

А.И. ДОЛГИХ, О.А. СТЕЛЬМАЦУК, Е.А. ЖЕРЕБЦОВ

РЕГИСТРАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Аннотация. Работа посвящена возможности применения метода времени жизни флуоресценции для оценки патологического состояния клеток при нейродегенеративных состояниях с целью ранней диагностики и своевременного лечения данных заболеваний. Параметры продолжительности жизни флуоресценции эндогенного флуорофора НАДН в клеточной культуре 20-дневных фибробластов с мутацией в гене *PINK1* измеряли с помощью камеры *rsco.film FLIM* с ультрафиолетовым лазером (375 нм/10 мВт) и амплитудной модуляцией на частоте 40 МГц. Выявленные статистические различия показывают перспективность оценки клеточного метаболизма с использованием данного метода для последующей своевременной диагностики болезни Паркинсона. Данный подход в последующем может позволить получать более подробную информацию о различных биохимических процессах в клетках в динамике, а также станет основой для ранней диагностики заболеваний.

Ключевые слова: оптическая диагностика, флуоресценция времени жизни, НАДН, болезнь Паркинсона, *PINK1*, фибробласты.

Введение

В настоящее время оптические методы, характеризующие различные параметры флуоресценции, активно применяются при исследовании функционального состояния клеток и живых организмов. Данный подход характеризуется высокой чувствительностью и возможностью предоставления информации о биохимических взаимодействиях на молекулярном уровне в связи с изменениями содержания флуорофоров НАДН/ФАД при развитии различных патологических процессов [1]. Являясь важнейшими участниками энергетического метаболизма, данные соединения крайне эффективны в дифференциальной диагностике заболеваний [2]. Например, благодаря оптическим методам стало возможным определение границ опухоли и раковых клеток по различию процессов получения энергии в виде АТФ [3,4][3][4]. Кроме того, данный подход активно применяется в сосудистой нейрохирургии при оценке гемодинамической ситуации, а также в офтальмологии при осмотре сосудов глазного дна [5]. Следует отметить, что, имея множество преимуществ, оптический метод диагностики *in vivo* имеет ряд трудностей в достоверной интерпретации данных, полученных при регистрации флуоресценции в тканях и клетках. Это связано с тем, что многие флуорофоры характеризуются схожими или перекрывающимися областями поглощения флуоресценции, что порождает неспособность их идентификации путем возбуждения и выброса длин волн [6]. Решением этой задачи стало применение фазово-модуляционного метода измерения параметров времени жизни флуоресценции (FD-FLIM), способного разделять сигналы флуоресценции и обеспечивающего достоверную, безболезненную и своевременную диагностику патологий на клеточном уровне [7].

Важнейшей характеристикой флуоресценции является время ее затухания. Время жизни флуоресценции определяется как среднее время, в течение которого флуорофор остается в возбужденном состоянии. Следует отметить, что данный параметр, в отличие от интенсивности, не зависит от концентрации или длины оптического пути, но на регистрируемые численные значения данной группы параметров могут влиять такие факторы как биохимическое взаимодействие НАДН с окружающими молекулами, локальный рН, содержание O_2 , Ca^{2+} и другие [8–11]. Ввиду этого, измерение времени жизни флуоресценции позволяет провести точный анализ метаболического состояния клеток.

Гликолиз и окислительное фосфорилирование, являясь важнейшими путями энергетического метаболизма клетки, связаны с процессами клеточного дыхания и последующим образованием АТФ. В свою очередь, кофакторы НАДН и ФАД выступают в роли доноров и акцепторов электронов в реакциях образования АТФ, находясь в окисленной (НАД⁺, ФАД) или восстановленной формах (НАДН, ФАДН₂) [12]. Коферменты НАДН и ФАД способны к флуоресценции, анализ параметров которой крайне важен в оценке метаболического состояния клетки. Спектр возбуждения НАДН лежит в районе 300-400 нм с

пиком на длине волны 355 нм, спектр эмиссии расположен в районе 400-600 нм с максимумом на $\lambda = 470$ нм. НАДН находится как в свободном, так и связанном с белками состоянии [13]. При этом свободная форма локализуется в цитозоле, отвечая за процессы гликолиза, а спектр эмиссии сдвинут в более красную область на 20 нм в сравнении со связанной формой. Связанная форма НАДН локализуется в митохондриях, участвуя в реакциях окислительного фосфорилирования, и испускает основную флуоресценцию в синем диапазоне [14]. Следует отметить, что квантовый выход НАДН увеличивается примерно в четыре раза в связанном с белками состоянии, в основе чего лежит тушение флуоресценции сенсора при взаимодействии с ионом. Время жизни флуоресценции сенсора в связанной с ионом форме обычно длиннее времени жизни того же сенсора в свободной форме. Соответственно, с повышением концентрации ионов время жизни флуоресценции сенсора увеличивается [8]. Характерное время жизни флуоресценции кофакторов в клетке составляет порядка 0,3 и 2,0 нс для НАДН. Более короткое время жизни соответствует свободной форме НАДН, более длинное связанной. Время жизни связанного НАДН зависит от того, с каким белком связан кофактор, и варьирует в пределах от 1,7 до 2,9 нс [14].

