

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Якимов Борис Павлович

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

Специальность 01.04.21 – лазерная физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Научные руководители:
д.ф.-м.н., проф. Фадеев Виктор Владимирович
к.ф.-м.н. Ширшин Евгений Александрович

Москва – 2022

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы	19
1.1. Лазерные методы диагностики, применяемые в биомедицинских исследованиях	19
1.2 Фотофизические характеристики эндогенных флуорофоров биотканей	22
1.2.1 Эндогенные флуорофоры с известным молекулярным строением и механизмами формирования оптических свойств	22
1.2.2 Стационарные оптические свойства гетерогенных систем эндогенных флуорофоров биотканей.....	26
1.3 Механизмы формирования фотофизических свойств гетерогенных систем эндогенных флуорофоров	31
1.3.1 Модели химического и структурного беспорядка формирования фотофизических свойств меланина	34
1.3.2 Модели усреднения и электронного взаимодействия, описывающие оптические свойства липофусцина.....	45
1.3.3 Модели формирования флуоресценции мономеров и агрегатов белков в видимой области спектра.....	47
1.3.4 Механизмы формирования флуоресцентного отклика структурных белков: продукты гликирования как источник флуоресценции.....	53
1.3.5 Общность свойств фотофизических характеристик эндогенных гетерогенных систем флуорофоров биотканей и углеродных наночастиц	55
1.3.6 Краткие выводы о механизмах формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров	57

1.4	Примеры использования оптического отклика гетерогенных систем флуорофоров в задачах лазерной биомедицинской диагностики.	59
1.5	Выводы.....	64
Глава 2.	Лазерная флуоресцентная спектроскопия гетерогенных систем флуорофоров: исследование механизмов формирования оптических свойств	67
2.1	Объекты и методы исследования	67
2.1.1	Обоснование выбора объектов исследования.....	67
2.1.2	Методы изготовления образцов	69
2.1.3	Измерение стационарных спектров поглощения и флуоресценции	70
2.1.4	Данные масс-спектрометрии	71
2.1.5	Метод микроскопии светового листа.	71
2.1.7	Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции и анизотропии флуоресценции на наносекундном временном масштабе.	72
2.1.8	Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции и анизотропии флуоресценции на пикосекундном временном масштабе.....	74
2.2	Общность спектров поглощения и флуоресценции ГСФ.....	76
2.3	Взаимосвязь оптических свойств и гетерогенности молекулярного состава ГСФ.....	81
2.4	Связь параметров супрамолекулярных агрегатов в ГСФ с их оптическими свойствами.....	84
2.5	Кинетика релаксации флуоресцентного отклика на пикосекундном и наносекундном масштабах в ГСФ.....	87
2.6	Кинетика анизотропии флуоресценции на пикосекундном и наносекундном масштабах времени в ГСФ.....	97
2.7	Влияние свойств растворителя на оптические свойства ГСФ	103

2.8 Выводы.....	108
Глава 3 Методы лазерной диагностики гетерогенных систем флуорофоров с использованием особенностей их оптических свойств	111
3.1 Структура кожи и потенциальные ГСФ в коже.....	111
3.1.1 Структурные и функциональные особенности кожи человека	111
3.1.2 Гетерогенные системы флуорофоров в коже.....	114
3.2 Лазерная диагностика гетерогенных продуктов окисления в единичных клетках кожи.....	115
3.2.1 Протокол культивирования клеточной культуры	115
3.2.2 Протокол индуцирования окислительного стресса.....	116
3.2.3 Результаты измерения сигнала эндогенной флуоресценции кератиноцитов при окислительном стрессе методом проточной цитометрии	117
3.2.4 Картирование распределения времени затухания флуоресценции продуктов окисления в единичных клетках.....	125
3.3.5 Обсуждение результатов.....	130
3.3. Лазерная диагностика меланина в верхних слоях кожи <i>in vivo</i>	131
3.3.1 Селективная визуализация меланина с помощью картирования времени затухания двухфотонно возбуждаемой флуоресценции.....	132
3.3.2 Локализация меланина по однофотонному инфракрасному флуоресцентному отклику и сигналу комбинационного рассеяния	136
3.4. Выводы.....	145
4. Заключение	148
Список сокращений и условных обозначений.....	153
5. Список литературы	154

Введение

Диссертационная работа посвящена лазерной флуоресцентной спектроскопии систем, обладающих фотофизическими характеристиками, отличными от единичных молекул-флуорофоров – 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 клеток и тканей является актуальной задачей биомедицины. Особый интерес при этом представляет использование эндогенного флуоресцентного контраста, то есть получение флуоресцентного отклика от тех объектов, 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 об оптических 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 возможно возбудить в широком диапазоне длин волн (от 300 до 800 нм), а их поглощение (коэффициент экстинкции) монотонно убывает с ростом длины волны. 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].

Всем указанным системам присущи следующие основные свойства. Во-первых, они обладают гетерогенным молекулярным составом. Так, меланин состоит из большого числа различных молекул [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 появлением 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 друг от друга, из-за чего электронное взаимодействие между отдельными

молекулами флуорофорами в агрегате может существенно влиять на наблюдаемые оптические свойства. Системы, для которых характерны указанные выше свойства, мы далее будем называть гетерогенными системами флуорофоров (ГСФ), одновременно подразумевая гетерогенность их молекулярного состава и наличие в них супрамолекулярных агрегатов.

Оптические свойства ГСФ, в частности, возможность возбуждения их флуоресцентного отклика в окне прозрачности биотканей (600–900 нм) [11] в связи с наличием длинноволнового края в спектрах поглощения, 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 парашитовидной 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 увеличить чувствительность и селективность методов детектирования ГСФ, а также позволить 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 индивидуальными невзаимодействующими молекулярными флуорофорами.

В зависимости от конкретной ГСФ исследователи придерживаются различных гипотез, объясняющих, по сути, идентичные свойства спектров их 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. Также следует заметить, что в большинстве работ используются косвенные экспериментальные методы, не позволяющие однозначно установить механизмы формирования оптических свойств ГСФ. В частности, 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.

Цель 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*.

Объектом исследования являются эндогенные гетерогенные системы флуорофоров (меланин, продукты окисления и гликирования белков и аминокислот) в коже.

Предметом исследования являются механизмы формирования флуоресцентного отклика гетерогенных систем флуорофоров и методы лазерной флуоресцентной диагностики исследуемых систем для задач биомедицины.

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: меланина, водных растворов продуктов фотоокисления триптофана, продуктов гликирования белковых макромолекул.
- Впервые показана взаимосвязь параметров поглощения ГСФ 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 полученных результатов работы состоит в развитии представлений о свойствах флуоресцентного отклика эндогенных флуорофоров в коже и механизмах формирования флуоресцентного отклика ГСФ. 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 применено 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 спектра, 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: микроскопия с визуализацией времени затухания флуоресценции с однофотонным и двухфотонным возбуждением флуоресценции 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*.

Защищаемые положения

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 релаксация молекул растворителя после возбуждения.

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

3. Лазерная конфокальная микроспектроскопия позволяет селективировать отклик эндогенных гетерогенных систем флуорофоров в коже по короткому 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, связано с отношением интенсивностей полос в спектре комбинационного рассеяния меланина и его молекулярной структурой в коже *in vivo*.

Обоснованность и 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 работы представлены в рецензируемых научных журналах.

Публикации по теме диссертации

Основные результаты данной работы опубликованы в следующих печатных работах, 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., Zhrebker 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., & Darwin, 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., & Darwin, 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)

Апробация результатов работы проводилась на всероссийских и международных конференциях:

- Saratov Fall Meeting 2019: VII Symposium on Optics & Biophotonics (Саратов, Россия)
- Towards Optical and Multimodality Translational Imaging 2020 (Саратов, Россия)
- II 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 имени 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, взаимосвязывающие 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, списка используемых сокращений и списка цитированной литературы. Работа содержит 170 страниц, 37 иллюстраций и 167 библиографических ссылок.

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе представлен обзор литературы по теме диссертационной работы. Приведено описание используемых лазерных методов биомедицинской диагностики, отражено место лазерной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии среди других оптических методов. Рассмотрены основные эндогенные (исходно присутствующие, не вводимые извне) флуорофоров биотканей, используемые для диагностики. Среди эндогенных флуорофоров тканей выделен подкласс систем, для которых свойственна монотонная зависимость величины поглощения от длины волны возбуждения в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне спектра, выраженная зависимость положения максимума эмиссии и интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждения, возможность возбуждения флуоресцентного отклика в видимом и ближнем ИК диапазоне спектра. Сформулированы основные конкурирующие гипотезы, позволяющие объяснить наблюдаемые оптические свойства ГСФ: 1) гетерогенность молекулярного состава и усреднение спектров отдельных компонент и 2) наличие межмолекулярного электронного взаимодействия в системе. Представлены избранные применения оптического отклика ГСФ, основанные на их уникальных фотофизических свойствах. В конце главы кратко резюмированы современные представления о механизмах формирования оптических свойств ГСФ, сформулированы цели и задачи диссертационной работы.

1.1. Лазерные методы диагностики, применяемые в биомедицинских исследованиях

Лазерные методы диагностики находят широкое применение в задачах биомедицины: от задач анализа свойств единичных молекул и межмолекулярных взаимодействий отдельных соединений, до исследования свойств живых клеток и биотканей *in vitro* и *in vivo*. Методы лазерной спектроскопии и микроскопии

дополняют и расширяют инструментарий стандартных методов клинической диагностики, предоставляя возможность проводить неинвазивную диагностику с молекулярной специфичностью, высоким пространственным, спектральным и временным разрешением, недоступным другим методам [1; 20–35].

Среди наиболее перспективных методов лазерной оптической биомедицинской диагностики можно выделить:

- оптическую когерентную томографию, обладающую высоким пространственным разрешением и сравнительно большой глубиной зондирования (порядка 1-2 мм), но не обладающую высокой молекулярной специфичностью [20; 21];
- оптоакустическую спектроскопию и томографию, позволяющую оценивать содержание и распределение основных хромофоров тканей (воды, липидов, оксигемоглобина и дезоксигемоглобина) на больших глубинах (до единиц сантиметров) [22–24];
- микроспектроскопию спонтанного комбинационного рассеяния (КР), обладающую высокой молекулярной специфичностью, однако низким сечением возбуждения процесса спонтанного КР и малой эффективной глубиной сканирования [25–27];
- методы микроскопии когерентного антистоксового рассеяния света и вынужденного комбинационного рассеяния, обладающие высокой молекулярной специфичностью, однако требующие возбуждения молекул несколькими импульсами, что осложняет их применение на практике [28–30];
- многофотонную микроскопию, в которой проводится детектирование сигналов оптических гармоник и многофотонно-возбуждаемой флуоресценции с субклеточным пространственным разрешением на глубинах вплоть до 1 мм [31; 32], что позволяет разделить различные морфофункциональные участки тканей [1; 31–34].

- флуоресцентную спектроскопию и микроскопию с одно- и многофотонным возбуждением, в том числе кинетическую лазерную флуоресцентную микроспектроскопию, позволяющую определить характерные времена затухания флуоресцентных молекул-репортеров в различных пикселях изображения.

Обладая одновременно высокой молекулярной специфичностью и сравнительно высоким сечением возбуждения (10^{-20} – 10^{-16} см²), флуоресцентная спектроскопия используется в широком пуле биомедицинских исследований [3;35;36]. Для повышения контраста в некоторых случаях диагностику клеток и тканей проводят с использованием экзогенных красителей – веществ, обладающих контрастным оптическим откликом, искусственно вводимых в исследуемый образец. Однако применение экзогенных меток в изучении и характеристике клеток и тканей ограничено из-за оказываемого влияния красителей на биохимические процессы в клетках, фототоксичности самих агентов и продуктов их деградации [3;35;37] – лишь небольшое число экзогенных маркеров может быть использовано *in vivo*. Использование эндогенных, т.е. исходно присутствующих в тканях, флуорофоров решает проблему токсичности, а также предоставляет дополнительную информацию о биохимических процессах, происходящих в тканях [1]. При этом небольшое количество эндогенных флуорофоров используется на практике для характеристики и диагностики свойств биотканей, и только для части из них установлены конкретные механизмы формирования оптических свойств – указан конкретный флуорофор и описаны изменения его фотофизических характеристик, происходящие при варьировании внешних условий (локального окружения молекулы-флуорофора). Для ряда других флуорофоров, напротив, механизмы формирования фотофизических свойств до сих пор остаются неизвестными, оптический отклик таких систем в диагностике тканей используется феноменологически. Понимание механизмов формирования оптических свойств таких систем представляет интерес,

как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения для использования сигнала данных флуорофоров в биомедицинской диагностике. Рассмотрим подробнее основные эндогенные флуорофоры тканей и их флуоресцентные свойства.

1.2 Фотофизические характеристики эндогенных флуорофоров биотканей

1.2.1 Эндогенные флуорофоры с известным молекулярным строением и механизмами формирования оптических свойств

Среди эндогенных флуорофоров биотканей можно выделить ряд молекул-репортеров, молекулярная структура и фотофизические характеристики которых известны и укладываются в рамки стандартных представлений о флуоресцентных свойствах единичных молекул. Максимум эмиссии флуоресценции таких флуорофоров не зависит (или слабо зависит) от длины волны возбуждения оптического отклика в ближнем УФ, видимом или ближнем ИК диапазоне, в спектре поглощения можно выделить характерную полосу поглощения с максимумом, связанным с переходом из основного в первое возбужденное состояние флуорофора. Характерные ширины полосы поглощения и эмиссии составляют по порядку 50–100 нм, а величина Стоксова сдвига 50–100 нм ($\sim 3000\text{--}6000\text{ см}^{-1}$) [2;38].

Таковыми свойствами обладает, в частности, собственная флуоресценция белковых макромолекул, обусловленная наличием в белках остатков ароматических аминокислот – триптофана, тирозина и фенилаланина. Основной вклад в собственную флуоресценцию белков вносят триптофановые остатки, а флуоресцентный отклик тирозиновых остатков в триптофан-содержащих белках обычно затушен. Флуоресцентный отклик фенилаланина может быть возбужден только на длинах волн менее 260 нм и на 1-2 порядка ниже по интенсивности, чем интенсивность флуоресценции триптофановых и тирозиновых остатков [2;39]. Спектр возбуждения триптофановых остатков имеет максимум вблизи 280 нм и

максимум эмиссии флуоресценции в области 310–380 нм в зависимости от локального окружения аминокислотного остатка [40;41]. Положение максимума поглощения тирозиновых остатков сдвинуто в коротковолновую область относительно спектра поглощения триптофана (максимум на 275 нм), а эмиссия флуоресценции имеет максимум на 303–310 нм [42;43]. Параметры собственной белковой флуоресценции являются чувствительным индикатором как изменения состава белков в сложной смеси, так и изменения конформации белковых макромолекул, что позволяет использовать их в биомедицинской диагностике [44; 45].

Другим эндогенным флуорофором, часто используемым в биомедицинской диагностике, является никотинамиддинуклеотид (НАД) [1; 46]. Его окисленные и восстановленные формы, а также никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ), вовлечены в ряд ключевых метаболических процессов живых клеток. За счёт различий в оптических свойствах различных форм НАД(Ф) возможна оценка метаболического статуса клеток по сигналу их флуоресценции. Восстановленная форма никотинамиддинуклеотида (НАДН) имеет полосу поглощения в диапазоне 340 ± 30 нм и полосу эмиссии в диапазоне 460 ± 50 нм. Время жизни флуоресценции НАДН чувствительно к локальному окружению, в случае связывания молекулы НАДН с ферментом оно обычно принимает значения в диапазоне 1–6.5 нс, в то время как в свободном состоянии время жизни НАДН варьируется в диапазоне 0.3–0.8 нс [1]. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции НАДН представлены на рисунке 1.1.

Ещё одним флуоресцирующим коферментом, повсеместно присутствующим в клетках, является флавинадениндинуклеотид (ФАД). Аналогично НАДН, интенсивность и параметры флуоресценции ФАД и флавопротеинов, а также ряда других флавинов, являются индикаторами метаболического статуса живых клеток и биотканей [1]. ФАД обладает полосой поглощения вблизи 460 ± 30 нм и эмиссией на

550 нм \pm 50 нм (Рисунок 1.1). К эндогенным флуорофорам, обладающим известными оптическими свойствами можно также отнести: протопорфирин-IX, обладающий характерной узкой линией флуоресценции с максимумом на 610 нм, эффективно возбуждаемой на 410 нм; арахидоновую кислоту, витамин А (ретинол), билирубин [47]. Спектры возбуждения и эмиссии этих флуорофоров представлены на рисунке 1.1.

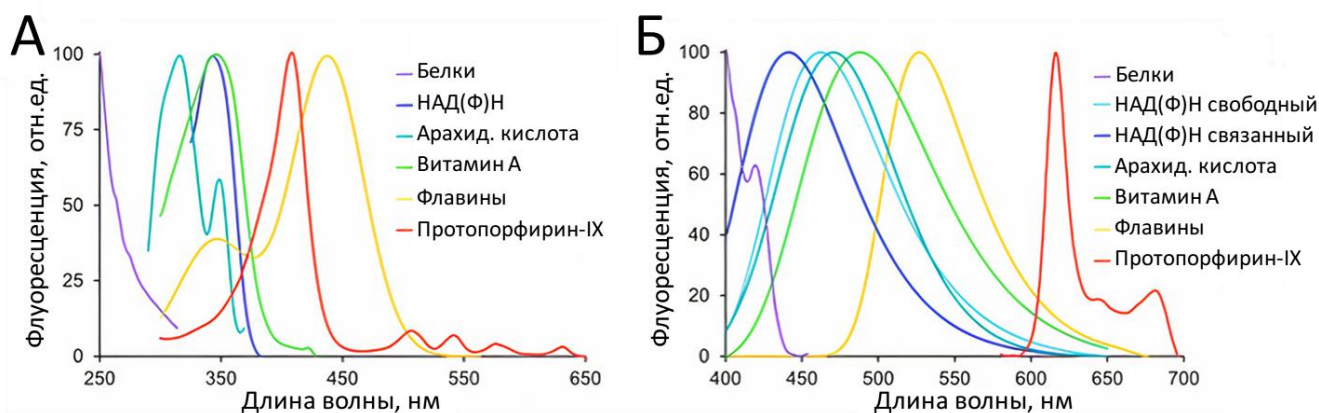


Рисунок 1.1 – Спектры возбуждения (А) и эмиссии флуоресценции (Б) некоторых эндогенных флуорофоров тканей. Спектры адаптированы из работы [47].

Описанные выше эндогенные флуорофоры можно сгруппировать по следующему признаку: во-первых, для указанных флуорофоров можно указать конкретную молекулу-репортер, ответственную за эмиссию флуоресценции. При этом наблюдаемые флуоресцентные свойства подчиняются правилу Вавилова-Каши [2] – положение максимума эмиссии, форма полосы флуоресценции и квантовый выход флуоресценции практически не зависят от длины волны возбуждения. Исключением из правила является зависимость эмиссии флуоресценции от длины волны возбуждения в диапазоне 290–310 нм в триптофановых остатках белков (т.н. red edge excitation effect) – подробное рассмотрение данного эффекта представлено в обзоре [40].

Как было указано выше, набор эндогенных флуорофоров биотканей не ограничивается перечисленными молекулами-репортерами. Интерес представляет другой класс флуоресцентных систем – гетерогенных систем флуорофоров (ГСФ), отличающихся по своим оптическим свойствам от единичных молекул. Для ГСФ свойственно отклонение наблюдаемой эмиссии флуоресценции от правила Вавилова-Каши – положение максимума эмиссии и квантовый выход флуоресценции данных флуорофоров существенно зависит от длины волны возбуждения. При этом характерно, что флуоресценцию таких систем возможно возбудить в широком диапазоне длин волн (300–800 нм), однако выделить конкретный флуорофор и соответствующую ему характерную полосу поглощения не удаётся – в таких системах спектр поглощения не имеет характерных локальных максимумов в ближнем УФ, видимом и ИК диапазоне и экспоненциально убывает с ростом длины волны возбуждения в диапазоне от 300 до 800 нм. Физические механизмы, объясняющие флуоресцентные свойства таких систем, являются предметом дискуссий. В ряде работ предполагается, что флуоресцентные свойства обусловлены лишь гетерогенностью молекулярного состава ГСФ, и наблюдаемые оптические свойства являются результатом усреднения оптических свойств отдельных невзаимодействующих молекулярных компонент многокомпонентной системы. В других работах предполагается, что природа наблюдаемых свойств связана с межмолекулярным взаимодействием хромофоров и флуорофоров системы.

В следующем разделе будут рассмотрены ГСФ, которые встречаются в биотканях и обладают указанными оптическими свойствами. Затем будут обсуждены предполагаемые физические механизмы, лежащие в основе формирования фотофизических свойств ГСФ.

1.2.2 Стационарные оптические свойства гетерогенных систем эндогенных флуорофоров биотканей

К эндогенным флуорофорам биотканей, обладающим оптическими свойствами ГСФ – бесструктурным, экспоненциально убывающим с длиной волны поглощением, флуоресценцией, параметры которой зависят от длины волны возбуждения – можно отнести меланин [4;48;49], структурные белки тканей (коллаген, эластин, кератин) [5;50;51], липофусцин [6;52;53], агрегаты белков [7;13;54;55], некоторые белки в растворах [56–60], а также конечные продукты гликирования тканей, образующиеся в результате неспецифического взаимодействия белков и сахаров [8;61–63].

Всем указанным системам присущи следующие ключевые свойства. Во-первых, указанные системы обладают гетерогенным молекулярным составом. Так, меланин состоит из большого числа различных олигомеров, образующихся в результате процессов окисления тирозина [9]. Липофусцин является гетерогенной смесью продуктов окисления липидов, белков и аминокислот [52]. В ряде работ указывается, что флуоресценция структурных белков – коллагена, кератина, эластина – обусловлена гетерогенными флуоресцентными сшивками, образующимися в результате окисления и гликирования [51;64;65]. В ряде работ демонстрируется, что флуоресценция агрегатов и мономеров белков может быть связана с наличием гетерогенных продуктов окисления [10;66;67]. Во-вторых, большая часть систем обычно существует в форме молекулярных агрегатов – частиц, состоящих из большого числа потенциальных молекулярных флуорофоров, находящихся на малом расстоянии в сравнении с флуорофорами в растворе (менее 1 нм), что потенциально может приводить к существенному влиянию межмолекулярного электронного взаимодействия на наблюдаемые оптические свойства данных систем. Подробнее агрегационные свойства некоторых соединений будут рассмотрены в разделе 1.3 Главы.

Среди указанных ГСФ наиболее изученной системой является меланин. Меланин представляет собой гетерогенную смесь соединений, образующихся в организме в результате каскада окислительных реакций с участием исходной молекулы-прекурсора – аминокислоты L-тирозина [9]. В зависимости от конкретного биохимического пути окисления, можно выделить различные подвиды меланинов, отличающиеся по своим свойствам – эумеланин, феомеланин, нейромеланин и пиомеланин [68]. Эумеланин, пигмент, наиболее часто встречающийся в коже, является гетерогенным полимером, мономерами которого являются 5,6-дигидроксииндол, 5,6-дигидроксииндольная-2-карбоновая кислота (DHICA) и пиррол, имеющие различные окислительные модификации; мономерами полимерных цепочек феомеланина являются производные бензотиазола [9]. В дальнейшем отдельные олигомеры могут агрегировать и формировать наночастицы и микрочастицы меланина, которые используются специализированными клетками (меланоцитами) для антиоксидантной и фото-защиты клеток организма [69]. Поскольку различия в оптических свойствах различных видов меланина не существенны, далее в данной работе разделение между типами меланина производиться не будет.

На рисунке 1.2А представлен спектр поглощения синтетического меланина из работы [48]. Как видно, поглощение меланина монотонно убывает с увеличением длины волны. Наблюдаемую монотонную зависимость поглощения в ряде работ описывают формулой (1.1) [17;49]:

$$A(\lambda) \sim \exp\left(-\lambda/\Lambda\right), \quad (1.1)$$

где λ – длина волны поглощения, Λ – параметр, зависящий от свойств вещества, характеризующий величину спектрального наклона зависимости поглощения от длины волны в полулогарифмическом масштабе. Спектры флуоресценции синтетического меланина из работы [48], полученные при возбуждении на

различных длинах волн, представлены на рисунке 1.2Б. Как видно, положение максимума спектра флуоресценции монотонно сдвигается с увеличением длины волны возбуждения, при этом уменьшается ширина полосы эмиссии флуоресценции на полувывсоте, а квантовый выход флуоресценции φ , охарактеризованный как (формула 1.2):

$$\varphi = \frac{\int F(\lambda_{em}, \lambda_{exc}) d\lambda_{em}}{A(\lambda_{exc})}, \quad (1.2)$$

где $F(\lambda_{em}, \lambda_{exc})$ – интенсивность флуоресцентного отклика, возбужденного на длине волны λ_{exc} , для данной длины волны эмиссии λ_{em} , монотонно убывает с ростом длины волны возбуждения и уменьшается в ~ 14 раз при увеличении длины волны возбуждения от 350 до 520 нм (Рисунок 1.2В). При этом абсолютные значения квантового выхода по порядку составляют 10^{-3} – 10^{-2} [70], что типично не только для меланина, но и для других ГСФ.

Меланину и другим гетерогенным системам флуорофоров также свойственны большие значения Стоксова сдвига $\Delta\nu$ (формула 1.3):

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_{em}} - \frac{1}{\lambda_{exc}} [\text{см}^{-1}], \quad (1.3)$$

где λ_{em} – положение максимума эмиссии флуоресценции на данной длине волны возбуждения λ_{exc} . Так для меланина Стоксов сдвиг убывает с $\sim 20000 \text{ см}^{-1}$ при возбуждении на 250 нм до $\sim 3000 \text{ см}^{-1}$ на 500 нм (Рисунок 1.2В). Типичные значения Стоксова сдвига для органических флуорофоров обычно составляют 3000 – 6000 см^{-1} [2;38].

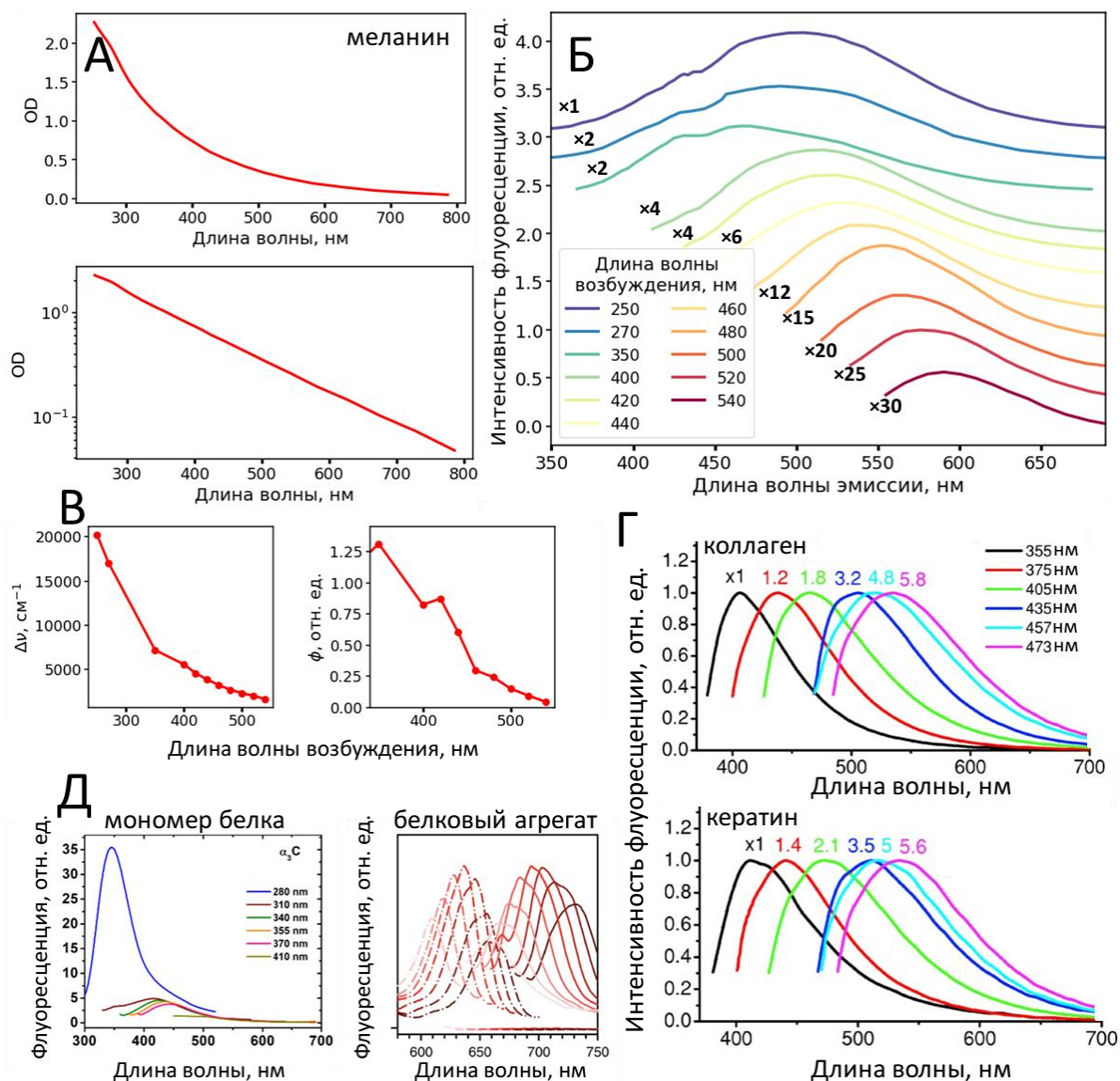


Рисунок 1.2 – А, Б) Спектры поглощения (А) и эмиссии флуоресценции (Б) синтетического меланина, адаптированные из работы [48]. В) Зависимость Стоксова сдвига $\Delta\nu$ и относительного квантового выхода ϕ флуоресценции, рассчитанные для спектров флуоресценции и поглощения, представленных на панелях (А, Б). Г) Спектры эмиссии флуоресценции, коллагена и кератина, полученные на различных длинах волн возбуждения из работы [5]. Д) Спектры эмиссии флуоресценции мономера белка $\alpha_3\text{C}$ из работы [60] и белкового агрегата из работы [13]. Множители, указанные на панелях Б и Г, характеризуют количество раз, в которое максимум интенсивности эмиссии флуоресценции на данной длине волны возбуждения ниже максимального значения интенсивности эмиссии флуоресценции для всех длин волн возбуждения.

Аналогичными свойствами обладает флуоресцентный отклик, ассоциированный с гетерогенными флуоресцентными сшивками структурных белков тканей – коллагена, эластина и кератина. Коллаген и эластин составляют основу соединительной ткани, а кератин является основным структурным белком живого и неживого эпидермиса [1]. Будучи белками, которые длительное время находятся в тканях, они подвергаются химической модификации в результате процессов окисления и гликирования, что приводит к ассоциированному с ними флуоресцентному отклику в видимом спектральном диапазоне. Примеры спектров флуоресценции коллагена и кератина из работы [5], полученных при возбуждении эмиссии в видимом диапазоне, представлены на рисунке 1.2 Г. Как видно, спектры эмиссии сдвигаются в длинноволновую область при увеличении длины волны возбуждения, при этом наблюдается падение интегральной интенсивности флуоресценции с увеличением длины волны возбуждения. Аналогичные закономерности в поведении спектров эмиссии флуоресценции в зависимости от длины волны возбуждения наблюдаются и для эластина [50]. Бесструктурное поглощение в видимом диапазоне данных у белков на несколько порядков ниже поглощения триптофановых остатков в их составе, однако, оно увеличивается при окислении, например, при фотоокислении с помощью УФ облучения [71]. Предполагается, что флуоресцентный отклик структурных белков в видимом диапазоне связан с образованием флуоресцентных сшивок (например, пиридинолина, диоксипиридинолина и пентозидина в коллагене [72]), возникающих в результате гликирования и окисления [73].

В ряде работ демонстрируется, что не только коллаген, эластин и кератин, но и некоторые другие белки и агрегаты белков и пептидов также обладают характерным флуоресцентным откликом в видимом диапазоне, зависящим от длины волны возбуждения [56–60;74] (Рисунок 1.2Д). При этом свойства флуоресцентного отклика в видимой области спектра, описываемого авторами для единичных белков

[56–60;74], идентичны свойствам флуоресцентного отклика меланина и структурных белков. Интересным является тот факт, что возбуждение флуоресценции в таких системах возможно и в ближнем инфракрасном диапазоне спектра в области прозрачности биотканей (600–900 нм), что позволяет детектировать сигнал от белковых агрегатов на сравнительно большой глубине (до нескольких мм) [13].

К ГСФ также можно отнести липофусцин. Липофусцином называют гетерогенные белково-липидные агрегаты, накапливающиеся в результате жизнедеятельности клеток [52]. Накопление липофусцина активно происходит в клетках эпителия глаза человека, при этом автофлуоресцентные свойства липофусцина позволяют диагностировать патологические изменения в сетчатке [52;53]. Аналогично другим системам, интенсивность и форма полосы флуоресценции липофусцина зависит от длины волны возбуждения [6], а спектр поглощения плавно спадает с увеличением длины волны в видимом диапазоне [6;75].

Представленный краткий обзор демонстрирует наличие нескольких систем эндогенных флуорофоров тканей, обладающих гетерогенным молекулярным составом и схожими оптическими свойствами, природа которых является “неклассической” в смысле отклонения от законов, известных для единичных молекул-флуорофоров. Далее, в Разделе 1.3, рассмотрены основные гипотезы о механизмах формирования наблюдаемых оптических свойств ГСФ, а затем, в Разделе 1.4, некоторые применения оптического отклика ГСФ для биомедицинской диагностики.

1.3 Механизмы формирования фотофизических свойств гетерогенных систем эндогенных флуорофоров

Гипотезы о механизмах формирования флуоресцентного отклика ГСФ можно разделить на два типа. В гипотезах первого типа предполагается, что наблюдаемые

оптические свойства являются исключительно результатом усреднения оптических свойств отдельных невзаимодействующих молекулярных хромофоров и флуорофоров, входящих в систему. В рамках данной модели для стационарных спектров поглощения $A(\lambda)$ и флуоресценции $F(\lambda_{em}, \lambda_{exc})$ могут быть записаны следующие выражения (формулы 1.4, 1.5):

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^N n_i \sigma_i(\lambda), \quad (1.4)$$

$$F(\lambda_{em}, \lambda_{exc}) = \sum_{i=1}^N \eta_i n_i \sigma_i(\lambda_{exc}) S_i(\lambda_{em}), \quad (1.5)$$

где n_i – концентрация i -го флуорофора в смеси, $\sigma_i(\lambda)$ – сечение поглощения на длине волны λ (или длине волны возбуждения λ_{exc}), η_i – квантовый выход флуоресценции, $S_i(\lambda_{em})$ – интенсивность эмиссии флуоресценции на длине волны λ_{em} для i -го флуорофора в смеси, состоящей из N флуорофоров. Таким образом, в рамках данной модели предполагается, что на различных длинах волн возбуждения происходит возбуждение различных подансамблей флуорофоров в системе. Аналогично, в рамках данной модели и другие аддитивные фотофизические параметры ГСФ могут быть представлены в виде средневзвешенной по концентрациям суммы.

В другом пуле гипотез выдвигается предположение, что наблюдаемые оптические свойства не являются результатом исключительно усреднения оптических свойств отдельных молекулярных компонент ГСФ. Напротив, предполагается, что наблюдаемые оптические свойства могут быть результатом межмолекулярного электронного взаимодействия, возникающего между отдельными молекулярными компонентами системы, приводящего к изменению оптических свойств ГСФ в сравнении с оптическими свойствами отдельных невзаимодействующих молекул-флуорофоров. Действительно, большинство рассмотренных систем флуорофоров

существуют в форме супрамолекулярных агрегатов различного размера (от ~1 нм до ~1 мкм) – электронное взаимодействие между флуорофорами может происходить внутри одного агрегата, или же взаимодействие может происходить между различными частями одной макромолекулы. В таком случае, выражения для спектров поглощения и флуоресценции системы должны включать слагаемые, ответственные за парное взаимодействие между *i*-м и *j*-м флуорофорами системы, тройное и т.д. (формулы 1.6, 1.7):

$$A(\lambda) = \sum_i n_i \sigma_i(\lambda) + \sum_{i<j} n_i n_j \sigma_{ij}(\lambda) + \dots, \quad (1.6)$$

$$F(\lambda_{em}, \lambda_{exc}) = \sum_i \eta_i n_i \sigma_i(\lambda_{exc}) S_i(\lambda_{em}) + \sum_{i<j} \eta_{ij} n_i n_j \sigma_{ij}(\lambda_{exc}) S_{ij}(\lambda_{em}) + \dots, \quad (1.7)$$

где величины n_i , η_i , $\sigma_i(\lambda)$, $S_i(\lambda_{em})$ соответствуют концентрации, квантовому выходу, сечению поглощения на длине волны λ (возбуждения λ_{exc}), интенсивности флуоресценции на длине волны эмиссии λ_{em} для *i*-го флуорофора, соответственно, а величины $\sigma_{ij}(\lambda_{exc})$, η_{ij} , $S_{ij}(\lambda_{em})$ характеризуют сечение поглощения, квантовый выход и спектральную зависимость эмиссии флуоресценции для полос, возникающих в результате взаимодействия *i*-го и *j*-го флуорофора в системе.

Для различных видов гетерогенных систем (например, меланина или продуктов окисления и гликирования белков) указанные классы гипотез имеют различные формулировки, а также различные экспериментальные и теоретические обоснования справедливости гипотез об “усреднении” или “электронном взаимодействии”, лежащих в основе формирования их оптических свойств. Ниже для каждой системы (меланина, структурных белков, липофусцина, агрегатов и мономеров белков) будут рассмотрены основные экспериментальные и теоретические результаты, представленные на данный момент в литературе, подтверждающие ту или иную гипотезу.

1.3.1 Модели химического и структурного беспорядка формирования фотофизических свойств меланина

Модель усреднения, или, если придерживаться терминологии работ, связанных с оптикой меланина, модель химического беспорядка (chemical disorder), и модель межмолекулярного электронного взаимодействия (модель структурного беспорядка, geometrical/structural disorder) в равной степени представлены в работах, связанных с исследованием и описанием фотофизических свойств меланина.

1.3.1.1 Модель химического беспорядка

Гипотеза “химического беспорядка” для объяснения оптических свойств меланина как результата усреднения оптических свойств отдельных невзаимодействующих между собой мономеров и олигомеров, составляющих меланин, впервые была введена в работе [16] и далее использована и в других работах [16;17;70;76;77]. Исторически, модель невзаимодействующих флуорофоров/хромофоров для объяснения свойств меланина была использована и в более ранних работах [77].

В рамках модели химического беспорядка авторы [16] экспериментально и с помощью *ab initio* квантово-химических вычислений продемонстрировали, что олигомеры (димеры, тримеры и т.д.), образуемые из прекурсора меланина ДНІСА в результате окислительной полимеризации, обладают различными энергиями перехода между основным и первым возбужденным состоянием [16]. При этом с увеличением размера олигомера величина энергетической щели между основным и первым возбужденным состоянием ΔE снижается до $\Delta E_{dimer}=2.13$ эВ для димера (соответствует длине волны перехода ~ 580 нм) со значения $\Delta E_{mono}=3.04$ эВ (~ 400 нм), соответствующего величине энергетической щели используемого в расчёте мономера. При этом за счёт суммирования спектров отдельных олигомеров с различными конфигурациями возможно получение спектра поглощения, не обладающего выделенными локальными максимумами.

Использование мономеров, обладающих другим строением (например, использование молекул гидрохинона, индолхинона и др. в качестве прекурсоров) для расчёта спектров различных олигомеров меланина принципиально не изменяет наблюдаемую картину оптических свойств. Поглощение олигомеров так же сдвигается в длинноволновую область, а усреднение спектров поглощения олигомеров различной конфигурации приводит к плавной зависимости поглощения в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне спектра [78–80]. На рисунке 1.3А представлены отдельные мономеры, спектры их поглощения, а также результирующие спектры отдельных тетрамеров и усредненный спектр поглощения меланина из работы [78].

Заметим, что увеличение длины волны максимума поглощения с увеличением размера олигомера соответствует общей зависимости ширины энергетической щели от длины сопряжения (числа чередующихся одинарных и двойных С=С связей) в органических молекулах. Действительно, в простейшем случае, в таких молекулах электрон на π -орбитали делокализован по всей цепочке сопряжения, откуда можно получить оценку зависимости ширины запрещенной зоны ΔE от длины сопряжения L как $\Delta E \sim 1/L^2$, из которой видно, что полоса поглощения и эмиссии флуорофоров должна сдвигаться в длинноволновую область спектра с увеличением длины сопряжения [81]. Аналогичный сдвиг, как видно на рисунке 1.3А, происходит при олигомеризации мономеров-прекурсоров меланина.

Наблюдаемый флуоресцентный отклик меланина также может быть интерпретирован с точки зрения модели химического беспорядка. Так, в работах [4;48] локальные максимумы в спектрах возбуждения флуоресценции синтетического и природного меланина (Рисунок 1.3Б), интерпретируются как локальные максимумы возбуждения флуоресценции флуорофоров различного химического строения, обладающих различной длиной волны перехода.

