

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Якимов Борис Павлович

**Лазерная флуоресцентная спектроскопия эндогенных гетерогенных систем
флуорофоров в коже и её применение для биомедицинской диагностики**

01.04.21– лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители – *Фадеев Виктор Владимирович*
доктор физико-математических наук, профессор

Шишин Евгений Александрович
кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты – *Чикишев Андрей Юрьевич*
доктор физико-математических наук, профессор
профессор кафедры общей физики и волновых
процессов физического факультета, Московский
государственный университет имени М.В.
Ломоносова

Яценко Алексей Михайлович
доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник Центра фотоники и
фотонных технологий, Автономная
некоммерческая образовательная организация
высшего образования «Сколковский институт
науки и технологий»

Братченко Иван Алексеевич
кандидат физико-математических наук,
доцент кафедры лазерных и биотехнических
систем, ФГАОУ ВО «Самарский национальный
исследовательский университет имени
академика С.П. Королева»

Защита диссертации состоится «29» июня 2022 года в 16:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.01.13 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 62, корпус нелинейной оптики, аудитория им. С.А. Ахманова.

E-mail: diss.sov.31@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д.27), на сайте ИАС “ИСТИНА”: <https://istina.msu.ru/dissertations/457397136/>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.01.13,
кандидат физико-математических наук

А.А. Коновко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Диссертационная работа посвящена лазерной флуоресцентной спектроскопии систем, обладающих фотофизическими характеристиками, отличными от единичных эндогенных молекул-флуорофоров кожи – гетерогенных систем флуорофоров (ГСФ). К таким системам относится ряд объектов в организме человека, в частности, меланин, продукты окисления аминокислот, липидов, белков, продукты гликирования белков. В работе изучаются механизмы формирования флуоресцентного отклика ГСФ, а также разрабатываются лазерные методы их визуализации и детектирования для задач биомедицинской диагностики.

Актуальность. Применение лазерных методов диагностики, в частности, лазерной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для мониторинга состояния единичных клеток и биотканей является актуальной задачей биомедицины. Особенный интерес при этом представляет использование эндогенного флуоресцентного контраста, то есть получение флуоресцентного отклика от тех маркеров, которые исходно присутствуют в организме человека. Использование эндогенного контраста позволяет избежать проблемы токсичности, возникающей при применении экзогенных красителей, а также позволяет получить дополнительную информацию о процессах, происходящих в живых клетках и тканях [1].

В организме человека можно выделить флуорофоры, структура которых известна, а фотофизические характеристики укладываются в рамки стандартных представлений о свойствах единичных молекул. Максимум эмиссии флуоресценции таких флуорофоров не зависит (или слабо зависит) от длины волны возбуждающего излучения, в их спектре поглощения можно выделить характерную полосу с максимумом, связанным с переходом из основного в возбужденное состояние. Характерные для таких флуорофоров ширины полос поглощения и эмиссии составляют 50–100 нм, а величина Стоксова сдвига флуоресценции – 50–100 нм ($\sim 3000\text{--}6000\text{ см}^{-1}$) [2]. К эндогенным флуорофорам указанного типа можно отнести ароматические аминокислотные остатки белковых макромолекул, восстановленный никотинамиддинуклеотид (НАДН) и флавины, витамин А (ретинол), билирубин, протопорфирин-IX [1–3].

Можно также выделить группу эндогенных флуорофоров, фотофизические свойства которых существенно отличаются от вышеуказанных. Для этих флуорофоров положение максимума и квантовый выход флуоресценции существенно зависят от длины волны возбуждения. Флуоресценцию таких систем можно возбудить в широком диапазоне длин волн (от 300 до 800 нм), а их поглощение монотонно убывает с ростом длины волны в указанном спектральном диапазоне. К эндогенным флуорофорам, обладающим такими оптическими свойствами можно отнести меланин [4], структурные белки тканей (коллаген, эластин, кератин) [5], липофусцин [6], агрегаты белков [7], а также конечные продукты гликирования, образующиеся в результате неспецифического взаимодействия белковых макромолекул и сахаров [8].

Указанным системам присущи следующие свойства. Во-первых, они обладают гетерогенным молекулярным составом. Так, меланин состоит из большого числа молекул с различным химическим строением [9]. В ряде работ указывается, что флуоресценция структурных белков – коллагена, кератина, эластина – обусловлена гетерогенным по молекулярному составу набором флуорофоров, образующихся в результате процессов их окисления и гликирования [8]. Предполагается, что флуоресценция агрегатов и мономеров некоторых белковых макромолекул в видимом диапазоне спектра может быть связана с возникновением в их структуре продуктов окисления аминокислотных остатков [10]. Во-вторых, указанные системы обычно существуют в форме молекулярных агрегатов, в которых субъединицы находятся на расстоянии менее 1 нм, из-за чего электронное взаимодействие между отдельными молекулами флуорофорами в агрегате может существенно влиять на наблюдаемые оптические свойства. Системы, для которых типичны указанные выше свойства, мы далее будем называть гетерогенными системами флуорофоров (ГСФ), одновременно подразумевая гетерогенность их молекулярного состава и наличие в них молекулярных агрегатов.

Оптические свойства ГСФ, в частности, возможность возбуждения их флуоресцентного отклика в окне прозрачности биотканей (600–900 нм) [11], могут быть использованы для решения задач биомедицинской диагностики. Так, показано, что с помощью флуоресцентного отклика в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне возможна оценка содержания меланина в коже *in vivo* [12], обнаружение агрегатов белков, накапливающихся при нейродегенеративных заболеваниях [13], визуализация паразитовидной железы [14]. Флуоресцентный отклик с возбуждением в ближнем ИК диапазоне может также служить диагностическим маркером при классификации здоровых и пораженных раковой опухолью тканей [15].

В большинстве случаев при решении задач биомедицинской диагностики флуоресцентный отклик ГСФ используется исключительно феноменологически, а механизмы его формирования не являются установленными. Исследование механизмов формирования оптических свойств ГСФ представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес, поскольку понимание фотофизических процессов в них может позволить увеличить чувствительность и селективность детектирования ГСФ, а также анализировать их структурные свойства, в том числе, *in vivo*.

Степень разработанности темы исследования.

Активная разработка новых методов лазерной флуоресцентной диагностики биологических тканей в видимом и ближнем ИК диапазоне стимулировала развитие теоретических представлений и реализацию экспериментальных верификаций механизмов формирования оптических свойств ГСФ. Можно выделить два класса гипотез о формировании оптических свойств ГСФ. В рамках первого класса гипотез предполагается, что наблюдаемые оптические свойства ГСФ являются результатом усреднения оптических свойств невзаимодействующих молекулярных флуорофоров и хромофоров, присутствующих в системе. Напротив, в рамках второго класса гипотез считается,

что наблюдаемые оптические свойства в первую очередь являются следствием межмолекулярного электронного взаимодействия между молекулами-флуорофорами в составе ГСФ, которое приводит к существенному изменению свойств спектров поглощения и флуоресценции ГСФ в сравнении с единичными молекулярными флуорофорами.

В зависимости от конкретной ГСФ исследователи придерживаются различных гипотез, объясняющих, по сути, идентичные закономерности, проявляющиеся в их спектрах поглощения и флуоресценции. Так, для меланина в литературе в одинаковой мере представлены как гипотезы, объясняющие его оптические свойства усреднением оптических свойств невзаимодействующих молекулярных флуорофоров [16], так и гипотезы, рассматривающие свойства поглощения и флуоресценции меланина с точки зрения электронного взаимодействия между флуорофорами в супрамолекулярных агрегатах [17] (то есть, используются оба класса гипотез). Для мономеров и агрегатов белковых макромолекул наличие бесструктурного поглощения и флуоресценции в видимой области спектра объясняют образованием внутри- и межмолекулярных комплексов с переносом заряда [7] (второй класс гипотез). Флуоресцентные свойства структурных белков и конечных продуктов гликирования белков обычно рассматривают с точки зрения модели невзаимодействующих флуорофоров [18] (первый класс гипотез).

На настоящий момент в литературе не представлено общего рассмотрения ГСФ как систем, обладающих схожими оптическими характеристиками и имеющих одинаковые механизмы формирования флуоресцентных свойств. При этом в большинстве работ используются косвенные экспериментальные методы, не позволяющие однозначно установить механизмы формирования оптических свойств ГСФ. Только в небольшом числе работ используются методы кинетической лазерной спектроскопии [19], позволяющие исследовать динамику релаксации возбужденных состояний на различных временных масштабах, а процессы затухания флуоресценции ГСФ на фемтосекундном временном масштабе вовсе не были исследованы. Применение методов лазерной флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением для исследования оптических свойств ГСФ и использование оптических свойств ГСФ для биомедицинской диагностики, таким образом, является актуальным направлением исследований, имеющим фундаментальное и прикладное значение, что и мотивировало постановку цели и задач данной работы.

Целью диссертационной работы является исследование методами лазерной спектроскопии механизмов формирования флуоресцентного отклика ГСФ и создание лазерных методов визуализации и детектирования ГСФ для решения задач биомедицинской диагностики.

Для достижения указанной цели в рамках настоящей работы были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Методами оптической спектроскопии, в том числе, лазерной флуоресцентной спектроскопии, исследовать взаимосвязь фотофизических характеристик репрезентативных ГСФ с их структурными свойствами.

2. Исследовать процессы релаксации возбужденного состояния в ГСФ на пикосекундном и наносекундном временных масштабах и установить механизм возникновения сверхбыстрой компоненты с характерным временем 1 пс в кинетике затухания флуоресценции ГСФ.

3. Разработать методы лазерной визуализации и анализа свойств ГСФ в единичных клетках и в коже человека *in vivo*.

Научная новизна работы состоит в следующем:

- Методами лазерной спектроскопии и микроскопии впервые показана общность фотофизических свойств – спектральных характеристик, параметров кинетики релаксации возбуждения и их зависимости от размера супрамолекулярных агрегатов в системе – для широкого круга гетерогенных систем флуорофоров, присутствующих в коже: меланина, водных растворов продуктов фотоокисления триптофана, продуктов гликирования белковых макромолекул.
- Впервые показана взаимосвязь параметров поглощения в диапазоне длин волн 400–700 нм с гетерогенностью молекулярного состава и средним размером частиц в ГСФ.
- Методом лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением обнаружено наличие сверхбыстрой компоненты с характерным временем 1 пс в кинетике затухания флуоресценции ГСФ в широком диапазоне длин волн и спектральной диффузии мгновенного спектра флуоресценции ГСФ в длинноволновую область спектра на масштабе времен 0–10 пс.
- Методом лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением выявлено отсутствие деполяризации флуоресцентного отклика ГСФ на пикосекундном масштабе времени (0–100 пс); показана зависимость вклада компоненты с характерным временем 1 пс в кинетику затухания флуоресценции от полярности растворителя. Полученные результаты позволили сделать вывод о возможности описать параметры кинетики затухания флуоресценции ГСФ моделью невзаимодействующих флуорофоров.
- Впервые показана возможность определения профиля распределения содержания меланина в коже *in vivo* по глубине с использованием метода лазерной конфокальной микроспектроскопии путем анализа спектров флуоресцентного отклика меланина при возбуждении на 785 нм и спектров комбинационного рассеяния кожи. Впервые показана взаимосвязь интенсивности флуоресценции кожи, возбуждаемой в ИК диапазоне спектра, и вклада меланина в спектры комбинационного рассеяния. Показано, что флуоресценция кожи, возбуждаемая в инфракрасном диапазоне спектра, определяется не только наличием меланина, но и продуктами окисления белковых макромолекул.