Благодаря особенностям данной технологии открывается возможность для лучшего понимания процесса формирования патогенеза метаболических процессов, происходящих при нейродегенеративных заболеваниях наследственной и приобретенной этиологии. Одним из социально значимых заболеваний является болезнь Паркинсона [15]. Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера, характеризуется потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции с последующей обширной потерей недофаминергических нейронов [16]. Симптомы ранней БП обычно трудно распознать, при этом латентный период от потери дофаминергических нейронов до появления симптомов составляет около 5 лет. В дополнение к таким тяжелым проявлениям БП как тремор, брадикинезия, беспокойство, депрессия и когнитивные нарушения, люди с БП страдают многочисленными сопутствующими заболеваниями: частыми инфекционными болезнями, сердечными, психическими и желудочно-кишечными расстройствами, вегетативными дисфункциями, затруднениями глотания, нарушениями сна, речи, а также травмами, связанными с потерей координации [17]. Одной из возможных причин формирования болезни Паркинсона является наследственная мутация в гене PINK1 (homozygous p.Trp90Leufsx12), связанном с аутосомно-рецессивной БП [18]. При данной патологии клетки имеют значительные нарушения в биоэнергетике, включая снижение митохондриального мембранного потенциала (ММП), изменения окислительно-восстановительных процессов, а также нарушения процессов дыхания клетки и повышенную чувствительность к стимуляции кальцием и связанное с этим открытие митохондриальных пор [19–21].

В связи с актуальностью ранней диагностики болезни Паркинсона были проведены исследования по оценке метаболических процессов в клеточной культуре с патологией PINK1 методом времени жизни флуоресценции с временным разрешением. Группа измерений основывалась на фазово-модуляционном методе регистрации сигнала, который возникает при возбуждении флуоресценции синусоидально-модулированным излучением. При этом эффект затухания приводил к тому, что фаза регистрируемого сигнала сдвигалась на некоторый угол относительно возбуждающего, а коэффициент модуляции снижался [7,22]. Количественная оценка данных эффектов позволяет визуализировать два параметра времени жизни флуоресценции, которые рассчитываются по задержке фазы и по снижению амплитуды модуляции. Преимуществом данного метода является возможность регистрации временных рядов изменения регистрируемых параметров, позволяющего проводить анализ динамических процессов в клетке в течение времени. Следует также отметить, что чем меньше разность фаз между возбуждением и излучением, тем меньше время жизни флуоресценции. Еще одной характеристикой данного параметра является модуляция. Временная задержка между возбуждением и эмиссией ведет к снижению модуляции или демодуляции флуоресцентного сигнала. Таким образом, чем больше время жизни флуоресценции, тем больше показатель демодуляции. Метод фазово-модуляционной флуорометрии позволяет регистрировать кинетику затухания флуоресценции, описываемую одной или двумя экспонентами. Использование этого метода для более сложных случаев затухания является затруднительным [11].

Материалы и методы

Объектом исследования являлись 20-дневные клетки фибробластов, которые культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Biological Industries LDT, Израиль), пенициллин (100 ед/мл) (Gibco, США), стрептомицин (100 мкг/мл) (Gibco, США) в CO₂-инкубаторе (Thermo Scientific) при температуре 37 °С, относительной влажности 100 % в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 95 % воздуха, в культуральных флаконах (Eppendorf AG). Культивирование клеток проводили до достижения конфлюэнтности около 80 %. Для подготовки к исследованиям клетки отделяли от поверхности флаконом путем обработки TrypLE (Gibco, Дания) в течение 15 мин при 37 °С с последующим переносом полученной суспензии на круглые покровные стекла диаметром 22 мм, на которых культивирование клеток проводили в среде аналогичного состава до достижения конфлюэнтности 40-50 %. Все исследования были одобрены Институциональным этическим комитетом Орловского государственного университета (Протокол № 18 от 21.02.2020).

Материалы и методы

Параметры продолжительности жизни флуоресценции в культуре фибробластов измеряли с помощью камеры pco.flim FLIM (PCO AG, Германия). В полнокадровой камере CMOS с разрешением 1008×1008 пикселей измерения осуществляются в частотной области. Для визуализации использовали флуоресценцию NAD(P)H в клетках, ультрафиолетовый лазер (375 нм/10 мВт) с амплитудной модуляцией на частоте 40 МГц. Жидкий световод (PCO AG, Германия) использовали для подачи излучения лазера на микроскоп Olympus IX73P1F (Olympus Corp., Япония) и смягчения влияния пятен на качество изображения. Изображения клеток были получены и обработаны с помощью программного обеспечения NIS Elements AR версии 5.11 с плагином pco.flim. Изображение проводилось с помощью флуоресцентных фильтров DC/ET455/50m и Optoscan P130/ELE/450 dichroic (Cairn Research Ltd., Великобритания) перед детектором камеры. Полученные изображения интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции были обработаны в ImageJ на заключительном этапе.

Калибровка производили по референсному раствору beta-Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt, hydrate (Acros organics, Германия) с концентрацией 500 мкМ и временем жизни 0,41 нс.

