

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

---

**ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*На правах рукописи*

**Ширшин Евгений Александрович**

**ОПТИКА ЭНДОГЕННЫХ ФЛУОРОФОРОВ:  
ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ И ПРИМЕНЕНИЕ  
ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Специальность:

1.3.6. Оптика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени

доктора физико-математических наук

Научный консультант:  
д.ф.-м.н., профессор  
Фадеев Виктор Владимирович

Москва – 2023

<b>Оглавление</b>	
<b>Список сокращений и условных обозначений</b>	<b>8</b>
<b>Введение</b>	<b>10</b>
<b>Глава 1. Современное состояние науки в области фотофизики и диагностики</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Оптический эндогенный контраст: молекулярная специфичность</b>	<b>22</b>
1.1.1 Эндогенный контраст, основанный на колебательных спектрах молекул	23
1.1.1.1 Спектроскопия спонтанного комбинационного рассеяния	23
1.1.1.2 Спектроскопия в ближнем ИК и среднем ИК диапазонах	26
1.1.2 Эндогенный контраст, основанный на свойствах электронных переходов молекул	28
<b>1.2 Биомедицинская диагностика с использованием оптического эндогенного контраста</b>	<b>30</b>
1.2.1 Методы и технологии биомедицинской диагностики, использующие в качестве эндогенного контраста гемоглобин	31
<b>1.3 Эндогенные флуорофоры и хромофоры в организме человека: локализация, фотофизические свойства и применения в биофотонике</b>	<b>34</b>
1.3.1 УФ-хромофоры и флуорофоры: ароматические молекулы	34
1.3.1.1 Ароматические аминокислоты и белковые молекулы	34
1.3.1.2 Фотофизические процессы в триптофане, обуславливающие вариабельность его оптических свойств в белках	36
1.3.1.3 Оптические свойства ДНК и РНК	36
1.3.2 Структурные белки: флуоресценция сшивок и модификации ароматических молекул	38
1.3.3 «Классические» эндогенные флуорофоры в видимой области спектра: НАД(Ф)Н и флавины	41
1.3.3.1 Фотофизические процессы в НАД(Ф)Н	41
1.3.3.2 Фотофизические процессы в ФАД и ФМН	44
1.3.4 Каротиноиды	45
1.3.5 Тетрапирролы как основа некоторых эндогенных флуорофоров	48
1.3.5.1 Порфирины	48
1.3.5.2 Гем и продукты его деградации	50
1.3.5.3 Билирубин	52
1.3.6 Меланин	55
1.3.7 Эндогенные флуорофоры в красном и ближнем ИК спектральных диапазонах	56

<b>Глава 2. Эндогенные флуорофоры в УФ диапазоне: собственная флуоресценция белков.....</b>	<b>60</b>
<b>2.1 Введение и постановка задачи .....</b>	<b>60</b>
<b>2.2 Использование УФ флуоресценции белковых макромолекул для исследования межмолекулярных взаимодействий .....</b>	<b>61</b>
2.2.1 Определение константы комплексообразования с использованием собственной флуоресценции белков .....	61
2.2.2 Ограничения метода тушения флуоресценции для определения константы комплексообразования .....	63
2.2.3 Неприменимость модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения числа сайтов связывания .....	67
2.2.4 Метод анализа числа сайтов связывания в системе по данным тушения флуоресценции .....	72
<b>2.3 Анализ флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан-содержащих белках</b>	<b>76</b>
2.3.1 Тирозиновая флуоресценция как индикатор конформационных изменений белков .....	76
2.3.2 Взаимодействие альбумина с детергентом ДСН: анализ флуоресценции Туг .....	77
2.3.3 Механизмы усиления флуоресценции Туг при конформационных изменениях альбумина .....	82
2.3.4 Флуоресценция Туг как индикатор конформационных изменений альбумина под действием денатурирующих агентов .....	84
<b>Выводы .....</b>	<b>87</b>
<b>Глава 3. Эндогенная флуоресценция белков и пептидов в видимой области спектра</b>	<b>89</b>
<b>3.1. Собственная флуоресценция белков в видимой области спектра.....</b>	<b>89</b>
<b>3.2. Эффект агрегационно-индуцированной флуоресценции белков и аминокислот: феномен и его возможные механизмы .....</b>	<b>91</b>
<b>3.3 Возможность влияния экзогенных зондов на кинетику самосборки пептидов и свойства образующихся структур .....</b>	<b>93</b>
3.3.1 Флуоресцентный зонд тиофлавин Т и его влияние на кинетику самосборки пептида Fmoc-FF.....	93
3.3.2 Влияние ThT на морфологию и механические свойства фибриллярных структур .	98
<b>3.4 Применение ВЭФБ для визуализации амилоидных фибрилл .....</b>	<b>102</b>
<b>3.5 Исследование кинетики фибриллообразования с использованием ВЭФБ.....</b>	<b>108</b>
3.5.1 Оптические методы в исследовании кинетики агрегации белков .....	108
3.5.2 Проявление фибрилообразования в изменениях оптических свойств системы.....	109
3.5.3 Спектральные свойства ВЭФБ в различных модельных системах .....	112
<b>3.6 Гипотеза о роли окислительных процессов в формировании эндогенной флуоресценции биомолекул и клеток.....</b>	<b>116</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>120</b>

