

О.А. СТЕЛЬМАЩУК, В.В. ШУПЛЕЦОВ, Е.А. ЖЕРЕБЦОВ

ТЕХНОЛОГИЯ ТРАНСКУТАННОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПАРАМЕТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Аннотация. В данной работе описаны возможности методов транскутанной регистрации интенсивности и времени жизни флуоресценции ФАД для дальнейшей оценки активности МАО. В ходе исследования была апробирована новая методика, позволяющая получать диагностическую информацию о метаболическом состоянии клеток ткани в режиме реального времени и описано устройство для диагностики активности МАО, основанное на совместном применении методов флуоресцентной спектроскопии и времени жизни флуоресценции, и. Описаны технические детали реализации измерения времени жизни флуоресценции и диффузного отражения системой в исследуемых тканях добровольцев.

Ключевые слова: время жизни флуоресценции, моноаминоксидаза, митохондрии, диагностика.

Введение

Методы, основанные на флуоресценции, в последнее время нашли широкое применение в исследованиях клеток и живых организмов. Высокий уровень чувствительности и способность предоставлять информацию о биохимических взаимодействиях на молекулярном уровне обеспечили возможность для перехода к разработкам и внедрению методов неинвазивной диагностики, основанных на анализе параметров флуоресценции биотканей. Интенсивность их специфичной флуоресценции используется для дифференциальной диагностики метаболических дисфункций и позволяет выявлять нарушения в клеточном метаболизме [1]. Химический состав, окружение и молекулярное взаимодействие флуорофора приводят к изменению времени жизни флуоресценции, что становится тем самым ценным ключом к пониманию важных процессов на молекулярном уровне в биологии и медицине.

Многие флуорофоры характеризуются схожими или перекрывающимися областями поглощения и флуоресценции. Это приводит к сложностям интерпретации данных, полученных в тканях. В настоящее время большой проблемой использования флуоресцентной спектроскопии является неспособность разграничить и определить отдельные флуорофоры путем выбора длин волн возбуждения и эмиссии флуоресценции. Решением этих задач может стать применение методов, способных разделять сигналы флуоресценции на основе других физических эффектов. Так, например, метод коррелированного по времени подсчета одиночных фотонов (TCSPC) позволяет измерять временные параметры релаксации флуоресценции эндогенных флуорофоров после возбуждения коротким пикосекундным лазерным импульсом. Это дает возможность на качественно новом уровне определять метаболическое состояние клеток или тканей [2]. Данный метод имеет ряд других функций, важных для визуализации биологических объектов в динамике. Он способен разрешать сложные профили спада интенсивности флуоресценции после импульсного возбуждения и устойчив к динамическим изменениям параметров затухания флуоресценции во время сбора первичных данных [3]. Это позволяет разделять пулы свободных и связанных с белком коферментов переноса электронов, отвечающих за продукцию энергии в митохондриях клеток, таких как НАДН/ФАД. Определение свободного НАДН возможно по относительно короткому времени релаксации его собственной флуоресценции, оцениваемой на уровне 400 пс. При этом среднее время жизни флуоресценции связанного с белком НАДН колеблется от 1,0 до 4,0 нс [4]. Разделение двух форм ФАД возможно по более продолжительному времени жизни флуоресценции в свободном состоянии от 2,3 до 2,9 нс по сравнению с состоянием, связанным с белком, когда данный параметр может быть менее 0,1 нс [5,6]. Ранее, подробный анализ автофлуоресценции с помощью разных компонент времени жизни в разных спектральных каналах был успешно применен для различения злокачественных и незлокачественных клеток [7]. Метод, основанный на регистрации спектров и времени жизни

автофлуоресценции, может давать надежную информацию о физиологических или измененных морфофункциональных свойствах клеток и тканей [8,9]. Многие патологические процессы в организме приводят к изменениям в флуоресцентной активности тканей, что происходит из-за изменения накопления природных флуорофоров [10]. Коферменты НАДН/ФАД являются важными участниками энергетического метаболизма клеток. Известно также, что количество внутриклеточного эндогенного флуоресцирующего протеин-связанного кофактора ФАД связано с активностью моноаминоксидаз (МАО) А и В [11].

