

# МУЛЬТИФОТОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ПРИЖИЗНЕННОМ ВЫЯВЛЕНИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ГЕПАТОЦИТОВ

DOI: 10.17691/stm2021.13.2.02  
УДК 60:543.42/.45:616.36–073.5  
Поступила 9.11.2020 г.



**С.А. Родимова**, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины

НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

аспирант Института биологии и биомедицины<sup>2</sup>;

**Д.С. Кузнецова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины

НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**Н.В. Бобров**, ассистент кафедры факультетской хирургии и трансплантологии<sup>1</sup>;

врач-хирург онкологического отделения<sup>3</sup>;

**А.А. Гулин**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией биофотоники<sup>4</sup>;

научный сотрудник химического факультета<sup>5</sup>;

**А.А. Васин**, инженер-исследователь лаборатории нанофотоники<sup>4</sup>; студент химического факультета<sup>5</sup>;

**М.В. Губина**, инженер-исследователь лаборатории нанофотоники<sup>4</sup>; студент Физтех-школы электроники,

фотоники и молекулярной физики<sup>6</sup>;

**В.И. Щеславский**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник<sup>7</sup>; зав. лабораторией

высокоразрешающей микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**В.В. Елагин**, научный сотрудник лаборатории высокоразрешающей микроскопии

НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;

**М.М. Карабут**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномики

и адаптивного противоопухолевого иммунитета<sup>1</sup>;

**В.Е. Загайнов**, д.м.н., зав. кафедрой факультетской хирургии и трансплантологии<sup>1</sup>;

главный специалист по хирургии<sup>3</sup>;

**Е.В. Загайнова**, д.м.н., ректор<sup>2</sup>; старший научный сотрудник НИИ экспериментальной онкологии

и биомедицинских технологий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1,  
Н. Новгород, 603005;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

<sup>3</sup>Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, ул. Ильинская, 14, Н. Новгород, 603109;

<sup>4</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, 4,  
Москва, 119991;

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991;

<sup>6</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),  
Институтский переулок, 9, Московская область, Долгопрудный, 141701;

<sup>7</sup>Becker & Hickl, GmbH, Nunsdorfer Ring 7–9, Berlin, 12277, Germany

**Цель исследования** — оценить возможность выявления гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу в нормальной печени с применением современных методов мультимикроскопии и масс-спектрометрии.

**Материалы и методы.** Степень гетерогенности гепатоцитов по общей метаболической активности оценивали с применением метода мультимикроскопии на основе данных об интенсивности автофлуоресценции внутриклеточных кофакторов

**Для контактов:** Родимова Светлана Алексеевна, e-mail: srodimova123@gmail.com

НАД(Ф)Н и ФАД. Гетерогенность гепатоцитов по интенсивности внутриклеточных метаболических процессов определяли с помощью метода время-разрешенного имиджинга (FLIM — fluorescence lifetime imaging) на основе данных о вкладах времен жизни флуоресценции различных форм кофактора НАД(Ф)Н. Методом времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (ToF-SIMS — time-of-flight secondary ion mass spectrometry) проведено исследование липидного и аминокислотного состава гепатоцитов.

**Результаты.** Методом мультифотонной микроскопии выявлена гетерогенность гепатоцитов по общей метаболической активности. С применением FLIM установлена высокая степень гетерогенности по интенсивности процессов окислительного фосфорилирования, гликолиза и синтетических процессов (липогенеза, синтез нуклеиновых кислот и пентозофосфатного пути). Методом ToF-SIMS выявлено наличие гетерогенности гепатоцитов по аминокислотному и липидному составам, что указывает на различную интенсивность синтетических процессов отдельных гепатоцитов. Кроме того, установлены различия в содержании  $PO_3$ -ионов. Результаты ToF-SIMS-исследования согласуются с данными мультифотонной микроскопии и FLIM, подтверждая выявленную гетерогенность гепатоцитов по общей метаболической активности, а также по интенсивности внутриклеточных метаболических процессов.

**Заключение.** Используемые в работе новейшие методы флуоресцентного биоимиджинга и масс-спектрометрии позволяют эффективно выявлять гетерогенность гепатоцитов по метаболическому статусу. Наличие гетерогенности необходимо учитывать при анализе ткани печени в различных состояниях с применением методов флуоресцентного биоимиджинга.

**Ключевые слова:** гетерогенность гепатоцитов; метаболический статус гепатоцитов; мультифотонная микроскопия; FLIM; ToF-SIMS.

**Как цитировать:** Rodimova S.A., Kuznetsova D.S., Bobrov N.V., Gulin A.A., Vasin A.A., Gubina M.V., Scheslavsky V.I., Elagin V.V., Karabut M.M., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Multiphoton microscopy and mass spectrometry for revealing metabolic heterogeneity of hepatocytes *in vivo*. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2021; 13(2): 18–31, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.2.02>

## English

# Multiphoton Microscopy and Mass Spectrometry for Revealing Metabolic Heterogeneity of Hepatocytes *in vivo*

**S.A. Rodimova**, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>; PhD Student, Institute of Biology and Biomedicine<sup>2</sup>;

**D.S. Kuznetsova**, PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**N.V. Bobrov**, Assistant, Department of Theoretical Surgery and Transplantology<sup>1</sup>; Surgeon, Oncology Department<sup>3</sup>;

**A.A. Gulin**, PhD, Senior Researcher, Acting Head of the Laboratory of Biophotonics<sup>4</sup>; Researcher, Faculty of Chemistry<sup>5</sup>;

**A.A. Vasin**, Research Engineer, Laboratory of Nanophotonics<sup>4</sup>; Student, Faculty of Chemistry<sup>5</sup>;

**M.V. Gubina**, Research Engineer, Laboratory of Nanophotonics<sup>4</sup>; Student, Phystech School of Electronics, Photonics and Molecular Physics<sup>6</sup>;

**V.I. Scheslavsky**, PhD, Senior Researcher<sup>7</sup>; Head of the Laboratory of High-Resolution Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**V.V. Elagin**, Researcher, Laboratory of High-Resolution Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**M.M. Karabut**, PhD, Researcher, Laboratory of Genomics and Adaptive Antitumor Immunity<sup>1</sup>;

**V.E. Zagainov**, MD, DSc, Head of the Department of Theoretical Surgery and Transplantology<sup>1</sup>; Chief Specialist in Surgery<sup>3</sup>;

**E.V. Zagaynova**, MD, DSc, Rector<sup>2</sup>; Senior Researcher, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>2</sup>National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>3</sup>Volga District Medical Centre of Federal Medical Biological Agency of Russia, 14 Ilyinskaya St., Nizhny Novgorod, 603109, Russia;

<sup>4</sup>N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina St., Moscow, 119991, Russia;

<sup>5</sup>Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia;

<sup>6</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russia;

<sup>7</sup>Becker & Hickl, GmbH, Nunsdorfer Ring 7–9, Berlin, 12277, Germany

**The aim of the investigation** was to study the possibility of revealing the heterogeneity of normal liver hepatocytes in terms of metabolic status using the modern methods of multiphoton microscopy and mass spectrometry.

**Materials and Methods.** Heterogeneity of hepatocytes in terms of total metabolic activity was assessed using multiphoton microscopy based on the autofluorescence intensity of intracellular cofactors NAD(P)H and FAD. Hepatocyte heterogeneity in terms of intensity of intracellular metabolic processes was determined using the fluorescence lifetime imaging (FLIM) method based on the data about fluorescence lifetime contributions of various forms of NAD(P)H. The method of time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) was used to study the lipid and amino acid composition of hepatocytes.

**Results.** It has been revealed using multiphoton microscopy that hepatocytes are heterogeneous in terms of general metabolic activity. Using FLIM, it was established that the heterogeneity degree was high in terms of intensity of oxidative phosphorylation, glycolysis, and synthetic processes (lipogenesis, nucleic acid synthesis, and the pentose phosphate pathway). The ToF-SIMS method revealed the presence of hepatocyte heterogeneity in terms of amino acid and lipid composition, which points to various intensities of synthetic processes in individual hepatocytes. Moreover, differences in the content of PO<sub>3</sub> ions were revealed. The results of ToF-SIMS study correlate with the data obtained by multiphoton microscopy and FLIM, confirming the revealed heterogeneity of hepatocytes in terms of general metabolic activity and intensity of intercellular metabolic processes.

**Conclusion.** The latest methods of fluorescence bioimaging and mass spectrometry proved to be effective in revealing hepatocyte heterogeneity in terms of metabolic status. The presence of heterogeneity should be taken into account in studying the liver tissue under various conditions with the application of fluorescence bioimaging methods.