- Впервые показана возможность использования интенсивности флуоресцентного отклика и параметров кинетики затухания флуоресценции ГСФ, определяемых с помощью однофотонной и двухфотонной лазерной конфокальной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции для их селективного детектирования в единичных клетках и коже.
- Впервые установлена взаимосвязь между изменением молекулярного состава меланина в коже человека *in vivo*, проявляющимся в изменении отношения интенсивностей полос с положением максимумов на 1380 см^{-1} и 1570 см^{-1} в спектрах комбинационного рассеяния меланина, со свойствами его флуоресцентного отклика. Установлено, что отношение интенсивностей полос комбинационного рассеяния на 1380 см^{-1} и 1570 см^{-1} отрицательно скоррелировано со Стоксовым сдвигом спектра флуоресценции, возбуждаемой на 785 нм и детектируемой в диапазоне $810\text{--}950\text{ нм}$.
- Верифицирована процедура выделения вкладов молекулярных компонент в спектры комбинационного рассеяния кожи с помощью метода неотрицательной матричной факторизации. Продемонстрирована возможность выделения новых (не включенных в стандартные библиотеки) спектральных компонент при анализе данных микроспектроскопии комбинационного рассеяния кожи.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в развитии представлений о свойствах флуоресцентного отклика эндогенных флуорофоров в коже и механизмах формирования флуоресцентного отклика ГСФ, в том числе, кинетики затухания флуоресценции, детектируемой с помощью фемтосекундной лазерной спектроскопии и микроскопии. Обнаруженные эффекты, связанные с отсутствием деполяризации флуоресценции ГСФ на пикосекундном временном масштабе, зависимости сверхбыстрой компоненты от полярности растворителя и наличия сверхбыстрой компоненты для молекулярной фракции ГСФ с размером менее 1 кДа свидетельствуют о возможности описать свойства кинетики затухания флуоресценции ГСФ моделью усреднения оптических свойств невзаимодействующих флуорофоров.

Выявленная методами лазерной спектроскопии общность оптических свойств ГСФ позволяет предположить природу источников флуоресценции в биотканях, обладающих флуоресцентным откликом, возбуждаемым в красной и ближней инфракрасной области спектра. Такими источниками являются гетерогенные продукты окисления и гликирования белков, аминокислот, липидов. Разработанные лазерные методы анализа свойств меланина в коже *in vivo* по данным спектроскопии комбинационного рассеяния, его двухфотонной флуоресценции и однофотонной флуоресценции в ИК области спектра могут быть использованы не только для определения содержания меланина, но и для анализа его молекулярной организации, что может быть использовано для диагностики патологических процессов, в которые вовлечен меланин.

Методология и методы исследования. Для исследования механизмов формирования оптических свойств ГСФ были использованы три модельные системы – водные растворы меланина, водные растворы продуктов фотоокисления аминокислоты триптофана, полученные путём облучения растворов триптофана ультрафиолетовым (УФ) излучением с длиной волны 254 нм, и гликированного модельного белка (альбумина). Исследование стационарных и время-разрешенных оптических свойств модельных систем было проведено с помощью спектроскопии поглощения и флуоресценции с возбуждением в ближнем УФ и видимом диапазоне, лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным и пикосекундным временным разрешением, разрешением по длине волны эмиссии и возможностью анализировать поляризацию флуоресцентного отклика. Исследование взаимосвязи оптических и структурных свойств ГСФ было проведено с помощью метода масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием.

Для исследования возможности наблюдения отклика гетерогенных систем флуорофоров в единичных клетках и биотканях *in vivo* были использованы: лазерная конфокальная микроскопия с визуализацией времени затухания флуоресценции с однофотонным и двухфотонным возбуждением в видимом диапазоне спектра и детектированием в видимом и ближнем ИК диапазоне спектра, лазерная микроспектроскопия комбинационного рассеяния с возбуждением в ближнем ИК диапазоне, проточная цитометрия с мультиспектральным возбуждением и детектированием флуоресценции в видимом диапазоне спектра. В качестве объектов исследования были использованы клетки иммортализованной клеточной линии кератиноцитов человека и кожа внутренней стороны предплечья человека *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В кинетике затухания флуоресценции эндогенных гетерогенных систем флуорофоров (меланина, продуктов окисления аминокислот и гликирования белков), детектируемой с помощью лазерной фемтосекундной спектроскопии, присутствует сверхбыстрая компонента со временем ~ 1 пс на всех длинах волн эмиссии, не свойственная эндогенным молекулам-флуорофорам кожи. Данная компонента связана с возбуждением сигнала флуоресценции набора спектрально различающихся флуорофоров гетерогенной системы, для которых имеет место сверхбыстрая ориентационная релаксация молекул растворителя после возбуждения.

2. Кинетика анизотропии и релаксации флуоресценции гетерогенных систем флуорофоров на масштабе времён от 150 фс до 1 пс после возбуждения описывается моделью невзаимодействующих флуорофоров.

3. Лазерная конфокальная микроспектроскопия позволяет селективировать отклик эндогенных гетерогенных систем флуорофоров в коже по времени затухания двухфотонно возбуждаемой флуоресценции и наличию однофотонно возбуждаемого флуоресцентного отклика в красной и ближней инфракрасной области спектра, не наблюдающегося у эндогенных молекул-флуорофоров кожи.

4. Положение максимума эмиссии инфракрасной флуоресценции меланина, детектируемой с помощью лазерной конфокальной микроспектроскопии комбинационного рассеяния в коже *in vivo*, связано с особенностями молекулярной структуры меланина, проявляющимися в спектре его комбинационного рассеяния.

Достоверность результатов обусловлена повторяемостью и воспроизводимостью представленных экспериментальных данных, полученных с использованием современного лабораторного оборудования, и описанных с использованием современных методов обработки данных. Доклады по теме диссертационной работы прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях, публикации по теме диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены соискателем на научных семинарах кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на российских и международных научных конференциях.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 6 печатных работах в рецензируемых журналах, входящих в базы данных Web of Science, Scopus, RSCI. Список публикаций приводится в конце автореферата.

Результаты диссертационной работы были представлены в 9 докладах на российских и международных конференциях: Saratov Fall Meeting 2019: VII Symposium on Optics & Biophotonics (Саратов, Россия), Towards Optical and Multimodality Translational Imaging 2020 (Саратов, Россия), I Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды (Дагомыс, Россия), ALT'21 The 28th International Conference on Advanced Laser Technologies (Москва, Россия), Saratov Fall Meeting 2020: VIII Symposium on Optics & Biophotonics (Саратов, Россия), UltrafastLight-2021 (Москва, Россия), Ivth Sechenov International Biomedical Summit (SIBS2020) (Москва, Россия), Vth Sechenov International Biomedical Summit (SIBS 2021) (Москва, Россия), Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (PIBM 2021) (Хайкоу, Китай).

Личный вклад автора. Все теоретические и экспериментальные результаты, представленные в диссертационной работе, либо получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники Физического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Публикации по теме диссертационной работы были написаны при определяющем участии автора.

В работах (1, 2) из списка публикаций по теме диссертации автором экспериментально установлено наличие сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции в гетерогенных продуктах окисления аминокислот, проведен

анализ параметров сверхбыстрой кинетики затухания флуоресценции образующихся ГСФ. Вклад автора в работы (1, 2), составляет не менее 50%. В работе (3) из списка публикаций по теме диссертации автором были получены экспериментальные результаты по флуоресцентному отклику ГСФ в единичных клетках кожи, построены модели анализа кинетики затухания флуоресценции и параметров интенсивности флуоресцентного отклика клеток при индуцировании в них окислительного стресса. Личный вклад автора в работу (3) составляет 50%. В работах (4, 5) автором экспериментально исследована возможность определения содержания меланина в коже по флуоресцентному отклику и параметрам комбинационного рассеяния. Построены статистические модели, связывающие флуоресцентный отклик с параметрами спектров комбинационного рассеяния меланина, исследована применимость модели неотрицательной матричной факторизации для выделения вклада меланина в спектр КР. Личный вклад автора в работу (4) составляет 60%, (5) – 50%. В работе (6) автором приведен обзор исследований меланина с помощью методов нелинейной оптики, личный вклад в работу составляет 40%.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, заключения и списка цитированной литературы. Работа содержит 170 страниц, 37 иллюстраций и 167 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** описывается актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования, формулируются цели и задачи работы, её научная новизна, теоретическая и практическая значимость, обоснованность и достоверность полученных результатов, формулируются положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о публикациях, апробации результатов и структуре диссертации.

Глава 1 «Обзор литературы». В начале Главы 1 представлен краткий обзор лазерных методов диагностики, применяемых в биомедицинских исследованиях, установлено место методов лазерной флуоресцентной микроскопии и спектроскопии среди них. Описаны основные эндогенные, то есть исходно присутствующие, флуорофоры в организме человека.

Среди эндогенных флуорофоров выделено две подгруппы, различающиеся по своим фотофизическим характеристикам. К первой подгруппе флуорофоров отнесены эндогенные флуорофоры с известным молекулярным строением и механизмами формирования фотофизических характеристик – ароматические остатки белковых макромолекул, восстановленная форма никотинамиддинуклеотида (НАДН), флавины, билирубин и др. Ко второй подгруппе отнесены флуорофоры, оптические свойства которых существенным образом отличаются от свойств единичных молекул-флуорофоров в коже. Для флуорофоров второй группы возбуждение флуоресценции возможно в широком диапазоне длин волн (от 300 нм до 800 нм), при этом положение максимума эмиссии и квантовый выход флуоресценции зависят от длины волны возбуждения. Поглощение таких флуорофоров не имеет локальных максимумов и экспоненциально спадает с ростом длины волны в диапазоне 400–800 нм. Исходя из литературных данных, к таким эндогенным флуорофорам отнесены меланин, структурные белки тканей (коллаген, эластин, кератин), липофусцин, агрегаты белков и некоторые единичные белки, а также конечные продукты гликирования белковых макромолекул. Далее в работе под гетерогенными системами флуорофоров (ГСФ) подразумевают флуорофоры второй подгруппы.

В главе рассматриваются основные гипотезы, описывающие механизмы формирования бесструктурного спектра поглощения и флуоресценции ГСФ в видимом и ближнем ИК диапазонах спектра, а также способы их верификации методами лазерной спектроскопии. Поскольку всем перечисленным объектам свойственны гетерогенность молекулярного состава, то есть наличие молекул с различным химическим строением, и тенденция образовывать супрамолекулярные агрегаты, можно выделить две основные гипотезы формирования оптических свойств ГСФ. В рамках первой гипотезы предполагается, что наблюдаемые свойства поглощения и флуоресценции ГСФ являются результатом усреднения оптических свойств невзаимодействующих флуорофоров, обладающих различными структурными и оптическими характеристиками. В рамках второй гипотезы, напротив, предполагается, что наблюдаемые оптические характеристики ГСФ обусловлены межмолекулярным электронным взаимодействием между молекулами-флуорофорами системы, которое приводит к изменению оптических свойств ГСФ в сравнении с

молекулами-флуорофорами, при этом гетерогенность химического состава имеет второстепенное значение. Обсуждаются экспериментальные и теоретические факты, подтверждающие и противоречащие вышеуказанным гипотезам для меланина, липофусцина, агрегатов и мономеров белков и их продуктов окисления и гликирования, а также возможности методов лазерной спектроскопии и микроскопии в исследовании ГСФ. Обсуждаются представленные в литературе применения флуоресцентного отклика ГСФ для решения задач биомедицинской диагностики.