Моноаминоксидаза обоих типов является хорошо изученным ферментом, в то же время оценка ее активности *in vivo* является сложной задачей. Контроль активности МАО необходим для подбора индивидуальной терапии при заболеваниях, связанных с недостаточной или избыточной активностью МАО. Кроме этого, имеется связь между тяжестью протекания заболевания

COVID-19 у пациентов и изменением активности МАО [12]. Одним из актуальных направлений является возможность транскутанного определения активности жизненно важного фермента окислительного дезаминирования в фибробластах кожи, что позволило бы неинвазивно диагностировать характер протекания инфекционных заболеваний, таких как COVID-19, а также ряда патологий наследственной и приобретенной этиологии (делирия, вызванного SARS-CoV-2, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, шизофрении, депрессии, дефицита внимания, склонности к наркотическим зависимостям, а также мигренью), связанных с отклонениями в активности моноаминоксидазы [12,13].

Для повышения эффективности лечения пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и тяжелыми осложнениями протекания новой вирусной инфекции COVID-19 актуальной задачей является разработка и внедрение новых методов контроля активности МАО. Одним из решений могут служить методы оптических измерений, позволяющих получать диагностическую информацию в режиме реального времени без забора биологического материала. Особенно перспективным представляется одновременное применение нескольких методов, обеспечивающее комплексную оценку взаимосвязанных параметров жизнедеятельности тканей.

В то же время следует учитывать, что метаболическое взаимодействие клеток необходимо наблюдать только в их естественном микроокружении. Поэтому для многих типов неинвазивных измерений кожа является многопараметрическим диагностическим интерфейсом. Отражение и флуоресценция кожи дают информацию о структуре ткани, параметрах кровенаполнения и природе метаболических процессов [8]. Неинвазивные измерения параметров флуоресценции в коже или слизистой оболочке представляют особый интерес для многих диагностических приложений, а также для открытия новых активных веществ и разработки современных фармацевтических препаратов [9,10]. Однако при измерениях на коже необходимо учитывать, что на уровень эндогенной флуоресценции влияет степень насыщения тканей кровью. Степень кровенаполнения изменяет оптические свойства ткани, что приводит к изменению флуоресценции и усложняет интерпретацию данных [11]. Также кровенаполнение влияет на работу митохондрий, требующей повышенного количества кислорода. Это связано с тем, что митохондрии отвечают за производство энергии в виде АТФ и контролируют многие процессы, от передачи сигналов до гибели клетки, а кислород имеет решающее значение для эффективного производства АТФ в процессе окислительного фосфорилирования, также называемого митохондриальным дыханием [12,13]. Эта функция делает митохондрии чувствительными к изменению количества поступающего кислорода. Информация о насыщении тканей кислородом может указывать о процессе снижения окислительного фосфорилирования, связанного с недостатком кислорода, или с внутренним переключением на гликолиз и будет зависеть от кровенаполнения тканей [14]. Следовательно, оценка метаболических процессов, связанных с насыщением кислородом тканей, ограничивается существующими методами *in vivo*, так как на сегодняшний день применяемые в диагностике методы регистрации флуоресценции в тканях *in vivo* имеют ряд недостатков.

При внесении катехоламинов к клеткам, содержащим в достаточном количестве МАО, наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции, ассоциированной с компонентами,

имеющими малое время жизни флуоресценции (фракция протеин-связанных флавинов). Активация МАО через введение катехоламинов посредством ионофореза позволяет быстро регистрировать изменения флуоресценции в тканях кожи, потенциально связанных с дезаминированием адреналина моноаминоксидазой. Известно, что диффузия адреналина через кожу посредством ионофореза в сравнении с эффективностью аппликации на основе пассивного диффузного проникновения вещества в ткань в 10-20 раз выше при одном и том же времени воздействия [15]. Однако до сих пор это свойство не было использовано для оценки активности МАО при *in vivo* измерениях. В ходе исследования для регистрации процессов активации МАО в качестве вещества из группы катехоламинов использовался адреналин, доставляемый в кожу посредством электрофореза.

Таким образом, целью данной работы явилось изучение возможных методов транскутанной регистрации интенсивности и времени жизни флуоресценции ФАД для дальнейшей оценки активности МАО. Разработка соответствующего метода, а также измерительной системы для определения активности МАО, представляет особый интерес для современной диагностики и клинических исследований, что обещает оказать огромное влияние на соответствующие области применения.

Материалы и методы

Экспериментальная установка объединяла один канал для записи перфузии крови методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и два канала для измерения флуоресценции (рисунок 1). Для регистрации ЛДФ-сигнала использовался ранее разработанный канал лазерной доплеровской флоуметрии, основанный на использовании одномодового лазера с длиной волны 1064 нм.