**Key words:** heterogeneity of hepatocytes; metabolic status of hepatocytes; multiphoton microscopy; FLIM; ToF-SIMS.

## Введение

Печень является функциональным органом, выполняющим самые разнообразные функции для поддержания физиологического гомеостаза. Она динамически контролирует содержание метаболитов в организме, накапливая питательные вещества, поступающие после еды [1], в частности, играет важную роль в поддержании постоянного уровня глюкозы в крови. Кроме того, этот орган осуществляет сложные процессы детоксикации, а также участвует в синтезе и экскреции желчных кислот и синтезе некоторых гормонов, в том числе инсулиноподобных факторов роста. В печени также синтезируется большая часть циркулирующих в крови белков, включая альбумин, белки системы комплемента и факторы свертывания крови [2].

Известно, что для оптимального выполнения большого количества функций гепатоциты пространственно неоднородны и зонированы вдоль портальной и центральной осей дольки печени. Такая гетерогенность обусловлена тем, что большинство задач печени выполняются разными подгруппами гепатоцитов. Следовательно, как в фундаментальных, так и в прикладных клинических исследованиях важно учитывать, что популяции клеток в паренхиме являются гетерогенными по своей структуре и функциям [2–4].

Стандартные методы анализа особенностей распределения и гетерогенности различных популяций клеток (иммуногистохимические и морфологические) достаточно информативны, однако не позволяют проводить прижизненные исследования на живой ткани. Для оценки гетерогенности популяции клеток ткани по уровню экспрессии различных генов применяется метод полимеразной цепной реакции, однако его использование сопряжено с разрушением клеточной структуры, что также не позволяет проводить исследова-

ования прижизненно или на образцах свежей ткани. Информативным методом для определения различных метаболических путей в гетерогенных популяциях клеток служит также изотопное маркирование, однако значительным недостатком его является необходимость добавления радиоактивной метки [5].

В настоящее время мультифотонная микроскопия в комбинации с регистрацией флуоресценции с временным разрешением — метод время-разрешенного имиджинга (FLIM — fluorescence lifetime imaging) — активно используется в биомедицинских исследованиях, в том числе для прижизненной оценки метаболического статуса различных типов клеток. Метод двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне позволяет проводить исследования *in vivo* и *ex vivo* с высокой глубиной проникновения лазерного возбуждения и минимальным фотоповреждением ткани [6]. Метод FLIM основан на регистрации времени жизни флуоресценции флуорофоров и позволяет получать информацию не только о структуре, но и о различных физико-химических процессах в клетках [7–10], в том числе и гепатоцитах [11].

В настоящее время современным актуальным подходом для прижизненного бесконтрастного анализа метаболического статуса различных клеток с применением мультифотонной микроскопии является оценка интенсивности автофлуоресценции, а также вкладов времен жизни флуоресценции различных форм кофакторов НАД(Ф)Н (никотинамидадениндинуклеотид) и ФАД (флавинадениндинуклеотид).

Известно, что НАДН участвует в реакциях цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования. Восстановленная фосфорилированная форма НАДФН является кофактором в реакциях биосинтеза жирных кислот и стероидов, обладает антиоксидантной активностью [11]. В зависимости от нахождения НАДН в свободном или связанном с бел-

ком состоянии кофактор имеет короткое или длинное время жизни флуоресценции [12]. ФАД входит в состав ферментов, участвующих в транспорте электронов, репарации ДНК, биосинтезе нуклеотидов, бета-окислении жирных кислот и катаболизме аминокислот, а также в синтезе других кофакторов, таких как коэнзим А (КоА), коэнзим Q (КоQ). Кроме того, восстановленный ФАДН<sub>2</sub> входит в состав комплекса II электрон-транспортной цепи митохондрий, таким образом принимая участие в реакциях окислительного фосфорилирования [13, 14]. Известно, что сдвиг метаболического статуса (изменение активности гликолиза или окислительного фосфорилирования) сопровождается изменением вкладов свободной и связанной форм времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н. Таким образом, FLIM позволяет косвенно оценивать интенсивность гликолиза, окислительного фосфорилирования и биосинтетических процессов при различных функциональных состояниях клеток [15–18]. Эффективность методов мультифотонной микроскопии в изучении гепатоцитов также была доказана рядом исследователей, которые проводили анализ особенностей изменения их метаболического статуса при различных патологиях печени, в частности прижизненный анализ [19–21]. Однако до сих пор с применением данных методов не выполнялось исследований гетерогенности гепатоцитов нормальной печени по метаболическому статусу.

Еще одним перспективным методом исследования тканей является времяпролетная масс-спектрометрия вторичных ионов (ToF-SIMS — time-of-flight secondary ion mass spectrometry), которая позволяет получить информацию о распределении липидного и аминокислотного состава ткани на клеточном уровне [22, 23]. ToF-SIMS позволяет не только проводить анализ компонентов клетки на основе их специфического химического строения, но и оценивать распределение интересующих метаболитов клетки на основе данных химического картирования [24]. В сочетании с другими методами ToF-SIMS была успешно применена и для анализа ткани печени, в частности при циррозе [24] и жировой болезни печени [25]. Нами ранее [26] с применением метода ToF-SIMS было показано изменение в соотношении насыщенных, ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот при остром холестазе и при хроническом фиброзе печени. Основным преимуществом метода ToF-SIMS является отсутствие необходимости дополнительного окрашивания образцов ткани или добавления различных маркеров, а также возможность прицельного анализа области интереса.

Методы FLIM и ToF-SIMS уже показали свою эффективность для оценки степени гетерогенности клеточных популяций, в частности для определения гетерогенности по клеточному составу различных типов опухолей [27–31].

В данной работе выполнен анализ степени гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу с

применением современных методов визуализации в сочетании в методом масс-спектрометрии вторичных ионов.

**Цель исследования** — оценить возможность выявления гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу в нормальной печени методами мультифотонной микроскопии и масс-спектрометрии с использованием химического картирования.

## Материалы и методы

**Лабораторные животные.** Исследование проводили на 25 самцах крыс линии Wistar массой 300–400 г. Содержание животных осуществляли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование было одобрено Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. Перед получением материала печени животное предварительно взвешивали, после чего наркотизировали раствором Золетила в концентрации 80 мг/кг массы тела. Затем печень животного полностью забирали для исследования. Полученный материал взвешивали, промывали физиологическим раствором и приготавливали образцы для исследования методами мультифотонной микроскопии, морфологического анализа и времяпролетной масс-спектрометрии.

**Морфологический анализ.** Для гистологических исследований печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили через спирты восходящих концентраций по стандартной методике. Депарафинизированные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином также по стандартной методике [32, 33]. С использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) для каждого образца получали 10 микрофотографий без перекрытия по всей поверхности среза ткани при увеличении в 10 и 40 раз.

**Мультифотонная микроскопия.** *Ex vivo* исследование образцов печени, полученных в течение 10 мин после забора органа, проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного фемтосекундным лазером Ti:Sa (частота повторения — 80 МГц, длительность импульса — 140 фс) и системой время-коррелированного счета фотонов Simple-Tau 152 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Средняя мощность составляла около 6 мВт. С ткани печени получали изображения интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД, а также изображения FLIM (по 10 для каждого животного). С этой целью использовали



масляно-иммерсионный объектив C-Apochromat 40×/1.2. Автофлуоресценцию НАД(Ф)Н возбуждали на длине волны 750 нм, эмиссию детектировали в диапазоне 450–500 нм, автофлуоресценцию ФАД возбуждали на длине волны 900 нм, эмиссию детектировали в диапазоне 500–550 нм. С применением программного обеспечения ImageJ (параметр integrated density) оценивали значения интенсивности автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД. Накопление фотонов FLIM-системой проводили в течение 90 с.

Количественную оценку полученных значений времен жизни флуоресценции различных форм НАД(Ф)Н выполняли в программе SPCImage (Becker & Hickl GmbH). Данные анализировали в области цитоплазмы клетки, исключая при этом ядро. Для каждого изображения оценивали следующие параметры:  $t_1$  (пс) — время жизни флуоресценции свободной формы НАДН;  $a_1$  (%) — вклад свободной формы НАДН;  $a_2$  (%) — вклад связанной формы НАДН;  $a_3$  (%) — вклад связанной формы НАДФН;  $a_1 + a_2 + a_3 = 100\%$ .

Для анализа интенсивности автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД, а также метаболического статуса гепатоцитов с применением метода FLIM получали по 10 флуоресцентных изображений, в каждом из которых выделяли 30 областей интереса (соответственно отдельному гепатоциту) в цитоплазме гепатоцитов.