Полученные результаты выражали в виде средних ± SEM (стандартная ошибка среднего значения); статистический анализ проводили по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Origin 2019 (Microcal Software Inc., Нортгемптон, Массачусетс, США). Различия считались значимыми, если $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Для выполнения исследований была проведена калибровка с применением референсного раствора, который имеет определенное экспоненциальное пространственно невариативное время жизни, в противном случае измерения следует считать ошибочными. На рисунке 1 приведен пример Phasor plot при калибровке на раствор НАДН.

В качестве исследуемой модели были использованы клеточные линии 20-дневных культур фибробластов. Одна из линий представляла собой культуру с мутацией гена PINK1, другая являлась линией фибробластов, полученной у контрольных пациентов. Количественная оценка данных эффектов позволяет визуализировать два параметра времени жизни флуоресценции, которые рассчитываются по задержке фазы и по снижению амплитуды модуляции.

На рисунке 2 приведены примеры изображений флуоресцентного имиджинга FLIM с временным разрешением для клеток фибробластов кожи человека.

Для измерения времени жизни флуоресценции в культуре клеток на микроскопической установке в течение 3 минут регистрировался базовый уровень сигнала, затем был добавлен FCCP (4 мкМ) и по окончании 3-х минут записи был внесен KCN (4 мМ).

Согласно статистическому анализу данных интенсивности флуоресценции по критерию Манна-Уитни у контрольных фибробластов и фибробластов с мутацией PINK1 было выявлено значимое различие ($p \leq 0,001$) базового уровня флуоресценции, наблюдалось падение сигнала при добавлении FCCP статистических различий не наблюдалось, а внесение KCN вызывало рост интенсивности флуоресценции ($p \leq 0,001$). При анализе параметров,

отражающих время жизни флуоресценции, оцененных по сдвигу фаз (τ_{ϕ} , нс) и уменьшению коэффициента модуляции сигнала флуоресценции (τ_m , нс), были выявлены статистически значимые различия при добавлении FCCP ($p \leq 0,001$) и рост показателей после внесения KCN ($p \leq 0,001$) (рисунок 3). Важно отметить, что при измерениях интенсивности флуоресценции после внесения разобщителя не наблюдалось статистически значимых различий, в отличие от показателей τ_{ϕ} и τ_m , что подтверждает необходимость применения параметров времени жизни флуоресценции для понимания метаболических процессов в клетках.