<b>Глава 4. Механизмы формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров</b> .....	<b>122</b>
<b>4.1 Введение и постановка задачи</b> .....	<b>122</b>
<b>4.2 Исследование механизма формирования оптических свойств ГСФ, формируемых «снизу вверх»</b> .....	<b>124</b>
4.2.1 Объекты и методы исследования .....	124
4.2.1.1. Приготовление образцов.....	124
4.2.1.2 Исследование молекулярного состава методом масс-спектрометрии .....	126
4.2.2 Спектральные свойства ГСФ, полученных подходом «снизу вверх» .....	126
4.2.3 Эволюция молекулярного состава ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх» .....	129
4.2.4. Кинетика релаксации ГСФ, полученных методом «снизу вверх» .....	130
4.2.5 Механизмы формирования кинетики релаксации ГСФ, полученных методом «снизу вверх» .....	133
Выводы по разделу .....	139
<b>4.3 Оптические свойства природных гетерогенных систем флуорофоров: природное органическое вещество</b> .....	<b>141</b>
4.3.1 Природное органическое вещество как ГСФ .....	141
4.3.2. Объекты и методы исследования .....	142
4.3.3 Стационарные оптические свойства систем ПОВ. Их связь с моделью невзаимодействующих флуорофоров .....	144
4.3.3.1 Спектральные свойства ПОВ .....	144
4.3.3.2 Описание флуоресценции ПОВ моделью усреднения вкладов компонент: феноменологический подход .....	147
4.3.4 Параметры кинетики затухания флуоресценции ПОВ на временах от 100 фс до 10 нс.....	149
4.3.5 Связь параметров пикосекундной релаксации возбужденного состояния с молекулярным составом ПОВ .....	152
4.3.6 Механизмы формирования оптических свойств ПОВ .....	153
<b>Выводы</b> .....	<b>158</b>
<b>Глава 5. Эндогенная флуоресценция в анализе биожидкостей</b> .....	<b>160</b>
<b>5.1 Введение и постановка задачи</b> .....	<b>160</b>
<b>5.2 Стационарная флуоресценция плазмы крови: механизмы формирования, вариабельность параметров, диагностические возможности</b> .....	<b>163</b>
5.2.1 Объекты и методы исследований .....	163
5.2.2 Триптофановая флуоресценция белков плазмы крови .....	165
5.2.3 Тирозиновая флуоресценция белков плазмы крови .....	168



