

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ИМИДЖИНГ В ИССЛЕДОВАНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2016.8.4.16

УДК 577.3:616–006–052

Поступила 9.11.2015 г.

© **М.М. Лукина**, младший научный сотрудник лаборатории изучения оптической структуры биотканей НИИ биомедицинских технологий¹; аспирант кафедры биофизики Института биологии и биомедицины²;
М.В. Ширманова, к.б.н., зав. лабораторией индивидуальной химиотерапии рака НИИ биомедицинских технологий¹;
Т.Ф. Сергеева, к.б.н., научный сотрудник лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НИИ биомедицинских технологий¹;
Е.В. Загайнова, д.м.н., директор НИИ биомедицинских технологий¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005,
пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950,
пр. Гагарина, 23

Рассмотрены основные подходы к изучению энергетического обмена в опухолевых клетках, основанные на флуоресцентной визуализации кофакторов НАДН и ФАД. Понятие «метаболический имиджинг» охватывает ряд современных флуоресцентных методов, позволяющих регистрировать НАДН и ФАД по интенсивности и/или времени жизни флуоресценции. Данные кофакторы играют важную роль в реакциях энергетического метаболизма в качестве переносчиков электронов и, обладая флуоресценцией, служат основой для анализа метаболических процессов в живых клетках и тканях, без применения дополнительных красителей. Особое внимание уделяется описанию метаболических изменений, сопутствующих канцерогенезу. Многочисленные примеры использования метаболического имиджинга на культурах клеток *in vitro*, опухолях животных и человека *in vivo*, а также биопсийных образцах опухолей пациентов демонстрируют его высокую востребованность в биомедицинских исследованиях онкологической направленности.

Ключевые слова: метаболический имиджинг; энергетический метаболизм; время жизни флуоресценции; редокс-отношение; НАДН; ФАД; окислительное фосфорилирование; гликолиз; опухолевые клетки.

Как цитировать: Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V. Metabolic imaging for the study of oncological processes (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(4): 113–121, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.16>

English

Metabolic Imaging in the Study of Oncological Processes (Review)

M.M. Lukina, Junior Researcher, Laboratory of Studying Optical Structure of Biotissues, Institute of Biomedical Technologies¹; PhD Student, Department of Biophysics, Institute of Biology and Biomedicine²;

M.V. Shirmanova, PhD, Head of the Laboratory of Individual Cancer Chemotherapy, Institute of Biomedical Technologies¹;

T.F. Sergeeva, PhD, Researcher, Fluorescent Bioimaging Laboratory, Institute of Biomedical Technologies¹;

E.V. Zagaynova, MD, DSc, Director, Institute of Biomedical Technologies¹

Для контактов: Лукина Мария Максимовна, e-mail: kuznetsova.m.m@yandex.ru

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

There have been reviewed the main approaches to the study of energy metabolism in cancer cells, based on fluorescent imaging of NADH and FAD cofactors. The term "metabolic imaging" covers a range of modern fluorescent techniques for detecting NADH and FAD according to fluorescence intensity and/or lifetime. These cofactors play an important role in energy metabolism reactions acting as electron carriers and, being fluorescent, serve as a basis for metabolic process analysis in living cells and tissues without the use of additional coloring agents. Particular attention is paid to metabolic changes associated with carcinogenesis. Numerous examples of metabolic imaging application in cell cultures *in vitro*, animal and human tumors *in vivo*, as well as in patients' tumor biopsy samples have demonstrated its being highly demanded for biomedical research in the area of oncology.

Key words: metabolic imaging; energy metabolism; fluorescence lifetime; redox ratio; NADH; FAD; oxidative phosphorylation; glycolysis; tumor cells.

Для поддержания гомеостаза клеткам необходима энергия. Все процессы жизнедеятельности клетки, такие как создание градиентов концентрации, движение цитоскелета, репарация ДНК, транскрипция, трансляция и везикулярный транспорт, являются энергозависимыми. Известно, что энергетический обмен нормальных клеток существенно отличается от метаболизма клеток при тех или иных заболеваниях. Поэтому метаболический статус может служить индикатором диагностики, а также визуализации ответа на лечение патологических процессов. В связи с широкой распространенностью онкологических заболеваний оценка метаболического фенотипа опухолевых клеток особенно актуальна.

Развитие технологий оптической визуализации открыло возможность неинвазивного анализа метаболических кофакторов НАДН и ФАД в живых опухолевых клетках с высоким пространственным разрешением (до нескольких сот нанометров) без применения дополнительных красителей и без существенного влияния на биохимическое и физиологическое состояние клеток. Понятие «метаболический имиджинг» охватывает ряд современных флуоресцентных методов, позволяющих визуализировать НАДН и ФАД по интенсивности и/или времени жизни их флуоресценции.

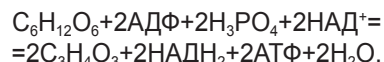
В представленном обзоре охарактеризованы особенности энергетического метаболизма опухолей, описаны два ключевых подхода к оценке метаболического статуса — анализ отношения интенсивностей флуоресценции кофакторов (редокс-отношение) и времени жизни их флуоресценции. Приведены многочисленные примеры использования метаболического имиджинга в исследовании онкологических процессов на культурах клеток *in vitro*, опухолях животных и человека *in vivo*, а также биопсийных образцах опухолей пациентов.

Кофакторы НАДН и ФАД и их роль в энергетическом метаболизме клетки

Важнейшие пути энергетического метаболизма клетки, такие как гликолиз и окислительное фосфори-

рование, связаны с процессами клеточного дыхания и синтезом АТФ. В роли доноров и акцепторов электронов в реакциях образования АТФ выступают кофакторы НАДН и ФАД, которые присутствуют в клетке в окисленной (НАД⁺, ФАД) или восстановленной формах (НАДН, ФАДН₂) [1–7].

В процессе гликолиза молекула глюкозы распадается на две молекулы пирувата, при этом две молекулы НАД⁺ восстанавливаются до двух молекул НАДН и образуются две молекулы АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования [8, 9]:



Затем молекула пирувата может быть транспортирована в митохондрии, где она преобразуется в ацетил-коэнзим А в результате реакций дегидрирования и декарбоксилирования. Эти реакции протекают при помощи мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса, состоящего из трех ферментов: пируватдекарбоксилазы, дигидролипидилтрансферазы и дигидролипоилдегидрогеназы (LipDH), а также пяти коферментов: тиаминдифосфата, липоевой кислоты, ФАД, НАД⁺ и коэнзима А. Впоследствии ацетил-коэнзим А вступает в цикл Кребса. Многочисленные дегидрогеназные комплексы в митохондриях играют важную роль в регулировании соотношения НАД⁺/НАДН и пула НАДН, который служит донором электронов и протонов для дыхательной цепи митохондрий [10–13].

Окислительное фосфорилирование является самым эффективным способом производства АТФ, НАДН — первичным донором, а ФАД — первичным акцептором электронов и протонов в дыхательной цепи митохондрий. В результате реакций гликолиза и цикла Кребса распад одной молекулы глюкозы может привести к образованию до 10 молекул НАДН. В процессе тканевого дыхания электроны и протоны от НАДН через комплексы дыхательной цепи транспортируются на кислород, при этом НАДН окисляется до НАД⁺, а протоны поступают из матрикса митохондрий в межмембранное пространство, что приводит к

созданию протонного градиента (электрохимического потенциала). Энергия электрохимического потенциала используется для синтеза АТФ при обратном транспорте протонов в матрикс митохондрий с помощью АТФ-синтазы [14–16].

Обобщающая схема участия НАДН и ФАД в реакциях энергетического обмена в клетке выглядит следующим образом (рис. 1) [17].

Коферменты НАДН и ФАД способны флюоресцировать (рис. 2). Спектр возбуждения НАДН лежит в

районе 300–400 нм с пиком на длине волны 355 нм, спектр эмиссии — в районе 400–600 нм с максимумом на $\lambda=470$ нм. У ФАД спектр возбуждения флюоресценции находится в диапазоне 350–500 нм с двумя максимумами — на 370 и 450 нм, спектр эмиссии — в диапазоне 500–600 нм с максимумом на $\lambda=525$ нм [18–21].