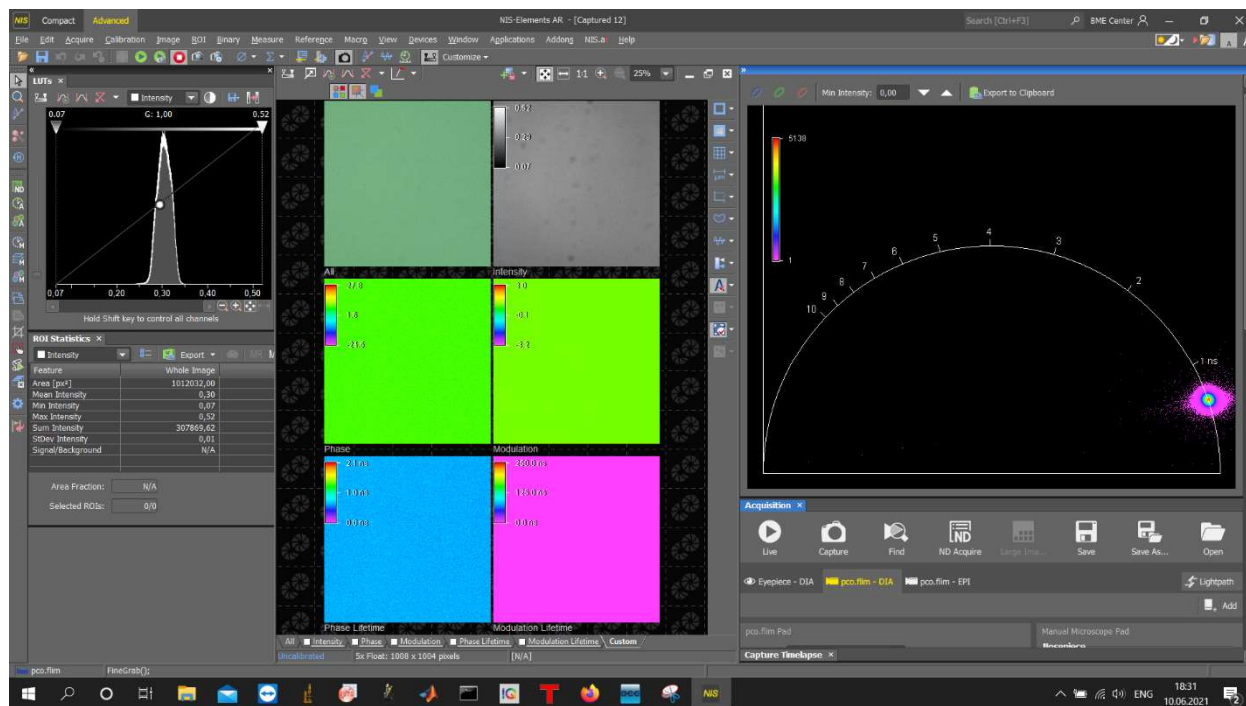


Рисунок 1 – Пример проведения калибровки

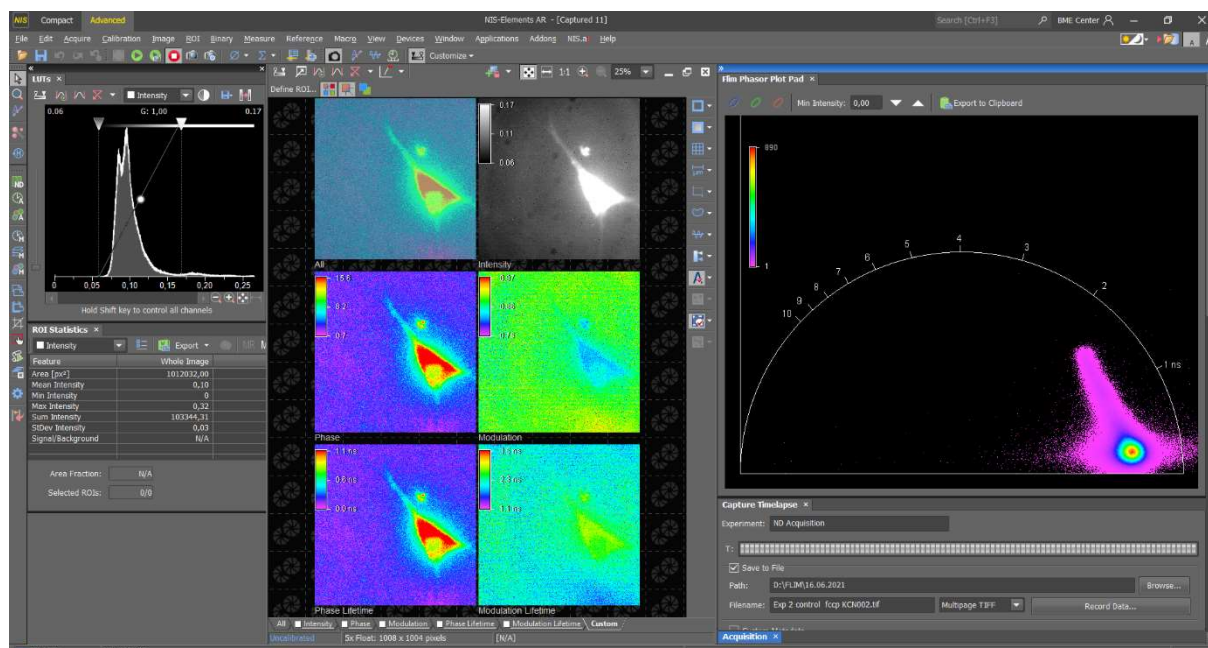


Рисунок 2 – Пример проведения исследования на клеточной культуре

Окислительно-восстановительное состояние НАДН является функцией активности дыхательной цепи и скорости доставки субстрата и может служить индикатором здоровья клетки. Однако флуоресценцию НАДН нельзя отделить от НАДФН, и она также

вырабатывается в цитозоле. Таким образом, для оценки автофлуоресценции НАДН в митохондриях следует использовать разобщитель в сочетании с ингибиторами электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) [23].

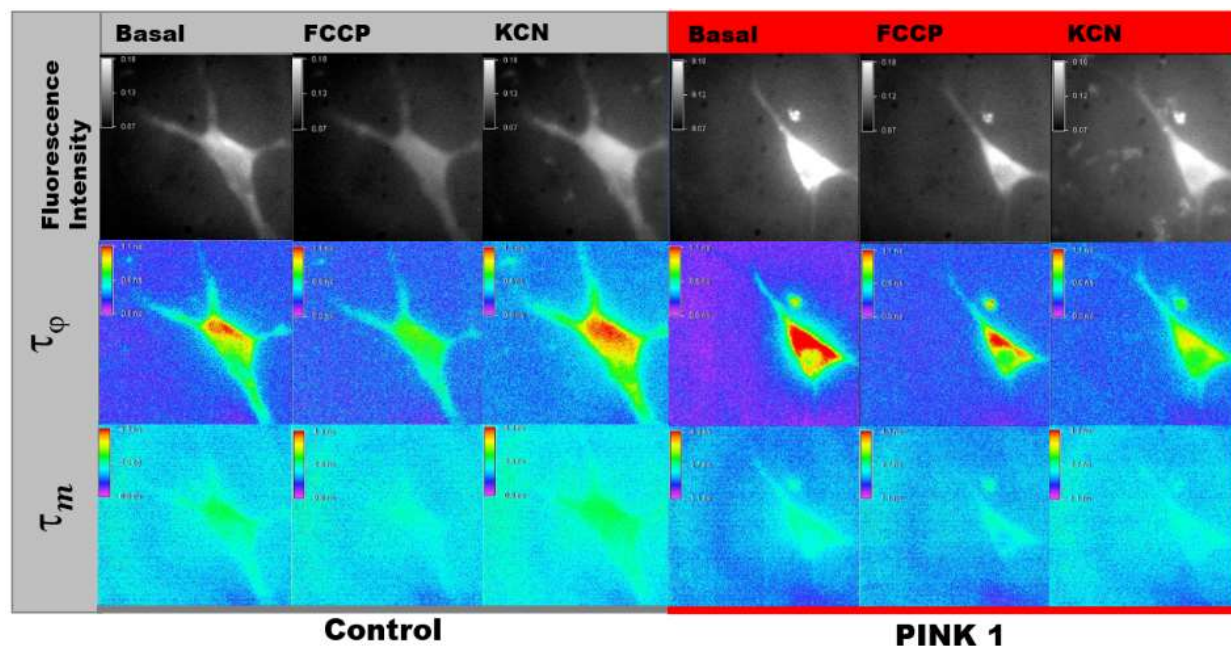


Рисунок 3 – Пример изображений флуоресцентного время-разрешенного имиджинга FLIM с временным разрешением клеток фибробластов кожи человека