5.2.4	Флуоресценция плазмы крови в видимой области спектра: роль белков и их химических модификаций .....	169
5.2.4.1	Оценка вклада НАДН в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра.....	171
5.2.4.2	Оценка вклада билирубина в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра.....	172
5.2.4.3	Оценка вклада ГСФ, связанных с пост-трансляционными модификациями белков, в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра	177
5.2.5	Классификационный анализ данных по флуоресценции плазмы крови .....	180
	Выводы.....	182
<b>Глава 6. Исследование капилляров кожи и перикапиллярной области методом ДФТ-FLIM.....</b>		<b>185</b>
<b>6.1</b>	<b>Введение и постановка задачи .....</b>	<b>185</b>
<b>6.2</b>	<b>Визуализация микрососудов в дерме методом ДФТ-FLIM.....</b>	<b>188</b>
6.2.1	Основы метода двухфотонной микроскопии .....	188
6.2.2	Метод визуализации параметров затухания флуоресценции FLIM .....	190
6.2.3	Метод ДФТ-FLIM в исследовании кожи .....	192
6.2.4	Визуализация микрососудов в дерме методом ДФТ-FLIM: эндогенный контраст .....	192
6.2.4.1	Оптическая визуализация капилляров .....	192
6.2.4.2	Объекты и методы исследования.....	193
6.2.4.3	Визуализация капилляров в дерме методами КЛСМ и ДФТ-FLIM .....	194
<b>6.3</b>	<b>Двухфотонная флуоресценция компонентов крови .....</b>	<b>197</b>
6.3.1	Кинетика затухания эндогенной флуоресценции эритроцитов .....	197
6.3.2	Кинетика затухания эндогенной флуоресценции лейкоцитов .....	198
6.3.2.1	Объекты и методы исследования.....	198
6.3.2.2	Параметры затухания флуоресценции клеток крови .....	199
<b>6.4</b>	<b>Механизм формирования флуоресценции эритроцитов: образование фотопродуктов при облучении гемоглобина .....</b>	<b>201</b>
6.4.1	Объекты и методы исследования .....	201
6.4.2	Механизм эндогенной флуоресценции эритроцитов .....	202
<b>6.5</b>	<b>Метод ДФТ-FLIM для анализа периваскулярной зоны и диагностика отечного синдрома оптическими методами .....</b>	<b>207</b>
6.5.1	Размер ПЗ как индикатор степени тяжести сердечной недостаточности .....	208
6.5.1.1	Группы пациентов, участвовавшие в исследовании .....	208

6.5.1.2 Размер ПЗ как индикатор степени тяжести ХСН .....	209
6.5.2 Природа периваскулярной зоны: гипотезы и анализ методом ДФТ-FLIM .....	211
6.5.3 Анализ степени отека и транскапиллярной диффузии оптическими методами .....	214
<b>Выводы .....</b>	<b>215</b>
<b>Глава 7. Метод FLIM в визуализации и анализе компонентов кожи <i>in vivo</i> .....</b>	<b>217</b>
<b>7.1. Введение и постановка задачи .....</b>	<b>217</b>
<b>7.2. Локализация молекулярных компонент в дерме <i>in vivo</i> с использованием параметров релаксации флуоресценции .....</b>	<b>218</b>
7.2.1 Оптическая спектроскопия компонентов внеклеточного матрикса .....	218
7.2.2 Анализ коллагенов и эластина в дерме методом ДФТ .....	220
<b>7.3. Анализ метаболической гетерогенности клеток методом FLIM – поиск клеточных субпопуляций .....</b>	<b>224</b>
7.3.1 FLIM НАД(Ф)Н в анализе метаболического состояния клеток .....	224
7.3.2 Постановка задачи детектирования метаболически различающихся субпопуляций клеток .....	225
7.3.3 Моделирование данных FLIM для оценки возможностей выделения субпопуляций клеток .....	226
7.3.4 Сравнительный анализ методов обработки FLIM для оценки возможностей выделения субпопуляций клеток .....	231
<b>7.4. ДФТ-FLIM для визуализации и анализа макрофагов <i>in vitro</i> и в коже <i>in vivo</i> .....</b>	<b>237</b>
7.4.1 Основные свойства макрофагов в дерме .....	237
7.4.2 Возможности анализа свойств макрофагов методом FLIM: литературные данные .....	239
7.4.3 Анализ распределения параметров затухания флуоресценции макрофагов <i>in vitro</i> .....	240
7.4.4 Визуализация M1 и M2 макрофагов в коже человека <i>ex vivo</i> .....	244
7.4.5 Визуализация M1 и M2 макрофагов в коже человека <i>in vivo</i> .....	246
<b>7.5. Детектирование тучных клеток в коже человека <i>in vivo</i> методом ДФТ .....</b>	<b>248</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>254</b>
<b>Глава 8. Меланин как гетерогенная система флуорофоров: фотофизические процессы в ИК диапазоне, молекулярные свойства и <i>in vivo</i> визуализация .....</b>	<b>256</b>
<b>8. 1 Введение и постановка задачи .....</b>	<b>256</b>
<b>8.2 Микроспектроскопия КР меланина <i>in vivo</i>: локализация и связь КР с ИК флуоресценцией .....</b>	<b>258</b>
<b>8.3 Спектроскопия КР как метод анализа структурной организации меланина .....</b>	<b>265</b>
<b>8.4 Некоторые процедуры анализа данных микроспектроскопии КР кожи и выделения вклада меланина .....</b>	<b>267</b>
<b>8.5 Механизм двухфотонного возбуждения флуоресценции меланина .....</b>	<b>276</b>

