Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 139-180

МНОГОФОТОННАЯ МИКРОСКОПИЯ С ЭНДОГЕННЫМ КОНТРАСТОМ: ПРИРОДА ФЛУОРОФОРОВ И ВОЗМОЖНОСТИ В ИССЛЕДОВАНИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

©2019 г.

Б. А. ШИРШИН^{1,2}*, Б. П. ЯКИМОВ¹, М. Е. ДАРВИН³, Н. П. ОМЕЛЬЯНЕНКО⁴, С. А. РОДИОНОВ⁴, Ю. И. ГУРФИНКЕЛЬ⁵, Ю. ЛАДЕМАНН³, В. В. ФАДЕЕВ¹, А. В. ПРИЕЗЖЕВ¹

¹ Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва ² Институт спектроскопии РАН, Троицк, Москва ³ Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Берлин

⁴ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

⁵ Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Метод многофотонной микроскопии. III. Природа эндогенных молекул-репортеров при реализации МФМ: источники автофлуоресценции и оптических гармоник. IV. Некоторые применения МФМ для исследования биохимических процессов в соединительной ткани и биомедицинской диагностике. V. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно развиваются оптические методы диагностики, позволяющие изучать процессы в живых организмах на молекулярном и клеточном уровнях. Одним из таких методов является

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; АФ – автофлуоресценция; ГВГ – генерация второй гармоники; ГТГ – генерация третьей гармоники; ДФ – двухфотонное; ИК – инфракрасный; КАРС – комбинационное антистоксовое рассеяние света; МИ – метаболический имиджинг; НАД – никотинамиддинуклеотид; НАДФ – никотинамиддинуклеотидфосфат; НАД^F/НАД^B – свободная/связанная форма НАД; МФМ – многофотонная микроскопия; ОФ – окислительное фосфорилирование; СК – стволовые клетки; УФ – ультрафиолетовый; ФАД – флавинадениндинуклеотид; ФП – флавопротеин; AGEs – Advanced Glycation End-products; FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging; TCSPC – Time-Correlated Single Photon Counting.

^{*}Адрес для корреспонденции: shirshin@lid.phys.msu.ru

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант №18-15-00422).

Е.А.ширшин и соивт	вт.
--------------------	-----

многофотонная микроскопия (МФМ, или многофотонная томография [1]) с визуализацией времени затухания флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM [2, 3]). Основным преимуществом МФМ как метода молекулярного имиджинга является высокое пространственное разрешение в совокупности с большей глубиной проникновения в ткань [4, 5]. МФМ применяется в иммунологии, онкологических исследованиях, нейробиологии, при этом используются различные метки, позволяющие увеличить интенсивность сигнала, его специфичность и глубину имиджинга [4, 6-8]. Однако, экзогенные метки технически сложно применить для исследования соединительной ткани человека in vivo, и в этом случае использование эндогенных источников информативного сигнала значительно упрощает решаемую задачу. Более того, оказалось, что в ряде случаев использование эндогенного сигнала позволяет не только визуализировать распределение молекул определенного типа в ткани, но и исследовать протекающие в ней биохимические процессы - в частности, широкое распространение получил так называемый флуоресцентный метаболический имиджинг [9, 10].

В МФМ источниками эндогенного сигнала являются: молекулыфлуорофоры, излучающие флуоресценцию при многофотонном возбуждении, анизотропные макромолекулы и структуры, обеспечивающие генерацию оптических гармоник, любые молекулы, внутримолекулярные колебания в которых могут быть использованы в методе когерентной антистоксовой Рамановской спектроскопии [11]. Эндогенная флуоресценция (или автофлуоресценция (АФ)) – классический эффект, десятилетиями используемый в биомедицинской диагностике и подробно описанный в монографиях и обзорах [12–14]. В целом, в МФМ используются те же группы флуорофоров, что и в классической флуоресцентной спектроскопии, тем не менее, имеется ряд особенностей, которые лежат в основе подходов к исследованию биохимических процессов и молекулярному имиджингу. Генерация оптических гармоник является нелинейным эффектом и позволяет осуществлять визуализацию структур с определенной организацией – например, коллагена типа I и клеток в ткани [15]. Использование мультимодального детектирования в МФМ, основанного на одновременном измерении АФ, генерации гармоник и FLIM, позволяет существенно расширить возможности молекулярного имиджинга как для фундаментальных исследований биохимических процессов, так и для целей in vivo диагностики.

Целью данного обзора являлось описание фотофизических процессов в основных молекулах-репортерах, используемых в МФМ с эндогенным контрастом (label-free), а также изложение некоторых

современных экспериментов, иллюстрирующих возможности labelfree МФМ для молекулярного имиджинга биохимических процессов в соединительной ткани.

II. МЕТОД МНОГОФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ

НЕЛИНЕЙНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Оптическая микроскопия использует свет в качестве зондирующего излучения – по характеристикам его взаимодействия с веществом делается вывод о строении изучаемого объекта. Взаимодействие света с веществом можно представить следующим образом. Падающий на материальную среду свет приводит к перераспределению электронной плотности в атомах. Свет поглощается, а колебания электронной плотности сами становятся источниками вторичных световых волн. Характерный размер атомов и их плотная упаковка (~10⁻⁸ см) значительно меньше длины волны излучения оптического диапазона (~10⁻⁴ см), что позволяет ввести такую характеристику, как поляризация \vec{P} – дипольный момент единицы объема среды [16]. Рассмотрение нелинейных оптических процессов также проводят с помощью вектора поляризации вещества [20].

В простейшем случае, поляризация среды \vec{P} линейно зависит от напряженности падающего светового поля. Таким образом, интенсивность детектируемого сигнала линейно зависит от интенсивности накачки, и если входное световое поле имеет частоту ω , то и поляризация вещества также совершает колебания на частоте ω , а генерируемое вторичное излучение имеет ту же длину волны. Такое приближение справедливо при очень низких по сравнению с внутриатомным полем напряженностях падающего поля и, соответственно, интенсивностях ($I << I_{\rm arowneoe} \sim 5 \cdot 10^{16} \, {\rm Bt/cm^2}$). Методы оптической микроскопии, которые используют линейные

Методы оптической микроскопии, которые используют линейные (однофотонные) процессы для создания контраста, не применимы для имиджинга глубоких слоев тканей: четкие изображения могут быть получены лишь вблизи поверхности, поскольку в более глубоких слоях превалирует эффект многократного рассеяния света, из-за чего изображения становятся размытыми [4, 17]. Методы нелинейной оптической микроскопии обладают рядом свойств, которые делают их подходящими для имиджинга с высоким разрешением в тканях на глубинах более 500 мкм (при выполнении ряда условий) [18].

При освещении среды высокоинтенсивным (лазерным) излучением начинает проявляться нелинейность зависимости поляризации от напряжённости электрического поля световой волны:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \hat{\chi}^{(1)}\vec{E} + \hat{\chi}^{(2)}\vec{E}^2 + \hat{\chi}^{(3)}\vec{E}^3 + \cdots,$$
(1)

где $\hat{\chi}^{(1)}$ – линейная восприимчивость, $\hat{\chi}^{(2)}$, $\hat{\chi}^{(3)}$ и т.д. – нелинейные восприимчивости второго, третьего и т.д. порядков. Соответственно, интенсивность вторичного излучения может нелинейно (квадратично, кубично и т.д.) зависеть от интенсивности падающего излучения.

Основными наблюдаемыми и используемыми в микроскопии нелинейными оптическими эффектами являются: процессы генерации второй (ГВГ, $\hat{\chi}^{(2)}$) и третьей (ГТГ, $\hat{\chi}^{(3)}$) гармоник, процесс двухфотонного (ДФ) возбуждения флуоресценции ($\hat{\chi}^{(3)}$), процесс когерентного антистоксового рассеяния света (КАРС, $\hat{\chi}^{(3)}$) [4].

ДВУХФОТОННОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ДФ возбуждение флуоресценции – это нелинейный эффект третьего порядка, заключающийся в «одновременном» (время взаимодействия ~ 0.5 фс) поглощении двух фотонов накачки молекулой вещества и последующей эмиссии флуоресценции [4, 5, 19]. При этом флуоресценция – это всегда однофотонный процесс, и спектральные и временные характеристики сигнала флуоресценции при многофотонном поглощении не отличаются от флуоресценции, индуцируемой однофонотонно. Квантово-механическое описание процесса ДФ поглощения дано в литературе [20, 21].

Процесс ДФ поглощения можно представить так: «первый» из пришедших фотонов падающего излучения может перевести молекулу вещества из основного состояния *g* в некоторое виртуальное состояние *v*, после чего «второй» фотон может перевести молекулу из виртуального возбужденного состояния в реальное возбужденное состояние *e* (рис. 1А). Таким образом, интенсивность процесса флуоресценции I_{TPEF} будет пропорциональна квадрату интенсивности накачки I_p и сечению ДФ поглощения $\sigma^{(2)}$:

$$I_{TPEF} \sim \sigma^{(2)} I_p^2. \tag{2}$$

Сечение ДФ поглощения, имеющего размерность см⁴·с, можно оценить как:

$$\sigma^{(2)} \sim \sigma_{gv}^{(1)} \sigma_{ve}^{(1)} \tau_{v}, \tag{3}$$

где $\sigma_{gv}^{(1)}$, $\sigma_{ve}^{(1)}$ – сечения однофотонного поглощения, характерное значение которых составляет $10^{-17} \div 10^{-16}$ см², а τ_v – время жизни виртуального состояния, которое, для фотонов с частотой ω и перехода с частотой ω_{ev} , оценивается из соотношения неопределенностей Гейзенберга как $\tau_v \sim 1/|\omega_{ev} - \omega| \approx 10^{-16} \div 10^{-15}$ с. Таким образом, сечение



Рис. 1. А). Диаграммы линейных и нелинейных оптических процессов. Отметим, что при линейном рассеянии, генерации второй гармоники и КАРС не происходит возбуждения молекул образца.

Б). Пространственная локализация сигнала при линейном и нелинейном возбуждении. При линейном возбуждении сигнал генерируется из всего объема, в то время как при нелинейном возбуждении, сигнал генерируется только из небольшой (порядка фемтолитра) области.

В). Генерация ДФ-возбуждаемой флуоресценции и второй гармоники (ГВГ). Излучение флуоресценции изотропно и не зависит от макроскопической упорядоченности образца (слева). Для эффективного излучения на частоте второй гармоники требуется наличие макроскопической упорядоченности (справа).

Г). Принципиальная схема мультифотонного микроскопа. Адаптировано из работы [4].

Е.А.Ширшин и с	соавт.
----------------	--------

ДФ поглощения по порядку составляет $\sigma^{(2)} \approx 10^{-49}$ см⁴ с. Аналогично можно провести обобщение на случай n-фотонного поглощения.

Для ДФ возбуждения обычно достаточно увеличить вдвое длину волны излучения, используемого для однофотонного возбуждения. Однако, наряду с приведенной оценкой сечения ДФ поглощения (6), важно иметь в виду, что ДФ процессы имеют правила отбора, отличные от таковых для однофотонных процессах. Например, в симметричных молекулах разрешены однофотонные переходы между состояниями различной четности, в то время как ДФ переходы возможны только между состояниями одинаковой четности – как результат, формы спектров однофотонного поглощения и ДФ поглощения могут значительным образом отличаться [22].

ГЕНЕРАЦИЯ ОПТИЧЕСКИХ ГАРМОНИК

Принципиально отличным от многофотонного поглощения является эффект генерации оптических гармоник. Экспериментально проще всего наблюдать генерацию второй и третьей оптических гармоник. В этих процессах два (три) фотона «одновременно» рассеиваются на электронах молекулы, превращаясь в один фотон с энергией в точности в два (три) раза больше (рис. 1А). Генерация гармоник, являясь эффектом нелинейного рассеяния, не требует поглощения падающей волны в образце, однако усиливается при его наличии в связи с резонансным возрастанием поляризуемости при приближении частоты излучения к частоте электронного перехода молекул [4, 23].

Можно показать, что интенсивное рассеяние на удвоенной частоте будет наблюдаться в том случае, если молекула не обладает симметрией инверсии. Однако отсутствие симметрии инверсии молекул не является достаточным условием для генерации второй гармоники, необходимо также, чтобы такая асимметричность сохранялась в макрообъёме. Заметим, что такое ограничение на отсутствие симметрии инверсии требуется только для эффективной генерации чётных оптических гармоник [20, 21].

Если рассеяние на удвоенной частоте будет происходить на объемно неупорядоченных молекулах, то часть волн будет интерферировать деструктивно (и сигнал будет низок по интенсивности), а в случае упорядоченного расположения молекул рассеянное излучение будет распространяться когерентно – такое когерентное распространение и называется ГВГ [21, 24]. Из условий когерентности также следует, что генерация оптических гармоник будет эффективно проходить лишь в некоторых направлениях, в отличие от АФ (рис. 1В).

