77]. Для того, чтобы произошел резонансный перенос энергии с одной возбужденной молекулы (донора) на другую (акцептор) требуются определенные условия. А именно: расстояние между донором и акцептором должно быть в пределах от 2 до 10 нм [78]. Известно, что эффективность переноса энергии, осуществляемой посредством безызлучательного дипольдипольного взаимодействия, обратно пропорциональна 6 степени расстояния между молекулами. Таким образом, FRET является своего рода «линейкой» для измерения межмолекулярных расстояний, где шкалой делений является Ферстеровское расстояние, определяемое как расстояние, на котором эффективность передачи энергии составляет 50%. Кроме того, для эффективного взаимодействия донора и акцептора спектр эмиссии донора должен перекрываться со спектром поглощения акцептора. Существенным фактором для эффективной передачи энергии также является определенная взаимная ориентация донора и акцептора.

Стандартные методы для измерения FRET основаны на измерениях только интенсивности флуоресценции донора и акцептора. Суть их состоит в том, что при взаимодействии молекул интенсивность флуоресценции донора падает, а акцептора – возрастает, поэтому эффективность FRET реакции измеряется по отношению интенсивностей донора и акцептора при возбуждении на длине волны поглощения донора [79]. Эти методы просты в реализации, но страдают от одного существенного недостатка: они зависят от концентрации донора и акцептора, которая варьирует в образце, и интенсивности падающего лазерного излучения. Напрямую измерить интенсивность флуоресценции акцептора, взаимодействующего с донором, представляется проблематичным, т.к. в спектральном диапазоне, в котором излучает акцептор, всегда присутствует также излучение донора (так называемая спектральная «утечка» донора). Более того, часть флуоресценции акцептора излучается из-за его возбуждения лазером, используемым для возбуждения донора. Таким образом, измерения FRET на основе интенсивностей флуоресценции требуют аккуратной калибровки, включая измерения образцов, содержащих только донор и только акцептор, и коррекции спектральной утечки. Дополнительную трудность представляет то, что не все молекулы донора взаимодействуют с молекулами акцептора. Следовательно, определить природу изменения эффективности FRET по интенсивности невозможно, поскольку она может изменяться



Рис. 7. Наблюдение FRET с помощью FLIM.

(А) Изображение клетки, содержащей FRET-пару GFP (донор)/Су3 (акцептор).
 (Б) Биэкспоненциальный анализ с временем жизни, усредненным по амплитуде, в области с высокой эффективностью FRET.

(В) Кривая затухания флуоресценции, соответствующая области с низкой эффективностью FRET.

Zeiss LSM 710 с аппаратурой Becker&Hickl Simple-Tau 152.

как за счет изменения расстояния между молекулами, так и за счет изменения фракции взаимодействующих молекул.

Использование FLIM для FRET измерений имеет очевидные преимущества. Главное преимущество состоит в том, что для измерения эффективности FRET достаточно измерить время жизни донора. В этом случае эффективность FRET рассчитывается по известной формуле 7:

$$E = 1 - (\tau_{\pi \Lambda} / \tau_{\pi}), \tag{7}$$

где τ_{AA} есть время затухания флуоресценции донора в присутствии акцептора; τ_A есть время затухания флуоресценции донора без акцептора. Взаимодействие донора с акцептором увеличивает скорость его перехода из возбужденного в основное состояние, то есть уменьшает время жизни его флуоресценции.

Таким образом, калибровочные измерения с акцептором не требуются, и необходимости проводить корректировку спектральной утечки нет. Единственное предварительное измерение, которое требуется – это измерение времени жизни флуоресценции донора в отсутствии акцептора [79, 80].

Пример FRET измерений, основанный на FLIM показан на рис. 7.

Надо отметить, что при измерениях FRET существует достаточно много подводных камней, которые могут привести к неправильной трактовке результатов экспериментов. В самом простейшем случае,

флуоресценция от донора может содержать вклад от флуоресценции эндогенных молекул. В некоторых случаях донор может взаимодействовать сразу с несколькими молекулами акцептора. Это приводит к тому, что изменения в эффективности FRET не связаны напрямую с изменениями в расстояниях между взаимодействующими молекулами и их количеством. В экспериментах с FRET следует избегать процессов фотодеструкции (фотобличинга) флуорофоров. Невзаимодействующие доноры сильнее подвержены фотобличингу, чем взаимодействующие. Следовательно, при фотобличинге измеряемая эффективность FRET может увеличиваться. Наконец, определенные трудности возникают при интерпретации измерений FRET, если кривая затухания флуоресценции невзаимодействующего донора описывается биэкспоненциальной зависимостью. В этом случае при фиттинге кривых затухания флуоресценции доноров определить процент взаимодействующих и невзаимодействующих протеинов не представляется возможным. Следует заметить, что данные проблемы касаются и FRET измерений, основанных на регистрации интенсивностей флуоресценции донора и акцептора. В любом случае, FLIM имеет преимущество перед альтернативными методами измерения FRET, т.к. разобраться в природе различных артефактов становится гораздо проще.

В литературе довольно редко приводятся результаты измерений расстояний между донором и акцептором ввиду неопределенности реального значения ферстеровского расстояния. Впрочем, абсолютные значения расстояний не так существенны, как собственно регистрация FRET и определение ее эффективности. В последнее время FLIM-FRET измерения находят широкое применение в молекулярной и клеточной биологии. Так FLIM-FRET использовался для изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках, взаимодействий белков и ДНК, лигандов и рецепторов, агрегации белков и их конформационных изменений, активности протеолитических ферментов [81–91]. Недавно методом трехфотонной FLIM-FRET были проведены исследования взаимодействий эндогенных флуорофоров триптофна и НАДН [92]. По сути все вышеперечисленные взаимодействия могут быть подразделены на два класса – первый, когда образуются FRET пары, и соответственно, происходит процесс передачи энергии от донора к акцептору, сопровождающийся уменьшением времени жизни флуоресценции донора (белок-белковые взаимодействия, взаимодействие белков и ДНК, лигандов и рецепторов, агрегации белков) и второй – когда происходит разрушение FRET пары с сопутствующим увеличением времени жизни флуоресценции донора (активность протеолитических ферментов).

ИЗМЕРЕНИЯ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

В случае регистрации автофлуоресценции биологических образцов традиционными методами – спектральными и флуоресцентными, но без временного разрешения – возникает проблема, связанная с тем, что клетки и ткани содержат много эндогенных флуорофоров, у которых спектры эмиссии сильно перекрываются, а их форма может зависеть от присутствия неизвестных хромофоров. Более того, спектры этих флуорофоров зачастую слабо чувствительны к изменениям в параметрах микроокружения. Таким образом, интерпретация данных при подобных измерениях становится нетривиальной задачей.