<b>8.6 Метод микроскопии насыщения флуоресценции .....</b>	<b>283</b>
<b>Выводы .....</b>	<b>289</b>
<b>Заключение .....</b>	<b>291</b>
<b>Список публикаций по теме диссертационной работы .....</b>	<b>293</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>298</b>

## Список сокращений и условных обозначений

Ade – adenine, аденин

AGEs – advanced glycation end-products, конечные продукты гликирования

ANS – 1-анилино-8-нафталинсульфонат

CR – Congo Red, конго красный

CT – charge transfer, перенос заряда

DHB или ДГБК– 2,5-дигидроксibenзойная кислота

EtOH – этанол

FF – дипептид фенилаланина

FLIM – fluorescence lifetime imaging microscopy, визуализация времени жизни флуоресценции

Fmoc-FF – N-fluorenylmethoxycarbonyl diphenylalanine, N-флуоренилметоксикарбонил дифенилаланин

fNIRS – functional near-infrared spectroscopy, функциональная спектроскопия инфракрасного диапазона

FTIR – Фурье-спектроскопия инфракрасного диапазона

GdnHCl – гидрохлорид гуанидин

Gly – аминокислота глицина

HOMO орбиталь – highest occupied molecular orbital, высшая занятая молекулярная орбиталь

Kyn – кинуренин

LUMO орбиталь — lowest unoccupied molecular orbital, низшая незаполненная молекулярная орбиталь

NBI – narrow band imaging, узкополосная визуализация

NFK – кинуренин

OH-Kyn – гидрокси-кинуренин

Phe – phenylalanine, фенилаланин

QY – квантовый выход

ThT – тиофлавин Т

Trp – tryptophan, триптофан

Tyr – tyrosine, тирозин

АД – артериальное давление

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АФ – автофлуоресценция

БИК область – ближняя инфракрасная область

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВКР – вынужденное комбинационное рассеяние  
ВЭФБ – видимая эндогенная флуоресценция белков  
ГВГ – генерация второй гармоники  
ГК – гуминовые кислоты  
ГКР – гигантское комбинационное рассеяние  
ГСФ – гетерогенная система флуорофоров  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДОТ – диффузно–оптический томограф  
ДСН – додецилсульфат натрия  
ДСН – додецил сульфат натрия  
ДФТ – двухфотонная томография  
ЕЕМ–матрица – excitation–emission matrix, матрица регистрации фотовозбуждения и флуоресценции  
ИК область – инфракрасная область  
КАРС – когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия  
КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия  
КР – комбинационное рассеяние  
МРТ – магнитно–резонансная томография  
НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотид (никотинамидадениндинуклеотидфосфат)  
ОА – оптоакустическая или оптоакустика  
ПЗ – периваскулярная зона  
ПОВ – природное органическое вещество (natural organic matter, NOM)  
ПЦЖ – паразитовидная железа  
РНК – Рибонуклеиновая кислота  
РОВ – растворенное органическое вещество  
САЧ – сывороточный альбумин человека  
ТГц – Терагерцы  
ТК – тучные клетки  
УФ – ультрафиолет  
ФАД — флавинадениндинуклеотид  
ФК – фульвокислоты  
ХСН – хроническая сердечная недостаточность  
ЧСС – частоты сердечных сокращений  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

## Введение

### Актуальность темы диссертационной работы

Обладая рядом принципиальных преимуществ, оптические методы нашли широкое распространение в исследовании живых систем [1]. С помощью методов оптической спектроскопии и микроскопии изучаются межмолекулярные взаимодействия, процессы в клетках и биотканях, а также создаются различные сенсорные системы. В то же время использование оптической диагностики в решении задач клинической практики затруднено по двум причинам. Во-первых, глубина оптического зондирования биотканей относительно мала и варьируется от десятых долей до нескольких единиц миллиметров, в исключительных случаях достигая нескольких сантиметров. Однако данный фактор не является лимитирующим при решении широкого круга задач: исследования межмолекулярных взаимодействий и структурной динамики молекул в растворах, анализа биожидкостей, интраоперационной диагностики, неинвазивной диагностики ряда физиологических параметров.