КОГЕРЕНТНОЕ АНТИСТОКСОВО РАССЕЯНИЕ СВЕТА

Отметим ещё олин нелинейный оптический процесс, который пока довольно мало используется на практике, но является перспективным для молекулярного имиджинга - когерентное антистоксово рассеяние света, КАРС. Диаграмма этого процесса изображена на рисунке 1А. На объект падает излучение, содержащее три волны, две из которых, обычно называемых накачкой, как правило, имеют одинаковую частоту ω_{n} , а третья, обозначаемая как стоксовая волна – частоту ω_{c} . Взаимодействуя на кубической поляризуемости, эти волны «генерируют» несколько частотных компонент поляризации, которые становятся источниками вторичных волн с частотами этих компонент. В КАРС используется компонента с частотой $\omega_{4S} = 2\omega_p - \omega_S [25-27]$, большей частот падающих волн, что позволяет называть её антистоксовой. Спектроскопия КАРС основана на эффекте резонансного увеличения кубической поляризуемости и, как следствие, интенсивности излучения на комбинационной (антистоксовой) частоте при настройке разности частот падающих волн на частоту внутримолекулярных колебаний: $\omega_p - \omega_s \approx \Omega$. Таким образом, КАРС-спектроскопия может селективно визуализировать молекулы с определенными химическими связями. При аппаратурной реализации КАРС используется лазер с плавной перестройкой одной из частот излучения, падающего на объект. Основное преимущество КАРС, по сравнению со спонтанным комбинационным рассеянием света (СКР), заключается в его большей (на 5-8 порядков) чувствительности и отсутствии перекрытия со спектром автофлуоресценции.

ПРЕИМУЩЕСТВА НЕЛИНЕЙНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИМИДЖИНГА И ХАРАКТЕРНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ УСТАНОВОК

Как было отмечено ранее, методы нелинейной оптической микроскопии обладают рядом преимуществ по сравнению с линейной мик-

роскопией.

Во-первых, для возбуждения молекул, поглощающих в УФ и коротковолновой части видимого диапазонах ($\lambda \sim 350 \div 500$ нм), может быть использовано излучение красной области видимого света и ближнего ИК диапазона ($\lambda_{ex} \sim 700 \div 1000$ нм). Излучение с такими длинами волн имеет большую, по сравнению с видимым светом, глубину проникновения за счёт меньшего рассеяния – характерная величина оптического пути видимого света в коже составляет по порядку 100 мкм, в то время как на длине волны 1000 нм (ближний ИК диапазон), эта длина составляет порядка 600 мкм [28]. Во-вторых,

спектры многофотонного поглощения менее структурированы и значительно шире, чем спектры однофотонного поглощения – часто не требуется подбор оптимальных условий возбуждения флуоресценции [29]. В-третьих, поскольку нелинейные процессы имеют степенную зависимость от интенсивности падающего излучения, сигнал генерируется только в фокальной плоскости объектива из объема порядка фемтолитра (рис. 1Б). Благодаря этому потенциальное фотоповреждение ограничено только областью фокального объема и не имеет места выше и ниже фокуса объектива [30]. Также за счёт генерации сигнала только из фокальной плоскости и большей глубины проникновения возможно производить трехмерное сканирование образца [4, 31].

Обратим внимание, что несмотря на меньшую величину показателя рассеяния в ближнем ИК диапазоне, число баллистических (не рассеянных) фотонов накачки в тканях экспоненциально затухает с глубиной проникновения – возможности МФМ по проникающей способности в ткани ограничены. Так, сигнал генерируемой двухфотонной флуоресценции *F* определяется как $F \propto [P_0 (\exp(-z/l_s^{(ex)})]^2$, где P_0 – мощность возбуждающего излучения, падающего на поверхность образца, $l_s^{(ex)}$ – длина свободного пробега фотона при рассеянии на длине волны возбуждения. Вследствие этого, максимальную глубину проникновения можно оценить как:

$$z_{max} \approx l_s^{(ex.)} \ln(\alpha P_0 \frac{T}{\tau} \sqrt{\Phi(z_{max})}), \qquad (4)$$

где Ф – доля фотонов флуоресценции, которые были зарегистрированы, α – параметр, характеризующий эффективность излучения флуорофоров и шумовых характеристик детектора, τ и 1/T – характерная длительность импульсов и частота их следования [18]. Таким образом, улучшение эффективности светосбора или увеличение мощности возбуждающего излучения приведёт лишь к незначительному приросту максимальной глубины проникновения (4), при этом увеличение плотности мощности может привести к фотохимическому повреждению метаболитов и термическому повреждению тканей. Так, максимальную глубину МФМ с использованием сигнала эндогенных флуорофоров можно оценить как ~200 мкм [17]. Значительное увеличение глубины проникновения (до 1.6 мм) может быть достигнуто при смещении возбуждающего излучения в длинноволновую область (1000-1300 нм) [32, 33], однако, увеличение длины волны возбуждающего излучения может привести к снижению детектируемого сигнала за счёт низкого сечения нелинейных оптических процессов в длинноволновой области. Отметим также, что принципиально глубина проникновения МФМ ограничена нали-

чием слабого фонового сигнала флуоресценции, генерируемого вне фокальной плоскости. Подробное исследование ограничений проникающей способности МФМ приведено, например, в работе [34].

Приведем краткое описание основных параметров экспериментальных установок, используемых для нелинейно-оптической микроскопии. Подробное описание может быть найдено, например, в работах [31, 35]. Принцип работы многофотонного микроскопа во многом схож с принципом работы конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Основное отличие состоит в источнике излучения. В качестве источника излучения обычно используется титансапфировый лазер с перестраиваемой длиной волны (700–1000 нм). Характерная длительность импульсов излучения составляет ~100 фс, что позволяет достигать пиковых интенсивностей в фокальной плоскости порядка 10¹³ Вт/см² при пространственной фокусировке с использованием объективов с большой числовой апертурой. Таких интенсивностей достаточно для генерации нелинейно-оптических сигналов.

Типичный оптический путь многофотонного микроскопа выглядит следующим образом. Лазерный луч проходит через модулятор интенсивности, после чего пучок расширяется с помощью телескопической системы, попадает на гальваносканер, контролирующий положение пучка в ХҮ-плоскости (рис. 1Г). Скорость сканирования может достигать ~30 кадров в секунду [36]. После ХҮ-сканера пучок снова расширяется с помощью системы линз для заполнения апертуры объектива, который фокусирует излучение на образец. Сгенерированный нелинейный сигнал может детектироваться как в «эпи-» так и «транс-» конфигурации микроскопа, для этого в оптический путь микроскопа помещают дихроичное зеркало, которое отсекает излучение накачки от полезного сигнала.

ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ (FLIM)

Как было указано ранее, спектральные и временные характеристики сигнала флуоресценции не зависят от способа её возбуждения. Это позволяет использовать преимущества многофотонного возбуждения в таком методе как время-разрешенная флуоресцентная микроскопия (FLIM, Fluorescence lifetime imaging microscopy).

FLIM – вид микроскопии, в котором на изображении формируется пространственное распределение времени жизни возбужденного состояния флуорофоров (рис. 2А) [3]. Визуализация времени жизни предоставляет ещё один способ контрастирования, который, в первом приближении, не зависит от таких факторов как интенсивность падающего излучения и длина оптического пути, которые сложно контролировать в биологических объектах. При этом время жизни





Е.А.Ширшин и соавт.

флуоресценции зависит от внутренних свойств самого флуорофора, а также от его взаимодействия с ближайшим окружением: так, в кинетике затухания могут проявляться эффекты динамического тушения, резонансного переноса энергии или изменения конформации самого флуорофора [3].

Мультифотонный микроскоп может быть дополнен оборудованием для реализации FLIM, прежде всего, использующим метод время-коррелированного счёта единичных фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) [3]. Другие способы детектирования, а также детали, связанные с методом FLIM, подробно описаны в литературе [37].

Кратко описать принцип работы метода TCSPC можно следующим образом. Импульсный источник излучения возбуждает молекулы исследуемого вещества, после чего определяется время, которое прошло между импульсом возбуждающего излучения и приходом фотона флуоресценции, испущенного образцом, на детектор. При этом интенсивность сигнала флуоресценции стараются ослабить таким образом, чтобы с от каждого возбуждающего импульса детектировать единичные фотоны флуоресценции. В таком случае, при многократном повторении, гистограмма временных отсчётов будет повторять временную зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от времени.

После возбуждения зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от времени F(t) имеет вид экспоненциальной кривой:

$$F(t) = A \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad t > 0, \tag{5}$$

где τ – время затухания флуоресценции, A – интенсивность сигнала в начальный момент времени (амплитуда), пропорциональная квантовому выходу флуоресценции и полной концентрации флуорофора. В случае, если в образце присутствуют несколько различных флуорофоров, временной сигнал будет представлять собой сумму экспонент:

$$F(t) = \sum_{i} a_{i} \exp\left(-\frac{t}{\tau_{i}}\right), \quad t > 0, \tag{6}$$

где a_i и τ_i – амплитуда и характерное время затухания і-го флуорофора (рис. 2Б). Однако такая зависимость справедлива лишь в случае идеального детектора, который откликается на воздействие мгновенно, и при этом полностью отсутствуют какие-либо шумы. В действительности, детектируемый сигнал S(t) представляет собой свёртку сигнала флуоресценции F(t) с функцией отклика детектора IRF(t) (Instrument Response Function):

$$S(t) \propto \int_0^t IRF(t') \cdot F(t-t')dt'.$$
⁽⁷⁾

Методы обработки данных FLIM можно условно разделить на параметрические и непараметрические. В параметрических подходах детектируемый временной сигнал аппроксимируется функцией, вид которой задан и определяется некоторыми параметрами. Например, предполагают, что закон затухания является двухэкспоненциальным и пытаются подобрать параметры a_1 , τ_1 , a_2 , τ_2 так, чтобы свёртка сигнала (6) наилучшим образом повторяла экспериментальный сигнал. Так, в методе наименьших квадратов сравнение аппроксимирующей функции и экспериментальных точек производится по взвешенному квадратичному отклонению.

Таким образом, можно определять параметры затухания флуоресценции в каждом пикселе изображения независимо от других пикселей. Часто предполагается, что в образце имеются минимум два хромофора, тогда для аппроксимации FLIM используются две экспоненты (см. (5)), после чего на изображении визуализируется среднее время жизни τ_m (рис. 2A):

$$\tau_m = \frac{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}{a_1 + a_2}.$$
(8)

Проблема «попиксельной» обработки FLIM-изображений заключается в необходимости большого числа фотоотсчётов для аппроксимации. Если для восстановления одного времени затухания и одной амплитуды моноэкспоненциальной кривой требуется порядка 200 фотоотсчётов, то для достоверного определения двух времен жизни требуется уже не менее 10000 фотоотсчётов [38]. Накопление такого количества отсчётов в кинетике для каждого пикселя изображения значительно увеличивает время съемки, а также может привести к фотодеградации образца – обычно, число отсчётов в одной кинетике не превосходит нескольких тысяч.

В непараметрических методах процедуры аппроксимации временного сигнала известной функцией не предполагается – вместо этого напрямую из экспериментально измеренного временного сигнала рассчитываются величины, характеризующие ансамбль флуорофоров. Эти методы предоставляют возможность удобно визуализировать временные характеристики, при этом требуя значительно меньше времени для обработки FLIM-данных [39–41].

Таким образом, широкое распространение в последнее время получил метод фазовых диаграмм (phasor plot) [39]. В данном подходе временной сигнал сворачивается с функциями синуса и косинуса:

$$C = \frac{\int_0^\infty I(t)\cos(\omega t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt}, \ S = \frac{\int_0^\infty I(t)\sin(\omega t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt},\tag{9}$$

где I(t) – зависимость сигнала флуоресценции от времени, ω – частота, которую в работе [39] предлагается выбирать обратной временному окну детектирования. По сути, подобное преобразование схоже с выделением Фурье-амплитуды временного сигнала на частоте ω . Для моноэкспоненциальной кривой с характерным временем затухания τ величины *C* и *S* задаются выражениями:

$$C = \frac{1}{1 + (\omega \tau)^2}, \ S = \frac{\omega \tau}{1 + (\omega \tau)^2}.$$
 (10)

Если теперь отметить данную точку на плоскости C-S, то эта точка будет лежать на полуокружности с единичным радиусом и центром в точке (0.5; 0) (рис. 2В). В случае, если временной сигнал представляет собой сумму нескольких экспонент, величины C и S будут представлять собой суперпозицию вида:

$$C = \sum_{i} \frac{f_i}{1 + (\omega \tau_i)^2}, \quad S = \sum_{i} \frac{f_i \omega \tau_i}{1 + (\omega \tau_i)^2}, \tag{11}$$

где $f_i^{=}(a_i\tau_i)/\Sigma_j(a_i\tau_i)$ – относительный вклад i-го флуорофора в среднюю интенсивность флуоресценции. Так, если кинетика затухания флуоресценции имеет биэкспоненциальный вид, то соответствующая точка на фазовой диаграмме будет расположена на отрезке, который соединяет точки, соответствующие моноэкспоненциальным распадам со временами τ_1 и τ_2 . Близость к каждой из точек будет определяться относительными вкладами первого и второго флуорофоров. По сути, на плоскости *C*–*S* работает правило сложения векторов (рис. 2В). Удобство метода фазовых диаграмм заключается ещё и в том, что возможна одновременная визуализация сразу большого числа флуорофоров по их временным характеристикам [42, 43], что будет проиллюстрировано в разделе IV.