FLIM обычно рассматривается как один из эффективных методов для идентификации нескольких флуорофоров с разными временами жизни. Однако, наиболее сильной стороной FLIM при регистрации автофлуоресценции является не это, а то, что времена жизни многих эндогенных флуорофоров зависят от параметров локального окружения. Таким образом, автофлуроресцентные измерения, сделанные с помощью FLIM, позволяют не только разделять флуорофоры по временам жизни, но и получать важную информацию об их микроокружении.

Особенно интересными представляются измерения времен жизни флуоресценции метаболических кофакторов восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД), которые вовлечены в механизм электронного транспорта в энергетическом метаболизме клетки [93]. НАДН является донором, а ФАД – акцептором электронов в митохондриальной электрон-транспортной цепи. При этом НАДН флуоресцирует в восстановленной форме и теряет эту способность, когда окисляется до НАД+. ФАД флуоресцирует в окисленной форме и теряет способность флуоресцировать в восстановленной форме ФАДН₂. Отношение интенсивностей флуоресценции НАДН и ФАД изменяется с изменением редокс-статуса клеток. Понятие редокс-отношения как отношения интенсивностей НАДН и ФАД было введено Бриттоном Чансом и используется для анализа метаболизма клеток и тканей до настоящего времени [94].

Измерения редокс-отношения важны при рассмотрении эффекта Варбурга, который состоит в том, что раковые клетки используют гликолиз даже при наличии кислорода [95]. В этом случае, вклад восстановленной формы кофакторов в общую флуоресценцию будет увеличиваться [96–98] Однако интерпретация результатов редокс-отношения не всегда однозначна, поскольку изменения интенсивности флуоресценции, ассоциированные как с изменением

концентрации, так и с изменением квантового выхода, могут быть вызваны участием тех же кофакторов в других метаболических реакциях.

Важным свойством НАДН и ФАД является то, что времена жизни их флуоресценции зависят от их взаимодействия с белками. Затухание флуоресценции кофакторов имеет мультиэкспонециальный характер, но в упрощенном представлении анализируется как биэкспоненциальное. В случае НАДН, короткая компонента времени жизни соответствует его свободной форме, тогда как связывание с белками приводит к росту времени жизни [99, 100]. При этом время жизни длинной компоненты НАДН зависит от того, с каким ферментом он связан [101]. В случае ФАД, снижение времени жизни флуоресценции обусловлено тушением флуоресценции флавина адениновым кольцом [102]. Отношение вкладов короткой и длинной компонент затухания флуоресценции каждого из кофакторов меняется в зависимости от метаболического статуса клетки [96–98, 103].

Благодаря неинвазивности и отсутствию необходимости в использовании контрастных агентов и дополнительных меток, FLIM метаболических кофакторов НАДН и ФАД активно входит в медикобиологические исследования в качестве метода экспресс-оценки метаболического состояния клеток и тканей.

В целом ряде работ показано, что данный метод достаточно чувствителен к метаболическим изменениям, при канцерогенезе, и коррелирует со стандартными биохимическими и молекулярными показателями метаболизма [104, 105]. Показана перспектива применения FLIM флуоресцирующих кофакторов НАДН и ФАД для диагностики предраковых и раковых процессов [96, 106]. В работах [107–109] демонстрируются возможности метода для оценки раннего ответа опухолей на химиотерапию и таргетную терапию. Метод FLIM обнаруживает гетерогенную метаболическую реакцию на терапию на клеточном уровне, что может быть причиной устойчивости некоторых опухолей к лечению [98, 108]. FLIM НАДН был успешно использован для мониторинга метаболического статуса клеток в процессе апоптотический и некротической гибели [89, 110, 111].

Все большее внимание метаболические исследования методом FLIM получают в регенеративной медицине. Данные о времени жизни флуоресценции НАДН были использованы для исследования метаболизма живых кардиомиоцитов на ранних стадиях отторжения трансплантированного сердца [103].

Показаны значительные изменения времен жизни флуоресценции НАДН и ФАД при различных типах дифференцировки мезенхим-

ных стволовых клеток – хондрогенной, адипогенной, остеогенной [112–114]. В работе Мелешиной и др. по двухфотонной FLIM стволовых клеток при адипогенной дифференцировке был проведен отдельный анализ фосфорилированной и нефосфорилированной формы НАДН, который впервые показал увеличение вклада НАДФН в затухание флуоресценции, связанное с липогенезом [115]. В исследовании по оценке качества тканеинженерных конструктов кожи с помощью FLIM НАДН были обнаружены изменения в сторону окислительного метаболизма в клеточном компоненте в процессе формирования эквивалента из фибробластов или клеток дермальной папиллы и коллагена [116]. В недавней работе Кузнецовой и др. методом FLIM исследовался метаболизм гепатоцитов в *in vivo* модели холестаза печени [117]. Выявлены характерные изменения и пограничных зонах.

Дополнительная информация о метаболическом состоянии ткани может быть получена при комбинации измерений сигналов автофлуоресценции и второй гармоники. Было показано, что отношение интенсивности сигналов второй гармоники коллагена и автофлуоресценции эластина может служить индикатором старения кожи [118]. В работе М. Лукиной с соавт. впервые были исследованы характеристики сигналов второй гармоники от коллагена и флуоресценции НАДН в опухолях мышей в процессе лечения различными химиопрепаратами [109]. Было установлено, что при лечении цисплатином и паклитакселем содержание коллагена увеличивается, при этом также упорядочивается ориентация фибрилл. С другой стороны, при лечении иринотеканом наблюдаются противоположные процессы. Природа различного поведения коллагена при лечении различными препаратами до конца не ясна. Во всех случаях, однако, в процессе лечения опухолей было зарегистрировано уменьшение вклада свободной формы НАДН, свидетельствующее о сдвиге метаболизма в сторону окислительного варианта.

Стоит подчеркнуть, что метаболический имиджинг на основе регистрации флуоресценции эндогенных молекул представляет большой интерес для клинических приложений поскольку не требует маркировки клеток экзогенными флуорофорами и обладает высокой чувствительностью в регистрации метаболических изменений.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ПОСЛЕДНИЕ РАЗРАБОТКИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

За последнее десятилетие FLIM на основе время-коррелированного счета фотонов совершила большой прогресс. Несколько направлений стоить выделить особо. Это комбинация фосфоресцентной и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением [34, 119–122]. Благодаря разработке данной техники и синтезу большого количества сенсоров на кислород, стали возможны одновременное наблюдение метаболизма клеток и тканей, и оценка содержания кислорода в них. Данная комбинация измерений была впервые использована С. Калининой и др. для одновременного анализа метаболизма опухолевых клеток *in vitro* и парциального давления кислорода в них [120]. В условиях гипоксии отмечался рост времени жизни фосфоресценции внутриклеточного кислородного сенсора Ru(BPY), и уменьшение времени жизни флуоресценции $HAД(\Phi)H$, что свидетельствовало о существенных изменениях в редокс-статусе клеток. Одновременные измерения кислородного и метаболического статусов проводились также на опухолях мышей in vivo с использованием волоконной установки, что позволяло локально зондировать опухолевую ткань на глубину в несколько миллиметров [123].