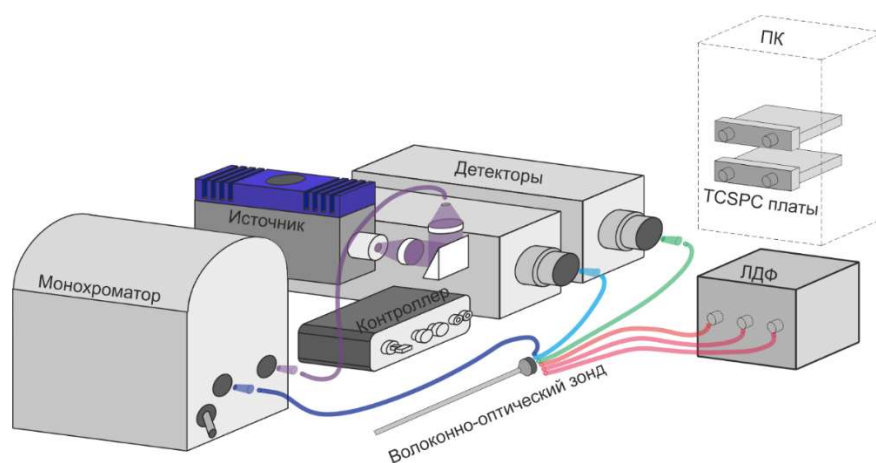


Рисунок 1 – Схематичное изображение используемой экспериментальной установки

Регистрация параметров флуоресценции осуществлялась с помощью экспериментальной установки, включающей два канала измерения времени жизни флуоресценции на основе системы счета одиночных фотонов с корреляцией по времени (Time Correlated Single Photon Counting – TCSPC) с эмиссионными фильтрами 479 ± 40 нм и 530 ± 43 нм в каждом канале. Для возбуждения флуоресценции использовался лазерный источник BDS-SM-375-FBC-101 (Becker & Hickl, GmbH, Германия) с пиком излучения в области 375 нм и частотой повторения импульсов 80 МГц совместно с монохроматором MonoScan2000 (Ocean Optics, Inc., США). В качестве детекторов использовались два гибридных фотодетектора HPM-100-40-CMOUNT (Becker & Hickl, GmbH, Германия) со спектральным диапазоном чувствительности 250-720 нм и квантовой эффективностью в 45% (для 500 нм). Фотонно-импульсные выходы двух детекторов подключались к двум модулям счета фотонов соответственно. Для выделения участков спектров флуоресценции перед оптическими входами детекторов использовались флуоресцентные оптические фильтры MF 479-40 и MF 530-43 (Thorlabs, Inc., США). Источник лазерного излучения и детекторы подсоединялись к

волоконно-оптическому зонду, состоящему из одного одномодового зондирующего волокна и двух собирающих многомодовых волокон. Расстояние источник-детектор между излучающим и собирающим световодами составляло около 1 мм. Для реализации ионофореза адреналина в ткань использовался аппарат Поток (Каскад-ФТО, Россия) при уровне тока 1 мА.

Гендерно сбалансированная выборка условно здоровых добровольцев составила 8 человек в возрасте $35 \pm 5,6$ лет. Каждому добровольцу проводились 5-минутные записи флуоресценции кожи предплечья с предварительным обезжириванием этанолом. Исследования включали одновременную регистрацию перфузии крови, параметров интенсивности и времени жизни флуоресценции совместно с ионофорезом физиологического раствора в течение 10 минут и последующим добавлением адреналина в область воздействия ионофореза в течение следующих 10 минут. Электрод для ионофореза имел отверстие для установки оптического волокна для измерения времени жизни флуоресценции на поверхности кожи. Поступление адреналина (500 мкл, 5,5 мМ) на поверхность кожи в область измерения осуществлялось с помощью инфузионного насоса.

Данные времени жизни флуоресценции были обработаны с фитингом двухэкспоненциальной моделью. Репрезентативные графики регистрируемой перфузии крови и измеряемые параметры времени жизни флуоресценции в спектральной полосе 530 ± 43 нм, показаны на рисунке 2.

Результаты исследования влияния кровенаполнения на регистрируемые параметры времени жизни флуоресценции

Средние значения параметров времени жизни флуоресценции для кожи предплечья, измеренные в выбранных полосах излучения, представлены в таблице 1. Степень взаимосвязи между перфузией крови, интенсивностью флуоресценции и рассчитанными параметрами времени жизни флуоресценции оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона.