III. ПРИРОДА ЭНДОГЕННЫХ МОЛЕКУЛ-РЕПОРТЕРОВ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МФМ: ИСТОЧНИКИ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ОПТИЧЕСКИХ ГАРМОНИК

ТРИПТОФАН И ТРИПТОФАН-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ

Собственная флуоресценция белковых макромолекул, обусловленная наличием в них остатков ароматических аминокислот (Trp, Tyr, Phe), широко применяется для исследования конформационных изменений, межмолекулярного взаимодействия, исследования биохимических процессов в клетке и для биомедицинской диагностики [13]. Наиболее интенсивной является флуоресценция триптофановых остатков, тогда как флуоресценция тирозиновых остатков в триптофан-содержащих

Е.А.Ши	ршин	и	соавт.
--------	------	---	--------

белках обычно затушена [44], и в области молекулярного имиджинга под собственной флуоресценцией белков подразумевается именно триптофановая флуоресценция. Интенсивность флуоресценции, форма спектра флуоресценции и кинетика релаксации возбужденного состояния триптофана широко используются не только в *in vitro* экспериментах, но и во флуоресцентной биомедицинской диагностике [13, 14].

Будучи классическим флуорофором при однофотонном возбуждении, триптофан намного реже используется в качестве источника информативного сигнала в многофотонной микроскопии. Данный факт связан, прежде всего, с отсутствием оптимальной длины волны накачки (~600 нм) для ДФ возбуждения Trp (максимум однофотонного поглощения которого находится в области 280 нм, а максимум эмиссии – в области 310–360 нм в зависимости от окружения [13] (см. таблицу)) в большинстве лазерных источников, используемых в МФМ, а также меньшей глубиной, с которой можно детектировать сигнал флуоресценции Trp в сравнении с другими флуорофорами. Помимо этого, в исследованиях с помощью микроскопии затруднительно использовать такой информативный параметр триптофановой флуоресценции, как форма спектра, поскольку в большинстве используемых установок детектирование осуществляется в фиксированном диапазоне длин волн.

Круг работ по МФМ, использующих сигнал флуоресценции Trp, достаточно ограничен, однако, имеющиеся результаты позволяют судить о дальнейших перспективах использования данного сигнала в МФМ. Так, в [45] осуществлена МФМ кожи крыс *in vivo*, при этом достигается повышенный контраст в визуализации клеток дермы в сравнении с сигналом от других флуорофоров – НАД(Ф)Н и ФАД. Причиной этого является локализация сигнала последних в ограниченных областях (преимущественно, в митохондриях), тогда как флуоресценция Trp распределена по клетке равномерно. МФМ с использованием АФ Trp позволяет также детектировать лейкоциты *in vivo* [46].

АФ Тгр также возбуждается трехфотонно ($\lambda_{exc} \sim 700-800/\lambda_{em} \sim 350$ нм), при этом низкое сечение поглощения может быть компенсировано высокой концентрацией флуорофора. Так, АФ Тгр при трехфотонном возбуждении была использована для метаболического имиджинга совместно с сигналами от НАД(Ф)Н и ФАД [47, 48] – данный аспект будет рассмотрен в разделе IV.5. Также интерес представляет детектирование метаболитов триптофана, в частности, серотонина, с использованием МФМ [49], для чего используется трехфотонное возбуждение [31].

Таблица. Фотофизические параметры эндогенных флуорофоров λ_{ex} – длина волны возбуждения, λ_{em} – положение максимума спектра эмиссии, τ – среднее время жизни возбужденного состояния. Индексы 1PE, 2PE, 3PE относятся к одно-, двух- и трехфотонному возбуждению, соответственно.

Флуорофор	$λ_{ex}$, ΗΜ	$\lambda_{em}^{}, \mathrm{HM}$	τ, нс
Триптофан	280 ^(1PE)	310-360 [50]*	0.1-10*
	600 ^(2PE) [46]		
	760 ^(3PE) [47, 48]		
Серотонин	760 ^(3PE) [49]	340 [49]	_
Коллаген	760 ^(2PE) [51]	370-440 [52]	1 [51]
Эластин	760 ^(2PE) [51]	475 [53]	1.3 [51]
Кератин	350 ^(1PE) [54]	420 [54]	_
	700–900(2PE) [55]	450–520 [55]**	
	764 [53]	465 [53]	
Флуоресцентные продукты	350 ^(1PE) [56]	450 ^(1PE) [56]	_
гликирования (AGEs)	760 ^(2PE) [57]		
НАД(Ф)Н ^F	330-360 ^(1PE) [10]	460 [60]	0.4 [61]
$HAД(\Phi)H^{B}$	<760 ^(2PE) [58, 59]	440 [60]	1-6.5 [61]*
ФАД ^F	360, 450(1PE) [62]	50 [59]	2.3-2.9
	725–760, 850–950 ^(2PE) [59]		[10]
Меланин	760-800 ^(2PE) [63]	550 [63, 64]	0.1 [63]
Липофусцин	400–500 (1PE) [12]	480-700 [12]	0.4 [66]
	755, 860(2PE) [65]		

*В зависимости от окружения.

** В зависимости от длины волны возбуждения.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ И ЭПИДЕРМИСА

Ряд фибриллярных белков, являющихся основными компонентами соединительной ткани (коллаген и эластин) и эпидермиса (кератин) обладают эмиссией флуоресценции с максимумом в области 450 нм при возбуждении в области 350 нм [54, 67]. Данный факт связан с наличием в их структуре так называемых сшивок (cross-links) [68]. При этом химическая структура сшивок и их оптические свойства могут отличаться для эластина [69], коллагена [70] и кератина [71]. АФ структурных белков подробно рассматривается в контексте задач биомедицинской диагностики, в частности, исследования кожи [67, 72]. Коллаген является наиболее распространенным белком в теле человека. Коллагены различных типов, а также коллагены, полученные из различных источников, обладают отличающимися

спектральными свойствами и временами жизни флуоресценции [73]. Данные об абсолютных значениях времен жизни возбуждённого состояния коллагенов различного типа и эластина значительно разнятся [51].

Кератин в коже синтезируется кератиноцитами, клетками, составляющими 90% эпидермиса. В процессе роста и дифференцировки кератиноциты постепенно смещаются от базальной мембраны к поверхности кожи. Это сопровождается кератинизацией - синтезом и накоплением кератина в клетках эпидермиса, что создает градиент концентрации кератина с минимальным его содержанием в клетках базального слоя и максимальным – в отмирающих и отслаивающихся клетках рогового слоя – корнеоцитах [74]. Роговой слой кожи обладает интенсивной флуоресценцией и, несмотря на достаточно малую толщину в сравнении с глубиной проникновения возбуждающего излучения, дает значительный вклад в спектры АФ кожи [72]. Оптические свойства кератина при ДФ возбуждении в диапазоне 700-900 нм исследованы в [55]. Было показано, что форма спектра флуоресценции препарата кератина зависит от длины волны возбуждения (накачки), сдвигаясь в длинноволновую область с увеличением длины волны накачки (положение максимума сдвигается с 450 до 500 нм при увеличении длины волны возбуждения с 760 до 900 нм), что, вероятно, связано с возбуждением различных групп флуоресцентных сшивок.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКОВ, ОБУСЛОВЛЕННАЯ БИОХИМИЧЕСКИМИ ПРОЦЕССАМИ: ГЛИКИРОВАНИЕ И ОКИСЛЕНИЕ

Ряд биохимических процессов также может влиять на оптические свойства структурных белков. Так, при гликировании белковых молекул возможно образование флуоресцентных конечных продуктов гликирования (AGEs, Advanced Glycation End-products) [75, 76], в частности, пентозидина [77]. При диабете кожа приобретает коричневый оттенок, что связано с гликированием коллагена дермы. Флуоресцентный сигнал от образующихся продуктов гликирования широко используется для диагностики заболевания и количественной оценки степени гликирования структурных белков [56, 75]. Возбуждение флуоресценции AGEs обычно осуществляется на длине волны 350 нм, а спектр их эмиссии является широким с максимумом в районе 450 нм и близок к спектрам АФ структурных белков [56]. Процесс гликирования также ярко проявляется в оптических свойствах ткани при ДФ возбуждении. Так, в работе [57] было исследовано гликирование образцов кожи ex vivo методом МФМ. Показано, что интенсивность АФ при гликировании коллагена возрастает, тогда как интенсивность сигнала ГВГ падает. Аналогичные результаты были

получены в экспериментах по *in vitro* гликированию коллагена [79], а также *ex vivo* для разных образцов соединительной ткани [80]. Данный факт является следствием образования флуоресцентных AGEs, приводящего к росту АФ, и нарушения структуры коллагена, приводящего к уменьшению ГВГ.

Процессы окисления также могут значительно влиять на флуоресцентные свойства структурных белков, в первую очередь, за счет влияния на ароматические аминокислотные остатки [71, 81–83]. Процессы старения и сопряженная с ними аккумуляция дефектов, вызванных действием активных форм кислорода (АФК), также могут приводить к посттранстляционным модификациям белков и образованию новых флуоресцентных сшивок [84].

Также немаловажным, с точки зрения природы эндогенных флуорофоров, является тот факт, что синяя флуоресценция, аналогичная по спектральным свойствам флуоресценции структурных белков, может наблюдаться у глобулярных белков [85]. В ряде статей [86–88] синяя флуоресценция глобулярных белков используется как маркер агрегации (в частности, фибриллообразования), при этом природа флуорофора, ответственного за нее, является дискуссионной [89]. В работе [90] было показано, что синяя флуоресценция может наблюдаться не только у агрегатов, но и у мономеров глобулярных белков, и связана с наличием у них карбонильных групп. Наконец, при окислении и гликировании мономеров глобулярных белков также может наблюдаться синяя флуоресценция [91].

Таким образом, характерный сигнал эмиссии соединительной ткани с максимумом в районе 450 нм при однофотонном возбуждении в области ближнего УФ и ДФ возбуждении в области 700–800 нм может быть связан как с флуоресцентными сшивками в структурных белках, так и с посттрансляционными модификациями фибриллярных и глобулярных белков. Хотя данный сигнал не является специфичным для флуорофоров одного типа, при наличии априорной информации об объекте он может быть использован для биомедицинской диагностики [88].

НИКОТИНАМИДДИНУКЛЕОТИД (НАДН) И НИКОТИНАМИДДИНУКЛЕОТИДФОСФАТ (НАДФН)

НАД и НАДФ являются универсальными кофакторами, задействованными во множестве окислительно-восстановительных процессов в клетках живых организмов [92]. Данные молекулы являются, по всей видимости, наиболее часто используемым эндогенным маркером при проведении исследований живых объектов методами флуоресцентной спектроскопии вообще и МФМ.

Окислительно-восстановительное состояние, или редокс-состояние клетки, является определяющим фактором в биоэнергетических процессах и метаболизме и имеет непосредственное отношение к патологическим процессам в организме. Окисленные и восстановленные НАД и НАДФ играют важную роль в редокс-состоянии клетки, будучи вовлеченными в ряд ключевых метаболических процессов. НАД ответственен за выработку АТФ в цитоплазме за счет гликолиза и в митохондриях за счет окислительного фосфорилирования (ОФ), а НАДФ вовлечен в биосинтез липидов, аминокислот, нуклеотидов и также в защиту от АФК. Таким образом, генерация АФК зависит от редокс-состояния НАД, тогда как НАДФ осуществляет антиоксидантную защиту в клетке [61].

Никотинамидный фрагмент НАДН обладает поглощением в области 340±30 нм и эмиссией флуоресценции в области 460±50 нм, при этом спектральные свойства НАДФН аналогичны в связи с удаленностью фосфатной группы от никотинамидного фрагмента, являющегося хромофором и флуорофором НАД(Ф)Н [9]. В связи с этим, в литературе в качестве названия флуорофора используется обозначение НАД(Ф)Н, поскольку однозначная идентификация источника флуоресценции затруднительна. При этом окисленные формы НАД(Ф)+ не обладают указанными полосами поглощения и, соответственно, флуоресценции, что делает возможным определение соотношения $HAД(\Phi)H/HAД(\Phi)^{+}$ – редокс-статуса клетки – с использованием флуоресцентной спектроскопии при однофотонном возбуждении в области 360 нм либо при ДФ возбуждении в области 700-800 нм [93]. Помимо интенсивности флуоресценции, в литературе большое распространение получил подход к исследованию метаболических процессов на основе измерения кинетики затухания флуоресценции $HAД(\Phi)H$ (см. также раздел IV).

Поскольку НАД(Φ) является кофактором в ряде каталитических реакций, а его оптические свойства (в частности, время жизни возбужденного состояния) чувствительны к микроокружению, времяразрешенная флуориметрия позволяет анализировать биохимические процессы с их участием. Время жизни флуоресценции свободного НАД(Φ)Н в растворе варьируется в диапазоне 0.3–0.8 нс, тогда как при связывании ферментом оно возрастает до 1–6.5 нс в зависимости от белка [61]. Обычно кинетика релаксации флуоресценции НАД(Φ)Н интерпретируется следующим образом. При биэкспоненциальной аппроксимации первое (быстрое) время приписывается свободной форме, НАД(Φ)Н^F, второе (медленное) – связанной, НАД(Φ)Н^B: здесь и далее верхние индексы F («Free») и B («Bound») будут обозначать свободную и связанную формы, соответственно. В связи с тем, что

НАД(Ф) является кофактором для разнообразных ферментов, измеряемая кинетика релаксации является усредненной по гетерогенной системе флуорофоров с разными временами жизни. Несмотря на большую востребованность данного подхода и его продуктивность в исследованиях биохимических процессов, интерпретация кинетики релаксации возбужденного состояния НАД(Ф)Н в клетке до сих пор является предметом дискуссий [58, 60, 94].