Во-вторых, использование внешних (экзогенных) меток, часто применяемых в научных исследованиях для повышения чувствительности и специфичности оптических методов, затруднено при измерениях на людях *in vivo* и, более того, может влиять на исследуемый процесс – при том, что именно создание новых типов меток привело к прорыву в исследовании живых систем с помощью оптики [2]. Таким образом, интерес представляет использование эндогенного контраста – оптического сигнала от молекул и систем молекул, уже присутствующих в образце (клетке, биожидкости, ткани).

На настоящий момент большинство прикладных задач биомедицинской оптической диагностики – классификация тканей или определение биологически релевантного параметра – решаются статистическими методами путём исследования феноменологической связи оптического отклика с исследуемой целевой переменной, без построения физической модели и селективного выделения вкладов от эндогенных молекул-репортеров и оценки их фотофизических свойств. Так могут быть классифицированы здоровые и патологические ткани при интраоперационной диагностике, проанализированы образцы биожидкостей или классифицированы субпопуляции клеток. Однако феноменологическое использование в статистических моделях оптического отклика, заведомо несвязанного с целевой переменной, не приведёт к успешному решению диагностической задачи независимо от любых математических преобразований, проводимых с оптическими дескрипторами. Конструирование признакового описания, достаточного для успешного решения диагностической задачи, возможно с развитием

новых методов оптической спектроскопии благодаря исследованию фотофизических процессов и отбору чувствительных фотофизических параметров исследуемых систем. Так, чувствительными оказываются параметры релаксации возбужденного состояния флуорофоров на диапазоне времен от долей пикосекунд до единиц наносекунд за счёт того, что их свойства связаны с распределением электронной плотности молекул, зависящим от структуры флуорофоров и взаимодействия с локальным окружением [3]. В ряде задач чувствительными оказываются как спектральная, так и временная компонента флуоресцентного отклика, связанная с эффективностью электронного взаимодействия подсистем. Данная концепция лежит в основе мультимодальных методов, когда производится одновременное измерение различных оптических параметров системы – например, в случае многофотонной томографии, нашедшей применение в оптической биопсии, такими параметрами служат эффективность генерации оптических гармоник, спектральные параметры, время жизни и интенсивность флуоресценции [4]. Таким образом, актуальной задачей биомедицинской фотоники является фундаментальное исследование механизмов формирования оптического отклика эндогенных флуорофоров и решение обратной задачи диагностики и визуализации компонентов живых систем с использованием этого отклика.

### **Уровень проработанности исследуемых проблем**

Несмотря на то, что оптика биомолекул, клеток и тканей является предметом многолетних исследований, обращает на себя внимание парадокс: в литературе в качестве эндогенных хромофоров и флуорофоров в организме человека рассматривается список из всего лишь примерно десяти молекул. При этом для каждой «классической» молекулы-флуорофора или хромофора есть своя ниша применений в биомедицине. Так, оптический отклик гемоглобина используется в носимых устройствах, диагностике онкологических заболеваний, нейроимиджинге. На использовании сигнала флуоресценции молекулы НАДН (никотинамидадениндинуклеотид) построен оптический метаболический имиджинг, используемый в персонализированной онкологии для подбора химиотерапии.

Выявление новых эндогенных молекул-флуорофоров в организме и исследование их фотофизических свойств является центральной задачей биомедицинской фотоники. При этом для ряда случаев природа эндогенной флуоресценции является дискуссионной. К таким наблюдениям относится эндогенная флуоресценция в ближней ИК области спектра [5], флуоресценция в видимой области спектра, возникающая в результате агрегации молекул, обладающих лишь электронными переходами в УФ [6]. Более того, ряд эндогенных источников флуоресценции представляет из себя не индивидуальные

молекулы, а сложные гетерогенные смеси флуорофоров, которые, несмотря на химические и структурные различия, проявляют общность оптических свойств, механизмы формирования которых являются малоизученными.