**Оценка степени гетерогенности.** Для оценки степени гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу полученные значения  $a_1$  и  $a_3$  были разделены по 15 подгруппам:

1-я —  $a_1$  в диапазоне 50–60% и  $a_3$  в диапазоне 4–6%;

2-я —  $a_1$  в диапазоне 50–60% и  $a_3$  в диапазоне 6–8%;

3-я —  $a_1$  в диапазоне 50–60% и  $a_3$  в диапазоне 8–10%;

4-я —  $a_1$  в диапазоне 50–60% и  $a_3$  в диапазоне 10–12%;

5-я —  $a_1$  в диапазоне 50–60% и  $a_3$  в диапазоне 12–14%;

6-я —  $a_1$  в диапазоне 60–70% и  $a_3$  в диапазоне 4–6%;

7-я —  $a_1$  в диапазоне 60–70% и  $a_3$  в диапазоне 6–8%;

8-я —  $a_1$  в диапазоне 60–70% и  $a_3$  в диапазоне 8–10%;

9-я —  $a_1$  в диапазоне 60–70% и  $a_3$  в диапазоне 10–12%;

10-я —  $a_1$  в диапазоне 60–70% и  $a_3$  в диапазоне 12–14%;

11-я —  $a_1$  в диапазоне 70–80% и  $a_3$  в диапазоне 4–6%;

12-я —  $a_1$  в диапазоне 70–80% и  $a_3$  в диапазоне 6–8%;

13-я —  $a_1$  в диапазоне 70–80% и  $a_3$  в диапазоне 8–10%;

14-я —  $a_1$  в диапазоне 70–80% и  $a_3$  в диапазоне 10–12%;

15-я —  $a_1$  в диапазоне 70–80% и  $a_3$  в диапазоне 12–14%.

Для каждой подгруппы проводили подсчет клеток, значения  $a_1$  и  $a_3$  которых соответствуют определенному диапазону. Двухмерные гистограммы распределения интенсивности автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД в гепатоцитах, а также трехмерные гистограммы распределения значений  $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$  в гепатоцитах были построены в среде разработки RStudio с использованием языка R 4.0.2 и библиотеки car (функция scatter3d).

**ToF-SIMS-анализ.** Анализ липидного и аминокислотного составов гепатоцитов выполнен на криосрезах печени методом масс-спектрометрии вторичных ионов на приборе TOF.SIMS 5 (IONTOF GmbH, Германия). В качестве источника использовали первичные ионы  $Bi_3^+$  с энергией 30 кэВ. Анализ проводили в трех режимах. Во всех режимах была активирована низкоэнергетическая электронная пушка во избежание зарядки образца, а плотность дозы первичных ионов поддерживалась ниже статического предела SIMS ( $10^{13}$  ионов/см<sup>2</sup>). Статистический анализ проводили в спектроскопическом режиме. Масс-спектры получены с области 300×300 мкм (с пространственным разрешением 5 мкм) в режимах как положительных, так и отрицательных ионов. Для каждого среза выполняли 18 измерений с перекрывающимися областей, выбранных случайным образом. Выходы вторичных ионов рассчитывали как интенсивность соответствующего пика отношения липида к аминокислоте, нормированную на общее количество ионов, с использованием программного обеспечения SurfaceLab 6 (IONTOF GmbH, Германия). Химическое картирование проводили для ионов липидов и аминокислот, идентифицированных на масс-спектрах, в двух режимах с пространственным разрешением 800 и 200 нм соответственно.

**Статистическая обработка данных.** На основании полученных методом ToF-SIMS данных рассчитывали средний выход вторичного иона и стандартное отклонение. Распределение было отнесено к нормальному при помощи графического метода. Для выявления статистически значимых различий использовали t-критерий Стьюдента. В качестве критических уровней значимости применяли значения  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ . Нормальность распределения выборок была подтверждена с помощью метода «график квантилей». Статистический анализ данных проводили в программах Excel и Statistica 10.0.

## Результаты

**Морфологический анализ.** Микрофотографии срезов ткани печени в норме, окрашенной гематоксилином и эозином, а также по методу Ван-Гизона, представлены на рис. 1. С применением стандартных

методов гистологического анализа наличия гетерогенности гепатоцитов по структурным параметрам не выявлено. Клетки имели однородное окрашивание, признаков отека и дистрофических изменений не наблюдалось.

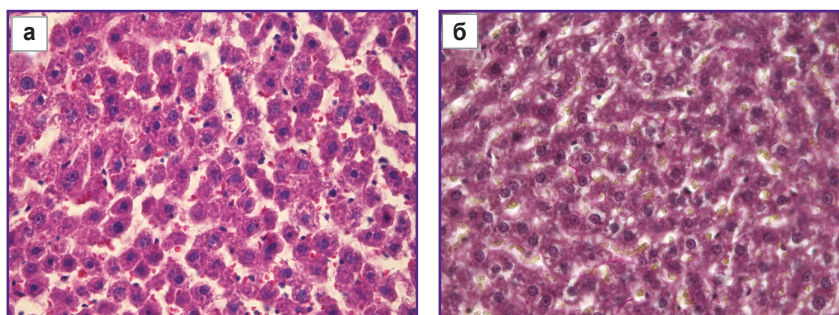
**Мультифотонная микроскопия и оценка степени гетерогенности популяции гепатоцитов *ex vivo* образцов ткани печени в норме.**

Анализ степени гетерогенности гепатоцитов методом FLIM проводили без привязки к определенным зонам дольки печени. Такой подход применялся с целью доказательства наличия гетерогенности гепатоцитов даже в случайных полях микроскопа. Кроме того, это позволило снизить время проведения анализа, так как процедура точного определения зон дольки печени является затратной по времени и сложно реализуемой в клинических условиях.

Таким образом, для оценки степени гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу были получены данные об интенсивности автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в гепатоцитах. Пример визуализации паренхимы печени с применением мультифотонной микроскопии, а также распределение значений интенсивности флуоресценции кофакторов для всех исследуемых клеток представлены на рис. 2.

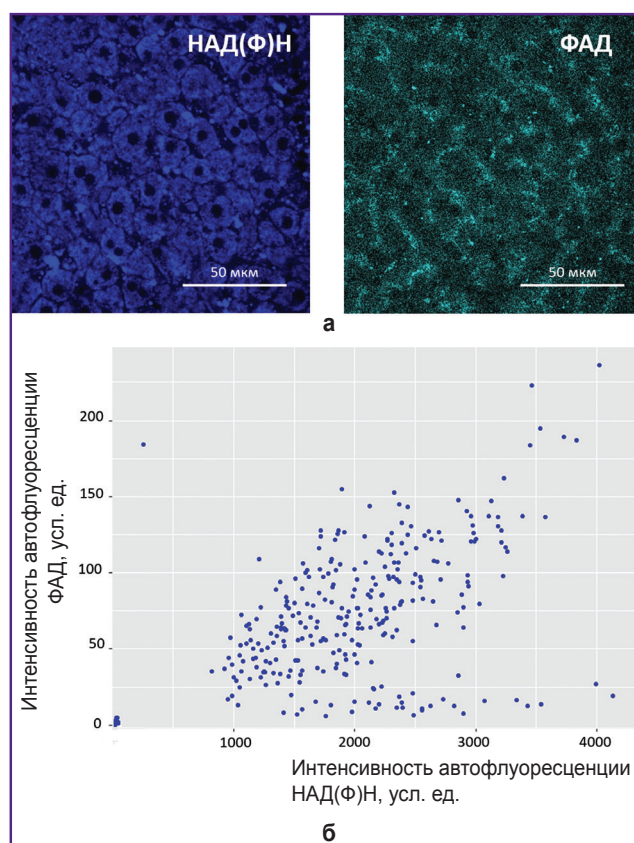
Установлена высокая степень гетерогенности гепатоцитов по значениям автофлуоресценции внутриклеточных кофакторов. Клетки с сигналом автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД низкой интенсивности представляют собой популяцию с низкой общей метаболической активностью. Клетки с сигналом автофлуоресценции высокой интенсивности представляют популяцию с высокой общей метаболической активностью. На рис. 2 видно, что в нормальной ткани линейных животных клетки разнородны по значениям интенсивностей кофакторов. Присутствуют клетки как с высокой, так и с низкой метаболической активностью.