Таблица 1 – Средние значения параметров времени жизни флуоресценции для кожи предплечья, измеренные в выбранных полосах эмиссии

Параметры времени жизни флуоресценции	Эмиссионный фильтр	Средние значения параметров
$\alpha_1, \%$	479±40 нм	56±2
	530±43 нм	57±2
$\alpha_2, \%$	479±40 нм	43±2
	530±43 нм	42±2
$\tau_1, \text{пс}$	479±40 нм	551±41
	530±43 нм	505±62
$\tau_2, \text{пс}$	479±40 нм	2904±59
	530±43 нм	2927±79

Абсолютные значения измеренных параметров времени жизни флуоресценции указывают на то, что основными обнаруженными в измерениях флуоресцентными агентами являются НАДН и ФАД как свободные, так и связанные с белком. Динамика и форма графиков временных рядов для второго канала регистрации флуоресценции (530 ± 43 нм) отличается от данных с первого канала (479 ± 40 нм). Это можно объяснить более сильным влиянием клеточных фракций ФАД в спектральной полосе регистрируемой эмиссии. Интенсивность флуоресценции демонстрировала высокую степень корреляции с перфузией крови, в то время как время жизни первой и второй компонент и их относительная доля в общей флуоресценции показали незначительную степень линейной связи с данными ЛДФ (рисунок 3).

Высокая корреляция параметров интенсивности флуоресценции с перфузией крови в значительной степени может быть объяснена поглощением кровью излучения флуоресценции и возбуждающего излучения. Полученные данные свидетельствуют о влиянии уровня перфузии крови на процессы клеточно-тканевого обмена.