Второе направление – люминесцентный время-разрешенный имиджинг макро-объектов. На сегодняшний день макро-FLIM реализован в виде конфокального макросканера, который позволяет получать изображения области до 18×18 мм и обеспечивает пространственное разрешение до 15 мкм. Применение этой технологии было продемонстрировано в недавних работах на опухолях мышей *in vivo* [91, 124]. Нами показано распределение времени жизни флуоресценции НАДН по всей опухоли, демонстрирующее метаболическую гетерогенность опухолевого узла и отличия метаболизма опухоли от окружающей нормальной ткани. Последнее наблюдение может быть особенно интересно с точки зрения клинического использования метода FLIM для определения границы резекции опухолей с помощью метаболического макро-имиджинга. Измерение времен жизни флуоресценции в опухоли на макроуровне также важно при изучении ее ответа на лечение. Одним из вариантов такого наблюдения является оценка активности каспазы-3 с помощью флуоресцентных генетически-кодируемых сенсоров на основе FRET. Так, в работе Жердевой и др. была выполнена прижизненная визуализация каспаза-3зависимого апоптоза в опухолевых ксенографтах *in vivo* при действии химиотерапии [91]. В работе Щеславского и др. показана возможность одновременной регистрации флуоресценции НАДН и флуоресценции генетически-кодируемого сенсора каспазы-3 в опухоли мышей in vivo [124].

В последнее время в оптической микроскопии активно ведутся разработки в области микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения [125]. Естественным в данным случае было бы скомбинировать высокое пространственное разрешение с молекулярным контрастом, обеспечиваемым FLIM. Впервые это было сделано группой Пола Френча в 2000 г, а позднее и в других лабораториях [126], посредством интеграции FLIM в STED микроскопы. Следует, однако, заметить, что флуорофоры, используемые для STED микроскопии, обычно нечувствительны к параметрам микроокружения, поэтому предстоит большая работа по созданию соответствующих флуоресцентных меток для использования во FLIM/ STED микроскопии.

Интересным вариантом использования FLIM является ее комбинация с микроскопией ближнего поля или атомно-силовой микроскопией [127, 128]. Подобная комбинация открывает перспективу одновременного изучения механических и молекулярных свойств образцов со сверхвысоким пространственным разрешением. Есть, однако, и в этом направлении свои трудности. Времена жизни флуоресценции в образце будут зависеть не только от микроокружения флуорофоров, но и от усиленного локального электромагнитного поля, образующегося на кончиках зондов, используемых в микроскопии ближнего поля и атомно-силовой микроскопии, а следовательно, потребуется аккуратный анализ причин изменения времен жизни.

Для исследователей в последнее время интерес представляет реализация FLIM в широкопольной микроскопии. Это возможно при использовании в качестве детекторов фотонов не стандартных ФЭУ или однофотонных лавинных фотодиодов, а позиционно-чувствительных ФЭУ или фотодиодов с линиями задержки [129]. В этом случае информация о координатах регистрации фотонов определяется временем прибытия импульсов на выходах этих линий задержки. Такой подход может быть использован также для микроскопии полного внутреннего отражения или листовой микроскопии, которые по своей природе широкопольные. Еще одним применением может быть одновременное измерение флуоресценции и фосфоресценции с маркерами, у которых времена жизни фосфоресценции находятся в миллисекундном диапазоне. Такие длинные времена в случае сканирующих систем подразумевают очень медленное сканирование. В случае же широкопольной микроскопии это не является проблемой. Широкопольная микроскопия с временным разрешением также может найти применение при изучении быстрых физиологических процессов в клетках. В этом случае возможный диапазон скоростей этих процессов не ограничен скоростью сканирования. По сравнению

В.И.Щеславскии и соавп

со сканирующими системами, однако, широкопольный вариант FLIM обладает недостатком, присущим всем системам микроскопии широкого поля: отсутствием подавления сигнала флуоресценции и рассеяния от областей вне фокуса. Это ограничивает использование данного варианта FLIM тонкими образцами с малым рассеянием.

Развитие более чувствительных и быстрых гибридных детекторов, основанных на комбинации элементов ФЭУ (катода) и лавинного фотодиода, позволило существенно уменьшить время сбора данных, измерять более быстрые времена затухания флуоресценции, что особенно важно для флуорофоров работающих в ближней ИК области, проводить эффективные измерения одиночных молекул методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии [130, 131]. Развитие детекторов в ближней ИК области (от 1200 нм), имеющих высокую квантовую эффективность (более 80%), высокое временное разрешение и низкий темновой ток, может позволить использовать их для имиджинга синглетного кислорода, что ранее представлялось проблематичным [132].

В последнее время наметилась тенденция развития FLIM на базе TCSPC, направленная на сверхбыструю регистрацию изображений. Следует отметить, однако, что очень часто в биологических экспериментах ограничивающим фактором является не скорость регистрации фотонов электроникой, а слабый поток фотонов, излучаемых образцом. Например, при метаболическом имиджинге НАДН типичные значения потока фотонов составляют не более 200 000 фотоотсчетов/с. При наблюдении флуоресцентных белков количество фотоотсчетов в секунду не превышает 500 000. Поэтому при всем желании быстрая электроника не может снять изображение быстро, если существует дефицит фотонов от образца. Для случаев же, когда поток фотонов достаточно большой, быстрое построение изображения может обеспечиваться использованием одного детектора и четырех плат счета одиночных фотонов, что реализовано, например, в системе FASTAC [133].

Дальнейший вектор развития TCSPC-FLIM вероятнее всего будет направлен в сторону активного внедрения метода в клинические исследования. На данный момент разработан офтальмологический сканер в комбинации с пикосекундными лазерами и TCSPC-FLIM системой. Он позволяет на основе анализа времени жизни автофлуоресценции эндогенных флуорофоров в зрачке глаза идентифицировать ранние стадии развития различных заболеваний глаза [134, 135]. Довольно обширным полем для использования TCSPC-FLIM в клинике является дифференциальная диагностика кожных заболеваний. Так, огромная работа проделана группой М. Робертса по имиджингу кожи человека, ее восприимчивости к различным заболеваниям и

изучению транспорта лекарственных препаратов, и влияния косметических средств на ее морфологию и функциональные свойства [136–138]. С использованием коммерческого томографа (MPT*flex*, JenLab, Germany) продемонстрировано, что анализ флуоресценции эндогенных флуорофоров с субклеточным разрешением с помощью многофотонной томографии позволяет идентифицировать рак кожи и другие патологии [139–141]. Наконец, использование FLIM методов в эндоскопии в сочетании с альтернативными методами диагностики (Оптическая Когерентная Томография, имиджинг на основе комбинационного рассеяния света, микроскопия второй и третьей гармоники) выглядит перспективно [142–145].