Для прицельного анализа метаболического статуса гепатоцитов в нормальной ткани печени, а также для определения наличия гетерогенности клеток были получены значения вкладов свободной и связанной форм НАДН (а1 и а2 соответственно), а также вклада связанной формы НАДФН (а3). В соответствии с полученными значениями можно выделить 15 подгрупп, отличающихся по интенсивности различных метаболических путей в клетках (гликолиз, окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный путь, липогенез, синтез нуклеотидов). На основе полученного массива данных методом FLIM была построена таблица, в которой отражено процентное количество гепатоцитов, находящихся в соответствующей подгруппе,



**Рис. 1. Микроизображения гистологических срезов ткани печени в норме:** а — окрашивание гематоксилином и эозином; б — окрашивание по методу Ван-Гизона; ×40

от общего числа исследованных клеток. Выделение подгрупп гепатоцитов, отличающихся по характерным значениям вкладов различных форм НАД(Ф)Н, происходило на основе предыдущих работ по исследованию метаболического статуса гепатоцитов в печени при разных состояниях [26]. Результаты анализа



**Рис. 2. Мультифотонная микроскопия ткани печени в норме:**

а — изображения автофлуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД в гепатоцитах; б — диаграмма рассеяния интенсивности автофлуоресценции кофакторов в нормальной печени линейных животных. НАД(Ф)Н: возбуждение — 750 нм, эмиссия — 455–500 нм; ФАД: возбуждение — 900 нм, эмиссия — 500–550 нм; поле зрения — 213×213 мкм; разрешение — 1024



гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу представлены в таблице.

Обнаружено, что в популяции гепатоцитов линейных животных наблюдается высокая степень гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу. Можно выделить подгруппы гепатоцитов, которые преобладают в паренхиме образца. Наиболее значимые по количеству подгруппы — 7, 9, 10, 13. Несмотря на преобладание в паренхиме подгруппы гепатоцитов со значениями  $a_1$  в диапазоне 60–70% (баланс процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования), в данном диапазоне преобладают клетки с повышенной интенсивностью биосинте-

**Процентное содержание различных подгрупп гепатоцитов в нормальной печени линейных животных**

$a_3$ , %	$a_1$ , %		
	50–60	60–70	70–80
4–5	0,07	0,07	5,27
6–7	0,67	16,13	27,40
8–9	2,40	35,60	2,07
10–11	1,20	6,33	0,47
12–13	0,33	1,53	0,53

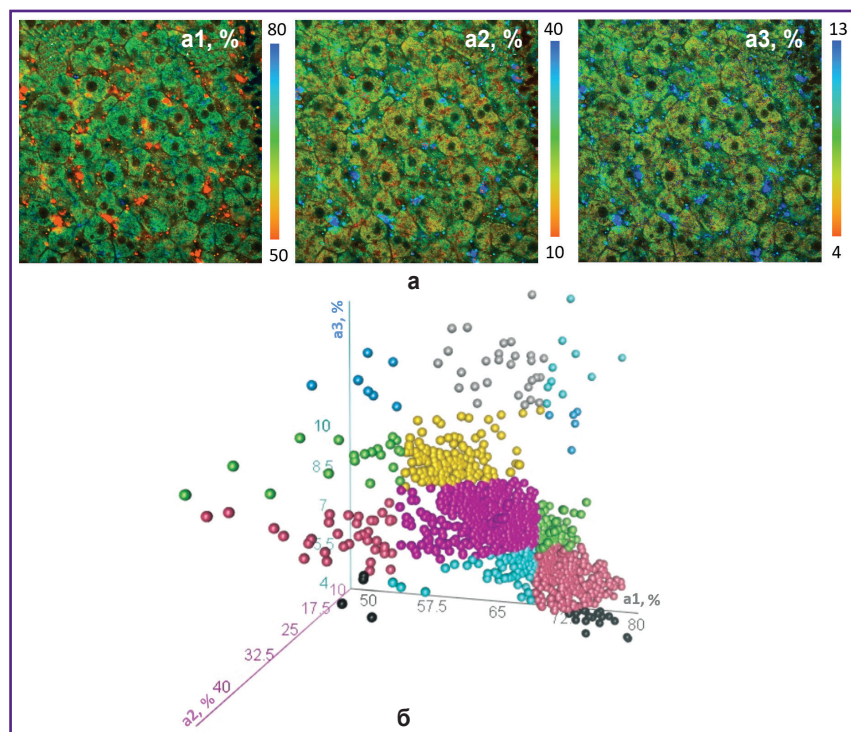
ческих процессов (значения  $a_3$  в диапазоне 8–9%). Кроме того, наблюдается также значительное количество гепатоцитов со значениями  $a_1$  в диапазоне 70–80% (сдвиг метаболического статуса в сторону увеличения интенсивности процессов гликолиза), при этом в данном диапазоне преобладают клетки с более низкой интенсивностью биосинтетических процессов (значения  $a_3$  в диапазоне 6–7%). Вклад популяции гепатоцитов со значениями  $a_1$  в диапазоне 50–60% незначителен (сдвиг метаболического статуса в сторону увеличения интенсивности процессов окислительного фосфорилирования).

На гистограмме, показывающей трехмерное распределение значений вкладов различных форм НАД(Ф)Н (рис. 3), видно, что популяция гепатоцитов в нормальной печени линейных животных является гетерогенной по трем исследуемым параметрам FLIM.

**ToF-SIMS-анализ.** При проведении статистического анализа сигналов вторичных ионов с разных срезов печени одного животного (рис. 4) наибольшие отличия наблюдали для ионов сфингомиелина (отношение массы иона к его заряду —  $m/z$  — составляло 104, 184, 264) и аминокислоты глицина ( $m/z$  — 30).

Показательно, что коэффициенты вариации вторичных ионов сильно варьируют в зависимости от иона. Так, для ионов аминокислот ( $m/z$  — 30, 70, 84) в рамках одного среза стандартные отклонения минимальны, тогда как для холестерина ( $m/z$  — 369), жирных кислот (все ионы на рис. 4, б), моноацилглицеридов ( $m/z$  — 313, 339) они весьма значительны, что указывает на неоднородность распределения данных липидов в одном срезе. Стоит отметить, что моноацилглицериды, скорее всего, являются фрагментами жиров, а жирные кислоты могут быть фрагментарными ионами как жиров, так и фосфолипидов.

С целью проведения визуальной оценки неравномерности распределения химического состава гепатоцитов на клеточном уровне были получены изображения химического картирования срезов с разрешением 800 нм (рис. 5) и 200 нм (рис. 6). Показано распределение некоторых липидов. Для корреляции данных измерения проводили с одной области как для положительных, так и для отрицательных ионов. Некоторые липиды, такие как фосфатидилхолин и сфингомиелин на рис. 5, распределены достаточно равномерно, но присутствуют темные пятна, указывающие на падение интенсивности сигнала в этой области. Холестерин и жирные кис-



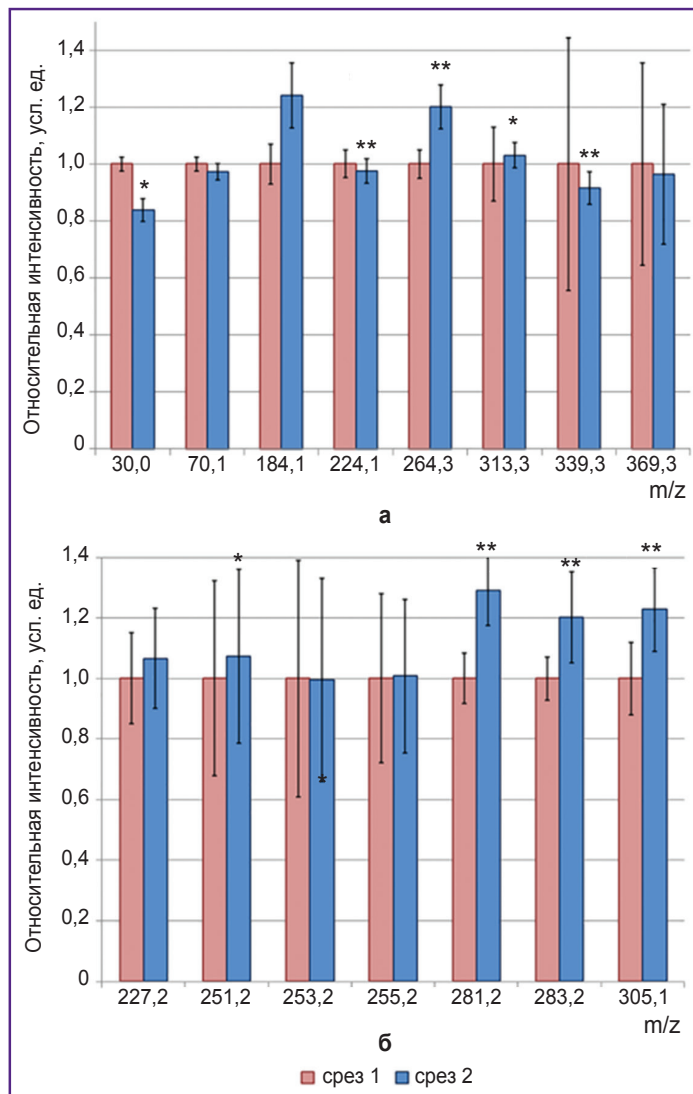
**Рис. 3. Распределение вкладов времен жизни флуоресценции гепатоцитов в норме:**