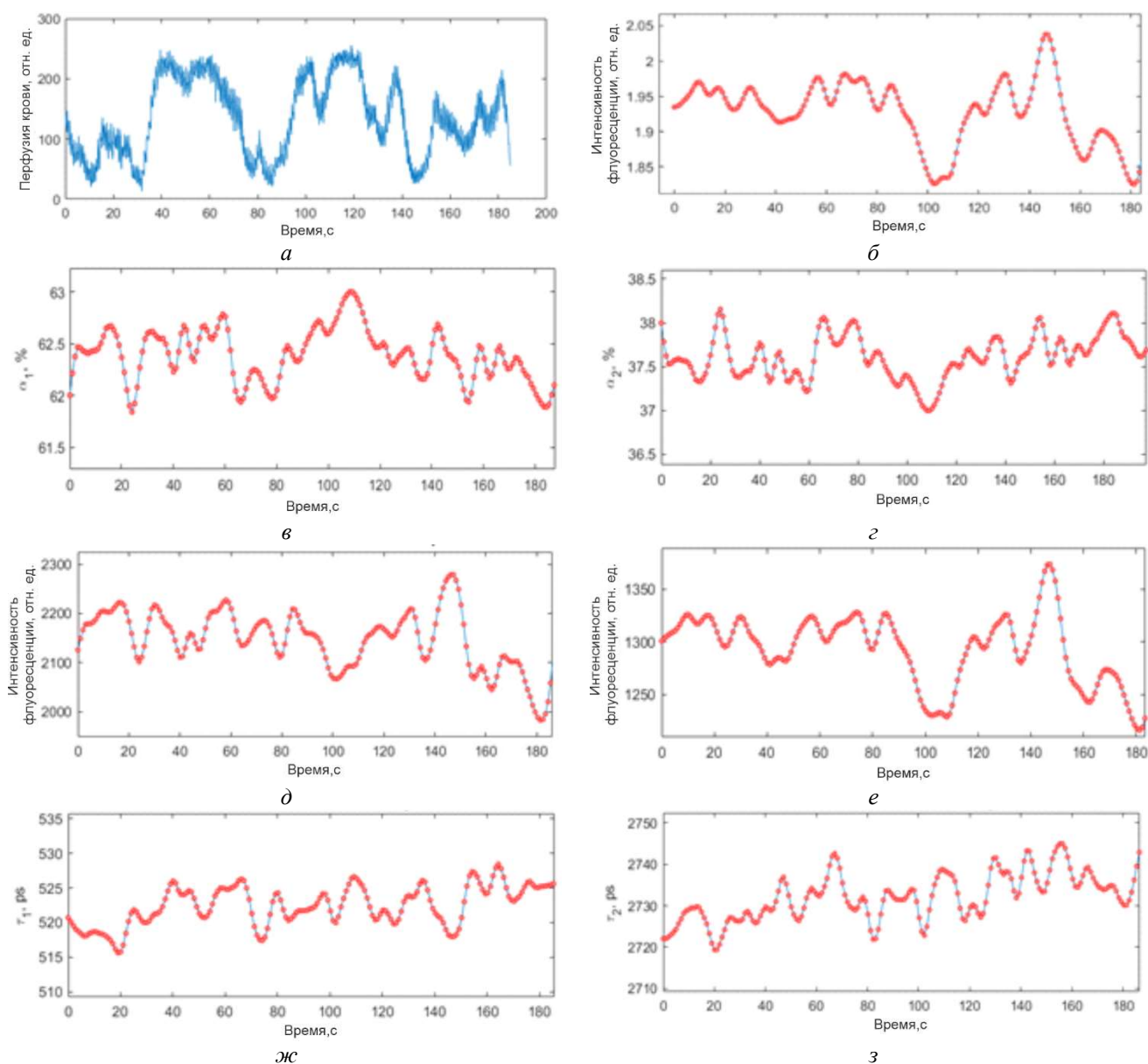


Рисунок 2 – Репрезентативные графики перфузии крови и параметров времени жизни флуоресценции (с эмиссионным фильтром 530 ± 43 нм):

а) перфузия крови, зарегистрированная методом ЛДФ; б) интенсивность флуоресценции; в) доля первой компоненты α_1 в общей флуоресценции; г) доля второй компоненты α_2 в общей флуоресценции; д) интенсивность флуоресценции первой компоненты α_1 ; е) интенсивность флуоресценции второй компоненты α_2 ; ж) время жизни флуоресценции τ_1 первой компоненты; з) время жизни флуоресценции τ_2 второй компоненты

Как результат исследования влияния катехоламинов на время жизни флуоресценции, были получены и рассчитаны параметры времени жизни флуоресценции, измеренные после воздействия адреналина на кожу (рисунки 4 и 5). Результаты представлены для двух каналов измерения соответственно.

Параметры времени жизни флуоресценции, за исключением τ_1 для измерений с эмиссионным фильтром 530 ± 43 нм и τ_2 для измерений с эмиссионным фильтром 479 ± 40 нм и 530 ± 43 нм (компоненты времени жизни флуоресценции), показали статистически значимые различия в измерениях до и после воздействия адреналина. Учитывая тот факт, что при ионофорезе адреналина на всей глубине диагностического зондирования происходит равномерное насыщение адреналина (субстратом MAO), полученные данные позволяют сделать вывод, что внесение адреналина через кожу вызывает рост интенсивности в спектральном диапазоне флуоресценции флавинов, причем существенен рост компоненты α_1 ,

связанной со вкладом свободной формы коротко живущей компоненты флуоресценции в общую долю сигнала. Это подтверждается выявленными статистическими различиями в параметрах времени жизни флуоресценции.