Глава 2 «Лазерная флуоресцентная спектроскопия гетерогенных систем флуорофоров: исследование механизмов формирования оптических свойств». Глава посвящена исследованию свойств и механизмов формирования фотофизических характеристик ГСФ. В начале главы приводится описание объектов и методов исследования, используемых в работе. Исследование оптических свойств ГСФ проводилось для трёх систем:

- 1) меланина, выделенного из *Sepia Officinalis*, поскольку его свойства как гетерогенной системы на настоящий момент являются наиболее изученными, при этом для меланина в ряде работ предполагается существенная роль межмолекулярного электронного взаимодействия в формировании его оптических свойств [17];
- 2) водных растворов гетерогенных продуктов фотоокисления триптофана, образующихся в результате облучения раствора L-триптофана с помощью УФ-излучения на длине волны 254 нм, как модели продуктов окисления аминокислотных остатков белковых макромолекул [10] (далее – продукты фотоокисления триптофана);
- 3) конечных продуктов гликирования модельного белка (бычьего сывороточного альбумина), формирующихся в результате взаимодействия белка с фруктозой при повышенной температуре – системы, для которой в литературе предполагается формирование флуоресцентного отклика за счёт усреднения свойств отдельных невзаимодействующих флуорофоров, образующихся в результате реакции гликирования [18] (далее – продукты гликирования белка).

Исходные молекулы-прекурсоры – аминокислота триптофан и бычий сывороточный альбумин – не обладают поглощением и флуоресценцией в спектральном диапазоне 400–800 нм.

Для исследуемых систем была установлена общность свойств спектров поглощения и флуоресценции. Было получено, что величина поглощения A продуктов фотоокисления триптофана и конечных продуктов гликирования белка аналогично поглощению меланина в диапазоне 400–800 нм экспоненциально спадает с увеличением длины волны λ (рисунок 1А) и может быть параметризована зависимостью (1):

$$A(\lambda) = A_0 \exp\left(-\lambda/\Lambda\right), \quad (1)$$

где A_0 – предэкспоненциальный множитель, Λ – обратный спектральный наклон поглощения. Определенная по спектральному диапазону 400–800 нм с использованием формулы (1) величина Λ составила 109.60 ± 0.12 нм для меланина, 82.9 ± 0.5 нм для продуктов фотоокисления триптофана и 68.9 ± 0.3 нм для продуктов гликирования белка.

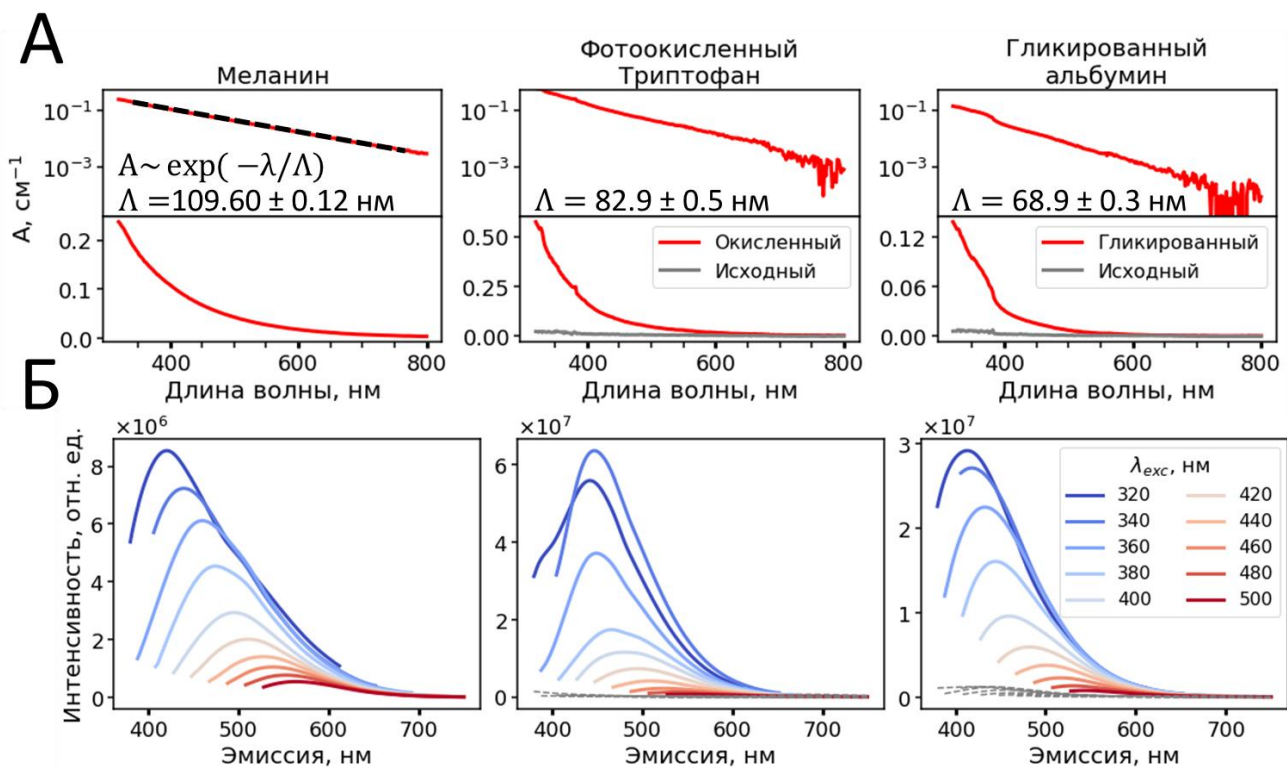


Рисунок 1 – А) Спектры поглощения растворов меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка в полулогарифмическом (верхний ряд) и линейном масштабе (нижний ряд). Поглощение в видимом и ближнем ИК диапазоне экспоненциально снижается с ростом длины волны. На рисунках приведен параметр обратного спектрального наклона поглощения в полулогарифмическом масштабе Λ , определенный по диапазону длин волн 400–800 нм. Б) Спектры флуоресценции меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка для различных длин волн возбуждения λ_{exc} .

Было установлено, что исследуемые объекты обладают схожими флуоресцентными свойствами (рисунок 1Б): при увеличении длины волны возбуждения наблюдается сдвиг полосы флуоресценции в длинноволновую область, при этом квантовый выход флуоресценции уменьшался в ~ 5 – 10 раз при увеличении длины волны возбуждения с 320 нм до 500 нм. Показано, что, аналогично спектрам флуоресценции меланина, положение максимума спектра флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка линейно возрастает с ростом длины волны возбуждения. При этом положение максимума эмиссии возрастает так, что при возбуждении флуоресцентного отклика на 320 нм величина Стоксова сдвига составляет $\sim 8000 \text{ см}^{-1}$, а на длине волны возбуждения 500 нм – $\sim 2000 \text{ см}^{-1}$.

В работе была исследована взаимосвязь параметров эмиссии флуоресценции с величиной спектрального наклона поглощения Λ . Было установлено, что положение максимума эмиссии флуоресценции в видимом диапазоне увеличивается с ростом показателя Λ для исследованных систем, в то время как квантовый выход флуоресценции убывает. Было получено, что флуоресцентный отклик исследуемых систем может быть возбужден в красной области спектра, в частности, при возбуждении на 640 нм и детектировании в диапазоне 660–720 нм, что было подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции.

На примере гетерогенных продуктов фотоокисления триптофана была исследована взаимосвязь оптических свойств ГСФ и молекулярного состава системы. Для этого параметры стационарного поглощения в диапазоне 300–700 нм для образцов триптофана, окисленных УФ-излучением различной дозы (~ 15 – 100 Дж/см³), были соотнесены с результатами масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса, позволяющей определять присутствующие в образце молекулярные соединения в диапазоне масс 200–700 Да с разрешением < 0.01 Да и динамическим диапазоном $> 10^5$. Было установлено, что в результате фотоокисления в образцах триптофана образуются новые молекулярные соединения (с различными молекулярными формулами) с массой в диапазоне 200–700 Да, при этом число новых молекулярных формул с относительным вкладом в детектируемый масс-спектр более 1% увеличивается в результате фотоокисления с 50 для дозы облучения 15 Дж/см³ до ~ 400 для дозы облучения 100 Дж/см³ и линейно коррелирует со средним значением величины поглощения в диапазоне 300–700 нм (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.96$, $p = 0.002$), а также с изменением спектрального наклона поглощения Λ (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0.94$, $p = 0.005$). Таким образом, с ростом длительности облучения наблюдалось возникновение “химического беспорядка” – большого числа различных молекулярных формул, которое сопровождало возникновение поглощения и флуоресценции в видимой области спектра в ГСФ, не наблюдавшихся у исходных молекул-прекурсоров.

На примере продуктов фотоокисления триптофана была изучена взаимосвязь параметров супрамолекулярных агрегатов в ГСФ с их оптическими свойствами. С помощью метода лазерной микроскопии светового листа, позволяющего детектировать сигнал упругого рассеяния, возбуждаемого на длине волны 405 нм, было продемонстрировано, что в исследуемой системе присутствуют супрамолекулярные агрегаты, не присутствующие в исходном растворе. Были исследованы флуоресцентные свойства фракций продуктов фотоокисления триптофана с молекулярной массой более 3 кДа и менее 3 кДа. Было обнаружено, что как в низкомолекулярной фракции с размером менее 3 кДа, так и в растворе фракции исследуемого образца с размерами более 3 кДа наблюдается бесструктурное поглощение и флуоресцентный отклик, возбуждаемый в видимом диапазоне спектра. При этом было установлено, что в зависимости от средней молекулярной массы значительным образом изменяется обратный спектральный наклон поглощения Λ – для фракции с размером менее 3 кДа спектральный наклон Λ составил 65.5 ± 0.8 нм, в то время как для фракции с

размером более 3 кДа значение Λ составляло 183.3 ± 2.6 нм. Было обнаружено, что квантовый выход флуоресценции низкомолекулярной фракции (< 3 кДа) в несколько раз превышал квантовый выход флуоресценции супрамолекулярной фракции (> 3 кДа) – для флуоресцентного отклика с возбуждением на 400 нм отношение квантовых выходов флуоресценции малой и крупной фракции продуктов фотоокисления триптофана составило ~ 6.2 . Таким образом, было показано, что бесструктурное поглощение и флуоресцентный отклик в видимом диапазоне наблюдается как для низкомолекулярной, так и для супрамолекулярной фракции ГСФ с размерами более 3 кДа, при этом основной вклад во флуоресцентный отклик вносит низкомолекулярная фракция ГСФ.

В супрамолекулярных агрегатах, присутствующих в ГСФ, среднее расстояние между отдельными флуорофорами существенно меньше (менее 1 нм), чем расстояние между молекулами-флуорофорами в растворе (~ 10 нм при концентрации флуорофора в растворе порядка 1 мМ). Малое расстояние между флуорофорами в агрегате может приводить к существенному электронному взаимодействию между ними, в частности, к переносу энергии электронного возбуждения между флуорофорами, существенно изменяющему оптические свойства системы в сравнении с оптическими свойствами отдельных не взаимодействующих молекулярных флуорофоров. В случае переноса возбуждения от доноров, поглощающих и излучающих в коротковолновой части спектра, на акцепторы, поглощающие и излучающие в длинноволновой части спектра, скорость дезактивации возбужденного состояния доноров должна быть выше за счёт дополнительного канала дезактивации, связанного с переносом энергии, что должно приводить к спектральной миграции флуоресценции на временном масштабе, соответствующем переносу энергии. Для проверки данной гипотезы для исследуемых ГСФ была изучена кинетика релаксации флуоресценции на пикосекундном масштабе (0–500 пс) с разрешением ~ 150 фс и на наносекундном масштабе (0–10 нс) с разрешением ~ 150 пс при возбуждении на 400 нм и детектировании сигнала эмиссии на различных длинах волн в диапазоне 430–600 нм.