В заключение отметим, что в настоящее время люминесцентная микроскопия с временным разрешением может быть реализована в различных конфигурациях, выбор которых зависит от конкретной задачи. В идеале для получения максимальной информации установка должна позволять регистрировать все возможные параметры люминесценции – спектр, интенсивность, время жизни, поляризацию, и при этом обеспечивать высокую чувствительность на уровне одиночных фотонов, высокое пространственное разрешение и быстрый сбор сигнала. Комплексный анализ флуоресценции с высоким временным разрешением имеет принципиальное значение в фундаментальных биологических исследованиях, которые сейчас трудно представить без использования общирного арсенала флуоресцентных методов. Можно надеяться, что при современной динамике развития технологий FLIM скоро станет рутинным методом в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 3d ed. Springer, Singapur, 5–10.
- Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., Uchiyama, S. (2012) Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy, *Nat. Commun.*, 3, 705.
- Suhling, K. Siegel, J., Philips, D., French, P.M.W., Leveque-Fort, S., Webb, S.E.D., Davis, D.M. (2002) Imaging the environment of green fluorescent protein, *Biophys. J.*, 83, 3589–3595.
- Haidekker, M.A., Theodorakis, E.A. (2007) Molecular rotors-fluorescence

biosensors for viscosity and flow, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1669–1678.

- Nakabayashi, T. Wang, H.P., Kinjo, M., Ohta, N. (2008) Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements, *Photoch. Photobiol. Sci.*, 7, 668–670.
- Lakowicz, J.R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K. Johnson, M. (1992) Fluorescence lifetime imaging of calcium using Quin-2, *Cell Calcium*, 13, 131–147.
- Becker, W., Shcheslavskiy, V., Studier, H. (2015) TCSPC FLIM with different optical scanning techniques in Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications, Springer, Switzerland, 65–117.

- Dowling, K., Hyde, S.C.W., Dainty J.C., French, P.M.W., Hares, J.D. (1997) 2-D fluorescence lifetime imaging using a time-gated intensifier, *Opt. Comm.*, 135, 27–31.
- 9. Mitchell, A.C., Wall, J.E., Murray, J.G., Morgan, C.G. (2002) Measurement of nanosecond time-resolved fluorescence with a directly gated interline CCD camera, *J. Micros.*, **206**, 233–238.
- Becker, W., Hirvonen, L.M., Milnes, J., Conneely, T., Jagutzki, O., Netz, H., Smietana, S., Suhling, K. (2016) A wide-fileld TCSPC FLIM system based on an MCP PMT with a delay line anode, *Rev. Sci. Instr.*, 87, 093710.
- Becker, W. (2005), Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques, Springer, Berlin, Heidelberg, 11–26 p.
- Alfano, A.J., Fong, F.K., Lytle, F.E. (1983) High repetition rate subnanosecond gated photon counting, *Rev. Sci. Instr.*, 54, 967–972.
- Gerritsen, H.C., Asselbergs, M.A.H., Agronskaia, A.V., Van Sark, W.G.J.H.M. (2002) Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition, speed, photon economy and lifetime resolution, J. Micr., 206, 218–224.
- Becker, W. (2012), Fluorescence lifetime imaging –techniques and applications, J. Micr., 247, 119–136.
- Gratton, E., Breusegem S., Sutin, J., Ruan, Q., Barry, N. (2003) Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods, *J. Biomed. Opt.*, 8, 381–390.
- O'Connor, D.V., Philips, D. (1984) Time-correlated single photon counting, Academic Press, London, 36–54.
- Bollinger, L.M. Thomas, G.E. (1961) Measurement of the time dependence of scintillation intensity by a delayed coincidence method, *Rev. Sci. Instr.*, 32, 1044–1050.
- Vogel, S.S., Nguen, T.A., Blank, P.S., Wieb van der Meer, B. (2015) An introduction to Interpreting Time-

Resolved Fluorescence Anisotropy Curves, in *Advanced Time-correlated single photon counting*, Springer, Switzerland, 385–406.

- 19. Boemer, M. Wahl, M., Rahn, H-J., Erdmann, R., Enderlein, J. (2002) Time-resolved fluorescence correlation spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **353**, 439–445.
- 20. Thomson, R.M., Stevenson, R.M., Shields, A.J., Farrer, I., Lobo, C.J., Ritchie, D.A., Leadbeater, M.L., Pepper, M. (2001) Single-photon emission from exciton complexes in individual quantum dots, *Phys. Rev. B*, 64, 1–4.
- Becker, W., Bergmann, A., Biskup, C., Zimmer, T., Kloecker, N., Benndorf, K. (2002) Multiwavelength TCSPC lifetime imaging, *Proc. SPIE*, 4620, 79–84.
- Becker, W., Bergmann, A., Biskup, C. (2007) Multi-spectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC, *Micr. Res. Tech.*, **70**, 403–409.
- Digman, M.A., Caiolfa, V.R., Zamai, M, Gratton, E. (2008) The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis, *Biophys. J.*, 94, L14–L16.
- 24. Stringari, C., Cinquin, A., Cinquin, O., Digman, M.A., Donovan, J.P., Gratton, E. (2011) Phasor approach for fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **108**, 13582–13587.
- 25. Becker, W., (2017) The bh Handbook, 7th edition, Becker&Hickl GmbH, Berlin, 98 p.
- 26. Becker, W., Bergmann, A., Biscotti, G., Koenig, K., Riemann, I., Kelbauskas, L., Biskup, C. (2004) High speed FLIM data acquisition by timecorrelated single photon counting, *Proc. SPIE*, **5323**, 2735.
- 27. Becker, W., Su, B., Bergmann, A. (2009) Fast acquisition multispectral FLIM by parallel TCSPC, *Proc. SPIE*, **7183**, 718305.

- 28. Rück, A., Hulshoff, C., Kinzler, I., Becker, W., Steiner, R. (2007) SLIM: a new method for molecular imaging, *Micr. Res. Tech.*, 70, 485–492.
- 29. Chorvat, D., Chorvatova, A. (2009) Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues, *Las. Phys. Lett.* **6**, 175–193.
- 30. Rück, A., Hauser, C., Mosch, S., Kalinina, S. (2014) Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells, J. Biomed. Opt., 19, 096005.
- Singhal, G.S., Rabinovitch, E. (1969) Measurement of the fluorescence lifetime of chlorophyll *in vivo*, *Biophys. J.*, 9, 586–591.
- 32. Becker, W. (2015) DCS-120 confocal scanning FLIM systems, in *Handbook*, 6th edition, Becker&Hickl GmbH, Berlin, 108–109.
- Becker, W., Shcheslavskiy, V., Frere, S., Slutsky, I. (2014) Spatially resolved recording of transient fluorescence-lifetime effects by linescanning TCSPC, *Micr. Res. Tech.*, 77, 216–224.
- 34. Shcheslavskiy, V.I., Neubauer, A., Bukowiecki, R., Dinter, F., Becker, W. (2016) Combined fluorescence and phosphorescence lifetime imaging, *Appl. Phys. Lett.*, **108**, 091111.
- 35. Nakabayashi, T., Ohta, N. (2015) Sensing of intracellular environments by fluorescence lifetime imaging, *Anal. Sci.*, **31**, 275–285.
- 36. Suhling, K., Hirvonen, L.M., Levitt, J.A., Chung, P.H., Tregido, C., Le Marois, A., Rusakov, D., Zhengb, K., Ameer-Beg, S., Poland, S., Coelho, S., Henderson, R., Krstaji, N. (2015) Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, *Med. Phot.*, 27, 3–40.
- Biskup, C., Gensch, T. (2014) Fluorescence lifetime imaging of ions in biological tissues, in *Fluorescence*

Lifetime Spectroscopy and Imaging. Principles and Applications in Biomedical Diagnostics, ed. Elson D., French P.W.M., Marcu, L., Taylor& Francis, Boca Raton, 497–535.