Фосфорилированная форма НАДН (НАДФН) имеет те же спектральные характеристики, что и нефосфорилированная НАДН, однако непосредственно в реакциях энергетического метаболизма не участву-

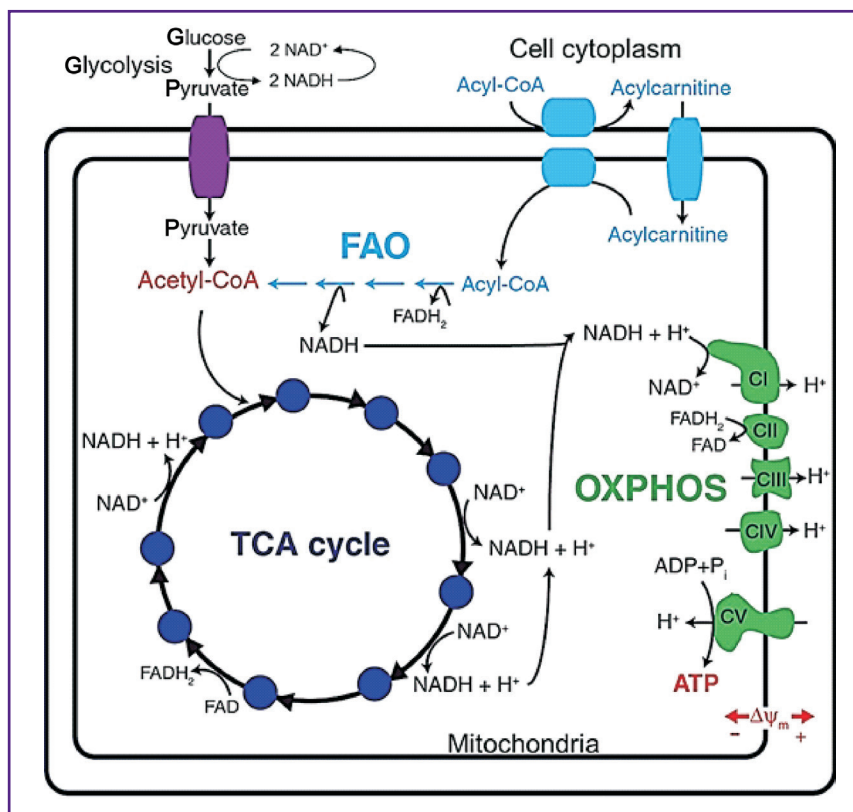


Рис. 1. Схема участия метаболических кофакторов НАДН и ФАД в энергетическом обмене клетки [17]

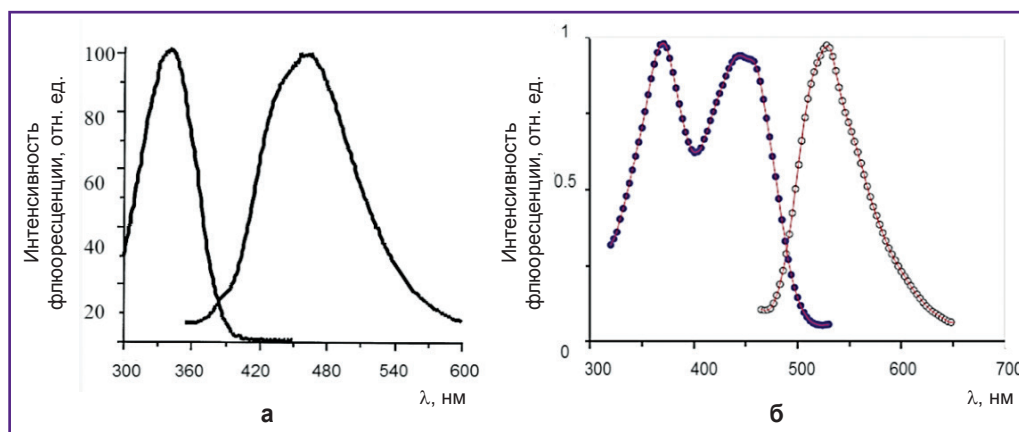


Рис. 2. Спектры поглощения и флюоресценции НАДН (а) и ФАД (б)

ет. Основным источником НАДФН в клетке является пентозофосфатный путь (за исключением тканей, в которых активно идет синтез жирных кислот и стероидов, где вклад в производство НАДФН вносят и другие реакции). НАДФН принимает участие в биосинтезе жирных кислот, кератиноидов и стероидов. Также НАДФН имеет большое значение для антиоксидантных систем, в частности аскорбат-глутатионового цикла, и регулирует процессы передачи клеточных сигналов. Окисленная форма НАДФ⁺ поддерживает гомеостаз Ca²⁺ в клетке [4–7]. По данным ряда работ, концентрация НАДФН в клетке в десятки раз ниже, чем НАДН, а квантовый выход флуоресценции — в 1,25–2,5 раза меньше [21–23]. При анализе энергетического метаболизма вклад НАДФН, как правило, не учитывается.

НАДН находится в клетке в свободном и связанном с белками состоянии. Свободная форма локализуется в цитозоле и отличается от связанной с белком формы спектром эмиссии (сдвинут в более красную область на 20 нм). Основная флуоресценция в синем диапазоне испускается связанной формой НАДН, локализованной в митохондриях, тогда как вклад свободной формы относительно мал [18]. При этом квантовый выход НАДН увеличивается примерно в четыре раза в связанном с белками состоянии [20].

ФАД в клетке связан с ферментами митохондрий, называемыми флавопротеинами. Флуоресценция ФАД тушится большинством этих ферментов, в том числе сукцинатдегидрогеназой, которая является ключевым ферментом цикла трикарбоновых кислот и вторым комплексом дыхательной цепи митохондрий. Около 50% флуоресценции ФАД испускается LipDH-содержащими ферментативными комплексами, 25% — электронным переносчиком флавопротеином, который служит посредником, принимая электроны и протоны от жирных кислот в процессе β-окисления и транспортируя их к пулу убихинона. Хотя флавопротеины не участвуют непосредственно в метаболизме глюкозы, они могут тушить флуоресценцию ФАД при изменении окислительно-восстановительного статуса клетки [10, 11, 24, 25]. Последние 25% флуоресценции ФАД испускаются дитионитом натрия и не связаны с метаболизмом [10]. Отношение связанной формы ФАД к ФАДН₂ увеличивается по мере роста скорости протекания реакций цикла Кребса и уменьшается по мере снижения скорости окисления НАДН в электронно-транспортной цепи митохондрий [26].

Понимание роли НАДН и ФАД в метаболических реакциях клетки имеет большое значение для правильной интерпретации данных, полученных на основе флуоресцентного анализа. Если НАДН локализован в основном в митохондриях и участвует преимущественно в энергетическом обмене клетки, то ФАД содержится как в цитоплазме, так и в митохондриях и задействован помимо окислительного фосфорилирования в различных биохимических процессах (утилизация глю-

татиона, липогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантные реакции, синтез ацетил-коэнзима А, аскорбат-глутатионовый цикл, пентозофосфатный цикл), что значительно усложняет анализ данных [4, 13, 21, 27].

Метаболические особенности опухолевых клеток

Опухолевые клетки характеризуются активной неконтролируемой пролиферацией, в связи с чем их энергетический метаболизм имеет некоторые особенности по сравнению с нормальными тканями. В отличие от нормальных клеток, у которых основным способом синтеза АТФ является окислительное фосфорилирование, у большинства раковых клеток повышен уровень гликолиза.

Характерной особенностью многих солидных опухолей является гипоксия, которая возникает в результате дисбаланса между поступлением кислорода и его потреблением в ткани. Считается, что уровень кислорода в гипоксичных опухолях ниже, чем в соответствующих нормальных тканях, и в среднем составляет 1–2% и ниже. Основными факторами развития гипоксии в опухоли являются атипичная структура микрососудов, большие расстояния между кровеносными сосудами и опухолевыми клетками, что ограничивает поступление кислорода путем диффузии, а также пониженный транспорт кислорода кровью в связи с анемией. Многочисленные исследования последних двух десятилетий показали, что гипоксия играет существенную роль в опухолевой прогрессии и является неблагоприятным фактором прогноза лечения [28–30]. Гипоксия индуцирует множество сложных сигнальных путей, включая HIF, PI3K/AKT/mTOR, MARK, NF-κB, вовлеченных в регуляцию пролиферации, апоптоза, воспаления, миграции, выживания и метаболизма. Среди них наибольшая роль в регуляции метаболизма принадлежит HIF1 и mTOR [31–33]. Транскрипционный фактор HIF1 является главным регулятором метаболизма глюкозы в условиях гипоксии. Он может способствовать деградации митохондрий через BNIP3-зависимую аутофагию, а также блокировать биосинтез митохондрий, ингибируя активность фактора транскрипции MYC. Путь mTOR принимает участие в запуске реакций гликолиза, биосинтеза липидов, аминокислот, нуклеотидов и белков. В результате в условиях пониженной оксигенации опухолевые клетки не способны к запуску реакций окислительного фосфорилирования, что вынуждает их переходить на гликолиз [28, 34–36].