а — FLIM-изображения различных форм НАД(Ф)Н, поле зрения — 213×213 мкм; разрешение — 512; б — гистограмма распределения вкладов различных форм НАД(Ф)Н. На диаграмме рассеяния каждый цвет соответствует отдельной подгруппе гепатоцитов, одна точка соответствует одному исследуемому гепатоциту

лоты, напротив, показывают ярко выраженную кластеризацию, которая обеспечивает сигнал намного выше фонового. Данные кластеры имеют разную форму, размер варьируется в пределах 5–70 мкм. Среди жирных кислот наиболее выражена кластеризация для кислот с 16 углеродными атомами (пальмитиновая, пальмитолеиновая кислоты), менее выражен данный эффект для жирных кислот с 18 атомами углерода (стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты). Зачастую расположение и формы кластеров совпадают, но есть и отличия. Кроме того, оказалось, что темные зоны на изображениях сфингомиелина и фосфатидилхолина совпадают со светлыми кластерами холестерина и жирных кислот. Поскольку клеточной структуры при данном разрешении не наблюдается, сложно точно сказать, к чему относятся те или иные кластеры. Однако эти карты хорошо объясняют высокие коэффициенты вариации, которые наблюдались для интенсивностей ряда липидов в спектроскопическом режиме.

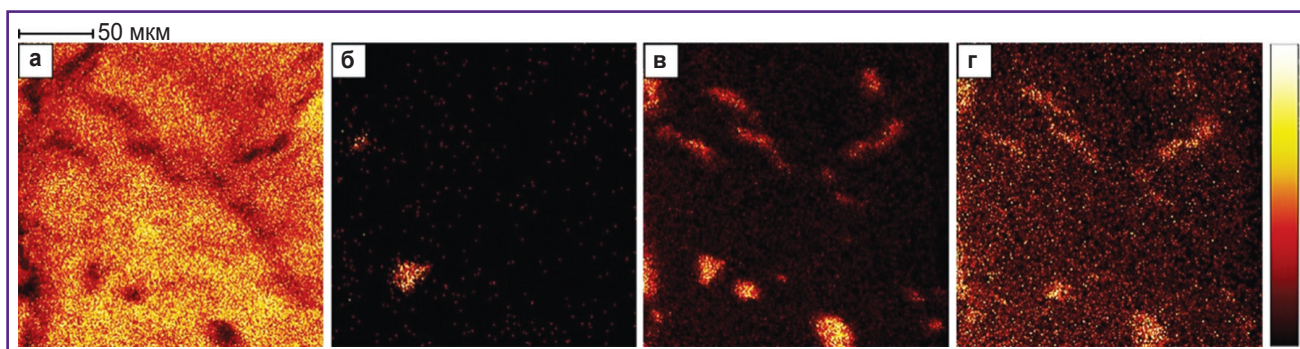
Разрешение 200 нм (см. рис. 6) близко к предельному пространственному разрешению, доступному для ToF-SIMS. Однако помимо очевидного улучшения качества изображения при его использовании возникает ряд сложностей. Ухудшается разрешение по массе, кроме того, падает интенсивность одного пикселя. Поэтому, чтобы достигнуть тех же показателей интенсивности, необходимо подвергать образец воздействию первичных ионов в 16 раз дольше по сравнению с разрешением 800 нм. Это приводит к дозе облучения первичными ионами  $\sim 5 \cdot 10^{12}$  ионов/см<sup>2</sup>, что близко к статическому пределу SIMS. Такие высокие дозы, как правило, приводят к деградации органического и биологического материала, поэтому анализ в режимах детекции положительных и отрицательных ионов проводили для разных зон.

На рис. 6, а показано распределение калия,



**Рис. 4. Выход вторичных ионов липидов и аминокислот для двух срезов печени:**

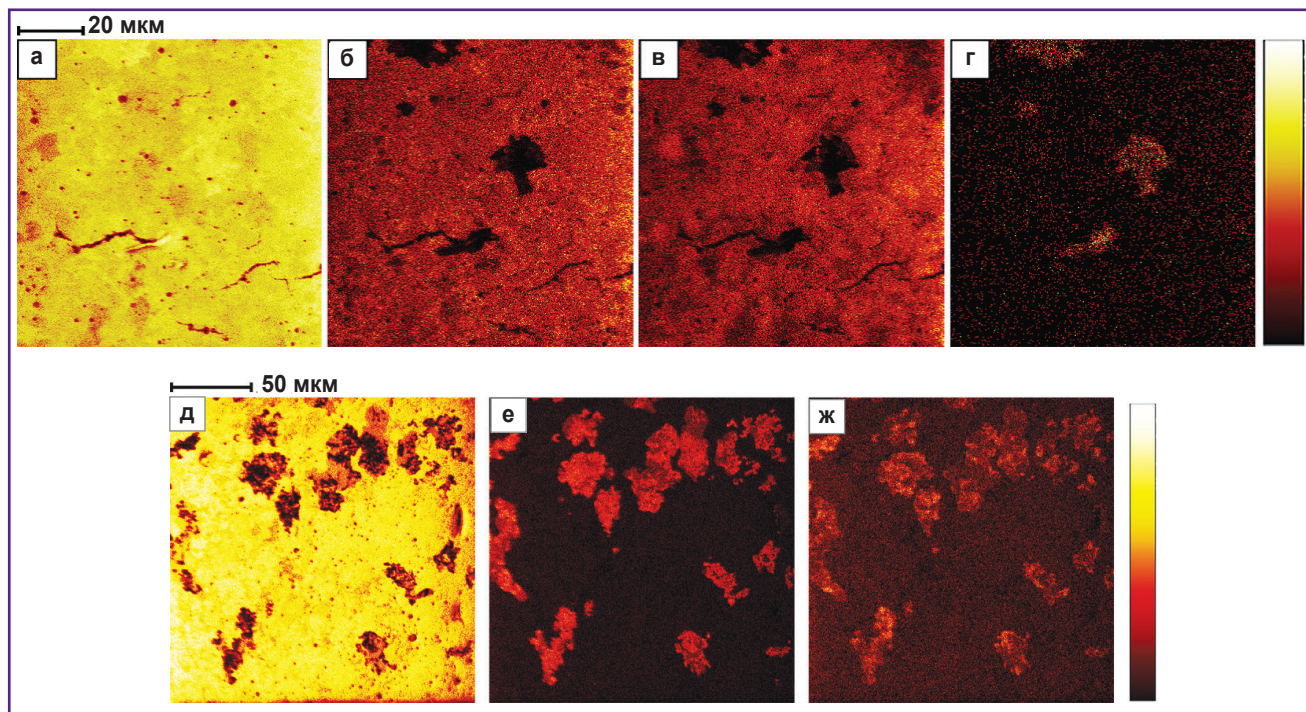
а — положительные ионы; б — отрицательные ионы. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. Статистически значимые различия при сравнении срезов: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,001$



**Рис. 5. Химическое картирование распределения липидов в срезах печени с разрешением 800 нм:**

а — головная группа фосфатидилхолина и сфингомиелина ( $m/z$  — 184); б — холестерин ( $m/z$  — 369); в — пальмитиновая кислота C16:0 ( $m/z$  — 255); г — стеариновая кислота C18:0 ( $m/z$  — 283)





**Рис. 6. Химическое картирование распределения липидов в срезах печени с разрешением 200 нм:** положительные ионы: а — калий ( $m/z$  — 39); б — фрагмент пролина и глутаминовой кислоты ( $m/z$  — 70); в — головная группа фосфатидилхолина и сфингомиелина ( $m/z$  — 184); г — холестерин ( $m/z$  — 369); отрицательные ионы: д — фосфатная группа ( $PO_3$ ) ( $m/z$  — 79); е — пальмитиновая кислота C16:0 ( $m/z$  — 255); ж — стеариновая кислота C18:0 ( $m/z$  — 283)

которое визуализирует очертания гепатоцитов. Распределения ионов на рис. 6, б и 6, в имеют сходство, хотя принадлежат к совершенно разным классам соединений — аминокислотам и фосфолипидам. Темные зоны, соответствующие низкому сигналу от фрагментов пролина и глутаминовой кислоты на рис. 6, б, а также низкому сигналу от головных групп фосфатидилхолина и сфингомиелина на рис. 6, в совпадают с яркими зонами, соответствующими скоплениям холестерина (рис. 6, г).