 $HAД(\Phi)H^{F}$ в растворе может существовать в двух конформациях, находящихся в динамическом равновесии, – свернутой и развернутой. Кинетика релаксации AФ HAД(Ф)H^F описывается двумя компонентами с временами около 0.2 и 0.6 нс, при этом их спектральные свойства идентичны [60]. Большее время жизни соответствует свернутой конформации, что было объяснено в [95] образованием эксиплекса (комплекса с переносом заряда, образующегося в возбужденном состоянии) при взаимодействии никотинамидного и аденинового фрагментов. Тем не менее, позднее в литературе появился ряд других гипотез, объясняющих биэкспоненциальность кинетики релаксации HAД(Ф)H^F различными фотофизическими процессами в никотинамидном фрагменте молекулы [96]. Рост времени жизни HAД(Ф)H при связывании ферментами определяется конформацией кофактора в сайте связывания и ограничением его подвижности [96].

В ряде работ указывается на тот факт, что $HAJ(\Phi)H^{B}$ также может давать вклад в быструю компоненту кинетики релаксации [60, 94]. Более того, уменьшение среднего времени жизни флуоресценции $HAД(\Phi)H$ в клетке может быть связано с перераспределением вкладов от $HAД(\Phi)H^{B}$, связанных с различными ферментами, а не увеличением соотношения $HAД(\Phi)H^{F}/HAД(\Phi)H^{B}$ [94]. Далее, в работе [58] показано, что вклад НАДФН в кинетику флуоресценции НАД(Ф)Н в клетках весьма значителен. С использованием методов молекулярной биологии и путем воздействия ряда веществ на соотношение НАД/ НАДФ в клетке авторы показали, что при возбуждении на 700 нм времена жизни НАДН^в и НАДФН^в в клетках составляли 1.5±0.2 нс и 4.4±0.2 нс, соответственно. Принципиальным выводом явилось то, что изменения кинетики затухания флуоресценции НАД(Ф)Н в клетке не могут однозначно свидетельствовать о смене метаболизма с ОФ на гликолиз, так как могут быть связаны с перераспределением вклада НАДН и НАДФН в кинетику при метаболических изменениях.

Резюмируя, интенсивность флуоресценции и кинетика релаксации НАД(Ф)Н являются информативными показателями в исследовании биохимических процессов в клетках, в первую очередь, связанных с метаболизмом, некоторые примеры чего приведены в разделе IV. В то

Е.А.Ширшин и со	эавт.
-----------------	-------

же время, подробный анализ фотофизических процессов с их участием в клетках до сих пор является актуальной задачей [58, 61]. Одним из подходов, позволяющих получить дополнительную информацию о редокс-состоянии клетки, является одновременное измерение с НАД(Ф)Н сигнала флавинадениндинуклеотида, ФАД, являющегося «комплиментарным» кофактором-индикатором метаболического состояния клеток [97].

ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД (ФАД) И РИБОФЛАВИН

В клетках ФАД, в основном, является кофактором для ферментов, вовлеченных в окислительно-восстановительные процессы [59, 98]. Число флавопротеинов (ФП) весьма велико, однако, в большинстве из них флуоресценция флавиновых кофакторов затушена за счет переноса на них электрона с ароматических аминокислотных остатков [99]. Помимо этого, определяющую роль играет конформация ФАД при связывании – при наличии взаимодействия между двумя фрагментами ФАД (стэкинге), время жизни и квантовый выход флуоресценции уменьшаются [62]. Подробное рассмотрение фотофизических свойств ФАД и ФП можно найти в работе [62].

Известно, что два ФП, вовлеченных в метаболические процессы (липоамид-дегидрогеназа и ФП, переносящий электроны), дают определяющий вклад в флуоресценцию ФАД [59, 98]. В связи с тем, что только ФП с окисленным кофактором и только восстановленная форма НАД(Ф)Н являются флуоресценцтными, соответствующие сигналы реагируют на изменение метаболического состояния противоположным образом [59, 98]. В связи с этим, определение редокс-состояния клетки, основанное на измерении отношения сигналов $HAJ(\Phi)H$ и ΦAJ , широко используется для мониторинга метаболизма клеток и тканей, в том числе, с использованием МФМ [59, 97]. Редокс-отношение может быть рассчитано из интенсивностей флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД несколькими способами [100], но в любом случае данный параметр не подвержен влиянию артефактов, связанных с измерением абсолютных значений интенсивности. В отличие от НАД(Ф)Н, флуоресцентный сигнал ФАД в МФМ может быть получен при большей длине волны возбуждения (~850 нм), меньше подвержен фотодеградации и локализован преимущественно в митохондриях [59].

Помимо ФАД, интерес в контексте АФ представляет рибофлавин – водорастворимый витамин, являющийся прекурсором ФАД в клетках организма. В работе [101] приведены результаты, связанные с обнаружением характерного сигнала АФ ($\lambda_{\rm exc} \sim 480/\lambda_{\rm em} \sim 530$ нм) у рако-

вых стволовых клеток (СК). Было установлено, что появление АФ является АТФ-зависимым, а также показано, что АТФ-зависимый транспортный белок ABCG2, для которого субстратом является рибофлавин, оверэкспрессирован в клетках с АФ и колокализован с мембраной везикул, обладающих АФ внутри клеток. Таким образом, было достоверно показано, что источником АФ, специфичной для раковых СК, является рибофлавин.

МЕЛАНИН

Меланины являются преимущественно внутриклеточными гетерогенными пигментами, ответственными за фотозащиту, цвет кожи, волос и глаз. В литературе имеется ряд модельных структур меланинов, но, в целом, можно сказать, что они представляют собой гетерогенные полимеры, образующиеся в результате окисления фенолов и последующей полимеризации промежуточных фенолов и образующихся из них хинонов [102].

Спектр однофотонного поглощения меланина в видимой и ближней ИК областях спектра хорошо описывается экспонентой, спадающей с длиной волны. При однофотонном возбуждении спектр АФ меланина лежит в диапазоне 400–700 нм, а ее интенсивность является малой в сравнении с другими флуорофорами соединительной ткани (например, НАДН и ФАД). Также меланин способен флуоресцировать при однофотонном ИК-возбуждении ($\lambda_{exc} \sim 785/\lambda_{em} \sim 820-920$ нм) [103]. При возбуждении меланина короткими импульсами ИК диапа-

зона наблюдается интенсивная флуоресценция. Согласно работе [64], процесс поглощения двух фотонов меланином является двухквантовым, а не двухфотонным, то есть происходит в две стадии с участием промежуточного электронного состояния. Данный факт связан с тем, что, в отличие от других флуорофоров, меланин обладает значительным сечением поглощения в ИК-области спектра, при этом, поскольку время жизни его возбужденного состояния мало (~100 пс), необходима большая плотность потока фотонов для того, чтобы реализовалось поглощение из возбужденного состояния, что имеет место при использовании источника лазерного излучения с параметрами, характерными для МФМ. При этом сечение двухступенчатого поглощения меланина выше, чем сечение ДФ поглощения большинства флуорофоров соединительной ткани, в результате чего становится возможным селективный имиджинг меланина, что лежит в основе работ по диагностике патологических процессов в коже [63, 104]. Еще одним параметром, позволяющим селектировать вклад АФ меланина, является ее короткое время релаксации (~200 пс) [63].

ЛИПОФУСЦИН

Еще одним эндогенным флуорофором, преимущественно локализованным в лизосомах, является липофусцин, который представляет из себя гетерогенное образование, состоящее из белков, липидов и/или каротиноидов, различающееся наличием сшивок и окисленностью [105]. Формирование липофусцина часто связывают с продуктами деградации липидов и белков, накапливающимися в клетке при старении и окислительном стрессе. [106].

Из-за гетерогенности молекулярного состава, оптические свойства липофусцина характеризуются широкими спектральными диапазонами возбуждения (300–500 нм) и эмиссии (480–700 нм) флуоресценции [107]. Детальное исследование спектральных свойств липофусцина затруднено тем фактом, что его оптические свойства в значительной мере зависят от концентрации: при плотной упаковке молекул в гранулах необходимо учитывать эффект внутреннего фильтра, т.е. самопоглощение флуоресценции липофусцином, приводящее к сдвигу максимума эмиссии в длинноволновую область (т.н. метахромный эффект [108]). Одновременное детектирование сигналов липофусцина, НАД(Ф)Н и ФАД является перспективным инструментом для анализа патологических процессов и окислительного стресса с использованием МФМ (подробнее см. IV).

В гистологических исследованиях АФ, вызванная наличием липофусцина, является проблемой: из-за значительной ширины спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции, сигнал от липофусцина может маскировать даже интенсивный сигнал иммунофлуоресценции. Для борьбы с данным явлением используют окраску образцов ткани красителем Суданом черным, являющимся эффективным тушителем флуоресценции [109]. Также в работе [66] был предложен метод селекции сигнала флуоресцентного зонда, встраивающегося в амилоидные тельца, от фонового сигнала липофусцина при *in vivo* МФМ. Предложенный подход опирается как на спектральные особенности липофусцина, так и на короткое время жизни его флуоресценции (~0.4 нс) в сравнении с зондом.

Помимо излучения входящих в состав липофусцина липидов, может наблюдаться эмиссия окисленных липидов, не локализованных в гранулах. В работе [53] с использованием МФМ и спектрального детектирования было показано, что флуоресценция рогового слоя*, а также межклеточного пространства верхних слоев кожи, сдвинута в длинноволновую область в сравнении со спектрами кератина и НАД(Ф)Н и, по крайней мере частично, связана с липидами.

ГЕНЕРАЦИЯ ОПТИЧЕСКИХ ГАРМОНИК

Сигнал ГВГ, связанный с откликом коллагена типа I (в дерме) несет информацию о его концентрации, морфологии и локализации, что важно в клинических исследованиях. Обзор применений ГВГ для молекулярного имиджинга, в том числе коллагеновых волокон, можно найти в книге [15]. Изображения внеклеточного матрикса, получаемые методом ГВГ, обычно содержат нитевидные структуры, и для анализа подобных изображений в литературе применяется ряд методов. Наиболее распространён метод, основанный на Фурьепреобразовании изображения, в литературе его можно встретить как FT-SHG. Метод основан на том, что в спектре двумерного Фурье-преобразования заложена информация о превалирующих на изображении направлениях [110]. Частоты Фурье-преобразования связаны с размерами пространственных признаков обратно пропорционально, максимальная частота в Фурье-преобразовании соответствует минимальному характерному размеру на изображении. В целом, можно утверждать, что микроскопия ГВГ является одной из наиболее актуальных модальностей в МФМ и позволяет извлечь ценную информацию об организации внеклеточного матрикса [110].

Метод МФМ позволяет одновременно измерять распределение коллагена типа I (по интенсивности ГВГ) и эластина (по АФ) в реальном времени *in vivo* [1]. Наиболее перспективным подходом для имиджинга структурных белков в соединительной ткани считается мультимодальное детектирование, при котором одновременно измеряются сигналы АФ, ГВГ и FLIM [43, 51]. Также микроскопия ГВГ может быть удобна для исследования наночастиц, в частности, в работе [111] с помощью ГВГ была определена глубина проникновения наночастиц оксида цинка (используемых в солнцезащитных кремах в качестве УФ фильтра) в эпидермис.

Эффект генерации третьей гармоники (ГТГ) предоставляет дополнительный механизм контрастирования, который при этом может быть совмещен с другими типами нелинейной оптической микроскопии [15, 112, 113]. Как было указано ранее, в отличие от ГВГ, для наличия отклика на утроенной частоте не требуется определенной пространственной упорядоченности и асимметрии молекул вещества. Однако при ГТГ-микроскопии сигнал обычно не наблюдается от однородных сред из-за деструктивной интерференции волн в сходящемся пучке возбуждающего излучения [20]. В связи с этим контрастные ГТГ-изображения получаются в том случае, если оптические неоднородности по размеру сравнимы с размером фокусного пятна. Так, например, могут быть визуализированы липидные капли [112]

Е.А.Ширшин и соав

и накапливающие липиды органеллы, размер которых составляет несколько сотен нанометров [114]. Обзор применений ГТГ приведен в работе [113]: ГТГ-микроскопия позволяет визуализировать клеточные мембраны, морфологию ядра, исследовать *in vivo* гемодинамику, разделять виды лейкоцитов и т.д. Важно отметить, что детектирование АФ, ГТГ и ГВГ можно осуществлять в МФМ одновременно путем детектирования сигнала в разных спектральных каналах [115], обеспечивая таким образом мультимодальность.