Опухолевые клетки в отличие от нормальных используют гликолиз даже при нормальных условиях оксигенации. Данный эффект был открыт в 1920-х гг. немецким физиологом Отто Варбургом и получил название аэробного гликолиза, или эффекта Варбурга [37–39]. Варбург считал, что преобладание гликолиза в присутствии кислорода обусловлено необрати-

мыми нарушениями функций митохондрий. Как было обнаружено позже, в действительности лишь некоторые опухолевые линии имеют митохондриальные дисфункции, такие как пониженная экспрессия белков-переносчиков и ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, укороченный цикл трикарбоновых кислот, сниженное количество митохондрий, нарушение структуры комплексов дыхательной цепи, повышенное количество ингибиторов митохондриальной АТФ-синтазы и высокая чувствительность мДНК к окислительному стрессу. Показано, что при ингибировании реакций гликолиза многие опухолевые клетки восстанавливают работу митохондрий и переходят на окислительное фосфорилирование [40–44].

Переход опухолевых клеток на гликолитический тип метаболизма вызван рядом причин. Во-первых, в основе этого лежит высокая потребность опухолевых клеток в синтезе макромолекул для активного роста. Именно в результате гликолиза образуются мономеры, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот, белков и липидов. Во-вторых, при гликолизе понижено образование свободных радикалов, что снижает уровень генотоксических повреждений в клетке и способствует уходу от апоптоза [8, 26, 41, 45, 46]. В-третьих, продуктом гликолиза является лактат, который транспортируется в межклеточное пространство. Известно, что кислая среда способствует опухолевой инвазии и метастазированию. Кроме того, высокая концентрация АТФ неблагоприятна для опухолевых клеток, поскольку подавляет гликолиз, ингибируя фосфофруктокиназу-1 и пируваткиназу [40].

На сегодняшний день установлено, что энергетический метаболизм опухолевых клеток представляет собой баланс между гликолизом и окислительным фосфорилированием, а теория «чистого гликолиза» в опухоли опровергнута. В опытах со снижением уровня кислорода показано, что ни одна опухолевая клетка не может существовать только посредством гликолиза. Ряд глиом, гепатом и клеточные линии рака молочной железы используют реакции окислительного фосфорилирования в качестве основного источника АТФ (хотя их метаболический фенотип меняется в условиях гипоксии). Считается, что максимальный вклад гликолиза в производство АТФ в опухолевых клетках составляет не более 50–60%, а в некоторых случаях уровень окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках даже выше, чем в окружающих стромальных клетках [9, 41, 42, 47]. Кроме того, некоторые опухолевые клетки способны обратимо переключаться между гликолизом и окислительным фосфорилированием в зависимости от наличия глюкозы в среде [9, 42]. Сами опухоли метаболически гетерогенны, и соотношение выработки АТФ путем гликолиза и окислительного фосфорилирования может варьировать в широких пределах между различными клетками одного опухолевого узла [41, 48].

Таким образом, метаболическая активность опухолевых клеток представляет собой сложный процесс, который помогает адаптироваться раковым клеткам к различным условиям окружающей среды, а также к их изменениям [42, 49–51].

Редокс-отношение как показатель метаболического статуса

Принцип и методы регистрации редокс-отношения. Так как НАДН и ФАД — единственные переносчики электронов, которые способны к флюоресценции, соотношение интенсивностей их флюоресценции может служить параметром для оценки метаболического статуса клетки и ткани. Отношение окисленных электронных переносчиков к восстановленным называется редокс-отношением (redox ratio). Данный подход был предложен В. Chance и его коллегами [26, 52]. В литературе встречаются различные варианты расчета редокс-отношения:

$$\begin{aligned} & \text{ФАД}/(\text{НАДН}+\text{ФАД}) [53–56]; \\ & \text{ФАД}/\text{НАДН} [22, 57–60]; \\ & \text{НАДН}/\text{ФАД} [61–63]. \end{aligned}$$

Выбор формулы подсчета редокс-отношения часто зависит от соотношения интенсивности флюоресценции кофакторов, вида объекта исследования и метода регистрации [63, 64].

Поскольку основная масса НАДН образуется при гликолизе, а ФАД — при окислительном фосфорилировании, низкое редокс-отношение указывает на высокую метаболическую активность клетки и преобладание гликолитического пути над окислительным фосфорилированием. Помимо увеличения гликолиза в пролиферирующих опухолевых клетках активно протекают реакции цикла Кребса, промежуточные продукты которого могут быть выведены из цикла для синтеза различных соединений. Увеличение гликолиза и/или цикла Кребса по сравнению с окислительным фосфорилированием приводит к аккумуляции НАДН. Если интенсивность флюоресценции НАДН увеличена, значит клетка имеет большой метаболический потенциал для производства АТФ с помощью реакций окислительного фосфорилирования. Увеличение концентрации НАДН является характерной особенностью опухолевых клеток [65, 66].

Снижение интенсивности флюоресценции НАДН и увеличение ФАД (высокое редокс-отношение) свидетельствует о высокой потребности в АТФ и преобладании окислительного фосфорилирования. Для нормальной клетки в стандартных условиях с оптимальным содержанием питательных веществ и кислорода увеличение потребности в АТФ приводит к росту редокс-отношения. Это связано с окислением НАДН до НАД⁺ в процессе окислительного фосфорилирования. В условиях гипоксии при недостатке кислорода, который служит конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий, протекание реакций

окислительного фосфорилирования становится невозможным, при этом увеличивается концентрация НАДН. Чтобы удовлетворить потребность в АТФ, клетка переходит на анаэробный гликолиз, в результате которого НАД⁺ восстанавливается до НАДН с образованием пирувата и АТФ. Отсутствие окисления НАДН через электронно-транспортную цепь и увеличение концентрации НАДН в результате гликолиза приводит к росту интенсивности флюоресценции НАДН в клетке при гипоксии [26, 52, 67].

Для регистрации флюоресценции НАДН и ФАД используются методы флюоресцентного имиджинга с одно- и двухфотонным возбуждением [26, 56].

В однофотонном режиме возбуждение НАДН осуществляется на длине волны 350 нм с диапазоном приема 450–470 нм. Флюоресценцию ФАД возбуждают, как правило, при $\lambda=450$ нм и регистрируют в диапазоне 500–550 нм [18, 20, 26, 52]. Исследования с применением однофотонного режима ограничены в основном моделями *in vitro* из-за сильного рассеивания света в толстых образцах ткани [26].

Исследование метаболического статуса с использованием двухфотонной флюоресцентной микроскопии имеет ряд преимуществ по сравнению с однофотонным режимом. При двухфотонном возбуждении молекула флюорофора поглощает два фотона, обладающих низкой энергией, в течение одного квантового события. В результате возбуждать флюоресценцию НАДН и ФАД можно в ИК-области (НАДН — в районе 740 нм и ФАД — в районе 900 нм), а не в УФ- и ближнем УФ-диапазоне [18, 26]. Это особенно важно для исследований *in vivo*, так как рассеяние света в ткани уменьшается при возбуждении флюоресценции в ИК-области. Кроме того, поскольку одновременное поглощение двух фотонов носит вероятностный характер, эффективное двухфотонное возбуждение происходит только в фокальной плоскости, где плотность фотонов самая высокая. Такое прицельное возбуждение флюоресценции снижает возможность повреждения и фотообесцвечивания образца [26].

Редокс-отношение в опухолевых клетках и тканях. На сегодняшний день показатель редокс-отношения используется для оценки метаболического статуса опухолевых клеток *in vitro*, ткани *ex vivo* и опухолей *in vivo*. J.H. Ostrander с соавт. [62] показали на различных клеточных культурах опухоли молочной железы человека, что опухолевые клетки имеют увеличенное редокс-отношение НАДН/ФАД по сравнению с нормальными эпителиальными клетками. Это связано с повышенным потреблением глюкозы и аэробным гликолизом в опухолевых клетках. К тому же субпопуляция клеток рака молочной железы, экспрессирующая рецепторы эстрогена, имела сниженное редокс-отношение. Схожие результаты продемонстрированы и на клеточной линии рака мочевого пузыря человека: редокс-отношение НАДН/ФАД было увеличено по сравнению с нормой [68].