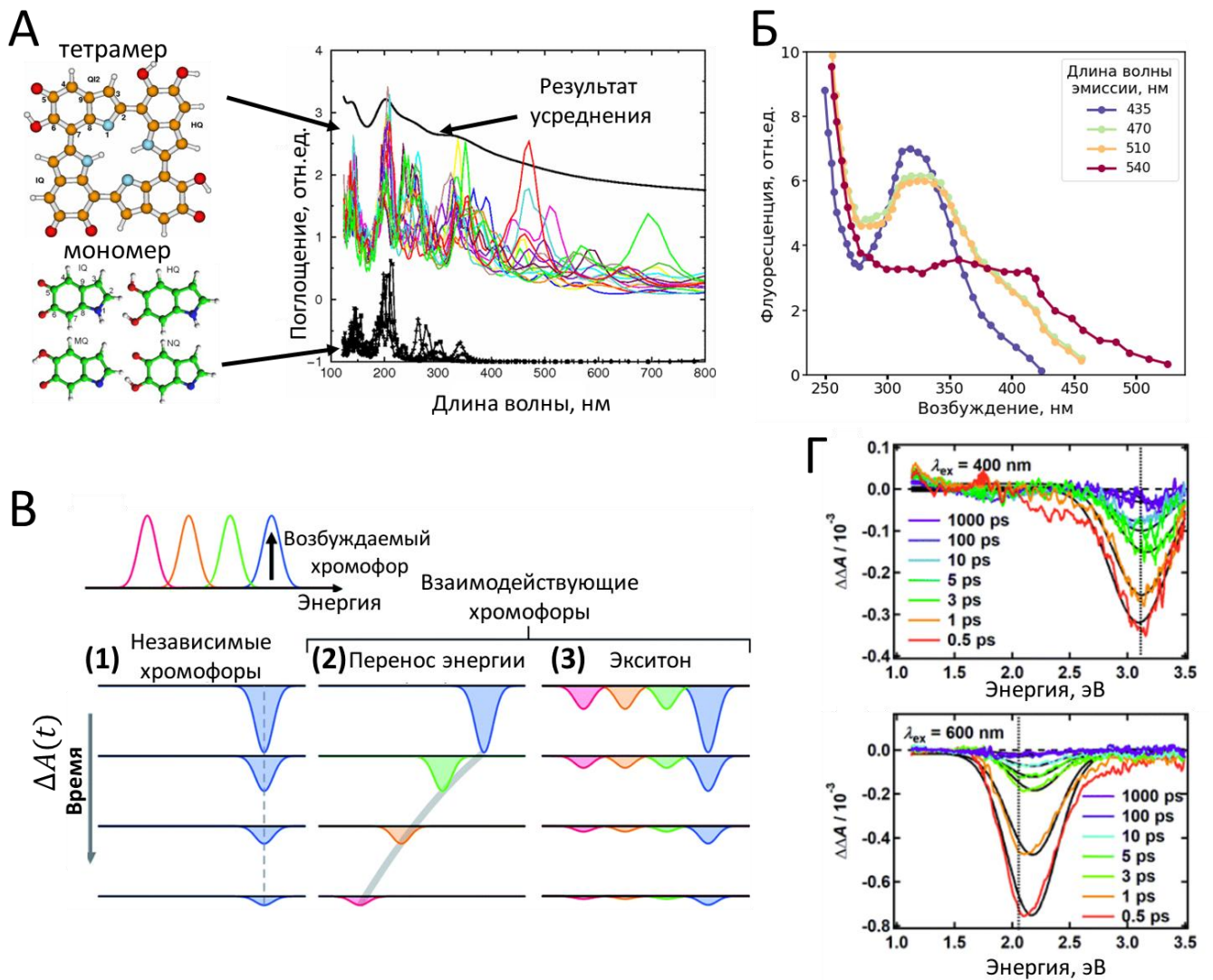


Рисунок 1.3 – А) Примеры мономеров и тетрамеров, входящих в состав меланина, спектры поглощения отдельных мономеров и тетрамеров с различным химическим строением, а также результат усреднения спектров поглощения из работ [78;79]. Б) Спектры возбуждения эмиссии флуоресценции меланина, адаптированные из работы [48] В) Модели изменения наведенного поглощения ΔA , связанного с обеднением основного состояния (“ground state bleaching”), в экспериментах по спектроскопии накачки-зондирования для меланина в случае модели меланина как (1) невзаимодействующих флуорофоров\хромофоров (2) в случае наличия взаимодействия, приводящего к некогерентному переносу или (3) возникновению экситонных состояний. Адаптировано из работы [19]. Г) Спектры наведенного поглощения ΔA для длин волн накачек $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$ и $\lambda_{ex} = 600 \text{ nm}$ для различных времён задержек между импульсом накачки и зондирующим излучением из работы [19].

Значительную информацию о фотофизических механизмах, формирующих оптический отклик гетерогенных систем флуорофоров могут предоставить методы лазерной спектроскопии. В частности, для выделения в меланине подансамбля хромофоров, поглощающих из основного состояния на определенной длине волны, может быть применен метод спектроскопии накачки-зондирования с временным разрешением [19;82–85]. В методе накачки-зондирования излучение накачки на длине волны λ_{pump} переводит систему из основного в возбужденное состояние, а использование зондирующего импульса позволяет оценить зависимость отклонения коэффициента поглощения системы в возбужденном состоянии от поглощения из основного состояния $\Delta A(\lambda_{probe}, \tau)$ на длине волны зондирующего излучения λ_{probe} от времени задержки между импульсом накачки и зондирования τ . Приводить к изменению величины наведенного поглощения ΔA могут несколько процессов:

- отрицательный вклад в ΔA может быть связан с обеднением основного состояния хромофоров, эффективно поглощающих на длине волны накачки (ground state bleaching);
- отрицательный вклад в ΔA также может быть обусловлен вынужденным излучением из возбужденного состояния (stimulated emission);
- помимо вынужденного излучения, может наблюдаться сигнал эмиссии флуоресценции системы (отличной по длинам волн и характерным величинам задержки τ от вынужденного излучения);
- положительный по величине вклад в ΔA обычно связан с поглощением хромофоров, находящихся в возбужденном состоянии, за счёт переходов из первого возбужденного в высшие возбужденные состояния (excited state absorption) или за счёт образования новых интермедиатов, образующихся между молекулами в возбужденном состоянии (эксимеров).

Авторы [19] показали, что при использовании различных длин волн накачки в кинетике наведенного поглощения ΔA природного меланина, выделенного из *Sepia*

officinalis, наблюдается отрицательный сигнал, связанный с явлением обеднения основного состояния. При этом авторы предположили, что в случае невзаимодействующих хромофоров полоса ΔA , связанная с обеднением основного состояния, должна иметь локальный минимум на длине волны накачки, а её положение не должно зависеть от времени задержки между импульсом накачки и временем задержки (случай (1) на рисунке 1.3В). Напротив, в случае значимого влияния межмолекулярного взаимодействия между хромофорами, поглощающими на различных длинах волн, при некогерентном переносе возбуждения, положение минимума наведенного поглощения должно зависеть от времени задержки между накачкой и зондированием, а в случае когерентного переноса (возникновения экситонных состояний), полоса наведенного поглощения должна быть широкой (случаи (2) и (3) на рисунке 1.3В). Экспериментально авторы [19] наблюдали, что при изменении длин волн накачки положение минимума “спектральной дыры” наведенного поглощения ΔA совпадает с длиной волны накачки и не зависит от времени задержки между импульсами накачки и зондирования (Рисунок 1.3 В). Также было показано, что полуширина (ширина на полувысоте) спектрального провала поглощения из возбужденного состояния значительным образом не изменяется при изменении длины волны возбуждения и составляет 0.4 эВ, что авторы объяснили связью данной полосы поглощения с возбуждением $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов в олигомерах меланина, поглощающих на заданной длине волны возбуждения [19]. Таким образом, рассмотренные результаты свидетельствуют в пользу модели невзаимодействующих хромофоров в формировании оптических свойств меланина, однако в этой же работе авторы наблюдали положительное наведенное поглощение ΔA в широком спектральном диапазоне (400–1000 нм), из-за чего было предположено, что наличие когерентного переноса энергии в меланине не может быть полностью исключено [19].

1.3.1.2 Модель структурного беспорядка

В гипотезах, альтернативных модели химического беспорядка, демонстрируется, что для достижения наблюдаемых оптических свойств меланина достаточно наличия межмолекулярного взаимодействия между отдельными идентичными по своей структуре молекулами, а гетерогенность молекулярного состава в таких системах не является необходимой. Значимым при этом является то, что меланин представляет собой неупорядоченный агрегат, в котором проявляется “гетерогенность” величины межмолекулярного электронного взаимодействия между отдельными молекулами агрегата.

Действительно, отдельные олигомеры меланина (например, тетрамеры, показанные на верхней части Рисунок 1.4А), стремятся образовать агрегаты, в которых единичные “листы” олигомера складываются вдоль нормали к плоскости “листа”, как показано на рисунках 1.4 А, Б, что подтверждается как результатами молекулярной динамики, так и экспериментально с помощью просвечивающей электронной микроскопии [76;86]. При этом в агрегате меланина образуются “домены”, в которых олигомеры частично упорядочены (пример смоделированной системы и ПЭМ- изображение агрегата показаны на рисунке 1.4 Б,В), а расстояние между олигомерами в таком агрегате составляет 3–4Å (Рисунок 1.4Г) [76;86]. По мнению ряда исследователей, в данной системе нельзя пренебрегать межмолекулярным электронным взаимодействием при рассмотрении её оптических свойств, и модель усреднения является недостаточной для описания оптических свойств меланина [17;87].

В работе [17] с помощью методов молекулярной динамики и квантовой химии исследовался вопрос влияния межмолекулярного взаимодействия олигомеров меланина на оптические свойства меланина для олигомеров различных конфигураций, ранее исследованных в [78;79]. Авторы [17] показали, что для наблюдения монотонной зависимости величины поглощения от длины волны

достаточно использовать один тип олигомера, по-разному взаимодействующего с его ближайшим окружением (в моделировании изменялась относительная ориентация и расстояние между олигомерами). Для оценки оптических свойств больших агрегатов авторы использовали модель экситонов Френкеля, исходно введенную для объяснения оптических свойств молекулярных кристаллов. В рамках модели экситонов Френкеля предполагается, что в молекулярном кристалле за счёт снятия вырождения при взаимодействии молекул, находящихся в одном электронном состоянии, образуется разрешенная энергетическая зона, в которой существует коллективное возбуждение (экситон). При этом энергетическая ширина этой возбужденной зоны пропорциональна величине межмолекулярного взаимодействия между молекулами [81].

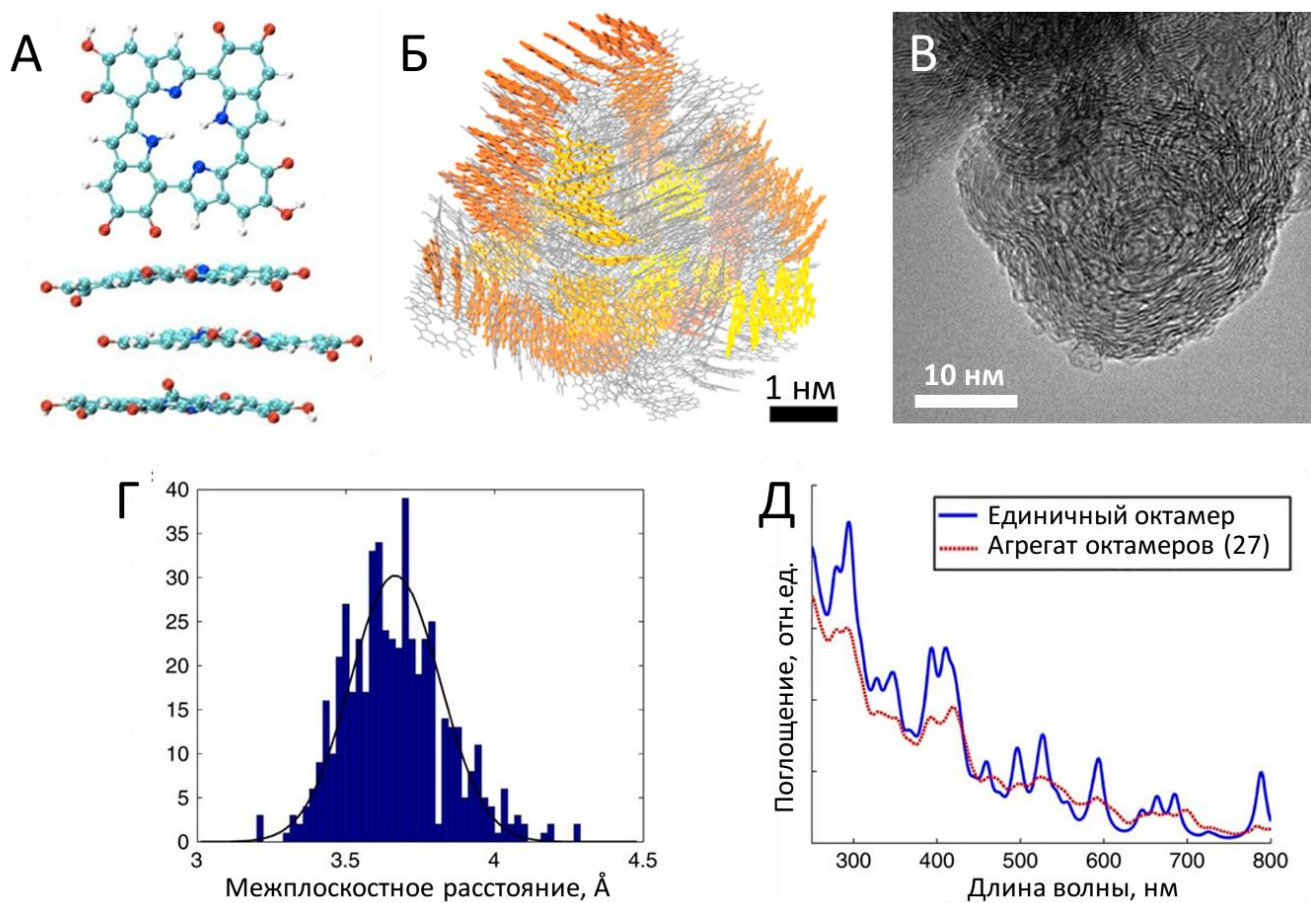


Рисунок 1.4. – А) Единичный олигомер, входящий в состав агрегата меланина, и энергетически выгодный вариант агрегации трёх составляющих меланин олигомеров из работы [17]. Б) Структура агрегата меланина, состоящего из 400 тетрамеров меланина, полученных в результате моделирования методом молекулярной динамики из работы [88]. В) Изображение агрегата меланина, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии, из работы [86]. Г) Расстояние между отдельными олигомерами меланина, полученные в результате моделирования агрегата меланина методом молекулярной динамики из работы [17]. Д) Спектр поглощения отдельного октамера меланина (синяя кривая) и спектр поглощения агрегата меланина, составленного из 27 октамеров, полученный в результате моделирования [17].

Авторы [17] предположили, что, в отличие от экситонов в молекулярных кристаллах с регулярным взаимным расположением молекул, в которых действует правило отбора по импульсу, и поглощение наблюдается только на “дне” экситонной зоны, величина силы осциллятора (сечение поглощения) для экситонной зоны в агрегате меланина равномерно распределена по всей ширине энергетической щели, а

монотонное убывание сечения поглощения с ростом длины волны может быть объяснено правилом сумм Томаса-Райхе-Куна.

Некоторые следствия экситонной модели, рассмотренные теоретически в [17;89], были проверены экспериментально. В частности, с помощью метода спектроскопии накачки-зондирования [19;85] была подтверждена зависимость полуширины полосы возбуждения от длины волны возбуждения (Рисунок 1.3Г) в пространстве длин волн (или же отсутствие зависимости ширины энергетической зоны в энергетическом представлении). Роль экситонов во флуоресцентном отклике меланина была продемонстрирована экспериментально в работе [90].

В работе [91] роль межмолекулярного взаимодействия в формировании оптических свойств меланина была оценена с помощью спектроскопии накачки-зондирования с накачкой в ближнем УФ и видимом диапазоне спектра (280–600 нм) и зондированием в диапазоне поглощения колебательных линий органических соединений ($500\text{--}2000\text{ см}^{-1}$). Авторы [91] предположили, что если за поглощение на различных длинах волн ответственны хромофоры, обладающие различным молекулярным строением, то такие отличия должны наблюдаться в спектрах поглощения колебательных мод возбужденного состояния, полученных на различных длинах волн накачки в видимом диапазоне (Рисунок 1.5А). Напротив, если за поглощение в видимом диапазоне ответственны состояния, связанные с межмолекулярным взаимодействием, принципиальных отличий в спектрах поглощения из возбужденного состояния, быть не должно [91]. Экспериментально различий в спектрах колебательных мод хромофоров, возбужденных на различных длинах волн накачки, не наблюдалось (Рисунок 1.5Б), что, по мнению авторов [91], свидетельствует о том, что межмолекулярное взаимодействие имеет значительное влияние на формирование оптических свойств меланина в видимом диапазоне спектра [91].

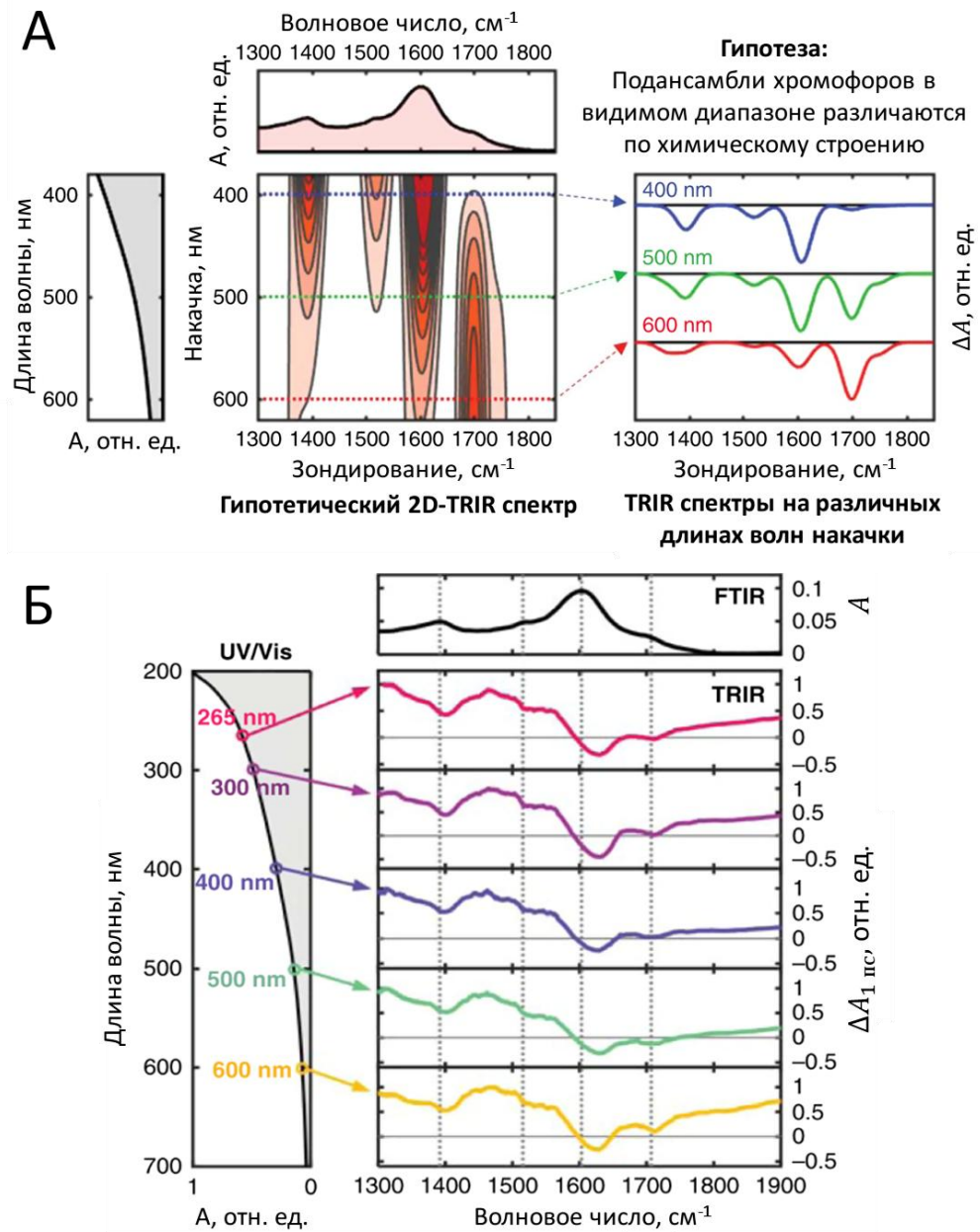


Рисунок 1.5 – А) Иллюстрация эксперимента по спектроскопии накачки-зондирования меланина с накачкой электронной подсистемы в видимом диапазоне спектра и зондированием колебательных мод образца в ИК диапазоне. В случае возбуждения накачкой хромофоров с различным химическим или структурным строением, спектры ИК поглощения из возбужденного состояния должны значительным образом различаться для различных длин волн накачки. Б) Стационарный спектр ИК поглощения из основного состояния (FTIR) и спектр ИК поглощения из возбужденного состояния для различных длин волн накачки (TRIR) меланина из работы [91].

Подробное исследование влияния агрегации и межмолекулярного взаимодействия на оптические свойства меланина было произведено в работах группы Варрена (Warren W.) [83–85], из экспериментов которой следует, по всей видимости, справедливость как модели химического, так и модели структурного беспорядка. В серии работ [83–85] авторы показали, что как низкомолекулярные фрагменты с молекулярной массой менее 2 кДа, так и фрагменты с массой более 2 кДа обладают монотонно спадающим спектром поглощения в видимом диапазоне спектра и флуоресцентным откликом в видимом диапазоне. При этом агрегация олигомеров приводит к уширению спектров поглощения меланина, в частности, с увеличением степени агрегации увеличивается ширина полосы поглощения хромофоров, что может быть экспериментально обнаружено с помощью спектроскопии накачки-зондирования. Примеры кинетики наведенного поглощения для олигомеров меланина и агрегировавших частиц, а также блок-схема, поясняющая наблюдаемый эффект, представлены на рисунке 1.6. Авторы показали, что полоса наведенного поглощения ΔA , связанная с обеднением возбужденного состояния хромофоров, поглощающих на длине волны накачки, спектрально уширена в агрегатах меланина (Рисунок 1.6Б) и уменьшается при дезагрегации частиц в щелочной среде (Рисунок 1.6В).

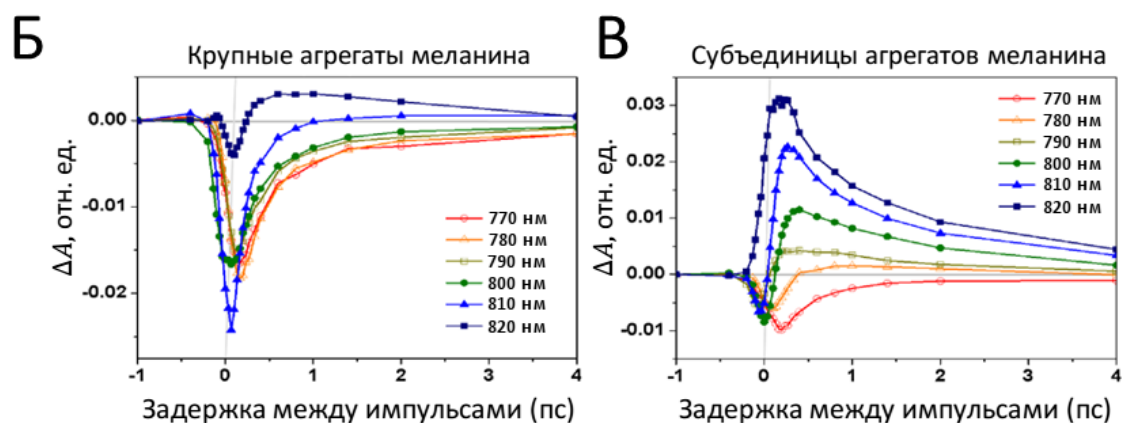
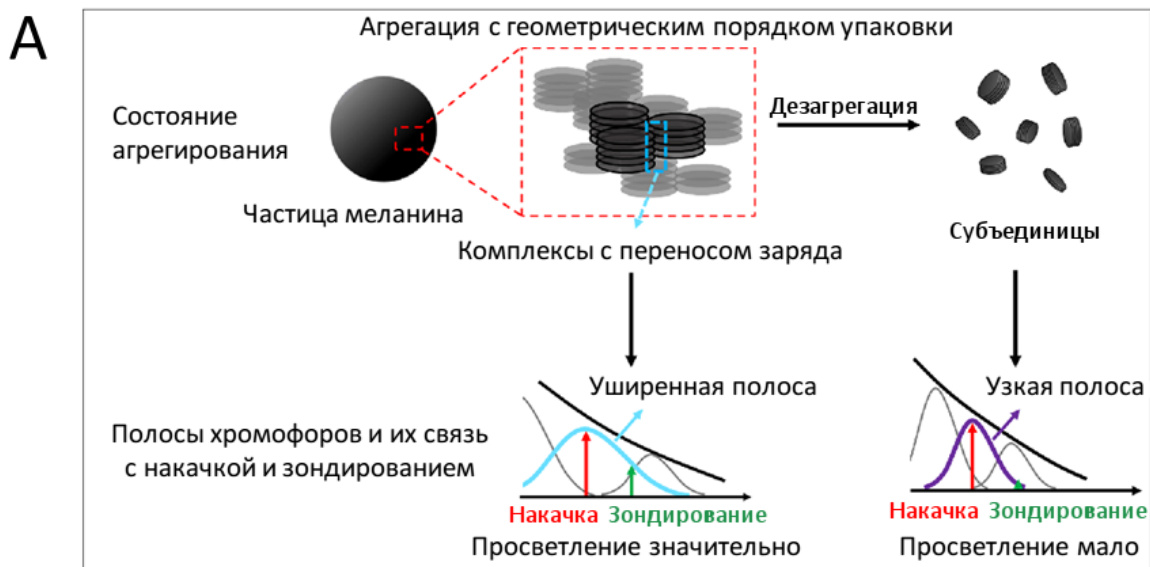


Рисунок 1.6. – А) Блок-схема изменения оптического отклика, наблюдаемого в экспериментах по спектроскопии накачки-зондирования цельных наночастиц меланина и дезагрегированных частиц меланина. В случае агрегации наблюдается уширение линии поглощения. Б, В) Кинетика изменения наведенного поглощения цельных частиц меланина (Б) и дезагрегированных частиц меланина (В) для различных длин волн зондирующего излучения. Наличие отрицательного отклика наведенного поглощения в цельных частицах меланина на рисунке Б свидетельствует об уширении линии поглощения в цельных частицах меланина. Адаптировано из работы [83].

1.3.2 Модели усреднения и электронного взаимодействия, описывающие оптические свойства липофусцина.

Оптические свойства липофусцина, в первую очередь, его флуоресцентные свойства, также рассматривались с точки зрения модели усреднения оптических

свойств невзаимодействующих флуорофоров [52;53;75] и модели межмолекулярного взаимодействия [6].

В липофусцине можно выделить более 20 различных флуоресцентных компонент [53;92;93], при этом считается, что бисретиноиды и их продукты фотоокисления и фотодеградации являются основными источниками флуоресценции. В частности, доминирующим классом флуорофоров в ряде работ считается бисретиноид A2E [94], однако не всегда распределение этого молекулярного флуорофора скоррелировано с распределением флуоресцентного отклика липофусцина в тканях [95].

В работе [6], напротив, флуоресцентный отклик в липофусцине рассматривался с точки зрения межмолекулярного взаимодействия, а зависимость флуоресцентного отклика липофусцина от длины волны возбуждения интерпретируется с точки зрения переноса возбуждения. Авторы [6] обратили внимание, что основное изменение флуоресцентного отклика липофусцина при изменении длины волны возбуждения происходит на синем краю спектра эмиссии флуоресценции, при этом красный край флуоресцентного отклика остаётся практически неизменным (Рисунок 1.7А), и для флуоресцентного отклика липофусцина наблюдается зависимость величины поляризации флуоресценции $P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ от длины волны эмиссии. С ростом длины волны эмиссии величина поляризации флуоресценции монотонно убывает до значений близких к нулю (Рисунок 1.7Б), что авторы связали с переносом возбуждения от флуорофоров, максимум эмиссии которых смещен в коротковолновую область, на флуорофоры/хромофоры, имеющие максимум поглощения и эмиссии в длинноволновом диапазоне [6].

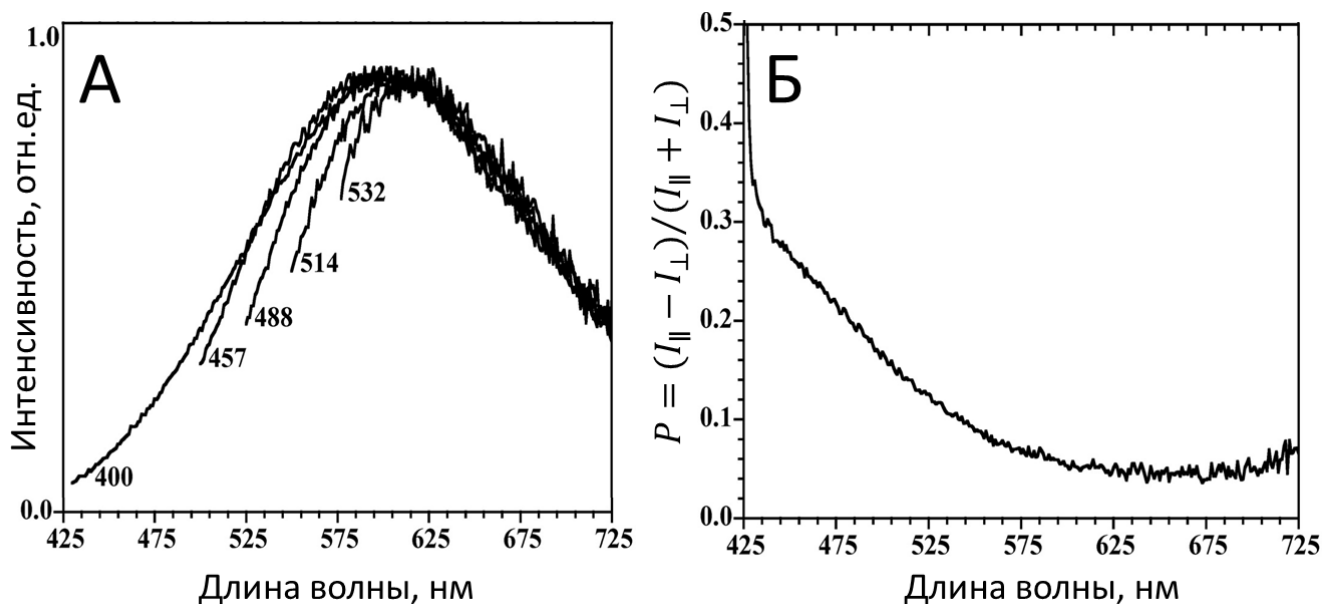


Рисунок 1.7 – А) Спектры эмиссии флуоресценции гранул липофусцина на различных длинах волн возбуждения. Б) Спектр поляризации флуоресценции $P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ при возбуждении флуоресценции на длине волны 400 нм из работы [6].

1.3.3 Модели формирования флуоресценции мономеров и агрегатов белков в видимой области спектра

Мономеры и агрегаты некоторых белков и коротких пептидов также обладают характерным флуоресцентным откликом и бесструктурным поглощением в ближнем УФ, видимом и ИК диапазонах спектра. В большом пуле работ образование оптического отклика в видимом диапазоне для указанных систем связывают с взаимодействием отдельных участков аминокислот внутри белка или между белками в агрегате [56–60], и только в сравнительно небольшом количестве работ рассматриваются гипотезы о возможном гетерогенном молекулярном составе флуорофоров, образующихся в результате химических модификаций белков [10;74].

1.3.3.1 Гипотезы о роли внутри- и межмолекулярного взаимодействия в формировании флуоресценции мономеров и агрегатов белков

Аминокислоты, составляющие белки и пептиды, при нейтральном рН являются цвиттер-ионами – на аминогруппе (NH_3^+) аминокислоты локализован

положительный заряд, а на карбоксильной группе COO^- локализован отрицательный заряд, при этом, в “нулевом приближении” (при нейтральном pH, при отсутствии у аминокислоты заряженной функциональной группы), аминокислота электронейтральна. Помимо неотъемлемых для аминокислот аминогруппы и карбоксильной групп, боковые функциональные группы некоторых аминокислот также являются заряженными при нейтральном pH.

В ряде работ [56–60] была выдвинута гипотеза, что внутри- и межмолекулярное взаимодействие между заряженными функциональными группами аминокислотных остатков белков может приводить к возникновению бесструктурной полосы поглощения и видимой флуоресценции в отдельных белках и коротких пептидах. С помощью квантово-химических расчётов и метода молекулярной динамики авторы показали, что при взаимодействии заряженных боковых групп аминокислотных остатков белков (Рисунок 1.8А) или при взаимодействии заряженной боковой группы и пептидной связи в полипептидной цепи белка (Рисунок 1.8Б) образуются новые состояния, поглощение и флуоресценция которых смещены в видимую область спектра [56–60]. На рисунке 1.8В представлены результаты расчёта силы осциллятора перехода, связанного с состоянием, ответственным за взаимодействие аминокислотного остатка глутамата с ближайшими к нему пептидными связями полипептидной цепи при различных конформациях белка убиквитина. Экспериментально авторы подтвердили свою гипотезу с помощью измерений зависимости флуоресцентного отклика белков от pH раствора. При изменении pH раствора изменяется заряд боковых групп и конформация белка, следовательно, по предположениям авторов, эти изменения должны наблюдаться и в спектрах флуоресцентного отклика, если видимая флуоресценция действительно обусловлена взаимодействием заряженных функциональных групп аминокислот. Действительно, экспериментально при изменении pH раствора с 2 до 11 авторами наблюдалось немонотонное изменение флуоресцентного отклика в 1.5–3 раза, которое зависело

от типа белка [56–60]. Однако следует отметить, что при значениях рН менее 2 и более 11, при которых должен исчезать заряд функциональных групп, изменения интенсивности флуоресценции на порядки не наблюдалось.

В работе [96] было показано, что флуоресцентный отклик, характерный для гетерогенных систем флуорофоров, также наблюдается при агрегации коротких пептидов, которые не имеют заряженных функциональных групп. Наличие видимой флуоресценции в агрегатах коротких пептидов авторы [88, 96] связали с состоянием с “переносом заряда”, которое может возникнуть между N- и C- концами пептидной цепочки при агрегации (Рисунок 1.8Г). При этом авторы показали, что за счёт наличия такого межмолекулярного взаимодействия образуется состояние, поглощение которого сдвинуто в длинноволновую область ($\lambda > 350$ нм) по сравнению с линиями поглощения исходных мономеров пептидов.

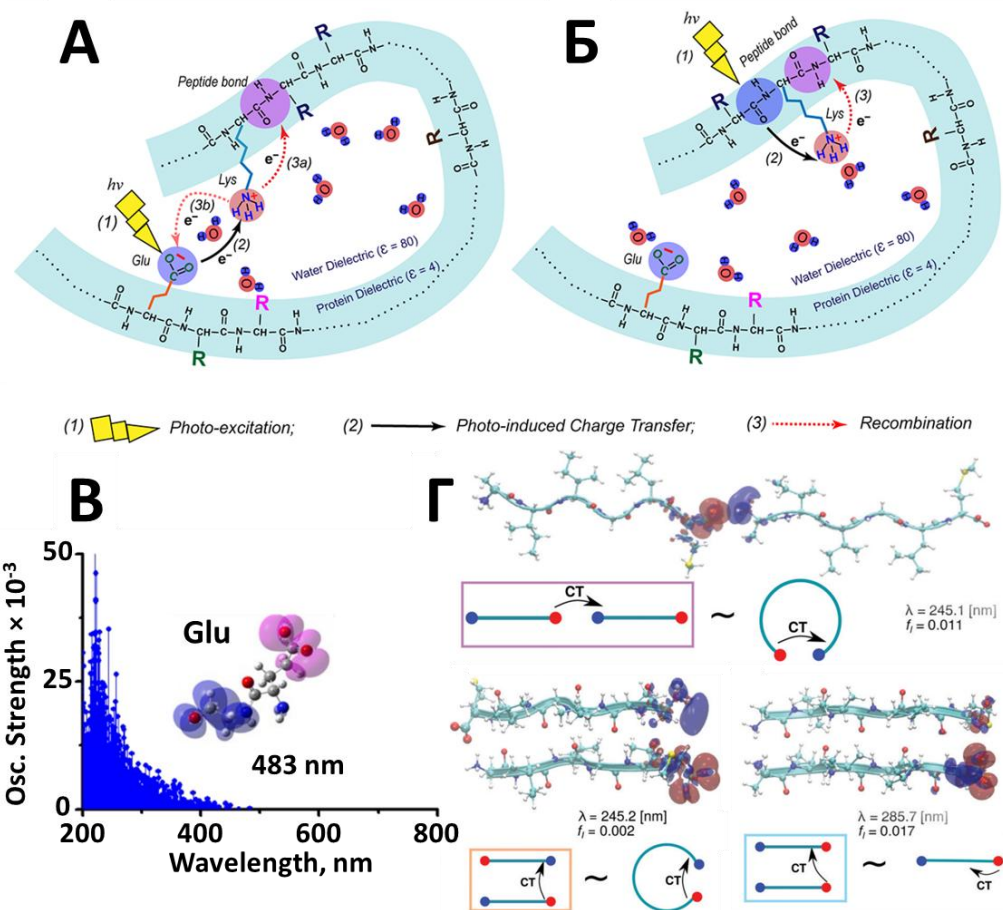


Рисунок 1.8 – А, Б) Схематическая иллюстрация возникновения состояний с переносом заряда в результате взаимодействия заряженных функциональных групп аминокислотных остатков белков (А) или в результате взаимодействия заряженного аминокислотного остатка и пептидной связи полипептидной цепи белка (Б) [60]. В) Спектр силы осциллятора для состояния с переносом заряда, возникающего в результате взаимодействия боковой цепи глутамата и ближайшей пептидной связи белка, рассчитанный в результате моделирования конформационных состояний убиквитина в течение 1 мкс [59]. На врезке показан фрагмент аминокислотного остатка глутамата. Цветами отмечены поверхности постоянной плотности разности заряда между основным и первым возбужденным состоянием для электрона (синий цвет) и дырки (розовый цвет) по уровню ± 0.0004 заряда электрона. Д) Поверхности постоянной плотности для разности зарядов между основным и первым возбужденным состоянием, возникающем в результате взаимодействия N- и C- конца полипептидов в агрегате из работы [96] для различных возможных конфигураций агрегата. Красный и синий цвета соответствуют положительной и отрицательной разности заряда по уровню ± 0.002 заряда электрона.

В ряде работ, в которых также предполагается формирование флуоресцентного отклика за счёт электронного взаимодействия отдельных функциональных групп аминокислот, был предложен механизм возникновения видимой флуоресценции, отличный от формирования состояния с переносом заряда [7;97;98]. Авторы [7;97;98] предположили, что изменение положения уровней в агрегатах белков возникает за счёт бистабильного состояния протона, обобществленного между геометрически близкими друг к другу группами NH_3^+ и COO^- , расположенными на N и C концах взаимодействующих пептидов. С помощью методов молекулярной динамики и квантово-химических расчётов авторы показали, что водород вблизи N и C концов пептидов имеет бистабильное положение – может находиться как вблизи аминогруппы, так и вблизи карбоксильной группы. Наличие такой делокализации протона, согласно расчётам авторов, увеличивает силу осциллятора перехода для состояний, локализованных вблизи N и C концов белков и пептидов в агрегате, а также смещает длину волны поглощения и флуоресценции для данного перехода в видимый диапазон.

Авторы аргументировали свои наблюдения экспериментальными данными зависимости стационарного флуоресцентного отклика от pH раствора – при “экстремальных” значениях pH ($\text{pH} \leq 2$ или $\text{pH} \geq 10$). Когда аминогруппы и карбоксильные группы аминокислот полностью протонированы или депротонированы, авторы наблюдали, что флуоресцентный отклик исследуемых систем существенно ниже, чем при нейтральном pH [7;97].

1.3.3.4 Гипотезы гетерогенности молекулярного состава в формировании оптических свойств мономеров и агрегатов белков

В действительности, для гипотез, предполагающих доминирующую роль внутри- и межмолекулярного электронного взаимодействия в формировании видимой флуоресценции и поглощения в мономерах и агрегатах белков, можно указать ряд

экспериментальных фактов, ставящих под сомнение корректность данных моделей [10;74].

В частности, в работе [74] экспериментально исследуется вопрос о влиянии агрегации белков, полипептидов с заряженной или электронейтральной боковой цепью и отдельных аминокислот на наблюдаемый флуоресцентный отклик. Авторы показывают, что интенсивность флуоресценции кристаллов исследуемых объектов растёт пропорционально интенсивности флуоресценции растворов исходных веществ, что говорит о том, что эффект агрегации и взаимодействия между исходными прекурсорами играет несущественную роль в образовании видимого флуоресцентного отклика. В свою очередь авторы выдвигают гипотезу о значимости карбонильных групп белков, коротких пептидов и аминокислот во флуоресцентном отклике [74], однако не указывают прямых механизмов, как именно наличие данных связей приводит к образованию видимой флуоресценции.

В работе [10] авторы показывают, что наблюдаемая флуоресценция в агрегатах белков и аминокислот может быть результатом возникновения гетерогенных по своему составу продуктов окисления. Известно, что при фотоокислении белков УФ-излучением могут возникнуть фотопродукты деградации, флуоресцирующие в видимом диапазоне [66;67]. Предположительно, окислительные процессы в организме и окислительные процессы, возникающие в *in vitro* экспериментах по агрегации белков, которые обычно проводятся в кислородной атмосфере, приводят к формированию аналогичных флуоресцентных продуктов, локализованных на мономере белка [10]. Однако являются ли формируемые продукты окисления отдельными молекулярными флуорофорами, играет ли роль полимеризация, агрегация и взаимодействие между отдельными флуорофорами, локализованными на белке (аналогично меланину) остаётся невыясненным.

1.3.4 Механизмы формирования флуоресцентного отклика структурных белков: продукты гликирования как источник флуоресценции

Как было показано в предыдущем разделе, в ряде работ выдвигаются гипотезы о том, что флуоресцентный отклик белков в действительности ассоциирован с гетерогенными продуктами окисления, возникающими в результате неспецифических окислительных реакций с участием белков. Однако для коллагена, эластина и кератина считается, что ключевую роль в формировании оптического отклика в видимом диапазоне играют не процессы окисления, а гликирования – т.е. взаимодействия структурных белков тканей с сахарами, которое приводит к образованию конечных продуктов гликирования [8;61–63].

Конечные продукты гликирования образуются в результате химической реакции между восстанавливающими сахарами (их карбонильной группой) и аминокислотами или аминокислотными остатками белков. Впервые обнаруженная Майяром в 1912 году реакция образования конечных продуктов гликирования включает большое количество этапов; в результате неё из сахаров с малой молекулярной массой и аминокислот или белков, образуются как продукты малых размеров (менее 1 кДа), так могут формироваться и гетерогенные по молекулярному составу сополимеры, обладающие массой вплоть до 100 кДа и более [99]. Продукты, с высокой молекулярной массой, образующиеся на финальных этапах реакции Майяра, также называют меланоидинами, эти вещества также демонстрируют характерный флуоресцентный отклик в видимом диапазоне и бесструктурное поглощение.

Видимую флуоресценцию структурных белков в первую очередь связывают с образованием флуоресцентных сшивок, имеющих малые молекулярные размеры. Как показано в [100], размер конечных продуктов гликирования белков варьируется в диапазоне от 300 до 3500 Да. Для структурных белков возможно выделить конкретные флуорофоры, вносящие вклад во флуоресцентный отклик в видимом

диапазоне, например, пентозидин, пиридинолин, дезоксипиридинолин [101], однако интегральный флуоресцентный отклик продуктов гликирования тканей связан с содержанием не только указанных флуорофоров – часть флуорофоров остаётся неустановленной [8;62;102].