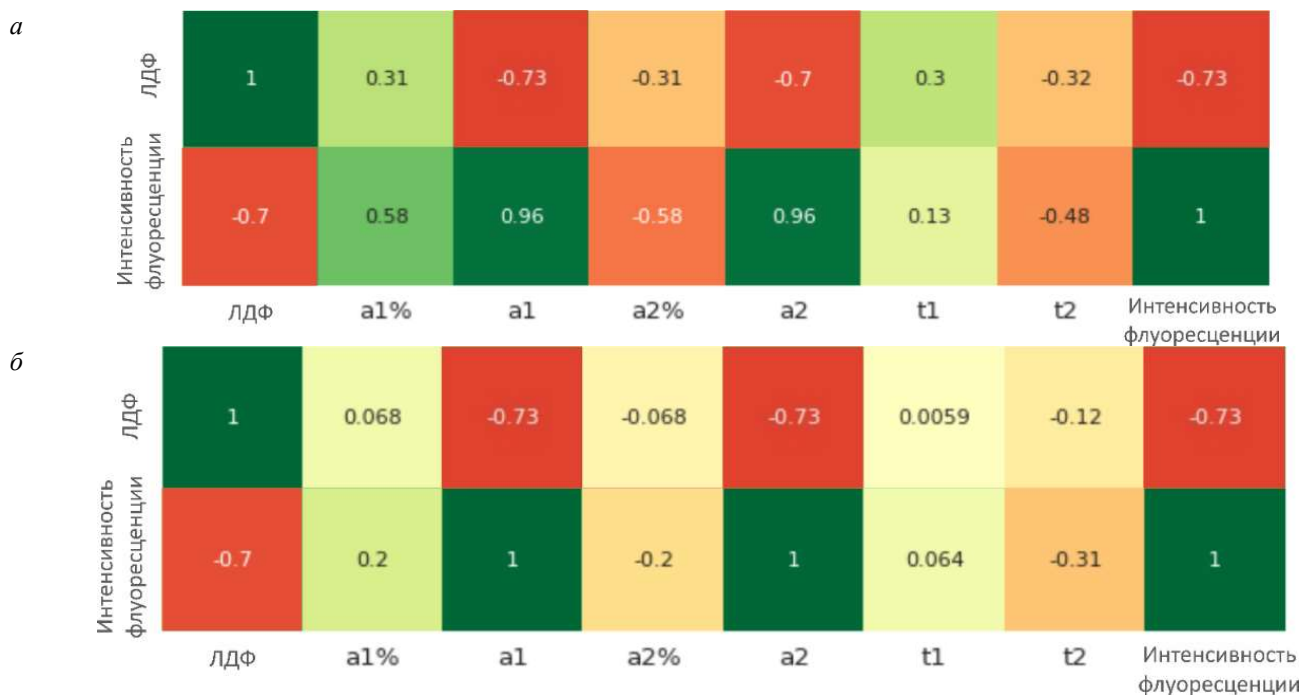


Рисунок 3 – Коэффициенты корреляции Пирсона для перфузии крови, измеренной методом ЛДФ, интенсивности флуоресценции и расчетных параметров времени жизни флуоресценции:

а) для 1-го FL-канала с эмиссионным фильтром 479±40 нм;
 б) для 2-го FL-канала с эмиссионным фильтром 530±43 нм

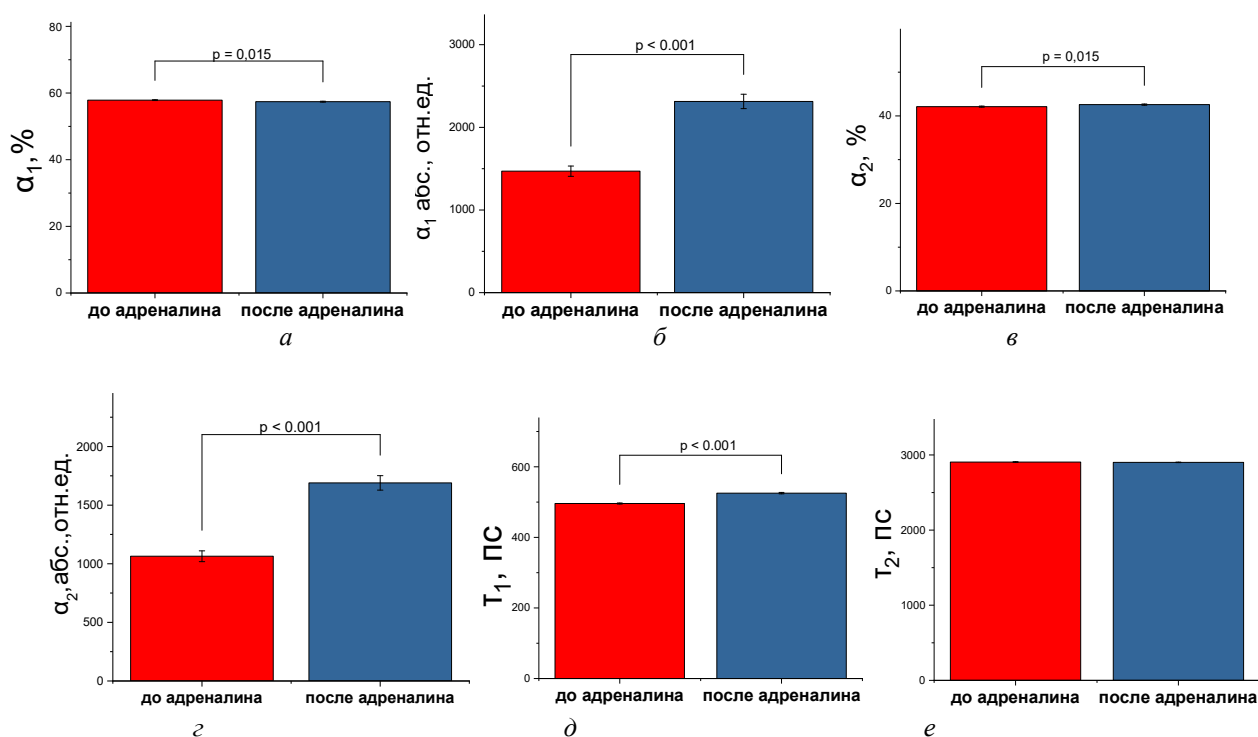


Рисунок 4 – Измерения с эмиссионным фильтром 479±40 нм:

а) доля первой компоненты a_1 в общей флуоресценции; б) доля второй компоненты a_2 в общей флуоресценции; в) интенсивность флуоресценции первой компоненты α_1 ; г) интенсивность флуоресценции второй компоненты α_2 ; д) время жизни флуоресценции τ_1 первой компоненты; е) время жизни флуоресценции τ_2 второй компоненты

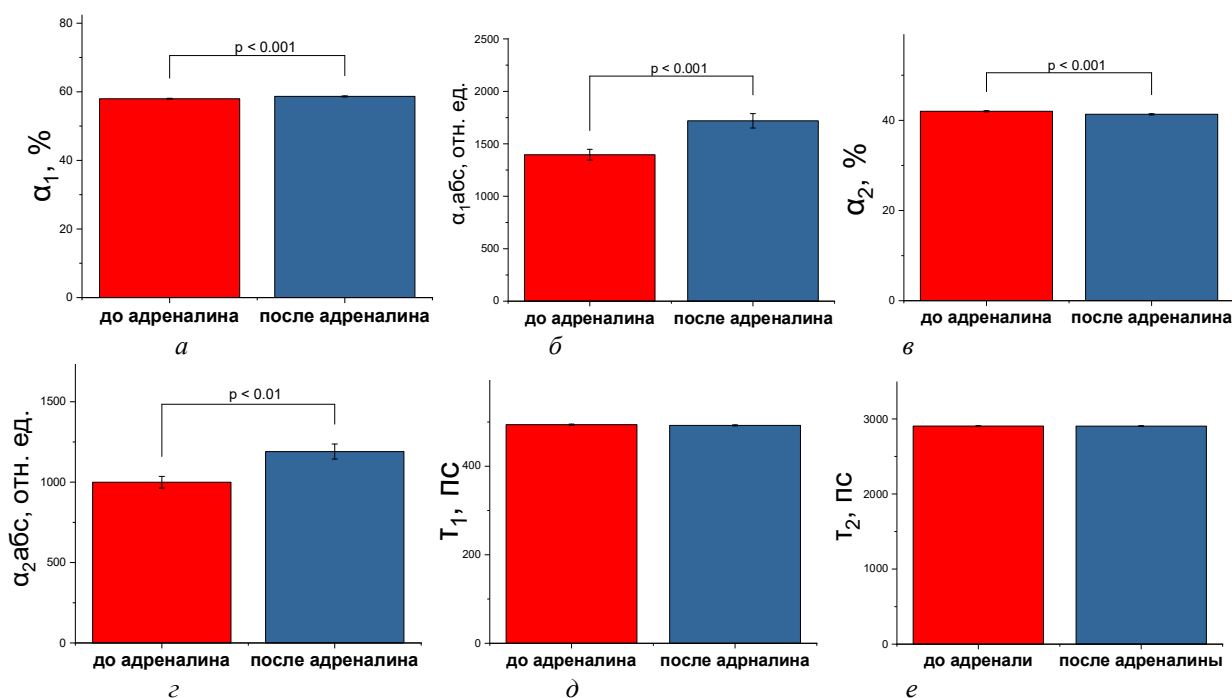


Рисунок 5 – Измерения с эмиссионным фильтром 530 ± 43 нм:

- а) доля первой компоненты α_1 в общей флуоресценции; б) доля второй компоненты α_2 в общей флуоресценции; в) интенсивность флуоресценции первой компоненты α_1 ; г) интенсивность флуоресценции второй компоненты α_2 ; д) время жизни флуоресценции τ_1 первой компоненты; е) время жизни флуоресценции τ_2 второй компоненты

Заключение

Предложенный и разработанный принцип получения диагностической информации, основанный на совместном применении методов флуоресцентной спектроскопии и времени жизни флуоресценции, а также методология многопараметрической оптической диагностики клеток биологических тканей и экспериментальная система счета одиночных фотонов с корреляцией по времени, интегрируемая в стандартный оптический зонд, позволили провести регистрацию интенсивности и времени жизни флуоресценции ФАД для дальнейшей оценки активности MAO.

Проведенные экспериментальные транскутанные исследования по изучению активности моноаминоксидазы позволили получить новые данные, подтверждающие перспективность предлагаемого метода и выявляющие различия в параметрах интенсивности и времени жизни флуоресценции в активированной и интактной форме MAO.