На клеточных линиях рака молочной железы MDA-

MB-231, MCF7, SKBr3 и BT474 выявлено снижение редокс-отношения НАДН/ФАД после добавления ингибитора окислительного фосфорилирования FCCP, что свидетельствовало о метаболических изменениях в клетках [69]. Обнаружена прямая корреляция между редокс-отношением ФАД/(НАДН+ФАД) и потреблением кислорода на различных культурах клеток рака молочной железы человека *in vitro* [70]. Также на культуре клеток рака молочной железы показана взаимосвязь между редокс-отношением НАДН/ФАД и экспрессией гена *HER2*. Известно, что *HER2* играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов рака молочной железы. Установлено, что самое высокое редокс-отношение НАДН/ФАД характерно для клеток с гиперэкспрессией гена *HER2* [71, 72].

J.M. Levitt и соавт. на 3D-модели эпителия изучали метаболическую активность нормальных и предраковых ВПЧ-иммортизированных клеток. Было обнаружено, что предраковые клетки имеют сниженное редокс-отношение ФАД/(НАДН+ФАД) по сравнению с нормальными клетками вследствие преобладания в них гликолиза [53, 73]. При исследовании изменения редокс-отношения ФАД/НАДН в клетках рака шейки матки человека в условиях кокультивирования с фибробластами [57] показано, что редокс-отношение в опухолевых клетках снижается при кокультивировании с фибробластами. Это снижение вызвано переходом на более гликолитический метаболизм. На клетках рака ротовой полости (SCC25 и SCC61) продемонстрировано *in vitro* снижение редокс-отношения НАДН/ФАД после лечения клеток Цисплатином [74]. Схожие результаты получены на клеточной линии рака мочевого пузыря (T24). После воздействия N-4-(гидроксифенил)-ретинамидом авторы наблюдали увеличение редокс-отношения ФАД/(НАДН+ФАД) [75].

In vivo в работе по изучению метаболических изменений эпителия слизистой оболочки защечного мешка хомяка показано снижение редокс-отношения ФАД/НАДН при канцерогенезе [60]. На той же модели в работах [76–78] обнаружено резкое снижение редокс-отношения ФАД/(НАДН+ФАД) в опухолевой ткани по сравнению с контролем, что свидетельствовало о ее повышенной метаболической активности. В работах [60, 78] выявлена разница в редокс-отношении ФАД/(НАДН+ФАД) между метастазирующей клеточной линией рака молочной железы MDA-MB231 и неметастазирующей — MCF7 *in vivo*. Редокс-отношение у клеток MDA-MB231 было выше, что авторы связывают с более агрессивным фенотипом метастазирующей линии.

Ряд работ посвящен изучению метаболических изменений при противоопухолевой терапии *in vivo*. Так, A.T. Shah с соавт. наблюдали статистически значимое снижение редокс-отношения НАДН/ФАД в клетках плоскоклеточного рака гортани (FaDu) *in vivo* на второй день химиотерапии Цисплатином [79]. Z. Zhang с соавт. описали увеличение редокс-отношения ФАД/

(НАДН+ФАД) в клетках глиомы крысы *in vivo* после фотодинамической терапии [56]. В работе [80] ими показано резкое увеличение редокс-отношения ФАД/(НАДН+ФАД) на клетках глиомы крысы *ex vivo* после фотодинамической терапии, что связывают с запущенным окислительным стрессом и нарушением структуры митохондрий.

Данный метод (использование редокс-отношения для оценки метаболического статуса опухолевых клеток) находит применение и в клинических исследованиях. R. de A. Natal с соавт. анализировали биопсийный материал от пациентов с опухолью молочной железы [54]. Выявлено, что редокс-отношение ФАД/НАДН снижено в образцах от пациентов с десмопластической реакцией, что указывает на высокую метаболическую активность данных клеток и неблагоприятный прогноз. A.T. Shah и M.C. Skala продемонстрировали возможность применения редокс-отношения НАДН/ФАД для анализа биопсийного материала от пациентов со злокачественными новообразованиями гортани, языка, эпидермиса и аденокарциномы слюнной железы *ex vivo*. Полученные ими данные указывают на то, что метаболический статус опухолевых клеток может служить критерием подбора адекватного лечения [81]. На образцах эпителия шейки матки показано, что образцы с дисплазией имеют сниженное редокс-отношение ФАД/(НАДН+ФАД) по сравнению с нормальным эпителием [82]. Схожие результаты получены на опухоли головного мозга крыс *ex vivo*: редокс-отношение ФАД/(НАДН+ФАД) в опухоли было значительно ниже, чем в нормальной ткани, что свидетельствует о преобладании гликолиза в опухолевых клетках [83]. Предполагается, что разница в значениях редокс-отношения может быть использована для визуализации границы опухоли во время операции [83].

Хотя нами не найдено клинических примеров регистрации редокс-отношения, анализ интенсивности флюоресценции метаболических кофакторов имеет большой потенциал для применения в клинике. Ряд работ демонстрируют результаты регистрации флюоресценции НАДН в опухолях пациентов. Показано, что увеличенная интенсивность флюоресценции НАДН свидетельствует о диспластических и онкологических изменениях ткани эпителия шейки матки человека *in vivo* [84]. В опухолях головы и шеи человека *in vivo* также была выявлена повышенная интенсивность флюоресценции НАДН по сравнению с нормальным эпителием [85]. Сходные результаты получены и при исследовании базально-клеточной карциномы человека *in vivo* [3]. Все авторы связывают высокую интенсивность флюоресценции НАДН с активными метаболическими процессами в опухолевых клетках.

Время жизни флюоресценции НАДН и ФАД в оценке энергетического метаболизма

Флюоресцентный имиджинг с временным разрешением. Исследование метаболизма клеток

методом время-разрешенного флюоресцентного имиджинга (fluorescence lifetime imaging, FLIM) основано на том, что время жизни флюоресценции кофакторов НАДН и ФАД существенно отличается в зависимости от того, в свободном состоянии они находятся или связаны с белками. Несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию метаболического статуса клетки на основе регистрации редокс-отношения, при таком подходе спектральное разделение свободных и связанных форм кофакторов невозможно, так как их спектры эмиссии отличаются на 10–20 нм при ширине пика в 150 нм [18, 86].

Флюоресцентный имиджинг с временным разрешением дает возможность исследовать метаболические кофакторы в живых клетках путем измерения среднего времени, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии, а не фактической интенсивности флюоресценции. Время жизни флюоресценции в разумных пределах не зависит от концентрации флюорофора, тогда как микроокружение является наиболее значимым фактором. На время жизни могут оказывать влияние pH, температура, концентрация ионов и кислорода, связь с другими молекулами или конформация хромофора [87, 88].

Технология FLIM для разделения свободного и связанного НАДН была предложена в 1992 г. J.R. Lakowicz и соавт. [89]. Ими впервые было измерено время жизни НАДН в растворе в свободном состоянии — 0,4 нс и в комплексе с малатдегидрогеназой — 1 нс. Недавно T.S. Blacker с соавт. была разработана методика разделения флюоресценции НАДН и НАДФН в живых клетках и тканях с использованием FLIM [21].

В настоящее время основным подходом к регистрации времени жизни флюоресценции является метод время-коррелированного счета фотонов (time-correlated single photon counting, TCSPC) [90–92]. Кинетика затухания флюоресценции измеряется после возбуждения образца коротко-импульсным лазерным излучением (фемто- или пикосекундным). Профиль затухания строится из множественного повтора одного фотонного события. Время прибытия первого фотона на детектор после импульса возбуждения измеряется и сохраняется в памяти, так что гистограмма времен и прихода фотонов представляет собой кривую интенсивности флюоресценции в зависимости от времени (рис. 3). Поскольку данные измерения требуют временного разрешения порядка нескольких пикосекунд, FLIM-системы оснащены высокоскоростными и сверхчувствительными детекторами, способными улавливать единичные фотоны [93, 94].

Характерное время жизни флюоресценции кофакторов в клетке составляет порядка 0,3 и 2,0 нс для НАДН, 0,3 и 2,7 нс — для ФАД. Более короткое время жизни соответствует связанной форме ФАД и свободной — НАДН, более длинное — свободному ФАД и связанному НАДН.