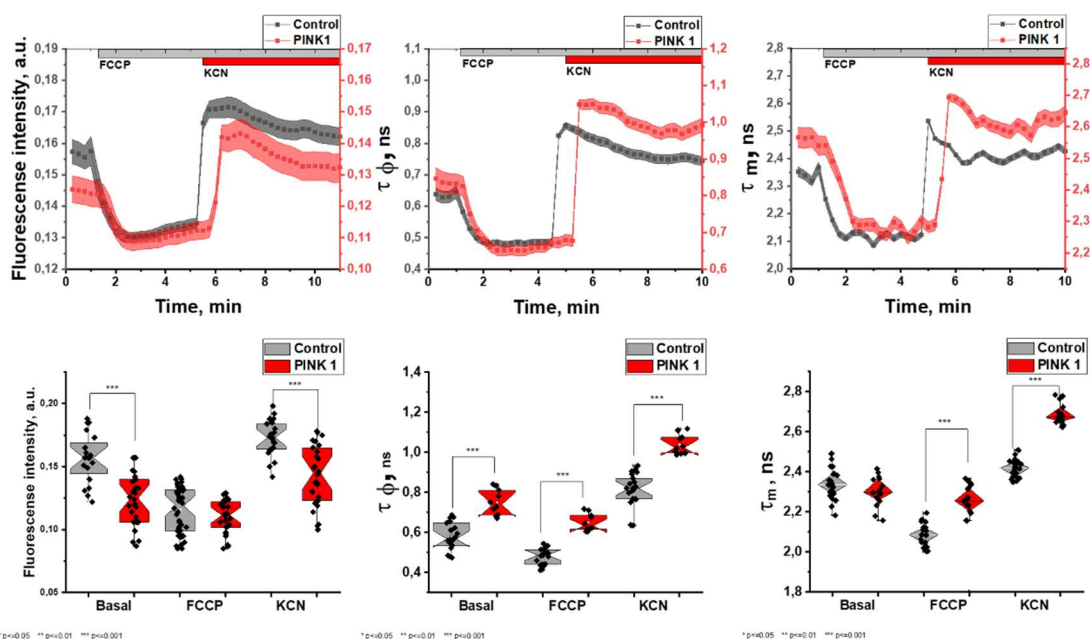


Рисунок 4 – Результат статистической обработки автофлуоресценции и параметров τ_{ϕ} , ns и τ_m , ns в ответ на 1 мкМ карбонилцианида-п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP) и 1 мМ NaCN в клеточной культуре фибробластов кожи здоровых пациентов и пациентов с мутацией PINK1

НАДН является донором электронов для комплекса I, и поэтому уровни НАДН обратно пропорциональны активности дыхательной цепи. Для измерения окислительно-восстановительного индекса FCCP (1 мкМ) используется для максимизации дыхания и, следовательно, минимизации пула НАДН, затем добавляется NaCN (1 мМ), чтобы блокировать митохондриальное дыхание и, таким образом, максимизировать пул НАДН.

Из литературных данных известно, что мутация в гене PINK1, который локализован в митохондриях, приводит к возрастной потере жизнеспособности нейронов и повышенной

чувствительности к индуцированному стрессом митохондриальному апоптозу [24] С помощью обработки автофлуоресценции и параметров τ_0 , n_s и τ_m , n_s мы демонстрируем, что отсутствие PINK1 приводит к измененному окислительно-восстановительным состоянию. Пониженная активность дыхательных комплексов недостаточна для поддержания $\Delta\psi_m$ и, следовательно, приводит к уменьшению $\Delta\psi_m$. В результате митохондрии переключаются с производства АТФ на потребление АТФ F1F0-АТФазой, чтобы поддерживать свой $\Delta\psi_m$, что так же было доказано у других исследователей [16].

Таким образом, выявленные статистические различия показывают перспективность оценки клеточного метаболизма при помощи метода измерения времени жизни флуоресценции для последующей своевременной диагностики болезни Паркинсона. С помощью FLIM-микроскопии была выявлена высокая межклеточная гетерогенность метаболизма в клетках с наследственной формой болезни Паркинсона по сравнению с нормальной клеточной культурой.