Образующиеся в результате гликирования продукты могут реагировать не только с остатком одной аминокислоты, но и образовывать сшивки между несколькими аминокислотными остатками в белке или между несколькими белками [18;103]. Таким образом, даже в одном белке может быть сформировано большое количество флуоресцентных сшивок. Так, например, транспортный белок крови – альбумин – содержит 59 лизиновых остатков [104], которые имеют высокую реакционную способность сахарами [105], т.е. потенциально в результате взаимодействия с сахарами может быть сформировано более 50 различных флуоресцентных сшивок только за счёт взаимодействия сахаров с аминокислотными остатками лизина. Результатом наличия большого количества флуоресцентных продуктов, локализованных на белке, может являться внутримолекулярное взаимодействие между сшивками, приводящее к изменению оптических свойств гликированного белка по сравнению с оптическими свойствами отдельных флуоресцентных сшивок. Данный эффект может быть аналогичен взаимодействию тирозиновых и триптофановых остатков в белке – между ними возможен фёрстеровский перенос энергии [42;43;106], приводящий к изменению оптических свойств белка в сравнении с оптическими свойствами тирозина и триптофана. Однако гипотеза о влиянии взаимодействия между флуорофорами на оптические свойства конечных продуктов гликирования белков на настоящее время в литературе не рассматривается – в данной области придерживаются гипотезы об усреднении оптических свойств невзаимодействующих флуоресцентных сшивок.

1.3.5 Общность свойств фотофизических характеристик эндогенных гетерогенных систем флуорофоров биотканей и углеродных наночастиц

Заметим, что оптический отклик ГСФ, рассмотренных ранее, во многом повторяет оптические свойства углеродных наночастиц, которые в частности могут быть сформированы в результате процессов гликирования и окисления простых органических соединений [107;108]. При этом для углеродных наночастиц более развито представление о механизмах формирования их оптических свойств, где в одинаковой мере рассматриваются гипотезы как усреднения отклика невзаимодействующих флуорофоров, так и о роли межмолекулярного взаимодействия в формировании их фотофизических характеристик, хотя и в данной области полного консенсуса достичь не удаётся. Следуя обзору [38], кратко рассмотрим предполагаемые механизмы формирования оптических свойств углеродных наночастиц.

Углеродные наночастицы имеют во многом такие же оптические свойства, что и эндогенные ГСФ: широкополосное бесструктурное поглощение, флуоресцентный отклик, параметры которого зависят от длины волны возбуждения и эмиссии. Флуоресцентный отклик при этом обладает большим Стоксовым сдвигом, не свойственным единичным молекулярным флуорофорам [38]. Отличает углеродные квантовые точки от гетерогенных систем флуорофоров высокий квантовый выход флуоресценции в видимом диапазоне ($QY = 0.1-0.7$), который, однако, в большом пуле работ определен некорректно и может соответствовать квантовому выходу единичных молекулярных флуорофоров, образующих наночастицы, а сами наночастицы могут иметь низкий квантовый выход, на уровне 0.01-0.1 [109].

Напрямую связь между структурой углеродных наночастиц и их оптическими свойствами установить не удаётся. В ряде работ предполагается, что основную роль в формировании наблюдаемых оптических свойств играют “домены” sp^2 -гибридизованного углерода, образованные внутри наночастиц и расположенные

ближе к центру (“ядру”) частицы [110] – аналогично гипотезам, рассмотренным выше для оптических свойств меланина. В ряде других работ предполагается, что ключевой является роль взаимодействия состояний, формируемых на поверхности наночастиц (“surface states”) и состояний ядра частицы [111], а в других работах предполагается, что основную роль играют только состояния, локализованные на поверхности [112;113]. Экспериментальные результаты [114;115] говорят о чувствительности флуоресцентного отклика к модификации поверхностных групп углеродных наночастиц, однако полностью исключить влияние “не поверхностных” состояний на оптические свойства наночастиц не удаётся [38].

Наблюдаемую зависимость положения максимума эмиссии флуоресценции от длины волны возбуждения в квантовых точках обычно интерпретируют с точки зрения внутри- и межчастичной гетерогенности. Гипотеза о межчастичной гетерогенности, предполагающая неоднородное уширение полосы флуоресценции за счёт присутствия наночастиц с различными максимумами эмиссии флуоресценции, подтверждается рядом экспериментальных фактов. Так, путём фильтрации и жидкостной хроматографии, в растворе углеродных наночастиц удаётся выделить фракции частиц определенного размера, положение максимума эмиссии флуоресценции которых не зависит от длины волны возбуждения [116–118]. В работе [119], однако, была продемонстрирована зависимость оптического отклика от длины волны возбуждения для единичной углеродной наночастицы, что было проинтерпретировано с точки зрения гипотезы о существенном влиянии внутримолекулярного взаимодействия на оптические свойства углеродных наночастиц. Как указывает автор [38], подобная зависимость может быть результатом агрегации наночастиц, и гипотеза внутримолекулярной гетерогенности требует большего количества экспериментальных фактов для подтверждения.

Для наблюдаемых значений высоких значений Стоксова сдвига (более 3000–6000 см⁻¹) флуоресцентного отклика наночастиц выдвигается несколько гипотез, которые,

однако, не удовлетворяют всем экспериментальным фактам, известным об оптических свойствах углеродных квантовых точек. В ряде работ предполагается, что высокие значения Стоксова сдвига флуоресценции углеродных наночастиц связаны с взаимодействием поверхностных состояний наночастиц с растворителем [120;121] – релаксация дипольного момента полярного растворителя может значительным образом снижать энергию возбужденного состояния. Однако такие значения Стоксова сдвига наблюдаются и для наночастиц при криогенных температурах или для частиц в твердой фазе [116;122], что говорит о незначительном влиянии растворителя на величину Стоксова сдвига рассматриваемых систем. В ряде работ предполагается влияние фёрстеровского переноса энергии, который бы приводил к некогерентному переносу энергии от хромофоров, поглощающих в синей области спектра, к флуорофорам, излучающим в красной области спектра [38;123;124]. Также, аналогично механизму формирования оптических свойств меланина, в работе [38] предполагается, что поглощение и флуоресценция могут быть объяснены образованием экситонов Френкеля, используемых для описания свойств Н-агрегатов.

1.3.6 Краткие выводы о механизмах формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров

Как видно из представленного в разделах 1.3.1–1.3.5 обзора, предполагаемые механизмы формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров в равной степени делятся на гипотезы, объясняющие наблюдаемые фотофизические свойства с точки зрения модели усреднения (“суперпозиции”) свойств отдельных невзаимодействующих молекул-флуорофоров системы, и модели, предполагающей ключевую роль межмолекулярного электронного взаимодействия в системе. Однако одно лишь указание необходимости гетерогенности молекулярного состава или межмолекулярного взаимодействия для наблюдения оптических свойств ГСФ не

является удовлетворительным с точки зрения применений данных моделей для решения прямой или обратной задачи спектроскопии для данных систем (предсказания молекулярной структуры гетерогенных систем из их оптических свойств). Требуется понимание взаимосвязи фотофизических характеристик гетерогенных систем флуорофоров, например, спектрального наклона поглощения в полулогарифмическом масштабе Λ , положения максимума эмиссии на заданной длине волны, величины квантового выхода флуоресценции ϕ между собой и в зависимости от молекулярного состава и размеров агрегатов в системе. Однако в литературе на настоящий момент для эндогенных систем такие взаимосвязи не установлены, что не позволяет полностью разделить роль гетерогенности молекулярного состава и межмолекулярного электронного взаимодействия. При этом только в небольшом числе работ для установления механизмов формирования оптических свойств ГСФ используются методы лазерной кинетической спектроскопии, позволяющей исследовать процессы релаксации возбуждения в ГСФ на различных временных масштабах. Систематическое исследование механизмов формирования флуоресцентного отклика и длинноволнового поглощения в красной и ближней инфракрасной области спектра в ГСФ с помощью лазерной флуоресцентной спектроскопии является одной из частей данной работы.

Вне зависимости от механизмов формирования оптического отклика гетерогенных систем флуорофоров, изменения их оптического отклика могут быть использованы для решения конкретных задач диагностики. В следующем разделе кратко рассмотрены некоторые примеры применения отклика эндогенных ГСФ тканей в задачах лазерной биомедицинской диагностики.

1.4 Примеры использования оптического отклика гетерогенных систем флуорофоров в задачах лазерной биомедицинской диагностики.

Бесструктурное поглощение, монотонно убывающее с ростом длины волны возбуждения, и флуоресцентный отклик, возбуждаемый в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне спектра, дают возможность использовать оптический контраст ГСФ (меланина, агрегатов белков, липофусцина) в решении задач биомедицинской диагностики.

Благодаря высокой концентрации меланина в коже, количественный анализ этого хромофора проводился с помощью большого набора оптических методов диагностики. Существенные отличия спектров поглощения меланина от спектров поглощения других эндогенных хромофоров тканей (гемоглобина, билирубина, воды и пр.) позволяют напрямую использовать сигнал диффузного отражения в видимом и ближнем ИК диапазоне для количественного определения меланина [125;126]. В частности, диффузное отражение может быть использовано для оценки фактора защиты кожи от солнечного излучения и планирования дозы излучения при воздействии на кожу [126]. В работе [127] была продемонстрирована возможность использования длинноволнового поглощения меланина для оптоакустического детектирования единичных циркулирующих клеток меланомы, содержащих большое количество меланина, в кровотоке пациентов *in vivo*, что может быть использовано для выявления метастазов (на рисунке 1.9А представлена схема детектирования единичных циркулирующих клеток меланоцитов с помощью оптоакустического отклика).

Несмотря на более высокие значения квантового выхода флуоресценции ГСФ в диапазоне длин волн 300–500 нм, флуоресценция ГСФ тканей в данном спектральном диапазоне существенно “перекрывается” с интенсивным откликом других эндогенных флуорофоров, например, НАДН и флавинов (Раздел 1.2 настоящей работы). Возбуждение флуоресцентного отклика в диапазоне 300–500 нм также неэффективно из-за высоких коэффициентов рассеяния и поглощения тканей,

что существенно снижает глубину зондирования [11]. Преимуществом ГСФ является возможность возбуждения их флуоресцентного отклика в окне прозрачности биотканей (600–900 нм) – спектральном диапазоне, в котором за счёт малого рассеяния и поглощения эффективная глубина проникновения на порядок выше (по порядку составляет 1–2 мм), чем в коротковолновой (<500 нм) области спектра (глубина проникновения ~10–100 мкм)[11]. Так, было показано, что при лазерном возбуждении флуоресценции на 785 нм возможно детектирование отклика меланина в диапазоне 800–1000 нм *in vivo*, в том числе для характеристики меланина в патологических случаях при нарушении регулярной пигментации тканей [12;128;129].

С помощью флуоресцентного отклика в видимом и ближнем ИК диапазоне как *ex vivo*, так и *in vivo* возможно детектирование агрегатов белков применительно к мониторингу динамики их образования [13], для их визуализации в тканях *ex vivo* [130–132], и даже для неинвазивного детектирования *in vivo* [13]. В работе [13] было показано, что инфракрасный флуоресцентный отклик белковых агрегатов, образующихся при нейродегенеративных заболеваниях, может быть использован для *in vitro* и *in vivo* для их визуализации при возбуждении флуоресценции в диапазоне 600–700 нм и детектировании в диапазоне 700–800 нм. Пример 2Д визуализации агрегатов белков на срезах тканей *ex vivo* и 3Д реконструкции агрегата в модельном эксперименте *in vivo* продемонстрированы на рисунке 1.9Б.

Детектирование флуоресцентного отклика гетерогенных продуктов окисления белков, липидов и аминокислот находит свои применения в криминалистике. Так, видимая флуоресценция гетерогенных продуктов окисления может быть использована для датирования отпечатков пальцев с погрешностью ~2 дня на интервале нескольких недель. В качестве индикатора для такого датирования может выступать отношение интенсивностей флуоресцентного отклика продуктов окисления, накапливающихся в оставленном отпечатке пальца с течением времени, к собственной флуоресценции белков, имеющихся в отпечатке пальца [133;134].

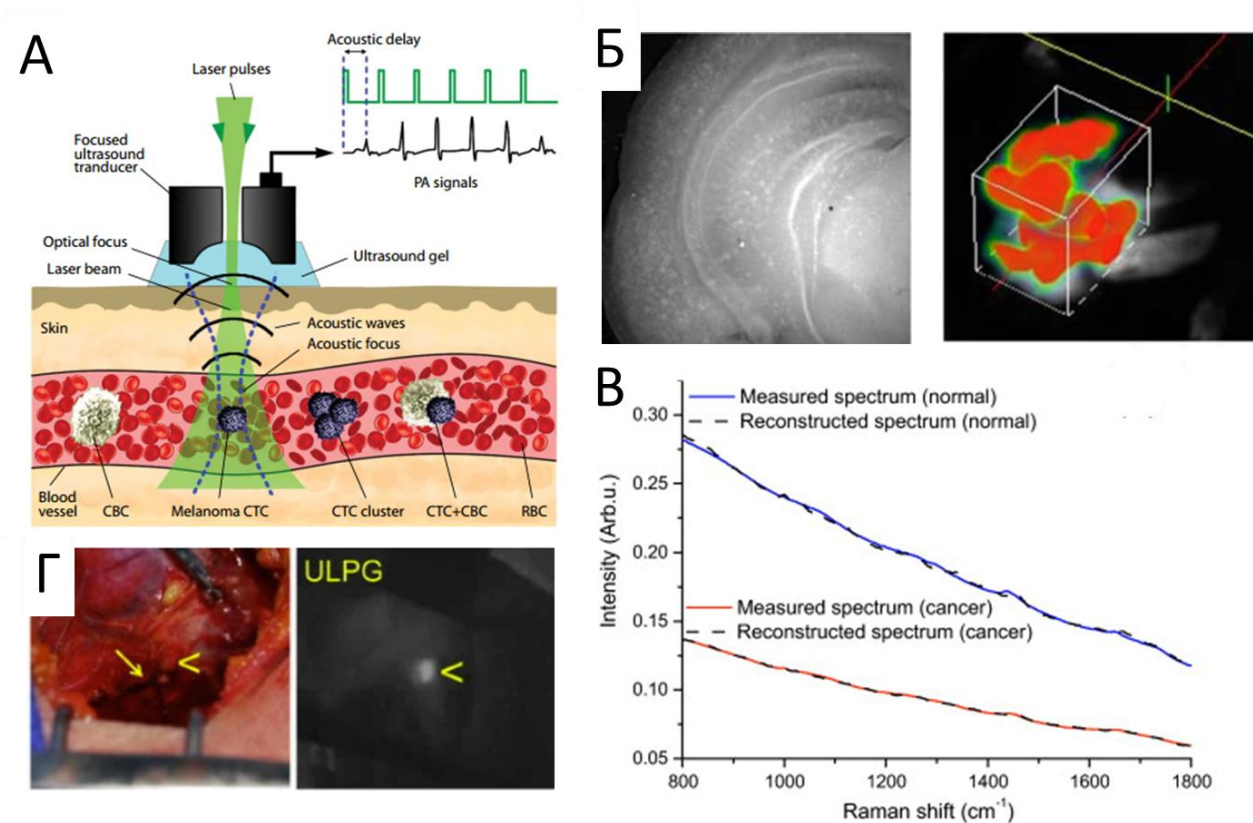


Рисунок 1.9 – А) Схема детектирования оптоакустического отклика от единичных раковых клеток в кровотоке, содержащих большое количество меланина, с использованием длинноволнового поглощения меланина [127]. Б) Результат двух- и трёхмерной визуализации белковых агрегатов, образующихся в результате нейродегенеративного заболевания в модельных экспериментах на мышцах *ex vivo* (левая панель) и *in vivo* (правая панель) при возбуждении флуоресцентного отклика в диапазоне возбуждения/детектирования 515–560 нм/580–620 нм (левая панель), и 690/700–760 нм (правая панель) [13]. В) Спектры флуоресценции и комбинационного рассеяния при лазерном возбуждении на 785 нм для здоровой (синяя линия) и опухолевой ткани (красная линия) рака желудка [134]. Г) Интраоперационная визуализация тканей щитовидной и паращитовидной железы в белом свете (левая панель) и с помощью автофлуоресцентного отклика в ИК диапазоне с возбуждением на 750 нм и детектированием в диапазоне 800–900 нм (правая панель). Светлое пятно, отмеченное стрелкой – паращитовидная железа, обладающая более ярким флуоресцентным откликом [135].

Видимая флуоресценция, ассоциированная с флуоресцентными сшивками в коллагене и эластине, используется для определения хронологического возраста тканей, оценки риска сердечно-сосудистых заболеваний, при которых происходит накопление конечных продуктов гликирования [136]. Интенсивность

автофлуоресцентного отклика продуктов окисления кератина является чувствительным предиктором болезней, в которых происходит нарушение естественной кератинизации (процесса дифференцировки и ороговения кератиноцитов) [137].

Свойства липофусцина и меланина, а также изменения их спектральных и временных характеристик эмиссии, возникающие при окислительном стрессе, используются для выявления ранних стадий дегенерации сетчатки и пигментного эпителия сетчатки [53].

В некоторых работах эндогенный флуоресцентный отклик клеток и биотканей, источником которого, по всей видимости, являются гетерогенные продукты окисления белков, липидов и аминокислот, используется сугубо феноменологически как предиктор, позволяющий выявлять изменения в тканях или же классифицировать нормальные и патологические участки тканей [134]. Так флуоресценция тканей в красном и ближнем инфракрасном диапазоне спектра, отчасти являющаяся помехой в спектроскопии комбинационного рассеяния, позволяет дискриминировать здоровые и опухолевые участки тканей *ex vivo* и *in vivo* [15;134]. При этом сигнал в опухолевых тканях обычно является пониженным – на рисунке 1.9 В представлена иллюстрация флуоресцентного отклика, возбужденного в ИК диапазоне для здоровых и опухолевых тканей желудка из работы [134].

Аналогично, до сих пор не установлен источник ближней инфракрасной флуоресценции парашитовидной железы. Благодаря повышенному, по сравнению с окружающими тканями, флуоресцентному отклику в красном и инфракрасном диапазоне спектра парашитовидной железы возможна интраоперационная флуоресцентная навигация и поиск этого органа *in vivo* [135]. Пример такой визуализации представлен на рисунке 1.9Г.

В ряде работ указывается, что флуоресцентный отклик с характерными для эндогенных ГСФ оптическими свойствами позволяет оценить возраст-ассоциированные изменения и уровень окислительного стресса в многоклеточных

организмах, в частности, *C. Elegans* [62;138;139]. Особенно чувствительным к изменениям, связанным с окислительным стрессом, является оптический отклик при возбуждении на 500 нм и детектировании в диапазоне 500–650 нм [138]. Возрастание флуоресцентного отклика в видимом и ближнем ИК диапазоне при увеличении окислительного стресса также наблюдается и в случае воздействия на единичные клетки [139]. Как и в других случаях, молекулярные источники флуоресценции для данных систем (как для единичных клеток, так и для тканей) не установлены, хотя флуоресцентный отклик успешно используется для решения конкретных задач диагностики.

Как видно, уникальные оптические свойства меланина, липофусцина, агрегатов белков (продуктов окисления белков, аминокислот и липидов) успешно используются для решения прикладных задач биомедицинской диагностики, во многом основываясь на феноменологическом описании наблюдаемого флуоресцентного отклика. При этом в некоторых задачах флуоресцентной диагностики, опирающихся на флуоресцентный отклик биотканей в красной и ближней инфракрасной области спектра, источники флуоресценции не являются установленными. Опираясь на описанные ранее флуоресцентные свойства ГСФ, формирующихся в результате неспецифического окисления и гликирования белков, аминокислот и липидов тканей, можно предположить, что именно они являются источником наблюдаемого для тканей флуоресцентного отклика.

Сформулируем также те задачи диагностики, опирающиеся на флуоресцентный отклик ГСФ, которые не были на настоящее время решены в литературе. Детально не изучена возможность детектирования сигнала ГСФ в различных подслоях кожи. В частности, для единичных клеток *in vivo* не был оценён вклад в их флуоресцентный отклик от гетерогенных продуктов окисления, которые могут накапливаться в клетках в результате процессов окисления. Несмотря на большой пласт работ, посвященных детектированию меланина в тканях, не была продемонстрирована возможность картирования меланина в различных слоях кожи

(на различных глубинах) с помощью флуоресцентного отклика в ближнем ИК диапазоне, не исследована взаимосвязь спектральных характеристик флуоресценции, возбуждаемой в ближнем ИК диапазоне с молекулярной организацией меланина. Решению указанных проблем диагностики будет посвящена Глава 3 настоящей работы.

1.5 Выводы

Представленный литературный обзор показывает, что ряд эндогенных флуорофоров тканей, таких как меланин, конечные продукты гликирования белков и продукты окисления белков, аминокислот и белковых агрегатов, обладают схожими свойствами спектров поглощения и флуоресценции, нехарактерными для единичных молекулярных флуорофоров. В частности, величина поглощения в таких системах экспоненциально убывает с ростом длины волны в видимом диапазоне, а положение максимума эмиссии флуоресценции и квантовый выход флуоресценции, возбуждаемой в широком спектральном диапазоне, зависит от длины волны возбуждения. Указанные флуорофоры можно объединить в общий подкласс гетерогенных систем флуорофоров (ГСФ).

Механизмы формирования фотофизических свойств ГСФ до сих пор являются противоречивыми, и пока не сформирована единая теория, устанавливающая взаимосвязь их структурных особенностей (молекулярного состава, наличия супрамолекулярных агрегатов в системах) и оптических характеристик. Среди предлагаемых гипотез формирования наблюдаемых флуоресцентных свойств и поглощения в видимом диапазоне можно выделить два основных направления. В модели усреднения предполагается, что наблюдаемый оптический отклик является результатом усреднения оптического отклика отдельных невзаимодействующих молекулярных флуорофоров и хромофоров, присутствующих в системе. В модели межмолекулярного электронного взаимодействия, напротив, предполагается, что наблюдаемые оптические свойства в первую очередь сформированы за счёт

взаимодействия флуорофоров в системе. При этом, по сути, одинаковые оптические свойства различных видов ГСФ в равной степени объясняются как с помощью модели усреднения, так и с помощью модели межмолекулярного электронного взаимодействия (Раздел 1.3).

В последнее время использование уникальных оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров приобретает всё большую популярность в решении задач биомедицинской диагностики, при этом в основном используется феноменологический подход, основанный на различии флуоресцентных свойств гетерогенных флуорофоров в различных типах тканей или различий флуоресцентного отклика в здоровых и патологических участках ткани (Раздел 1.4). Определение механизмов формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров, взаимосвязи различных фотофизических характеристик, а также взаимосвязи структурных и оптических свойств указанных систем, представляет не только фундаментальный, но и практический интерес, что и мотивировало постановку цели и задач данной работы.

Таким образом, 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*.

Глава 2. Лазерная флуоресцентная спектроскопия гетерогенных систем флуорофоров: исследование механизмов формирования оптических свойств

В данной главе проводится исследование фотофизических механизмов, лежащих в основе формирования оптического отклика ГСФ. В качестве модельных ГСФ используются меланин, продукты фотоокисления аминокислоты триптофана и гликированный модельный белок альбумин.

В первую очередь демонстрируется общность стационарных оптических свойств модельных систем. Далее, на примере продуктов фотоокисления триптофана, исследуется взаимосвязь гетерогенности молекулярного состава и наблюдаемых стационарных оптических свойств. Исследуются параметры нано- и микрочастиц, образующихся в результате процессов окисления в исследуемых системах. С помощью лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным и пикосекундным разрешением исследуется вопрос о влиянии межмолекулярного взаимодействия и наличия некогерентного переноса возбуждения на оптические свойства исследуемых систем. Демонстрируется наличие сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции ГСФ, параметры которой коррелируют с параметрами стационарных оптических свойств. Исследуется взаимосвязь межмолекулярного электронного взаимодействия и релаксации растворителя с обнаруженной сверхбыстрой компонентой затухания флуоресцентного отклика.

2.1 Объекты и методы исследования

2.1.1 Обоснование выбора объектов исследования

В данной работе проведено исследование трёх различных систем гетерогенных флуорофоров. Одной из исследуемых в работе ГСФ был меланин, выделенный из *Sepia Officinalis*. Оптические свойства естественного и синтетического меланина,

исходя из литературных данных, являются наиболее изученными, при этом в ряде работ предполагается, что наблюдаемые фотофизические характеристики меланина являются результатом межмолекулярного взаимодействия молекулярных флуорофоров и хромофоров, образующих агрегаты меланина [17;86].

В качестве другой модели ГСФ были использованы продукты окисления триптофана, образуемые в результате фотоокисления с помощью УФ-излучения с максимумом эмиссии на 254 нм, попадающего в полосу поглощения триптофана (280 нм). В ряде работ предполагается [10;74], что видимая флуоресценция может быть сформирована за счёт неспецифического окисления аминокислот или аминокислотных остатков белков, при этом триптофан является одной из наиболее подверженных окислению аминокислот из-за низкого потенциала ионизации [140], в частности, окисление триптофана возможно при фотооблучении [141].

В отличие от меланина, для ряда других систем предполагается исключительно “суперпозиционная” модель формирования оптического отклика как среднего оптического отклика отдельных невзаимодействующих молекулярных компонент, составляющих систему. Такая модель, в частности, рассматривается для конечных продуктов гликирования, образуемых в результате взаимодействия аминокислотных остатков белков и сахаров (Раздел 1.3.4). Поэтому в качестве ещё одной модели, рассматриваемой в работе, был использован гликированный бычий сывороточный альбумин (БСА), образуемый в результате гликирования БСА с фруктозой при повышенной (40 °С) температуре.

Таким образом, исследование оптических свойств ГСФ проводилось для трёх систем:

- 1) меланина, выделенного из *Sepia Officinalis* (далее – меланин).
- 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 (далее – продукты фотоокисления триптофана);

3) конечных продуктов гликирования модельного белка (БСА), формирующихся в результате взаимодействия белка с фруктозой при повышенной температуре (далее – продукты гликирования белка).

2.1.2 Методы изготовления образцов

Стоковые растворы меланина, выделенные из *Sepia officinalis*, были приготовлены по протоколу, аналогичному протоколу из работы [142]: концентрированные чернила *Sepia officinalis* добавлялись в 0.5М раствор NaOH, после чего полученный раствор подвергался действию ультразвука (35 кГц, ~50 Вт) в течение 1 часа для выделения меланина из отдельных меланосом. Далее, полученный раствор фильтровался с помощью шприцевых целлюлозных фильтров с диаметром пор 0.22 мкм.

Для проверки гипотезы о возникновении флуоресцентного отклика, характерного для ГСФ, в результате окисления аминокислот, водные растворы L-триптофана (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 0.05 мг/мл ($\sim 2.5 \cdot 10^{-4}$ М) были окислены с помощью УФ-излучения (длина волны возбуждения 254 нм, интенсивность излучения на образце составляла ~ 10 мВт/см²) различными дозами облучения (~ 20 – 100 Дж/см³) при фиксированной температуре 30 °С (термостат QPod 2e, Quantum Northwest, США).

Для создания гетерогенных конечных продуктов гликирования модельного белка БСА в концентрации 10^{-4} М в фосфатном буфере (50 мМ) инкубировался с добавлением фруктозы (0.5 М) в течение 120 часов при 40°С по протоколу [143]. Использование фруктозы значительно ускоряет образование продуктов гликирования, по сравнению с глюкозой [144]. Дополнительно в растворы белка при

приготовлении добавлялся азид натрия (0.01 М) для исключения бактериальной контаминации.

Фракционирование образцов по размеру производилось с помощью ультрафильтрирующих концентрирующих фильтров с размером пор, рассчитанных на молекулярную массу 1 и 3 кДа (Microcon, Millipore, США), по стандартному протоколу, указанному для фильтров: стоковые образцы продуктов окисления триптофана в объёме 0.5 мл фильтровались в течение 60 минут при ускорении 12 100g. Предварительно фильтры промывались с использованием буферного раствора для исключения контаминации отфильтрованных образцов. Фракции более 1 или 3 кДа экстрагировались из центрифужных фильтров с использованием буферного раствора.

2.1.3 Измерение стационарных спектров поглощения и флуоресценции

Стационарные спектры поглощения в видимом и ближнем ИК диапазоне измерялись с помощью спектрофотометра UV-Vis Lambda 25 (Perkin-Elmer, США) в кварцевых кюветах с величиной оптического пути 1 см.

Измерения стационарных спектров флуоресценции производились с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 (Horiba, Jobin Yvon, Япония). Матрицы возбуждения-эмиссии измерялись с шагом возбуждения 20 нм в диапазоне 320–500 нм, со спектральной шириной щели возбуждения и эмиссии 2 нм. Исходные растворы разбавлялись так, чтобы величина оптической плотности на 320 нм составляла не более 0.1 см⁻¹ для исключения эффекта внутреннего фильтра [145].

Относительный квантовый выход флуоресценции φ рассчитывался как отношение интегрального сигнала флуоресценции к величине поглощения на длине волны возбуждения флуоресценции по формуле (2.1):

$$\varphi = \frac{\int_{\lambda_{exc}+20}^{700} F(\lambda_{em}, \lambda_{exc}) d\lambda_{em}}{A(\lambda_{exc})}, \quad (2.1)$$

где $F(\lambda_{em}, \lambda_{exc})$ – сигнал флуоресценции для данной длины волны эмиссии λ_{em} и длины волны возбуждения λ_{exc} ; $A(\lambda_{exc})$ – величина поглощения исследуемого раствора на длине волны возбуждения. Для устранения экспериментальных артефактов, связанных с детектированием сигнала комбинационного рассеяния растворителя, а также первого и второго порядка рэлеевского рассеяния, спектры флуоресценции в диапазоне длин волн эмиссии λ_{em} , где артефакты отсутствовали, интерполировались на диапазоны длин волн, где присутствовали артефакты с использованием кубического сплайна. Погрешность интерполяции флуоресценции в диапазонах длин волн, соответствующих сигналу комбинационного рассеяния, составляла менее 5%.

2.1.4 Данные масс-спектрометрии

Данные масс-спектрометрии были получены с помощью масс-спектрометра FT MS Bruker Apex Ultra, реализующего метод масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье преобразованием (FTICR MS) по стандартному протоколу [146].

Данные FTICR MS были обработаны с помощью открытого программного обеспечения UltraMassExplorer (<http://dockersrv1.awi.de:3838/ume>). Рассчитанные молекулярные формулы CHON были отфильтрованы так, чтобы соотношение O/C было меньше 1, H/C было меньше 2, а максимальные значения чисел атомов в формулах составляли C = 120, H = 200, O = 60, N = 4, при этом относительный вклад формулы составлял не менее 0.01%.

2.1.5 Метод микроскопии светового листа.

Измерения с помощью метода микроскопии светового листа осуществлялись с использованием специально собранной экспериментальной установки. В качестве источника возбуждения использовался лазерный диод с длиной волны возбуждения 405 нм с непрерывным излучением и мощностью 1 мВт, излучение которого фокусировалось в световой лист толщиной 10 мкм и шириной перетяжки 200 мкм с помощью цилиндрической линзы с фокусным расстоянием 10 см и объектива с

увеличением $10\times$ и числовой апертурой $NA = 0.25$. Детектирование рассеянного излучения и флуоресценции производилось с помощью EMCCD камеры под 90° к направлению распространения возбуждающего излучения в плоскости светового листа в диапазоне 300–750 нм (при детектировании рэлеевского рассеяния) и во флуоресцентном канале в диапазоне 450–750 нм.

2.1.6 Метод микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции.

Картирование времени затухания флуоресценции производилось с помощью установки Microtime 200 (Picoquant, Берлин, Германия). Возбуждение флуоресцентного отклика производилось с помощью импульсных пикосекундных лазерных диодов на длинах волн 402 и 640 нм (частота следования импульсов 40 МГц, максимальная средняя мощность 50 мВт, длительность импульса 40 пс). Картирование производилось в конфокальной схеме светосбора с помощью объектива Olympus UPlanSApo 100 \times ($NA = 1.4$). Время накопления сигнала в одном пикселе составляло 0.2 мс, размер изображения составлял 400 \times 400 пикселей (80 \times 80 мкм). Детектирование сигнала флуоресценции проводилось в спектральном диапазоне 425–900 нм при возбуждении на 402 нм и 660–720 нм при возбуждении на 640 нм.

2.1.7 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции и анизотропии флуоресценции на наносекундном временном масштабе.

Измерение кинетики затухания флуоресценции в растворах исследуемых образцов ГСФ на наносекундном масштабе с пикосекундным временным разрешением производилось с помощью специально собранного лазерного флуориметра, реализующего метод время-коррелированного счёта единичных фотонов. В качестве источника возбуждения использовался импульсный диодный лазер (длина волны 405 нм, длительность импульса 40 пс, энергия в импульсе 10 пДж, частота повторений 10 МГц). Флуоресценция образца собиралась с помощью коллимирующей линзы и многомодового оптического волокна (диаметр

центральной жилы 600 мкм), идущего на вход монохроматора MonoScan-2000 (точность позиционирования <0.5 нм, FWHM $\sim 5\text{--}10$ нм, OceanOptics, США). Регистрация кинетики затухания флуоресценции производилась с помощью системы, состоящей из фотоэлектронного умножителя (ФЭУ, PMC-100, Becker&Hickl, Германия) и платы время-коррелированного счёта фотонов SPC-130EM (Becker&Hickl, Германия), необходимой для измерения длительности между синхроимпульсом возбуждающего излучения и детектированием фотона флуоресценции, задетектированным с помощью ФЭУ – принципиальная схема установки представлена на рисунке 2.1. Для учёта различий в приёмо-передающих характеристиках установки при вертикальной и горизонтальной поляризации возбуждающего излучения и флуоресцентного отклика при расчёте кинетики анизотропии, сигнал флуоресценции измерялся в четырех различных комбинациях положений поляризатора и анализатора (поляризаторы WP12L-VIS, Thorlabs, США), из которых рассчитывался корректирующий фактор.

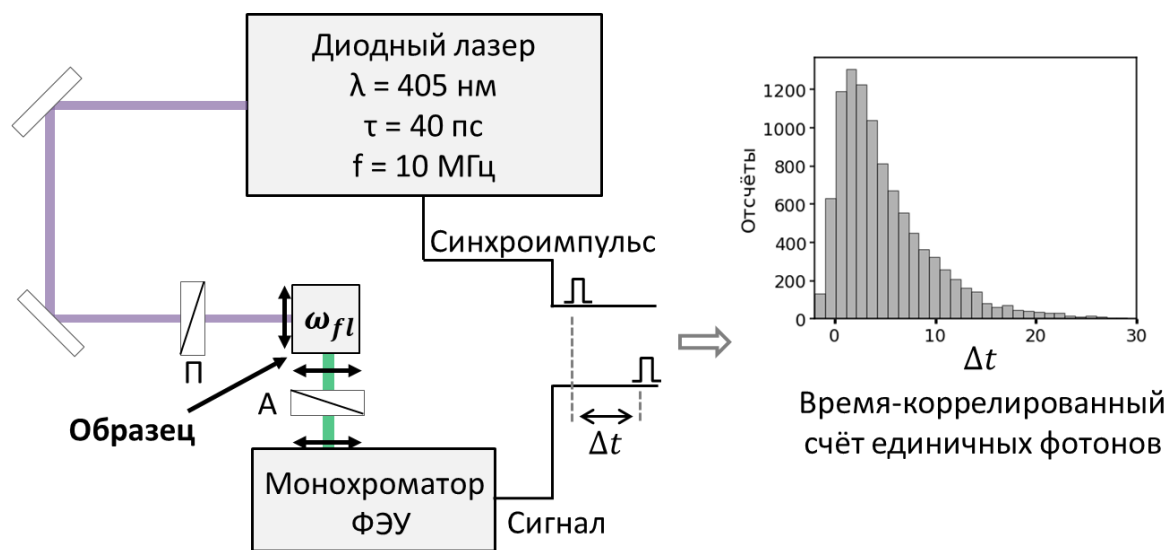


Рисунок 2.1 – Принципиальная схема установки, использованной для измерения кинетики затухания флуоресценции с временным разрешением ~ 150 пс с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов. П, А – поляризатор и анализатор, использованные для контроля поляризации возбуждающего и детектируемого излучения соответственно.

2.1.8 Лазерная кинетическая спектроскопия флуоресценции и анизотропии флуоресценции на пикосекундном временном масштабе

Для измерения кинетики затухания флуоресценции с разрешением ~ 150 фс была использована система, реализующая метод оптического стробирования сигнала (метод ап-конверсии флуоресценции) FOG100 (CDP Systems, Россия). Принципиальная схема установки продемонстрирована на рисунке 2.2. Для возбуждения флуоресценции образца использовался сигнал второй гармоники импульсного излучения титан-сапфирового лазера с длиной волны 800 нм, характерной длительностью импульса ~ 150 фс, частотой следования импульсов 80 МГц и средней мощностью сигнала второй гармоники 30 мВт. После возбуждения флуоресценции образца импульсом второй гармоники (2ω), коллимированный флуоресцентный отклик (ω_{fl}) сбивался на нелинейном кристалле бета-бората бария с лазерным импульсом на фундаментальной частоте ω , прошедшим через систему задержки. Генерируемый в нелинейном кристалле сигнал на суммарной частоте $\omega_{sum} = \omega + \omega_{fl}$, выделяемый с помощью двойного монохроматора (спектральное разрешение < 1.5 нм), детектировался с помощью ФЭУ, работающего в режиме счёта фотонов. За счёт того, что лазерный импульс имеет характерную длительность порядка 150 фс, эффективная генерация сигнала на суммарной частоте также ограничена временным интервалом порядка 150 фс – происходит “оптическое стробирование” сигнала флуоресценции посредством сигнала на фундаментальной частоте накачки. Указанное временное разрешение на настоящий момент невозможно достичь с помощью других (“не оптических”) методов, в частности, с помощью электронных методов стробирования сигнала.

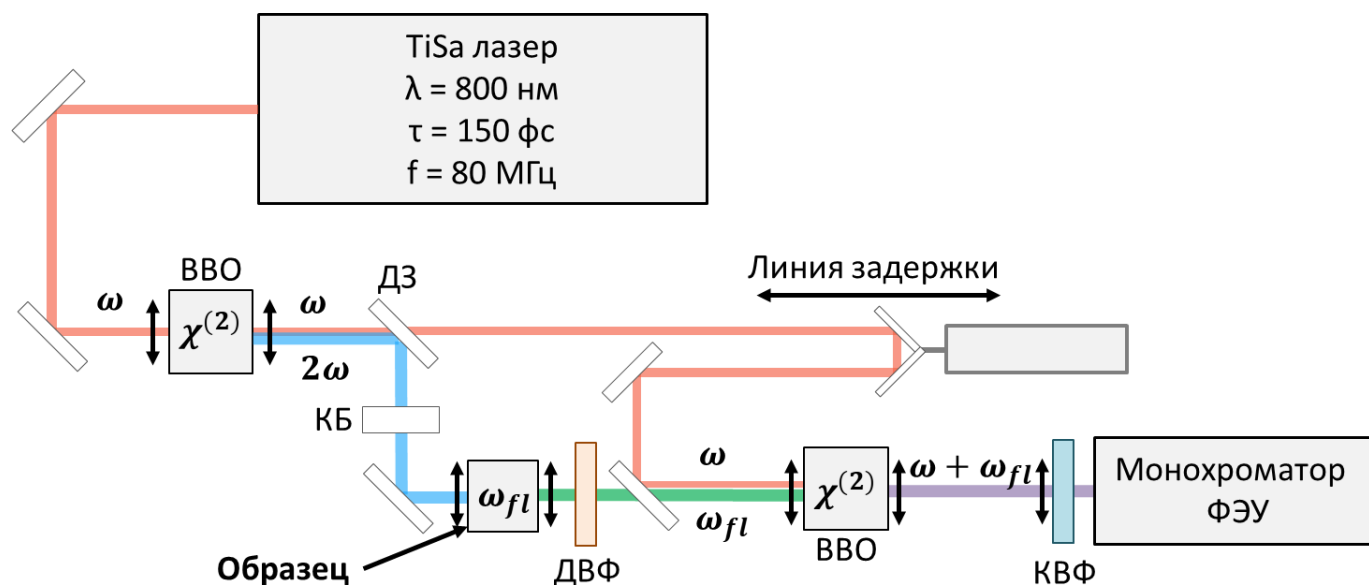


Рисунок 2.2 – Принципиальная схема установки, использованной для измерения кинетики затухания флуоресценции с временным разрешением ~ 150 фс с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. КБ – компенсатор Берека, используемый для контроля поляризации возбуждающего излучения, ДВФ – длинноволновой фильтр, ослабляющий сигнал импульса на удвоенной частоте накачки, возбуждающего флуоресценцию, КВФ – коротковолновый фильтр, ослабляющий фоновую засветку стробирующего импульса, ВВО – нелинейные кристаллы бета-бората бария, используемые для генерации удвоенной и суммарной частот.

При измерении кинетики затухания анизотропии флуоресценции для учёта различий в приёмо-передающих характеристиках установки для возбуждающего излучения различных поляризаций, дополнительно измерялась кинетика затухания анизотропии флуоресценции для красителя тиофлавина Т. Для данного красителя в водном растворе коэффициент анизотропии флуоресценции равен 0.4 в течение первой пикосекунды после начала возбуждения [147], откуда можно рассчитать соответствующий корректирующий фактор.

Анализ данных производился с помощью специально написанных скриптов для обработки на языке программирования Python 3 с использованием библиотек Numpy, Scipy, Pandas, Matplotlib, Scikit-learn, LmFit.