Методы диагностики конкретных биологических систем с помощью широкого класса методов оптической спектроскопии также не проработаны с достаточной степенью детализации. Например, применение метода многофотонной томографии (МФТ), позволяющего локализовать распределение эндогенных флуорофоров с субмикронным разрешением на глубинах до нескольких сотен микрон, представлено для анализа ограниченного числа объектов *in vivo*, что связано со сложностью решения обратной задачи и селективного выделения сигнала от определенных структур. Решение двух указанных задач определило основные направления исследований в данной работе.

### **Цель и задачи работы**

Основной целью диссертационной работы является исследование фотофизических процессов в эндогенных флуорофорах, а также создание новых методов диагностики и визуализации с использованием фотофизических параметров эндогенных флуорофоров клеток и биотканей человека.

Для достижения основной цели были поставлены следующие задачи:

1. Развить оптические подходы к исследованию структурных изменений и межмолекулярных взаимодействий биомолекул путем анализа фотофизических параметров эндогенных флуорофоров и разработать методы анализа сложных смесей эндогенных флуорофоров (биожидкостей) путем селективного определения их фотофизических параметров.
2. Исследовать механизмы формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров с использованием оптической время-разрешенной и нелинейной спектроскопии и разработать методы анализа их структурных свойств.
3. Разработать методы локализации и определения свойств микрообъектов в биотканях на основе многофотонной микроскопии и картирования времени затухания флуоресценции по эндогенному флуоресцентному отклику.

### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследований в данной работе являются эндогенные хромофоры и флуорофоры в организме человека. Предметом исследования являются установление механизмов формирования их оптических свойств в УФ, видимом и ИК спектральных диапазонах, анализ эндогенной флуоресценции биожидкостей, клеток и тканей, возможности использования сигнала эндогенной флуоресценции для биомедицинской



визуализации и диагностики.

### **Методология исследования**

Методология исследования заключается в проведении экспериментальных исследований фотофизических свойств эндогенных флуорофоров, разработке математических моделей, их верификации на известных теоретических предсказаниях и/или экспериментальных исследованиях, получении и интерпретации результатов. В число использованных экспериментальных методик входили время-разрешенная кинетическая флуориметрия в диапазоне времен  $200 \text{ фс} \div 100 \text{ пс}$  (метод ап-конверсии флуоресценции) и  $100 \text{ пс} \div 50 \text{ нс}$  (метод время-коррелированного счета единичных фотонов); двухфотонная томография, в том числе, *in vivo*; конфокальная микроскопия комбинационного рассеяния; нелинейная флуориметрия с одно- и двухфотонным возбуждением, а также ряд неоптических методик (ЯМР, АСМ, ПЭМ и др.), с помощью которых анализировались структурные свойства исследуемых образцов.

### **Научная новизна**

В диссертационной работе впервые получены следующие научные результаты:

1. Показана некорректность подхода для определения числа сайтов связывания в системе белок-лиганд путем анализа данных триптофановой флуоресценции белков с использованием модифицированного уравнения Штерна-Фольмера и предложен новый подход к определению параметров комплексообразования в таких системах.
2. Показана возможность детектирования конформационных изменений в триптофан-содержащих белках с использованием фотофизических параметров флуоресценции тирозина в случаях, когда триптофановая флуоресценция является нечувствительной.
3. Предложена модификация метода нелинейной флуориметрии насыщения с однофотонным возбуждением для определения фотофизических параметров флуорофоров с учетом процессов фотоионизации и фотодеградации.
4. Продемонстрирована возможность влияния экзогенных флуоресцентных меток на кинетику процесса агрегации белков, морфологические и механические свойства агрегатов и предложена методика визуализации агрегатов белков и анализа кинетики их образования с использованием эндогенной флуоресценции в видимой области спектра.
5. Показано, что появление у биомолекул, в том числе, в клетках, эндогенной флуоресценции и поглощения в видимой и ближней ИК области спектра связано с образованием гетерогенных систем флуорофоров, появляющихся за счет химических модификаций.