Заключение

Данные о метаболическом статусе клетки необходимы для анализа ее функционального состояния. Безконтрастное FLIM измерение как неинвазивный оптический метод демонстрирует перспективу его использования для визуализации метаболического статуса патологических клеток, основываясь на флуоресценции эндогенного флуорофора НАДН. Данный подход, обладая такими преимуществами как неинвазивность, высокая чувствительность, биологическая безопасность и отсутствие необходимости применения красителей, открывает возможность ранней диагностики различных заболеваний и мониторинга ответа на терапевтическое воздействие в режиме реального времени. Предполагается, что метод FD-FLIM позволит получить более подробную информацию о динамических биохимических процессах в клетках, а также станет основой для ранней диагностики заболеваний.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becker W. Advanced time-correlated single photon counting techniques [Text] / Springer Science & Business Media // 2005. – Vol. 81. – P. 168-189
2. Becker W. et al. Metabolic imaging by simultaneous FLIM of NAD (P) H and FAD // Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIX. – SPIE, 2019. – T. 10882. – С. 34-41.
3. Кандурова К.Ю. Использование спектроскопических методов в диагностике новообразований печени [Текст] / К.Ю. Кандурова, В.В. Шуплецов // XVII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике. – 2019. – С. 286-293.
4. Sun Y. H. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery [Text] / Y.H. Sun, N. Hatami, M. Yee, J.E. Phipps, D.S. Elson, F. Gorin, R.J. Schrot, L. Marcu // Journal of biomedical optics. – 2010. – Vol. 15. – №. 5. – P. 056022.
5. Горяйнов С. А. Флуоресцентная диагностика и лазерная биоспектроскопия как один из методов мультимодальной нейронавигации в нейрохирургии [Текст] / С.А. Горяйнов, А.А. Потапов, Д.А. Гольбин, П.В. Зеленков, Г.Л. Кобяков, А.Г. Гаврилов, В.А. Охлопков, В.А. Шурхай, Е.В. Шелеско, В.Ю. Жуков, В.Б. Лощенов, Т.А. Савельева, С.Г. Кузьмин // Вопросы нейрохирургии им. НН Бурденко. – 2012. – Т. 76. – №. 6. – С. 57-65.
6. Chorvatova A. Tissue uorophores and their spectroscopic characteristics [Text] / A. Chorvatova, D. Chorvat // Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging. – CRC Press. – 2014. – P. 64-103.
7. Suhling K. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments [Text] / K. Suhling, L.M. Hirvonena, J.A. Levitt, P. Chung, C. Tregidgo, A. Marois, Dm.A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg // Medical Photonics. – 2015. – Vol. 27. – P. 3-40.
8. Щеславский В. Люминесцентная микроскопия на основе многопараметрического время-коррелированного счета фотонов [Текст] / В. И. Щеславский, М. В. Ширманова, А. Ельцов, И В. Беккер // Успехи биологической химии. – 2019. – №. 59. – С. 103.
9. Ho A. H. P. Handbook of photonics for biomedical engineering [Text] / A.H.P. Ho, D. Kim, M. G. Somekh // Springer Netherlands. – 2017.
10. Jones P. B. Biomedical FRET–FLIM applications [Text] / P.B. Jones, J.Bacskaï, B. T.Hyman // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. – 2009. – Vol. 33. – P. 447-474.
11. Sanderson M. J. Fluorescence Microscopy [Text] / M.J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M.D. Bootman // Cold Spring Harbor Protocols. – 2014. – Vol. 10. – P. 36.
12. Cassimeris L. Lewin's cells [Text] / L. Cassimeris, G. Plopper, V. R. Lingappa // Jones & Bartlett Publishers. – 2011.
13. Zherebtsov E. Machine learning aided photonic diagnostic system for minimally invasive optically guided surgery in the hepatoduodenal area [Text] / E. Zherebtsov, M. Zajnulina, K. Kandurova, E. Potapova, V. Dremin, A. Mamoshin, S. Sokolovski, A. Dunaev, E. U. Rafailov // Diagnostics. – 2020. – Vol. 10. – №. 11. – P. 873.
14. Lukina M. M. Metabolical imaging for the study of oncological processes [Text] / M.M. Lukina, M.V. Shirmanova, T.F. Sergeeva, E.V. Zagaynova // Sovremennye tekhnologii v meditsine. – 2016. – Vol. 8. – №. 4. – P. 113.