IV. НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ МФМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ И БИОМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Анализ метаболизма клеток с использованием флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД начался с работ Б. Ченса в 1960-е и приобрел большую популярность в различных областях исследований. Развитие техники оптической микроскопии, в частности, конфокальной микроскопии, позволило осуществлять метаболический имиджинг (МИ)* – исследование редокс-статуса клетки, определенного через параметры сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н и/или ФАД – с субклеточным пространственным разрешением, а внедрение техники FLIM в 1990-е привело к появлению дополнительного канала информации, основанного на измерении кинетики затухания флуоресценции. Данный метод свободен от недостатков подхода, основанного на измерении интенсивности сигнала флуоресценции [116].

Наконец, развитие МФМ позволило осуществлять МИ на 3D структурах с меньшим вкладом фотодеградации. За годы существования МИ накоплен большой массив данных в различных областях, нашедший отражение в ряде обзоров – например, [9, 10, 61]. В связи с этим, в данном обзоре мы кратко изложим основные результаты и тренды в области МИ с использованием МФМ-FLIM и более подробно остановимся на менее стандартных его применениях с фокусом на фотофизических процессах, лежащих в основе наблюдаемых изменений сигнала от клеток, а также использовании эндогенных флуорофоров помимо НАД(Ф)Н и ФАД.

^{*} Здесь и далее под метаболическим имиджингом имеется в виду флуоресцентный метаболический имиджинг, при котором отслеживается только флуоресцирующая часть метаболома клетки

ИССЛЕДОВАНИЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Исследования опухолевых клеток в 2D и 3D моделях с использованием MФM-FLIM нацелены как на изучение фундаментальных аспектов, связанных с особенностями их метаболизма и гетерогенностью, так и на разработку методов диагностики отклика опухолевых клеток при воздействии противоопухолевыми препаратами. Помимо этого, в литературе широко обсуждается возможность клинического применения MU для биомедицинской диагностики онкологических заболеваний и навигации по операционному полю [2]. В связи с тем, что данному направлению исследований посвящен ряд обзоров [9, 10, 100, 117], мы в данной работе не будем останавливаться на конкретных примерах, а рассмотрим лишь общую картину, которая, хотя и не претендует на полноту описания механизмов изменения флуоресцентных свойств HAД(Φ) и Φ AД при онкологических процессах, позволяет составить общее представление о них.

Многочисленные исследования раковых клеток с использованием МИ демонстрируют у них понижение редокс-статуса и уменьшение среднего времени жизни, связанного с увеличением доли НАД(Φ) Н^F. Зачастую интерпретация этих результатов производится на основе гипотезы Варбурга, предполагающей смену метаболизма в раковых клетках с ОФ на гликолиз даже при нормальных условиях оксигенации, вызванную необратимым нарушением функций митохондрий в них [118]. Несмотря на то, что на данный момент установлено, что гипотеза Варбурга не является верной в общем случае, а митохондриальные дисфункции имеются только у некоторых опухолевых линий, и ингибирование гликолитических процессов приводит к обратному переходу опухолевых клеток на ОФ, сам тренд переключения на гликолитический метаболизм существует [100, 118, 119].

В целом, в большинстве статей раковые клетки характеризуются меньшим соотношением ФАД/НАДН (и повышенной флуоресценцией НАДН) и меньшим временем жизни НАДН в сравнении с нормой, тогда как при воздействии на опухолевые клетки противоопухолевыми препаратами наблюдается обратный тренд [10, 117]. Первый факт связан, в первую очередь, с тем, что НАДН аккумулируется в процессе гликолиза, тогда как при ОФ происходит окисление до НАД⁺ в митохондриях, а для ФАД наблюдается обратный процесс. Второй факт вызван тем, что свободная форма НАДН локализована преимущественно в цитозоле и вовлечена в гликолиз, тогда как связанная – в ОФ. Данное обобщение, конечно, имеет исключения, как можно видеть, например, из компиляции результатов, проведенной в обзоре [10]. Показано, что редокс-статус и соотношение концентраций сво-



Рис. 3. Схематическое изображение данных FLIM на фазовой диаграмме.

А). Распределение пикселей модельного FLIM-изображения, соответствующих НАД(Φ)H^F ($\tau \approx 0.4$ нс), НАД(Φ)H^B ($\tau \approx 3$ нс) и окисленным липидам ($\tau \approx 7.5$ нс) на фазовой диаграмме; линии уровня иллюстрируют распределение пикселей по интенсивности сигнала.

Б). Распределение пикселей FLIM-изображения, соответствующего модельному эксперименту. Группа точек, расположенных вдоль отрезка, соединяющего области, соответствующие НАД(Ф)Н^F (синий круг) и НАД(Ф)Н^B (желтый круг) соответствуют кинетике релаксации флуоресценции НАД(Ф)Н, при этом смещение в сторону НАД(Ф)Н^F соответствует гликолизу, а в сторону НАД(Ф)Н^B – ОФ. Наличие окислительного стресса приводит к смещению группы в область окисленных липидов (красный круг). Рис. 3Б адаптирован из [120].

бодной и связанной форм НАД(Ф)Н позволяют детектировать предраковые клетки, различать клетки разной степени пролиферации, исследовать особенности отклика и резистентности для разных клеточных линий и т.д. [9, 10, 100, 117]. В частности, МИ позволяет характеризовать отклик на лечение опухоли уже на ранней стадии, что может использоваться для персонализированной медицины [117].

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (СК)

МИ нашел также применение для исследования процессов, связанных с СК, а именно, с процессами их дифференцировки. Помимо этого, интерес представляет анализ гетерогенности популяции клеток для выделения чистых линий и применения их в клеточной терапии. Необходимо отметить, что в данной области широкое распространение получил анализ данных MФM-FLIM на основе представления кинетики затухания флуоресценции на фазовой диаграмме (см. раздел II). Так, пиксели, соответствующие HAД(Ф)H^F (с малым временем жизни) и HAД(Ф)H^B кластеризуются в разных участках диаграммы (рис. 3), а смещение распределения пикселей в координатах фазовой диаграммы может говорить о перераспределении форм HAД(Ф)H и смене основного типа метаболизма (т.н. метаболическая траектория). Более

того, ряд работ анализируют ширину распределения пикселей по диаграмме и анализируют ее с позиции гетерогенности флуорофоров, связанной с множеством НАД-зависимых ферментов.

Общий тренд, наблюдаемый в исследованиях дифференцировки СК методом МФМ-FLIM, заключается в увеличении среднего времени жизни флуоресценции клеток при возбуждении в области 700–760 нм, что объясняется увеличением доли НАД(Ф)Н^в. При этом наблюдается смещение вдоль метаболической траектории от гликолиза к ОФ в ряду СК-прогениторные клетки-дифференцированные клетки [121]. Более того, анализ данных на фазовой плоскости позволяет с использованием методов кластеризации разделять различные культуры клеток [122]. Данный подход позволил, в частности, различить СК и прогениторные нервные клетки на разных стадиях дифференцировки, при том, что эти стадии были неразличимы по морфологии клеток и экспрессии маркеров [123].

Авторы [124] исследовали отличия в распределении свободной и связанной форм НАД(Ф)Н в клеточной линии миобластов L6 для недифференцированных клеток и клеток, находящихся в ранней стадии дифференцировки. Было показано, что наиболее яркое отличие заключается в значительном увеличении доли НАД(Ф)Н^в в ядрах клеток на ранней стадии дифференцировки, что было интерпретировано как следствие повышенной активности процессов транскрипции и структуры хроматина в сравнении с недифференцированными клетками (т.н. «повышенная активность в ядре»). Отметим, что данная интерпретация отличается от широко используемой концепции «метаболической траектории», оперирующей параметрами флуоресценции НАД(Ф)Н в митохондриях и цитозоле (см., например, предыдущий раздел). Взаимодействие регуляторных белков в ядре с НАД является важным фактором, влияющим на процесс транскрипции [125]. Таким образом, МФМ-FLIM позволяет, теоретически, неинвазивно анализировать процессы, происходящие в ядре, однако это применение на данный момент получило меньшее распространение, чем МИ [124, 126]. Вероятно, это связано с низким сигналом из области ядра и сложностью интерпретации полученных данных, однако, несомненно, данный подход позволяет увидеть различия между клетками на качественном уровне.

МФМ-FLIM позволяет также исследовать СК *in vivo*. Так, в работе [127] были продемонстрированы временные осцилляции метаболического статуса СК эпидермиса у мышей *in vivo*. С использованием флуоресцентного сигнала НАД(Ф)Н было показано, что циркадный ритм циклически координирует изменение вклада гликолиза и ОФ с активностью синтеза ДНК. Авторы продемонстировали увеличение

Е.А.Ши	ршин	и	соавт.
--------	------	---	--------

доли НАД(Ф)Н^F ночью, совпадающее по времени с наибольшей долей СК, находящихся в S-фазе клеточного цикла, и предположили, что данный факт связан с необходимостью поддержания низкой концентрации АФК при активной пролиферации.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

При нормальном метаболизме АФК в клетках могут выполнять сигнальную роль в процессах регуляции редокс-гомеостаза. Аккумуляция АФК в концентрации, превышающей нормальный физиологический уровень, может приводить к окислительному стрессу – повреждению ДНК, окислению белковых и липидных молекул, что, в свою очередь, может являться причиной развития ряда патологий – воспалительных процессов, диабета, рака, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний [92]. Детектирование окислительного стресса и связанных с ним повышенных концентраций АФК может быть реализовано рядом методов, в том числе, с использованием флуоресцентных зондов. В то же время, интерес представляет способ исследования окислительного стресса с использованием эндогенных флуорофоров, для чего используются сигналы НАДН, ФАД и окисленных липидов.

Так, в работе [120] с использованием МФМ показано, что при окислительном стрессе в клетке образуются липидные капли, характеризующиеся длинным временем жизни (7.5 нс). Путем представления распределения флуорофоров в клетке по параметрам кинетики затухания на фазовой плоскости авторы показывают, что помимо «метаболической траектории», соответствующей перераспределению НАД(Ф)Н в клетке между свободной и связанной формами, имеет место «траектория окислительного стресса» (рис. 3), характеризующаяся появлением на FLIM-изображении группы пикселей, которым соответствует длинное время затухания. Аналогичный подход был применен для исследования окислительного стресса в кардиомиоцитах при гипоксии и под действием кардиотоксинов [128].

Похожие результаты были получены в работе [122], в которой исследовалась дифференцировка эмбриональных СК. Было показано, что в недифференцированных эмбриональных СК детектируются гранулы ($\lambda_{exc} = 760/\lambda_{em} \sim 500$ нм) размером ~1 мкм, характеризующиеся медленным затуханием флуоресценции (~10 нс). Авторы доказывают, что эти гранулы содержат липиды, и объясняют это тем, что в недифференцированных эмбриональных СК их наличие вызвано высокой концентрацией АФК, связанной с высокой скоростью ОФ, а также избытком ненасыщеных жирных кислот, которые при окислении могут образовывать флуорофоры.

Важно отметить, что авторы [120, 122] отмечают, что за флуоресценцию гранул с большим временем жизни не может быть ответственен липофусцин, ссылаясь на то, что для него характерно значительно более быстрое затухание флуоресценции и широкий спектр возбуждения. Помимо этого, долгоживущий сигнал не был локализован в лизосомах [122], как это могло бы ожидаться для липофусцина [12, 107]. В то же время, в работе [65], в которой с использованием МФМ исследовалась адипогенная и остеогенная дифференцировка мезенхимальных СК, было показано, что со временем в клетках появляются липидные гранулы, колокализованные с лизосомами, флуоресценция которых возбуждается и на 755, и на 860 нм. Авторы [65] идентифицируют соответствующий флуорофор как липофусцин и объясняют его накопление окислительным стрессом в клетках. Объяснение флуоресценции гранул наличием липофусцина присутствует также в работе [129], где исследована дифференцировка эмбриональных СК. В этой работе измерения выполнены с использованием длины волны возбуждения 366 нм, при этом концентрации флуорофоров в клетках определялись путем разложения спектров $A\Phi$ на 6 компонент (окисленные белки, $HAД(\Phi)H^{F}$ и НАД(Ф)Н^в, ФАД, липофусцин и порфирины). Авторы [129] также объясняют аккумуляцию липофусцина в СК окислительным стрессом и отмечают уменьшение его содержания при дифференцировке.

Резюмируя, МФМ предоставляет возможность неинвазивной косвенной оценки окислительного стресса по вкладу в сигнал флуоресценции липидных капель или включений липофусцина, появляющихся в результате окисления липидов и белков АФК. В перспективе, эта методика может быть применена не только для исследования 2D и 3D клеточных культур, но и *in vivo*.

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ РАССТРОЙСТВА

В литературе имеется ряд свидетельств в пользу того, что дисфункция митохондрий является одним из ключевых факторов нейродегенерации [130], однако причинно-следственные связи в развитии патологических процессов до сих пор до конца не ясны. Поскольку label-free MФМ-FLIM является информативным методом исследования метаболических процессов, связанных с митохондриями, а также может осуществлять молекулярный имиджинг, в частности, белков и их олигомеров [88], его применение для исследования процессов нейродегенерации на моделях представляет определенный интерес.