2.2 Общность спектров поглощения и флуоресценции ГСФ

В первую очередь была установлена общность стационарных оптических свойств поглощения и флуоресценции для исследуемых ГСФ. На рисунке 2.3 резюмированы свойства поглощения и флуоресценции для меланина, продуктов фотоокисления триптофана (доза облучения 20 Дж/см^3) и гликированного белка. Как уже было отмечено, меланин имеет бесструктурное поглощение в видимом и ближнем ИК диапазоне, экспоненциально спадающее с ростом длины волны возбуждения (Рисунок 2.3А). Было установлено, что в результате окисления триптофана и гликирования альбумина возникает аналогичное бесструктурное поглощение, экспоненциально спадающее с ростом длины волны, хорошо описываемое зависимостью (формула 2.2):

$$A(\lambda) = A_0 \exp\left(-\frac{\lambda}{\Lambda}\right), \quad (2.2)$$

где λ – длина волны поглощения, A_0 – предэкспоненциальный множитель, Λ – обратный спектральный наклон поглощения; параметры A_0 и Λ подбираются в результате аппроксимации спектра. Было получено, что параметр Λ – обратный наклон спектров поглощения, характеризующий разность длин волн, на которой происходит уменьшение величины поглощения в e раз – был различен для рассматриваемых систем. Определенная по спектральному диапазону 400–800 нм с использованием формулы 2.2 величина Λ составила 109.63 ± 0.12 нм для меланина, 82.9 ± 0.5 нм для продуктов фотоокисления триптофана и 68.9 ± 0.3 нм для продуктов гликирования белка. Отметим, что исходные прекурсоры, используемые для приготовления продуктов гликирования белка и продуктов фотоокисления триптофана обладали пренебрежимо малым поглощением $<10^{-3} \text{ см}^{-1}$ в видимом диапазоне (Рисунок 2.3А), которое, по всей видимости, было связано с естественным окислением реагентов в кислородной атмосфере.

Было установлено, что исследуемые объекты также обладают схожими флуоресцентными свойствами: при увеличении длины волны возбуждения наблюдался сдвиг полосы флуоресценции в длинноволновую область, при этом квантовый выход флуоресценции уменьшался в ~ 5 раз при увеличении длины волны возбуждения с 320 нм до 500 нм (Рисунок 2.3Б). На рисунках 2.3 В,Г резюмированы основные свойства наблюдаемого видимого флуоресцентного отклика. Было установлено, что, аналогично спектрам флуоресценции меланина, положение максимума спектра флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка линейно возрастает с ростом длины волны возбуждения (Рисунок 2.3В). При этом положение максимума эмиссии возрастает так, что при возбуждении флуоресцентного отклика на 320 нм величина Стоксова сдвига составляет $\sim 8000 \text{ см}^{-1}$ (7040, 7380 и 8570 см^{-1} для меланина, продуктов окисления триптофан и гликированного альбумина соответственно), а на длине волны возбуждения 500 нм составляет $\sim 2000 \text{ см}^{-1}$ (1550, 1680 и 2240 см^{-1}).

Было обнаружено, что с увеличением значения спектрального наклона поглощения Λ , максимум спектра флуоресценции сдвигается в красную область спектра (Рисунок 2.3В, Г). Так, положение максимума эмиссии флуоресценции с возбуждением на 400 нм для продуктов гликирования белка составило 460 нм, для продуктов фотоокисления триптофана 480 нм, а для меланина 496 нм (Рисунок 2.3Г). При этом величина спектрального наклона поглощения Λ также коррелирует с квантовым выходом флуоресценции, определенным по формуле 2.1. Было установлено, что квантовый выход флуоресценции продуктов гликирования белка, обладающих наименьшим значением параметра обратного спектрального наклона поглощения ($\Lambda = 68.9 \pm 0.3 \text{ нм}$), в ~ 1.9 раз выше квантового выхода флуоресценции продуктов окисления триптофана ($\Lambda = 82.99 \pm 9 0.59 \text{ нм}$) и в ~ 10 раз выше квантового выхода флуоресценции меланина ($\Lambda = 109.639 \pm 9 0.129 \text{ нм}$), при возбуждении флуоресценции на 400 нм (Рисунок 2.3Д).

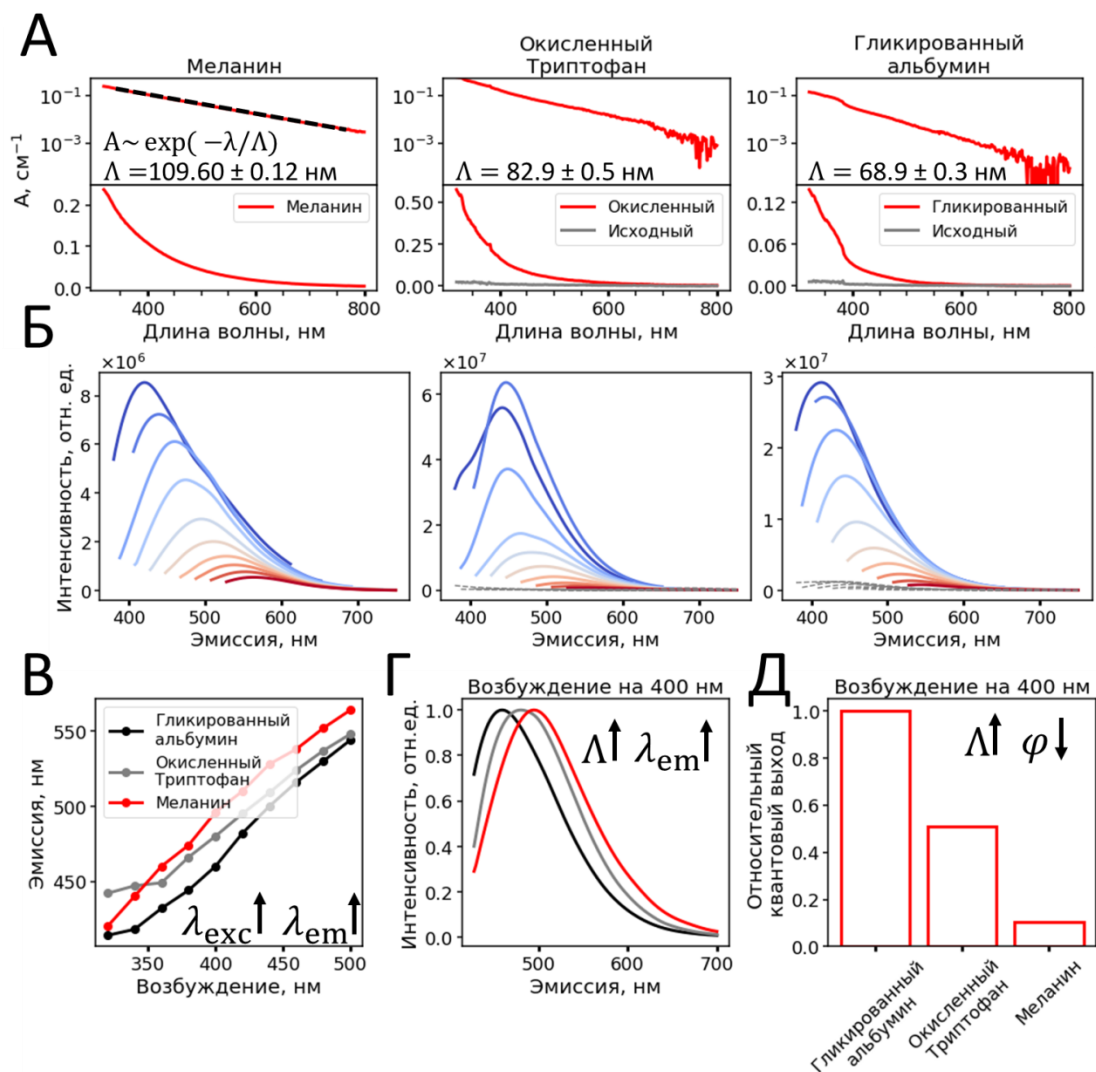


Рисунок 2.3 – А) Спектры поглощения меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка в полулогарифмическом (верхний ряд) и линейном масштабе (нижний ряд). На рисунках приведен параметр обратного спектрального наклона поглощения в полулогарифмическом масштабе Λ , определенный по диапазону длин волн 400–800 нм. Б) Спектры флуоресценции меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка для различных длин волн возбуждения. В) Зависимость максимума эмиссии флуоресценции от длины волны возбуждения флуоресценции для исследуемых ГСФ. Г) Спектры флуоресценции с возбуждением на 400 нм для указанных систем. Д) Относительные квантовые выходы флуоресценции (нормированные на квантовый выход для продуктов гликирования белка), рассчитанные по формуле 2.1 рассматриваемых систем с возбуждением эмиссии на 400 нм.

Также было получено, что флуоресцентный отклик от продуктов фотоокисления триптофана может быть возбужден/задетектирован в красном/ближнем инфракрасном диапазоне. Для этого водный раствор аминокислоты триптофана (1 мг/мл, объем 2 мл) был фотоокислен с помощью источника излучения на 254 нм дозой ~ 200 Дж/см³, а затем высушен при комнатной температуре на стеклянной подложке. Полученная твердая фаза продуктов окисления обладала флуоресцентным откликом, который регистрировался с помощью метода FLIM (микроскопии с визуализацией времени жизни) при возбуждении на 640 нм и детектировании в диапазоне 660–720 нм. Было установлено, что кинетика затухания флуоресценции в каждом пикселе изображения может быть описана биэкспоненциальной кривой затухания с предэкспоненциальными факторами $a_1 \sim 81\%$, $a_2 \sim 19\%$ и характерными временами $\tau_1 \sim 0.22$ нс и $\tau_2 \sim 0.73$ нс. По полученным для каждого пикселя значениям амплитуд a_1 , a_2 затухания флуоресценции и временам τ_1 , τ_2 было рассчитано среднее время затухания флуоресценции по формуле (2.3) [148]:

$$\tau_m = \frac{\sum_{i=1}^N a_i \tau_i}{\sum_{i=1}^N a_i}, \quad (2.3)$$

где N – количество используемых компонент (в данном случае $N = 2$). На рисунке 2.4 представлена карта распределения среднего времени затухания флуоресценции τ_m (Рисунок 2.4А) и гистограммы среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции для всех пикселей полученного с помощью метода FLIM изображения (Рисунок 2.4 Б,В). Как видно, среднее время жизни флуоресценции при возбуждении на 640 нм составляло порядка 0.3–0.5 нс и было неоднородно распределено по образцу, что может быть объяснено гетерогенным составом получаемых продуктов окисления.

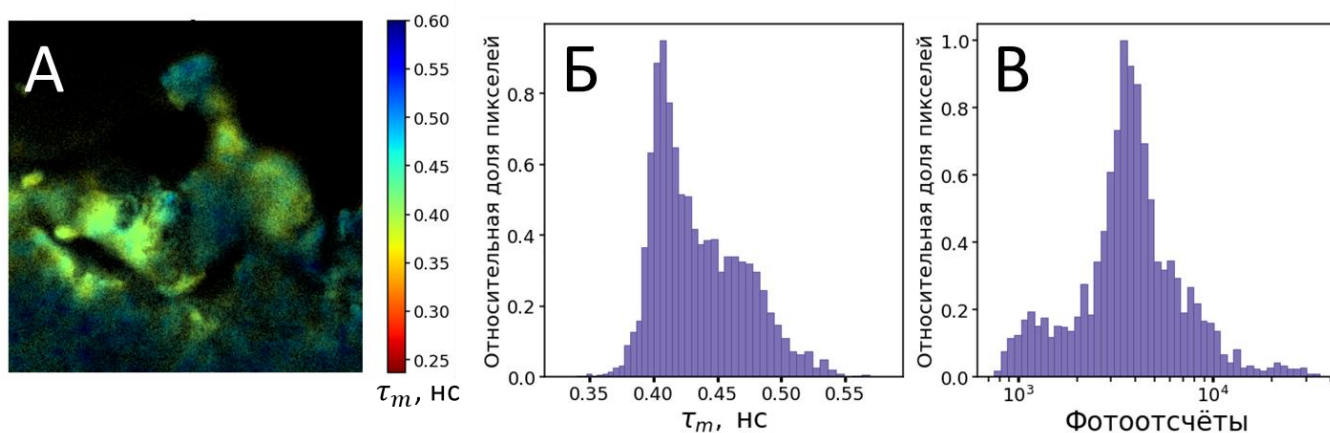


Рисунок 2.4 – Карты среднего времени затухания флуоресценции (А), гистограммы распределения среднего времени затухания флуоресценции (Б) и интенсивности флуоресценции (В) продуктов фотоокисления триптофана при возбуждении флуоресценции на 640 нм и детектировании в диапазоне 660–720 нм.

Таким образом, было установлено, что продукты окисления и гликирования белков обладают схожими с меланином свойствами поглощения и флуоресцентного отклика, возбуждаемого в видимом диапазоне, параметры которого (положение максимума эмиссии, квантовый выход) зависят от длины волны возбуждения. При этом для продуктов окисления триптофана было установлено, что флуоресцентный отклик может быть возбужден на 640 нм и задетектирован в красной и ближней инфракрасной области спектра. Помимо схожести наблюдаемых оптических свойств исследуемых систем, также можно сделать вывод о том, что основным “управляющим параметром”, характеризующим наблюдаемые стационарные оптические свойства ГСФ, является обратный спектральный наклон поглощения Λ – данный параметр одновременно характеризует свойства поглощения и взаимосвязан с параметрами стационарного флуоресцентного отклика (положением максимума эмиссии, квантовым выходом флуоресценции) в видимом диапазоне.

2.3 Взаимосвязь оптических свойств и гетерогенности молекулярного состава ГСФ

Как было указано в Главе 1 (Раздел 1.3), для гетерогенных систем флуорофоров в ряде гипотез предполагается, что наблюдаемый оптический отклик формируется за счёт “химического беспорядка”, т.е. является результатом усреднения оптического отклика невзаимодействующих молекулярных хромофоров и флуорофоров, входящих в состав системы. Поскольку в данной работе продукты фотоокисления триптофана и продукты гликирования белка изготавливались из прекурсора с известным молекулярным составом (Раздел 2.1), для данных систем было возможно отследить одновременные изменения оптических свойств с изменением их химического состава.

Для установления взаимосвязи между стационарными оптическими свойствами гетерогенных систем и их молекулярного состава, для триптофана, фотоокисленного с помощью УФ-излучения в течение различного времени (30–180 мин., что соответствует дозе порядка $\sim 15\text{--}100$ Дж/см²), были измерены масс-спектры в диапазоне масс 200–700 Да (разрешение 0.01 Да) с помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием. Полученные параметры молекулярного состава были соотнесены со спектральными оптическими свойствами для исследуемых образцов.

На рисунке 2.5А представлены спектры поглощения растворов триптофана с различной длительностью фотоокисления УФ-излучением (0–180 мин.). Как видно, с увеличением дозы фотооблучения происходит не только увеличение амплитуды поглощения в видимом диапазоне, но также изменяется и величина спектрального наклона поглощения Λ . При увеличении длительности фотоокисления с 30 до 180 минут величина обратного наклона поглощения монотонно возрастает от 83 нм до 104 нм. При этом с дозой фотоокисления увеличивается и гетерогенность молекулярного состава исследуемой смеси. На рисунке 2.5Б представлены

диаграммы ван Кревелена, отражающие молекулярные формулы (200–700 Да), присутствующие в образце в координатах отношения чисел атомов кислорода (О/С) и водорода (Н/С) к числу атомов углерода в данной молекулярной формуле. Видно, что с увеличением времени окисления происходит значимое изменение молекулярного состава, при этом появляется большое число новых молекулярных соединений с отличным от триптофана молекулярным строением.

Было установлено (Рисунок 2.5В), что с увеличением длительности фотоокисления с 30 до 180 мин. число новых молекулярных формул с относительным вкладом в детектируемый масс-спектр более 1% увеличивается от ~50 до 400 и линейно коррелирует со средним значением величины поглощения в диапазоне 300–700 нм (коэффициент корреляции Пирсона $r = 0.96$, $p = 0.002$). Также было получено, что с увеличением числа новых молекулярных формул монотонно возрастает величина обратного спектрального наклона поглощения Λ (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0.94$, $p = 0.005$). При этом следует отметить, что с ростом длительности окисления не наблюдалось накопления определенного вида флуоресцентного продукта – возникало большое число новых молекулярных формул с относительным вкладом порядка 0.001–0.01 (Рисунок 2.5Д).

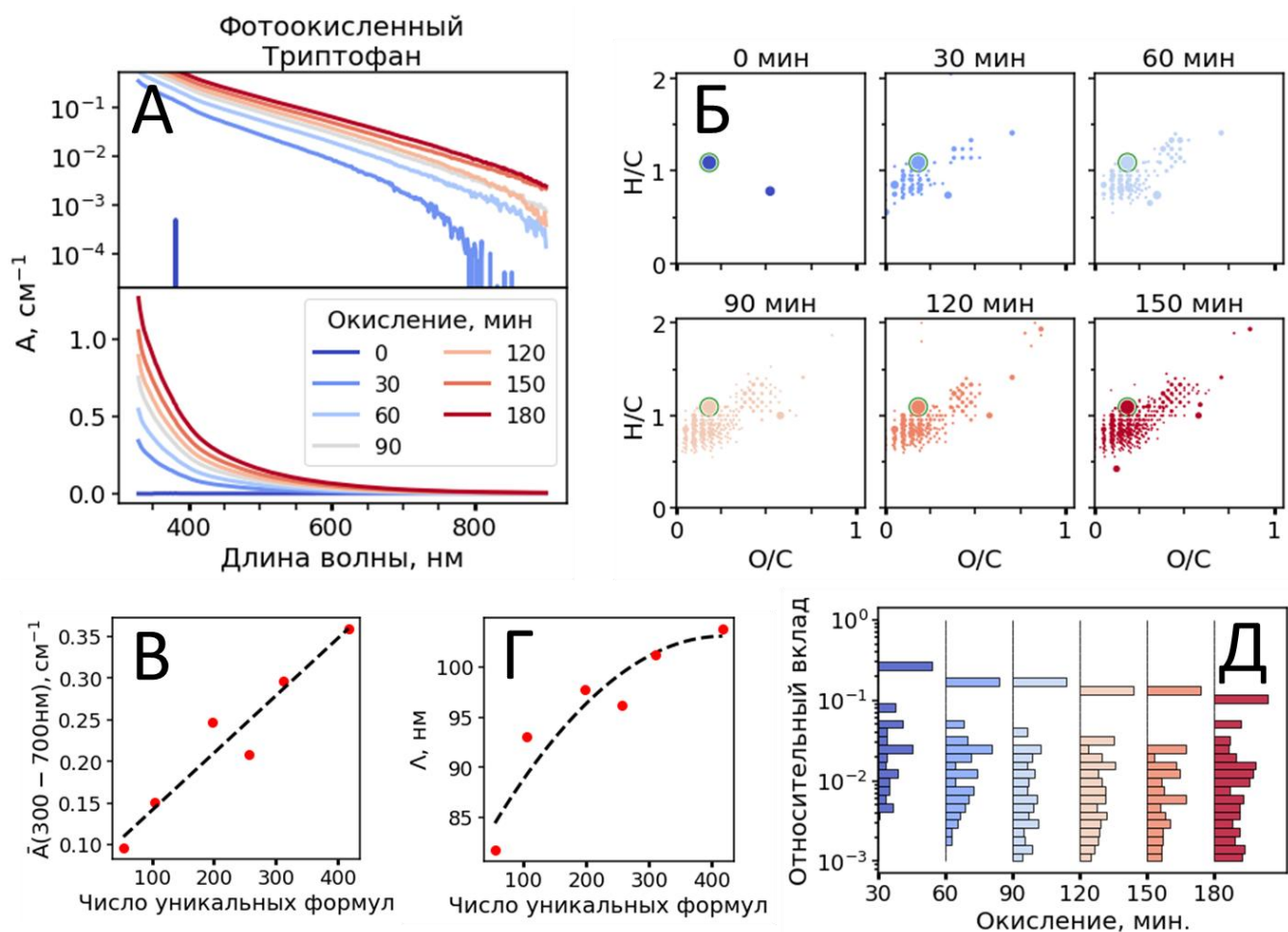


Рисунок 2.5 – А) Спектры поглощения растворов триптофана, окисленных с помощью УФ-излучения в течение различного времени. Б) Диаграммы ван Кревелена для образцов триптофана с различным временем фотоокисления. Каждая точка на диаграмме соответствует молекулярной формуле с определенным соотношением числа атомов кислорода (О/С) и водорода (Н/С) к числу атомов углерода в установленной молекулярной формуле. Размер точки соответствует относительному вкладу данной молекулярной формулы в детектируемый масс-спектр. В, Г) Взаимосвязь величины среднего поглощения в диапазоне 300–700 нм (В) и параметра поглощения Λ (Г) с числом уникальных формул с относительным вкладом в масс-спектр более 1%. Д) Гистограммы распределений относительного вклада различных молекулярных формул в общий масс-спектр продуктов триптофана, полученных для различных длительностей фотоокисления.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что изменение параметра обратного спектрального наклона поглощения Λ коррелирует с увеличением гетерогенности молекулярного состава в исследуемых системах, то есть наличие “химического

беспорядка” – большого числа различных молекулярных формул – сопутствует возникновению видимого поглощения и флуоресценции в гетерогенных системах флуорофоров.

2.4 Связь параметров супрамолекулярных агрегатов в ГСФ с их оптическими свойствами

Помимо изменения молекулярного состава в процессе окисления и гликирования исходных аминокислот и белков, в исследуемых системах также может происходить образование супрамолекулярных агрегатов различного размера. В ряде работ указывается, что ключевую роль в возникновении видимой флуоресценции в исследуемых системах может играть межмолекулярное электронное взаимодействие между отдельными молекулами в агрегатах, и именно наличие межмолекулярного взаимодействия приводит к возникновению видимого флуоресцентного отклика [7;17;96]. В данном разделе были исследованы вопросы наличия супрамолекулярных агрегатов в исследуемых системах на примере продуктов фотоокисления триптофана, и того, как связаны размеры молекулярных агрегатов с наблюдаемыми оптическими свойствами.

Визуализация супрамолекулярных агрегатов в растворах исходного прекурсора и фотоокисленного триптофана была реализована с помощью микроскопии светового листа (микроскопии плоскостного освещения). Метод микроскопии светового листа подразумевает картирование широкого поля зрения (в данном эксперименте 100×100 мкм) с малой глубиной резкости (~ 5 – 10 мкм) за счёт освещения поля зрения с помощью плоскопараллельного пучка, падающего на объект ортогонально объективу, детектирующему поле зрения [149]. Интенсивность света, рассеянного агрегатами, значительно выше, чем рассеяние от отдельных молекул, так как сечение рассеяния в приближении Рэлея зависит квадратично от объема частицы [150] – таким образом, возможно детектирование отдельных частиц, даже в случае если их размеры не превосходят дифракционного предела.

Было установлено, что в результате фотоокисления триптофана, параллельно с возникновением поглощения, в системе происходит агрегация. Так, для исходного раствора прекурсора в среднем на кадр в канале рассеяния не наблюдалось частиц на фоне сигналов рассеяния и флуоресценции от раствора образца, в то время как для образца триптофана, фотоокисленного в течение 120 минут, среднее число частиц увеличивалось до 83 ± 19 на кадр. На рисунке 2.6А представлено поле светового листа для окисленного триптофана (120 мин. фотоокисления). Было установлено, что присутствующие в системе агрегаты, визуализируемые с помощью микроскопии светового листа, обладают низким сигналом флуоресценции (Рисунок 2.6 Б). При этом сигнал флуоресценции, возбуждаемый на 405 нм и детектируемый в диапазоне 450–900 нм, для объёмной фракции образца, соответствует либо единичным молекулярным флуорофорам, либо супрамолекулярным агрегатам, которые невозможно разрешить с помощью метода спектроскопии светового листа.

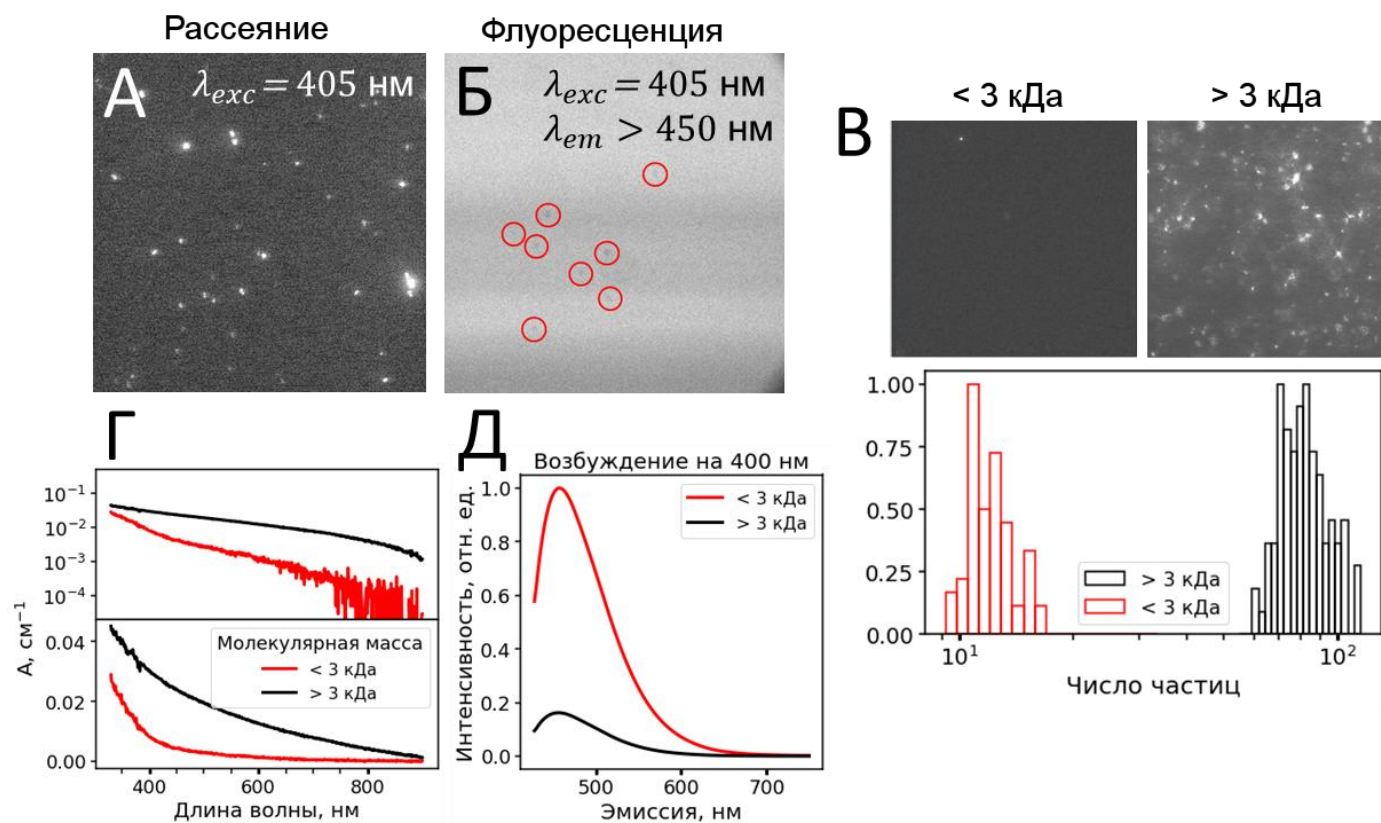


Рисунок 2.6 – А, Б) Изображения поля светового листа (размер области 100×100 мкм), возбуждение на 405 нм, в спектральном канале, детектирующем сигнал рассеяния (А) и флуоресценции в диапазоне 450–900 нм (Б) водного раствора продуктов фотоокисления триптофана (120 мин. фотооблучения). На изображении (Б) красным обведены темные точки, соответствующие крупным агрегатам. В) Характерные изображения поля светового листа в канале светорассеяния для фракций продуктов фотоокисления триптофана с молекулярной массой менее 3 кДа и более 3 кДа (верхняя панель). Гистограмма распределения числа ярких частиц на изображении, полученная с помощью обработки фильмов с помощью алгоритмов трэкинга частиц (нижняя панель). Г, Д) Спектры поглощения (Г) и флуоресценции (Д) для фракций образцов окисленного триптофана с размером менее 3 кДа и более 3 кДа. Спектры флуоресценции нормированы на величину оптической плотности на длине волны возбуждения (400 нм), для возможности сравнения квантовых выходов отдельных фракций.

Для дальнейшего исследования взаимосвязи флуоресцентного отклика с размером супрамолекулярных агрегатов, продукты фотоокисления триптофана были разделены на растворы фракций частиц с молекулярной массой более 3 кДа и менее 3 кДа с использованием мембранных целлюлозных фильтров (Раздел 2.1.2).

Изображения полей зрения светового листа для данных фракций представлены на рисунке 2.6В. После фильтрации через 3 кДа-фильтр число частиц в поле снижалось на порядок, по сравнению с образцом с фракцией более 3 кДа (Рисунок 2.6В), и было равно 14 ± 6 частицам на поле зрения.

Для растворов фракций с молекулярной массой продуктов окисления более 3 кДа и менее 3 кДа были измерены спектры поглощения и стационарные спектры флуоресценции с возбуждением на 400 нм (Рисунок 2.6 Г,Д). Было обнаружено, что при фракционировании значительным образом изменяется обратный спектральный наклон поглощения Λ . Так, для фракции с малым размером (< 3 кДа) спектральный наклон Λ составил 65.5 ± 0.8 нм, в то время как для фракции с размером более 3 кДа $\Lambda = 183.3 \pm 2.6$ нм (Рисунок 2.6Г). При этом было установлено, что квантовый выход флуоресценции для фракции с размером менее 3 кДа в несколько раз превышает квантовый выход флуоресценции крупной фракции – для флуоресцентного отклика с возбуждением на 400 нм отношение квантовых выходов флуоресценции малой фракции крупной составило ~ 6.2 (Рисунок 2.6Д).

Таким образом, для модельной ГСФ было установлено, что размер агрегатов связан со свойствами поглощения и флуоресценции: фракция с низкой молекулярной массой (менее 3 кДа, т.е. наночастицы и отдельные молекулы размером менее 2 нм) обладают малым спектральным наклоном поглощения Λ и высоким квантовым выходом флуоресценции, в отличие от супрамолекулярных агрегатов с молекулярной массой более 3 кДа, которые имеют большие значения спектрального наклона поглощения Λ .

2.5 Кинетика релаксации флуоресцентного отклика на пикосекундном и наносекундном масштабах в 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

флуорофоров порядка 1 мМ). Малое расстояние между флуорофорами в агрегате может приводить к электронному взаимодействию между ними, изменяющему оптические свойства системы в сравнении с оптическими свойствами единичных невзаимодействующих молекулярных флуорофоров. В частности, как предполагается для меланина, межмолекулярное взаимодействие может приводить к некогерентному переносу энергии в системе, например, по фёрстеровскому механизму, или же приводить к когерентному переносу энергии (возникновению экситонных состояний, Раздел 1.3.1). Экспериментальное проявление данного эффекта во флуоресцентных свойствах при этом не было продемонстрировано в литературе.

Перенос энергии между флуорофорами в системе должен существенным образом изменять кинетику затухания флуоресценции, детектируемую на различных длинах волн эмиссии флуоресценции (влиять на мгновенный спектр флуоресценции). Так, например, в случае переноса энергии в паре донор-акцептор по диполь-дипольному механизму, время жизни донора, поглощающего и излучающего в коротковолновой части спектра, должно уменьшаться за счёт возникновения дополнительного канала дезактивации, связанного с переносом возбуждения на акцептор, поглощающий и излучающий в длинноволновой области. За счёт изменения параметров затухания флуоресценции на различных длинах волн эмиссии в системе также должна наблюдаться спектральная миграция мгновенного спектра флуоресценции из коротковолнового в длинноволновый диапазон. В связи с этим, для выявления значимости межмолекулярного взаимодействия в формировании оптического отклика ГСФ, в работе были проведены исследования свойств кинетики затухания флуоресценции на различных масштабах времени затухания оптического отклика с помощью методов лазерной флуоресцентной спектроскопии с фемтосекундным и пикосекундным временным разрешением.

Для исследования временных характеристик релаксации флуоресценции ГСФ, была измерена кинетика затухания флуоресценции для образцов меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка с пикосекундным и фемтосекундным временным разрешением для различных длин волн эмиссии с возбуждением флуоресценции на 405 и 400 нм соответственно. Кинетика затухания флуоресценции с разрешением ~ 150 пс была измерена с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с возбуждением флуоресценции на 405 нм и детектированием сигнала в диапазоне длин волн 430–600 нм. Кинетика затухания флуоресценции с временным разрешением ~ 150 фс была измерена с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с возбуждением флуоресценции на 400 нм и детектированием сигнала в диапазоне 480–560 нм (подробное описание методов и схемы установок приведены в Разделе 2.1).

Было обнаружено, что на пикосекундном масштабе времени (0–500 пс после начала возбуждения) и на наносекундном масштабе времени (0–20 нс) в исследуемых образцах кинетика затухания флуоресценции имеет немоноэкспоненциальный закон затухания. Экспериментально детектируемый сигнал флуоресценции $F(t)$ хорошо описывался ($\chi^2 < 1.2$) функцией, представляющей собой свёртку функции отклика детектора ($IRF(t)$, от “instrument response function”) и суммы трёх экспоненциальных законов затухания (формула 2.4):

$$F(t) = \int IRF(t - t') \sum_{i=1}^3 a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) dt', \quad (2.4)$$

где a_i – амплитуда компоненты затухания со временем затухания τ_i , $IRF(t)$ – функция отклика детектора, с которой производится свёртка. Предэкспоненциальные факторы a_i и времена затухания τ_i подбирались с помощью метода наименьших квадратов, при аппроксимации зависимостей была использована функция отклика детектора в виде гауссианы, ширина на полувысоте и

положением максимума которой также подбирались с помощью метода наименьших квадратов.

Было установлено, что кинетика затухания флуоресценции, детектируемая с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением ~ 150 фс, в интервале 0–500 пс имеют характерные времена затухания $\tau_1 \sim 1$ пс, $\tau_2 \sim 10$ и $\tau_3 \sim 100$ пс, и амплитуды $a_1 \sim 50\text{--}70\%$, $a_2 \sim 20\text{--}30\%$ и $a_3 \sim 10\%$ (верхняя панель Рисунок 2.7А). Параметры кинетики затухания флуоресценции, измеренной с фемтосекундным временным разрешением, на длине волны эмиссии 500 нм также представлены в Таблице 2.1. Для кинетики затухания флуоресценции, детектируемой с временным разрешением ~ 150 пс, времена затухания составили $\tau_1 \sim 0.5\text{--}1$ нс, $\tau_2 \sim 3$ нс и $\tau_3 \sim 10$ нс с амплитудами вкладов $a_1 \sim 50\%$, $a_2 \sim 30\text{--}40\%$ и $a_3 \sim 10\%$ (нижняя панель Рисунок 2.7А и Таблица 2.2).

Было установлено, что значения времен затухания флуоресценции τ_i и амплитуд вкладов компонент a_i зависят от длины волны эмиссии флуоресценции, как для отклика детектируемого на пикосекундном временном масштабе, так и для компонент затухания, проявляющихся на масштабе наносекунд. Так, в частности, амплитуда a_1 сверхбыстрой компоненты со временем затухания $\tau_1 \sim 1$ пс, убывает ростом длины волны возбуждения, а время жизни данной компоненты увеличивается с ростом длины волны эмиссии (Рисунок 2.7Б, В).

Кинетика затухания флуоресцентного отклика была охарактеризована средним временем затухания флуоресценции τ_m (формула 2.3 с числом компонент $N = 3$). Было получено, что среднее время затухания флуоресценции τ_m на пикосекундном масштабе, рассчитанное по формуле 2.3, монотонно возрастает с увеличением длины волны возбуждения в диапазоне 480–560 нм, при этом на наносекундном масштабе в диапазоне 430–600 нм имеет немонотонную зависимость от длины волны эмиссии. Пример зависимости среднего времени затухания флуоресценции τ_m

от длины волны возбуждения для продуктов фотоокисления триптофана представлен на рисунке 2.7Г.

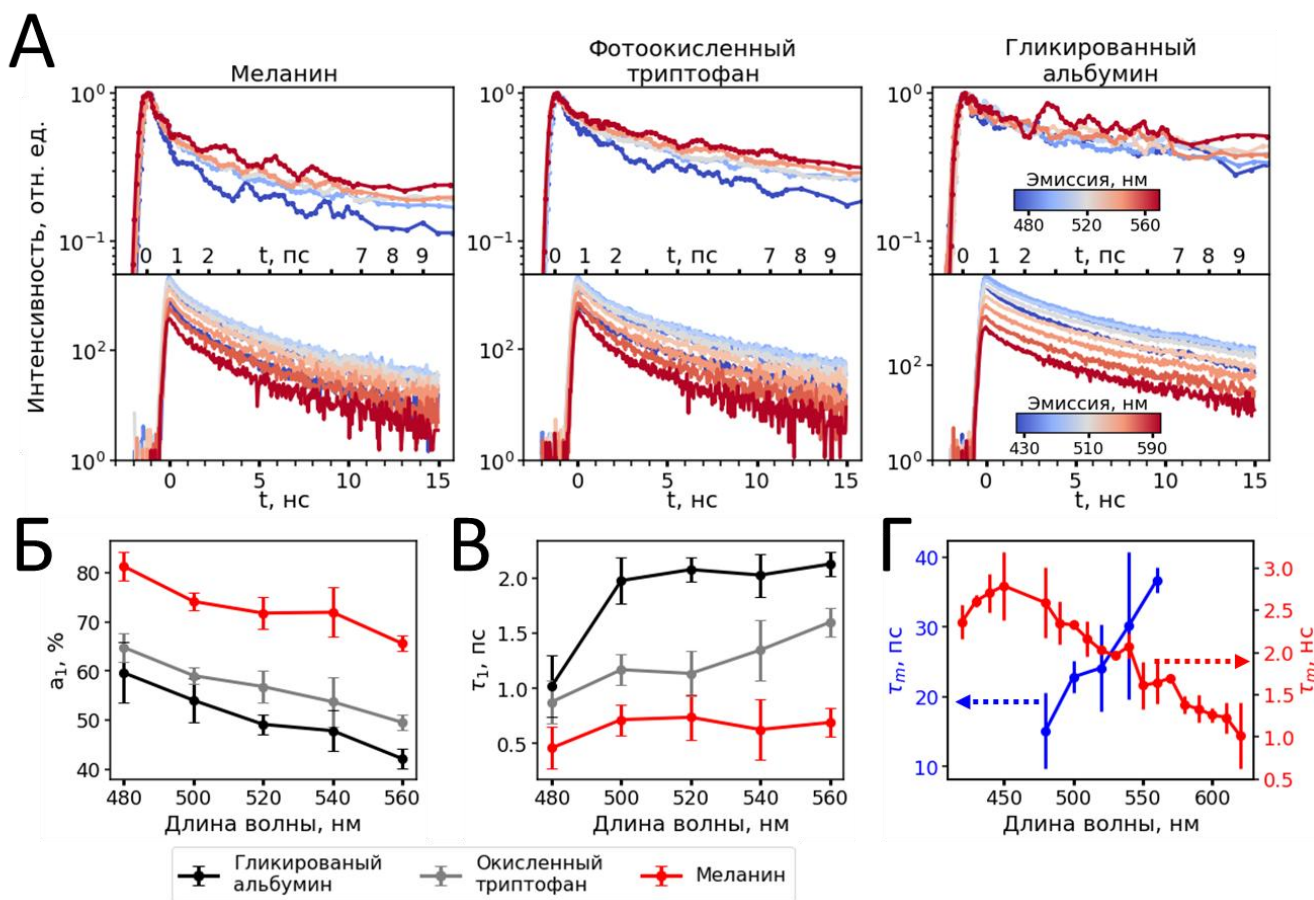


Рисунок 2.7 – Результаты измерения кинетики затухания флуоресценции на пикосекундном и наносекундном временных масштабах для меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка. А) Кинетика затухания флуоресценции, полученная с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с возбуждением эмиссии на 400 нм и детектированием в диапазоне 480–560 нм с шагом 20 нм (верхняя панель). Кинетика затухания флуоресценции, полученная с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с возбуждением эмиссии на 405 нм и детектированием сигнала в диапазоне 430–600 нм (нижняя панель). Б, В) Зависимость амплитуды (Б) и времени затухания (В) сверхбыстрой компоненты кинетики затухания флуоресценции для исследуемых ГСФ. Г) Зависимость среднего времени затухания флуоресценции, определенного из кинетики затухания флуоресценции, полученной с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с фемтосекундным временным разрешением (синяя кривая), и с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с наносекундным временным разрешением (красная кривая).

Таблица 2.1. Параметры затухания флуоресценции ГСФ, измеренные с фемтосекундным временным разрешением с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. Длина волны возбуждения 400 нм, длина волны эмиссии флуоресценции 500 нм.

Образец	$a_1, \%$	$\tau_1, \text{пс}$	$a_2, \%$	$\tau_2, \text{пс}$	$a_3, \%$	$\tau_3, \text{пс}$
Продукты гликирования белка	54 ± 4	1.98 ± 0.07	23 ± 3	20.6 ± 1.5	22 ± 10	512 ± 27
Продукты фотоокисления триптофана	59.3 ± 2.5	1.17 ± 0.05	33 ± 4	16.3 ± 0.9	7.2 ± 2.1	227 ± 11
Меланин	74 ± 2.2	0.717 ± 0.027	19 ± 3	10.9 ± 0.6	6.3 ± 1.4	178 ± 8

Таблица 2.2. Параметры затухания флуоресценции ГСФ, измеренные с пикосекундным временным разрешением с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов. Длина волны возбуждения 405 нм, длина волны эмиссии флуоресценции 500 нм.

Образец	$a_1, \%$	$\tau_1, \text{нс}$	$a_2, \%$	$\tau_2, \text{нс}$	$a_3, \%$	$\tau_3, \text{нс}$
Продукты гликирования белка	54 ± 3	1.16 ± 0.03	39.3 ± 2.1	4.05 ± 0.16	7.6 ± 1.7	11.6 ± 0.23
Продукты фотоокисления триптофана	56.9 ± 2.8	0.76 ± 0.05	35 ± 3	3.1 ± 0.3	9 ± 4	9.2 ± 0.4
Меланин	48.8 ± 1.3	0.368 ± 0.029	42 ± 3	1.96 ± 0.10	9 ± 2	7.42 ± 0.27

Полученные зависимости кинетики затухания флуоресценции на различных длинах волн эмиссии позволили провести анализ эволюции мгновенных спектров затухания

флуоресценции для исследуемых образцов. На рисунках 2.8А,Б представлены мгновенные спектры флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана, рассчитанные по данным кинетики затухания флуоресценции, измеренной на пикосекундном и наносекундном масштабах. На первых 5–10 пс после возбуждения в исследуемых ГСФ наблюдалась спектральная миграция мгновенного спектра флуоресценции из коротковолновой области спектра в длинноволновую (Рисунок 2.8А). При этом на наносекундном масштабе в диапазоне 0–15 нс был обнаружен обратный тренд – интенсивность флуоресцентного отклика на красном краю затухала быстрее, чем флуоресцентный отклик в синей области спектра, что приводило к смещению мгновенных спектров флуоресценции в синюю область спектра (Рисунок 2.8Б).