15. Chaturvedi R. K. Mitochondrial diseases of the brain [Text] / R.K. Chaturvedi, M.F. Beal // Free Radical Biology and Medicine. – 2013. – Vol. 63. – P. 1-29.
16. Gandhi S. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death [Text] / S. Gandhi, A. Wood-Kaczmar, Z. Yao, H. Plun-Favreau, E. Deas, K. Klupsch, J. Downward, D.S. Latchman, S.J. Tabrizi, N.W. Wood, M.R. Duchen, A.Y. Abramov // Molecular Cell. – Vol. 33. – №. 5. – P. 627-638.
17. Tanner P. W. S. K. Parkinson disease [Text] / P. W. S. K. Tanner, W. Poewe, K. Seppi, C. M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman // Nat Rev Dis Primers. – 2017. – Vol. 3. – №. 17013. – P. 10.1038.
18. Berezhnov A. V. Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy [Text] / A.V. Berezhnov, M.P.M. Soutar, E.I. Fedotova, H. Plun-Favreau, V.P. Zinchenko, A.Y. Abramov // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – Vol. 291. – №. 16. – P. 8701-8708.
19. Angelova P. R. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention [Text] / P.R. Angelova, N. Esteras, A.Y. Abramov // Medicinal Research Reviews. – 2021. – Vol. 41. – №. 2. – P. 770-784.
20. Angeletos G. M. Uninsured idiosyncratic investment risk and aggregate saving [Text] // Review of Economic dynamics. – 2007. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-30.
21. Przedborski S. Neurodegeneration [Text] // Neuroimmune Pharmacology. – Springer. – 2017. – P. 345-354.
22. Маскевич А. А. Комплекс аппаратных и программных средств для исследования кинетики затухания флуоресценции [Текст] // Весник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне. – 2013. – №. 3. – С. 107.
23. Bartolomé F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells [Text] / F. Bartolomé, A.Y. Abramov // Mitochondrial Medicine. – Humana Press, New York, NY, 2015. – P. 263-270.
24. Wood-Kaczmar A. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons [Text] / A. Wood-Kaczmar, S. Gandhi, Z. Yao, A.S.Y. Abramov, E.A. Miljan, G. Keen, L. Stanyer, I. Hargreaves, K. Klupsch, E. Deas, J. Downward, L. Mansfield // PloS one. – 2008. – Vol. 3. – №. 6. – P. 2455.

Долгих Ангелина Игоревна
 Орловский государственный
 университет имени И.С.
 Тургенева, г. Орел, стажер-
 исследователь лаборатории
 клеточной физиологии и
 патологии научно-
 технологического центра
 биомедицинской фотоники
 Россия, г. Орел, ул.
 Комсомольская, 95
 E-mail: dolgikhanig@mail.ru

Стельмашук Ольга Андреевна
 Орловский государственный
 университет имени И.С.
 Тургенева, г. Орел,
 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

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: zherebzw@gmail.com

A.I. DOLGIKH, O.A. STELMASHCHUK, E.A. ZHEREBTSOV

USE OF FLUORESCENCE LIFETIME TO ASSESS THE PATHOLOGICAL STATE OF CELLS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

Abstract. *The paper is devoted to the possibility of applying of fluorescence lifetime method for the evaluation of the pathological state of cells in neurodegenerative diseases for the purpose of early diagnostics and early treatment of these diseases. Lifetime parameters of endogenous NADH fluorophore fluorescence in cell culture of 20-day-old fibroblasts with a mutation in the PINK 1 gene were measured by pco.flim FLIM camera with ultraviolet laser (375 nm/10 MW) and amplitude modulation at 40 MHz. The identified statistical differences show the promise of assessing cellular metabolism using this method for the subsequent timely diagnosis of Parkinson's disease. This approach may subsequently allow obtaining more detailed information about various biochemical processes in cells in the dynamics and become the basis for early disease diagnosis.*

Keywords: *optical diagnosis, lifetime fluorescence, NADH, Parkinson's disease, PINK 1, fibroblasts.*

BIBLIOGRAPHY

1. Becker W. Advanced time-correlated single photon counting techniques [Text] / Springer Science & Business Media // 2005. – Vol. 81. – P. 168-189
2. Becker W. et al. Metabolic imaging by simultaneous FLIM of NAD (P) H and FAD // Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XIX. – SPIE, 2019. – T. 10882. – C. 34-41.
3. Kandurova K.Yu. Ispol'zovanie spektroskopicheskikh metodov v diagnostike novoobrazovaniy pecheni [Tekst] / K.Yu. Kandurova, V.V. SHuplecov // XVII Vserossiyskiy molodezhnyj Samarskiy konkurs-konferenciya nauchnyh rabot po optike i lazernoj fizike. – 2019. – S. 286-293.
4. Sun Y. H. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery [Text] / Y.H. Sun, N. Hatami, M. Yee, J.E. Phipps, D.S. Elson, F. Gorin, R.J. Schrot, L. Marcu // Journal of biomedical optics. – 2010. – Vol. 15. – №. 5. – P. 056022.
5. Goryajnov S. A. Fluorescentnaya diagnostika i lazernaya biospektroskopiya kak odin iz metodov mul'timodal'noj nejronavigacii v nejrohirurgii [Tekst] / S.A. Goryajnov, A.A. Potapov, D.A. Gol'bin, P.V. Zelenkov, G.L.