Для исследования кинетики затухания флуоресценции с фемтосекундным разрешением был использован метод оптического стробирования флуоресценции (ап-конверсии флуоресценции), в котором сигнал, возбужденный импульсным излучением, сбивается на нелинейном кристалле с лазерным импульсом стробирующего излучения на частоте ω , прошедшим через систему задержки, после чего детектируется сигнал на суммарной частоте (ω_{sum}) сигналов флуоресценции (ω_{fl}) и стробирующего импульса (ω) – $\omega_{sum} = \omega + \omega_{fl}$. В таком случае временное разрешение метода ограничено характерной длительностью импульса стробирующего излучения и существенно превышает временные разрешения, получаемые с помощью других способов измерения кинетики затухания флуоресценции. Принципиальная схема экспериментальной установки представлена на рисунке 2. Кривые затухания флуоресценции на наносекундном масштабе с разрешением ~ 150 пс были измерены с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов.

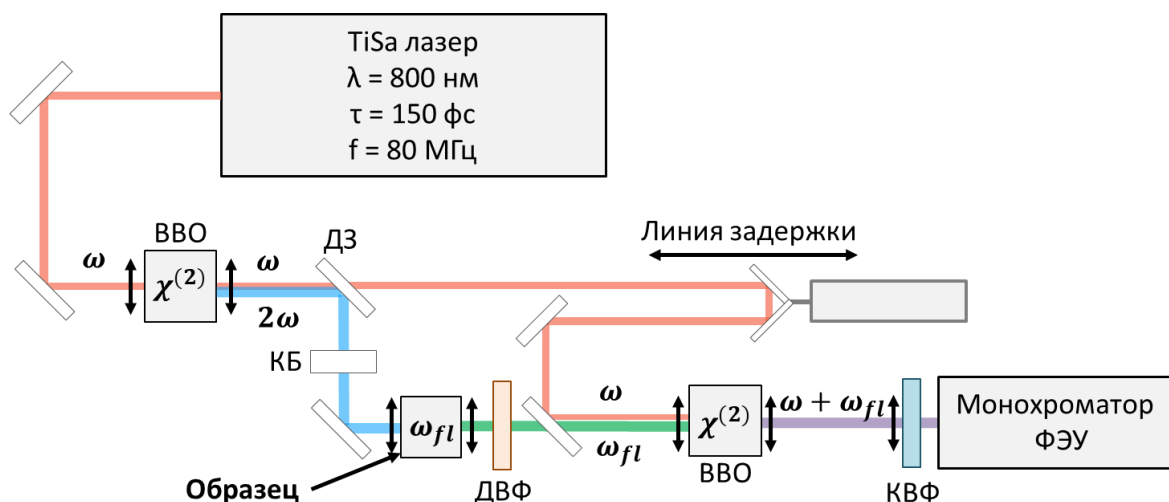


Рисунок 2 – Принципиальная схема установки, реализующей метод измерения кинетики затухания флуоресценции с фемтосекундным разрешением с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. КБ – компенсатор Берека, используемый для контроля поляризации возбуждающего излучения, ДВФ – длинноволновой фильтр, ослабляющий сигнал импульса, возбуждающего флуоресценцию, КВФ – коротковолновый фильтр, ослабляющий фоновую засветку от стробирующего импульса, ВВО – нелинейные кристаллы бета-бората бария, используемые для генерации сигналов на удвоенной и суммарной частоте.

Результаты измерения кинетики затухания флуоресценции ГСФ представлены на рисунке 3А. Было установлено, что на пикосекундном и наносекундном масштабах времени в исследуемых образцах кинетика затухания флуоресценции имеет немонотонный закон затухания. Кинетики затухания флуоресценции, детектируемые с фемтосекундным временным разрешением в интервале 0–500 пс, были аппроксимированы мультиэкспоненциальным законом затухания с тремя компонентами, имеющими порядок времён $\tau_1 \sim 1$ пс, $\tau_2 \sim 10$ пс и $\tau_3 \sim 100$ пс, с характерными амплитудами $a_1 \sim 50\text{--}70\%$, $a_2 \sim 20\text{--}30\%$ и $a_3 \sim 10\%$. Аналогично, кинетики затухания флуоресценции, детектируемые с пикосекундным временным разрешением также обладали немонотонным затуханием с временами порядка $\tau_1 \sim 0.5\text{--}1$ нс, $\tau_2 \sim 2\text{--}3$ нс и $\tau_3 \sim 10$ нс и амплитудами компонент $a_1 \sim 50\%$, $a_2 \sim 30\text{--}40\%$ и $a_3 \sim 10\%$ соответственно.

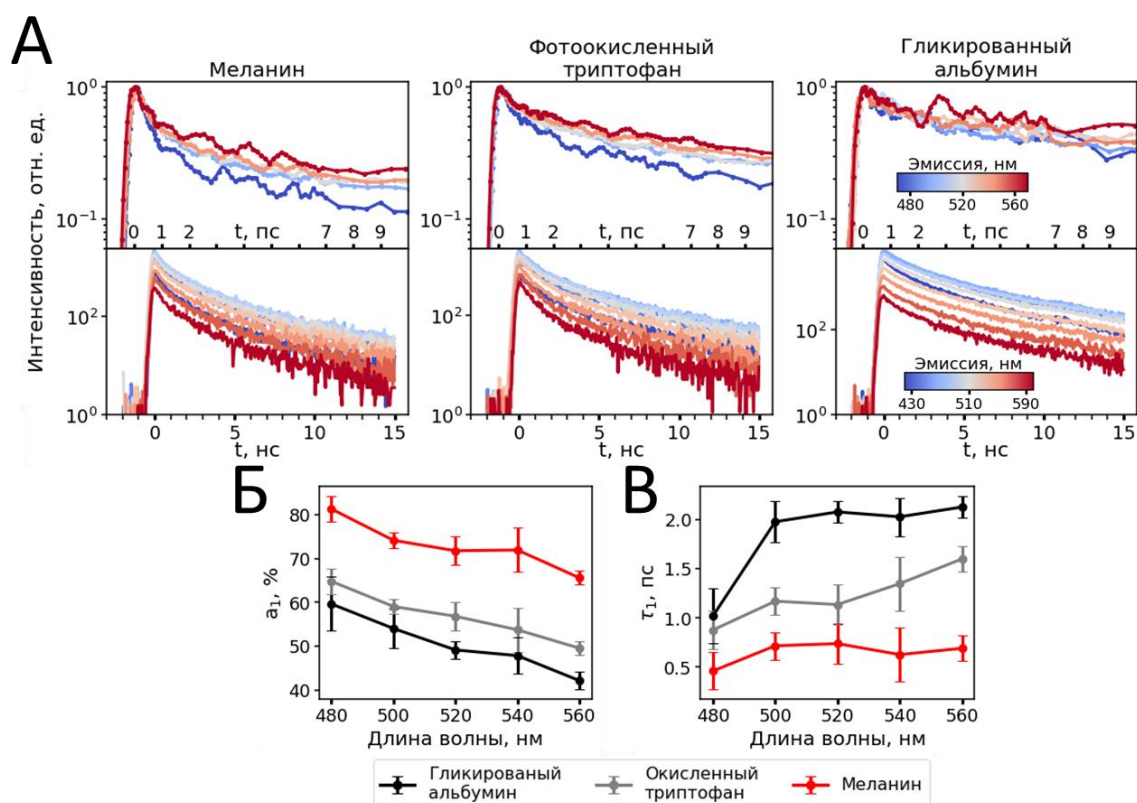


Рисунок 3 – Результаты измерения кинетики затухания флуоресценции для меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка (альбумина). А) (верхняя панель) Кинетики затухания флуоресценции, полученные с помощью метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение ~ 150 фс) с возбуждением эмиссии на 400 нм и детектированием в диапазоне 480–560 нм (шаг 20 нм). (Нижняя панель) кинетики затухания флуоресценции, полученные с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов (временное разрешение ~ 150 пс) с возбуждением эмиссии на 405 нм и детектированием сигнала в диапазоне 430–600 нм. Б, В) Зависимость амплитуды (Б) и времени затухания (В) сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка от длины волны эмиссии.

Было установлено, что времена затухания флуоресценции и амплитуды вкладов компонент зависят от длины волны эмиссии как для кинетик затухания флуоресцентного отклика наблюдаемого на пикосекундном временном масштабе, так и для компонент затухания, проявляющихся на масштабе наносекунд. Выраженной при этом является спектральная зависимость амплитуды a_1 и среднего времени затухания компоненты со временем затухания $\tau_1 \sim 1$ пс, не наблюдающейся в широком диапазоне длин волн эмиссии у эндогенных молекул-флуорофоров кожи (далее «сверхбыстрая компонента»). Было обнаружено, что амплитуда сверхбыстрой компоненты при увеличении длины волны эмиссии с 480 до 560 нм убывает на 15–20% (рисунок 3Б), а время затухания данной компоненты возрастает в 1.5–2 раза (рисунок 3В), что приводит к смещению эмиссии из синей в красную область спектра на масштабе 0–10 пс. При этом

спектральной миграции эмиссии флуоресценции не наблюдается на наносекундном масштабе. Было установлено, что величина обратного спектрального наклона поглощения Λ положительно скоррелирована с амплитудой сверхбыстрой компоненты a_1 и отрицательно скоррелирована со временем затухания τ_1 .

Обнаруженная спектральная миграция возбуждения на интервале 0–10 пс может являться индикатором переноса энергии в системе, то есть свидетельствовать в пользу влияния межмолекулярного электронного взаимодействия на флуоресцентные свойства ГСФ. Далее в работе была исследована возможная обусловленность сверхбыстрой компоненты релаксации возбуждения переносом энергии в системе.

Экспериментально методами лазерной спектроскопии было установлено, что сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции не связана с некогерентным переносом возбуждения по диполь-дипольному механизму. Данный факт был доказан в экспериментах по исследованию кинетики анизотропии флуоресценции на масштабе 0–100 пс, измеренной с временным разрешением ~ 150 фс. Анизотропия флуоресценции $r(t)$ – безразмерная величина, характеризующая величину деполяризации флуоресценции при возбуждении линейно-поляризованным светом, рассчитываемая по формуле (2):

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (2)$$

где I_{\parallel} , I_{\perp} – интенсивности флуоресцентного отклика, с поляризацией параллельной и ортогональной поляризации возбуждающего излучения соответственно. В случае значимого вклада некогерентного переноса энергии в релаксацию возбуждения на пикосекундном масштабе, величина анизотропии флуоресценции должна была бы экспоненциально уменьшаться со временем, соответствующим характерному времени переноса возбуждения, за счёт того, что дипольные моменты флуорофоров-доноров и флуорофоров-акцепторов обычно не полностью сонаправлены [20]. Однако наблюдалось, что на интервале 0–100 пс величина анизотропии флуоресценции не изменяется, что говорит об отсутствии связи сверхбыстрой компоненты релаксации флуоресценции в ГСФ с межмолекулярным переносом энергии по диполь-дипольному механизму. На рисунке 4А представлен пример кинетики затухания анизотропии флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана.