- 38. Kaneko, H., Putzier, I., Frings, S., Kaupp, U.B., Gensch, T. (2004) Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons, *J. Neurosci.*, 24, 7931–7938.
- 39. Funk, K., Woitecki, A., Franjic-Würtz, C., Gensch, T., Möchrlein, F., Frings, S. (2008) Modulation of chloride homeostasis by inflammatory mediators in dorsal ganglion neurons, *Mol. Pain*, 4, 32.
- 40. Gensch, T., Untiet, V., Franzen, A., Kovermann, P., Fahlke, C. (2015) Determination of Intracellular Chloride Concentrations by Fluorescence Lifetime Imaging in Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications, ed. Becker, W., Springer, Switzerland, 189–211.
- 41. Herman, B., Wodnicki, P., Kwon, S., Periasami, A., Gordon G.W., Mahajan, N., Xue Feng, W. (1997) Recent developments in monitoring calcium and protein interactions in cells using fluorescence lifetime microscopy, J. Fluoresc., 7, 85–92.
- 42. Wilms, C.D., Eilers, J. (2007) Photo-physical properties of Ca²⁺-indicator dyes suitable for two-photon fluorescence lifetime recordings, *J. Micr.*, **225**, 209–213.
- 43.Lahn, M., Dosche, C., Hille, C. (2011) Two-photon microscopy and fluorescence lifetime imaging reveal stimulus-induced intracellular Na⁺ and Cl⁻ changes in cockroach salivary acinar cells, Am. J. Physiol.-Cell Physiol., **300**, C1323–C1336.
- 44. Szmacinski, H., Lakowicz, J.R. (1997) Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime, *Anal. Biochem.*, **250**, 131–138.
- 45. Gilbert, D., Franjic-Würtz, C., Funk, K., Gensch, T., Frings, S., Möhrlein, F. (2007) Differential maturation

of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **25**, 479–489.

- 46. Kuchibholta, K.V., Lattarulo, C.R., Hyman, B.T., Bacskai, B.J. (2009) Synchronous hyperactivity and intracellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice, *Science*, **323**, 1211–1215.
- 47. Lin, H.-J., Szmacinski, H., Lakowicz, J.R. (1999) Lifetime-based pH sensors: indicators for acidic environments, *Anal. Chem.*, 269, 162–167.
- 48. Sanders, R., Draaijer, A., Gerritsen, H.C., Houpt, P.M., Levine, Y.K. (1995) *Anal. Biochem.*, **227**, 302–308.
- 49. Lin, H.-J., Herman, P., Lakowicz, J.R. (2003) Fluorescence lifetimeresolved pH imaging of living cells, *Cytometry Part A*, **52A**, 77–89.
- 50. Orte, A., Alvarez-Pez, J.M., Ruedas-Rama, M.J. (2013) Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of intracellular pH with quantum dots nanosensors, *ACS Nano*, 7, 6387–6395.
- 51. Germond, A., Fujita, H., Ichimura, T., Watanabe, T.M. (2016) Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters, *Biophys. Rev.*, 8, 121–138.
- 52. Battisti, A., Digman, M.A., Gratton, E., Storti, B., Beltram, F., Bizzari, R. (2012) Intracellular pH measurements made simple by fluorescent protein probes and the phasor approach to fluorescence lifetime imaging, *Chem. Comm.*, 48, 5127–5129.
- 53. Poea-Guyon, S., Pasquier, H., Merola, F., Morel, N., Erard, M. (2013) The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging, *Analyt. Bioanalyt. Chem.*, **405**, 3983–3987.
- 54. Tantama, M., Hung, Y.P., Yellen, G. (2011) Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor, J. Am. Chem. Soc., 133, 10034–10037.

- 55. Haidekker, M.A., Nipper, M., Mustafic, A., Lichlyter, D., Dakanali, M., Teodarakis, E.A. (2010) Dyes with segmental mobility: molecular rotors, in *Advanced Fluorescence Reportes in Chemistry and Biology I. Fundamentals and Molecular Design*, ed. by Demchenko, A.P., Springer, Berlin, 267–308.
- 56. Kuimova, M., Yahioglu, G., Levitt, J.A., Suhling, K. (2008) Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging, J. Am. Chem. Soc., 130, 6672–6673.
- 57. Hosny, N.A., Mohamedi, G., Rademeyer, P., Owen, J., Wu, Y., Tang, M.X., Eckersley, R.J., Stride, E., Kuimova M.K. (2013) Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 9225–9230.
- 58. Loison, P., Hosny, N.A., Gervais, P., Champion, D., Kuimova, M.K., Perrier-Cornet, J.M. (2013) Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of Bacillus spores: a molecular rotor/FLIM study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1828, 2436–2443.
- 59. Shimolina, L.E., Izquierdo, M.A., Lopez-Duarte, I., Bull, J.A., Shirmanova, M.V., Klapshina, L.G., Zagaynova, E.V., Kuimova, M.K. (2017) Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors, *Sci. Rep.*, 7, 41097.
- 60. Shirmanova, M.V. Shimolina, L.E., Lukina, M.M, Zagaynova, E.V., Kuimova, M.K. (2017) Live Cell Imaging of Viscosity in 3D Tumor Cell Models in *Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1035**, Springer, 143–153.
- 61. Patel, D., Franklin, K.A. (2009) Temperature-regulation of plant architecture, *Plant Signal Behav.*, **4**, 577–579.
- 62. Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L.C., Breibart, H., Eisenbach, M., (2003) Thermotaxis

of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract, *Nat. Med.*, **9**, 149–150.