На рис. 6, д показано распределение фосфатной группы  $PO_3$ . Данная группа может являться фрагментарным ионом АТФ, НАД(Ф)Н, РНК, фосфорилированных белков, фосфолипидов. Темные зоны, соответствующие низкому сигналу от фосфатных ионов, в точности повторяют светлые зоны, соответствующие высокому сигналу от жирных кислот (рис. 6, е, ж), что указывает на то, что зоны с низким сигналом фосфатной группы  $PO_3$  имеют высокий сигнал пальмитиновой и стеариновой кислот.

Таким образом, выявлена неоднородность распределения различных липидов (в частности, холестерина, жирных кислот и моноацилглицеридов) и отдельных аминокислот (в частности, глицина) в ткани печени. Полученные результаты могут указывать на наличие гетерогенности в интенсивности процессов липогенеза и синтеза аминокислот в гепатоцитах нормальной печени.

Важно отметить, что стандартными гистологическими методами наличие гетерогенности популяции гепатоцитов не было обнаружено. Применение современных методов флуоресцентного биоимиджинга и методов масс-спектрометрии с проведенным химическим картированием позволило выявить гетерогенность популяции гепатоцитов по метаболическому статусу и характеру распределения клеточных липидов и аминокислотных фрагментов.

Полученные в данной работе результаты будут использованы для дальнейшей разработки критериев оценки состояния ткани печени при патологии на основе анализа гетерогенности гепатоцитов в случайных полях зрения с применением современных методов прижизненной визуализации и метода масс-спектрометрии с химическим картированием.

### Обсуждение

С метаболической точки зрения функциональной единицей печени является печеночная долька. Кровь поступает на периферию дольки в воротные узлы и перемещается радиально внутрь к дренирующей центральной вене через синусоидальные кровеносные сосуды. В результате формируются градиенты концентрации веществ (ростовых факторов, метаболитов и кислорода), которые растворены в крови или секретируются вышележащими перипортальными

гепатоцитами [34]. Градиент определяется изменениями в составе плазмы крови и различной оксигенацией в кровотоке в пространстве между перипортальной и перивенозной областями [35]. Явление гетерогенности гепатоцитов рассмотрено во многих работах [34–38]. Показано, что гепатоциты, расположенные в перипортальной зоне (зона 1), специализируются на глюконеогенезе и  $\beta$ -окислении, тогда как в гепатоцитах, расположенных вокруг центральной вены (зона 3), выявлена высокая интенсивность реакций гликолиза, липогенеза, а также процессов детоксикации. Следовательно, гепатоциты функционально неоднородны. Кроме того, выявлены различия в экспрессии различных генов в зависимости от расположения гепатоцитов в печеночной дольке вдоль портоцентральной оси [39]. Взаимозависимые метаболические пути (например, липогенез и гликолиз) колокализированы, чтобы обеспечить синергетическое действие, тогда как противоположные пути локализованы в разных зонах, что позволяет избежать взаимного вмешательства. В целом неоднородность распределения гепатоцитов позволяет одновременно выполнять разные и даже противоположные метаболические функции, обеспечивая гибкую адаптацию к различным условиям [2, 40].

В настоящий момент известны данные об изменении уровня гетерогенности гепатоцитов, а также о нарушении зонального расположения гепатоцитов при различных патологиях печени. В частности, степень гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу изменяется при развитии алкогольной жировой болезни печени, что связано с нарушением метаболизма жирных кислот в гепатоцитах [41]. Показано селективное отложение триглицеридов (ТГ) в перипортальных гепатоцитах (перипортальный стеатоз), а также увеличение липогенной активности в перипортальных областях. Кроме того, выявлено, что при развитии патологии происходит увеличение интенсивности  $\beta$ -окисления в перипортальных гепатоцитах, тогда как у контрольных животных интенсивность данного процесса выше в перипортальных областях дольки печени [41].

При развитии неалкогольной жировой болезни печени наблюдается дисбаланс метаболизма жирных кислот [42], что в результате приводит к неоднородному отложению ТГ в печени. Кроме того, было показано, что в этом случае меняется распределение ферментов, участвующих в метаболизме фосфатидилхолина и реакциях глюконеогенеза [43].

При развитии стеатогепатита выявлено зональное усиление перекисного окисления липидов и окислительного стресса в сочетании со сниженным напряжением кислорода на мембранах митохондрий. Такое изменение связано с развитием митохондриальной дисфункции в отдельных гепатоцитах [44].

Прогрессирование хронических печеночных заболеваний ведет к развитию цирроза, где зональное распределение гепатоцитов полностью теряется и, кроме

того, практически прекращается синтез глутатион синтетазы (нарушение глутатионового цикла) [45].

Таким образом, оценка степени гетерогенности гепатоцитов с применением современных методов визуализации имеет большее значение при проведении интраоперационного исследования состояния ткани печени, в частности при выявлении фоновых заболеваний.

В настоящий момент методы флуоресцентного биоимиджинга широко применяются для оценки метаболического статуса клеток, в частности опухолевых и стволовых [45–50]. Кроме того, показана эффективность методов мультифотонной микроскопии в сочетании с FLIM для анализа метаболического статуса гепатоцитов в норме и при различных состояниях печени [19, 27].

В данной работе с целью выявления гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу были определены значения интенсивности флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД, вклады свободной и связанной форм НАДН ( $a_1$  и  $a_2$ ), а также вклад связанной формы НАДФН ( $a_3$ ) различных участков печеночной ткани. Нами не проводился прицельный поиск зон долек печени, поскольку выполнение прицельного анализа — сложный, затратный по времени процесс, увеличивающий продолжительность операции. В связи с этим «слепая» визуализация представляет собой более реализуемый подход в клинической практике. И даже без учета прицельного анализа зон нами была выявлена высокая степень гетерогенности популяции гепатоцитов по интенсивности внутриклеточных процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза, а также по интенсивности биосинтетических процессов в случайных полях.

ToF-SIMS позволяет исследовать липидный и аминокислотный состав ткани печени. В нашей работе проведен статистический анализ липидного и аминокислотного состава гепатоцитов в случайных полях. Для ряда ионов жирных кислот, моноацилглицеридов, холестерина обнаружен значительный разброс в интенсивностях в зависимости от места анализа. При помощи химического картирования удалось подтвердить данный результат. Жирные кислоты, холестерин концентрируются в отдельных клетках. В этих же клетках фиксируется пониженная интенсивность фосфатидилхолина и аминокислот (белков). Кроме того, клетки с повышенным сигналом липидов также различаются: в некоторых гепатоцитах повышен сигнал только одиночных жирных кислот, в других — определенного набора жирных кислот, а в некоторых — еще и холестерина. Скорее всего, источником повышенного сигнала жирных кислот являются триацилглицериды, а уровень фосфолипидов, содержание которых коррелирует с интенсивностью фосфатного иона, напротив, в данных клетках снижен. Интересно, что жирные кислоты с более короткими цепями (16 углеродных атомов) демонстрируют более выраженный контраст на химических картах по сравнению с кислотами с более

длинными цепями (18 и 20 углеродных атомов). Это свидетельствует о том, что жирные кислоты с более короткими цепями имеют тенденцию к более выраженному накоплению в отдельных гепатоцитах. Каких-либо тенденций по распределению при сравнении по степени ненасыщенности жирных кислот не выявлено. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых описано наличие гетерогенности гепатоцитов по интенсивности биосинтетических процессов: в частности, выявлено усиление процессов липогенеза в отдельно расположенных гепатоцитах [51]. В работе [52] показана неравномерная интенсивность процессов метаболизма липидов в клетках печени: в частности, установлено, что скорость синтеза жирных кислот выше в периферических гепатоцитах, тогда как скорость  $\beta$ -окисления выше в перипортальных клетках печени. В работе N.R. Katz с соавт. [53] на модели крыс выявлена более высокая активность липогенных ферментов ацетил-КоА-карбоксилазы и АТФ-цитратлиазы в периферических областях. Кроме того, обнаружено, что активность карнитин-пальмитилтрансферазы 1, ключевого фермента в  $\beta$ -окислении, выше в перипортальных гепатоцитах. Карнитин-пальмитилтрансфераза 1 также демонстрирует более низкую чувствительность к ингибированию липогенным промежуточным малонил-КоА в перипортальных областях по сравнению с периферическими областями [54]. Известно [41, 55], что этерификация жирных кислот и синтез липопротеинов очень низкой плотности несколько выше в гепатоцитах, локализованных в периферических областях. Высказано предположение, что такое неравномерное распределение позволяет избежать накопления ТГ, тем самым предотвращая негативные последствия усиленного липогенеза в данной популяции гепатоцитов. Однако в этом же исследовании различий в скорости экскреции ТГ для фракций гепатоцитов из перипортальных и периферических зон печени не обнаружено.