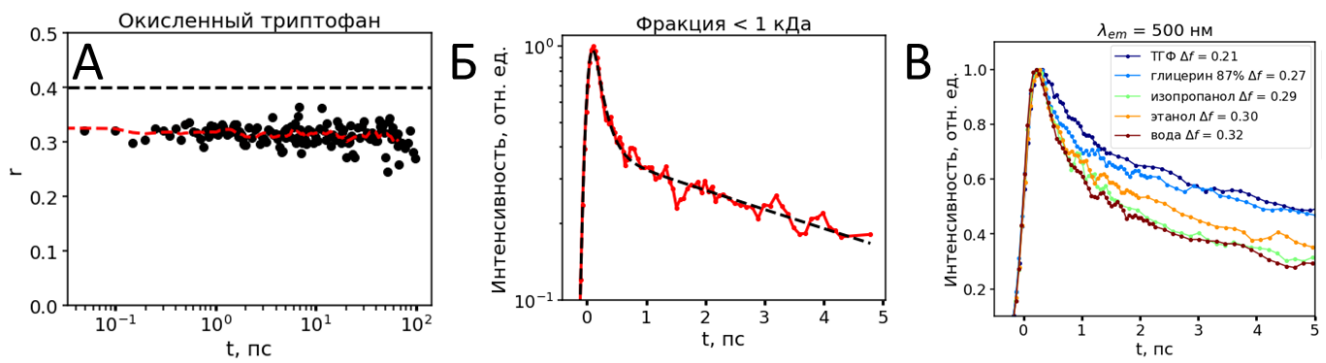


Рисунок 4 – А) Кинетика анизотропии флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана. Б) Кинетика затухания флуоресценции для молекулярной фракции продуктов фотоокисления триптофана с массой менее 1 кДа. В) Кинетика затухания флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана в растворителях с различной полярностью. Детектирование эмиссии флуоресценции производилось на длине волны 500 нм при возбуждении на 400 нм.

Отсутствие некогерентного переноса энергии по диполь-дипольному механизму на пикосекундном масштабе в исследуемых ГСФ также было подтверждено в экспериментах по исследованию кинетики затухания флуоресцентного отклика для фракции образцов с размером менее 1 кДа (менее ~1.5 нм), полученных с помощью фильтрации через мембранные фильтры. Фракция с массой менее 1 кДа не содержит крупных супрамолекулярных агрегатов, следовательно, перенос возбуждения возможен только между единичными молекулами-флуорофорами, расстояние между которыми в растворе может быть оценено по порядку из исходной концентрации прекурсора как ~10 нм, что должно приводить к переносу энергии по диполь-дипольному механизму на наносекундном масштабе. При этом для молекулярной фракции ГСФ с размером менее 1 кДа наблюдался существенный вклад сверхбыстрой компоненты в кинетику затухания флуоресценции (рисунок 4Б). Данный факт указывает на то, что сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции не связана с переносом энергии, а связана со свойствами единичных молекул-флуорофоров в исследуемых гетерогенных системах.

Было также обнаружено, что параметры флуоресцентного отклика ГСФ существенным образом зависят от полярности растворителя Δf , оцененной по формуле Липперта-Матаги [2] (3):

$$\Delta f = \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right), \quad (3)$$

где ε – стационарная диэлектрическая проницаемость растворителя, n – показатель преломления растворителя. Установлено, что положение максимума эмиссии флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана возрастает с увеличением полярности растворителя. Увеличение полярности растворителя Δf приводит к увеличению амплитуды a_1 и уменьшению времени затухания флуоресценции τ_1 . Так, для водного раствора ($\Delta f = 0.32$) продуктов фотоокисления триптофана при детектировании эмиссии на 500 нм амплитуда

сверхбыстрой компоненты составила 67%, а время затухания данной компоненты $\tau_1 = 0.95 \pm 0.05$ пс, в то время как для продуктов фотоокисления триптофана, растворенных в тетрагидрофуране ($\Delta f = 0.21$), вклад сверхбыстрой компоненты в кинетику затухания флуоресценции составил 50%, а время затухания $\tau_1 = 1.56 \pm 0.11$ пс. Кинетика затухания флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана для растворителей различной полярности представлена на рисунке 4В.

На основе полученных результатов был сделан вывод о том, что наличие сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции ГСФ связано с эффектом ориентационной релаксации молекул растворителя, находящихся в локальном окружении флуорофора, при этом роль межмолекулярного электронного взаимодействия в формировании флуоресцентных свойств исследуемых гетерогенных систем является незначительной, следовательно, кинетика затухания флуоресценции и анизотропии флуоресценции ГСФ в первую очередь должна быть описана моделью невзаимодействующих флуорофоров. В конце главы представлены выводы по представленным результатам.

Глава 3 «Методы лазерной диагностики гетерогенных систем флуорофоров с использованием особенностей их оптических свойств». В данной главе представлены результаты исследования возможности детектирования ГСФ на основе особенностей их оптических свойств в некоторых задачах биомедицинской диагностики. Представлены результаты исследования свойств флуоресцентного отклика гетерогенных продуктов окисления в единичных клетках (кератиноцитах) кожи, а также меланина и продуктов окисления белков в коже человека *in vivo*.

В начале главы представлено краткое описание структуры кожи и возможных ГСФ в ней. Потенциально, в эпидермисе возможно задетектировать флуоресцентный отклик от гетерогенных продуктов окисления белков и липидов в клетках кожи, накапливающиеся в результате неспецифических процессов окисления, а также флуоресцентный отклик меланина. В дерме возможно детектирование флуоресцентного отклика от продуктов окисления и гликирования структурных белков (коллагена и эластина). Наличие ГСФ в коже стимулировало разработку методов их визуализации и анализа с помощью методов лазерной спектроскопии.

Возможность детектирования флуоресцентного отклика от гетерогенных продуктов окисления биомолекул (белков, аминокислот, липидов) была исследована для единичных клеток иммортализованной клеточной линии кератиноцитов человека (клеточная линия HaCaT), подверженных окислительному стрессу различной природы – фотоокислению УФ-излучением с дозой от 25 до 200 мДж/см² (длина волны излучения 254 нм) и инкубации с пероксидом водорода (максимальная концентрация 1500 мкМ). Изменения свойств эндогенной флуоресценции клеток оценивались с помощью методов мультиспектральной проточной цитометрии с лазерным возбуждением флуоресценции на 405, 488 и 638 нм и детектированием эмиссии в диапазонах 425–475 нм, 505–545 нм и 655–665 нм, соответственно, а также однофотонной

конфокальной микроскопии с картированием времени затухания флуоресценции при импульсном возбуждении флуоресцентного отклика на 402 и 638 нм. В методе проточной цитометрии регистрировался сигнал флуоресценции и рассеяния от единичных клеток, за счёт чего возможен набор статистики оптических свойств большого числа клеток (10^4 – 10^5 штук) за сравнительно небольшое время (1–2 мин.).

Было обнаружено, что наибольшие относительные изменения флуоресцентного отклика клеток спустя 5–20 часов после фотооблучения исследуемых образцов наблюдаются при возбуждении на 638 нм и детектировании эмиссии флуоресценции в диапазоне 655–665 нм. Так, спустя 15 часов после окислительного воздействия, сигнал флуоресценции в клетках, подвергнутых фотооблучению УФ-излучением с дозой 200 мДж/см^2 возрос в ~ 8.2 раза по сравнению с медианным уровнем флуоресценции клеток контрольного образца. При возбуждении (детектировании) на длинах волн 405 нм (425–475 нм) и 488 нм (505–545 нм) изменения флуоресцентного отклика были менее выражены, интенсивность флуоресценции возрастала в 2–5 раз от медианного значения флуоресценции клеток контрольного образца. На рисунке 5 представлены гистограммы распределения флуоресцентного отклика клеток на различных длинах волн возбуждения и детектирования, подвергнутых фотоокислению УФ-излучением с дозой, варьирующейся в диапазоне от 25 до 200 мДж/см^2 . Было установлено, что увеличение флуоресцентного отклика наблюдается также в результате окислительного стресса, индуцированного с помощью пероксида водорода, оно составляло ~ 1.3 –2 раза от медианного значения интенсивности клеток контрольного образца в использованных спектральных каналах возбуждения и эмиссии.

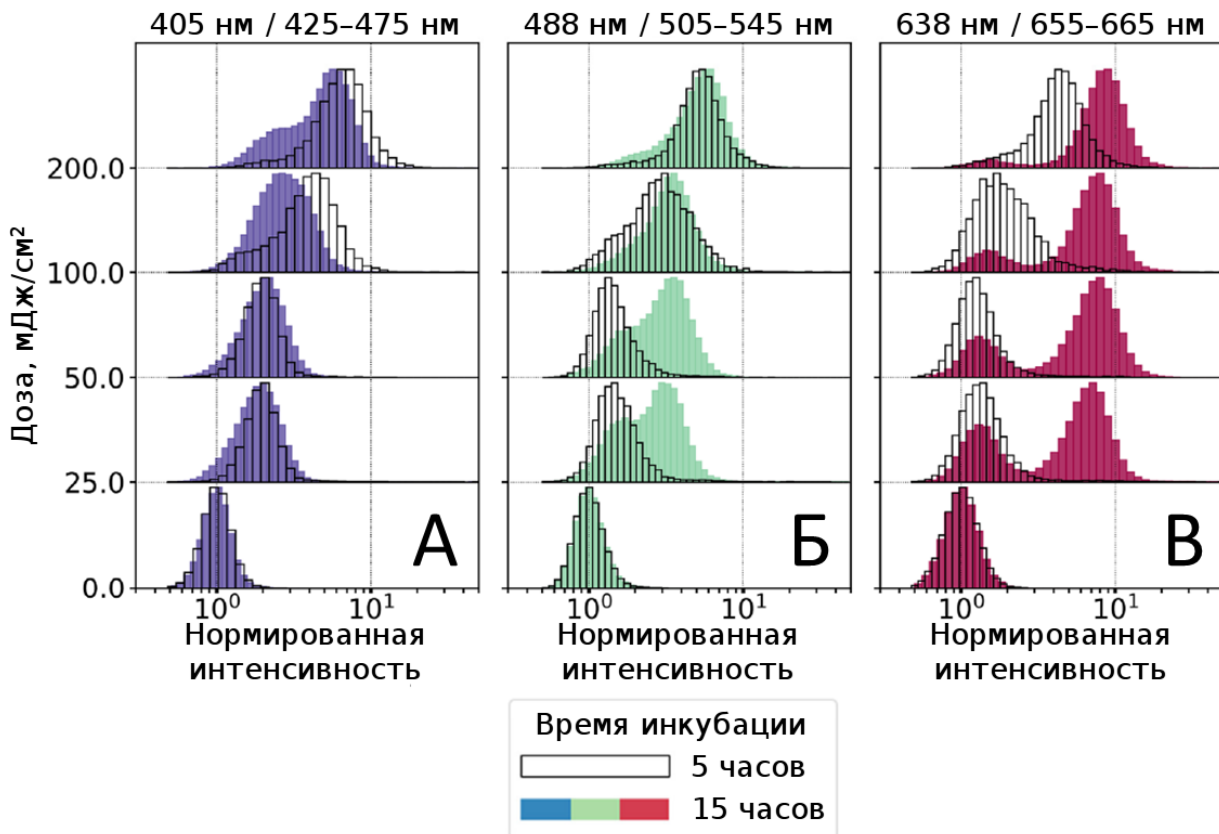


Рисунок 5 – Распределение интенсивности флуоресцентного отклика клеток при возбуждении сигнала на 405 нм (А), 488 нм (Б) и 638 нм (В) и детектировании в диапазонах 425–475 нм, 505–545 нм и 655–665 нм, соответственно, для образцов клеток кожи (клеточной линии HaCaT), облученных УФ-излучением с дозой 25, 50, 100 и 200 мДж/см², и клеток контрольного образца. Значения интенсивности флуоресценции в каждом спектральном канале нормированы на медианное значение интенсивности контрольного образца.