- Kobyakov, A.G. Gavrilov, V.A. Ohlopkov, V.A. SHurhaj, E.V. SHElesko, V.YU. ZHukov, V.B. Loshchenov, T.A. Savel'eva, S.G. Kuz'min // *Voprosy neirohirurgii im. N.N. Burdenko*. – 2012. – Т. 76. – №. 6. – С. 57-65.
6. Chorvatova A. Tissue uorophores and their spectroscopic characteristics [Text] / A. Chorvatova, D. Chorvat // *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging*. – CRC Press. – 2014. – P. 64-103.
7. Suhling K. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments [Text] / K. Suhling, L.M. Hirvonena, J.A. Levitt, P. Chung, C. Tregidgo, A. Marois, Dm.A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg // *Medical Photonics*. – 2015. – Vol. 27. – P. 3-40.
8. Sheslavskij V. Lyuminescentnaya mikroskopiya na osnove mnogoparametricheskogo vremya-korrelirovannogo scheta fotonov [Tekst] / V. I. SHCHeslavskij, M. V. SHirmanova, A. El'cov, I V. Bekker // *Uspekhi biologicheskoy himii*. – 2019. – №. 59. – S. 103.
9. Ho A. H. P. Handbook of photonics for biomedical engineering [Text] / A.H.P. Ho, D. Kim, M. G. Somekh // Springer Netherlands. – 2017.
10. Jones P. B. Biomedical FRET–FLIM applications [Text] / P.B. Jones, J.Bacskaï, B. T.Hyman // *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 33. – P. 447-474.
11. Sanderson M. J. Fluorescence Microscopy [Text] / M.J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M.D. Bootman // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2014. – Vol. 10. – P. 36.
12. Cassimeris L. Lewin's cells [Text] / L. Cassimeris, G. Plopper, V. R. Lingappa // Jones & Bartlett Publishers. – 2011.
13. Zherebtsov E. Machine learning aided photonic diagnostic system for minimally invasive optically guided surgery in the hepatoduodenal area [Text] / E. Zherebtsov, M. Zajnulina, K. Kandurova, E. Potapova, V. Dremin, A. Mamoshin, S. Sokolovski, A. Dunaev, E. U. Rafailov // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10. – №. 11. – P. 873.
14. Lukina M. M. Metabolical imaging for the study of oncological processes [Text] / M.M. Lukina, M.V. Shirmanova, T.F. Sergeeva, E.V. Zagaynova // *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. – 2016. – Vol. 8. – №. 4. – P. 113.
15. Chaturvedi R. K. Mitochondrial diseases of the brain [Text] / R.K. Chaturvedi, M.F. Beal // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – Vol. 63. – P. 1-29.
16. Gandhi S. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death [Text] / S. Gandhi, A. Wood-Kaczmar, Z. Yao, H. Plun-Favreau, E. Deas, K. Klupsch, J. Downward, D.S. Latchman, S.J. Tabrizi, N.W. Wood, M.R. Duchon, A.Y. Abramov // *Molecular Cell*. – Vol. 33. – №. 5. – P. 627-638.
17. Tanner P. W. S. K. Parkinson disease [Text] / P. W. S. K. Tanner, W. Poewe, K. Seppi, C. M. Tanner, G.M. Halliday, P. Brundin, J. Volkman // *Nat Rev Dis Primers*. – 2017. – Vol. 3. – №. 17013. – P. 10.1038.
18. Berezhnov A. V. Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy [Text] / A.V. Berezhnov, M.P.M. Soutar, E.I. Fedotova, H. Plun-Favreau, V.P. Zinchenko, A.Y. Abramov // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291. – №. 16. – P. 8701-8708.
19. Angelova P. R. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention [Text] / P.R. Angelova, N. Esteras, A.Y. Abramov // *Medicinal Research Reviews*. – 2021. – Vol. 41. – №. 2. – P. 770-784.
20. Angeletos G. M. Uninsured idiosyncratic investment risk and aggregate saving [Text] // *Review of Economic dynamics*. – 2007. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-30.
21. Przedborski S. Neurodegeneration [Text] // *Neuroimmune Pharmacology*. – Springer. – 2017. – P. 345-354.
22. Maskevich A. A. Kompleks apparatnyh i programmnyh sredstv dlya issledovaniya kinetiki zatuhaniya fluorecencii [Tekst] // *Vesnik Grodzenskaga dzwarzha'naga y'niversiteta imya Yanki Kupaly. Serya 2. Matematyka. Fizika. Infarmatyka, vylichal'naya tekhnika i kiravanne*. – 2013. – №. 3. – S. 107.
23. Bartolomé F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells [Text] / F. Bartolomé, A.Y. Abramov // *Mitochondrial Medicine*. – Humana Press, New York, NY, 2015. – P. 263-270.
24. Wood-Kaczmar A. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons [Text] / A. Wood-Kaczmar, S. Gandhi, Z. Yao, A.S.Y. Abramov, E.A. Miljan, G. Keen, L. Stanyer, I. Hargreaves, K. Klupsch, E. Deas, J. Downward, L. Mansfield // *PloS one*. – 2008. – Vol. 3. – №. 6. – P. 2455.

Dolgikh Angelina Igorevna
Orel State University named after
I.S. Turgeneva, Orel, Research
Assistant, Laboratory of Cell
Physiology and Pathology, Scientific
and Technological Center for
Biomedical Photonics Russia, Orel,
st. Komsomolskaya, 95
E-mail: dolgikhanig@mail.ru

Stelmashchuk Olga Andreevna
Orel State University named after
I.S. Turgenev, Orel,
Junior Researcher, Laboratory of
Cell Physiology and Pathology,
Scientific and Technological Center
for Biomedical Photonics
Russia, Orel, st. Komsomolskaya, 95
E-mail: o.a.stelmashuk@gmail.com

Zherebtsov Evgeny Andreevich
Orel State University named after
I.S. Turgenev, Orel,
Senior Researcher, Science and
Technology Center for Biomedical
Photonics
Russia, Orel, st. Komsomolskaya, 95
E-mail: zherebzow@gmail.com