Полученные результаты анализа ToF-SIMS согласуются с данными FLIM, где показано увеличение вклада связанной формы НАДФН в отдельных клетках, что обуславливается увеличением интенсивности биосинтетических процессов (в большей степени липогенеза) в клетках.

Кроме того, в нашей работе методом ToF-SIMS установлено неравномерное распределение ионов  $PO_3$  в гепатоцитах. Известно, что ион  $PO_3$  входит в состав АТФ и НАДФН. В связи с этим различная концентрация данного иона в отдельных гепатоцитах может быть связана также с различной интенсивностью метаболической активности клеток. Такой результат согласуется с данными метаболического имиджинга с применением мультифотонной микроскопии, с помощью которой выявлена гетерогенность гепатоцитов по метаболической активности и по интенсивности процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза.

Таким образом, методы флуоресцентного биоимиджинга и масс-спектрометрии представляются пер-

спективными для проведения анализа структурно-функционального состояния ткани печени, а также выявления гетерогенности популяций гепатоцитов в ткани печени в прижизненном состоянии. Доказано, что популяция гепатоцитов является гетерогенной даже при проведении анализа в случайных полях зрения, не соответствующих определенной зоне печеночной доли. Феномен гетерогенности необходимо учитывать при проведении анализа метаболического статуса клеток в ткани печени. В дальнейшем планируется разработка алгоритма для анализа степени гетерогенности метаболического и химического состава ткани печени по случайному набору гепатоцитов.

## **Заключение**

Использование мультифотонной микроскопии позволяет методом «слепой» визуализации выявить гетерогенность гепатоцитов по метаболическому статусу в норме на основе данных об интенсивности автофлуоресценции кофакторов НАДФ(Ф)Н и ФАД, а также данных о временах жизни флуоресценции и вкладов различных форм НАДФ(Ф)Н. Метод ToF-SIMS показывает наличие гетерогенности гепатоцитов по аминокислотному и липидному составу, что указывает на различную интенсивность синтетических процессов отдельных гепатоцитов. С его помощью можно выявить различия в содержании  $PO_3$ -ионов. Результаты ToF-SIMS-исследования согласуются и с данными мультифотонной микроскопии и подтверждают гетерогенность гепатоцитов по метаболической активности, а также по интенсивности процессов окислительного фосфорилирования, гликолиза и синтетических процессов.

Предложенные в работе новейшие методы флуоресцентного биоимиджинга и масс-спектрометрии эффективны в выявлении гетерогенности гепатоцитов по метаболическому статусу и позволяют оценивать наличие гетерогенности при проведении исследований ткани печени в различных состояниях, в том числе в клинической практике.

**Благодарности.** Эксперименты ToF-SIMS были выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Анализ химических, биологических систем и природных материалов: масс-спектральная микроскопия и фемтосекундная лазерная микроскопия-спектроскопия» (№506694).

**Финансирование исследования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №19-15-00263).

**Конфликт интересов** отсутствует.

## **Литература/References**

1. Jungermann K. Dynamics of zonal hepatocyte heterogeneity. Perinatal development and adaptive alterations



during regeneration after partial hepatectomy, starvation and diabetes. *Acta Histochem Suppl* 1986; 32: 89–98.

2. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992; 53(3): 275–354, [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(92\)90055-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(92)90055-5).

3. Jungermann K., Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 1996; 16: 179–203, <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001143>.

4. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: the oxygen gradient revisited. *Redox Biol* 2017; 11: 622–630, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>.

5. Fan T.W.M., Higashi R.M., Chernayavskaya Y., Lane A.N. Resolving metabolic heterogeneity in experimental models of the tumor microenvironment from a stable isotope resolved metabolomics perspective. *Metabolites* 2020; 10(6): 249, <https://doi.org/10.3390/metabo10060249>.

6. Hoover E.E., Squier J.A. Advances in multiphoton microscopy technology. *Nat Photonics* 2013; 7(2): 93–101, <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.361>.

7. Kuimova M.K., Yahioglu G., Levitt J.A., Suhling K. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *J Am Chem Soc* 2008; 130(21): 6672–6673, <https://doi.org/10.1021/ja800570d>.

8. Okabe K., Inada N., Gota C., Harada Y., Funatsu T., Uchiyama S. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Commun* 2012; 3(1): 1–9, <https://doi.org/10.1038/ncomms1714>.

9. Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P.M., Lévêque-Fort S., Webb S.E., Davis D.M. Imaging the environment of green fluorescent protein. *Biophys J* 2002; 83(6): 3589–3595, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75359-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75359-9).

10. Becker W., Shcheslavskiy V., Frere S., Slutsky I. Spatially resolved recording of transient fluorescence-lifetime effects by line-scanning TCSPC. *Microsc Res Tech* 2014; 77(3): 216–224, <https://doi.org/10.1002/jemt.22331>.

11. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10(2): 179–206, <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>.

12. Lakowicz J.R., Szmajdzinski H., Nowaczyk K., Johnson M.L. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(4): 1271–1275, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.4.1271>.

13. 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>.

14. 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).

15. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30(6): 875–889, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.

16. Roberts M.S., Dancik Y., Prow T.W., Thorling C.A., Lin L.L., Grice J.E., Robertson T.A., König K., Becker W. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy. *Eur J Pharm*

*Biopharm* 2011; 77(3): 469–488, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.023>.

17. Stringari C., Nourse J.L., Flanagan L.A., Gratton E. Phasor fluorescence lifetime microscopy of free and protein-bound NADH reveals neural stem cell differentiation potential. *PLoS One* 2012; 7(11): e48014, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048014>.

18. Stringari C., Donovan P., Gratton E. Phasor FLIM metabolic mapping of stem cells and cancer cells in live tissues. In: *Proc. SPIE 8226, Multiphoton microscopy in the biomedical sciences XII*. SPIE; 2012, <https://doi.org/10.1117/12.909420>.

19. Thorling C.A., Liu X., Burczynski F.J., Fletcher L.M., Gobe G., Roberts M.S., Multiphoton microscopy can visualize zonal damage and decreased cellular metabolic activity in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Biomed Opt* 2011; 16(11): 116011, <https://doi.org/10.1117/1.3647597>.

20. 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>.

21. Lakner P.H., Monaghan M.G., Möller Y., Olayioye M.A., Schenke-Layland K. Applying phasor approach analysis of multiphoton FLIM measurements to probe the metabolic activity of three-dimensional in vitro cell culture models. *Sci Rep* 2017; 7: 42730, <https://doi.org/10.1038/srep42730>.

22. Van Nuffel S., Quatredeniens M., Pirkl A., Zakel J., Le Caer J.P., Elie N., Vanbellinghen Q.P., Dumas S.J., Nakhleh M.K., Ghigna M.R., Fadel E., Humbert M., Chaurand P., Touboul D., Cohen-Kaminsky S., Brunelle A. Multimodal imaging mass spectrometry to identify markers of pulmonary arterial hypertension in human lung tissue using MALDI-ToF, ToF-SIMS, and hybrid SIMS. *Anal Chem* 2020; 92(17): 12079–12087, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02815>.

23. Gularyan S.K., Gulin A.A., Anufrieva K.S., Shender V.O., Shakhparonov M.I., Bastola S., Antipova N.V., Kovalenko T.F., Rubtsov Y.P., Latyshev Y.A., Potapov A.A., Pavlyukov M.S. Investigation of inter- and intratumoral heterogeneity of glioblastoma using TOF-SIMS. *Mol Cell Proteomics* 2020; 19(6): 960–970, <https://doi.org/10.1074/mcp.ra120.001986>.

24. Petit V.W., Réfrégiers M., Guettier C., Jamme F., Sebanayakam K., Brunelle A., Laprêvote O., Dumas P., Le Naour F. Multimodal spectroscopy combining time-of-flight-secondary ion mass spectrometry, synchrotron-FT-IR, and synchrotron-UV microspectroscopies on the same tissue section. *Anal Chem* 2010; 82(9): 3963–3968, <https://doi.org/10.1021/ac100581y>.

25. Debois D., Bralet M.P., Le Naour F., Brunelle A., Laprêvote O. In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal Chem* 2009; 81(8): 2823–2831, <https://doi.org/10.1021/ac900045m>.