Результаты, полученные с помощью метода проточной цитометрии, были подтверждены с помощью конфокальной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции при однофотонном возбуждении эмиссии на 402 нм и 640 нм и детектировании в диапазоне 450–900 нм и 660–720 нм соответственно. Кинетики затухания флуоресцентного отклика, детектируемые с помощью данного метода, были аппроксимированы биэкспоненциальным законом затухания. Амплитуды кинетик a_1 , a_2 и времена затухания флуоресценции τ_1 , τ_2 были использованы для расчёта среднего времени затухания флуоресценции как $\tau_m = (a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2) / (a_1 + a_2)$. Установлено, что в результате фотооблучения в клетках происходит накопление продуктов окисления биомолекул, различающихся характерным временем затухания флуоресценции для областей цитоплазмы и ядра клеток. Так флуоресцентный отклик, возбуждаемый на 402 нм, из областей, соответствующих ядрам клеток, имел среднее время затухания флуоресценции $\tau_m = 1.91 \pm 0.07$ нс, а флуоресцентный отклик областей, соответствующих цитоплазме клеток, имел среднее время затухания $\tau_m = 2.34 \pm 0.14$ нс. В работе также проанализированы интенсивность и параметры затухания флуоресценции, детектируемой при возбуждении на 640 нм.

Был сделан вывод о том, что флуоресцирующие продукты биомолекул, накапливающиеся в результате процессов окисления в клетках, могут вносить существенный вклад во флуоресцентный отклик клеток кожи, возбуждаемый в видимом диапазоне спектра, при этом наибольшие относительные изменения в интенсивности флуоресценции наблюдаются при возбуждении и детектировании оптического отклика в красном диапазоне спектра. Представленные результаты могут быть использованы при анализе параметров эндогенной флуоресценции клеток, подвергнутых окислительному стрессу.

Помимо гетерогенных продуктов окисления, накапливающихся в результате окислительного стресса в клетках, в коже также может присутствовать меланин, представляющий собой ГСФ. Далее в Главе представлены результаты исследования возможности визуализации меланина в коже *in vivo* с использованием двух отличительных характеристик его оптического отклика: 1) наличия сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции и 2) возможности возбуждения флуоресцентного отклика в красной и ближней инфракрасной области спектра.

С помощью лазерной конфокальной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции с двухфотонным возбуждением флуоресцентного отклика на длине волны 760 нм и детектированием кинетики затухания флуоресценции в диапазоне 410–680 нм была показана возможность визуализации меланина по короткому времени затухания флуоресценции (менее 200 пс) на глубинах от 0 до 60 мкм в нормальных участках кожи предплечья и в участках кожи, облученных УФ-Б излучением (280–315 нм) с дозой 100 мДж/см². С помощью данного метода количественно охарактеризовано перераспределение меланина в верхних слоях кожи при УФ облучении.

Далее в работе была исследована возможность селективной визуализации меланина по сигналу однофотонной флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) при возбуждении оптического отклика на длине волны 785 нм. С помощью конфокального микроспектрометра для 12 добровольцев с фототипами кожи II (7 добровольцев) и III (5 добровольцев) был измерен оптический отклик от кожи внутренней стороны предплечья на глубинах от 0 до 60 мкм с шагом 2 мкм. Было обнаружено, что спектры оптического отклика кожи, возбуждаемого на 785 нм, представляли собой суперпозицию флуоресцентного фона и сигнала КР, в котором наблюдались характерные полосы КР меланина с положением максимумов на 480, 1380 и 1570 см⁻¹ и характерной шириной на полувысоте ~150 см⁻¹, перекрывающиеся с полосами КР липидов и белков кожи на 1298, 1450 и 1655 см⁻¹. Для характеристики интенсивности флуоресцентного отклика, средний сигнал флуоресценции в диапазоне волновых чисел 1550–1720 см⁻¹ был нормирован на средний сигнал КР в диапазоне 1550–1720 см⁻¹, рассчитанный после вычитания флуоресцентного фона. Было обнаружено, что спектрам с высоким значением F1 – отношения интенсивности флуоресценции к сигналу комбинационного рассеяния в диапазоне 1550–1720 см⁻¹ (F1 = 10–20) соответствуют спектры КР кожи с высокой интенсивностью линий КР меланина по отношению к линиям белков и липидов (рисунки 6 А,В), в то время в спектрах

с низким значением сигнала флуоресценции ($FI = 2-5$), интенсивность линий КР белков и липидов выше интенсивности линий КР меланина (рисунки 6 Б,Г).

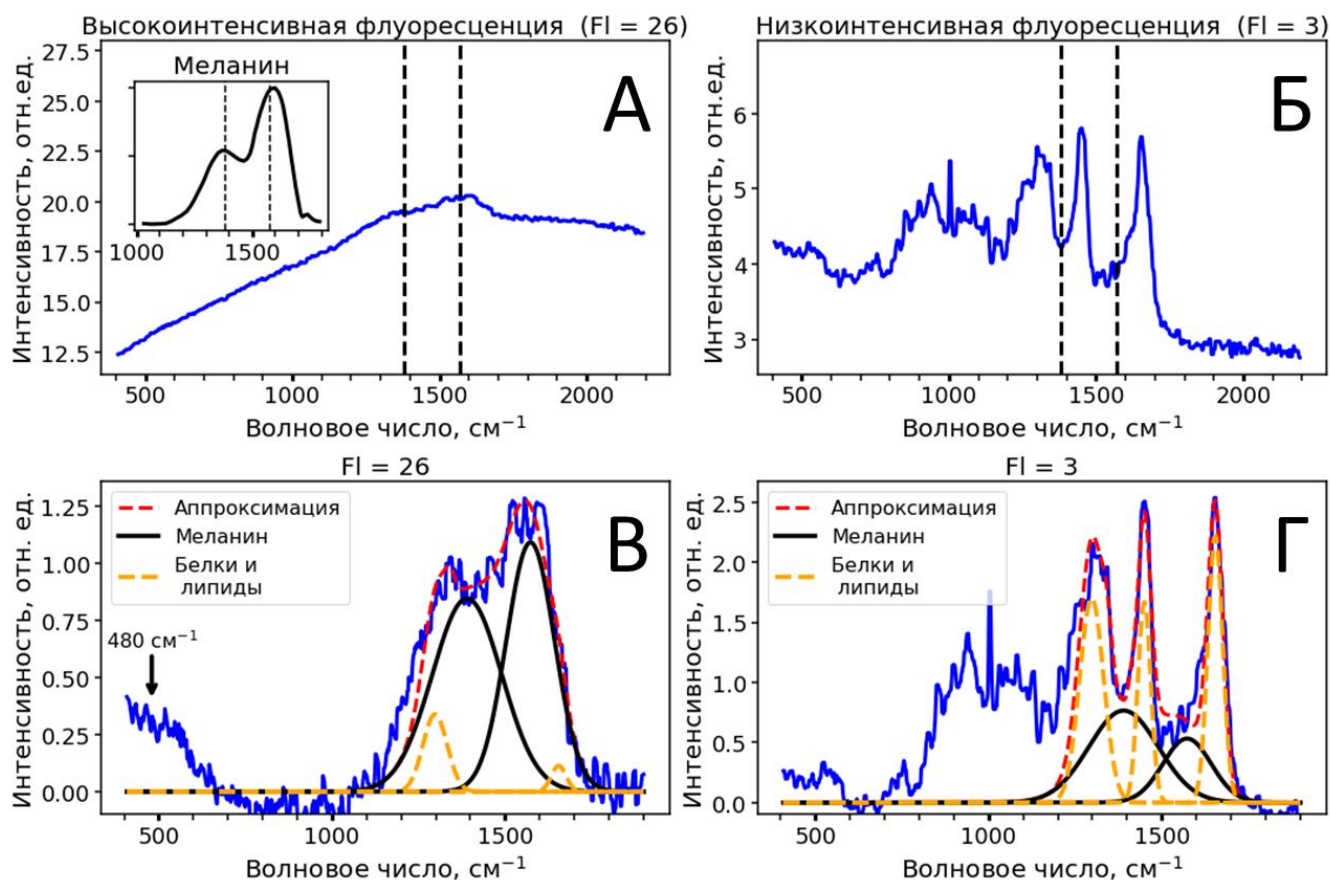


Рисунок 6 – А) Типичный вид спектра КР кожи (глубина детектирования 40 мкм) с высоким значением отношения интенсивности флуоресценции к сигналу КР в диапазоне $1550-1720\text{ см}^{-1}$ ($FI = 26$). В спектре КР отчётливо наблюдаются широкие полосы меланина с максимумами на 1380 и 1570 см^{-1} (аналогично спектрам синтетического меланина, см. вставку) Б) Типичный вид спектра КР кожи (глубина детектирования 10 мкм) с низким значением отношения интенсивности флуоресценции к сигналу КР в диапазоне $1550-1720\text{ см}^{-1}$ ($FI = 3$). Видны характерные интенсивные линии КР белков и липидов на 1298 , 1450 и 1655 см^{-1} . Пунктирными линиями на рисунках А,Б отмечены положения максимумов линий КР меланина на 1380 и 1570 см^{-1} . В,Г) Спектры комбинационного рассеяния с высоким ($FI = 26$, В) и низким ($FI = 3$, Г) уровнем флуоресценции после вычитания фона. На 480 см^{-1} также присутствует характерная линия меланина (В). На рисунках В,Г также приведены результаты разложения спектров в диапазоне $1200-1800\text{ см}^{-1}$ на полосы белков/липидов и меланина.

Было установлено, что по отношению интенсивностей линий КР меланина на 1380 и 1570 см^{-1} к средней интенсивности линий КР белков и липидов на 1298 , 1450 и 1655 см^{-1} возможно построение профиля распределения содержания меланина по глубине. Было получено, что относительная концентрация меланина,

оцененная из сигнала КР, имеет неоднородное распределение по глубине в коже, в частности, имеет локальный максимум вблизи глубины 35–40 мкм (рисунок 7А).

Поскольку линии КР меланина на 1380 и 1570 см^{-1} перекрываются с линиями белков и липидов тканей, был исследован вопрос о возможности разделения вкладов меланина и других компонентов тканей в спектр комбинационного рассеяния с помощью методов статистического обучения, не предполагающих наличия априорной информации о спектрах молекулярных компонент, вносящих вклад в детектируемые спектры КР кожи. Было показано, что с помощью метода неотрицательной матричной факторизации можно выделить вклады кератина, естественного увлажняющего фактора, урокановой кислоты, керамидов, меланина и каротиноидов в спектры КР кожи.