- 63. Lowell, B.B., Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis, *Nature*, **404**, 652–660.
- 64. Suhling, K., Siegel, J., Philips, D., French, P.M.W., Leveque-Fort, S., Webb, S.E.D., Davis, D.M. (2002) Imaging the environment of green fluorescent protein, *Biophys. J.*, **83**, 3589–3595.
- 65. Tregidgo, C., Levitt, J.A., Suhling, K. (2008) Effect of refractive index on the fluorescence lifetime of green fluorescent protein, *J. Biomed. Opt.*, 13, 031218.
- 66.Borst, J.W., Hink, M.A., Hoek, A., Visser, A.J. (2005) Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins, *J. Fluores.*, **15**, 153–160.
- 67. van Manen H.J., Verkuijlen, P., Wittendorp, P., Subramaniam, V., van den Berg, T.K., Roos, D., Otto, C. (2008) Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biophys. J.*, 94, L67–L69.
- 68. Pliss, A., Zhao, L.L., Ohulchanskyy, T.Y., Qu, J.L., Prasad, P.N. (2012) Fluorescence lifetime of fluorescent proteins as an intracellular environment probe sensing the cell cycle progression, ACS Chem. Biol., 7, 1385–1392.
- 69. Fort, E., Gresillon, S. (2008) Surface enhanced fluorescence, J. Phys. D-Appl. Phys., **41**, 013001.
- 70. Kawata, S., Inouye, Y., Ichimura, T. (2004) Near-field optics and spectroscopy for molecular nanoimaging, *Sci. Prog.*, 87, 25–49.
- 71. Cade, N.I., Fruhwirth, G., Archibald, S.J., Richards, D. (2010) A cellular screening assay using analysis of metal-modified fluorescence lifetime, *Biophys. J.*, 98, 2752–2757.

- 72.Dmitriev, R.I., Papkovsky, D.B. (2012) Optical probes and techniques for O2 measurement in live cells and tissue, *Cell. Mol. Life Sci.*, 69, 2025–2039.
- 73. Dunphy, I, Vinogradov, S.A., Wilson, D.F. (2002) Oxyphor R2 and G2: phosphors for measuring oxygen by oxygen-dependent quenching of phosphorescence, *Anal. Biochem.*, **310**, 191–198.
- 74. Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S., Takeuchi, T. (2010) Phosphorescent light – emitting iridium complexes serve as a hypoxia sensing probe for tumor imaging in living animals, *Cancer Res.*, **70**, OF1–OF9.
- 75. Koshel, E.I., Chelushkin, P.S., Melnikov, A.S., Serdobintsev, P.Y., Stolbovaia, A.Y., Saifitdinova, A.F., Shcheslavskiy, V.I., Chernavskiy, O., Gaginskaya, E.R., Koshevoy, I.O, Tunik, S.P. (2017) Lipophilic phosphorescent gold (1) clusters as selective probes for visualization of lipid droplets by two-photon microscopy, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 332, 122–130.
- 76. Solomatina, A.I., Chelushkin, P.S., Krupenya, D.V., Podkorytov, I.S., Artamonova, T.O., Sizov, V.V., Melnikov, A.S., Gurzhiy, V.V., Koshel, E.I., Shcheslavskiy, V.I., Tunik, S.P. (2017) Coordination to imidazole ring switches on phosphorescence of platinum cyclometalated complexes: the route to selective labelling of peptides and proteins via histidine residues, *Biocon. Chem.*, 28, 426–437.
- Förster, Th. (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz, *Naturwissen*schaften, 6, 166–175.
- 78. Cleg, R.M. (2006) The history of FRET: from conception through the labors of birth in *Reviews in Fluorescence*, ed. Geddes, C.D., Lakowicz, J.R., Springer, New York, 1–45.
- 79. Periasami, A., Day, R.N. (2005) Molecular Imaging: FRET Microscopy and

Spectroscopy, Oxford University Press, New York, 21–56.

- 80. Periasami, A., Mazumder, N., Sun, Y., Christopher, K.G., Day, R.N. (2015) FRET Microscopy: Basics, Issues, and Advantages of FLIM-FRET Imaging, in *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, Springer, Heidelberg, 189–276.
- 81. Lleres, D., Swift, S., Lamond, A.I. (2007) Detecting protein-protein interactions *in vivo* with FRET using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Cur. Protoc. Cytom.*, **42**, 10.1–12.10.19.
- 82. Cremazy, F.G., Manders, E.M., Bastianes, P.I., Kramer, G., Hager, G.L., van Munster, E.B., Verschure, P.J., Gadella, T.J., van Driel, R. (2005) Imaging in situ protein-DNA interactions in the cell nucleos using FRET-FLIM, *Exp. Cell. Res.*, **309**, 390–396.
- 83. Abe, K., Zhao, L., Periasami, A., Intes, X., Barroso, M. (2013) Noninvasive *in vivo* imaging of near infrared-labeled transferrin in breast cancer cells and tumors using fluorescence lifetime FRET, *PLOS ONE*, 8, e80269.
- 84. Meshri, S.E., Dujardin, D., Godet, J., Richert, L., Boudier, C., Darlix, J.L., Didier, P., Mely, Y., de Rocquigny, H. (2015) Role of the nucleocapsid domain in HIV-1 Gag oligomerization and trafficking to the plasma membrane: A fluorescence lifetime imaging microscopy investigation, J. Mol. Biol., 427, 1480–1494.
- 85. Ghukassian, V., Hsu, Y.-Y., Kung, S.-H., Kao, F.-J. (2007) Application of fluorescence resonance energy transfer resolved by fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of enterovirus 71 infection in cells, J. Biomed. Opt., 12, 0240161–0240168.
- 86. Calleja, V., Ameer-Beg, S.M., Vojnovic, B., Woschelski, R., Down-

ward, J., Larijani, B. (2003) Monitoring conformational changes of proteins in cells by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Biochem. J.*, **372**, 33–40.

- 87. Börsch, M., Diez, M., Zimmerman, B., Reuter, R., Graber, P. (2002) Stepwise rotation of of the γ -subunit of EF₀F₁-ATP synthase observed by intramolecular single-molecule fluorescence resonance energy transfer, *FEBS Lett.*, **527**, 147–152.
- 88. Bacskai, B.J., Skoch, J., Hickey, G.A., Allen, R., Hyman, B.T. (2003) Fluorescence resonance energy transfer determinations using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy to characterize amyloid-beta palques, J. Biomed. Opt., 8, 368–375.
- 89. Savitsky, A.P., Rusanov, A.L., Zherdeva, V.V., Gorodnicheva, T.V., Khrenova, M.G., Nemukhin, A.V. (2012) FLIM-FRET Imaging of Caspase-3 Activity in Live Cells Using Pair of Red Fluorescent Proteins, *Theranostics*, 2, 215–226.
- 90. Sergeeva, T.F., Shirmanova, M.V., Zlobovskaya, O.A., Gavrina, A.I., Dudenkova, V.V., Lukina, M.M., Lukyanov, K.A., Zagaynova, E.V. (2017) Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 604–611.
- 91. Zherdeva, V.V., Kazachkina, N.I., Shcheslavskiy, V.I., Savitsky, A.P. (2018) Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts, J. Biomed. Opt., 23, 035002.
- 92. Jyothikumar, V., Sun, Y., Periasami, A. (2013) Investigation of tryptophan-NADH in live human cells using 3-photon fluorescence lifetime imaging, J. Biomed. Opt., 18, 060501.
- 93. Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, 191, 144–148.