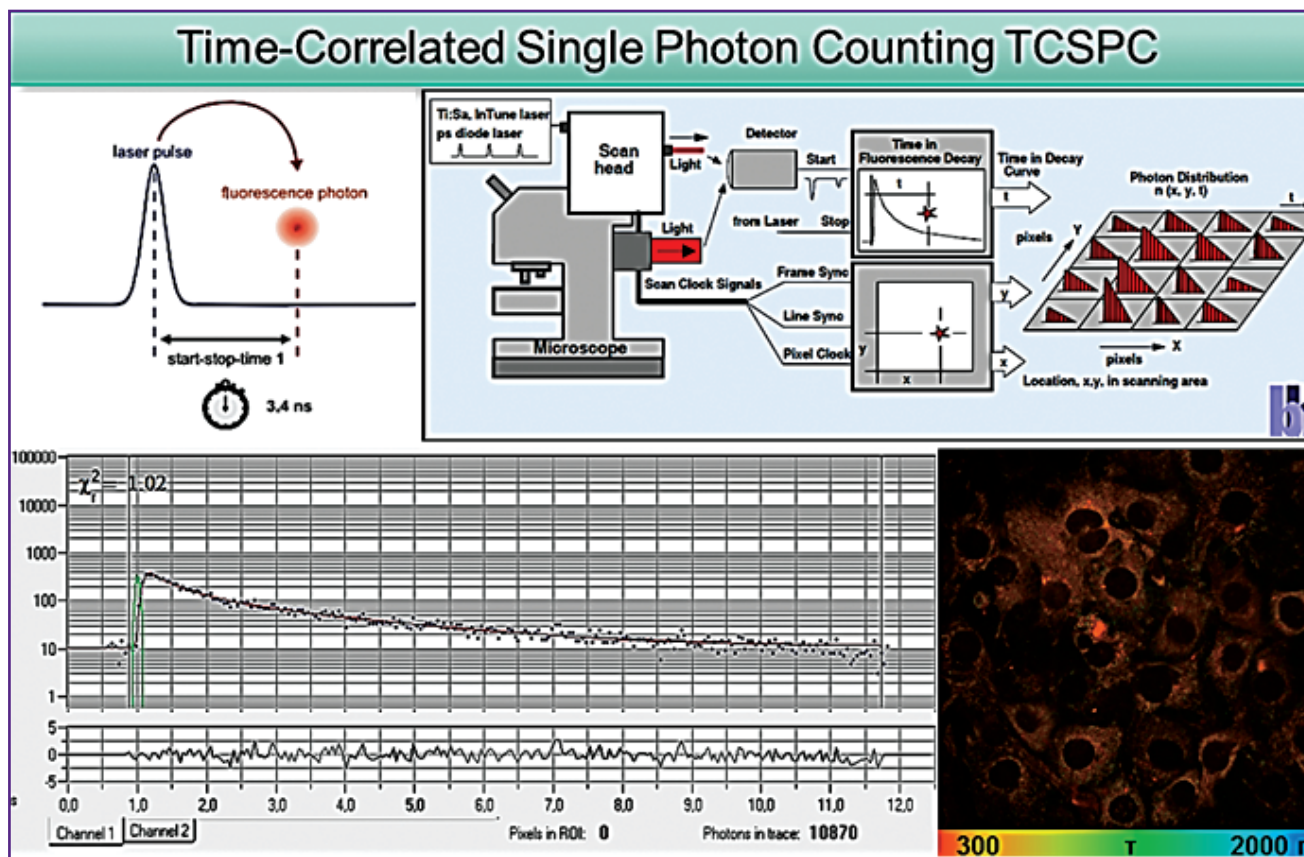


Рис. 3. Принцип работы метода время-коррелированного счета фотонов [1]

Хотя в случае ФАД различное время жизни обусловлено не связью с белком, а конформацией молекулы кофактора внутри белкового комплекса, применение понятий «свободный» и «связанный» к ФАД скорее традиционно. Известно, что ФАД существует в двух конформациях: закрытой, когда ароматические кольца изоаллоксазина и аденина находятся на предельно близком расстоянии друг от друга, и открытой, при которой два ароматических кольца предельно удалены друг от друга. При этом в открытой конформации эмиссия осуществляется за счет ароматической группы изоаллоксазина и время жизни составляет около 2–3 нс, тогда как время жизни флюоресценции закрытой конформации гораздо короче (100–300 нс), что обусловлено тушением флюоресценции изоаллоксазина аденином [21, 57, 86].

Свободная форма НАДН локализуется в цитозоле и отвечает за процессы гликолиза, тогда как связанная — в митохондриях и участвует в реакциях окислительного фосфорилирования. Время жизни связанного НАДН зависит от того, с каким белком связан кофактор, и варьирует в пределах от 1,7 до 2,9 нс [26, 60, 95].

Существует ряд работ, посвященных анализу изменения времени жизни кофакторов при онкологических процессах, однако основным показателем при изучении энергетического метаболизма ме-

тодом FLIM является относительный процентный вклад свободной и связанной форм кофакторов [22, 26, 57, 95].

На сегодняшний день флюоресцентный имиджинг с временным разрешением реализован в виде микроскопии на основе двухфотонного возбуждения, спектроскопии и макроимиджинга. Существуют установки для двухфотонной микроскопии и FLIM, одобренные для применения в клинике, например системы MPTflex и Dermalnspect производства компании JenLab (Германия) [3, 96, 97].

Изменения времени жизни флюоресценции при онкологических процессах. Ввиду неинвазивности, высокой чувствительности и отсутствия необходимости введения экзогенных красителей метод FLIM стал незаменимым инструментом для визуализации опухолевого метаболизма.

В многочисленных работах с помощью FLIM демонстрируется более гликолитический метаболизм опухолевых клеток по сравнению с нормальными. Например, на культурах клеток рака головы и шеи SCC25 и SCC61 выявлен пониженный процентный вклад связанных форм НАДН и ФАД по сравнению с нормальными эпителиальными клетками [74]. В той же работе продемонстрировано увеличение вклада связанного НАДН и ФАД после лечения химиопрепаратами Цисплатин, Цетуксимаб и BGT226. При ис-

следовании времени жизни НАДН в кератиноцитах и опухолевых клетках полости рта человека *in vitro* обнаружено, что опухолевые клетки имеют большее время жизни флюоресценции НАДН, а соотношение свободной/связанной форм НАДН в них снижено по сравнению с контролем [98]. Также установлено, что время жизни флюоресценции НАДН в клетках рака молочной железы человека значительно ниже по сравнению с клетками нормального эпителия [86].

V.K. Ramanujan с соавт. измерили характерные времена жизни флюоресценции НАДН для человеческих эмбриональных клеток почек (НЕК 293Т), гепатоцитов и клеточной линии рака шейки матки человека (HeLa) и показали, что вклад свободной формы НАДН наиболее высок в опухолевых клетках, что свидетельствует о смещении метаболизма клеток к гликолитическому [99]. На культуре клеток базофильной лейкемии крыс проанализировано время жизни флюоресценции НАДН при нормальных условиях и при изменении концентрации глюкозы [100]. Выявлено, что наименьшее значение среднего времени жизни НАДН соотносилось с пониженным содержанием глюкозы и клеточным голоданием. С увеличением концентрации глюкозы в среде среднее время жизни НАДН увеличивалось. На клеточной культуре рака молочной железы человека установлено, что в процессе пролиферации клеток время жизни флюоресценции связанной формы НАДН снижается, а процентный вклад свободной формы увеличивается. Такие же изменения, но с различной динамикой, наблюдали при добавлении к клеткам цианистого калия и при снижении концентрации питательных веществ в культуральной среде [101].

M.S. Islam с соавт. показали изменение времени жизни флюоресценции ФАД в опухолевых клетках рака шейки матки человека при изменении pH. Время жизни флюоресценции оставалось неизменным при изменении внеклеточного pH, однако при защелачивании внутриклеточного pH оно снижалось [102].

В работе [103] изучено распределение флюоресценции флавинов, их характерное время жизни и вклад в метаболические процессы на опухолевых клетках глиобластомы человека U-87 MG *in vitro*. Выявлено, что в опухолевых клетках флавины локализируются в основном в митохондриях, а среднее время жизни ФАД составляет 1,4 нс. Данный факт может служить критерием для ранней диагностики онкологических процессов.