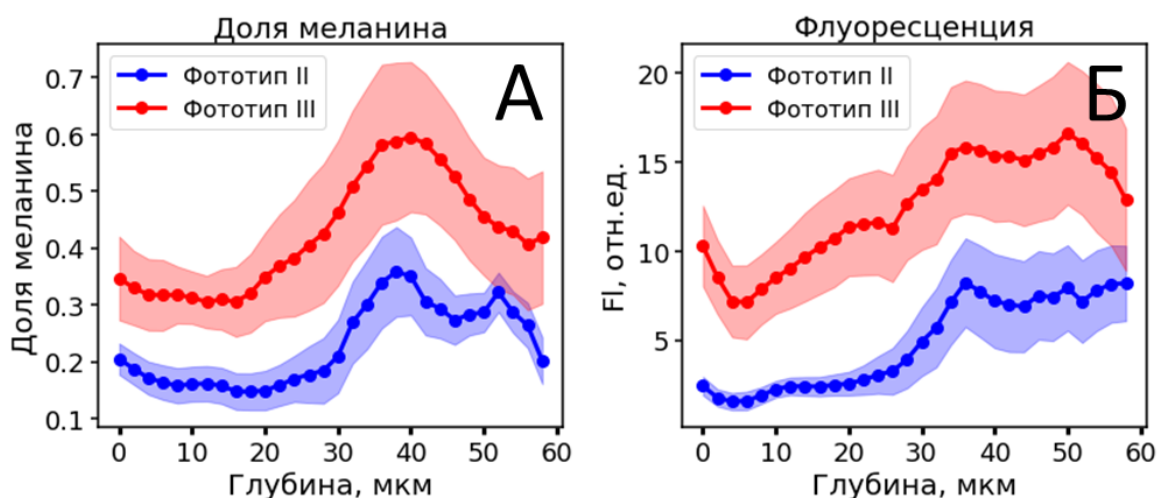


Рисунок 7 – А) Профили распределения доли меланина, оцененной из спектров КР кожи для добровольцев с фототипами кожи II и III. Б) Глубинные профили распределения флуоресценции, возбуждаемой на 785 нм, нормированной на сигнал КР в диапазоне 1550–1720 см^{-1} , для добровольцев с фототипами кожи II и III.

Далее, в работе была изучена возможность локализации меланина по сигналу флуоресценции, возбуждаемой на 785 нм и детектируемой в диапазоне 810–950 нм. Было установлено, что интенсивность флуоресцентного отклика линейно коррелирует (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.8$, $p < 10^{-9}$) с долей меланина, оцененной из сигналов комбинационного рассеяния кожи. Обнаружено, что интенсивность флуоресцентного отклика в зависимости от глубины сканирования также возрастает на глубине сканирования 35–40 мкм (рисунок 7Б), однако не убывает на глубинах более 40 мкм. Был сделан вывод о том, что сигнал флуоресценции, детектируемый на глубинах более 40 мкм, соответствует оптическому отклику от ГСФ в коже, отличных от меланина, – продуктов гликирования и окисления структурных белков (коллагена, эластина).

Было установлено, что параметры ИК флуоресценции меланина коррелируют с относительной интенсивностью линий меланина на 1380 и 1570 см^{-1} . А именно, было получено, что Стоксов сдвиг полосы флуоресценции меланина, оцененный как положение максимума флуоресцентного фона (рисунки

8А,Б), коррелирует с соотношением интенсивностей линий КР меланина $I(1380\text{ см}^{-1})/I(1570\text{ см}^{-1})$ (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.55$, $p < 10^{-9}$, рисунки 8В,Г), то есть, изменения молекулярного состава меланина, проявляемые в спектрах КР меланина кожи *in vivo*, взаимосвязаны с фотофизическими параметрами его флуоресцентного отклика.

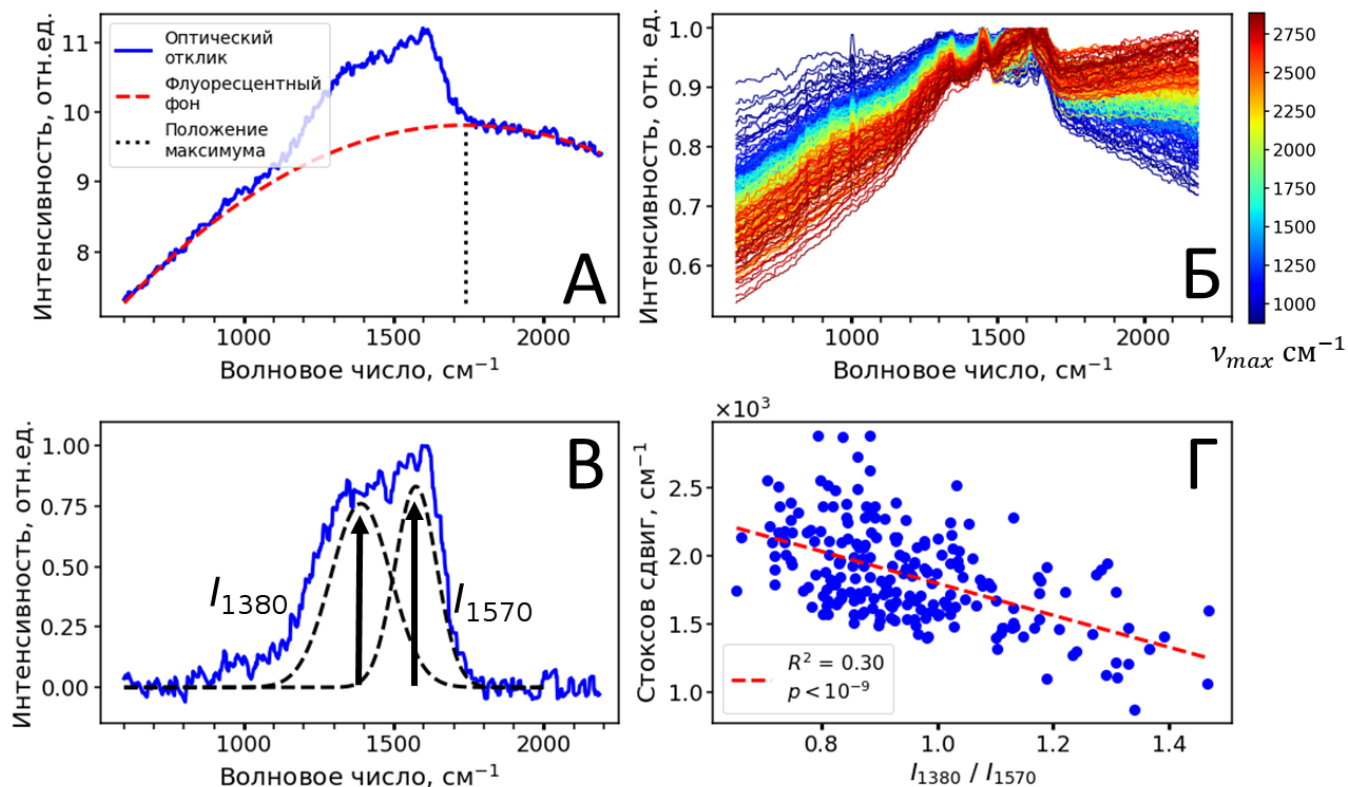


Рисунок 8 – А) Пример определения положения максимума (Стоксова сдвига) спектра флуоресценции кожи. Б) Спектры оптического отклика кожи при возбуждении на 785 нм, характеризующиеся высоким уровнем флуоресценции ($I_1 > 10$). Цветом закодирован Стоксов сдвиг флуоресценции. В) Типичный спектр КР кожи с высоким содержанием меланина. Г) Зависимость Стоксова сдвига ИК-флуоресценции от отношения амплитуд линий меланина $I(1380\text{ см}^{-1})/I(1570\text{ см}^{-1})$. Наблюдается статистически значимая линейная корреляция, коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.55$, $p < 10^{-9}$.

Таким образом, в работе было установлено, что лазерная конфокальная фемтосекундная микроскопия позволяет визуализировать меланин с помощью короткого (менее 200 пс) времени затухания его флуоресцентного отклика в видимом диапазоне при многофотонном возбуждении флуоресценции; лазерная конфокальная микроспектроскопия с однофотонным возбуждением в ближнем ИК диапазоне позволяет селективно детектировать меланин на различных глубинах в коже по сигналу комбинационного рассеяния по линиям на 1380 см^{-1} и 1570 см^{-1} , в том числе, с помощью метода неотрицательной матричной факторизации; а также по интенсивности сигнала однофотонно-возбуждаемой на 785 нм флуоресценции. Было установлено, что параметры флуоресцентного отклика меланина, в частности, Стоксов сдвиг флуоресценции, взаимосвязаны с

изменениями молекулярного состава меланина кожи *in vivo*, проявляющимися в спектрах КР. Полученные результаты могут быть использованы для исследования распределения и свойств меланина при его участии в нормальных и патологических процессах в коже.

В конце Главы 3 сформулированы выводы по представленным в главе результатам.

Заключение. В диссертационной работе экспериментально с помощью методов лазерной спектроскопии исследованы механизмы формирования флуоресцентного отклика в эндогенных гетерогенных системах флуорофоров кожи (меланина, продуктов окисления аминокислот и гликирования белков). Показана взаимосвязь фотофизических характеристик поглощения и флуоресценции гетерогенных систем флуорофоров в видимом диапазоне спектра с гетерогенностью молекулярного состава и свойствами супрамолекулярных агрегатов исследуемых систем. С использованием лазерной фемтосекундной флуоресцентной спектроскопии для гетерогенных систем флуорофоров впервые обнаружена сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции с характерным временем 1 пс, присутствующая на всех длинах волн эмиссии флуоресценции, не характерная для единичных эндогенных молекул-флуорофоров кожи и обусловленная локальной ориентационной релаксацией молекул растворителя, окружающих флуорофоры гетерогенной системы, различающиеся положениями максимумов спектров эмиссии флуоресценции. Показано, что кинетика анизотропии и затухания флуоресценции гетерогенных систем флуорофоров может быть описана с точки зрения модели усреднения свойств невзаимодействующих молекулярных флуорофоров. На основе исследованных особенностей оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров, а именно, возможности возбуждения флуоресцентного отклика в красной и ближней инфракрасной области спектра и наличия сверхбыстрого флуоресцентного отклика, разработаны методы лазерной флуоресцентной диагностики гетерогенных систем флуорофоров в задачах биомедицинской диагностики единичных клеток и кожи *in vivo*.

В диссертационной работе были получены следующие основные результаты:

- Продемонстрирована общность стационарных и время-разрешенных оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров, детектируемых с помощью методов лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным и пикосекундным временным разрешением, на примере меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования модельного белка (альбумина). Показано, что такие системы обладают поглощением, экспоненциально спадающим с длиной волны возбуждения в диапазоне 400–800 нм с параметром спектрального наклона поглощения в полулогарифмическом масштабе $\Lambda = 60\text{--}180$ нм, и флуоресцентным откликом, возбуждаемым в ближнем УФ и видимом диапазоне, параметры которого зависят от длины волны возбуждения: положение максимума эмиссии флуоресценции в диапазоне 320–500 нм растёт линейно с увеличением длины волны возбуждения, а величина Стоксова сдвига флуоресценции убывает с

$\sim 8000 \text{ см}^{-1}$ при возбуждении на 320 нм до величины $\sim 2000 \text{ см}^{-1}$ на длине волны возбуждения 500 нм.