26. Kuznetsova D.S., Rodimova S.A., Gulin A., Reunov D., Bobrov N., Polozova A.V., Vasin A., Shcheslavskiy V.I., Vdovina N., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology. *J Biomed Opt* 2019; 25(1): 014508, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.25.1.014508>.

27. Wang H., Liang X., Gravot G., Thorling C.A., Crawford D.H., Xu Z.P., Liu X., Roberts M.S. Visualizing liver anatomy, physiology and pharmacology using multiphoton

- microscopy. *J Biophotonics* 2017; 10(1): 46–60, <https://doi.org/10.1002/jbio.201600083>.
28. Rudkouskaya A., Sinsuebphon N., Intes X., Barroso M. Role of tumor heterogeneity in imaging breast cancer targeted delivery using FLIM FRET in vivo. In: *Cancer imaging and therapy*. OSA; 2016; CTh2A-5, <https://doi.org/10.1364/cancer.2016.cth2a.5>.
29. Trinh A.L., Chen H., Chen Y., Hu Y., Li Z., Siegel E.R., Linskey M.E., Wang P.H., Digman M.A., Zhou Y.H. Tracking functional tumor cell subpopulations of malignant glioma by phasor fluorescence lifetime imaging microscopy of NADH. *Cancers (Basel)* 2017; 9(12): 168, <https://doi.org/10.3390/cancers9120168>.
30. Barnes C.A., Brison J., Robinson M., Graham D.J., Castner D.G., Ratner B.D. Identifying individual cell types in heterogeneous cultures using secondary ion mass spectrometry imaging with C<sub>60</sub> etching and multivariate analysis. *Anal Chem* 2012; 84(2): 893–900, <https://doi.org/10.1021/ac201179t>.
31. Dimovska Nilsson K., Neittaanmäki N., Zaar O., Angerer T.B., Paoli J., Fletcher J.S. TOF-SIMS imaging reveals tumor heterogeneity and inflammatory response markers in the microenvironment of basal cell carcinoma. *Biointerphases* 2020; 15(4): 041012, <https://doi.org/10.1116/6.0000340>.
32. Клэнт Э.К. *Атлас патологии Роббинса и Котрана*. М: Логосфера; 2010.
- Klatt E.K. *Atlas patologiji Robbinsa i Kotrana* [Atlas of pathology by Robbins and Cotran]. Moscow: Logosfera; 2010.
33. Лилли Р. *Патогистологическая техника и практическая гистохимия*. Пер. В.В. Португалова. М: Мир; 1969.
- Lilli R. *Patogistologicheskaya tekhnika i prakticheskaya gistokhimiya*. [Histopathological technique and practical histochemistry]. V.V. Portugalov (translator). Moscow: Mir; 1969.
34. Ben-Moshe S., Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(7): 395–410, <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0134-x>.
35. Godoy P., Hewitt N.J., Albrecht U., Andersen M.E., Ansari N., Bhattacharya S., Bode J.G., Bolleyn J., Borner C., Böttger J., Braeuning A., Budinsky R.A., Burkhardt B., Cameron N.R., Camussi G., Cho C.S., Choi Y.J., Craig Rowlands J., Dahmen U., Damm G., Dirsch O., Donato M.T., Dong J., Dooley S., Drasdo D., Eakins R., Ferreira K.S., Fonsato V., Fraczek J., Gebhardt R., Gibson A., Glanemann M., Goldring C.E., Gómez-Lechón M.J., Groothuis G.M., Gustavsson L., Guyot C., Halifax D., Hammad S., Hayward A., Häussinger D., Hellerbrand C., Hewitt P., Hoehme S., Holzhütter H.G., Houston J.B., Hrach J., Ito K., Jaeschke H., Keitel V., Kelm J.M., Kevin Park B., Kordes C., Kullak-Ublick G.A., LeCluyse E.L., Lu P., Luebke-Wheeler J., Lutz A., Maltman D.J., Matz-Soja M., McMullen P., Merfort I., Messner S., Meyer C., Mwinyi J., Naisbitt D.J., Nussler A.K., Olinga P., Pampaloni F., Pi J., Pluta L., Przyborski S.A., Ramachandran A., Rogiers V., Rowe C., Schelcher C., Schmich K., Schwarz M., Singh B., Stelzer E.H., Stieger B., Stöber R., Sugiyama Y., Tetta C., Thasler W.E., Vanhaecke T., Vinken M., Weiss T.S., Widera A., Woods C.G., Xu J.J., Yarborough K.M., Hengstler J.G. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013; 87(8): 1315–1530, <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.
36. Gebhardt R., Matz-Soja M. Liver zonation: novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8491–8504, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8491>.
37. Colnot S., Perret C. Liver zonation. In: *Molecular pathology of liver diseases*. Monga P.S. (editor). Springer; 2011; p. 7–16.
38. Chen F., Jimenez R.J., Sharma K., Luu H.Y., Hsu B.Y., Ravindranathan A., Stohr B.A., Willenbring H. Broad distribution of hepatocyte proliferation in liver homeostasis and regeneration. *Cell Stem Cell* 2020; 26(1): 27–33.e4, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.001>.
39. Gilgenkrantz H., Collin de l'Hortet A. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *Am J Pathol* 2018; 188(6): 1316–1327, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.008>.
40. Hijmans B.S., Grefhorst A., Oosterveer M.H., Groen A.K. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 2014; 96: 121–129, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.007>.
41. Guzman M., Castro J. Zonal heterogeneity of the effects of chronic ethanol feeding on hepatic fatty acid metabolism. *Hepatology* 1990; 12(5): 1098–1105, <https://doi.org/10.1002/hep.1840120504>.
42. Tessari P., Coracina A., Cosma A., Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19(4): 291–302, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.12.015>.
43. Soto-Gutierrez A., Gough A., Vernetti L.A., Taylor D.L., Monga S.P. Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: the potential of microphysiology systems. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017; 242(16): 1605–1616, <https://doi.org/10.1177/1535370217707731>.
44. Shaw S. Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(5): 541–547, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90030-0).
45. Skala M.C., Ricking 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 U S A* 2007; 104(49): 19494–19499, <https://doi.org/10.1073/pnas.0708425104>.
46. Lukina M., Shirmanova M., Dudenkova V., Druzhkova I., Shumilova A., Zagaynova E. Analysis of energy metabolism of HeLa cancer cells in vitro and in vivo using fluorescence lifetime microscopy. In: *Proc. SPIE 9887, Biophotonics: photonic solutions for better health care V*. SPIE; 2016, <https://doi.org/10.1117/12.2227488>.
47. Shirmanova M.V., Lukina M.M., Lyubov' E.S., Kuimova M.K., Dudenkova V.V., Shcheslavskiy V.I., Zagaynova E.V. Probing energy metabolism and microviscosity in cancer using FLIM. In: *Proc. SPIE 10411, Clinical and preclinical optical diagnostics*. SPIE; 2017, <https://doi.org/10.1117/12.2287094>.
48. Varum S., Rodrigues A.S., Moura M.B., Momcilovic O., Easley C.A. IV, Ramalho-Santos J., Van Houten B., Schatten G. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 2011; 6(6): e20914, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020914>.
49. Folmes C.D., Nelson T.J., Martinez-Fernandez A.,

Arrell D.K., Lindor J.Z., Dzeja P.P., Ikeda Y., Perez-Terzic C., Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 2011; 14(2): 264–271, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.011>.

50. Meleshina A.V., Dudenkova V.V., Bystrova A.S., Kuznetsova D.S., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V. Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 15, <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0484-7>.

51. Lindros K.O., Penttilä K.E. Digitonin-collagenase perfusion for efficient separation of periportal or perivenous hepatocytes. *Biochem J* 1985; 228(3): 757–760, <https://doi.org/10.1042/bj2280757>.

52. Quistorff B. Gluconeogenesis in periportal and perivenous hepatocytes of rat liver, isolated by a new high-yield digitonin/collagenase perfusion technique. *Biochem J* 1985; 229(1): 221–226, <https://doi.org/10.1042/bj2290221>.

53. Katz N.R., Fischer W., Giffhorn S. Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue. *Eur J Biochem* 1983; 135(1): 103–107, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07623.x>.

54. Guzmán M., Castro J. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem J* 1989; 264(1): 107–113, <https://doi.org/10.1042/bj2640107>.

55. Guzmán M., Bijleveld C., Geelen M.J.H. Flexibility of zonation of fatty acid oxidation in rat liver. *Biochem J* 1995; 311(3): 853–860, <https://doi.org/10.1042/bj3110853>.