- 94. Chance, B. Schoener, B. Oshino, R., Itshak, F., Nakaze, Y. (1979) Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals, *J. Biol. Chem.*, 254, 4764–4771.
- Warburg, O. (1956) On respiratory impairment in cancer cells, *Science*, 124, 269–270.
- 96. Skala, M.C., Riching, K.M., Gendron-Fitzpatrick, A., Eickhoff, J., Eliceiri, K.W., White, J.G., Ramanujam, N. (2007) In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **104**, 19494–19499.
- 97. Walsh, A.J., Cook, R.S., Manning, H.C., Hicks, D.J., Lafontant, A., Arteaga, C.L., Skala, M.C. (2013) Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, subtypes, and early-treatment response in breast cancer, *Cancer Res.*, **73**, 6164–6174.
- 98. Lukina, M.M, Dudenkova, V.V, Ignatova, N.I., Druzhkova, I.N., Shimolina, L.E., Zagaynova, E.V., Shirmanova, M.V. (2018) Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 1693–1700.
- 99. Lakowicz, J.R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., and Johnson, M.L. (1992) Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **89**, 1271–1275.
- 100. Paul, R.J., Schneckenburger, H. (1996) Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yest: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy, *Naturwissenschaften*, 83, 32–35.

- 101. Sharik, J.T., Favreau, P.F., Gillette, A.A., Sdao, S.M., Merrins, M.J., Skala, M.C. (2018) Protein-bound NAD(P)H lifetime is sensitive to multiple fates of glucose carbon, *Sci. Rep.*, **8**, 5456.
- 102. van den Berg, P.A.W, Feenstra, K.A., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C., Visser, A.J.W.G. (2002) Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics, J. Phys. Chem. B, 106, 8858–8869.
- 103. Chorvat, D., Chrorvatova, A. (2006) Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes, *Eur. Biophys. J.*, 36, 73–83.
- 104. Qu, Y., Heikal, A.A. (2009) Twophoton autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level, *J. Photochem. Photobiol. B*, **95**, 46–57.
- 105. Shah, A.T., Beckler, M.D., Walsh, A.J., Jones, W.P., Pohlmann, P.R., Skala, M.C. (2014) Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma, *PLOS ONE*, 9, e90746.
- 106. Zagaynova, E., Shirmanova, M., Lukina, M., Dudenkova, V., Ignatova, N., Elagin, V., Shlivko, I., Shcheslavskiy, V., Orliskay, N. (2018) Metabolic imaging of tumor for diagnosis and response for therapy, *Proc. SPIE*, **10498**, 1049804.
- 107. Shirmanova, M.V., Druzhkova, I.N., Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Ignatova, N.I., Snopova, L.B., Shcheslavskiy, V.I., Beloisov, V.V., Zagaynova, E.V. (2017) Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic

landscape of cancer cells in vitro and in vivo, *Sci. Rep.*, 7, 8911.

- 108. Alam, S.R., Wallrabe, H., Svindrych, Z., Chaudhary, A.K., Christopher, K.G., Chandra, D., Periasami, A. (2017) Investigation of mitochondrial metabolic response to doxorubicin in prostate cancer cells: an NADH, FAD and tryptophan FLIM assay, *Sci. Rep.*, 7, 10451.
- 109. Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Shimolina, L.E., Snopova, L.B., Zagaynova, E.V., Shirmanova, M.V. (2019) In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy, *Cytometry A* (accepted).
- 110. Wang, H.W., Ghukassian, V., Chen, C.T., Wei, Y.H., Guo, H.W., Yu, J.S., Kao, F.J. (2008) Differentiation of apoptosis from necrosis by dynamic changes of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence lifetime in live cells, J. Biomed. Opt., 13, 054011.
- 111. Sanchez, W.Y., Prow, T.W., Sanchez, W.H., Grice, J., Roberts, M.S. (2010) Analysis of the metabolic deterioration of ex vivo skin from ischemic necrosis through the imaging of intracellular NAD(P)H by multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging microscopy, J. Biomed. Opt., 15, 046008.
- 112. König, K., Uchugonova, A., Gorjup, E. (2011) Multiphoton fluorescence lifetime imaging of 3D-stem cell spheroids during differentiation, *Micros. Res. Tech.*, 74, 9–17.
- 113. Meleshina, A.V., Dudenkova, V.V., Bystrova, A.S., Kuznetsova, D.S., Shirmanova, M.V., Zagaynova, E.V. (2017) Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chromogenic differentiation, *Stem Cell Res. Ther.*, 8, 15.
- 114. Meleshina, A.V., Dudenkova, V.V., Shirmanova, V.V., Bystrova, A.S., Zagaynova, E.V. (2016) Multiphoton fluorescence lifetime ima-

ging of metabolic status in mesenchymal stem cell during adipogenic differentiation, *Proc. SPIE*, **9712**, 97121T.

- 115. Meleshina, A.V., Dudenkova, V.V., Shirmanova, M.V., Shcheslavskiy, V.I., Becker, W., Bystrova, A.S., Cherkasova, E.I., Zagaynova, E.V. (2016) Probing metabolic states of differentiating stem cells using twophoton FLIM, *Sci. Rep.*, 6, 21853.
- 116. Meleshina, A.V., Rogovaya, O.S., Dudenkova, V.V., Sirotkina, M.A., Lukina, M.M., Bystrova A.S., Krut V.G., Kuznetsova, D.S., Kalabusheva, E.P., Vasiliev, A.V., Vorotelyak, E.A., Zagaynova, E.V. (2018) Multimodal label-free imaging of living dermal equivalents including dermal papilla cells, *Stem Cell Res. Ther.*, 9, 84.
- 117. Kuznetsova, D.S., Dudenkova, V.V., Rodimova, S.A., Bobrov, N.V., Zagainov, V.E., Zagaynova, E.V. (2018) In vivo multiphoton and fluorescence lifetime imaging microscopy of the healthy and cholestatic liver, *Proc. SPIE*, **10498**, 1049827.
- 118. Koehler, M.J., König, K., Elsner, P., Bückle, R., Kaatz, M. (2006) In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography, *Opt. Lett.*, **31**, 2879– 2881.
- 119. Becker W., Shcheslavskiy, V., Rück, A. (2017) Simultaneous phosphorescence and fluorescence lifetime imaging by multi-dimensional TCSPC and multi-pulse excitation, *Advan. Exp. Med. Biol.*, **1035**, 19–30.
- 120. Kalinina, S., Breymayer, J., Schäfer, P., Calzia, E., Shcheslavskiy, V., Becker W., Rück, A. (2016) Correlative NAD(P)H-FLIM and oxygen sensing-PLIM for metabolic mapping, J. Biophot., 9, 800–811.
- 121. Solomatina, A.I., Su, S.H., Lukina, M.M., Dudenkova, V.V., Shcheslavskiy, V.I., Wu, C.H., Chelushkin, P.S., Chou, P.T., Koshevoi, I.O., Tunik, S.P. (2018) Water-soluble

cyclometalated platinum(II) and iridium(III) complexes: synthesis, tuning of the photophysical properties, and in vitro and in vivo phosphorescence lifetime imaging, *RCS Adv.*, **8**, 17224–17236.