In vivo было показано снижение процентных вкладов связанных форм НАДН и ФАД в процессе канцерогенеза клеток эпителия защечного мешка хомяка в результате активации гликолиза [60, 95]. На той же модели индуцированного рака полости рта H. Fatakawala с соавт. показали пониженное время жизни флюоресценции НАДН в опухоли по сравнению с нормой [104]. На клетках плоскоклеточного рака гортани (FaDu) *in vivo* обнаружено снижение времени

жизни флюоресценции НАДН и ФАД в результате химиотерапии Цисплатином и Цетуксимабом [79].

В последнее время особый интерес вызывает применение метода FLIM в клинической онкологии. Анализ кофакторов в опухолях человека проводится в основном в биопсийных образцах. На образцах опухоли пациентов с раком гортани, языка, эпидермиса и аденокарциномы слюнной железы *ex vivo* было проанализировано время жизни НАДН и ФАД [81]. Данное исследование показало, что онкологические процессы имеют свои характерные метаболические особенности и отличаются от нормы более гликолитическим типом метаболизма. В работе [54] на образцах опухоли молочной железы человека *ex vivo* выявлено, что опухолевые клетки с десмопластической реакцией имели более короткое время жизни флюоресценции НАДН и ФАД по сравнению с опухолевыми клетками, у которых данная реакция не наблюдалась. В образцах опухоли яичника человека *ex vivo* было обнаружено увеличенное время жизни флюоресценции ФАД в сравнении с нормальным эпидермисом [105].

При помощи FLIM-макроимиджинга на биопсийных образцах установлено, что клетки базалиомы имеют более короткое время жизни флюоресценции НАДН по сравнению с нормой [106]. Также на образцах опухолей кишечника, желудка, мочевого пузыря, печени, поджелудочной железы продемонстрировано, что среднее время жизни флюоресценции НАДН значительно длиннее по сравнению с его значением на границе опухоли и нормальной ткани того же образца [107].

В связи с небольшой глубиной зондирования (~300 мкм), работы с использованием FLIM на опухолях человека *in vivo* ограничены исследованиями новообразований кожи и головного мозга (интраоперационно). Так, было продемонстрировано, что в клетках меланомы время жизни НАДН существенно короче, чем в клетках базалиомы, и это может служить критерием для дифференциальной диагностики [97]. Первая работа на опухоли мозга *in vivo* показала применимость FLIM для оценки границ резекции в процессе нейрохирургического вмешательства [96]. У пациентов с опухолями головы и шеи методом FLIM-спектроскопии обнаружено, что клетки опухолевой ткани имеют более короткое время жизни флюоресценции НАДН по сравнению с окружающей нормальной тканью [108–110], это говорит об их более гликолитическом статусе.

Заключение

Данные о метаболическом статусе клетки важны для оценки ее функционального состояния. Все вышеперечисленные примеры демонстрируют потенциал неинвазивных оптических методов для визуализации метаболического статуса опухолевых клеток по флюоресценции эндогенных флюорофоров НАДН и ФАД. Описанные подходы на основе анализа интенсивности флюоресценции (редокс-отношение) и времени

жизни флуоресценции (FLIM) открывают возможности ранней диагностики онкологических заболеваний и мониторинга ответа на терапевтическое воздействие в режиме реального времени. Ожидается, что метаболический имиджинг улучшит понимание динамических биохимических процессов в клетках, а также станет основой для ранней диагностики не только онкологических процессов, но и других патологий, связанных с метаболическими изменениями (сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания и др.).

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научно-го фонда (проект №14-15-00646).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Chakraborty S., Nian F.-S., Tsai J.-W., Karmenyan A., Chiou A. Quantification of the metabolic state in cell-model of parkinson's disease by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Sci Rep* 2016; 6: 19145, <https://doi.org/10.1038/srep19145>.
- Folmes C.D., Dzeja P.P., Nelson T.J., Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012; 11(5): 596–606, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.002>.
- Balu M., Zachary C.B., Harris R.M., Krasieva T.B., König K., Tromberg B.J., Kelly K.M. In vivo multiphoton microscopy of basal cell carcinoma. *JAMA Dermatol* 2015; 151(10): 1068–1074, <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.0453>.
- Corpas F.J., Barroso J.B. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Front Environ Sci* 2014; 2, <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00055>.
- Heikal A.A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med* 2010; 4(2): 241–263, <https://doi.org/10.2217/bmm.10.1>.
- Shi F., Li Y., Li Y., Wang X. Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41(5): 352–361, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp029>.
- Xia W., Wang Z., Wang Q., Han J., Zhao C., Hong Y., Zeng L., Tang L., Ying W. Roles of NAD(+)/NADH and NADP(+)/NADPH in cell death. *Curr Pharm Des* 2009; 15(1): 12–19, <https://doi.org/10.2174/138161209787185832>.
- Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85–95, <https://doi.org/10.1038/nrc2981>.
- Cantor J.R., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* 2012; 2(10): 881–898, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-12-0345>.
- Kunz W.S., Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1985; 841(3): 237–246, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90064-9).
- Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. In: *Bioenergetics of the cell: quantitative aspects*. Springer Science + Business Media; 1998; p. 81–100, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5653-4_7.
- Pollak N., Dölle C., Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides — small molecules with a multitude of functions. *Biochem J* 2007; 402(2): 205–218, <https://doi.org/10.1042/bj20061638>.
- Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 2007; 10(2): 179–206, <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>.
- Smeitink J., van den Heuvel L., DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Gene* 2001; 2(5): 342–352, <https://doi.org/10.1038/35072063>.
- Papa S., Martino P.L., Capitanio G., Gaballo A., De Rasmio D., Signorile A., Petruzzella V. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 2012; 942: 3–37, https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1.
- Gautheron D.C. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review. *J Inherit Metab Dis* 1984; 7(Suppl 1): 57–61, <https://doi.org/10.1007/bf03047376>.
- Nsiah-Sefaa A., McKenzie M. Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Biosci Rep* 2016; 36(2): e00313, <https://doi.org/10.1042/BSR20150295>.
- Chorvat D., Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys Lett* 2009; 6(3): 175–193, <https://doi.org/10.1002/lapl.200810132>.
- Patterson G.H., Knobel S.M., Arkhammar P., Thastrup O., Piston D.W. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10): 5203–5207, <https://doi.org/10.1073/pnas.090098797>.
- Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. *Annu Rev Phys Chem* 1996; 47: 555–606, <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.555>.
- Blacker T.S., Mann Z.F., Gale J.E., Ziegler M., Bain A.J., Szabadkai G., Duchon M.R. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat Commun* 2014; 5: 3936, <https://doi.org/10.1038/ncomms4936>.
- Meleshina A.V., Dudenkova V.V., Shirmanova M.V., Shchesslavskiy V.I., Becker W., Bystrova A.S., Cherkasova E.I., Zagaynova E.V. Probing metabolic states of differentiating stem cells using two-photon FLIM. *Sci Rep* 2016; 6: 21853, <https://doi.org/10.1038/srep21853>.
- Klaidman L.K., Leung A.C., Adams J.D. Jr. High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions. *Anal Biochem* 1995; 228(2): 312–317, <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1356>.
- Huang S., Heikal A.A., Webb W.W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J* 2002; 82(5): 2811–2825, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75621-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75621-x).
- Rocheleau J.V., Head W.S., Piston D.W. Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals

- metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 31780–31787, <https://doi.org/10.1074/jbc.m314005200>.
26. Georgakoudi I., Quinn K.P. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng* 2012; 14: 351–367, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150108>.
27. Kim H.J., Winge D.R. Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1827(5): 627–636, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.012>.
28. Wouters B.G., Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(11): 851–864, <https://doi.org/10.1038/nrc2501>.
29. Marusyk A., Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(1): 105–117, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>.
30. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008; 7(1): 11–20, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
31. Eninger A.L., Linardic C.M., Chiang G.G., Thompson C.B., Abraham R.T. Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res* 2003; 63(23): 8451–8460.
32. Peng T., Golub T.R., Sabatini D.M. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* 2002; 22(15): 5575–5584, <https://doi.org/10.1128/mcb.22.15.5575-5584.2002>.
33. Masson N., Ratcliffe P.J. Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer Metab* 2014; 2(1): 3, <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3>.
34. Solaini G., Baracca A., Lenaz G., Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1797(6–7): 1171–1177, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.011>.
35. Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L. Mitochondrial autophagy is a HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283(16): 10892–10903, <https://doi.org/10.1074/jbc.M800102200>.
36. Zhang H., Gao P., Fukuda R., Kumar G., Krishnamachary B., Zeller K.I., Dang C.V., Semenza G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007; 11(5): 407–420, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.001>.
37. Lopez-Lazaro M. The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8(3): 305–312, <https://doi.org/10.2174/187152008783961932>.
38. Warburg O., Wind F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 1927; 8(6): 519–530, <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.
39. Pelicano H., Martin D.S., Xu R.H., Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34): 4633–4646, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209597>.
40. Zheng J. Energy metabolism of cancer: glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncol Lett* 2012; 4(6): 1151–1157, <https://doi.org/10.3892/ol.2012.928>.
41. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. *Mitochondrion* 2010; 10(6): 584–588, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.002>.
42. Diaz-Ruiz R., Rigoulet M., Devin A. The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1807(6): 568–576, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.010>.
43. Fantin V.R., St-Pierre J., Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9(6): 425–434, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>.
44. Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Enríquez S., Marín-Hernández A., Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 2007; 274(6): 1393–1418, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>.
45. Brand K.A., Hermfisse U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb J* 1997; 11(5): 388–395.
46. Lunt S.Y., Vander Heiden M.G. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 441–464, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>.
47. Fogal V., Richardson A.D., Karmali P.P., Scheffler I.E., Smith J.W., Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2010; 30(6): 1303–1318, <https://doi.org/10.1128/MCB.01101-09>.
48. Zu X.L., Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313(3): 459–465, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.136>.
49. Robertson-Tessi M., Gillies R.J., Gatenby R.A., Anderson A.R. Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes. *Cancer Res* 2015; 75(8): 1567–1579, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1428>.
50. Sengupta D., Pratz G. Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Mol Cancer* 2016; 15: 4, <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0481-3>.
51. Xu H.N., Feng M., Moon L., Dolloff N., El-Deiry W., Li L.Z. Redox imaging of the p53-dependent mitochondrial redox state in colon cancer ex vivo. *J Innov Opt Health Sci* 2013; 6(3): 1350016, <https://doi.org/10.1142/s1793545813500168>.
52. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 1979; 254(11): 4764–4771.
53. Levitt J.M., Baldwin A., Papadakis A., Puri S., Xylas J., Munger K., Georgakoudi I. Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells. *J Biomed Opt* 2006; 11(6): 064012, <https://doi.org/10.1117/1.2401149>.
54. Natal R. de A., Pelegati V.B., Bondarik C., Mendonça G.R., Derchain S.F., Lima C.P., Cesar C.L., Sarian L.O., Vassalloet J. Increased metabolic activity detected by FLIM in human breast cancer cells with desmoplastic reaction: a pilot study. *Proc SPIE 9536, Advanced Microscopy Techniques IV; and Neurophotonics II, 95360L* (July 14, 2015), <https://doi.org/10.1117/12.2183442>.
55. Quinn K.P., Sridharan G.V., Hayden R.S., Kaplan D.L., Lee K., Georgakoudi I. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation. *Sci Rep* 2013; 3: 3432, <https://doi.org/10.1038/srep03432>.

56. Zhang Z., Blessington D., Li H., Busch T.M., Glickson J., Luo Q., Chance B., Zheng G. Redox ratio of mitochondria as an indicator for the response of photodynamic therapy. *J Biomed Opt* 2004; 9(4): 772–778, <https://doi.org/10.1117/1.1760759>.
57. Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Mishina N.M., Zagaynova E.V. The metabolic interaction of cancer cells and fibroblasts — coupling between NAD(P)H and FAD, intracellular pH and hydrogen peroxide. *Cell Cycle* 2016; 15(9): 1257–1266, <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1160974>.
58. Skala M., Ramanujam N. Multiphoton redox ratio imaging for metabolic monitoring in vivo. *Methods Mol Biol* 2010; 594: 155–162, https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_11.
59. Skala M.C., Fontanella A., Lan L., Izatt J.A., Dewhirst M.W. Longitudinal optical imaging of tumor metabolism and hemodynamics. *J Biomed Opt* 2010; 15(1): 011112, <https://doi.org/10.1117/1.3285584>.
60. Skala M.C., Riching K.M., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., White J.G., Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(49): 19494–19499, <https://doi.org/10.1073/pnas.0708425104>.
61. Cannon T.M., Shah A.T., Walsh A.J., Skala M.C. High-throughput measurements of the optical redox ratio using a commercial microplate reader. *J Biomed Opt* 2015; 20(1): 010503, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.1.010503>.
62. Ostrander J.H., McMahon C.M., Lem S., Millon S.R., Brown J.Q., Seewaldt V.L., Ramanujam N. Optical redox ratio differentiates breast cancer cell lines based on estrogen receptor status. *Cancer Res* 2010; 70(11): 4759–4766, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-2572>.
63. Staniszewski K., Audi S.H., Sepehr R., Jacobs E.R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs. *Ann Biomed Eng* 2013; 41(4): 827–836, <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0716-z>.
64. Sepehr R., Staniszewski K., Maleki S., Jacobs E.R., Audi S., Ranji M. Optical imaging of tissue mitochondrial redox state in intact rat lungs in two models of pulmonary oxidative stress. *J Biomed Opt* 2012; 17(4): 046010, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.4.046010>.
65. Currie E., Schulze A., Zechner R., Walther T.C., Farese R.V. Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab* 2013; 18(2): 153–161, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>.
66. Fox C.J., Hammerman P.S., Thompson C.B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(11): 844–852, <https://doi.org/10.1038/nri1710>.
67. Chance B. Optical method. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1991; 20(1): 1–30, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.20.060191.000245>.
68. Palmer S., Litvinova K., Rafailov E.U., Nabi G. Detection of urinary bladder cancer cells using redox ratio and double excitation wavelengths autofluorescence. *Biomed Opt Express* 2015; 6(3): 977–986, <https://doi.org/10.1364/BOE.6.000977>.
69. Cannon T.M., Shah A.T., Skala M.C. Validation and characterization of optical redox ratio measurements with a microplate reader in breast cancer cells. *Proc. SPIE* 9303, Photonic Therapeutics and Diagnostics XI, 93032S (February 26, 2015), <https://doi.org/10.1117/12.2077941>.
70. Hou J., Wright H.J., Chan N., Tran R., Razorenova O.V., Potma E.O., Tromberg B.J. Correlating two-photon excited fluorescence imaging of breast cancer cellular redox state with seahorse flux analysis of normalized cellular oxygen consumption. *J Biomed Opt* 2016; 21(6): 60503, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.6.060503>.
71. Walsh A., Cook R.S., Rexer B., Arteaga C.L., Skala M.C. Optical imaging of metabolism in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Biomed Opt Express* 2012; 3(1): 75–85, <https://doi.org/10.1364/boe.3.000075>.
72. Walsh A.J., Cook R.S., Manning H.C., Hicks D.J., Lafontant A., Arteaga C.L., Skala M.C. Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, sub-types and early treatment response in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73(20): 6164–6174, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-0527>.
73. Levitt J.M., McLaughlin-Drubin M.E., Münger K., Georgakoudi I. Automated biochemical, morphological, and organizational assessment of precancerous changes from endogenous two-photon fluorescence images. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24765, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024765>.
74. Shah A.T., Demory Beckler M., Walsh A.J., Jones W.P., Pohlmann P.R., Skala M.C. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014; 9(3): e90746, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090746>.
75. Kirkpatrick N.D., Zou C., Brewer M.A., Brands W.R., Drezek R.A., Utzinger U. Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring. *Photochem Photobiol* 2005; 81(1): 125–134, <https://doi.org/10.1562/2004-08-09-ra-267.1>.
76. Gurushankar K., Nazeer S.S., Jayasree R.S., Krishnakumar N. Evaluation of antitumor activity of hesperetin-loaded nanoparticles against dmba-induced oral carcinogenesis based on tissue autofluorescence spectroscopy and multivariate analysis. *J Fluoresc* 2015; 25(4): 931–939, <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1575-4>.
77. Gohulkumar M., Nazeer S.S., Jayasree R.S., Gurushankar K., Krishnakumar N. Monitoring the metabolic response to nanoencapsulated silibinin treatment in DMBA-induced oral carcinogenesis using endogenous fluorescence. *Anal Methods* 2014; 6(24): 9744–9753, <https://doi.org/10.1039/c4ay01877j>.
78. Xu H.N., Nioka S., Glickson J.D., Chance B., Li L.Z. Quantitative mitochondrial redox imaging of breast cancer metastatic potential. *J Biomed Opt* 2010; 15(3): 036010, <https://doi.org/10.1117/1.3431714>.
79. Shah A.T., Diggins K.E., Walsh A.J., Irish J.M., Skala M.C. In vivo autofluorescence imaging of tumor heterogeneity in response to treatment. *Neoplasia* 2015; 17(12): 862–870, <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.11.006>.
80. Zhang M., Zhang Z., Blessington D., Li H., Busch T.M., Madrak V., Miles J., Chance B., Glickson J.D., Zheng G. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters. *Bioconjug Chem* 2003; 14(4): 709–714, <https://doi.org/10.1021/bc034038n>.
81. Shah A.T., Skala M.C. Ex vivo label-free microscopy of head and neck cancer patient tissues. *Proc. SPIE* 9329, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XV, 93292B (March 5, 2015), <https://doi.org/10.1117/12.2075583>.