- Установлено, что кинетика затухания флуоресценции, детектируемая методом ап-конверсии флуоресценции при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с временным разрешением 150 фс на масштабе 150 фс – 500 пс и методом время-коррелированного счёта единичных фотонов с временным разрешением 150 пс на масштабе 150 пс – 20 нс, обладает немоноэкспоненциальным законом затухания. Выявлена новая особенность кинетики затухания флуоресценции рассматриваемых систем при возбуждении на 400 нм: наличие компоненты релаксации возбуждения с характерным временем затухания ~ 1 пс и амплитудой вклада в кинетику затухания флуоресценции 40–70%. Обнаружено, что время затухания флуоресценции на пикосекундном масштабе возрастает с увеличением длины волны эмиссии флуоресценции в 1.5–2 раза при увеличении длины волны эмиссии с 480 нм до 560 нм, а амплитуда сверхбыстрой компоненты убывает на 15–20%, что приводит к спектральной миграции эмиссии на временном масштабе 0–10 пс после начала возбуждения.
- Показано, что амплитуда и скорость затухания сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции возрастают с увеличением значения параметра спектрального наклона поглощения гетерогенных систем флуорофоров. На примере продуктов фотоокисления триптофана показано, что увеличение поглощения гетерогенных систем флуорофоров в диапазоне 350–700 нм и величина спектрального наклона поглощения увеличивается с гетерогенностью молекулярного состава в образцах, характеризуемого как число уникальных молекулярных формул в масс-спектре высокого разрешения в диапазоне 200–700 Да, что позволяет утверждать о связи параметров релаксации сверхбыстрой компоненты с гетерогенностью молекулярного состава.
- Установлено, что величина анизотропии флуоресценции исследуемых систем не изменяется на интервале 150 фс – 100 пс после начала возбуждения и имеет начальный уровень 0.2–0.35 для исследуемых гетерогенных систем флуорофоров. Показано, что сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции с характерным временем ~ 1 пс наблюдается для молекулярной фракции менее 1 кДа, а параметры затухания наблюдаемой компоненты зависят от полярности растворителя. Наблюдаемые факты говорят в пользу формирования кинетики затухания флуоресценции гетерогенных систем флуорофоров по модели усреднения оптических свойств невзаимодействующих флуорофоров, а наличие сверхбыстрой компоненты в диапазоне 480–560 нм может быть объяснено релаксацией молекул растворителя, окружающих флуорофоры гетерогенной системы, обладающих различными длинами волн эмиссии флуоресценции, после возбуждения системы.
- Продемонстрирована возможность использования интенсивности однофотонно возбуждаемого флуоресцентного отклика гетерогенных систем флуорофоров в видимом диапазоне спектра для диагностики окислительного стресса в клетках

на модели клеточной линии кератиноцитов человека (клеточная линия HaCaT), фотоокисленной УФ-излучением с дозой до 200 мДж/см². Установлено, что в результате облучения происходит дозозависимое возрастание интенсивности флуоресценции, возбуждаемой в видимом диапазоне спектра на 405 нм, 488 нм и 638 нм и детектируемой в спектральных диапазонах 425–475 нм, 505–545 нм и 655–665 нм соответственно. При этом наибольшие изменения наблюдаются (в ~8 раз в сравнении с флуоресцентным откликом контрольного образца) при возбуждении отклика на 638 нм и детектировании в диапазоне эмиссии 655–665 нм, что может быть объяснено тем, что эндогенные молекулы-флуорофоры не возбуждаются эффективно в данном спектральном диапазоне.

- Продемонстрирована возможность применения лазерной конфокальной микроскопии для анализа распределения меланина в коже по глубине *in vivo* по короткому времени затухания двухфотонно возбуждаемой флуоресценции (менее 200 пс при двухфотонном возбуждении флуоресценции на 760 нм и регистрации эмиссии в диапазоне 410–680 нм), по интенсивности однофотонно возбуждаемого флуоресцентного отклика в ближнем ИК диапазоне (длина волны возбуждения 785 нм, регистрация эмиссии в диапазоне 810–950 нм), а также по интенсивности линий комбинационного рассеяния с положением максимумов на 1380 см⁻¹ и 1570 см⁻¹, в том числе выделяемых с помощью метода неотрицательной матричной факторизации спектров КР.
- Установлено, что спектральные характеристики флуоресцентного отклика меланина связаны с его молекулярной организацией, проявляющейся в его спектре комбинационного рассеяния. Стоксов сдвиг полосы флуоресценции меланина (длина волны возбуждения 785 нм, детектирование 810–950 нм) уменьшается с ростом отношения интенсивностей линий комбинационного рассеяния меланина на 1380 см⁻¹ и 1570 см⁻¹. Данный факт может быть использован для характеристики молекулярной структуры меланина в коже *in vivo*.

Список публикаций по теме диссертации, входящих в базы данных Web of Science, Scopus, RSCI и Перечень изданий МГУ:

1. Oxidation of individual aromatic species gives rise to humic-like optical properties/ **Yakimov B. P.**, Rubekina A. A., Zherebker A. Ya., Budylin G. S., Kompanets V.O., Chekalin S. V., Vainer Yu. G., Hasan A. A., Nikolaev E. N., Fadeev V. V., Perminova I.V., Shirshin E.A.//Environmental Science & Technology Letters — 2022. 9(5), 452–458 (**IF = 7.653**)
2. On-off transition and ultrafast decay of amino acid luminescence driven by modulation of supramolecular packing./ Arnon, Z. A., Kreiser, T., **Yakimov, B. P.**, Brown, N., Aizen, R., Shaham-Niv, S., Pandeewar, M., Qaisrani, M., Poli, E., Ruggiero, A., Slutsky, I., Hassanali, A., Shirshin E., Levy, D., Gazit, E.. // iScience - (2021), 24(7), 102695. (**IF = 5.458**)
3. The oxidation-induced autofluorescence hypothesis: red edge excitation and implications for metabolic imaging / Semenov A. N., **Yakimov B. P.**, Rubekina A. A., Gorin D. A., Drachev V. P., Zarubin M. P., Fadeev V. V., Shirshin E. A.// Molecules – 2020, 25(8), 1863. (**IF = 4.411**)

4. Melanin distribution from the dermal–epidermal junction to the stratum corneum: non-invasive in vivo assessment by fluorescence and Raman microspectroscopy. / **Yakimov, B. P.**, Shirshin, E. A., Schleusener, J., Allenova, A. S., Fadeev, V. V., & Darvin, M. E.// Scientific reports - 2020 10(1), 1-13. (**IF = 4.379**)
5. Blind source separation of molecular components of the human skin in vivo: non-negative matrix factorization of Raman microspectroscopy data/ **Yakimov, B. P.**, Venets, A. V., Schleusener, J., Fadeev, V. V., Lademann, J., Shirshin, E. A., & Darvin, M. E.// Analyst - 2021, 146(10), 3185-3196. (**IF = 4.616**)
6. Melanin diagnostics with nonlinear optics: a mini-review/ Shirshin, E. A., **Yakimov, B. P.**, Budylin, G. S., Buyankin, K. E., Armaganov, A. G., Fadeev, V. V., & Kamalov, A. A. // Quantum Electronics – 2022. 52(1), 28. (**IF = 1.022**)

Список цитируемой литературы

1. Shirshin E., Yakimov B., Darvin M., Omelyanenko N., Rodionov S., Gurfinkel Y., Lademann J., Fadeev V., Priezzhev A. Label-Free Multiphoton Microscopy: The Origin of Fluorophores and Capabilities for Analyzing Biochemical Processes//Biochemistry (Moscow), 2019, T. 84, N 1, C. 69-88.
2. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. – Springer Science & Business Media, 2013.
3. Croce A., Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis//European journal of histochemistry: EJH, 2014, T. 58, N 4.
4. Perna G., Palazzo G., Mallardi A., Capozzi V. Fluorescence properties of natural eumelanin biopolymer//Journal of Luminescence, 2011, T. 131, N 8, C. 1584-1588.
5. Wu Y., Qu J.Y. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues//Journal of biomedical optics, 2006, T. 11, N 5, C. 054023.
6. Haralampus-Grynaviski N.M., Lamb L.E., Clancy C.M., Skumatz C., Burke J.M., Sarna T., Simon J.D. Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, T. 100, N 6, C. 3179-3184.
7. Pinotsi D., Grisanti L., Mahou P., Gebauer R., Kaminski C.F., Hassanali A., Kaminski Schierle G.S. Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures//Journal of the American Chemical Society, 2016, T. 138, N 9, C. 3046-3057.
8. Meerwaldt R., Hartog J.W.L., Graaff R., Huisman R.J., Links T.P., den Hollander N.C., Thorpe S.R., Baynes J.W., Navis G., Gans R.O.B., Smit A.J. Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients//Journal of the American Society of Nephrology, 2005, T. 16, N 12, C. 3687.
9. Simon J.D., Peles D., Wakamatsu K., Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function//Pigment cell & melanoma research, 2009, T. 22, N 5, C. 563-579.
10. Tikhonova T.N., Rovnyagina N.R., Zhrebker A.Y., Sluchanko N.N., Rubekina A.A., Orekhov A.S., Nikolaev E.N., Fadeev V.V., Uversky V.N., Shirshin E.A. Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation//Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, T. 651, C. 13-20.

11. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review//*Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2011, T. 4, N 01, C. 9-38.
12. Huang Z., Lui H., Chen M.X., Alajlan A., McLean D.I., Zeng H. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin//*Journal of biomedical optics*, 2004, T. 9, N 6, C. 1198-1206.
13. Pansieri J., Josserand V., Lee S.-J., Rongier A., Imbert D., Sallanon M.M., Kövari E., Dane T.G., Vendrely C., Chaix-Pluchery O., Guidetti M., Vollaire J., Fertin A., Usson Y., Rannou P., Coll J.-L., Marquette C., Forge V. Ultraviolet–visible–near-infrared optical properties of amyloid fibrils shed light on amyloidogenesis//*Nature Photonics*, 2019, T. 13, N 7, C. 473-479.
14. Constantine Paras, Matthew Keller, Anita Mahadevan-Jansen, Lisa White, John Phay Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands//*Journal of Biomedical Optics*, 2011, T. 16, N 6, C. 1-5.
15. Ivan A. Bratchenko, Dmitry N. Artemyev, Oleg O. Myakinin, Yulia A. Khristoforova, Alexander A. Moryatov, Sergey V. Kozlov, Valery P. Zakharov Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions//*Journal of Biomedical Optics*, 2017, T. 22, N 2, C. 1-10.
16. Tran M.L., Powell B.J., Meredith P. Chemical and Structural Disorder in Eumelanins: A Possible Explanation for Broadband Absorbance//*Biophysical Journal*, 2006, T. 90, N 3, C. 743-752.
17. Chen C.-T., Chuang C., Cao J., Ball V., Ruch D., Buehler M.J. Excitonic effects from geometric order and disorder explain broadband optical absorption in eumelanin//*Nature communications*, 2014, T. 5, N 1, C. 1-10.
18. Schmitt A., Schmitt J., Münch G., Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics//*Analytical Biochemistry*, 2005, T. 338, N 2, C. 201-215.
19. Kohl F.R., Grieco C., Kohler B. Ultrafast spectral hole burning reveals the distinct chromophores in eumelanin and their common photoresponse//*Chemical Science*, 2020.
20. Hwang I., Scholes G.D. Electronic Energy Transfer and Quantum-Coherence in π -Conjugated Polymers//*Chemistry of Materials*, 2011, T. 23, N 3, C. 610-620.
21. Joly-Tonetti N., Wibawa J.I.D., Bell M., Tobin D.J. An explanation for the mysterious distribution of melanin in human skin: a rare example of asymmetric (melanin) organelle distribution during mitosis of basal layer progenitor keratinocytes//*British Journal of Dermatology*, 2018, T. 179, N 5, C. 1115-1126.