Образование амилоидных фибрилл и связанных с ними телец сопряжено с развитием нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера, Паркинсона и др.), в частности, с нарушением синап-

тической связи между нейронами [131]. Также известно, что токсичными являются, в основном, олигомеры амилоидогенных белков. В работе [132] был исследован метаболизм клеток НЕК293, в которых был оверэкспрессирован амилоидогенный белок альфа-синуклеин (HEK293-aS), вовлеченный в патогенез болезни Паркинсона, а также клеток HEK293-aS, в цитоплазму которых были добавлены зерна фибриллообразования (HEK293-seeds), т.е. зрелые фибриллы, наличие которых значительно ускоряет процесс агрегации. Методом МФМ-FLIM было показано, что в модели НЕК293-аS значительно возрастает доля связанной формы НАД(Ф)Н, что было объяснено встраиванием олигомеров альфа-синуклеина в митохондрии и связанным с этим нарушением их функционирования и окислительным стрессом. Также было обнаружено, что НАД(Ф)Н способна встраиваться в зрелые фибриллы, которые присутствовали в модели HEK293-seeds, что было подтверждено в экспериментах in vitro. Тем не менее, поскольку по оценкам авторов концентрация альфа-синуклеина в исследованных моделях составляла около 1 мкМ, а концентрация НАД(Ф)Н – около 1 мМ, эффект увеличения времени жизни НАД(Φ)Н в HEK293-seeds должен быть связан с его встраиванием в фибриллы лишь в незначительной степени. Авторы [132] высказывают предположение, что меньшее изменение редокс-статуса НЕК293-seeds в сравнении с HEK293-aS связано с тем, что в них весь белок был вовлечен в образование зрелых фибрилл, таким образом, эффект олигомеров на функционирование митохондрий был меньшим.

В работе [133] исследовался метаболический статус дифференцированных нейронов методом МФМ-FLIM. Авторы отмечают, что данная модель является более адекватной для болезни Паркинсона, чем использовавшаяся в работе [132]. В эксперименте наблюдалось уменьшение среднего времени жизни НАД(Ф)Н и ФАД для модели болезни Паркинсона [134], а доли НАД(Ф)Н^F и ФАД^B увеличивались. Авторы объясняли данный факт ингибированием электронно-транспортной цепи и сделали заключение о переключении метаболизма с ОФ на гликолиз для клеток-модели болезни Паркинсона.

Далее авторы [135] исследовали метаболизм в клетках НЕК293, трансфицированных плазмидами, содержащими экзон 1 гена НТТ с разным числом повторов триплета ЦАГ. Данный кодон кодирует аминокислоту глутамин, и в случае, если число ее остатков в белке НТТ превышает 40, развивается болезнь Хантингтона, тогда как число повторов менее 36 является нормой. Авторы показали, что для большего числа повторов (97 против 25) наблюдалось значительное увеличение доли НАД(Ф)Н^F в клетках, в том числе, в ядрах, что

может свидетельствовать о трансляционной дисрегуляции. Аналогичные результаты были получены *in vivo* на клетках глазного диска трансгенных дрозофил [135], которые являются адекватной моделью для исследования нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Хантингтона [136], в связи с наличием у них нервной системы со специализированными функциями. Таким образом, МФМ позволяет исследовать метаболические процессы при нейродегенеративных заболеваниях на моделях как *in vitro*, так и *in vivo*.

МИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ TRP В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРА

Помимо стандартного подхода к определению метаболического статуса клетки, основанного на измерении параметров флуоресценции $HAД(\Phi)H$ и $\Phi AД$, в литературе имеются статьи, в которых в качестве индикатора выступает флуоресценция триптофана. Данный метод основан на том, что при связывании кофактора (НАД(Ф)Н) ферментом, имеет место перенос энергии на него с триптофановых остатков в составе белка по ферстеровскому механизму с эффективным радиусом ~2.3 нм [48]. Таким образом, время жизни триптофановой флуоресценции клетки сокращается при увеличении доли связанной формы НАД(Ф)Н. В работах [47, 48] осуществлялось одновременное детектирование AФ Trp, вызванной трехфотонным возбуждением, и ДФ НАД(Ф)Н при возбуждении на 740 нм. Было показано, что эффективность переноса энергии Trp-HAД(Φ)Н коррелирует с долей связанной формы НАД(Ф)Н в митохондриях [48] и с отношением долей $HAД(\Phi)H^{B}$ и $\Phi AД^{F}$, которые авторы [47] использовали в качестве индикатора редокс-состояния клеток.

ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КОЖИ: ОПТИЧЕСКАЯ БИОПСИЯ

Нелинейная оптическая микроскопия является удобным инструментом для биомедицинского имиджинга за счёт физических принципов, лежащих в основе создания контраста между отдельными объектами. Одним из основных ее преимуществ является возможность реконструкции объемного изображения, что, в том числе, позволяет производить морфологические исследования *ex vivo* (на биопсийных образцах) и *in vivo*. В частности, в нашей работе [137] методом МФМ была выполнена неивазивная оптическая гистология ногтевого ложа – области, исследуемой в методе оптической капилляроскопии. Применение МФМ позволило установить на клеточном уровне причины корреляции параметров, измеряемых методом капилляроскопии, с тяжестью сердечной недостаточности у пациентов: было показано, что отечный синдром проявляется в увеличении размера

периваскулярной области, связанного с накоплением жидкости в эпидермисе. Данный пример иллюстрирует преимущества МФМ в сравнении с другими методами оптической биопсии, позволяющими проводить гистологические исследования на людях *in vivo*: высокое пространственное разрешение и большую (в сравнении с конфокальной лазерной микроскопией) глубину сканирования. Основным же преимуществом является возможность анализа молекулярных компонент соединительной ткани при одновременном применении нескольких модальностей: АФ, ГВГ, FLIM [1, 43, 51].

В работе [138] методом МФМ была измерена морфология кератиноцитов при наличии процессов воспаления кожи in vivo, при этом было продемонстрировано перераспределение митохондрий внутри клеток, а именно, их локализация в области около ядра при воспалении. Степень увеличения среднего межклеточного расстояния и уменьшения толщины эпидермиса также коррелировала с активностью воспалительных процессов. Неинвазивный морфометрический подход к анализу распределения митохондрий в клетках эпидермиса in vivo был также применен в работе [139] для исследования онкологических заболеваний. Авторы показали, что в здоровой коже наблюдается плавное изменение распределения митохондрий в клетках с глубиной, тогда как для опухолевой ткани такой тренд отсутствует, что может быть использовано в диагностических целях. Анализ морфологии клеток в гранулярном, шиповатом и базальном слоях позволил найти отличия между здоровой кожей, плоскоклеточным раком и ему предшествующим кератозом, используя in vivo MФМ [140]. Важные результаты были получены в работе [141], где исследовалась морфология клеток зернистого слоя кожи (stratum granulosum) с целью объяснения его пространственной архитектуры, позволяющей сохранять так называемые плотные контакты между клетками при их обновлении и обеспечивать барьерную функцию кожи. Было показано, что клетки эпидермиса, ответственные за образование плотных контактов, имеют форму уплощенного тетракаидекаэдра, а также была визуализирована динамика перехода клеток между слоями, что позволило установить роль формы клеток в постоянном поддержании плотной упаковки и защитных свойств кожи. Еще одним примером неинвазивного морфометрического исследования возможного при использовании МФМ является определение формы дермо-эпидермального перехода (ДЭП), то есть, по сути, формы поверхности папиллярной дермы, являющейся индикатором процессов старения кожи [142]. Визуализация ДЭП возможна благодаря, во-первых, явному отличию оптических свойств клеток у базальной мембраны,

а именно, повышенному содержанию меланина [104], а во-вторых, наличием сигнала ГВГ от волокон коллагена типа I в дерме [15] таким образом, появление сигнала ГВГ, определяет начало ДЭП, а значение максимума сигнала ГВГ определяет нижнюю границу папиллярной дермы, позволяя определить ее толщину in vivo [143]. Методом МФМ-FLIM возможна также *in vivo* визуализация сосудов в дерме с использованием флуоресценции эритроцитов [51]. В связи со сверхбыстрым (~30 фс) переносом заряда с порфириновых колец в составе гема на незаполненные d-орбитали иона железа, гемоглобин является нефлуоресцентным. Тем не менее, в работах группы [144] было показано, что в результате ДФ поглощения в диапазоне длин волн 700-850 нм может наблюдаться эмиссия флуоресценции растворов гемоглобина и гема, при этом время релаксации флуоресценции составляет менее 50 пс. В работе [145] было показано, что наличие указанной флуоресценции связано с необратимой аккумуляцией флуоресцирующего фотопродукта, образующегося в результате спонтанной конверсии молекулы гема в возбужденном состоянии.

Возможность неинвазивного доступа к клеткам кожи, в первую очередь, в эпидермисе, позволяет анализировать биохимические процессы в них, например, с помощью МИ. В частности, методом МФМ-FLIM, было показано, что в кератиноцитах по мере их дифференцировки наблюдается смена основного типа метаболизма с гликолиза на ОФ [146]. На основе МФМ-FLIM также были разработаны методы детектирования рака кожи, в частности, базальной карциномы [147] и меланомы [63, 104].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный в данном обзоре анализ литературы позволяет сделать следующие выводы. Направления развития методов молекулярного имиджинга диктуются как нуждами фундаментальных биомедицинских исследований, так и желанием использовать его в клинической диагностике. Несмотря на то, что МФМ рассматривается, прежде всего, как инструмент, позволяющий проводить 3D сканирование объектов с использованием экзогенных меток, обеспечивающих лучшую специфичность и глубину имиджинга, ее применение с эндогенным контрастом также имеет свою нишу. В области экспериментов *in vitro* наибольшее распространение получил флуоресцентный метаболический имиджинг, что связано как с ценностью информации, которую при помощи него можно получить, так и с исследованностью биохимических процессов, лежащих в его основе.

Тем не менее, даже в этом направлении остаются нерешенные задачи [61]. Для более широкого применения МФМ в *in vitro* экспериментах необходимо уметь извлекать сигнал специфично от определенных молекул, т.е. выделить вклад заданных флуорофоров (например, липофусцина, рибофлавина, окисленных белков) из общего сигнала, что может значительно повысить информативность метода [101]. В связи с этим, актуальным является исследование фотофизических и фотохимических процессов в эндогенных флуорофорах, в частности, в гетерогенных системах флуорофоров – меланине, липофусцине, окисленных белках и липидах. Второй задачей является разработка физических методов селективного имиджинга молекул заданного типа для расширения возможностей МФМ, например, КАРС.

В области клинических применений основной недостаток МФМ – недостаточная глубина имиджинга, ограничивающая ее применения *in vivo* на людях, в основном, кожей. Несмотря на наличие ряда работ по реализации морфологических исследований с помощью МФМ с эндогенным контрастом *ex vivo*, кажется неочевидным, что данное направление сможет превзойти по чувствительности и специфичности обычную гистологию, которая также может быть автоматизирована. Существенное продвижение, вероятно, может быть достигнуто при реализации МФМ в виде эндоскопической методики, что позволит использовать ее как минимум для тех же задач, что и флуоресцентную спектроскопию, СКР и спектроскопию диффузного отражения. В перспективе, новых результатов можно ожидать от применения задела, полученного с помощью МФМ с эндогенным контрастом в *in vitro* экспериментах, на человеке *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

- Konig, K., Riemann, I. (2003) Highresolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution, *J. Biomed. Opt.*, 8, 432–439.
- Marcu, L., French, P.M.W., Elson, D.S. (2014) Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging : principles and applications in biomedical diagnostics, Boca Raton : CRC Press/Taylor & Francis Group. 570 p.
- Becker, W. (2012) Fluorescence lifetime imaging-techniques and applications, J. Microsc., 247, 119–136.
- Helmchen, F., Denk, W. (2005) Deep tissue two-photon microscopy, *Nat. Methods*, 2, 932.
- So, P.T.C., Dong, C.Y., Masters, B.R., Berland, K.M. (2000) Two-photon excitation fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2, 399–429.
- Phan, T.G., Bullen, A. (2010) Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper, *Immunol. Cell. Biol.*, 88, 438– 444.
- 7. Xu, C., Zipfel, W.R. (2015) Multiphoton excitation of fluorescent probes, *Cold*

Spring Harbor Protocols, **2015**, pdb-top086116.

- Зубова Н.Н., Савицкий А.П. (2005) Молекулярные клеточные сенсоры, созданные на основе цветных флуоресцирующих белков I: Сенсоры pH, ионов Cl⁻, Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, *Успехи биол. химии*, **45**, 391–454.
- Mayevsky, A., Rogatsky, G.G. (2007) Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 292, C615–C640.
- Kolenc, O.I., Quinn, K.P. (2018) Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD, *Antioxid. Redox Signal*, опубликовано онлайн https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451
- Obeidy, P., Tong, P.L., Weninger, W. (2018) Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin, *J. Invest. Dermatol.*, **138**, 720–725.
- Croce, A.C., Bottiroli, G. (2017) Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues, *Methods Mol. Biol.*, 1560, 15–43.
- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed. New York: Springer. 954 p.
- Berezin, M.Y., Achilefu, S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging, *Chem. Rev.*, 110, 2641–2684.
- Pavone, F.S., Campagnola, P.J. (2014) Second harmonic generation imaging. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis. 476 p.
- Ахманов, С.А., Никитин, С.Ю. (2004) Физическая оптика. Москва: Изд-во Моск. ун-та. 654 с.
- Sdobnov, A.Y., Darvin, M.E., Genina, E.A., Bashkatov, A.N., Lademann, J., Tuchin, V.V. (2018) Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, **197**, 216–229.
- Oheim, M., Beaurepaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J., Charpak, S. (2001) Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth, *J. Neurosci. Methods*, **111**, 29–37.