Также было установлено, что параметры сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции различаются для различных типов систем (Рисунок 2.7Б,В, Рисунок 2.8В,Г). При этом параметры сверхбыстрой компоненты связаны с обратным спектральным наклоном поглощения Λ , характеризующим свойства стационарного поглощения и флуоресценции исследуемых систем (Раздел 2.2). Так, амплитуда сверхбыстрой компоненты возрастала с увеличением параметра Λ исследуемой ГСФ – для продуктов гликирования белка для флуоресценции на длине волны эмиссии 500 нм величина амплитуды сверхбыстрой компоненты составила $54 \pm 3\%$ ($\Lambda = 68.9 \pm 0.3$ нм), в то время как для меланина данный величина данного параметра составила $74 \pm 2.2 \%$ ($\Lambda = 109.63 \pm 0.12$ нм, Рисунок 2.8В). Время затухания сверхбыстрой компоненты, напротив, убывало с ростом Λ : для продуктов гликирования белка время затухания сверхбыстрой компоненты составило 1.98 ± 0.07 пс, в то время как для меланина характерное время затухания составило 0.717 ± 0.027 пс (Рисунок 2.8Г).

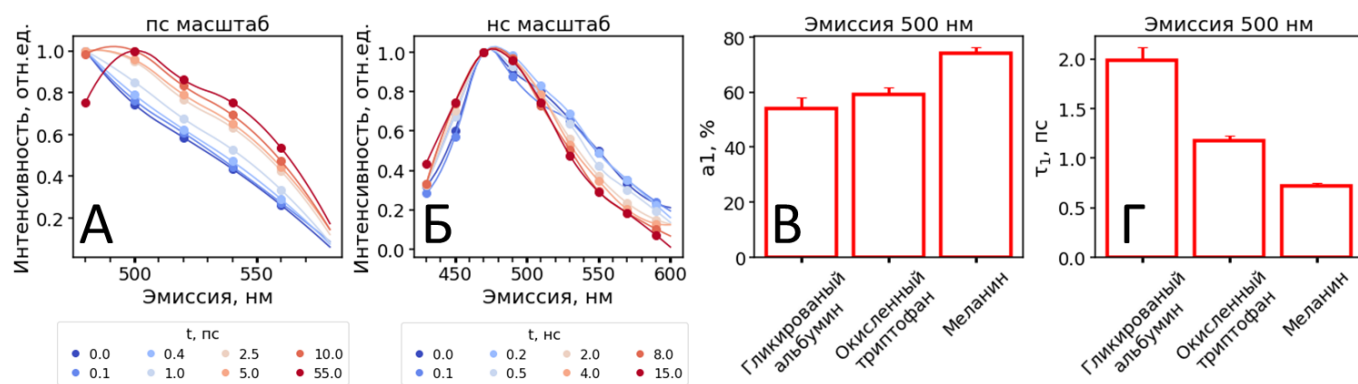


Рисунок 2.8 – А,Б) Эволюция мгновенных спектров флуоресценции в диапазоне 0–50 пс (А) и 0–15 нс (Б) для продуктов фотоокисления триптофана, рассчитанные на основе измеренной кинетики затухания флуоресценции с фемтосекундным (А) и пикосекундным (Б) временным разрешением. В, Г) Амплитуда (В) и характерное время затухания (Г) сверхбыстрой компоненты кинетики затухания флуоресценции для образцов продуктов гликирования белка (альбумина), продуктов фотоокисления триптофана и меланина. Образцы упорядочены по величине обратного спектрального наклона поглощения Λ .

Обнаруженная в кинетике затухания флуоресценции компонента релаксации с характерным пикосекундным временем затухания, параметры которой зависят от длины волны эмиссии, может свидетельствовать в пользу нескольких эффектов, проявляемых в ГСФ. Во-первых, сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции может быть следствием переноса энергии между флуорофорами в системе, который, как предполагается, может принимать участие в формировании оптических свойств ГСФ. Во-вторых, данная компонента может быть связана с локальной подстройкой окружения флуорофора (ориентационной релаксацией молекул растворителя), возникающей за счёт изменения дипольного момента флуорофора при возбуждении. Подробнее обсудим каждый из возможных эффектов.

При переносе энергии по диполь-дипольному механизму, передача возбуждения обычно происходит от флуорофоров, обладающих максимумом эмиссии в коротковолновой области спектра, на флуорофоры, поглощающие и излучающие в длинноволновой области спектра. Такая передача возбуждения должна приводить к

наблюдению компоненты затухания флуоресценции, параметры которой будут зависеть от длины волны возбуждения так, как это наблюдается для сверхбыстрой компоненты с пикосекундным временем релаксации (Рисунок 2.8В,Г), так как скорость дезактивации возбужденного состояния для флуорофоров-доноров в случае переноса возбуждения должна быть существенно выше, чем для акцепторов возбуждения, за счёт дополнительного канала дезактивации, связанного с трансфером энергии на акцепторы. Зависимость параметров затухания флуоресценции от длины волны, в свою очередь, должна приводить к спектральной миграции возбуждения из синей области в красную область спектра, аналогично спектральной миграции, наблюдаемой на рисунке 2.8А. Предполагаемый процесс переноса возбуждения в гетерогенных системах флуорофоров схематично изображен на рисунке 2.9А – поглощение возбуждающего излучения происходит флуорофорами-донорами, которые затем передают возбуждение на флуорофоры-акцепторы, излучающие в более длинноволновой области спектра.

Некогерентный перенос энергии, в частности, перенос энергии по фёрстеровскому (диполь-дипольному) механизму для флуорофоров в растворе обычно имеет характерное время порядка 0.1–1 нс [2], однако в некоторых случаях время переноса может снижаться до 1–10 пс. В частности сверхбыстрый перенос энергии на пикосекундном масштабе наблюдается в некоторых флуоресцентных сопряженных полимерах, например, РЗНГ (поли(3-гексилтиофен-2,5-диил)) или МЕН-PPV (поли[2-метокси-5-(2'-этилгексилокси)-1,4-фениленвинилен]), и связан с некогерентным переносом энергии по фёрстеровскому механизму среди отдельных флуоресцентных звеньев в полимерной цепочке [151]. Таким образом, связь пикосекундной компоненты в кинетике затухания флуоресценции с некогерентным переносом энергии не может быть полностью исключена из рассмотрения, исходя только из результатов, представленных в данном разделе, и требуются

дополнительные эксперименты, верифицирующие наличие или отсутствие переноса возбуждения в исследуемых системах.

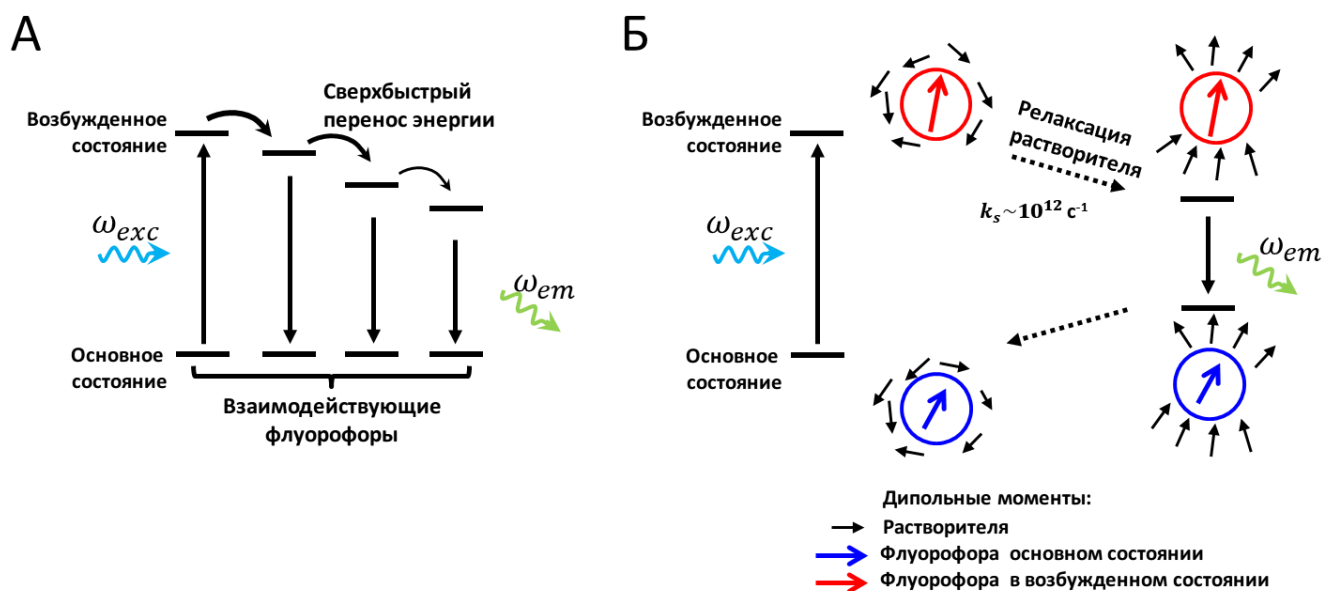


Рисунок 2.9 – Возможные механизмы, приводящие к наблюдению сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции: перенос энергии между взаимодействующими флуорофорами системы (А) и релаксация растворителя вокруг единичных флуорофоров системы (Б).

Второй эффект, который может приводить к наблюдению в кинетике затухания флуоресценции сверхбыстрой компоненты, может быть обусловлен локальной подстройкой окружения флуорофора (ориентационной релаксацией молекул растворителя), возникающей за счёт изменения дипольного момента флуорофора при возбуждении. При этом данный эффект может наблюдаться даже в случае единичных молекул-флуорофоров, находящихся в растворе [2;152]. Отметим, что эффект для единичных молекул-флуорофоров проявляется только в коротковолновой части спектра эмиссии (т.е. для значений длин волн меньших положения максимума спектра эмиссии флуоресценции).

Суть данного эффекта состоит в следующем. Дипольные моменты молекулы-флуорофора в основном и возбужденном состоянии могут быть различны. За счёт того, что возбуждение электронной подсистемы молекулы происходит за время

порядка $\sim 10^{-15}$ с, дипольные моменты молекул растворителя, находящиеся в локальном окружении флуорофора, не успевают переориентироваться при возбуждении флуорофора, чтобы минимизировать энергию взаимодействия с флуорофором в возбужденном состоянии, изменившим свой дипольный момент. Переориентация молекул растворителя из ближайшего окружения возбужденного флуорофора происходит за характерные времена порядка 10^{-12} – 10^{-10} с [2;152], при этом за счёт снижения энергии системы при переориентации растворителя, на таком же временном диапазоне происходит спектральная миграция эмиссии флуоресценции в длинноволновую область спектра, за счёт изменения энергии взаимодействия дипольного момента флуорофора с дипольными моментами молекул растворителя из ближайшего окружения. Таким образом, в случае существенного влияния релаксации растворителя, в кинетике затухания флуоресценции может наблюдаться сверхбыстрая компонента, параметры которой зависят от длины волны эмиссии флуоресценции. Схематично данный процесс представлен на рисунке 2.9Б.

Для подтверждения или опровержения гипотез о влиянии переноса энергии в системе по диполь-дипольному механизму или влиянии эффекта релаксации растворителя на кинетику затухания флуоресцентного отклика в гетерогенных систем флуорофоров, были проведены дополнительные эксперименты по исследованию кинетики релаксации анизотропии флуоресценции (Раздел 2.6) и исследованию зависимости параметров флуоресцентного отклика от полярности растворителя (Раздел 2.7).

2.6 Кинетика анизотропии флуоресценции на пикосекундном и наносекундном масштабах времени в ГСФ

Наличие сверхбыстрого переноса возбуждения на пикосекундном масштабе может быть проверено с помощью исследования кинетики анизотропии флуоресценции

$r(t)$ – безразмерной величины, характеризующей скорость деполяризации флуоресценции при возбуждении линейным поляризованным светом, которая рассчитывается как (формула 2.5):

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (2.5)$$

где I_{\parallel} , I_{\perp} – интенсивности флуоресцентного отклика, поляризованного параллельно и ортогонально возбуждающему излучению соответственно. Частичная поляризованность флуоресцентного отклика связана с тем, что эффективность возбуждения молекулы пропорциональна квадрату скалярного произведения матричного элемента дипольного момента перехода и напряженности электрического поля, таким образом, эффективно возбуждаются молекулы, чей дипольный момент перехода сонаправлен с вектором напряженности электрического поля возбуждающего излучения [2]. В случае возбуждения флуоресценции в разупорядоченном ансамбле флуорофоров, например, в растворе, в случае отсутствия дополнительных деполяризующих факторов, величина анизотропии флуоресценции равна (формула 2.6)

$$r = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right), \quad (2.6)$$

где β – угол между дипольными моментами поглощения и эмиссии [2]. В случае отсутствия процессов, приводящих к деполяризации эмиссии, величина анизотропии флуоресценции в разупорядоченной системе в таком случае варьируется в диапазоне от -0.2 до 0.4.

Деполяризация флуоресцентного отклика может происходить из-за нескольких процессов, происходящих с флуорофором: анизотропия флуоресценции может уменьшаться из-за переориентации дипольного момента флуорофора в пространстве за счёт вращательной диффузии, а также из-за некогерентного переноса

возбуждения между молекулами в системе. Уменьшение анизотропии флуоресценции при некогерентном переносе возбуждения происходит из-за того, что дипольные моменты флуорофора-донора и флуорофора-акцептора, которые участвуют в переносе энергии, обычно не сонаправлены [2], что приводит к деполяризации флуоресценции на том же характерном масштабе времён, на котором происходит перенос возбуждения.

Таким образом, исследование кинетики релаксации анизотропии флуоресценции позволяет установить природу наблюдаемой сверхбыстрой компоненты затухания флуоресцентного отклика ГСФ. В случае связи сверхбыстрой компоненты релаксации флуоресценции с переносом возбуждения в системе, ожидается, что в кинетике анизотропии флуоресценции также будет присутствовать сверхбыстрая компонента с характерным пикосекундным временем затухания. Например, сверхбыстрая релаксация анизотропии флуоресценции наблюдается для сопряженных полимеров, в которых имеется перенос энергии по фёрстеровскому механизму на пикосекундном временном масштабе между отдельными звеньями цепи [151].

Для образцов меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка была измерена кинетика затухания анизотропии флуоресценции с временным разрешением ~ 150 фс в диапазоне 0–100 пс (Рисунок 2.10). Как видно, одинаково для всех трёх типов исследуемых гетерогенных систем флуорофоров на масштабе 0–100 пс не наблюдается значительного изменения анизотропии флуоресценции. При этом величина анизотропии флуоресценции в нулевой момент времени различна для исследуемых систем и составляет 0.23 для меланина, 0.32 для продуктов фотоокисления триптофана и 0.35 для продуктов гликирования белка (Рисунок 2.10А). Отсутствие деполяризации флуоресценции на масштабе пикосекунд свидетельствует о том, что пикосекундная компонента, наблюдаемая в

кинетики релаксации флуоресценции, не связана с некогерентным переносом возбуждения в таких системах.

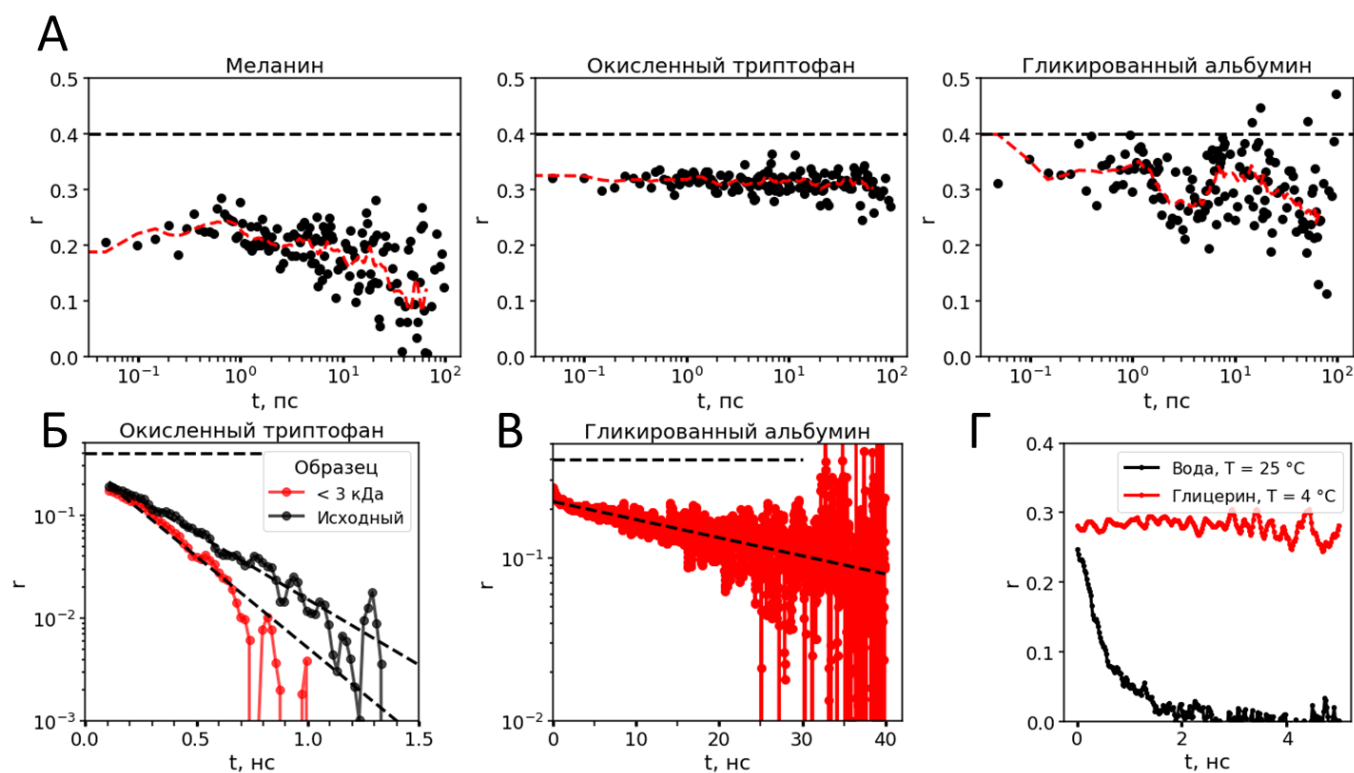


Рисунок 2.10 – А) Кинетика затухания анизотропии флуоресценции для меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования белка при возбуждении на 400 нм и эмиссии на 500 нм, измеренная с временным разрешением ~150 фс на временном интервале 0–100 пс. Б, В) Кинетика затухания анизотропии флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана (Б, фракция меньше 3кДа и исходный образец) и продуктов гликирования белка (В), измеренная с временным разрешением ~150 пс в диапазоне 0–40 нс. Г) Кинетика затухания анизотропии флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана в воде при 20 °С и в глицерине при 4 °С, измеренная с временным разрешением ~150 пс.

Было установлено, что экспоненциальное затухание анизотропии флуоресценции при этом происходит на наносекундных масштабах времени (Рисунок 2.10Б,В). Было получено, что анизотропия флуоресцентного отклика для водных растворов продуктов фотоокисления триптофана (как фракции меньше 3 кДа, так и нефракционированного образца) затухает с характерным временем порядка 0.3 нс

(0.244 ± 0.020 нс для фракции меньше 3 кДа и 0.340 ± 0.015 нс для нефракционированного образца), а для гликированного белка время затухания анизотропии флуоресценции составило 39.4 ± 6.64 нс. Основным механизмом деполяризации флуоресценции в растворах на наносекундном масштабе является вращательная диффузия флуорофоров. За счёт вращательной диффузии зависимость анизотропии флуоресценции от времени уменьшается по экспоненциальному закону затухания со временем, соответствующим времени диффузного вращения флуорофора в растворе [2]. Согласно соотношению Стокса-Эйнштейна, время вращательной диффузии молекулы задаётся следующим выражением (формула 2.7):

$$\tau_{rot} = \frac{\eta V}{RT}, \quad (2.7)$$

где η – динамическая вязкость раствора, V – объем молекулы, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Для подтверждения того, что основным механизмом затухания анизотропии флуоресценции в гетерогенных системах флуорофоров на наносекундном временном масштабе является вращательная диффузия, кинетика затухания анизотропии флуоресценции была измерена для продуктов фотоокисления триптофана, помещенных в растворители различной вязкости – воду при температуре 20°C и 80% смесь глицерин/вода при температуре 4°C. Динамическая вязкость воды при данной температуре составляет 1.6 мПа·с, в то время как величина вязкости смеси 80% глицерин/вода, использованной в эксперименте, на два порядка выше и составляет 303 мПа·с. На рисунке 2.10Г представлена кинетика затухания анизотропии флуоресценции для продуктов окисления триптофана в воде при 20 °C и глицерине при 4 °C на интервале 0–5 наносекунд после возбуждения эмиссии. Как видно, величина анизотропии флуоресценции для продуктов фотоокисления триптофана в воде релаксирует до нулевого значения за первые 2 нс,

в то время как анизотропия флуоресценции продуктов окисления триптофана в глицерине остаётся на постоянном уровне.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что основным механизмом деполяризации флуоресценции в гетерогенных системах флуорофоров является вращательная диффузия, а некогерентный перенос энергии не оказывает дополнительного влияния на деполяризацию флуоресцентного отклика.

Отсутствие переноса энергии на пикосекундном масштабе в исследуемых гетерогенных системах флуорофоров также косвенно подтверждается результатами экспериментов по измерению кинетики затухания флуоресцентного отклика с фемтосекундным разрешением для фракций образцов различного размера. Так, на рисунке 2.11 представлена кинетика затухания флуоресценции для исходных продуктов фотоокисления триптофана и фракции продуктов, отфильтрованных с помощью мембранного фильтра с размером пор, эффективно пропускающим только молекулы с молекулярной массой менее 1 кДа. Как видно, для фракции продуктов окисления с размером менее 1 кДа также наблюдается сверхбыстрая компонента переноса с характерным масштабом времени порядка 1 пс.

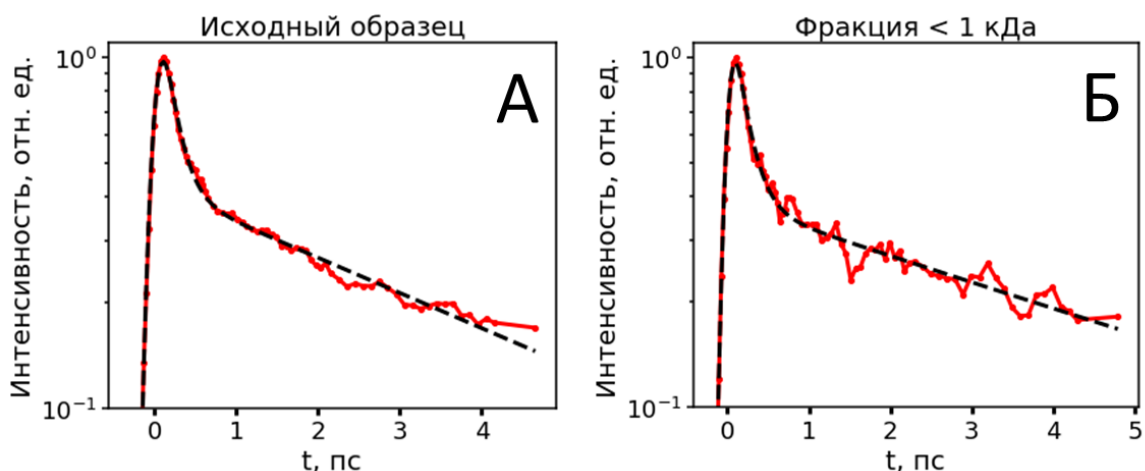


Рисунок 2.11 – Кинетика затухания флуоресценции для исходного нефракционированного по размеру образца продуктов фотоокисления триптофана (А) и фракции продуктов фотоокисления триптофана с молекулярной массой менее 1 кДа (Б).

Наличие сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресцентного отклика для фракции размером менее 1 кДа, в которой не может быть крупных супрамолекулярных агрегатов, а также отсутствие деполяризации флуоресценции на пикосекундном масштабе, указывают на то, что пикосекундная компонента в релаксации флуоресцентного отклика не связана с переносом энергии в исследуемых системах. Как было указано ранее (Раздел 2.5), влияние на кинетику затухания флуоресценции на таком масштабе времён также может оказывать подстройка локального окружения флуорофора, вызванная различиями в дипольных моментах молекул флуорофора в основном и возбужденном состоянии. Релаксация молекул растворителя в локальном окружении флуорофора может приводить как к изменению стационарных свойств флуоресценции, так и к наличию компоненты в кинетике затухания флуоресценции с характерным пикосекундным масштабом времени затухания. Далее в рамках работы была проверена гипотеза о влиянии свойств растворителя на наблюдаемые оптические свойства гетерогенных систем флуорофоров.

2.7 Влияние свойств растворителя на оптические свойства ГСФ

Переход флуорофора из основного в возбужденное состояние происходит с изменением дипольного момента молекулы за время порядка $\sim 10^{-15}$ с [2;81]. Молекулы растворителя, находящиеся в ближайшем окружении возбужденного флуорофора, переориентируются так, чтобы скомпенсировать возникающую разность дипольных моментов флуорофора в основном и возбужденном состоянии. Характерное время ориентационной релаксации молекул растворителя по порядку составляет 10^{-12} – 10^{-10} с. Взаимодействие флуорофора с локально окружающими его молекулами растворителя при возбуждении флуоресценции в некоторых случаях значительно влияет на наблюдаемые стационарные и время-разрешенные флуоресцентные свойства системы [2;81].

Для образцов продуктов фотоокисления триптофана было исследовано влияние растворителей различной полярности на наблюдаемые стационарные оптические свойства. Были использованы следующие растворители: тетрагидрофуран (диэлектрическая восприимчивость $\epsilon = 7.68$, показатель преломления $n = 1.407$), изопропанол ($\epsilon = 19.92$, $n = 1.377$), этанол ($\epsilon = 24.5$, $n = 1.361$), глицерин ($\epsilon = 42.5$, $n = 1.472$) и вода ($\epsilon = 78.4$, $n = 1.333$) [153]. На рисунках 2.12 А,Б представлены спектры поглощения (Рисунок 2.12 А) и флуоресценции (Рисунок 2.12Б) на длине волны возбуждения $\lambda_{exc} = 400$ нм. Как видно, при смене растворителя изменяется как спектральный наклон поглощения, так и положение максимума эмиссии в зависимости от типа используемого растворителя.

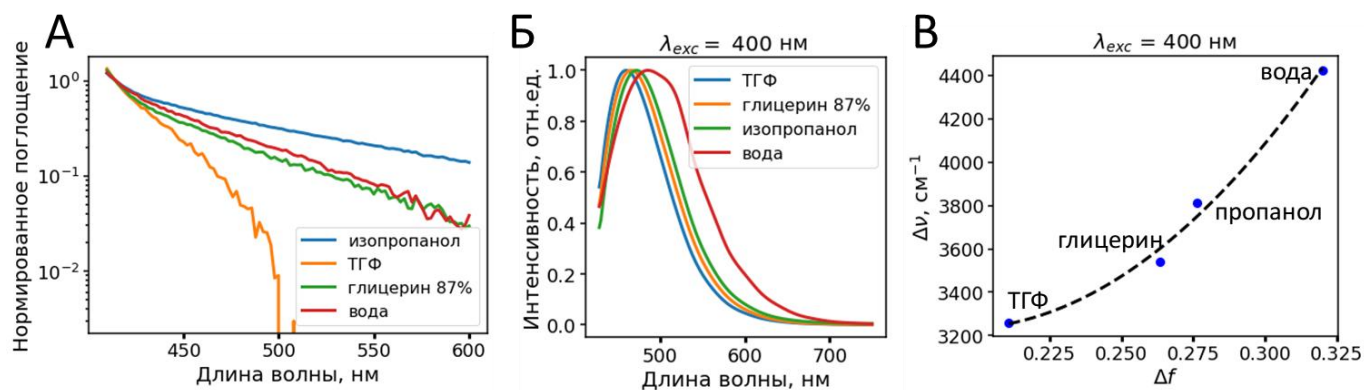


Рисунок 2.12 – А) Нормированный на величину поглощения на 400 нм спектр поглощения продуктов окисления триптофана в растворителях различной полярности: в тетрагидрофуране (ТГФ), в изопропаноле, 87% смеси глицерина и воды, и воде. Б) Спектры эмиссии флуоресценции с возбуждением на 400 нм для продуктов окисления триптофана в различных растворителях. В)

Зависимость Стоксова сдвига флуоресценции $\Delta\nu$ от полярности растворителя $\Delta f = \frac{\epsilon-1}{2\epsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1}$.

Изменение Стоксова сдвига флуоресценции можно проинтерпретировать с точки зрения теории влияния растворителя на спектры флуоресценции, предложенной Липпертом и Матага [2, 153]. Энергию взаимодействия дипольного момента флуорофора с его ближайшим окружением можно оценить как $V = -\vec{\mu}\vec{E}$, где $\vec{\mu}$ – дипольный момент флуорофора (или возникающая разность дипольных моментов в

основном и возбужденном состоянии), \vec{E} – напряженность электрического поля, создаваемого молекулами растворителя в точке, где находится молекула-флуорофор. Напряженность поля, создаваемого дипольными моментами молекул растворителя вблизи флуорофора, можно оценить как $\vec{E} = \frac{-2\vec{\mu}}{a^3} \frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}$ (как поле внутри сферической полости с радиусом a в диэлектрике с диэлектрической проницаемостью ε и дипольным моментом $\vec{\mu}$, расположенным внутри полости, где a можно оценить как характерный размер молекулы).

При возбуждении электронная подсистема молекул растворителя реагирует мгновенно, однако молекулы растворителя не успевают переориентироваться вокруг дипольного момента возбужденного флуорофора, поэтому энергия взаимодействия молекул растворителя с флуорофором в возбужденном состоянии до момента переориентации молекул растворителя вокруг флуорофора может быть оценена как $V_1 = \frac{2\vec{\mu}^2}{a^3} \left(\frac{n^2-1}{2n^2+1} \right)$, где n – показатель преломления вещества, который выступает в качестве оценки диэлектрической восприимчивости вещества на высоких частотах и характеризует подстройку электронной подсистемы молекул растворителя при возбуждении. После переориентации энергия взаимодействия составляет $V_2 = \frac{2\vec{\mu}^2}{a^3} \left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} \right)$, где ε – диэлектрическая проницаемость после возбуждения. Стоксов сдвиг флуоресценции, выраженный в волновых числах, должен быть пропорционален разности энергий до и после переориентации молекул растворителя $\Delta\nu \sim \Delta V$, таким образом, связь Стоксова сдвига с полярностью растворителя может быть оценена как (формула 2.8) [2]:

$$\Delta\nu \sim \left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \right) \frac{2(\vec{\mu}_e - \vec{\mu}_g)^2}{a^3} + const., \quad (2.8)$$

где $\vec{\mu}_e$ и $\vec{\mu}_g$ – дипольные моменты молекулы в возбужденном и основном состоянии соответственно, a – характерный размер молекулы флуорофора, ε – диэлектрическая

проницаемость растворителя, n – показатель преломления растворителя на длине волны возбуждения. Поскольку при изменении растворителя дипольные моменты флуорофора в основном и возбужденном состоянии в первом приближении не должны изменяться, Стоксов сдвиг в первую очередь должен быть пропорционален полярности Δf (формула 2.9):

$$\Delta f = \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right), \quad (2.9)$$

На рисунке 2.12 В представлена зависимость Стоксова сдвига флуоресценции, выраженного в см^{-1} от полярности используемого растворителя, охарактеризованной величиной Δf . Как видно, с увеличением полярности, величина Стоксова сдвига растёт от 3200 см^{-1} для растворителя ТГФ до 4400 см^{-1} в воде.

Зависимость флуоресцентного отклика от полярности растворителя проявляется не только в стационарных, но и во время-разрешенных характеристиках исследуемых систем. Так, было обнаружено, что амплитуда и время затухания пикосекундной компоненты зависят от величины полярности растворителя Δf . Кинетика затухания флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана для растворителей с различной величиной полярности, измеренная с фемтосекундным временным разрешением при возбуждении на 400 нм и эмиссии на 500 нм , представлены на рисунке 2.13А. Было обнаружено, что с увеличением значения полярности растворителя Δf амплитуда пикосекундной компоненты уменьшается и одновременно увеличивается характерное время затухания τ_1 сверхбыстрой компоненты. Так для водного раствора ($\Delta f = 0.32$) триптофана при детектировании эмиссии на 500 нм амплитуда компоненты составила $61 \pm 4\%$, а время затухания первой компоненты $\tau_1 = 1.12 \pm 0.07 \text{ пс}$, в то время как для тетрагидрофурана ($\Delta f = 0.21$) амплитуда первой компоненты $a_1 = 40 \pm 5\%$, а $\tau_1 = 1.77 \pm 0.11 \text{ пс}$. Зависимости времени затухания и амплитуды сверхбыстрой компоненты от полярности растворителя представлены на рисунках 2.13Б, В.

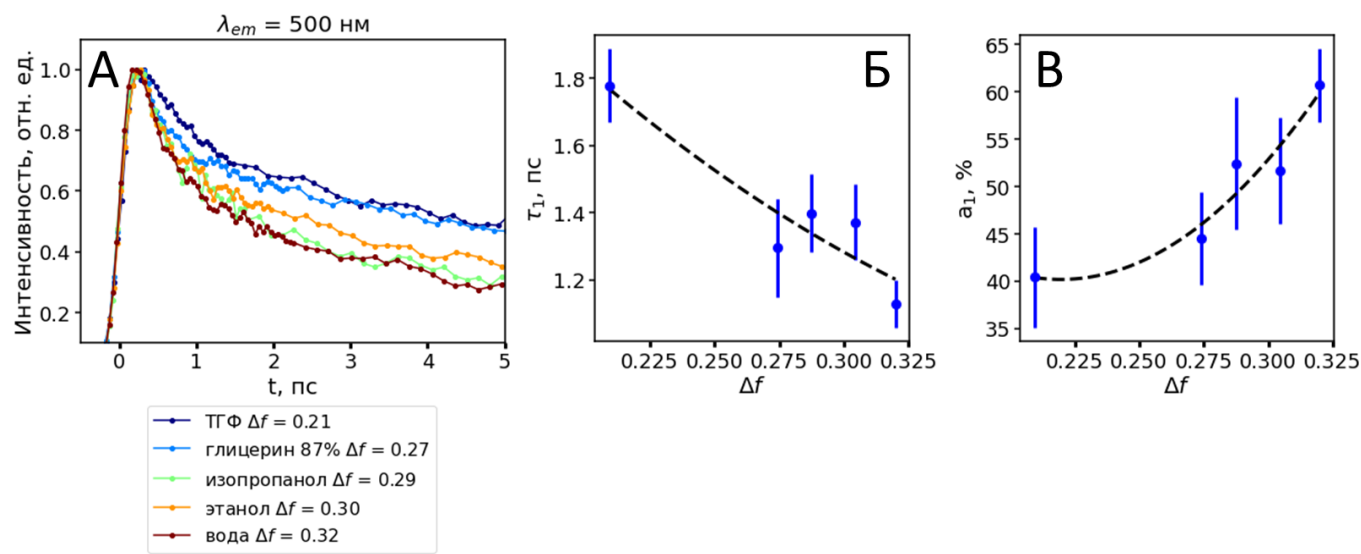


Рисунок 2.13 – А) Кинетика затухания флуоресценции продуктов фотоокисления триптофана, измеренная в растворителях различной полярности. Длина волны возбуждения $\lambda_{exc} = 400$ нм, длина волны эмиссии $\lambda_{em} = 500$ нм. Б, В) Зависимости времени затухания и амплитуды сверхбыстрой компоненты от полярности растворителя Δf , определенные в результате анализа кинетики затухания флуоресценции, представленной на панели А.

Полученные зависимости параметров стационарных и время-разрешенных характеристик поглощения и флуоресценции от полярности растворителя свидетельствуют о существенной роли влияния релаксации растворителя на наблюдаемые оптические свойства ГСФ. Наблюдаемые эффекты также говорят о незначительной роли межмолекулярного взаимодействия в формировании флуоресцентных свойств исследуемых ГСФ.

Заметим, что в отличие от единичных молекул-флуорофоров, для которых эффект релаксации растворителя наблюдается только на коротковолновом краю полосы эмиссии флуоресценции (то есть для длин волн меньших положения максимума эмиссии стационарного спектра флуоресценции) [2], сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции в ГСФ наблюдается на всех длинах волн эмиссии. Учитывая, что сверхбыстрая компонента затухания флуоресценции ГСФ не связана

с электронным взаимодействием флуорофоров, и зависит от свойств молекул растворителя, можно предположить, что её наблюдение на всех длинах волн эмиссии флуоресценции при возбуждении на 400 нм связано с усреднением вкладов сигналов флуоресценции флуорофоров, обладающих различными положениями максимума эмиссии флуоресценции, для которых имеет место сверхбыстрая релаксация растворителя после возбуждения.

2.8 Выводы

В данной главе с использованием методов лазерной флуоресцентной спектроскопии были исследованы механизмы формирования фотофизических характеристик репрезентативных ГСФ на примере меланина, продуктов фотоокисления триптофана и продуктов гликирования модельного белка (альбумина). Было показано, что такие системы обладают бесструктурным поглощением, экспоненциально спадающим с увеличением длины волны в диапазоне 400–800 нм и обладающих величиной обратного спектрального наклона поглощения, варьирующегося в диапазоне $\Lambda = 60\text{--}180$ нм. Было продемонстрировано, что такие системы обладают 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, при этом 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.

На примере продуктов фотоокисления триптофана было показано, что изменение свойств поглощения ГСФ в диапазоне 350–700 нм связано с изменением молекулярного состава в образцах – среднее значение поглощения в диапазоне 300–700 нм и величина обратного спектрального наклона поглощения коррелируют с числом уникальных формул в диапазоне 200–700 Да, обладающих относительным вкладом в масс-спектр образца более 10^{-2} . Было получено, что процессу

фотоокисления триптофана сопутствует образование супрамолекулярных агрегатов, при этом было установлено, что супрамолекулярные агрегаты продуктов окисления с размером более 3 кДа обладают квантовым выходом флуоресценции в ~ 5 раз меньше квантового выхода флуоресценции для фракции с молекулярной массой менее 3 кДа при возбуждении флуоресценции на 400 нм.

С помощью метода лазерной фемтосекундной спектроскопии было установлено, что кинетика затухания флуоресценции исследуемых систем обладает немонотонным законом затухания в диапазоне времён 0–500 пс после начала возбуждения лазерным импульсом с характерной длительностью ~ 150 фс. Выявлена новая особенность кинетики затухания флуоресценции рассматриваемых систем при возбуждении на 400 нм: наличие компоненты затухания с характерным временем затухания ~ 1 пс с амплитудой вклада в кинетику затухания флуоресценции 40–70%, параметры которой зависят от длины волны эмиссии. 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 возбуждения на временном масштабе 0–10 пс после начала возбуждения. Было установлено, что амплитуда и скорость затухания сверхбыстрой компоненты релаксации флуоресценции возрастают с увеличением значения параметра спектрального наклона поглощения Λ . В свою очередь, взаимосвязь спектрального наклона поглощения с числом соединений с различной молекулярной формулой в гетерогенных системах флуорофоров позволяет утверждать о связи параметров сверхбыстрой компоненты с гетерогенностью молекулярного состава.

Было установлено, что для исследуемых ГСФ не наблюдается изменение анизотропии флуоресценции на масштабе 0–100 пс после начала возбуждения, что говорит о незначительности вклада некогерентного переноса возбуждения энергии в

системе по диполь-дипольному механизму в наблюдаемые флуоресцентные свойства. Было установлено, 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 оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров с длинноволновым поглощением – меланина, продуктов окисления триптофана, продуктов гликирования белков – по модели усреднения оптических свойств невзаимодействующих молекулярных флуорофоров системы, а наличие сверхбыстрой компоненты в диапазоне 480–560 нм связано с вкладом в кинетику флуоресценции отклика от флуорофоров гетерогенной системы, для которых имеет место эффект сверхбыстрой ориентационной релаксации молекул растворителя после возбуждения.

Глава 3 Методы лазерной диагностики гетерогенных систем флуорофоров с использованием особенностей их оптических свойств

Данная глава посвящена разработке методов детектирования ГСФ с использованием особенностей их флуоресцентного отклика для биомедицинской диагностики. В качестве примера объекта диагностики рассматривается кожа человека – исследуется возможность детектирования флуоресцентного отклика ГСФ как в единичных клетках кожи, так и в объеме тканей (эпидермисе и дерме) *in vivo*.

3.1 Структура кожи и потенциальные ГСФ в коже

Мониторинг состояния кожи имеет прикладную значимость для многих разделов медицины, в том числе для фармакологии, косметологии и дерматологии [154–156]. Наблюдение морфологических изменений, метаболического статуса и молекулярного состава кожи может быть осуществлено с помощью спектроскопических и микроскопических оптических методов [1]. Детектирование флуоресцентного отклика ГСФ позволило бы расширить набор диагностических маркеров кожи, получаемых с помощью оптических методов. Для выделения ГСФ, которые потенциально могут присутствовать в коже, кратко рассмотрим молекулярную и морфологическую структуру кожи человека.

3.1.1 Структурные и функциональные особенности кожи человека

Кожа – сложный многослойный орган человека, вовлеченный в большое число физиологических процессов организма. Кожа участвует в регуляции температуры тела, функционировании нервной системы, осуществляет защиту внутренних органов от внешних патогенов и регуляцию содержания воды в организме [154–156].

В коже принято выделять три основных слоя: эпидермис, дерму и гиподерму (или подкожно-жировую клетчатку). Эпидермис – верхний слой кожи – имеет толщину от 0.05 до 1 мм в зависимости от участка кожи и в основном состоит из клеток.

Основными клетками эпидермиса (~90% общей численности клеток эпидермиса) являются кератиноциты – клетки, продуцирующие нитевидные структурные белки кератины, поддерживающие механическую прочность эпидермиса [157]. В эпидермисе также присутствуют меланоциты, осуществляющие синтез и транспорт меланина в коже (на каждые ~30–40 кератиноцитов приходится один меланоцит); клетки Лангерганса (2–8% общей численности клеток эпидермиса), выполняющие иммунные функции, клетки Меркеля, отвечающие за механосенсорное восприятие [157].

В простейшем приближении эпидермис можно разделить на роговой слой и живой эпидермис. Основу рогового слоя составляют плотно прилегающие друг к другу “отмершие” (терминально-дифференцированные) безъядерные кератиноциты (корнеоциты), помещенные в водно-липидный матрикс и скрепленные белковыми мостиками. В случае кожи предплечья, где толщина эпидермиса составляет ~40–60 мкм, толщина рогового слоя в норме может варьироваться от 10 до 30 мкм, при этом, благодаря своему строению, роговой слой выполняет основную барьерную функцию эпидермиса [157]. В живом эпидермисе постоянно происходит рост, дифференцировка и миграция кератиноцитов от нижнего, базального слоя, к роговому слою эпидермиса. Толщина живого эпидермиса в местах “тонкой” кожи составляет 20–30 мкм [157]. На рисунке 3.1 представлено схематическое изображение верхних слоёв кожи.