- 122. Kalinina, S., Breymayer, J., Reeβ, K., Lilge, L., Mandel, A., Rück, A. (2018) Correlation of intracellular oxygen and cell metabolism by simultaneous PLIM of phosphorescent TLD1433 and FLIM of NAD(P)H, J. Biophot., Jun 7: e201800085.
- 123. Lukina, M., Orlova, A., Shirmanova, M., Shirokov, D., Pavlikov, A., Neubauer, A., Studier, H., Becker, W., Zagaynova, E., Yoshihara, T., Tobita, S., Shcheslavskiy, V. (2017) Interrogation of metabolic and oxygen states of tumors with fiberbased luminescence lifetime spectroscopy, Opt. Lett., 42, 731–734.
- 124. Shcheslavskiy, V.I., Shirmanova, M.V., Dudenkova, V.V., Lukyanov, K.A., Gavrina, A.I., Shumilova, A.V., Zagaynova, E.V., Becker, W. (2018) Fluorescence time-resolved macroimaging, Opt. Lett., 43, 3152–3155.
- 125. Hell, S. W. (2010) Far-field optical nanoscopy. Springer Series in Chemical Physics, 96, 365–398.
- 126. Auksorius, E., Boruah, B.R., Dunsby, C., Lanigan, P.M.P., Kennedy, G., Neil, M.A.A., French, P.M.W. (2008) Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging, *Opt. Lett.*, **33**, 113–115.
- 127. Cadby, A., Dean, R., Fox, A.M., Jones, R.A.L., Lidzey, D.G. (2005) Imaging the fluorescence decay time of a conjugated polymer in a phaseseparated blend using a scanning near-field optical microscope, *Nanolett.*, 5, 2232–2237.
- 128. Micic, M., Hu, D., Suh, Y.D., Newton, G., Romine, M., Lu, H.P. (2004) Correlated atomic force microscopy

and fluorescence lifetime imaging of live bacterial cells, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **34**, 205–212.

- 129. Hirvonen, L.M., Becker, W., Milnes, J., Conneely, T., Smietana, S., Le Marois, A., Jagutzki, O., Suhling, K. (2016) Picosecond wide-field timecorrelated single photon counting fluorescence microscopy with a delay line anode detector, *Appl. Phys. Lett.*,**109**, 071101.
- Becker, W., Shcheslavskiy, V. (2015) Fluorescence lifetime imaging with near-infrared dyes, *Photon. Las. Med.*, 4, 73–83.
- Ivanov, D., Shcheslavskiy, V., Märki, I., Leutenegger, M., Lasser, T. (2009) High volume confinement in two-photon total-internal-reflection fluorescence correlation spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 94, 083902.
- 132. Shcheslavskiy, V.I, Morozov, P., Divochiy, Vakhtomin, Yu., Smirnov, K., Becker, W. (2016) Ultrafast time mesurements by time-correlated single photon counting coupled with superconducting single photon detector, *Rev. Sci. Instr.*, 87, 053117.
- 133. Becker, W. (2018) Fast acquisition TCSPC FLIM system with sub-25ps IRF width, *Appl. Note*, www. becker-hickl.de.
- 134. Jentsch, S., Schweitzer, D., Schmidtke, K.U., Peters, S., Dawczynski, J., Bär, K.J., Hammer, M. (2014) Retinal fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy measures depend on the severity of Alzheimer's disease, *Acta Ophtalmologica*, **93**, e241–e247.
- 135. Dysli, C., Wolf, S., Berezin, M.Y., Sauer, L., Hammer, M., Zinkernagel, M.S. (2017) Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy, *Prog. Retin. Eye Res.*, **60**, 120–143.
- 136. Leite-Silva, V.R., Le Lamer, M., Sanchez, W.Y., Liu, D.C., Sanchez, W.H., Morrow, I., Martin, D., Silva, H.D.T., Prow, T.W., Grice, J.E., Roberts, M.S. (2013) The effect on formulation on the penetration

of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 84, 297–308.

- 137. Roberts, M.S., Roberts M.J., Robertson, T.A., Sanchez, W., Thörling, C., Zou, W., Zhao, X., Becker, W., Zvyagin, A.V. (2008) In vitro and in vivo imaging of xenobiotic transport in human skin and in the rat liver, *J. Biophoton.*, 1, 478–493.
- 138. Prow, T.W., Grice, J.E., Lin, L.L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., Wurm, E.M.T., Yoong, C., Robertson, T.A., Soyer, H.P., Roberts, M. (2011) Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, Adv. Drug. Deliv. Rev., 63, 470–491.
- 139. Seidenari, S., Arginelli, F., Bassoli, S., Cautela, J., French, P.M.W., König, K., Magnoni, C., Talbot, C., Ponti, G. (2013) Multiphoton Laser Tomography and Fluorescence Lifetime Imaging of Melanoma: Morphologic Features and Quantitative Data for Sensitive and Specific Non-Invasive Diagnostics, *PLOS ONE*, 8, e70682.
- 140. Huck, V., Gorzelanni, C., Thomas, K., Getova, V., Niemeyer, V., Zens, K., Unnerstall, T.R., Feger, J.S., Fallah, M.A., Metze, D., Ständer, S., Luger, T.A., König, K., Mess, C., Schneider, S.W. (2016) From morphology to biochemical state – intravital multiphoton fluorescence

lifetime imaging of inflamed human skin, *Sci. Rep.*, **6**, 22789.

- 141. Balu, M., Zachary, C.B., Harris, R.M., Krasieva, T.B., König, K., Tromberg, B.J., Kelly, K.M. (2015) In Vivo Multiphoton Microscopy of Basal Cell Carcinoma, *JAMA Dermatol.*, **151**, 1068–1074.
- 142. Gora, M.J., Suter, M.J., Tearney, G.J., Li, X. (2017) Endoscopic optical coherence tomography: technologies and clinical applications, *Biomed. Opt. Express*, **8**, 2405–2444.
- 143. Lombardini, A., Mutskaniuk, V., Sivankutty, S., Andresen, E.R., Chen, X., Wenger, J., Fabert, M., Joly, N., Louradour, F., Kudlinski, A., Rigneault, H. (2018) High-resolution multimodal flexible coherent Raman endoscope, *Light: Science & Applications*, 7, 10.
- 144. Yakovlev, V.V, Shcheslavskiy, V., Ivanov, A. (2002) High-energy femtosecond Cr4+:forsterite oscillators and their applications in biomedical and material sciences, *Applied Physics B: Lasers and Optics*, **74**, s145–s152.
- 145. Shcheslavskiy, V.I., Saltiel, S.M., Faustov, A., Petrov, G.I., Yakovlev, V.V. (2005) Third-harmonic Rayleigh scattering: Theory and experiment, *Journal of the Optical Society* of America B: Optical Physics, 22, 2402–2408.