- Oheim, M., Michael, D.J., Geisbauer, M., Madsen, D., Chow, R.H. (2006) Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 788–808.
- Shen, Y.-R. (1984) The principles of nonlinear optics. New York: Wiley-Interscience. 575 p.
- 21. Boyd, R.W. (2003) Nonlinear optics. Amsterdam: Elsevier. 640 p.
- 22. Steinfeld, J.I. (2012) Molecules and radiation: An introduction to modern molecular spectroscopy. North Chelms-ford: Courier Corporation. 512 p.
- Campagnola, P.J., Loew, L.M. (2003) Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms, *Nat. Biotechnol.*, 21, 1356.
- Masters, B.R., So, P. (2008) Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy. Oxford: Oxford University Press. 896 p.
- Müller, M., Zumbusch, A. (2007) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, *ChemPhysChem*, 8, 2156–2170.
- Cheng, J.-X., Xie, X.S. (2004) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications, *J. Phys. Chem. B*, 108 (3), 827–840.
- Xie, X.S., Cheng, J.-X., Potma, E. (2006) Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. Handbook of biological confocal microscopy. / Eds. Pawley J. Boston: Springer. 595–606.
- Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Tuchin, V.V. (2011) Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 4, 9–38.
- Xu, C., Zipfel, W., Shear, J.B., Williams, R.M., Webb, W.W. (1996) Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10763–10768.
- Hopt, A., Neher, E. (2001) Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy, *Biophys. J.*, 80, 2029–2036.

- Zipfel, W.R., Williams, R.M., Webb, W.W. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences, *Nat. Biotechnol.*, 21, 1369.
- Balu, M., Baldacchini, T., Carter, J.L., Krasieva, T.B., Zadoyan, R., Tromberg, B.J. (2009) Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media, J. Biomed. Opt., 14, 010508.
- Kobat, D., Horton, N.G., Xu, C. (2011) In vivo two-photon microscopy to 1.6mm depth in mouse cortex, *J. Biomed. Opt.*, 16, 106014.
- 34. Theer, P., Denk, W. (2006) On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy, *JOSA A*, 23, 3139–3149.
- Majewska, A., Yiu, G., Yuste, R. (2000) A custom-made two-photon microscope and deconvolution system, *Pflü*gers Arch., 441, 398–408.
- Nguyen, Q.T., Callamaras, N., Hsieh, C., Parker, I. (2001) Construction of a two-photon microscope for videorate Ca2+ imaging, *Cell calcium*, 30, 383–393.
- Periasamy, A., Clegg, R.M. (2009) FLIM microscopy in biology and medicine. New York: Chapman and Hall/ CRC. 472 p.
- Köllner, M., Wolfrum, J. (1992) How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements?, *Chem. Phys. Lett.*, **200**, 199–204.
- Digman, M.A., Caiolfa, V.R., Zamai, M., Gratton, E. (2008) The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis, *Biophys. J.*, 94, L14–L16.
- Le Marois, A., Labouesse, S., Suhling, K., Heintzmann, R. (2017) Noise-Corrected Principal Component Analysis of fluorescence lifetime imaging data, *J. Biophotonics*, **10**, 1124–1133.
- Leray, A., Padilla-Parra, S., Roul, J., Héliot, L., Tramier, M. (2013) 827Spatio-temporal quantification of FRET in living cells by fast time-domain FLIM: a comparative study of non-fitting methods, *PloS one*, 8, e69335.
- 42. Stringari, C., Cinquin, A., Cinquin, O., Digman, M.A., Donovan, P.J., Gratton, E. (2011) Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy

distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13582–13587.

- 43. Ranjit, S., Dvornikov, A., Stakic, M., Hong, S.H., Levi, M., Evans, R.M., Gratton, E. (2015) Imaging Fibrosis and Separating Collagens using Second Harmonic Generation and Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging, *Sci. Rep.*, 5, 13378.
- Zhdanova, N.G., Shirshin, E.A., Maksimov, E.G., Panchishin, I.M., Saletsky, A.M., Fadeev, V.V. (2015) Tyrosine fluorescence probing of the surfactantinduced conformational changes of albumin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 14, 897–908.
- Li, C., Pistillides, C., Runnels, J.M., Cote, D., Li, C. (2010) Multiphoton Microscopy of Live Tissues With Ultraviolet Autofluorescence, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 16, 516–523.
- 46. Li, C., Pastila, R.K., Pitsillides, C., Runnels, J.M., Puoris'haag, M., Cote, D., Lin, C.P. (2010) Imaging leukocyte trafficking in vivo with twophoton-excited endogenous tryptophan fluorescence, *Opt. Express*, 18, 988–999.
- Alam, S.R., Wallrabe, H., Svindrych, Z., Chaudhary, A.K., Christopher, K.G., Chandra, D., Periasamy, A. (2017) Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay, *Sci. Rep.*, 7, 10451.
- 48. Jyothikumar, V., Sun, Y., Periasamy, A. (2013) Investigation of tryptophan-NADH interactions in live human cells using three-photon fluorescence lifetime imaging and Forster resonance energy transfer microscopy, *J. Biomed. Opt.*, **18**, 060501.
- Maiti, S., Shear, J.B., Williams, R.M., Zipfel, W.R., Webb, W.W. (1997) Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation, *Science*, 275, 530–532.
- Vivian, J.T., Callis, P.R. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins, *Biophys. J.*, 80, 2093–2109.

- Shirshin, E.A., Gurfinkel, Y.I., Priezzhev, A.V., Fadeev, V.V., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization, *Sci. Rep.*, 7, 1171.
- Borisova, E., Angelova, L., Pavlova, E. (2014) Endogenous and Exogenous Fluorescence Skin Cancer Diagnostics for Clinical Applications, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 20, 7100412.
- Palero, J.A., de Bruijn, H.S., van der Ploeg van den Heuvel, A., Sterenborg, H.J., Gerritsen, H.C. (2007) Spectrally resolved multiphoton imaging of in vivo and excised mouse skin tissues, *Biophys. J.*, 93, 992–1007.
- Voloshina, O.V., Shirshin, E.A., Lademann, J., Fadeev, V.V., Darvin, M.E. (2017) Fluorescence detection of protein content in house dust: the possible role of keratin, *Indoor Air*, 27, 377–385.
- Pena, A., Strupler, M., Boulesteix, T., Schanne-Klein, M. (2005) Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy, *Opt. Express*, 13, 6268–6274.
- 56. Mulder, D.J., Water, T.V., Lutgers, H.L., Graaff, R., Gans, R.O., Zijlstra, F., Smit, A.J. (2006) Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations, *Diabetes Technol. Ther.*, 8, 523–535.
- Ghazaryan, A.A., Hu, P.S., Chen, S.J., Tan, H.Y., Dong, C.Y. (2012) Spatial and temporal analysis of skin glycation by the use of multiphoton microscopy and spectroscopy, *J Dermatol. Sci.*, 65, 189–195.
- Blacker, T.S., Mann, Z.F., Gale, J.E., Ziegler, M., Bain, A.J., Szabadkai, G., Duchen, M.R. (2014) Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM, *Nat. Commun.*, 5, 3936.
- Huang, S., Heikal, A.A., Webb, W.W. (2002) Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)

H and flavoprotein, *Biophys. J.*, **82**, 2811–2825.

- 60. Yu, Q., 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.
- Blacker, T.S., Duchen, M.R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence, *Free Radic. Biol. Med.*, 100, 53–65.
- 62. Galban, J., Sanz-Vicente, I., Navarro, J., de Marcos, S. (2016) The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review, *Methods Appl. Fluoresc.*, 4, 042005.
- Dimitrow, E., Riemann, I., Ehlers, A., Koehler, M.J., Norgauer, J., Elsner, P., Konig, K., Kaatz, M. (2009) Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis, *Exp. Dermatol.*, 18, 509–515.
- Teuchner, K., Freyer, W., Leupold, D., Volkmer, A., Birch, D.J., Altmeyer, P., Stucker, M., Hoffmann, K. (1999) Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin, *Photochem. Photobiol.*, **70**, 146–151.
- Rice, W.L., Kaplan, D.L., Georgakoudi, I. (2010) Two-photon microscopy for non-invasive, quantitative monitoring of stem cell differentiation, *PLoS One*, 5, e10075.
- 66. Chen, C., Liang, Z., Zhou, B., Li, X., Lui, C., Ip, N.Y., Qu, J. (2018) In Vivo Near-infrared Two-photon Imaging of Amyloid Plaques in Deep Brain of Alzheimer's Disease Mouse Model, ACS Chem. Neurosci., https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ acschemneuro.8b00306
- Sinichkin, Y.P., Utz, S.R., Mavliutov, A.H., Pilipenko, H.A. (1998) In vivo fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models, *J. Biomed. Opt.*, 3, 201–211.
- Robins, S.P. (1982) Analysis of the crosslinking components in collagen and elastin, *Methods Biochem. Anal.*, 28, 329–379.

- Deyl, Z., Macek, K., Adam, M., Vancikova, O. (1980) Studies on the chemical nature of elastin fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, 625, 248–254.
- 70. Stamatas, G.N., Estanislao, R.B., Suero, M., Rivera, Z.S., Li, J., Khaiat, A., Kollias, N. (2006) Facial skin fluorescence as a marker of the skin's response to chronic environmental insults and its dependence on age, *Br. J. Dermatol.*, **154**, 125–132.
- Malencik, D.A., Anderson, S.R. (2003) Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe, *Amino Acids*, 25, 233–247.
- Sterenborg, N.J., Thomsen, S., Jacques, S.L., Duvic, M., Motamedi, M., Wagner, R.F., Jr. (1995) In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumors, *Dermatol. Surg.*, 21, 821–822.
- Marcu, L., Cohen, D., Maarek, J.-M., Grundfest, W. (2000) Characterization of type I, II, III, IV, and V collagens by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy, *Proc. SPIE*, **3917**, 93.
- 74. Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E. (2017) Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy, *Sci. Rep.*, 7, 15900.
- Gkogkolou, P., Bohm, M. (2012) Advanced glycation end products: Key players in skin aging?, *Dermatoendocrinol.*, 4, 259–270.
- Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Bailie, K.E., Lyons, T.J., McCance, D.R., Baynes, J.W. (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *J. Clin. Invest.*, **91**, 2463–2469.
- Dyer, D.G., Blackledge, J.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1991) Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo, *J. Biol. Chem.*, 266, 11654–11660.
- Monnier, V.M., Kohn, R.R., Cerami, A. (1984) Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes

mellitus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 583–587.

- 79. Kim, B.M., Eichler, J., Reiser, K.M., Rubenchik, A.M., Da Silva, L.B. (2000) Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity, *Lasers Surg. Med.*, **27**, 329–335.
- Tseng, J.Y., Ghazaryan, A.A., Lo, W., Chen, Y.F., Hovhannisyan, V., Chen, S.J., Tan, H.Y., Dong, C.Y. (2010) Multiphoton spectral microscopy for imaging and quantification of tissue glycation, *Biomed. Opt. Express*, 2, 218–230.
- Dyer, J.M., Bringans, S.D., Bryson, W.G. (2006) Characterisation of photooxidation products within photoyellowed wool proteins: tryptophan and tyrosine derived chromophores, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5, 698–706.
- Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. (2012) Photo-oxidation of proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11, 38–53.
- Balasubramanian, D., Kanwar, R. (2002) Molecular pathology of dityrosine cross-links in proteins: structural and functional analysis of four proteins, *Mol. Cell. Biochem.*, 234–235, 27–38.
- Soskic, V., Groebe, K., Schrattenholz, A. (2008) Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing, *Exp. Gerontol.*, 43, 247–257.
- Tikhonova, T.N., Rovnyagina, N.R., Zherebker, A.Y., Sluchanko, N.N., Rubekina, A.A., Orekhov, A.S., Nikolaev, E.N., Fadeev, V.V., Uversky, V.N., Shirshin, E.A. (2018) Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 651, 13–20.
- Pinotsi, D., Buell, A.K., Dobson, C.M., Kaminski Schierle, G.S., Kaminski, C.F. (2013) A label-free, quantitative assay of amyloid fibril growth based on intrinsic fluorescence, *Chembiochem*, 14, 846–850.
- 87. Shukla, A., Mukherjee, S., Sharma, S., Agrawal, V., Radha Kishan, K.V., Guptasarma, P. (2004) A novel UV laser-induced visible blue radiation from protein crystals and aggregates:

scattering artifacts or fluorescence transitions of peptide electrons delocalized through hydrogen bonding?, *Arch. Biochem. Biophys.*, **428**, 144–153.