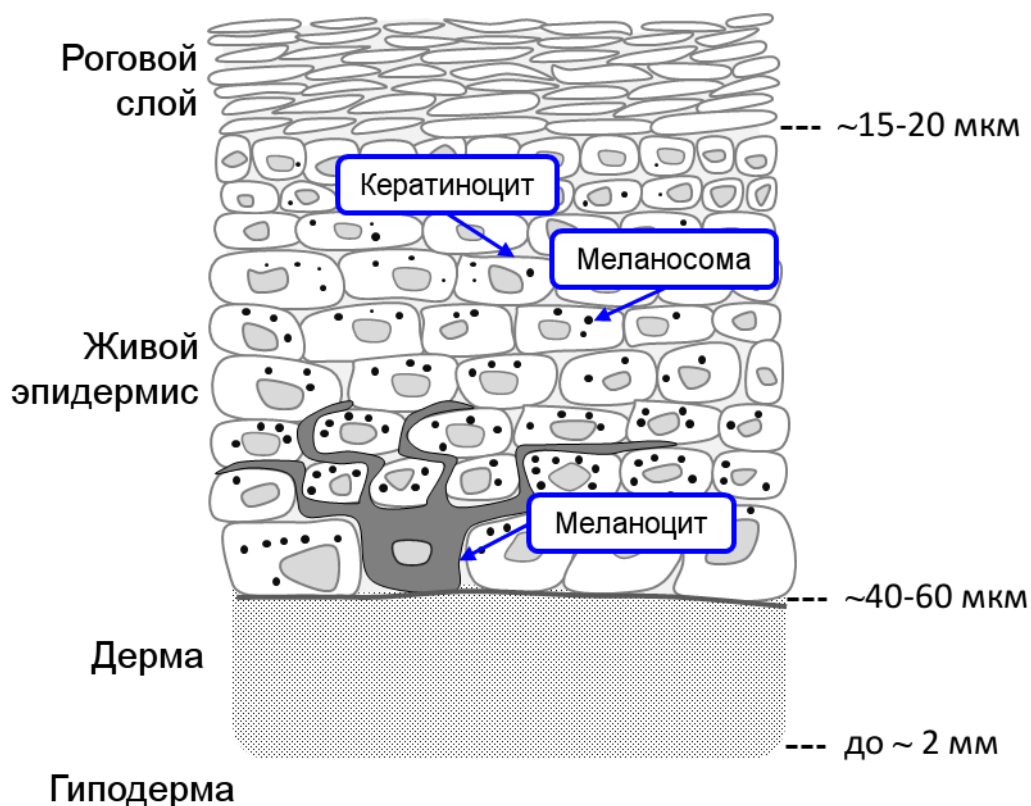


Рисунок 3.1 – Структура верхних слоёв кожи человека. Толщины слоёв приведены для участков кожи внутренней стороны предплечья.

Дерма, в отличие от плотно упакованного клетками эпидермиса, в большей мере состоит из внеклеточного матрикса, основу которого составляют структурные белки коллаген и эластин, а также вспомогательные гликозаминогликаны, протеоглики и пр. Внеклеточный матрикс пронизан сосудами кровеносной и лимфатической системы, кожными придатками (волосами, различными кожными железами, также проходящими и через эпидермис). Основными клетками дермы являются фибробласты, осуществляющие синтез внеклеточного матрикса, макрофаги и тучные клетки, отвечающие за иммунный отклик [158]. Толщина дермы составляет приблизительно 1–3 мм. Дерма отвечает за механические свойства кожи, участвует в процессах терморегулирования и аккумуляции воды, играет ключевую роль в процессе заживления ран [158]. Под дермой находится слой гиподермы, в основном

состоящей из жировой ткани, являющейся “резервным” источником энергии для организма.

3.1.2 Гетерогенные системы флуорофоров в коже

Во всех слоях кожи потенциально могут присутствовать ГСФ, обладающие флуоресцентным откликом, возбуждаемым в видимой и ближней инфракрасной области спектра. В роговом слое и живом эпидермисе могут присутствовать гетерогенные продукты окисления структурного белка кератина и других белков, липидов и аминокислот кератиноцитов. На границе раздела эпидермис-дерма локализованы меланоциты, продуцирующие меланин. В дерме потенциальным источником видимой и инфракрасной флуоресценции могут быть флуоресцентные сшивки, образованные в результате процессов окисления и гликирования структурных белков дермы (коллагена и эластина); в гиподерме такими источниками могут быть продукты окисления липидов.

Исходя из особенностей флуоресцентных свойств ГСФ, описанных в Главе 2, их селективное детектирование при условии наличия других эндогенных флуорофоров тканей (например, НАД(Ф)Н, ФАД и др.), может быть осуществлено с помощью следующих особенностей флуоресцентного отклика. Во-первых, благодаря наличию поглощения, монотонно убывающего вплоть до ближнего инфракрасного диапазона, возможно возбуждение флуоресцентного отклика ГСФ в красной и ближней инфракрасной области спектра. Во-вторых, для ГСФ свойственно наличие релаксации флуоресцентного отклика с характерными временами затухания от единиц пикосекунд до единиц наносекунд – селективная визуализация ГСФ возможна с использованием особенностей времён затухания флуоресценции таких систем.

Ниже экспериментально исследована возможность детектирования флуоресцентного сигнала от: 1) продуктов окисления белков, липидов и аминокислот в единичных

кератиноцитах – основных клеток эпидермиса; 2) меланина в роговом слое и живом эпидермисе *in vivo*.

3.2 Лазерная диагностика гетерогенных продуктов окисления в единичных клетках кожи

В данном разделе была исследована возможность детектирования флуоресцентного отклика от продуктов окисления биоорганических молекул в клетках HaCaT (клетки иммортализованной клеточной линии кератиноцитов человека), подверженных окислительному стрессу различной природы (фотоокислению УФ-излучением и инкубации в растворах пероксида водорода). Изменения в сигнале эндогенной флуоресценции кератиноцитов, вызванные окислительным стрессом, регистрировались с помощью методов мультиспектральной проточной цитометрии с детектированием интенсивности флуоресценции при однофотонном возбуждении на различных длинах волн возбуждения в видимом диапазоне и однофотонной конфокальной микроскопии с картированием времени затухания флуоресценции (FLIM) с несколькими длинами волн возбуждения.

Ниже будут описаны экспериментальные протоколы культивирования клеток и индуцирования окислительного стресса, результаты экспериментов и их обсуждение.

3.2.1 Протокол культивирования клеточной культуры

Для исследования процессов накопления флуоресцентных гетерогенных продуктов окисления была использована иммортализованная клеточная линия кератиноцитов человека (HaCaT). Клетки были предоставлены лабораторией клеточной биологии Института Биологии Развития РАН им. Н.К. Кольцова (Москва, Россия). Клетки культивировали по стандартной методике в пластиковых флаконах при стандартных условиях в CO₂ инкубаторе при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) с добавлением 10% раствора эмбриональной бычьей сыворотки и 0.32 мг/мл L-

глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки пересеивали стандартным образом три раза в неделю с использованием раствора трипсина и раствора Версена (ПанЭко, Россия). За сутки до фотоокисления или инкубации с окислителем, клетки HaCaT пересеивались в чашки Петри диаметром 35 мм в концентрации $7.5 \cdot 10^5 - 10^6$ клеток/мл, где они образовывали монослой.

3.2.2 Протокол индуцирования окислительного стресса

Для индуцирования окислительного стресса с помощью фотоокисления, монослой клеток HaCaT облучался с помощью ртутной газоразрядной лампы низкого давления с максимумом эмиссии на 254 нм. Интенсивность излучения на поверхности образца составляла 10 мВт/см^2 . Были исследованы клеточные культуры облученные различными дозами УФ-излучения: 0 (контрольный образец), 25, 50, 100 и 200 мДж/см². Выбранный диапазон доз излучения должен приводить к значительному окислительному стрессу, поскольку известно, что значение физиологической дозы УФ-излучения в диапазоне 280–320 нм, приводящее к реакции кожи человека (т.н. минимальная доза эритемы), варьируется в диапазоне 10–100 мДж/см² в зависимости от фототипа кожи [159].

Для исследования окислительного стресса, вызванного добавлением раствора пероксида водорода, стоковые растворы пероксида водорода, приготовленные в фосфатном буфере (pH = 7.4), добавлялись в чашки к клеткам HaCaT. Концентрация пероксида водорода в образцах составляла 750 и 1500 мкМ. После добавления стрессора клетки инкубировались в течение 19 часов до начала измерений. Такие концентрации пероксида водорода были выбраны для индуцирования значительного окислительного стресса, поскольку известно, что инкубирование кератиноцитов HaCaT в среде с концентрацией $[\text{H}_2\text{O}_2] \approx 500 \text{ мкМ}$ приводит к 50% выживаемости клеток [160].

3.2.3 Результаты измерения сигнала эндогенной флуоресценции кератиноцитов при окислительном стрессе методом проточной цитометрии

Для оценки изменений флуоресцентного отклика основных клеток эпидермиса, вызванных окислительным стрессом, был использован метод проточной цитометрии с эндогенным флуоресцентным контрастом.

Метод проточной цитометрии позволяет детектировать оптический отклик от единичных клеток, при этом достаточно быстро (в течение нескольких минут) может быть набрана информация по большой популяции клеток ($\sim 10^4$ – 10^5 событий). В проточной цитометрии клетки из раствора образца, разделенные с помощью гидродинамической фокусировки, проплывают через капилляр, совмещенный с оптической системой, состоящей из нескольких лазерных источников и детекторов (обычно ФЭУ), детектирующих сигнал светорассеяния и флуоресценции в определенных спектральных диапазонах. По длительности регистрируемых импульсов и интенсивности регистрируемого сигнала возможно судить о размере объекта (в частности, по сигналу рассеяния под малым углом), его форм-факторе (по сигналу рассеяния под 90 градусов), свойствах флуоресцентного отклика [161].

В данной работе был использован проточный цитометр CytoFLEX (Beckman Coulter, США), с источниками возбуждения оптического отклика на 405, 488 и 638 нм. Для клеток образца одновременно детектировался сигнал упругого рассеяния под малыми углами (далее FSC, от “forward scattering”), сигнал рассеяния под 90° (далее SSC, от “side scattering”) с возбуждением на 488 нм и сигнал автофлуоресценции в следующих спектральных диапазонах длин волн возбуждения/детектирования эмиссии: 405 нм/425–475 нм; 488 нм/505–545 нм; 638 нм/ 655–665 нм.

В первой серии экспериментов детектировался флуоресцентный отклик от кератиноцитов, в которых окисление было вызвано облучением ультрафиолетом (максимум эмиссии на 254 нм) различной дозы от 0 (контрольный образец) до 200 мДж/см². Для выделения сигнала, соответствующего единичным клеткам, было

использовано стробирование событий по интенсивности и длительности сигнала упругого рассеяния на 488 нм под малыми углами. Кластер, соответствующий единичным клеткам, был выделен по высокому значению интенсивности рассеяния вперёд (FSC $\sim 1.5 \cdot 10^6$ отн. ед.) и малому значению длительности детектируемого импульса рассеяния вперёд (FSC-Width $\sim 1.8 \cdot 10^3$ отн. ед., обведён красным пунктиром на рисунке 3.2А). Кластер на рисунке 3.2А, обладающий большим значением длительности импульса рассеяния (FSC-Width $\sim 3 \cdot 10^3$ отн. ед., интенсивность рассеяния вперёд FSC $\sim 1.5 \cdot 10^6$ отн. ед.), соответствует “дублетам” (двойным срабатываниям детектора) – событиям, состоящим в регистрации оптического отклика одновременно от двух или более клеток, проплывающих через канал. Кластер на рисунке 3.2А с малым значением интенсивности рассеяния вперёд (FSC $< 0.5 \cdot 10^5$ отн. ед.) соответствует клеточным фрагментам (“клеточному мусору”), образуемому в результате гибели клеток. Точки, соответствующие “дублетам” и “клеточном мусору”, были исключены из рассмотрения при анализе оптического отклика клеток.

В первую очередь было установлено, что в течение первых десяти минут после фотоокисления не наблюдается значительных изменений во флуоресцентном отклике клеток во всех спектральных каналах. На рисунках 3.2 Б-Г представлены интенсивности сигналов флуоресценции с возбуждением в нескольких спектральных каналах. Значительных изменений также не происходило и в сигнале рассеяния вперёд (Рисунок 3.2Д). Отсутствие значительных изменений во флуоресцентном отклике сразу после облучения свидетельствует об отсутствии продуктов окисления, формирующихся за счет прямого фотоокисления, т.е. образования флуоресцирующих продуктов в результате фотохимических реакций.

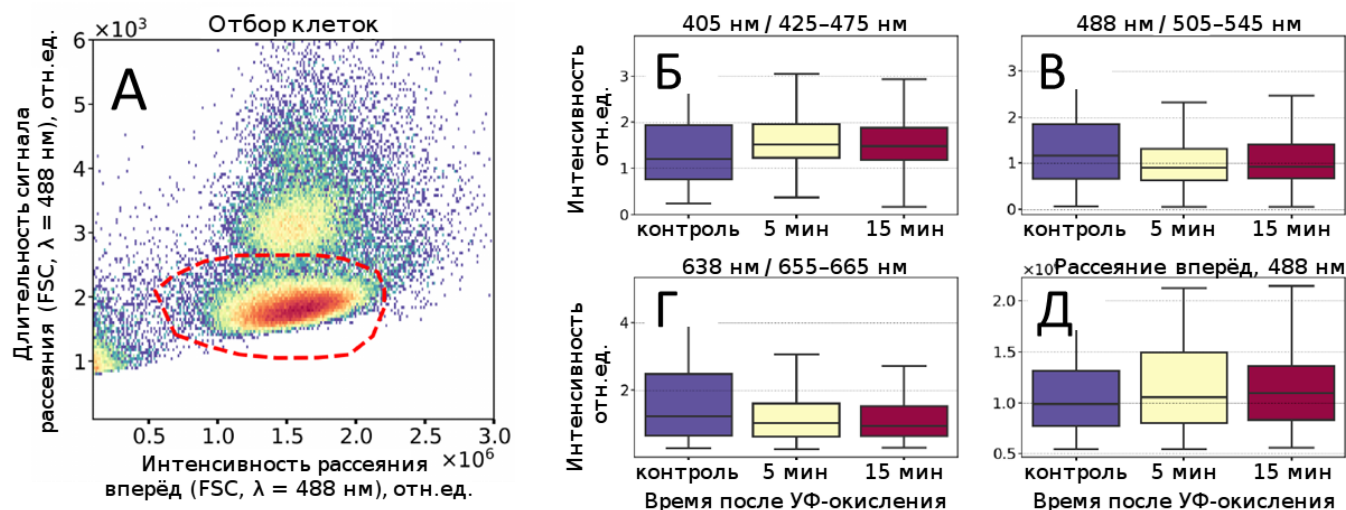


Рисунок 3.2 – А) Стробирование сигнала от клеток по интенсивности и длительности импульса сигнала рассеяния вперед на 488 нм. Б–Г) Интенсивность сигнала флуоресцентного отклика в каналах с возбуждением/детектированием флуоресцентного отклика в спектральных диапазонах 405 нм/425–475 нм (Б), 488 нм/505–545 нм (В), 638 нм/655–665 нм (Г) для контрольных, необлученных клеток, и клеток, облученных дозой 100 мДж/см² спустя 5 и 15 минут после облучения. Д) Интенсивность рассеяния вперед на 488 нм для контрольных, необлученных клеток, и клеток, облученных дозой 100 мДж/см² спустя 5 и 15 минут после облучения.

Существенные изменения в оптическом отклике клеток наблюдались спустя 5 и 15 часов после облучения клеток, проинкубированных в стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂ атмосфера). Спустя 5 и 15 часов инкубации клеток после фотоокисления наблюдалось дозозависимое изменение интенсивности рассеяния вперед и бокового рассеяния (Рисунок 3.3 А, Б). Спустя 5 часов после инкубации медианное значение интенсивности рассеяния вперед понизилось на ~15% (дозы 25 и 50 мДж/см²) и на 50% (200 мДж/см²) по сравнению с контролем. Спустя 15 часов после облучения, интенсивность сигнала рассеяния вперед понизилась на ~40–50% по отношению к контрольному образцу ($p < 10^{-4}$, тест Краскела-Уоллиса). При этом интенсивность сигнала рассеяния под 90° изменилась незначительно (снизилась на 10% по отношению к контролю, $p < 10^{-4}$).

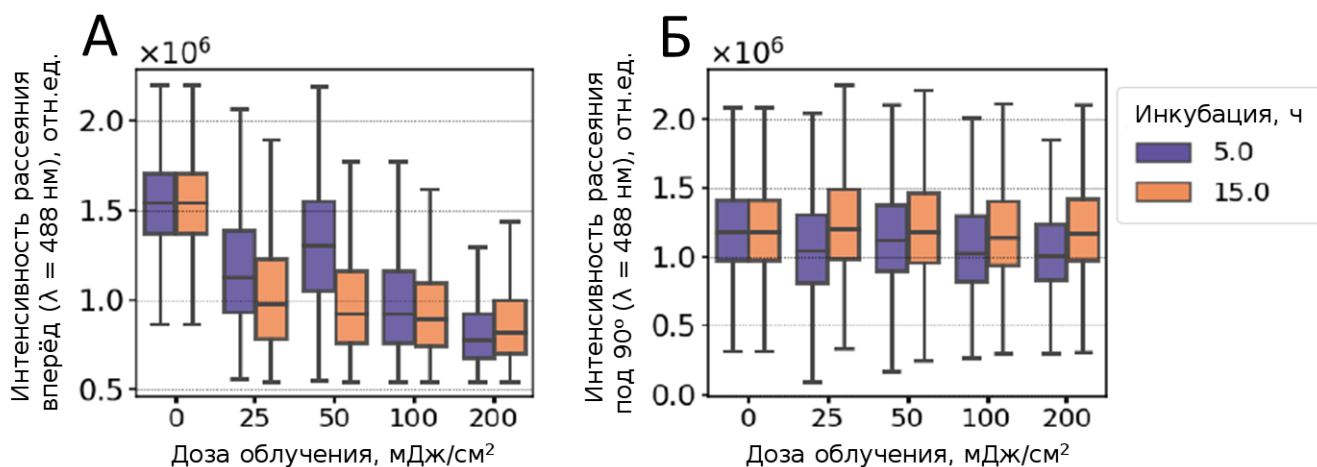


Рисунок 3.3 – Интенсивность рассеяния вперёд (А) и рассеяния под 90° (Б) на длине волны возбуждения 488 нм спустя 5 и 15 часов после фотоокисления клеток HaCaT.

Для анализа флуоресцентного отклика клеток интенсивность сигнала флуоресценции была нормирована на значения рассеяния вперёд для учёта зависимости сигнала от размера клеток, как это рекомендуется в работе [139]. На рисунке 3.4 приведены гистограммы распределений интенсивности флуоресцентного отклика, нормированного на медианную интенсивность флуоресцентного отклика в данном спектральном канале в контрольном образце, не подверженном облучению. Выделим ключевые моменты, характеризующие изменения флуоресцентного отклика кератиноцитов, вызванные фотоокислением.

В канале с возбуждением/детектированием на длинах волн 405 нм/425–475 нм спустя 5 часов после облучения увеличение сигнала флуоресценции было пропорционально дозе УФ-излучения (Рисунок 3.4А). При этом спустя 15 часов значимых изменений флуоресценции не наблюдалось.

В канале 488 нм/505–545 нм распределения интенсивности флуоресцентного отклика клеток, облученных дозами 25 и 50 мДж/см², изменились незначительно по сравнению с распределением интенсивности в контрольном образце (медианное значение интенсивности флуоресценции в облученных образцах увеличилось в ~1.5

раза), в то время как для доз 100 и 200 мДж/см² интенсивность флуоресценции возросла в ~3.5 и 5 раз соответственно (Рисунок 3.4Б). В отличие от сигнала флуоресценции, возбужденной на 405 нм, сигнал автофлуоресценции канале 488 нм/505–545 нм для доз 25 и 50 мДж/см² изменился спустя 15 часов после облучения (медианное значение интенсивности флуоресценции возросло в ~2.7 и ~2.9 раз соответственно).

Наиболее выраженные изменения сигнала автофлуоресценции наблюдались при возбуждении и детектировании в красном диапазоне спектра, в канале 638 нм/655–665 нм (Рисунок 3.4В). Спустя 5 часов после облучения значительные изменения сигнала автофлуоресценции произошли только для клеток, облученных дозой 200 мДж/см². Однако после 15 часов инкубации, сигнал флуоресценции по сравнению с контрольным образцом возрос в 5 раз для всех доз УФ-излучения, при этом для дозы излучения 200 мДж/см² увеличение интенсивности сигнала флуоресценции составило 8.2 раза. Следует отметить, что в распределениях интенсивности сигнала красной автофлуоресценции кератиноцитов наблюдалось две моды (тест на биомодальность “UniDip” $p < 10^{-3}$, [162]), что указывает на наличие в популяции клеток, в которых не происходит увеличение сигнала флуоресценции и накопления фотопродукта, флуоресцирующего в красной области спектра.

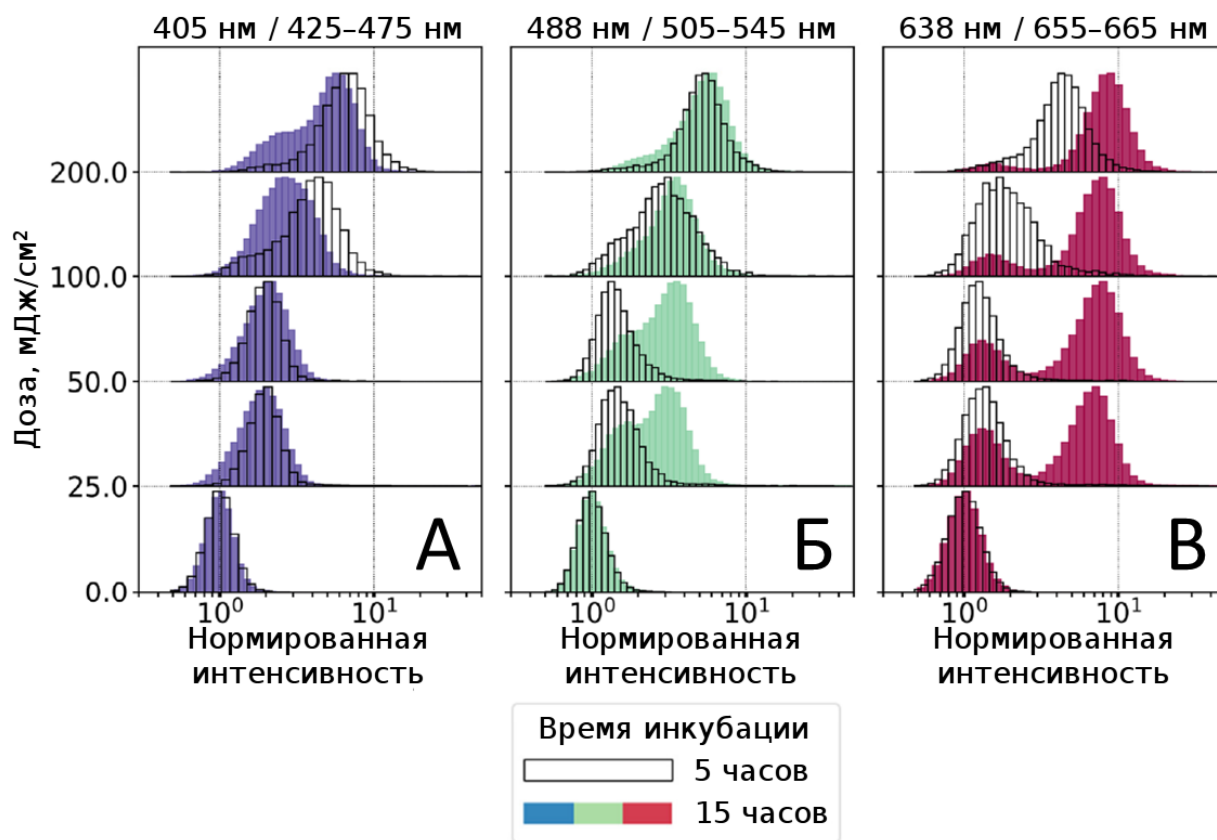


Рисунок 3.4 – Распределение интенсивности флуоресценции, нормированной на медианное значение интенсивности флуоресценции в контрольном образце, для флуоресцентного отклика с возбуждением/детектированием в спектральных каналах 405 нм/425–475 нм (А), 488 нм/505–545 нм (Б), 638 нм/655–665 нм (В) для клеток HaCaT, облученных различными дозами УФ-излучения.

Асинхронное изменение сигнала автофлуоресценции, возбуждаемого на различных длинах волн (405, 488 и 638 нм) свидетельствует в пользу гетерогенности состава флуорофоров, ответственных за изменения оптического отклика кератиноцитов, появление которых индуцировано фотоокислением. Действительно, в случае образования одного флуоресцирующего фотопродукта изменения в различных каналах должны были бы происходить синхронно с увеличением дозы облучения и времени инкубации, чего не наблюдалось в эксперименте. Наличие флуоресцентного сигнала, возбуждаемого в красной области, свидетельствует о присутствии гетерогенных продуктов окисления, рассматриваемых в Главе 2.

Аналогично экспериментам с фотоокислением, были исследованы изменения флуоресцентного отклика кератиноцитов, индуцированные окислением с помощью пероксида водорода (Рисунок 3.5). В случае индуцирования окислительного стресса пероксидом водорода спустя 19 часов после добавления стрессора происходило значимое усиление сигнала автофлуоресценции во всех спектральных каналах – при инкубации клеток в среде с концентрацией пероксида водорода 1500 мкМ медианное значение флуоресцентного отклика возрастало приблизительно в 1.3–1.5 раза (Рисунок 3.5). При этом также наблюдалось уменьшение интенсивности рассеяния вперёд (FSC).

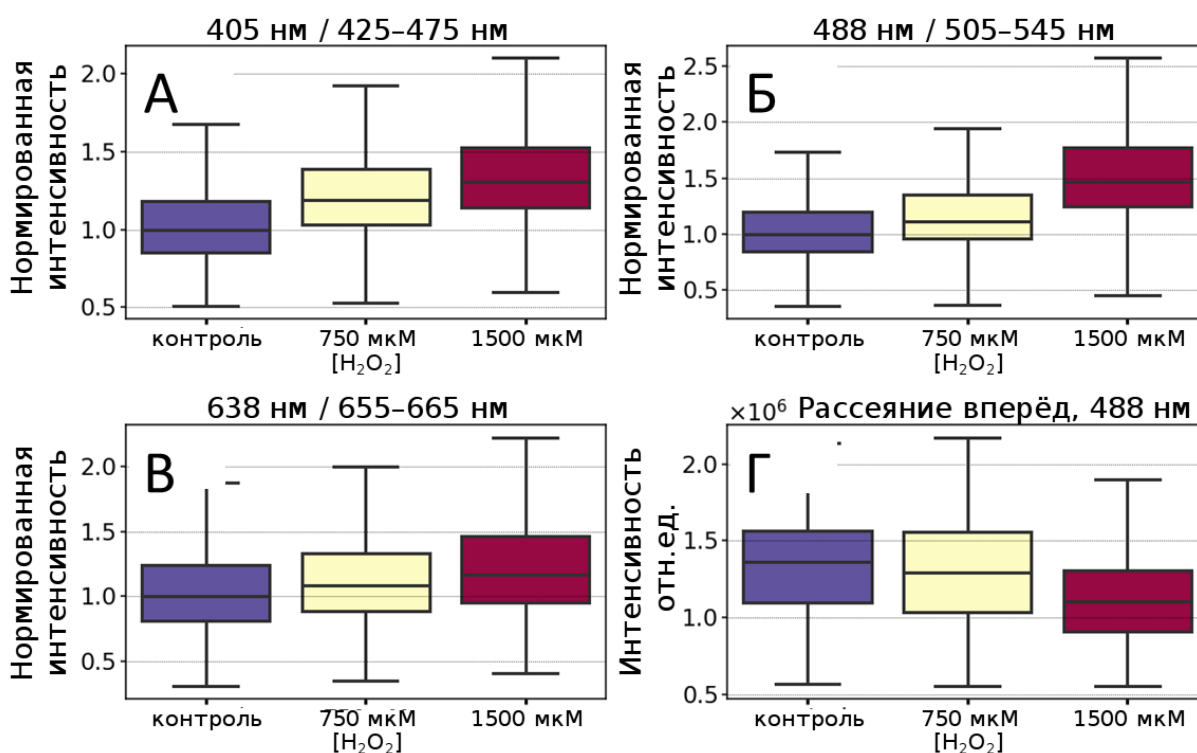


Рисунок 3.5 – Распределение интенсивности флуоресцентного отклика, нормированного на медианное значение интенсивности флуоресценции в контрольном образце, для сигналов в каналах с возбуждением/детектированием на длинах волн 405нм/425–475 нм (А), 488 нм/505–545 нм (Б), 638 нм/655–665 нм (B) и интенсивности рассеяния вперёд на длине волны 488 нм (Г) для контрольной субпопуляции клеток и клеток, с окислительным стрессом, вызванным добавлением пероксида водорода (H₂O₂).

Следует также отметить, что как в случае фотоокисления, так и в случае воздействия пероксидом водорода, не наблюдалось значительного изменения флуоресцентного отклика в субклеточных фрагментах (“клеточном мусоре”), детектируемом с помощью проточной цитометрии. Фрагменты клеточных остовов были выделены по малым значениям интенсивности в канале рассеяния вперёд ($< 0.5 \cdot 10^6$ отн. ед.), после чего были проанализированы распределения значений флуоресценции в них в зависимости от времени инкубации после УФ облучения. На рисунке 3.6 представлены распределения флуоресцентного отклика от малых клеточных фрагментов для флуоресцентных каналов 405 нм/425–475 нм, 488 нм/505–545 нм, 638 нм/655–665 нм – видно, что значительных изменений в уровне флуоресцентного отклика по сравнению с контрольным образцом не наблюдалось. Таким образом, можно заключить, что изменение флуоресцентного отклика в кератиноцитах в первую очередь было вызвано каскадом биохимических реакций, приводящих к накоплению гетерогенных продуктов окисления, но не прямым окислением, связанным с взаимодействием исходного окислителя (УФ-излучения или пероксида водорода) с молекулами образца.

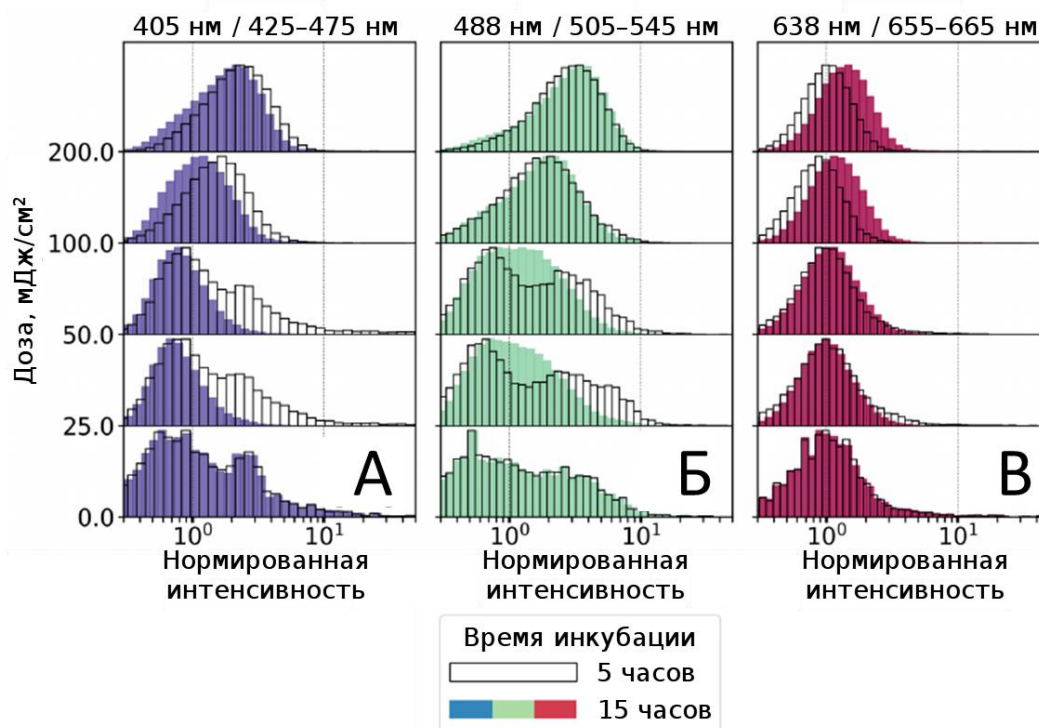


Рисунок 3.6 – Распределение интенсивности флуоресценции, нормированной на медианное значение интенсивности флуоресценции в контрольном образце, для сигналов во флуоресцентных каналах с возбуждением/детектированием 405 нм/425–475 нм (А), 488 нм/505–545 нм (Б), 638 нм/655–665 нм (В) для “клеточного мусора”, наблюдаемого в образцах клеток HaCaT, подверженных УФ-фотоокислению различной дозы.

3.2.4 Картирование распределения времени затухания флуоресценции продуктов окисления в единичных клетках

Для наблюдения изменений свойств эндогенной флуоресценции и морфологии клеток кожи был применен метод лазерной флуоресцентной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции с возбуждением отклика на 402 нм и 640 нм. Для картирования времен затухания флуоресценции была использована экспериментальная установка Microtime 200 (Picoquant, Германия), реализующая детектирование кинетики затухания флуоресценции с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с характерной длительностью функции отклика детектора ~100 пс. В качестве источников возбуждения были использованы пикосекундные диодные лазеры (характерная длительность импульса ~40 пс) с

длинами волн возбуждения 402 нм и 640 нм; частотой следования импульсов – 40 МГц, средней мощностью излучения на образце – 50 мкВт. Детектирование сигнала флуоресценции при возбуждении на 402 нм осуществлялось в диапазоне 425–900 нм; при возбуждении на 640 нм в диапазоне 660–720 нм. Измерения осуществлялись в конфокальной схеме светосбора с помощью иммерсионного объектива Olympus UPlanSApo 100× с $NA = 1.4$. Карты размером 400×400 пикселей измерялись со временем накопления 0.2 мс/пиксель, таким образом, время накопления для полного поля 80×80 мкм составляло 40 с.

Кинетика затухания флуоресценции детектировалась во временном окне 25 нс. Предварительно для снижения погрешности измерений производилось пространственное усреднение (биннинг) сигнала флуоресценции по области 11×11 пикселей, при этом анализировались кривые затухания флуоресценции, имеющие более 20 фотонов в максимуме кривой затухания флуоресценции. Задетектированные кривые затухания флуоресценции аппроксимировались с помощью биэкспоненциального закона затухания с учётом свертки с гауссовой функцией отклика детектора. Из амплитуд a_1 , a_2 и времен затухания флуоресценции τ_1 , τ_2 были рассчитаны карты среднего времени жизни флуоресценции по формуле 2.3 с числом компонент $N = 2$.

Кинетика затухания флуоресценции была измерена для образцов кератиноцитов человека (линия HaCaT), облученных дозой 100 мДж/см², аналогично экспериментальным протоколам, описанным в разделах 3.2.1 – 3.2.3, и клеток контрольного образца, не подвергавшегося облучению. Клетки облученного образца инкубировались в течение 15 часов после облучения в стандартных условиях.

На рисунках 3.7 А–Г представлены карты среднего времени затухания флуоресценции τ_m для клеток HaCaT контрольного, необлученного образца (Рисунок 3.7А,В), и для УФ-облученных кератиноцитов (Рисунок 3.7Б,Г). Гистограммы распределения параметров флуоресцентного отклика представлены на

рисунках 3.7Д–З. При возбуждении на 402 нм в контрольном образце для областей цитоплазмы наблюдался флуоресцентный отклик со средним временем затухания флуоресценции $\tau_m = 1.92 \pm 0.29$ нс (Рисунок 3.7 А, Д) и средним числом фотонов под кривой затухания флуоресценции равным ~ 6400 фотоотсчётов (Рисунок 3.7Е), в то время как для областей, соответствующих ядрам клеток, не наблюдалось интенсивной флуоресценции. В облученном образце при возбуждении на 402 нм наблюдался интенсивный флуоресцентный отклик из областей, соответствующих как цитоплазме, так и ядрам клеток (Рисунок 3.7Б). Флуоресцентный отклик 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, обладал средним временем затухания $\tau_m = 2.34 \pm 0.14$ нс (Рисунок 3.7Д). Различия в среднем времени затухания флуоресценции свидетельствуют о различном составе продуктов окисления, накапливаемых в цитоплазме и ядре клеток. Интенсивность сигнала флуоресценции, оцененная по интегральному числу фотоотсчётов в кинетике затухания флуоресценции, при этом увеличилась в 5.8 раз по сравнению с контрольным образцом (Рисунок 3.7Е).

В случае возбуждения сигнала на 640 нм, клетки кожи контрольного образца обладали низким сигналом автофлуоресценции. Интенсивность детектируемого оптического отклика составляла ~ 1000 фотоотсчётов. При этом клетки NaCaT образца, облученного дозой 200 мДж/см^2 , обладали флуоресцентным откликом, интенсивность которого возрастала в 9.3 раза по сравнению интенсивностью оптического отклика контрольного образца при возбуждении на 640 нм, а среднее время затухания флуоресценции составляло 1.11 ± 0.19 нс. Изменения, наблюдаемые во флуоресцентном отклике, возбужденном на 402 и 640 нм, согласуются с данными, полученными с помощью проточной цитометрии (раздел 3.2.3).

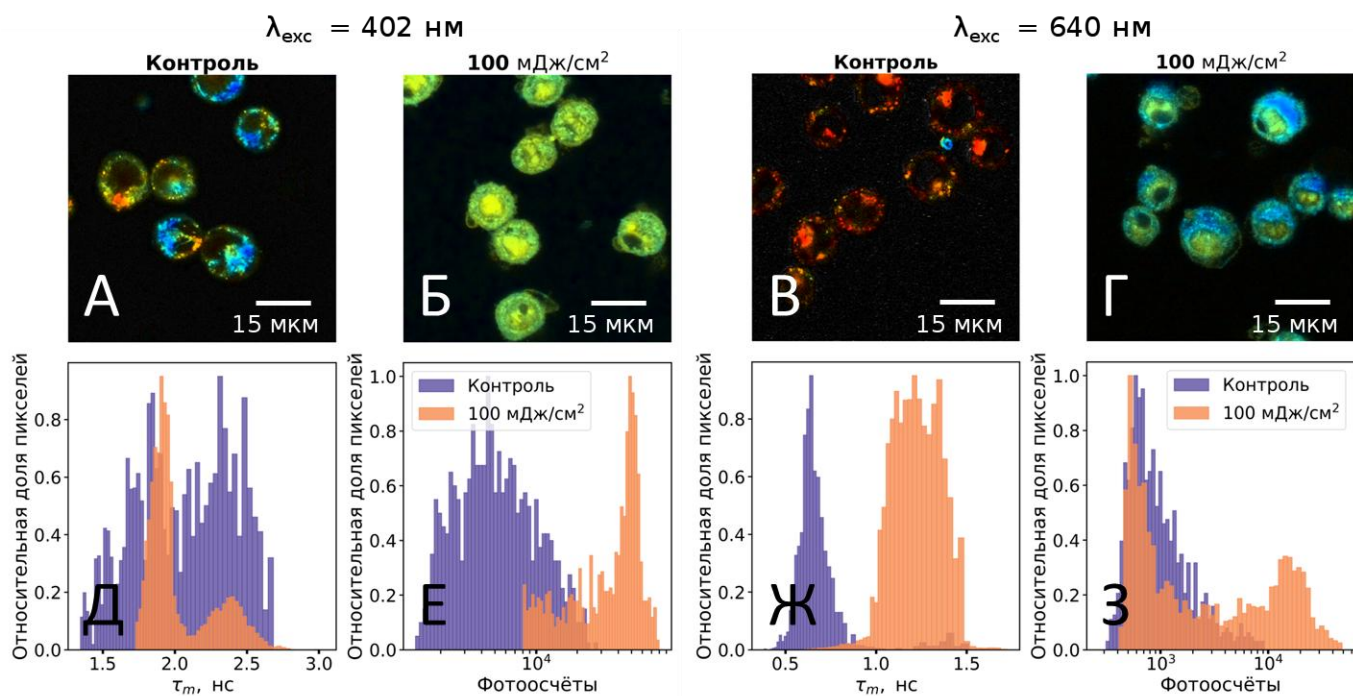


Рисунок 3.7 – А–Г) Карты среднего времени затухания флуоресценции, возбуждаемой на 402 нм (А,Б) и 640 нм (В,Г) для клеток, необлученных УФ-излучением (контроль) (А,В), и клеток, подверженных фотоокислению (Б,Г). Д,Е) Гистограммы распределения среднего времени жизни (Д) и интегрального числа фотонов под кривой затухания флуоресценции (Е), возбуждаемой на 402 нм, для контрольного образца и образца, облученного УФ-излучением. Ж,З) Гистограммы распределения среднего времени жизни (Ж) и интегрального числа фотонов под кривой затухания флуоресценции (З), возбуждаемой на 640 нм, для контрольного образца и образца, облученного УФ-излучением.

Для того чтобы подтвердить, что в результате УФ облучения происходит окислительный стресс и значительное накопление продуктов окисления в кератиноцитах, облученные и необлученные клетки NaCaT были окрашены с помощью красителя, реагирующего на наличие активных форм кислорода в системе — Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), квантовый выход которого возрастает в $\sim 10^2$ – 10^3 раз при взаимодействии с синглетным кислородом [163].

Для характеристики окислительного стресса краситель SOSG (Thermo Fisher Molecular Probes, США) добавлялся к необлученным контрольным клеткам и к

клеткам облученным дозой УФ-излучения 100 мДж/см^2 и инкубированным в течение 5 часов после облучения. Стоковый раствор SOSG в объёме 10 мкл (1.6 мМ в метаноле) добавлялся к клеткам, находившимся в питательной среде (1 мл, 10^6 клеток/мл). Клетки инкубировались с красителем в течение 30 минут до начала исследования, избытки красителя и питательной среды несколько раз смывались с помощью фосфатного буфера Дульбекко. После приготовления образцы были измерены с помощью конфокального микроскопа Olympus FV10i (Токио, Япония).