Таким образом, в ходе исследования была подтверждена принципиальная возможность использования предложенного метода и устройства для выявления особенностей метаболических и структурных изменений в клетках тканей при различных состояниях активности MAO. С высокой степенью вероятности данное направление исследований имеет перспективу, нацеленную на будущее с целью внедрения в клиническую практику.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 20-75-00123.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kandurova K. et al. Fiber-optic system for intraoperative study of abdominal organs during minimally invasive surgical interventions // Appl. Sci. 2019. Vol. 9, № 2. P. 217.
2. Becker W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications // Journal of Microscopy. 2012. Vol. 247, № 2. 119–155 p.
3. Becker W. The bh TCSPC Handbook // Scanning. 2010. 768 p.
4. Niesner R. et al. Selective Detection of NADPH Oxidase in Polymorphonuclear Cells by Means of NAD(P)H-Based Fluorescence Lifetime Imaging // J. Biophys. 2008. Vol. 2008. P. 13.
5. Datta R. et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation,

analysis, and applications // J. Biomed. Opt. 2020. Vol. 25, № 7. P. 071203.

6. Nakashima N. et al. Picosecond fluorescence lifetime of the coenzyme of D-amino acid oxidase. // J. Biol. Chem. 1980. Vol. 255, № 11. P. 5261–5263.

7. Rück A. et al. SLIM: A new method for molecular imaging // Microsc. Res. Tech. 2007. Vol. 70, № 5. P. 485–492.

8. Anderson R.R., Parrish J.A. The Optics of Human Skin // J. Invest. Dermatol. 1981. Vol. 77, № 1. P. 13–19.

9. Stelmashchuk O. et al. Noninvasive control of the transport function of fluorescent coloured liposomal nanoparticles // Laser Phys. Lett. 2017. Vol. 14, № 6.

10. Tarakanchikova Y. et al. Allocation of rhodamine-loaded nanocapsules from blood circulatory system to adjacent tissues assessed in vivo by fluorescence spectroscopy // Laser Phys. Lett. 2018. Vol. 15, № 10.

11. Becker W. Advanced time-correlated single photon counting techniques // Springer Ser. Chem. Phys. 2005. Vol. 81.

12. Angelova P.R., Abramov A.Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration // FEBS Lett. 2018. Vol. 592, № 5. P. 692–702.

13. Ubbink R. et al. Mitochondrial oxygen monitoring with COMET: verification of calibration in man and comparison with vascular occlusion tests in healthy volunteers // J. Clin. Monit. Comput. 2020. Vol. 35, № 6. P. 1357–1366.

14. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2011. Vol. 27. P. 441–464.

15. Di Stasi S.M. et al. The stability of lidocaine and epinephrine solutions exposed to electric current and comparative administration rates of the two drugs into pig bladder wall // Urol. Res. Springer, 2003. Vol. 31, № 3. P. 169–176.

Стельмашук Ольга Андреевна

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орел, аспирант кафедры Приборостроение, метрология и сертификация, младший научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии и патологии научно-технологического центра биомедицинской фотоники
Россия, г. Орел, ул. Комсомольская, 95
E-mail: o.a.stelmashuk@gmail.com

Шуплецов Валерий Витальевич

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орел, аспирант кафедры Приборостроение, метрология и сертификация, стажер-исследователь научно-технологического центра биомедицинской фотоники
Россия, г. Орел, ул. Комсомольская, 95
E-mail: matoka_97@mail.ru

Жеребцов Евгений Андреевич

Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орел, старший научный сотрудник научно-технологического центра биомедицинской фотоники
Россия, г. Орел, ул. Комсомольская, 95
E-mail: zherebzow@gmail.com

O.A. STELMASHCHUK, V.V. SHUPLETSOV, E.A. ZHEREBTSOV

NOVEL TECHNIQUE FOR TRANSCUTANEOUS ASSESSMENT OF MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY BASED ON THE ANALYSIS OF SKIN FLUORESCENCE PARAMETERS

Abstract. *This paper describes the possibilities of transcutaneous recording of the intensity and lifetime of fluorescence of FAD for further assessment of MAO activity. In the course of the study, a new technique was tested and a device for diagnosing MAO activity was described, based on the combined use of fluorescence spectroscopy and lifetime fluorescence methods, which allows obtaining diagnostic information about the metabolic state of tissue cells in real time. Here we describe the technical details of the implementation of the measurement of the lifetime of fluorescence and diffuse reflection by the system in the skin of volunteers.*

Keywords: *fluorescence lifetime, monoamine oxidase, mitochondria, diagnostics*

BIBLIOGRAPHY

1. Kandurova K. et al. Fiber-optic system for intraoperative study of abdominal organs during minimally invasive surgical interventions // Appl. Sci. 2019. Vol. 9, № 2. P. 217.