- Shaham-Niv, S., Arnon, Z.A., Sade, D., Lichtenstein, A., Shirshin, E.A., Kolusheva, S., Gazit, E. (2018) Intrinsic Fluorescence of Metabolite Amyloids Allows Label-Free Monitoring in Live Cells, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 57, 12444.
- Pinotsi, D., Grisanti, L., Mahou, P., Gebauer, R., Kaminski, C.F., Hassanali, A., Kaminski Schierle, G.S. (2016) Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures, J. Am. Chem. Soc., 138, 3046–3047.
- Niyangoda, C., Miti, T., Breydo, L., Uversky, V., Muschol, M. (2017) Carbonyl-based blue autofluorescence of proteins and amino acids, *PLoS One*, 12, e0176983.
- Permyakov, E.A., Permyakov, S.E., Deikus, G.Y., Morozova-Roche, L.A., Grishchenko, V.M., Kalinichenko, L.P., Uversky, V.N. (2003) Ultraviolet illumination-induced reduction of alphalactalbumin disulfide bridges, *Proteins-Structure Function and Genetics*, **51**, 498–503.
- Ying, W. (2008) NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxid. Redox. Signal*, 10, 179–206.
- Blacker, T.S., Berecz, T., Duchen, M.R., Szabadkai, G. (2017) Assessment of Cellular Redox State Using NAD(P)H Fluorescence Intensity and Lifetime, *Bio Protoc.*, 7, e2105.
- Vishwasrao, H.D., Heikal, A.A., Kasischke, K.A., Webb, W.W. (2005) Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy, *J. Biol. Chem.*, 280, 25119–25126.
- 95. Visser, A.J.W.G., van Hoek, A. (1981) The fluorescence decay of reduced nicotinamides in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked Ar ion laser, *Photochem. Photobiol.*, 33, 35–40.

- Blacker, T., Marsh, R.J., Duchen, M.R., Bain, A.J. (2013) Activated barrier crossing dynamics in the non-radiative decay of NADH and NADPH, *Chem. Phys.*, 422, 184–194.
- 97. 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, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 19494–19499.
- Kunz, W.S., Kunz, W. (1985) Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 841, 237–246.
- 99. Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y. (2000) Dynamics and Mechanisms of Ultrafast Fluorescence Quenching Reactions of Flavin Chromophores in Protein Nanospace, J. Phys. Chem. B, 104, 10667.
- 100. Лукина, М.М., Ширманова, М.В., Сергеева, Т.Ф., Загайнова, Е.В. (2016) Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор), Соврем. Технол. Med., 8, 113–126.
- 101. Miranda-Lorenzo, I., Dorado, J., Lonardo, E., Alcala, S., Serrano, A.G., Clausell-Tormos, J., Cioffi, M., Megias, D., Zagorac, S., Balic, A., Hidalgo, M., Erkan, M., Kleeff, J., Scarpa, A., Sainz, B., Jr., Heeschen, C. (2014) Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells, *Nat. Methods*, **11**, 1161–1169.
- 102. Solano, F. (2014) Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation, *New J. Sci.*, 2014, 498276.
- 103. Huang, Z., Zeng, H., Hamzavi, I., Alajlan, A., Tan, E., McLean, D.I., Lui, H. (2006) Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation, *J. Biomed. Opt.*, **11**, 34010.
- 104. Arginelli, F., Manfredini, M., Bassoli, S., Dunsby, C., French, P., Konig, K., Magnoni, C., Ponti, G., Tal-

bot, C., Seidenari, S. (2013) High resolution diagnosis of common nevi by multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging, *Skin Res. Technol.*, **19**, 194–204.

- Wolman, M. (1980) Lipid pigments (chromolipids): their origin, nature, and significance, *Pathobiol. Annu.*, 10, 253–267.
- 106. Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E.A., Brunk, U.T. (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging, *Antioxid. Redox Signal.*, 12, 503–535.
- Di Guardo, G. (2015) Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence, *Eur. J. Histochem.*, 59, 2485.
- Yin, D.Z., Brunk, U.T. (1991) Microfluorometric and fluorometric lipofuscin spectral discrepancies: a concentration-dependent metachromatic effect?, *Mech. Ageing Dev.*, 59, 95–109.
- Schnell, S.A., Staines, W.A., Wessendorf, M.W. (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue, *J. Histochem. Cytochem.*, 47, 719–730.
- Cicchi, R., Vogler, N., Kapsokalyvas, D., Dietzek, B., Popp, J., Pavone, F.S. (2013) From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy, J. Biophotonics, 6, 129–142.
- 111. Darvin, M.E., Konig, K., Kellner-Hoefer, M., Breunig, H.G., Werncke, W., Meinke, M.C., Patzelt, A., Sterry, W., Lademann, J. (2012) Safety assessment by multiphoton fluorescence/second harmonic generation/hyper-Rayleigh scattering tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **25**, 219–226.
- 112. Chang, T., Zimmerley, M.S., Quinn, K.P., Lamarre-Jouenne, I., Kaplan, D.L., Beaurepaire, E., Georgakoudi, I. (2013) Non-invasive monitoring of cell metabolism and lipid production in 3D engineered human adipose tissues using label-free multiphoton microscopy, *Biomaterials*, 34, 8607–8616.

- Weigelin, B., Bakker, G.J., Friedl, P. (2016) Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization, *J. Cell Sci.*, **129**, 245–255.
- 114. Debarre, D., Supatto, W., Pena, A.M., Fabre, A., Tordjmann, T., Combettes, L., Schanne-Klein, M.C., Beaurepaire, E. (2006) Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy, *Nat. Methods*, **3**, 47–53.
- 115. You, S., Tu, H., Chaney, E.J., Sun, Y., Zhao, Y., Bower, A.J., Liu, Y.Z., Marjanovic, M., Sinha, S., Pu, Y., Boppart, S.A. (2018) Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy, *Nat. Commun.*, 9, 2125.
- Lakowicz, J.R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., Johnson, M.L. (1992) Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1271–1275.
- 117. Walsh, A.J., Shah, A.T., Sharick, J.T., Skala, M.C. (2015) Fluorescence Lifetime Measurements of NAD(P) H in Live Cells and Tissue. Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications. / Ed. W. Becker. Cham: Springer International Publishing. 435–456.
- Lopez-Lazaro, M. (2008) The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 8, 305–312.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. (2010) Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer, *Mitochondrion*, 10, 584–588.
- Datta, R., Alfonso-Garcia, A., Cinco, R., Gratton, E. (2015) Fluorescence lifetime imaging of endogenous biomarker of oxidative stress, *Sci. Rep.*, 5, 9848.
- 121. Stringari, C., Edwards, R.A., Pate, K.T., Waterman, M.L., Donovan, P.J., Gratton, E. (2012) Metabolic trajectory of cellular differentiation in small intestine by Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of NADH, Sci. Rep., 2, 568.
- 122. Stringari, C., Sierra, R., Donovan, P.J., Gratton, E. (2012) Label-free

separation of human embryonic stem cells and their differentiating progenies by phasor fluorescence lifetime microscopy, *J. Biomed. Opt.*, **17**, 046012.

- 123. Stringari, C., Nourse, J.L., Flanagan, L.A., Gratton, E. (2012) Phasor fluorescence lifetime microscopy of free and protein-bound NADH reveals neural stem cell differentiation potential, *PLoS One*, **7**, e48014.
- 124. Wright, B.K., Andrews, L.M., Markham, J., Jones, M.R., Stringari, C., Digman, M.A., Gratton, E. (2012) NADH distribution in live progenitor stem cells by phasor-fluorescence lifetime image microscopy, *Biophys. J.*, **103**, L7–L9.
- 125. Kim, J.H., Cho, E.J., Kim, S.T., Youn, H.D. (2005) CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 423–428.
- 126. Wright, B.K., Andrews, L.M., Jones, M.R., Stringari, C., Digman, M.A., Gratton, E. (2012) Phasor-FLIM analysis of NADH distribution and localization in the nucleus of live progenitor myoblast cells, *Microsc. Res. Tech.*, **75**, 1717–1722.
- 127. Stringari, C., Wang, H., Geyfman, M., Crosignani, V., Kumar, V., Takahashi, J.S., Andersen, B., Gratton, E. (2015) In vivo single-cell detection of metabolic oscillations in stem cells, *Cell Rep.*, **10**, 1–7.
- 128. Datta, R., Heylman, C., George, S.C., Gratton, E. (2016) Label-free imaging of metabolism and oxidative stress in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Biomed. Opt. Express*, 7, 1690–1701.
- 129. Santin, G., Paulis, M., Vezzoni, P., Pacchiana, G., Bottiroli, G., Croce, A.C. (2013) Autofluorescence properties of murine embryonic stem cells during spontaneous differentiation phases, *Lasers Surg. Med.*, 45, 597–607.
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchen, M.R. (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 26, 711–723.

- 131. Scott, D.A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E., Roy, S. (2010) A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration, *J. Neurosci.*, **30**, 8083–8095.
- 132. Plotegher, N., Stringari, C., Jahid, S., Veronesi, M., Girotto, S., Gratton, E., Bubacco, L. (2015) NADH fluorescence lifetime is an endogenous reporter of alpha-synuclein aggregation in live cells, *FASEB J*, 29, 2484–2494.
- 133. Chakraborty, S., Nian, F.S., Tsai, J.W., Karmenyan, A., Chiou, A. (2016) Quantification of the Metabolic State in Cell-Model of Parkinson's Disease by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, *Sci. Rep.*, 6, 19145.
- 134. Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., Vila, M. (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease, J. Bioenerg. Biomembr., 36, 375–379.
- 135. Sameni, S., Syed, A., Marsh, J.L., Digman, M.A. (2016) The phasor-FLIM fingerprints reveal shifts from OXPHOS to enhanced glycolysis in Huntington Disease, *Sci. Rep.*, 6, 34755.
- Marsh, J.L., Pallos, J., Thompson, L.M. (2003) Fly models of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.*, 12 Spec No 2, R187–R193.
- 137. Shirshin, E.A., Gurfinkel, Y.I., Matskeplishvili, S.T., Sasonko, M.L., Omelyanenko, N.P., Yakimov, B.P., Lademann, J., Darvin, M.E. (2018) In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans, J. Biophotonics, e201800066.
- 138. Huck, V., Gorzelanny, C., Thomas, K., Getova, V., Niemeyer, V., Zens, K., Unnerstall, T.R., Feger, J.S., Fallah, M.A., Metze, D., Stander, S., Luger, T.A., Koenig, 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.

- 139. Pouli, D., Balu, M., Alonzo, C.A., Liu, Z., Quinn, K.P., Rius-Diaz, F., Harris, R.M., Kelly, K.M., Tromberg, B.J., Georgakoudi, I. (2016) Imaging mitochondrial dynamics in human skin reveals depth-dependent hypoxia and malignant potential for diagnosis, *Sci. Transl. Med.*, **8**, 367ra169.
- 140. Klemp, M., Meinke, M.C., Weinigel, M., Rowert-Huber, H.J., Konig, K., Ulrich, M., Lademann, J., Darvin, M.E. (2016) Comparison of morphologic criteria for actinic keratosis and squamous cell carcinoma using in vivo multiphoton tomography, *Exp. Dermatol.*, 25, 218–222.
- 141. Yokouchi, M., Atsugi, T., Logtestijn, M.V., Tanaka, R.J., Kajimura, M., Suematsu, M., Furuse, M., Amagai, M., Kubo, A. (2016) Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape, *Elife*, 5, e19593.
- 142. Newton, V.L., Bradley, R.S., Seroul, P., Cherel, M., Griffiths, C.E., Rawlings, A.V., Voegeli, R., Watson, R.E., Sherratt, M.J. (2017) Novel approaches to characterize age-related remodelling of the dermal-epidermal junction in 2D, 3D and in vivo, *Skin Res. Technol.*, 23, 131–148.
- 143. Springer, S., Zieger, M., Koenig, K., Kaatz, M., Lademann, J., Darvin, M.E. (2016) Optimization of the

measurement procedure during multiphoton tomography of human skin in vivo, *Skin Res. Technol.*, **22**, 356–362.

- 144. Sun, Q., Zheng, W., Wang, J., Luo, Y., Qu, J.Y. (2015) Mechanism of two-photon excited hemoglobin fluorescence emission, *J. Biomed. Opt.*, 20, 105014.
- 145. Shirshin, E.A., Yakimov, B.P., Rodionov, S.A., Omelyanenko, N.P., Priezzhev, A.V., Fadeev, V.V., Lademann, J., Darvin, M.E. (2018) Formation of hemoglobin photoproduct is responsible for two-photon and single photon-excited fluorescence of red blood cells, *Laser: Phys. Lett.*, 15, 075604.
- 146. Stringari, C., Abdeladim, L., Malkinson, G., Mahou, P., Solinas, X., Lamarre, I., Brizion, S., Galey, J.B., Supatto, W., Legouis, R., Pena, A.M., Beaurepaire, E. (2017) Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing, *Sci. Rep.*, 7, 3792.
- 147. Patalay, R., Talbot, C., Alexandrov, Y., Lenz, M.O., Kumar, S., Warren, S., Munro, I., Neil, M.A., Konig, K., French, P.M., Chu, A., Stamp, G.W., Dunsby, C. (2012) Multiphoton multispectral fluorescence lifetime tomography for the evaluation of basal cell carcinomas, *PLoS One*, 7, e43460.