На рисунке 3.8 представлены изображения клеток контрольного (Рисунок 3.8А,В) и тестового образцов (Рисунок 3.8В,Г; доза 100 мДж/см^2) в белом свете (А,Б) и в флуоресцентном канале, подходящим для эффективного возбуждения и детектирования сигнала флуоресценции SOSG (длина волны возбуждения 490 нм, детектирование 540–640 нм, Рисунок 3.8В,Г). В клетках контрольного образца слабоинтенсивный флуоресцентный отклик наблюдался только от областей, соответствующих цитоплазме (Рисунок 3.8В). В это же время в облученном образце краситель, активирующийся в присутствии активных форм кислорода, интенсивно флуоресцировал как в областях, соответствующих цитоплазме клеток, так и в области ядер (Рисунок 3.8Г). Эти результаты также свидетельствуют в пользу наличия продуктов окисления в клетках при воздействии УФ-излучением.

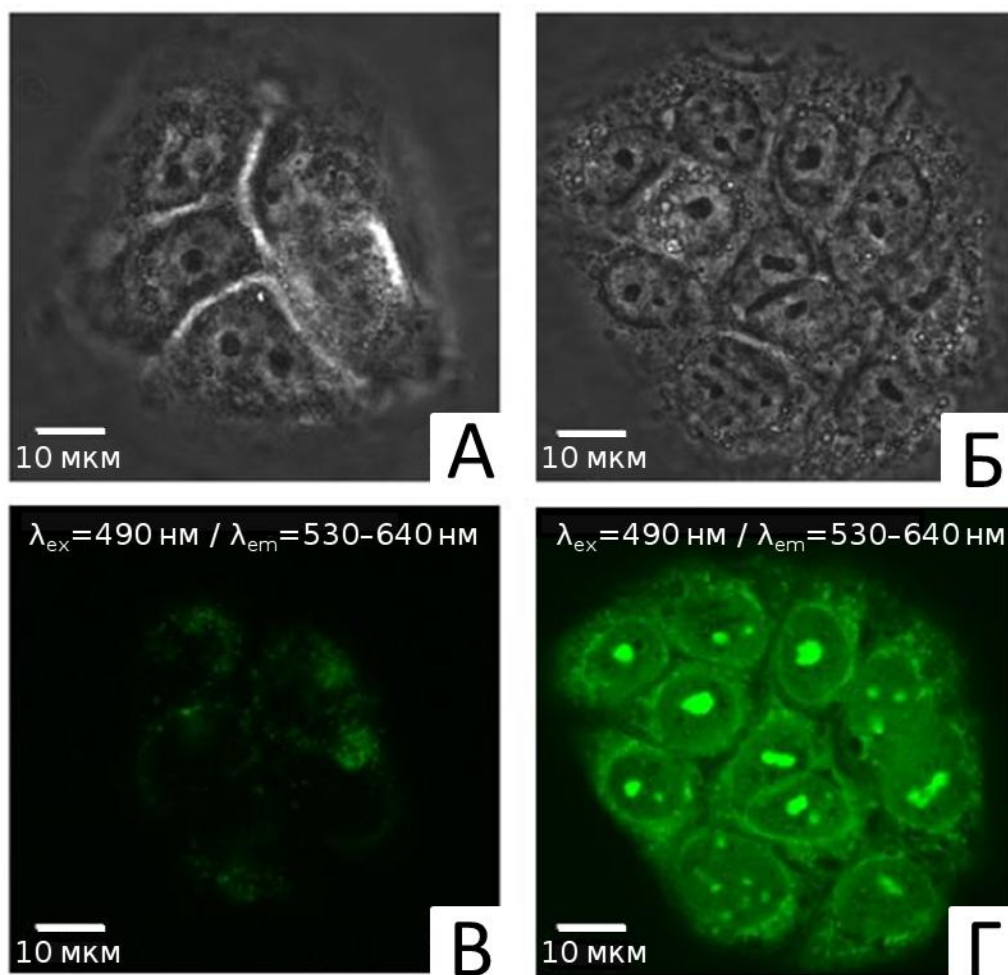


Рисунок 3.8 – А,Б) Изображения кератиноцитов, окрашенных с помощью красителя, чувствительного к присутствию синглетного кислорода в системе (SOSG), контрольного образца (А) и тестового образца (Б, доза 100 мДж/см²), полученные с помощью широкопольной микроскопии в белом свете на отражение. В,Г) Изображения кератиноцитов, окрашенных с помощью красителя SOSG, контрольного образца (В) и тестового образца (Г, доза 100 мДж/см²), полученные во флуоресцентном канале, с возбуждением на 490 нм и детектированием эмиссии в диапазоне 530–640 нм, оптимальном, для визуализации сигнала красителя.

3.3.5 Обсуждение результатов

Как видно, в результате индуцирования окислительного стресса с помощью различных стрессоров в основных клетках эпидермиса, кератиноцитах, наблюдается

увеличение сигнала автофлуоресценции в видимом и ближнем ИК диапазоне спектра. При этом наиболее чувствительным индикатором накопления гетерогенных продуктов окисления является сигнал флуоресценции с возбуждением и детектированием в красной области спектра (638 нм/655-665 нм), в данной области усиление сигнала флуоресценции в среднем составляет ~5–10 раз по сравнению с сигналом, детектируемым для контрольного образца.

Было установлено, что фотоокисление приводит к дозозависимому накоплению продуктов окисления, причём накапливаемые продукты окисления в первую очередь возникают за счёт биохимических процессов, проходящих в клетках, но не за счёт прямого окисления. Накопление флуоресцентных продуктов окисления при этом происходит как в цитоплазме клеток, так и в ядре. С помощью картирования времени затухания флуоресценции было установлено, что продукты окисления, накапливаемые в цитоплазме и ядре клеток, отличаются по своим параметрам затухания флуоресцентного отклика, следовательно, и по молекулярному составу.

По интенсивности, сигнал автофлуоресценции продуктов окисления при этом сравним с эндогенной флуоресценцией других флуорофоров тканей при возбуждении в диапазоне 400–500 нм и должен учитываться при анализе флуоресцентного отклика клеток. При возбуждении в красной и ближней инфракрасной области спектра флуоресцентный отклик ГСФ, образованных в результате процессов окисления, может быть доминирующим.

3.3. Лазерная диагностика меланина в верхних слоях кожи *in vivo*

Помимо гетерогенных продуктов окисления, накапливаемых в результате окислительного стресса, в эпидермисе нормальной кожи присутствует меланин, также отнесенный к классу ГСФ. Как было указано в Разделе 3.1, меланин неоднородно распределен по глубине эпидермиса и имеет локальный максимум

концентрации на глубине, соответствующей переходу между эпидермисом и дермой. Картирование содержания меланина *in vivo* на различных глубинах в коже по его флуоресцентному отклику в видимом и ближнем ИК диапазоне не было ранее продемонстрировано в литературе. При этом информация о распределении меланина в различных слоях кожи представляет интерес для биомедицинской диагностики, так как меланин вовлечён в большое число нормальных и патологических процессов в коже.

В данном разделе была исследована возможность визуализации меланина в эпидермисе и дерме *in vivo*. Исходя из оптических свойств ГСФ, описанных в Главе 2, селективная визуализация меланина может быть осуществлена за счёт нескольких отличительных характеристик флуоресцентных свойств меланина: 1) возможности возбуждения флуоресцентного отклика в красной и ближней инфракрасной области спектра, 2) наличия сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции. Далее исследована возможность анализа пространственного распределения меланина на различных глубинах в коже *in vivo* на основе указанных оптических характеристик.

3.3.1 Селективная визуализация меланина с помощью картирования времени затухания двухфотонно возбуждаемой флуоресценции

Возможность картирования распределения меланина с использованием сверхбыстрого затухания флуоресцентного отклика была исследована с помощью метода микроскопии с картированием времени затухания флуоресценции (FLIM).

Для различных слоёв эпидермиса *in vivo* были измерены карты среднего времени затухания флуоресценции при двухфотонном возбуждении (для измерений был использован мультифотонный томограф DermaInspect, JenLab GmbH). Для возбуждения флуоресценции использовалось излучение титан-сапфирового лазера

на длине волны 760 нм, с характерной длительностью импульса ~ 100 фс, частотой повторений 80 МГц, средней мощностью излучения 50 мВт. Для визуализации использовался планапохроматический объектив с увеличением $40\times$ и числовой апертурой $NA = 1.3$. Латеральное разрешение установки составляло 1 мкм, разрешение по глубине составляло 2 мкм. Кинетика затухания флуоресценции детектировалась в спектральном диапазоне 410–680 нм с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с временным разрешением детектора 250 пс. Кинетика затухания флуоресценции аппроксимировалась биэкспоненциальным законом затухания с учётом свертки сигнала с гауссовой функцией отклика детектора. Амплитуды a_1 , a_2 и времена затухания флуоресценции τ_1 , τ_2 были использованы для расчёта среднего времени затухания флуоресценции по формуле 2.3.

Для того, чтобы наблюдать изменения, связанные с перераспределением меланина в коже, измерения производились на внутренней стороне предплечья (фототип II) в нормальном состоянии и на участках кожи предплечья, облученных УФ-Б излучением (полоса излучения 280–315 нм, доза 100 мДж/см²). Известно, что такое стрессовое воздействие может приводить к активной генерации и перераспределению меланина в коже [164].

Было обнаружено, что кривые затухания флуоресценции, детектируемые в различных подслоях кожи, могут быть разделены на две подгруппы, обладающие различным средним временем затухания – менее 200 пс (то есть меньше разрешающей способности детектора) и средним временем ~ 1 нс (Рисунок 3.9А). Распределения среднего времени затухания флуоресценции, измеренные на различных глубинах для случая нормальной кожи предплечья (“контроль”) и кожи, облученной с помощью УФ-Б излучения (“облучение”, доза 100 мДж/см²), спустя 48 часов после облучения представлены на рисунках 3.9 Б,В. Как видно из карт среднего времени жизни для контрольных, необлученных участков кожи,

интенсивный флуоресцентный отклик с характерным коротким временем жизни (<200 пс) наблюдался на глубинах порядка 40 – 50 мкм, на глубине расположения перехода между эпидермисом и дермой, вблизи которого локализованы меланоциты, активно продуцирующие меланин. Для облученных участков кожи было получено, что области с коротким временем жизни также наблюдаются и на глубинах порядка 0–20 мкм, что свидетельствует в пользу того, что при УФ облучении происходит перераспределение меланина в верхние слои кожи, в частности, в роговой слой.

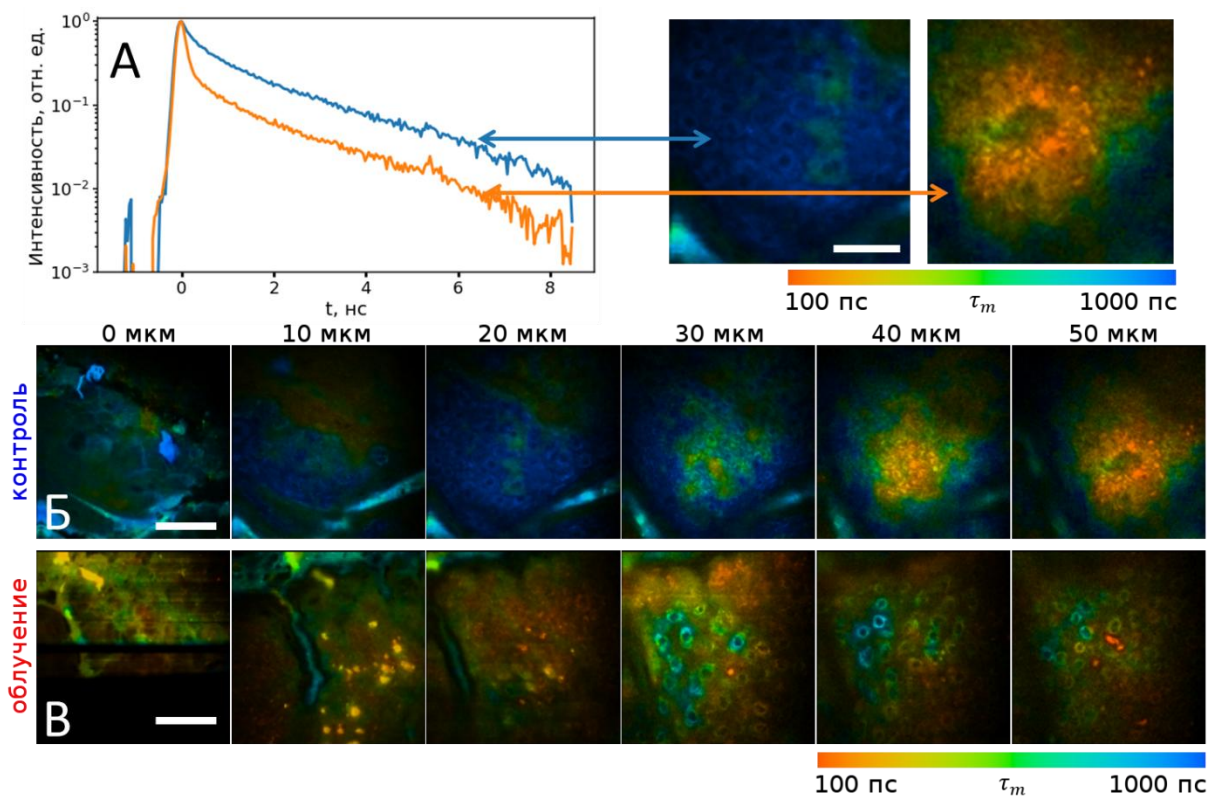


Рисунок 3.9 – А) Репрезентативные кривые затухания флуоресценции со средним временем затухания флуоресценции $\tau_m < 200$ пс (оранжевая кривая) и $\tau_m \sim 1$ нс (синяя кривая), и соответствующие им карты среднего времени затухания флуоресценции, измеренные для различных слоёв эпидермиса кожи предплечья (фототип II). Б, В) Карты времени затухания флуоресценции, измеренные для различных слоёв кожи предплечья не облученной УФ излучением (Б) и облученной дозой УФ-Б излучения 100 мДж/см^2 спустя 48 часов после облучения (В). Глубина 0 мкм соответствует роговому слою, 40 мкм – переходу эпидермис-дерма. Масштабная шкала – 15 мкм.

Полученные карты среднего времени затухания флуоресценции и интенсивности флуоресценции позволяют провести оценку, насколько сигнал флуоресценции меланина превышает сигнал от других флуорофоров кожи – в случае возбуждения сигнала флуоресценции на 760 нм таким флуорофором в первую очередь является НАД(Ф)Н (эффективное возбуждение в диапазоне 300–380 нм, спектр однофотонного возбуждения представлен в Разделе 1.2, Рисунок 1.1). На рисунке 3.10 представлены карты интенсивности двухфотонной флуоресценции (Рисунок 3.10 А), среднего времени затухания флуоресценции (Рисунок 3.10 Б) и корреляции интенсивности и среднего времени затухания флуоресценции (Рисунок 3.10 В) в случае контрольных необлученных участков кожи. Было получено, что сигнал флуоресценции в областях со временем затухания менее 200 пс составляет около 2000 отн. е.д. (Рисунок 3.10 В), тогда как сигнал флуоресценции с характерным временем затухания 600–800 пс, соответствующий НАД(Ф)Н в кератиноцитах, составляет при тех же настройках около 200 отн. е.д., то есть при двухфотонном возбуждении флуоресценции на 760 нм, интенсивность флуоресценции меланина в среднем в 10 раз выше, чем флуоресцентный отклик НАД(Ф)Н. Наблюдаемые различия в интенсивности флуоресцентного отклика могут быть связаны как с повышенной концентрацией меланина вблизи перехода между эпидермисом и дермой, так и с повышенной эффективностью двухфотонного возбуждения меланина.

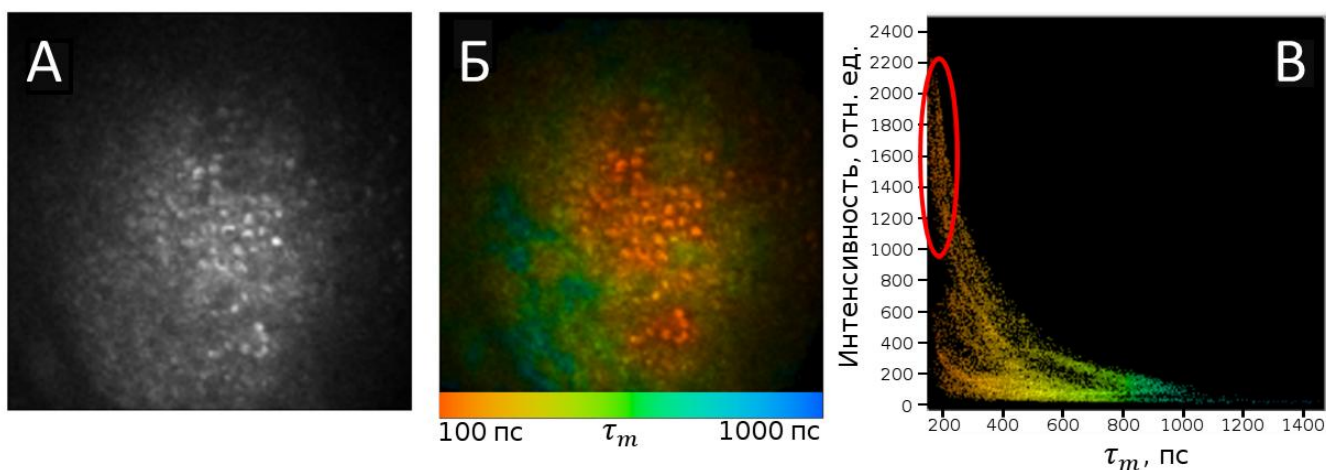


Рисунок 3.10. А) Флуоресцентное изображение кожи человека *in vivo*, полученное при двухфотонном возбуждении отклика на 760 нм. Яркие области соответствуют высокой концентрации меланина. Б) Карта среднего времени затухания флуоресценции той же области, что и на панели А. В) Корреляция между средним временем затухания и интенсивностью флуоресценции в области базальной мембраны.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что сигнал флуоресценции от меланина может быть селективно визуализирован с помощью многофотонной флуоресценции с использованием карт времени затухания флуоресценции. При этом возбуждаемый отклик от меланина в несколько раз может превышать сигнал флуоресценции, наблюдаемый от других эндогенных флуорофоров кожи, таких как НАД(Ф)Н, ФАД, а наличие сверхбыстрой компоненты позволяет локализовать меланин по характерному времени затухания флуоресценции.

3.3.2 Локализация меланина по однофотонному инфракрасному флуоресцентному отклику и сигналу комбинационного рассеяния

Селективная визуализация меланина и других ГСФ возможна по флуоресцентному отклику, возбуждаемому и детектируемому в красной и ближней инфракрасной области спектра. Также меланин, как *in vitro* [165] так и *in vivo* [12], может быть обнаружен по двум широким линиям КР с положениями максимумов на ≈ 1380 и ≈ 1570 см^{-1} (ширина линий порядка 200 см^{-1}). Как было показано в предыдущей

главе, флуоресцентный отклик ГСФ связан с оптическим откликом от единичных молекулярных флуорофоров, но не супрамолекулярных агрегатов – т.е. в первую очередь обусловлен “химическим беспорядком”. Поскольку линии комбинационного рассеяния характеризуют химическую структуру меланина, можно предположить, что должна наблюдаться взаимосвязь между флуоресцентным откликом и относительной интенсивностью линий КР меланина. В данном разделе представлены результаты исследования возможности локализации меланина по однофотонно-возбуждаемому флуоресцентному отклику в красной и ближней инфракрасной области спектра и сигналу комбинационного рассеяния меланина.

Измерения спектров флуоресценции и комбинационного рассеяния (КР) на различной глубине в коже были проведены с помощью системы конфокальной микроспектроскопии КР 3510 SCA (RiverD, Нидерланды). Возбуждение оптического отклика производилось с помощью непрерывного диодного лазера на 785 нм (выходная мощность 20 мВт). Оптический отклик детектировался с помощью конфокальной системы светосбора с помощью воздушного 60× объектива ($NA = 0.7$) в диапазоне 810–950 нм, что соответствует диапазону волновых чисел 400–2200 cm^{-1} , время накопления сигнала для измерения одного спектра составляло 5 с. Положение объектива относительно участка кожи изменялось с помощью автоматической подвижки. Пространственное латеральное разрешение и разрешение по глубине используемой установки составляло 2 мкм.

Для 12 добровольцев с фототипами кожи II (7 добровольцев) и III (5 добровольцев) были измерены сигналы комбинационного рассеяния кожи внутренней стороны предплечья на глубине от 0 до 60 мкм с шагом 2 мкм. С целью устранения неоднородности сигналов комбинационного рассеяния по глубине, для каждого добровольца было измерено от 4 до 8 глубинных профилей.

Репрезентативные спектры детектируемого оптического отклика кожи на разных глубинах сканирования представлены на рисунке 3.11. Как видно (Рисунок 3.11А), в

спектрах оптического отклика наблюдается как сигнал комбинационного рассеяния тканей с узкими спектральными линиями, так и бесструктурный флуоресцентный фон. Флуоресцентный фон был интерполирован в исследуемом спектральном диапазоне с помощью полинома второго порядка с использованием областей 620–700 см^{-1} и 1900–2200 см^{-1} . Репрезентативные примеры интерполяции флуоресцентного фона представлены на рисунке 3.11Б.

Для характеристики средней интенсивности флуоресценции в исследуемом спектральном диапазоне, а также учёта зависимости сигнала флуоресценции от глубины сканирования, возникающей за счёт рассеяния и поглощения излучения тканями, была применена процедура нормировки интенсивности сигнала флуоресценции на сигнал комбинационного рассеяния. Средняя интенсивность флуоресценции в диапазоне 1550–1720 см^{-1} , оцененная с использованием интерполяции, нормировалась на среднюю интенсивность линии амид-III белков в диапазоне 1550–1720 см^{-1} (заштрихованные красная и синяя области на рисунке 3.11Б) Далее, нормированная интенсивность флуоресценции в диапазоне 1550–1720 см^{-1} будет обозначена как Fl.

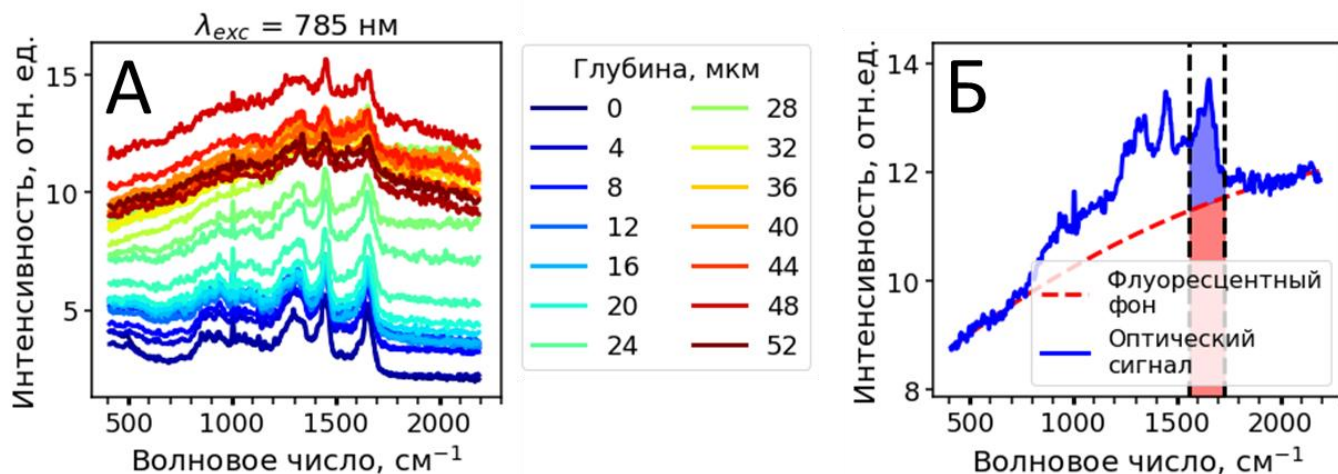


Рисунок 3.11 – А) Репрезентативные спектры оптического отклика кожи, полученные на различных глубинах сканирования при возбуждении на 785 нм в диапазоне детектирования 400–2200 см^{-1} . Б) Пример интерполяции флуоресцентного фона (красный пунктир) для спектров исходного оптического отклика кожи (синяя кривая). Красная и синяя области на изображении отражают спектральные диапазоны, используемые для расчёта величины FI – средней интенсивности флуоресценции, нормированной на сигнал КР.

Было обнаружено, что в разрешенных по глубине спектрах КР кожи, полученных после вычитания флуоресцентного фона, можно выделить вклад меланина по характерным линиям меланина на 1380 и 1570 см^{-1} , частично перекрывающимся с узкими линиями липидов и белков на 1298, 1450 и 1655 см^{-1} . При этом было установлено, что спектрам КР с преобладающим вкладом линий меланина соответствует высокий флуоресцентный отклик. На рисунке 3.12 представлены типичные спектры комбинационного рассеяния с высоким ($FI = 26$) и низким ($FI = 3$) флуоресцентным фоном до (Рисунок 3.12 А,Б) и после вычитания флуоресцентного фона полиномом второй степени (Рисунок 3.12 В,Г). При этом спектр КР в области 1200–1800 см^{-1} хорошо описывается суммой взвешенных гауссиан с максимумами, соответствующими линиям КР белков и липидов на 1298, 1450, 1655 см^{-1} и линиям меланина на 1380 и 1570 см^{-1} с характерными ширинами на полувысоте 80, 45, 50, 230 и 165 см^{-1} соответственно. По отношению интенсивности линий меланина к линиям белков и липидов можно оценить долю меланина.

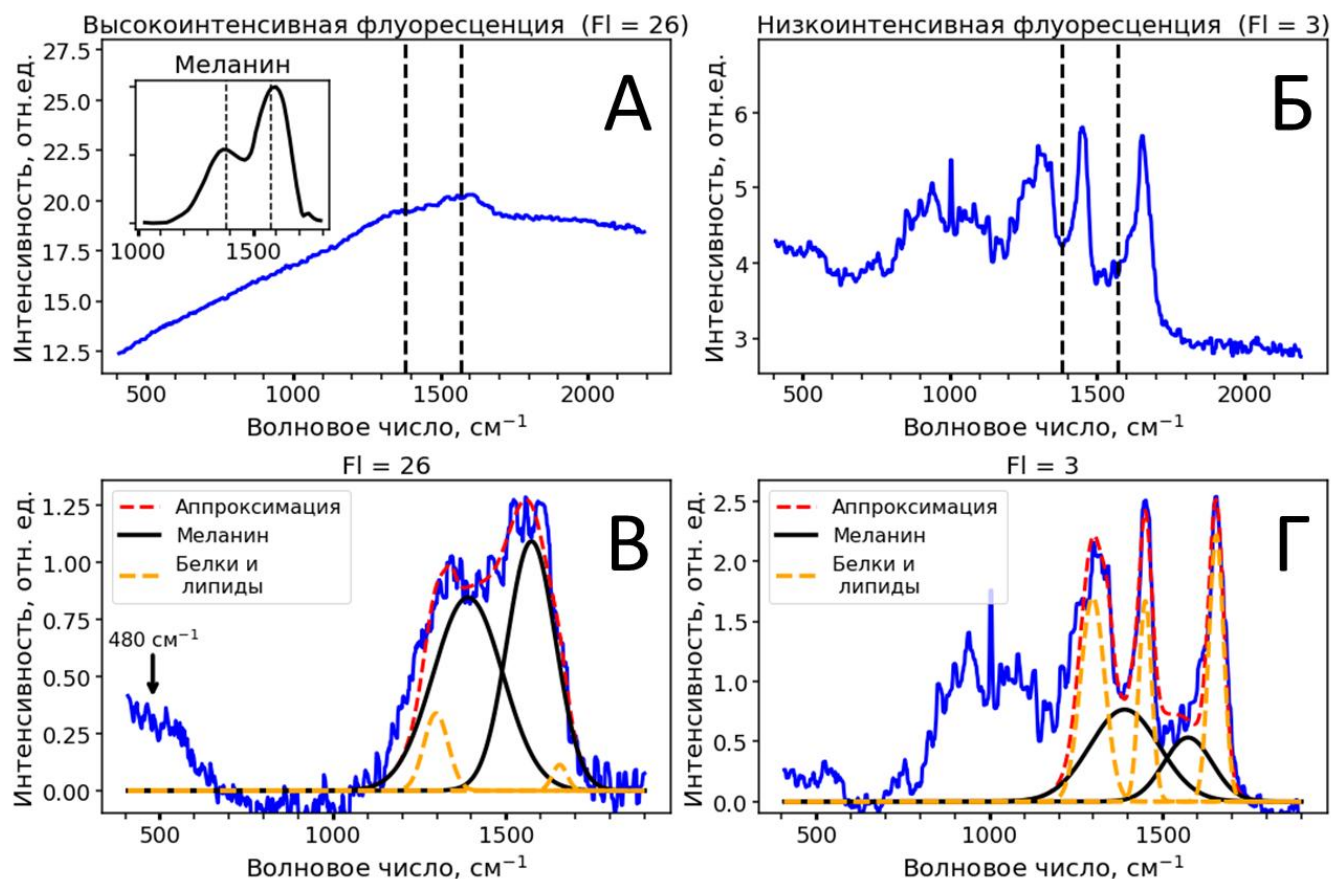


Рисунок 3.12 – А) Типичный вид спектра КР кожи (глубина детектирования 40 мкм) с высоким уровнем флуоресценции ($FI = 26$). В спектре КР отчётливо наблюдаются широкие полосы меланина с максимумами на 1380 и 1570 см⁻¹ (аналогично спектрам синтетического меланина, см. вставку) Б) Типичный вид спектра КР кожи (глубина детектирования 10 мкм) с низким уровнем флуоресценции ($FI = 3$). 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 (рисунок В). На рисунках В,Г также приведены результаты разложения спектров в диапазоне 1200 – 1800 см⁻¹ на линии белков/липидов и меланина.

Поскольку линии меланина существенным образом перекрываются с линиями КР белков и липидов в коже, дополнительно были исследованы возможности выделения вклада меланина с помощью методов статистического обучения, не предполагающих наличия априорной информации о спектрах отдельных

молекулярных компонент, которые вносят вклад в детектируемые спектры КР. В частности, была исследована возможность применения метода неотрицательной матричной факторизации для анализа вклада отдельных молекулярных компонент в глубинно-разрешенные спектры комбинационного рассеяния кожи на глубинах 0–30 мкм.

В методе неотрицательной матричной факторизации предполагается, что наблюдаемые спектры комбинационного рассеяния $I_i(\nu)$, где I – интенсивность сигнала комбинационного рассеяния, соответствующая волновому числу ν , и измеренная для объекта i в выборке, является суммой нескольких независимых компонент т.е. $I_i(\nu) \approx \sum_j w_{ij} h_j(\nu)$, где w_{ij} – коэффициенты разложения, отражающие вклад в i -й экспериментальный спектр j -ой компоненты, имеющей спектр $h_j(\nu)$. Коэффициенты разложения w_{ij} и $h_j(\nu)$ при этом ищутся такими, чтобы они минимизировали общую невязку L в имеющемся наборе данных (формула 3.1):

$$L(w_{ij}, h_j(\nu)) = \sum_{\nu} \sum_i \left(I_i(\nu) - \sum_j w_{ij} h_j(\nu) \right)^2, \quad (3.1)$$

при этом предполагается, что коэффициенты разложения неотрицательны: $w_{ij} \geq 0$, $h_j(\nu) \geq 0$. Данное ограничение естественно в случае разложения спектров комбинационного рассеяния на независимые компонент, так как интенсивности спектров КР отдельных молекулярных компонент и их вклады не могут быть отрицательными.

Было установлено, что в результате неотрицательной матричной факторизации спектров кожи на 16 независимых компонент, удаётся выделить вклады кератина, естественного увлажняющего фактора, урокановой кислоты, церамидов (Рисунок 3.13А), которые обычно используются для анализа спектров комбинационного рассеяния верхних слоёв кожи [166]. При этом независимые

компоненты, выделенные с помощью метода неотрицательной матричной факторизации, не только сохраняют положения основных линий отдельных компонент, но и соотношения между интенсивностями отдельных линий, и обладают высокой косинусной мерой схожести (часто применяемой для сравнения спектров КР [167]) с истинными КР спектрами веществ. В результате факторизации также выделяются компоненты, вклад от которых обычно не учитывается при анализе распределения молекулярных компонент кожи (Рисунок 3.13Б). Одной из таких компонент является меланин. По вкладу компоненты, связанной с меланином, получаемой в результате неотрицательной матричной факторизации, возможна его локализация и оценка содержания меланина в тканях.

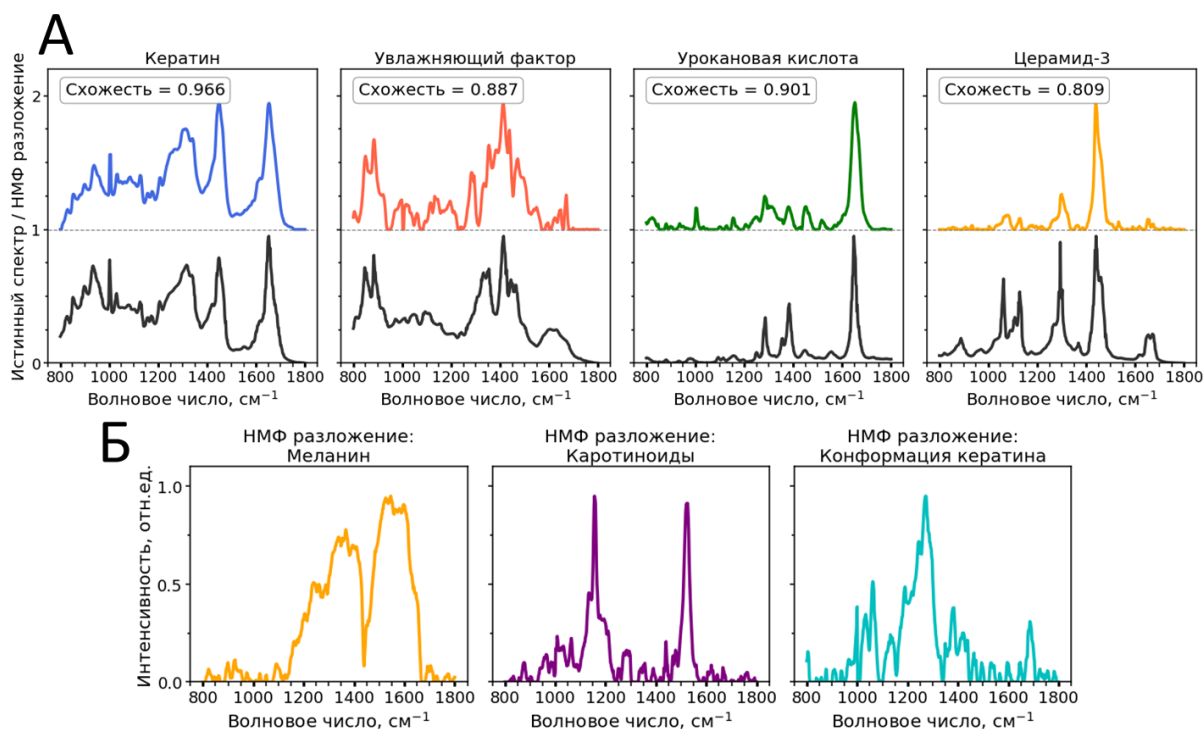


Рисунок 3.13 – Спектры независимых компонент, полученные с помощью неотрицательной матричной факторизации экспериментальных спектров КР кожи на 16 независимых компонент. На панели (А) дополнительно приведено сравнение спектров независимых компонент и КР-спектров веществ, вносящих вклад в КР отклик кожи. Для оценки схожести истинных спектров, и спектров, выделяемых с помощью неотрицательной матричной факторизации, использована косинусная мера [167].

С использованием вклада амплитуды меланина, полученного с помощью метода неотрицательной матричной факторизации, или по отношению суммы интенсивностей линий меланина на 1380 и 1570 см^{-1} к сумме амплитуд линий меланина на 1380 и 1570 см^{-1} и линий белков и липидов на 1298, 1450 и 1655 см^{-1} может быть проведена оценка содержания меланина на различных глубинах в коже. При этом было обнаружено, что сигнал флуоресценции, возбуждаемой на 785 нм линейно коррелирует с долей меланина, оцененной из сигнала комбинационного рассеяния (Рисунок 3.14А).

Было установлено, что относительная концентрация меланина, оцененная из сигнала КР, имеет локальный максимум вблизи 35–40 мкм (Рисунок 3.14 Б), что соответствует представлениям о том, что основная часть меланина локализована вблизи базальной мембраны у кожи типов II, III. Интенсивность флуоресцентного отклика в зависимости от глубины сканирования также возрастает на глубине сканирования 35-40 мкм (Рисунок 3.14В), однако не убывает на глубинах выше 40 мкм. Сигнал, детектируемый на глубине более 40 мкм, соответствует оптическому отклику от дермы, во флуоресцентный отклик которой вносят вклад продукты гликирования и окисления белков дермы (коллагена, эластина).

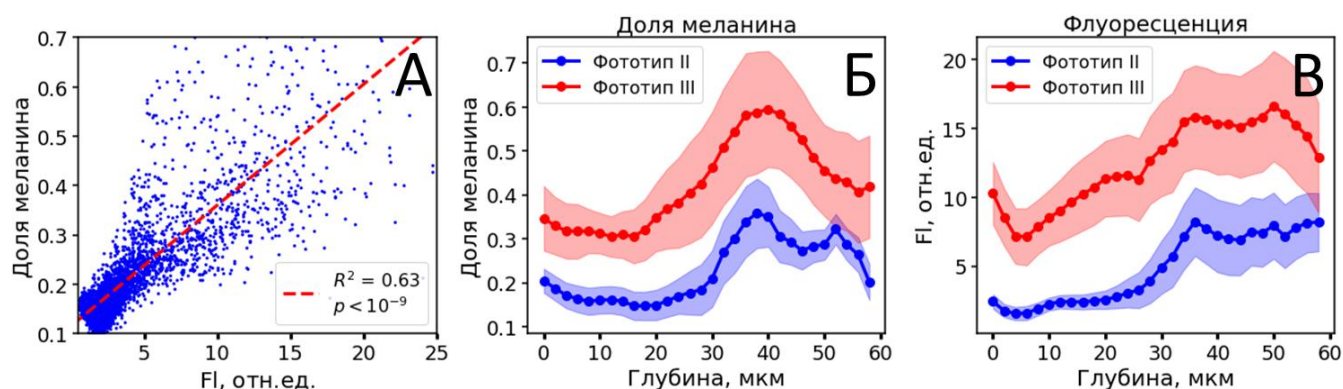


Рисунок 3.14 – А) Корреляция доли меланина, оцененной из спектров КР, и интенсивности ИК-флуоресценции, нормированной на величину комбинационного рассеяния (FI). Б) Типичные профили распределения доли меланина для волонтеров с фототипом II и III. В) Глубинные профили распределения флуоресценции (FI).

Было установлено, что параметры однофотонно-возбуждаемой ИК флуоресценции меланина коррелируют с относительной интенсивностью линий меланина на 1380 и 1570 см^{-1} . А именно, было получено, что для спектров оптического отклика с высокой интенсивностью флуоресценции ($F1 > 10$) Стоксов сдвиг флуоресценции, оцененный как положение максимума полинома второй степени, используемого для интерполяции флуоресцентного фона (Рисунок 3.15А,Б), статистически значимо (коэффициент Пирсона $r = 0.55$, $R^2 = 0.3$, $p < 10^{-9}$) коррелирует с соотношением интенсивностей линий КР меланина $I(1380 \text{ см}^{-1})/I(1570 \text{ см}^{-1})$ (Рисунок 3.15 В,Г).

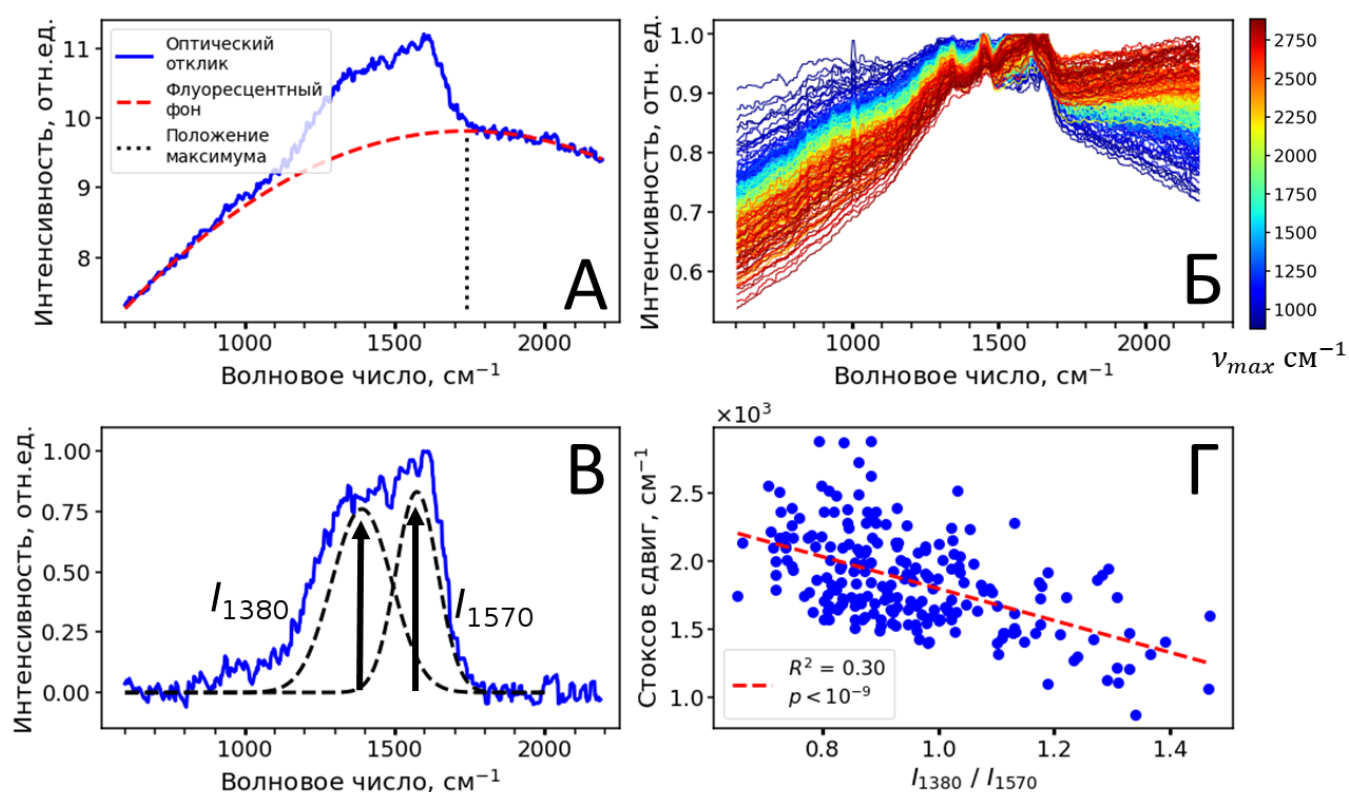


Рисунок 3.15 – А) Пример определения положения максимума (Стоксова сдвига) спектра флуоресценции. Б) Спектры КР/флуоресценции, используемые для анализа. Цветом закодирован Стоксов сдвиг флуоресценции. В) Типичный спектр КР кожи, с высоким содержанием меланина. Отношение амплитуд линий на 1380 и 1570 см^{-1} коррелирует с положением максимума эмиссии. 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 $r = 0.55$, $R^2 = 0.3$, $p < 10^{-9}$.