82. Ramanujam N., Richards-Kortum R., Thomsen S., Mahadevan-Jansen A., Follen M., Chance B. Low temperature fluorescence imaging of freeze-trapped human cervical tissues. *Opt Express* 2001; 8(6): 335–343, <https://doi.org/10.1364/oe.8.000335>.
83. Liu Q., Grant G., Li J., Zhang Y., Hu F., Li S., Wilson C., Chen K., Bigner D., Vo-Dinh T. Compact point-detection fluorescence spectroscopy system for quantifying intrinsic fluorescence redox ratio in brain cancer diagnostics. *J Biomed Opt* 2011; 16(3): 037004, <https://doi.org/10.1117/1.3558840>.
84. Georgakoudi I., Jacobson B.C., Müller M.G., Sheets E.E., Badizadegan K., Carr-Locke D.L., Crum C.P., Boone C.W., Dasari R.R., Van Dam J., Feld M.S. NAD(P) H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Res* 2002; 62(3): 682–687.
85. Müller M.G., Valdez T.A., Georgakoudi I., Backman V., Fuentes C., Kabani S., Laver N., Wang Z., Boone C.W., Dasari R.R., Shapshay S.M., Feld M.S. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. *Cancer* 2003; 97(7): 1681–1692, <https://doi.org/10.1002/cncr.11255>.
86. Yu Q., Heikal A.A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *J Photochem Photobiol B* 2009; 95(1): 46–57, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.12.010>.
87. Tregidgo C., Levitt J.A., Suhling K. Effect of refractive index on the fluorescence lifetime of green fluorescent protein. *J Biomed Opt* 2008; 13(3): 031218, <https://doi.org/10.1117/1.2937212>.
88. van Manen H.J., Verkuijlen P., Wittendorp P., Subramaniam V., van den Berg T.K., Roos D., Otto C. Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biophys J* 2008; 94(8): L67–L69, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127837>.
89. Lakowicz J.R., Szmajcinski H., Nowaczyk K., Johnson M.L. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(4): 1271–1275, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1271>.
90. Duncan R.R. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein–protein interactions inside cells. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 5): 679–682, <https://doi.org/10.1042/bst0340679>.
91. Elson D., Webb S., Siegel J., Suhling K., Davis D., Lever J., Phillips D., Wallace A., French P. Biomedical applications of fluorescence lifetime imaging. *Opt Photon News* 2002; 13(11): 26–32, <https://doi.org/10.1364/opn.13.11.000026>.
92. Campos-Delgado D.U., Navarro O.G., Arce-Santana E.R., Walsh A.J., Skala M.C., Jo J.A. Deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy by a library of exponentials. *Opt Express* 2015; 23(18): 23748–23767, <https://doi.org/10.1364/oe.23.023748>.
93. Becker W. Fluorescence lifetime imaging — techniques and applications. *J Microsc* 2012; 247(2): 119–136, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x>.
94. Becker W., Bergmann A., Hink M.A., König K., Benndorf K., Biskup C. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* 2004; 63(1): 58–66, <https://doi.org/10.1002/jemt.10421>.
95. Skala M.C., Richtig K.M., Bird D.K., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., Keely P.J., Ramanujam N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nadh in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt* 2007; 12(2): 024014, <https://doi.org/10.1117/1.2717503>.
96. Kantelhardt S.R., Kalasauskas D., König K., Kim E., Weinigel M., Uchugonova A., Giese A. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue. *J Neurooncol* 2016; 127(3): 473–482, <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2062-8>.
97. Seidenari S., Arginelli F., Dunsby C., French P.M., König K., Magnoni C., Talbot C., Ponti G. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of melanoma: morphologic features and quantitative data for sensitive and specific non-invasive diagnostics. *PLoS ONE* 2013; 8(7): e70682, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070682>.
98. Ruck A., Hauser C., Mosch S., Kalinina S. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells. *J Biomed Opt* 2014; 19(9): 096005, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.19.9.096005>.
99. Ramanujan V.K., Zhang J.H., Biener E., Herman B. Multiphoton fluorescence lifetime contrast in deep tissue imaging: prospects in redox imaging and disease diagnosis. *J Biomed Opt* 2005; 10(5): 051407, <https://doi.org/10.1117/1.2098753>.
100. Vergen J., Hecht C., Zhuludeva L.V., Marquardt M.M., Hallworth R., Nichols M.G. Metabolic imaging using two-photon excited NADH intensity and fluorescence lifetime imaging. *Microsc Microanal* 2012; 18(4): 761–770, <https://doi.org/10.1017/S1431927612000529>.
101. Bird D.K., Yan L., Vrotsos K.M., Eliceiri K.W., Vaughan E.M., Keely P.J., White J.G., Ramanujam N. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. *Cancer Res* 2005; 65(19): 8766–8773, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-3922>.
102. Islam M.S., Honma M., Nakabayashi T., Kinjo M., Ohta N. pH dependence of the fluorescence lifetime of FAD in solution and in cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(1): 1952–1963, <https://doi.org/10.3390/ijms14011952>.
103. Horilova J., Cunderlikova B., Marcek Chorvatova A. Time- and spectrally resolved characteristics of flavin fluorescence in U87MG cancer cells in culture. *J Biomed Opt* 2015; 20(5): 051017, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.20.5.051017>.
104. Fatakdawala H., Poti S., Zhou F., Sun Y., Bec J., Liu J., Yankelevich D.R., Tinling S.P., Gandour-Edwards R.F., Farwell D.G., Marcu L. Multimodal in vivo imaging of oral cancer using fluorescence lifetime, photoacoustic and ultrasound techniques. *Biomed Opt Express* 2013; 4(9): 1724–1741, <https://doi.org/10.1364/boe.4.001724>.
105. Adur J., Pelegati V.B., de Thomaz A.A., Baratti M.O., Almeida D.B., Andrade L.A., Bottcher-Luiz F., Carvalho H.F., Cesar C.L. Optical biomarkers of serous and mucinous human ovarian tumor assessed with nonlinear optics microscopies. *PLoS ONE* 2012; 7(10): e47007, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047007>.
106. Galletly N.P., McGinty J., Dunsby C., Teixeira F., Requejo-Isidro J., Munro I., Elson D.S., Neil M.A., Chu A.C., French P.M., Stamp G.W. Fluorescence lifetime imaging distinguishes basal cell carcinoma from surrounding uninvolved skin. *Br J Dermatol* 2008; 159(1): 152–161, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08577.x>.

107. McGinty J., Galletly N.P., Dunsby C., Munro I., Elson D.S., Requejo-Isidro J., Cohen P., Ahmad R., Forsyth A., Thillainayagam A.V., Neil M.A.A., French P.M.W., Stamp G.W. Wide-field fluorescence lifetime imaging of cancer. *Biomed Opt Express* 2010; 1(2): 627–640, <https://doi.org/10.1364/boe.1.000627>.

108. Sun Y., Hatami N., Yee M., Phipps J., Elson D.S., Gorin F., Schrot R.J., Marcu L. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery. *J Biomed Opt* 2010; 15(5): 056022, <https://doi.org/10.1117/1.3486612>.

109. Sun Y., Phipps J.E., Meier J., Hatami N., Poirier B., Elson D.S., Farwell D.G., Marcu L. Endoscopic fluorescence lifetime imaging for in vivo intraoperative diagnosis of oral carcinoma. *Microscopy and Microanalysis* 2013; 19(4): 791–798, <https://doi.org/10.1017/s1431927613001530>.

110. Butte P.V., Mamelak A.N., Nuno M., Bannykh S.I., Black K.L., Marcu L. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors. *Neuroimage* 2011; 54(Suppl 1): S125–S135, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.11.001>.