Таким образом, было установлено, что молекулярная организация меланина, проявляемая в отклике КР меланина, также связана и с параметрами флуоресцентного отклика. Такая связь в дальнейшем может быть использована для характеристики различных типов меланина и для оценки свойств его молекулярной организации, как в нормальных физиологических процессах, так и в процессах, связанных с нарушениями продуцирования меланина, в частности, при меланоме [83].

Кратко подытожим результаты, представленные в данном разделе Главы. Было установлено, что меланин может быть селективно визуализирован с помощью особенностей времени затухания его флуоресцентного отклика в видимом диапазоне при многофотонном возбуждении флуоресценции при детектировании кинетики затухания флуоресцентного отклика меланина. Распределение меланина может быть определено *in vivo* с помощью сигнала комбинационного рассеяния по линиям на 1380 и 1570 см^{-1} , а также с помощью методов неотрицательной матричной факторизации меланина, и с помощью сигнала однофотонно возбуждаемой на 785 нм флуоресценции. При этом спектральные свойства флуоресценции скоррелированы с молекулярными особенностями строения меланина, проявляющимися в сигнале комбинационного рассеяния.

3.4. Выводы

В данной главе были разработаны методы лазерного детектирования ГСФ – меланина, продуктов окисления аминокислот и белков – в задачах диагностики единичных клеток и в коже человека *in vivo*.

Была продемонстрирована возможность использования флуоресцентного отклика гетерогенных продуктов, накапливающихся в результате окислительного стресса в единичных клетках, на примере клеточной линии кератиноцитов человека (клеточная линия HaCaT) фотоокисленных УФ-излучением с длиной волны 254 нм, с дозой облучения от 25 до 200 мДж/см^2 и инкубации с пероксидом водорода (750 и

1500 мкМ). С помощью проточной цитометрии с флуоресцентным детектированием сигнала с параметрами возбуждения/детектирования 405 нм/425–475 нм, 488 нм/505–545 нм, 638 нм/655–665 нм, было установлено, что при индуцировании окислительного стресса происходит дозозависимое возрастание флуоресцентного отклика во всех каналах детектирования. Наибольшие изменения наблюдаются при возбуждении отклика на 638 нм и детектировании в диапазоне эмиссии 655–665 нм. Так, для клеток, проинкубированных в течение 15 часов после облучения УФ-излучением с дозой 200 мДж/см², медианное увеличение флуоресцентного отклика в при возбуждении на 405 нм и детектировании в диапазоне 425–475 нм составило 2.9 раза, в то время как при возбуждении на 638 нм и детектировании в диапазоне 655–665 нм оно составило 8.2 раза. С помощью метода микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции также были обнаружены изменения интегральной интенсивности и среднего времени затухания флуоресценции кератиноцитов при возбуждении флуоресцентного отклика на 402 и 640 нм. При возбуждении на 402 нм среднее время затухания флуоресценции в необлученных кератиноцитах составило 1.92 ± 0.29 нс, в то время как для фотооблученных клеток наблюдалось среднее время затухания флуоресценции 1.91 ± 0.07 нс для областей, соответствующих ядрам клеток, и 2.34 ± 0.14 нс для областей, соответствующих цитоплазме клеток. При возбуждении флуоресцентного отклика на 640 нм для контрольного образца не наблюдался интенсивный флуоресцентный отклик, что не позволило точно определить среднее время затухания флуоресценции. Среднее время затухания флуоресценции при возбуждении на 640 нм для фотоокисленного образца составило 1.11 ± 0.19 нс.

С помощью метода лазерной фемтосекундной конфокальной микроскопии с визуализацией времени затухания флуоресценции с двухфотонным возбуждением на 760 нм и детектированием в диапазоне 410–680 нм было исследовано распределение содержания меланина на глубине 0–60 мкм в коже предплечья *in vivo*.

Было показано, что визуализация меланина возможна с помощью короткого среднего времени затухания флуоресценции (менее 200 пс) в случае нормальной кожи и кожи, облученной УФ-Б излучением (полоса излучения 280–315 нм, доза 100 мДж/см²), в которой распределение меланина по различным подслоям кожи нарушено.

Распределение меланина по различным подслоям кожи *in vivo* на глубинах 0–60 мкм было исследовано с помощью метода конфокальной микроспектроскопии с возбуждением на 785 нм и детектированием сигнала флуоресценции и комбинационного рассеяния в диапазоне 810–950 нм. Было показано, что распределение меланина в коже по глубине *in vivo* может быть получено с помощью анализа интенсивности флуоресцентного отклика, возбуждаемого в ближнем ИК диапазоне (длина волны возбуждения 785 нм, детектирование 810–950 нм), а также по интенсивности линий КР меланина на 1380 см⁻¹ и 1570 см⁻¹, в том числе выделяемых с помощью метода неотрицательной матричной факторизации спектров КР.

Было установлено, что спектральные характеристики флуоресцентного отклика меланина связаны с молекулярным строением меланина, проявляющимся в спектрах комбинационного рассеяния меланина: Стоксов сдвиг флуоресценции (длина волны возбуждения 785 нм, детектирование 810–950 нм) отрицательно скоррелирован с отношением интенсивностей линий комбинационного рассеяния меланина на 1380 и 1570 см⁻¹, что может быть использовано для характеристики свойств меланина *in vivo*.

4. 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 немонотонным 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*.

Благодарности

Автор благодарит научных руководителей Фадеева Виктора Владимировича и Ширшина Евгения Александровича за неоценимый опыт, перенятый при постановке и решении поставленных исследовательских задач, обсуждении полученных результатов и помощь в выдвижении новых гипотез в проводимых исследованиях.

Автор выражает признательность всему коллективу лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за непередаваемую атмосферу, помощь и поддержку. Спасибо семье, близким и друзьям – вашу поддержку переоценить невозможно.

Список сокращений и условных обозначений

ГСФ	Гетерогенная система флуорофоров
ИК	Инфракрасный
УФ	Ультрафиолетовый
НАД(Ф)Н	Восстановленная форма никотинамиддинуклеотида (фосфата)
ФАД	Флавинадениндинуклеотид
DNICA	5,6-дигидроксииндольная-2-карбоновая кислота
ФЭУ	Фотоэлектронный умножитель
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy – микроскопия с визуализацией времени затухания флуоресценции
КР	Комбинационное рассеяние
SOSG	Singlet oxygen sensor green – краситель, чувствительный к присутствию синглетного кислорода в системе

5. Список 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, Vol. 84, No. 1, P. 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, Vol. 58, No. 4.
4. Perna G., Palazzo G., Mallardi A., Capozzi V. Fluorescence properties of natural eumelanin biopolymer//*Journal of Luminescence*, 2011, Vol. 131, No. 8, P. 1584-1588.
5. Wu Y., Qu J.Y. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues//*Journal of biomedical optics*, 2006, Vol. 11, No. 5, P. 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, Vol. 100, No. 6, P. 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, Vol. 138, No. 9, P. 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, Vol. 16, No. 12, P. 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, Vol. 22, No. 5, P. 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, Vol. 651, P. 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, Vol. 4, No. 01, P. 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, Vol. 9, No. 6, P. 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, Vol. 13, No. 7, P. 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, Vol. 16, No. 6, P. 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, Vol. 22, No. 2, P. 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, Vol. 90, No. 3, P. 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, Vol. 5, No. 1, P. 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, Vol. 338, No. 2, P. 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. Olsen J., Holmes J., Jemec G.B. Advances in optical coherence tomography in dermatology—a review//Journal of biomedical optics, 2018, Vol. 23, No. 4, P. 040901.

21. Ang M., Tan A., Cheung C.M.G., Keane P.A., Dolz-Marco R., Sng C.C., Schmetterer L. Optical coherence tomography angiography: a review of current and future clinical applications//Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2018, Vol. 256, No. 2, P. 237-245.
22. Karlas A., Fasoula N.-A., Paul-Yuan K., Reber J., Kallmayer M., Bozhko D., Seeger M., Eckstein H.-H., Wildgruber M., Ntziachristos V. Cardiovascular optoacoustics: From mice to men—A review//Photoacoustics, 2019, Vol. 14, P. 19-30.
23. Karlas A., Pleitez M.A., Aguirre J., Ntziachristos V. Optoacoustic imaging in endocrinology and metabolism//Nature Reviews Endocrinology, 2021, Vol. 17, No. 6, P. 323-335.
24. Omar M., Aguirre J., Ntziachristos V. Optoacoustic mesoscopy for biomedicine//Nature biomedical engineering, 2019, Vol. 3, No. 5, P. 354-370.
25. Santos I.P., Barroso E.M., Schut T.C.B., Caspers P.J., van Lanschot C.G., Choi D.-H., Van Der Kamp M.F., Smits R.W., Van Doorn R., Verdijk R.M. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics//Analyst, 2017, Vol. 142, No. 17, P. 3025-3047.
26. Jermyn M., Desroches J., Aubertin K., St-Arnaud K., Madore W.-J., De Montigny E., Guiot M.-C., Trudel D., Wilson B.C., Petrecca K. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology//Physics in Medicine & Biology, 2016, Vol. 61, No. 23, P. R370.
27. Ember K.J., Hoeve M.A., McAughtrie S.L., Bergholt M.S., Dwyer B.J., Stevens M.M., Faulds K., Forbes S.J., Campbell C.J. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review//NPJ Regenerative medicine, 2017, Vol. 2, No. 1, P. 1-10.
28. Li Y., Shen B., Li S., Zhao Y., Qu J., Liu L. Review of stimulated Raman scattering microscopy techniques and applications in the biosciences//Advanced Biology, 2021, Vol. 5, No. 1, P. 2000184.
29. Shi L., Fung A.A., Zhou A. Advances in stimulated Raman scattering imaging for tissues and animals//Quantitative imaging in medicine and surgery, 2021, Vol. 11, No. 3, P. 1078.
30. Li S., Li Y., Yi R., Liu L., Qu J. Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy and its applications//Frontiers in Physics, 2020, Vol. 8, P. 515.

31. Miller D.R., Jarrett J.W., Hassan A.M., Dunn A.K. Deep tissue imaging with multiphoton fluorescence microscopy//Current opinion in biomedical engineering, 2017, Vol. 4, P. 32-39.
32. Helmchen F., Denk W. Deep tissue two-photon microscopy//Nature methods, 2005, Vol. 2, No. 12, P. 932.
33. Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E. Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 1171.
34. I T.T., Goedeke J., Muensterer O.J. Multiphoton microscopy in surgical oncology-a systematic review and guide for clinical translatability//Surgical Oncology, 2019, Vol. 31, P. 119-131.
35. Croce A.C. Light and autofluorescence, multitasking features in living organisms//Photochem, 2021, Vol. 1, No. 2, P. 67-125.
36. Lima I.F.P., Brand L.M., de Figueiredo J.A.P., Steier L., Lamers M.L. Use of autofluorescence and fluorescent probes as a potential diagnostic tool for oral cancer: A systematic review//Photodiagnosis and photodynamic therapy, 2021, Vol. 33, P. 102073.
37. Progatzy F., Dallman M.J., Lo Celso C. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments//Interface focus, 2013, Vol. 3, No. 3, P. 20130001.
38. Demchenko A.P. Excitons in carbonic nanostructures//C, 2019, Vol. 5, No. 4, P. 71.
39. Berezin M.Y., Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging//Chemical reviews, 2010, Vol. 110, No. 5, P. 2641-2684.
40. Demchenko A.P. The red-edge effects: 30 years of exploration//Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence, 2002, Vol. 17, No. 1, P. 19-42.
41. Callis P.R. Exploring the electrostatic landscape of proteins with tryptophan fluorescence//Reviews in fluorescence 2007. – Springer, 2009. – P. 199-248.
42. Zhdanova N.G., Shirshin E.A., Maksimov E.G., Panchishin I.M., Saletsky A.M., Fadeev V.V. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin//Photochemical & Photobiological Sciences, 2015, Vol. 14, No. 5, P. 897-908.

43. Zhdanova N., Maksimov E., Arutyunyan A., Fadeev V., Shirshin E. Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins//Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, Vol. 174, P. 223-229.
44. Lawaetz A.J., Bro R., Kamstrup-Nielsen M., Christensen I.J., Jørgensen L.N., Nielsen H.J. Fluorescence spectroscopy as a potential metabonomic tool for early detection of colorectal cancer//Metabolomics, 2012, Vol. 8, No. 1, P. 111-121.
45. Genova T., Borisova E. Tryptophan fluorescence for diagnosis and staging of gastrointestinal cancers//Biophotonics, Tryptophan and Disease. – Elsevier, 2022. – P. 157-169.
46. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences//Antioxidants & redox signaling, 2008, Vol. 10, No. 2, P. 179-206.
47. Croce A.C., Bottiroli G. Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues//Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols/eds. C. Pellicciari, M. Biggiogera. – New York, NY: Springer New York, 2017. – P. 15-43.
48. Perna G., Frassanito M.C., Palazzo G., Gallone A., Mallardi A., Biagi P., Capozzi V. Fluorescence spectroscopy of synthetic melanin in solution//Journal of Luminescence, 2009, Vol. 129, No. 1, P. 44-49.
49. Capozzi V., Perna G., Carmone P., Gallone A., Lastella M., Mezzenga E., Quartucci G., Ambrico M., Augelli V., Biagi P. Optical and photoelectronic properties of melanin//Thin Solid Films, 2006, Vol. 511, P. 362-366.
50. Peyrot D.A., Lefort C., Steffenhagen M., Mansuryan T., Ducourthial G., Abi-Haidar D., Sandeau N., Vever-Bizet C., Kruglik S.G., Thiberville L. Development of a nonlinear fiber-optic spectrometer for human lung tissue exploration//Biomedical optics express, 2012, Vol. 3, No. 5, P. 840-853.
51. Voloshina O., Shirshin E., Lademann J., Fadeev V., Darvin M. Fluorescence detection of protein content in house dust: the possible role of keratin//Indoor air, 2017, Vol. 27, No. 2, P. 377-385.
52. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human-retinal-pigment epithelium with age

and pathology//Analytical and bioanalytical chemistry, 2015, Vol. 407, No. 4, P. 1075-1088.

53. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.S., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. Spectral analysis of fundus autofluorescence pattern as a tool to detect early stages of degeneration in the retina and retinal pigment epithelium//Eye, 2018, Vol. 32, No. 9, P. 1440-1448.

54. Chan F.T.S., Pinotsi D., Gabriele S., Schierle K., Kaminski C.F. Chapter 13 - Structure-Specific Intrinsic Fluorescence of Protein Amyloids Used to Study their Kinetics of Aggregation//Bio-nanoimaging/ eds. V.N. Uversky, Y.L. Lyubchenko. – Boston: Academic Press, 2014. – P. 147-155.

55. Joseph S.K., Kuritz N., Yahel E., Lapshina N., Rosenman G., Natan A. Proton-Transfer-Induced Fluorescence in Self-Assembled Short Peptides//The Journal of Physical Chemistry A, 2019, Vol. 123, No. 9, P. 1758-1765.

56. Homchaudhuri L., Swaminathan R. Novel Absorption and Fluorescence Characteristics of L-Lysine//Chemistry Letters, 2001, Vol. 30, No. 8, P. 844-845.

57. Homchaudhuri L., Swaminathan R. Near Ultraviolet Absorption Arising from Lysine Residues in Close Proximity: A Probe to Monitor Protein Unfolding and Aggregation in Lysine-Rich Proteins//Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2004, Vol. 77, No. 4, P. 765-769.

58. Prasad S., Mandal I., Singh S., Paul A., Mandal B., Venkatramani R., Swaminathan R. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein//Chemical Science, 2017, Vol. 8, No. 8, P. 5416-5433.

59. Mandal I., Paul S., Venkatramani R. Optical backbone-sidechain charge transfer transitions in proteins sensitive to secondary structure and modifications//Faraday Discussions, 2018, Vol. 207, No. 0, P. 115-135.

60. Kumar A., Ahari D., Priyadarshi A., Ziauddin Ansari Mohd., Swaminathan R. Weak Intrinsic Luminescence in Monomeric Proteins Arising from Charge Recombination//The Journal of Physical Chemistry B, 2020, Vol. 124, No. 14, P. 2731-2746.

61. Thorpe S.R., Baynes J.W. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives//Amino Acids, 2003, Vol. 25, No. 3, P. 275-281.

62. Komura T., Yamanaka M., Nishimura K., Hara K., Nishikawa Y. Autofluorescence as a noninvasive biomarker of senescence and advanced glycation end products in *Caenorhabditis elegans*//npj Aging and Mechanisms of Disease, 2021, Vol. 7, No. 1, P. 12.

63. Ammanath G., Delachi C.G., Karabacak S., Ali Y., Boehm B.O., Yildiz U.H., Alagappan P., Liedberg B. Colorimetric and Fluorometric Profiling of Advanced Glycation End Products//ACS Applied Materials & Interfaces, 2022, Vol. 14, No. 1, P. 94-103.
64. Monnier V.M., Sun W., Gao X., Sell D.R., Cleary P.A., Lachin J.M., Genuth S., The DCCT/EDIC Research Group Skin collagen advanced glycation endproducts (AGEs) and the long-term progression of sub-clinical cardiovascular disease in type 1 diabetes//Cardiovascular Diabetology, 2015, Vol. 14, No. 1, P. 118.
65. Fukushima S., Shimizu M., Miura J., Matsuda Y., Kubo M., Hashimoto M., Aoki T., Takeshige F., Araki T. Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin//Biomedical Optics Express, 2015, Vol. 6, No. 5, P. 1844-1856.
66. Fujimori E. Blue fluorescence and crosslinking of photooxidized proteins//FEBS Letters, 1981, Vol. 135, No. 2, P. 257-260.
67. Fricano A., Librizzi F., Rao E., Alfano C., Vetri V. Blue autofluorescence in protein aggregates “lighted on” by UV induced oxidation//Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2019, Vol. 1867, No. 11, P. 140258.
68. Cao W., Zhou X., McCallum N.C., Hu Z., Ni Q.Z., Kapoor U., Heil C.M., Cay K.S., Zand T., Mantanona A.J., Jayaraman A., Dhinojwala A., Deheyn D.D., Shawkey M.D., Burkart M.D., Rinehart J.D., Gianneschi N.C. Unraveling the Structure and Function of Melanin through Synthesis//Journal of the American Chemical Society, 2021, Vol. 143, No. 7, P. 2622-2637.
69. Herrling T., Jung K., Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair//Selected papers from the 10th EMARDIS Meeting, 2008, Vol. 69, No. 5, P. 1429-1435.
70. Meredith P., Riesz J. Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin¶//Photochemistry and Photobiology, 2004, Vol. 79, No. 2, P. 211-216.
71. Metreveli N.O., Jariashvili K.K., Namicheishvili L.O., Svintradze D.V., Chikvaidze E.N., Sionkowska A., Skopinska J. UV–vis and FT-IR spectra of ultraviolet irradiated collagen in the presence of antioxidant ascorbic acid//Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, Vol. 73, No. 3, P. 448-455.
72. Verzijl N., DeGroot J., Bank R.A., Bayliss M.T., Bijlsma J.W.J., Lafeber F.P.J.G., Maroudas A., TeKoppele J.M. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels

as a quantitative measure of protein turnover//Matrix Biology, 2001, Vol. 20, No. 7, P. 409-417.

73. Kida Y., Saito M., Shinohara A., Soshi S., Marumo K. Non-invasive skin autofluorescence, blood and urine assays of the advanced glycation end product (AGE) pentosidine as an indirect indicator of AGE content in human bone//BMC Musculoskeletal Disorders, 2019, Vol. 20, No. 1, P. 627.

74. Niyangoda C., Miti T., Breydo L., Uversky V., Muschol M. Carbonyl-based blue autofluorescence of proteins and amino acids//PLOS ONE, 2017, Vol. 12, No. 5, P. e0176983.

75. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A. Fluorescence emission and excitation spectra of fluorophores of lipofuscin granules isolated from retinal pigment epithelium of human cadaver eyes//Russian Chemical Bulletin, 2010, Vol. 59, No. 1, P. 276-283.

76. Watt A.A.R., Bothma J.P., Meredith P. The supramolecular structure of melanin//Soft Matter, 2009, Vol. 5, No. 19, P. 3754-3760.

77. Galvão D.S., Caldas M.J. Polymerization of 5,6-indolequinone: A view into the band structure of melanins//The Journal of Chemical Physics, 1988, Vol. 88, No. 6, P. 4088-4091.

78. Kaxiras E., Tsolakidis A., Zonios G., Meng S. Structural Model of Eumelanin//Physical Review Letters, 2006, Vol. 97, No. 21, P. 218102.

79. Meng S., Kaxiras E. Theoretical Models of Eumelanin Protomolecules and their Optical Properties//Biophysical Journal, 2008, Vol. 94, No. 6, P. 2095-2105.

80. Wang J., Blancafort L. Stability and Optical Absorption of a Comprehensive Virtual Library of Minimal Eumelanin Oligomer Models**//Angewandte Chemie International Edition, 2021, Vol. 60, No. 34, P. 18800-18809.

81. Köhler A., Bässler H. Electronic processes in organic semiconductors: An introduction. – John Wiley & Sons, 2015.

82. Warren S.C., Margineanu A., Alibhai D., Kelly D.J., Talbot C., Alexandrov Y., Munro I., Katan M., Dunsby C., French P.M. Rapid global fitting of large fluorescence lifetime imaging microscopy datasets//PLoS One, 2013, Vol. 8, No. 8, P. e70687.

83. Ju K.-Y., Degan S., Fischer M.C., Zhou K.C., Jia X., Yu J., Warren W.S. Unraveling the molecular nature of melanin changes in metastatic cancer//Journal of biomedical optics, 2019, Vol. 24, No. 5, P. 051414.
84. Ju K.-Y., Fischer M.C., Warren W.S. Understanding the Role of Aggregation in the Broad Absorption Bands of Eumelanin//ACS Nano, 2018, Vol. 12, No. 12, P. 12050-12061.
85. Thompson A., Robles F.E., Wilson J.W., Deb S., Calderbank R., Warren W.S. Dual-wavelength pump-probe microscopy analysis of melanin composition//Scientific Reports, 2016, Vol. 6, No. 1, P. 36871.
86. Chen C.-T., Ball V., de Almeida Gracio J.J., Singh M.K., Toniazzo V., Ruch D., Buehler M.J. Self-Assembly of Tetramers of 5,6-Dihydroxyindole Explains the Primary Physical Properties of Eumelanin: Experiment, Simulation, and Design//ACS Nano, 2013, Vol. 7, No. 2, P. 1524-1532.
87. Stark K.B., Gallas J.M., Zajac G.W., Golab J.T., Gidanian S., McIntire T., Farmer P.J. Effect of Stacking and Redox State on Optical Absorption Spectra of Melanins—Comparison of Theoretical and Experimental Results//The Journal of Physical Chemistry B, 2005, Vol. 109, No. 5, P. 1970-1977.
88. Träg J., Duchstein P., Hennemann M., Clark T., Guldi D.M., Zahn D. Size-Dependent Local Ordering in Melanin Aggregates and Its Implication on Optical Properties//The Journal of Physical Chemistry A, 2019, Vol. 123, No. 43, P. 9403-9412.
89. Prampolini G., Cacelli I., Ferretti A. Intermolecular interactions in eumelanins: a computational bottom-up approach. I. small building blocks//RSC Advances, 2015, Vol. 5, No. 48, P. 38513-38526.
90. Kostetskyi A.O., Piryatynski Yu.P., Verbitsky A.B., Lutsyk P.M., Rozhin A. Time-resolved photoluminescence study of excited states in nanostructured melanin//Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2020, Vol. 697, No. 1, P. 31-48.
91. Grieco C., Kohl F.R., Hanes A.T., Kohler B. Probing the heterogeneous structure of eumelanin using ultrafast vibrational fingerprinting//Nature Communications, 2020, Vol. 11, No. 1, P. 4569.
92. Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids//Journal of Lipid Research, 2010, Vol. 51, No. 2, P. 247-261.
93. Yakovleva M.A., Radchenko A.Sh., Feldman T.B., Kostyukov A.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. Fluorescence characteristics of

lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium//Photochemical & Photobiological Sciences, 2020, Vol. 19, No. 7, P. 920-930.

94. Lamb L.E., Simon J.D. A2E: A Component of Ocular Lipofuscin¶//Photochemistry and Photobiology, 2004, Vol. 79, No. 2, P. 127-136.

95. Ablonczy Z., Higbee D., Anderson D.M., Dahrouj M., Grey A.C., Gutierrez D., Koutalos Y., Schey K.L., Hanneken A., Crouch R.K. Lack of Correlation Between the Spatial Distribution of A2E and Lipofuscin Fluorescence in the Human Retinal Pigment Epithelium//Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2013, Vol. 54, No. 8, P. 5535-5542.

96. Jong K.H., Azar Y.T., Grisanti L., Stephens A.D., Jones S.T.E., Credginton D., Kaminski Schierle G.S., Hassanali A. Low energy optical excitations as an indicator of structural changes initiated at the termini of amyloid proteins//Physical Chemistry Chemical Physics, 2019, Vol. 21, No. 43, P. 23931-23942.

97. Grisanti L., Pinotsi D., Gebauer R., Kaminski Schierle G.S., Hassanali A.A. A computational study on how structure influences the optical properties in model crystal structures of amyloid fibrils//Physical Chemistry Chemical Physics, 2017, Vol. 19, No. 5, P. 4030-4040.

98. Stephens A.D., Qaisrani M.N., Ruggiero M.T., Díaz Mirón G., Morzan U.N., González Lebrero M.C., Jones S.T.E., Poli E., Bond A.D., Woodhams P.J., Kleist E.M., Grisanti L., Gebauer R., Zeitler J.A., Credginton D., Hassanali A., Kaminski Schierle G.S. Short hydrogen bonds enhance nonaromatic protein-related fluorescence//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021, Vol. 118, No. 21, P. e2020389118.

99. Ames J.M. The maillard reaction//Biochemistry of food proteins. – Springer, 1992. – P. 99-153.

100. Lapolla A., Fedele D., Martano L., Arico' N.C., Garbeglio M., Traldi P., Seraglia R., Favretto D. Advanced glycation end products: a highly complex set of biologically relevant compounds detected by mass spectrometry//Journal of Mass Spectrometry, 2001, Vol. 36, No. 4, P. 370-378.

101. Saito M., Marumo K., Fujii K., Ishioka N. Single-Column High-Performance Liquid Chromatographic–Fluorescence Detection of Immature, Mature, and Senescent Cross-Links of Collagen//Analytical Biochemistry, 1997, Vol. 253, No. 1, P. 26-32.

102. Ahmed N., Thornalley P.J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?//Diabetes, Obesity and Metabolism, 2007, Vol. 9, No. 3, P. 233-245.

103. Rondeau P., Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts//*Biochimie*, 2011, Vol. 93, No. 4, P. 645-658.
104. Meloun B., Morávek L., Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin//*FEBS Letters*, 1975, Vol. 58, No. 1-2, P. 134-137.
105. Ajandouz E.H., Puigserver A. Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics//*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, Vol. 47, No. 5, P. 1786-1793.
106. Davis K.B., Zhang Z., Karpova E.A., Zhang J. Application of tyrosine-tryptophan fluorescence resonance energy transfer in monitoring protein size changes//*Analytical Biochemistry*, 2018, Vol. 557, P. 142-150.
107. Li D., Na X., Wang H., Xie Y., Cong S., Song Y., Xu X., Zhu B.-W., Tan M. Fluorescent Carbon Dots Derived from Maillard Reaction Products: Their Properties, Biodistribution, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity//*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, Vol. 66, No. 6, P. 1569-1575.
108. Zuo P., Lu X., Sun Z., Guo Y., He H. A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots//*Microchimica Acta*, 2016, Vol. 183, No. 2, P. 519-542.
109. Essner J.B., Kist J.A., Polo-Parada L., Baker G.A. Artifacts and Errors Associated with the Ubiquitous Presence of Fluorescent Impurities in Carbon Nanodots//*Chemistry of Materials*, 2018, Vol. 30, No. 6, P. 1878-1887.
110. Xiong Y., Schneider J., Ushakova E.V., Rogach A.L. Influence of molecular fluorophores on the research field of chemically synthesized carbon dots//*Nano Today*, 2018, Vol. 23, P. 124-139.
111. Zhu S., Wang L., Li B., Song Y., Zhao X., Zhang G., Zhang S., Lu S., Zhang J., Wang H., Sun H., Yang B. Investigation of photoluminescence mechanism of graphene quantum dots and evaluation of their assembly into polymer dots//*Carbon*, 2014, Vol. 77, P. 462-472.
112. Sciortino A., Cayuela A., Soriano M.L., Gelardi F.M., Cannas M., Valcárcel M., Messina F. Different natures of surface electronic transitions of carbon nanoparticles//*Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, Vol. 19, No. 34, P. 22670-22677.

113. Bourlinos A.B., Stassinopoulos A., Anglos D., Zboril R., Karakassides M., Giannelis E.P. Surface functionalized carbogenic quantum dots//*Small*, 2008, Vol. 4, No. 4, P. 455-458.
114. Park Y., Yoo J., Lim B., Kwon W., Rhee S.-W. Improving the functionality of carbon nanodots: doping and surface functionalization//*Journal of Materials Chemistry A*, 2016, Vol. 4, No. 30, P. 11582-11603.
115. Yan F., Jiang Y., Sun X., Bai Z., Zhang Y., Zhou X. Surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review//*Microchimica Acta*, 2018, Vol. 185, No. 9, P. 424.
116. Malyukin Y., Viagin O., Maksimchuk P., Dekaliuk M., Demchenko A. Insight into the mechanism of the photoluminescence of carbon nanoparticles derived from cryogenic studies//*Nanoscale*, 2018, Vol. 10, No. 19, P. 9320-9328.
117. Zhang M., Bai L., Shang W., Xie W., Ma H., Fu Y., Fang D., Sun H., Fan L., Han M., Liu C., Yang S. Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells//*Journal of Materials Chemistry*, 2012, Vol. 22, No. 15, P. 7461-7467.
118. Dong Y., Shao J., Chen C., Li H., Wang R., Chi Y., Lin X., Chen G. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid//*Carbon*, 2012, Vol. 50, No. 12, P. 4738-4743.
119. van Dam B., Nie H., Ju B., Marino E., Paulusse J.M.J., Schall P., Li M., Dohnalová K. Excitation-Dependent Photoluminescence from Single-Carbon Dots//*Small*, 2017, Vol. 13, No. 48, P. 1702098.
120. Zhang T., Zhu J., Zhai Y., Wang H., Bai X., Dong B., Wang H., Song H. A novel mechanism for red emission carbon dots: hydrogen bond dominated molecular states emission//*Nanoscale*, 2017, Vol. 9, No. 35, P. 13042-13051.
121. Reckmeier C.J., Wang Y., Zboril R., Rogach A.L. Influence of Doping and Temperature on Solvatochromic Shifts in Optical Spectra of Carbon Dots//*The Journal of Physical Chemistry C*, 2016, Vol. 120, No. 19, P. 10591-10604.
122. Tetsuka H., Nagoya A., Asahi R. Highly luminescent flexible amino-functionalized graphene quantum dots@cellulose nanofiber–clay hybrids for white-light emitting diodes//*Journal of Materials Chemistry C*, 2015, Vol. 3, No. 15, P. 3536-3541.
123. Shang J., Ma L., Li J., Ai W., Yu T., Gurzadyan G.G. The Origin of Fluorescence from Graphene Oxide//*Scientific Reports*, 2012, Vol. 2, No. 1, P. 792.

124. Xiao L., Wang Y., Huang Y., Wong T., Sun H. Self-trapped exciton emission from carbon dots investigated by polarization anisotropy of photoluminescence and photoexcitation//*Nanoscale*, 2017, Vol. 9, No. 34, P. 12637-12646.
125. Zonios G., Bykowski J., Kollias N. Skin Melanin, Hemoglobin, and Light Scattering Properties can be Quantitatively Assessed In Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy//*Journal of Investigative Dermatology*, 2001, Vol. 117, No. 6, P. 1452-1457.
126. Yudovsky D., Pilon L. Rapid and accurate estimation of blood saturation, melanin content, and epidermis thickness from spectral diffuse reflectance//*Applied Optics*, 2010, Vol. 49, No. 10, P. 1707-1719.
127. Galanzha Ekaterina I., Menyayev Yulian A., Yadem Aayire C., Sarimollaoglu Mustafa, Juratli Mazen A., Nedosekin Dmitry A., Foster Stephen R., Jamshidi-Parsian Azemat, Siegel Eric R., Makhoul Issam, Hutchins Laura F., Suen James Y., Zharov Vladimir P. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma//*Science Translational Medicine*, 2019, Vol. 11, No. 496, P. eaat5857.
128. Huang Z., Zeng H., Hamzavi I., Alajlan A., Tan E., McLean D.I., Lui H. Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation//*Journal of biomedical optics*, 2006, Vol. 11, No. 3, P. 034010.
129. Hamzavi I., Shiff N., Martinka M., Huang Z., McLean D., Zeng H., Lui H. Spectroscopic assessment of dermal melanin using blue vitiligo as an in vivo model//*Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 2006, Vol. 22, No. 1, P. 46-51.
130. Purushothuman S., Marotte L., Stowe S., Johnstone D.M., Stone J. The Response of Cerebral Cortex to Haemorrhagic Damage: Experimental Evidence from a Penetrating Injury Model//*PLOS ONE*, 2013, Vol. 8, No. 3, P. e59740.
131. Gao Y., Liu Q., Xu L., Zheng N., He X., Xu F. Imaging and Spectral Characteristics of Amyloid Plaque Autofluorescence in Brain Slices from the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease//*Neuroscience Bulletin*, 2019, Vol. 35, No. 6, P. 1126-1137.
132. Johansson P.K., Koelsch P. Label-free imaging of amyloids using their intrinsic linear and nonlinear optical properties//*Biomedical Optics Express*, 2017, Vol. 8, No. 2, P. 743-756.
133. van Dam A., Schwarz J.C.V., de Vos J., Siebes M., Sijen T., van Leeuwen T.G., Aalders M.C.G., Lambrechts S.A.G. Oxidation Monitoring by Fluorescence Spectroscopy

Reveals the Age of Fingermarks//*Angewandte Chemie International Edition*, 2014, Vol. 53, No. 24, P. 6272-6275.

134. Bergholt M.S., Zheng W., Lin K., Ho K.Y., Teh M., Yeoh K.G., So J.B.Y., Huang Z. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer//*Biosensors and Bioelectronics*, 2011, Vol. 26, No. 10, P. 4104-4110.

135. De Leeuw F., Breuskin I., Abbaci M., Casiraghi O., Mirghani H., Ben Lakhdar A., Laplace-Builhé C., Hartl D. Intraoperative Near-infrared Imaging for Parathyroid Gland Identification by Auto-fluorescence: A Feasibility Study//*World Journal of Surgery*, 2016, Vol. 40, No. 9, P. 2131-2138.

136. Hofmann B., Gerull K.A., Bloch K., Riemer M., Erbs C., Fröhlich A., Richter S., Ehrhardt M., Zitterbart C., Bartel F.F., Siegel P., Wienke A., Silber R.-E., Simm A. It's all in our skin—Skin autofluorescence—A promising outcome predictor in cardiac surgery: A single centre cohort study//*PLOS ONE*, 2020, Vol. 15, No. 6, P. e0234847.

137. Anker P., Fésűs L., Kiss N., Noll J., Becker K., Kuroli E., Mayer B., Bozsányi S., Lőrincz K., Lihacova I., Lihachev A., Lange M., Wikonkál N., Medvecz M. Visualization of Keratin with Diffuse Reflectance and Autofluorescence Imaging and Nonlinear Optical Microscopy in a Rare Keratinopathic Ichthyosis//*Sensors*, 2021, Vol. 21, No. 4.

138. Pincus Z., Mazer T.C., Slack F.J. Autofluorescence as a measure of senescence in *C. elegans*: look to red, not blue or green//*Aging*, 2016, Vol. 8, No. 5, P. 889-898.

139. Surre J., Saint-Ruf C., Collin V., Orenga S., Ramjeet M., Matic I. Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival//*Scientific Reports*, 2018, Vol. 8, No. 1, P. 12088.

140. Bellmaine S., Schnellbaecher A., Zimmer A. Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins//*Free Radical Biology and Medicine*, 2020, Vol. 160, P. 696-718.

141. Davies M.J., Truscott R.J.W. Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis//*Consequences of exposure to sunlight: elements to assess protection*, 2001, Vol. 63, No. 1, P. 114-125.

142. Guo X., Chen S., Hu Y., Li G., Liao N., Ye X., Liu D., Xue C. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity//*Journal of Food Science and Technology*, 2014, Vol. 51, No. 12, P. 3680-3690.

143. Takagi Y., Kashiwagi A., Tanaka Y., Asahina T., Kikkawa R., Shigeta Y. Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product//Journal of Diabetes and its Complications, 1995, Vol. 9, No. 2, P. 87-91.
144. Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. Advanced glycation end-products: a review//Diabetologia, 2001, Vol. 44, No. 2, P. 129-146.
145. Wang T., Zeng L.-H., Li D.-L. A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum//Applied Spectroscopy Reviews, 2017, Vol. 52, No. 10, P. 883-908.
146. Zhrebker A., Yakimov B., Rubekina A., Kharybin O., Fedoros E.I., Perminova I.V., Shirshin E., Nikolaev E.N. Photoreactivity of humic-like polyphenol material under irradiation with different wavelengths explored by FTICR MS and deuteromethylation//European Journal of Mass Spectrometry, 2020, Vol. 26, No. 4, P. 292-300.
147. Kuznetsova I.M., Sulatskaya A.I., Maskevich A.A., Uversky V.N., Turoverov K.K. High Fluorescence Anisotropy of Thioflavin T in Aqueous Solution Resulting from Its Molecular Rotor Nature//Analytical Chemistry, 2016, Vol. 88, No. 1, P. 718-724.
148. Fišerová E., Kubala M. Mean fluorescence lifetime and its error//Journal of Luminescence, 2012, Vol. 132, No. 8, P. 2059-2064.
149. Filipe V., Poole R., Kutscher M., Forier K., Braeckmans K., Jiskoot W. Fluorescence Single Particle Tracking for the Characterization of Submicron Protein Aggregates in Biological Fluids and Complex Formulations//Pharmaceutical Research, 2011, Vol. 28, No. 5, P. 1112-1120.
150. Bohren C.F., Huffman D.R. Absorption and scattering of light by small particles. – John Wiley & Sons, 2008.
151. Hwang I., Scholes G.D. Electronic Energy Transfer and Quantum-Coherence in π -Conjugated Polymers//Chemistry of Materials, 2011, Vol. 23, No. 3, P. 610-620.
152. Fedunov R.G., Yermolenko I.P., Nazarov A.E., Ivanov A.I., Rosspeintner A., Angulo G. Theory of fluorescence spectrum dynamics and its application to determining the relaxation characteristics of the solvent and intramolecular vibrations//Journal of Molecular Liquids, 2020, Vol. 298, P. 112016.
153. Reichardt C., Welton T. Solvents and solvent effects in organic chemistry. – John Wiley & Sons, 2010.

154. Dąbrowska A.K., Spano F., Derler S., Adlhart C., Spencer N.D., Rossi R.M. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors//*Skin Research and Technology*, 2018, Vol. 24, No. 2, P. 165-174.
155. Verdier-Sévrain S., Bonté F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms//*Journal of Cosmetic Dermatology*, 2007, Vol. 6, No. 2, P. 75-82.
156. Schmitt T., Neubert R.H.H. State of the Art in Stratum Corneum Research. Part II: Hypothetical Stratum Corneum Lipid Matrix Models//*Skin Pharmacology and Physiology*, 2020, Vol. 33, No. 4, P. 213-230.
157. Rawlings A.V., Harding C.R. Moisturization and skin barrier function//*Dermatologic Therapy*, 2004, Vol. 17, No. s1, P. 43-48.
158. Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrest B.A., Paller A.S., Leffell D.J., Wolff K. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8e//McGrawHill Medical, 2012, P. 2421-2429.
159. Dornelles S., Goldim J., Cestari T. Determination of the Minimal Erythema Dose and Colorimetric Measurements as Indicators of Skin Sensitivity to UV-B Radiation//*Photochemistry and Photobiology*, 2004, Vol. 79, No. 6, P. 540-544.
160. Liu L., Xie H., Chen X., Shi W., Xiao X., Lei D., Li J. Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress//*Clinical and Experimental Dermatology*, 2012, Vol. 37, No. 7, P. 772-780.
161. Macey M.G., Macey M.G. Flow cytometry. – Springer, 2007.
162. Maurus S., Plant C. Skinny-dip: clustering in a sea of noise//*Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining.* – 2016. – P. 1055-1064.
163. Flors C., Fryer M.J., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineaux P.M., Nonell S., Wilson M.T., Baker N.R. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green®//*Journal of Experimental Botany*, 2006, Vol. 57, No. 8, P. 1725-1734.
164. 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, Vol. 179, No. 5, P. 1115-1126.

165. Saha A., Arora R., Yakovlev V.V., Burke J.M. Raman microspectroscopy of melanosomes: the effect of long term light irradiation//Journal of biophotonics, 2011, Vol. 4, No. 11-12, P. 805-813.
166. Caspers P.J., Bruining H.A., Puppels G.J., Lucassen G.W., Carter E.A. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles//Journal of Investigative Dermatology, 2001, Vol. 116, No. 3, P. 434-442.
167. Carey C., Boucher T., Mahadevan S., Bartholomew P., Dyar M.D. Machine learning tools for mineral recognition and classification from Raman spectroscopy//Journal of Raman Spectroscopy, 2015, Vol. 46, No. 10, P. 894-903.