6. Продемонстрирована общность механизмов формирования спектральных свойств и свойств кинетики релаксации флуоресценции на временах от 100 фс до 10 пс для гетерогенных систем флуорофоров, образованных в результате подходов снизу вверх (путем воздействий на растворы простых молекул) и сверху вниз (на примере класса широкого соединений – природного органического вещества).
7. Доказана и количественно охарактеризована роль эндогенной флуоресценции белков в формировании флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра, и на основе параметров эндогенной флуоресценции белков плазмы крови в УФ и видимой области спектра предложена классификационная модель, позволяющая классифицировать образцы плазмы крови пациентов с колоректальным раком и здоровых добровольцев.
8. Предложен метод визуализации микрососудов с помощью двухфотонной эндогенной флуоресценции и доказано, что природа данного сигнала связана с генерацией флуоресцирующих фотопродуктов гемоглобина.
9. Методом двухфотонной микроскопии с эндогенным контрастом показана, что периваскулярная область, идентифицируемая методом оптической капилляроскопии, соответствует области живого эпидермиса, а ее размер позволяет проводить оценку степени отека у пациентов с сердечной недостаточностью.
10. Предложена методика детектирования субпопуляций клеток в тканях путем анализа параметров релаксации флуоресценции эндогенных флуорофоров в них, с помощью которой впервые визуализированы иммунные клетки (макрофаги и тучные клетки) в коже человека *in vivo*.
11. На основании измерения сечения двухфотонного поглощения методом нелинейной флуориметрии доказано отсутствие резонансного возбуждения меланина при двухфотонной микроскопии.
12. Предложен новый метод микроскопии насыщения флуоресценции, позволяющий визуализировать сечение двухфотонного поглощения флуорофоров по образцу, в частности, в живых клетках.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные в диссертационной работе результаты имеют как теоретическую, так и практическую значимость. С фундаментальной точки зрения разработанный подход к описанию оптического отклика гетерогенных систем флуорофоров может быть использован для объяснения оптических свойств широкого класса систем, включая неупорядоченный углерод и природное органическое вещество. Разработка модели

формирования оптических свойств таких систем была поддержана грантом международного сообщества IHSS (International Humic Substances Society, США, 2018-2020). Полученные в работе результаты позволяют интерпретировать природу возникновения универсальной эндогенной ИК флуоресценции в живых системах и флуоресценцию в видимой области спектра у биожидкостей и сложных смесей биомолекул (например, бытовой пыли, исследование которой было поддержано грантом LG Electronics), а также визуализировать *in vivo* ранее недоступные структуры методом многофотонной томографии.

Полученные результаты о механизмах формирования и диагностической значимости фотофизических свойств эндогенных флуорофоров имеют практическую важность для разработки новых методов интраоперационной диагностики (работы с НТО «ИРЭ «Полюс», договор 18/12), неинвазивной диагностики физиологических параметров человека (работы по Госзаданию МНОЦ МГУ, научные темы 0908/008, 0908.009, 0708.012), клинической лабораторной диагностики (работы по договору с АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении», №2212-19/22-1НИР).

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Взаимодействие экзогенных флуоресцентных меток, обладающих высокой константой комплексообразования ( $>10^7 \text{ M}^{-1}$ ) со структурами, образующимися в процессе агрегации белков и пептидов, влияет на кинетику образования агрегатов и их морфологию.
2. Гетерогенные системы флуорофоров, образующиеся в результате процесса окисления белков и пептидов, обладают спектром возбуждения флуоресценции в диапазоне 300-700 нм и квантовым выходом флуоресценции  $\sim 0.01$ , за счет чего их вклад в эндогенный сигнал флуоресценции клеток и тканей в видимой области спектра сравним с НАДН и флавинами, а в красной и ближней ИК области спектра может быть доминирующим.
3. Поведение спектральных свойств и параметров релаксации флуоресценции на масштабе времени от 100 фс до 10 нс для гетерогенных систем флуорофоров, полученных методом снизу вверх, путем окисления монокомпонентных растворов органических молекул, и сверху вниз, в частности, природного органического вещества, определяется единообразием фотофизических механизмов в них – статистическим усреднением свойств входящих в их состав молекулярных флуорофоров.
4. Эндогенная флуоресценция белков плазмы крови в диапазоне длин волн возбуждения 280-450 нм может быть использована для диагностики онкологических заболеваний, при этом флуоресценция при возбуждении  $>350$  нм связана с наличием гетерогенных систем флуорофоров, образующихся за счет химических модификаций белковых макромолекул.

5. При двухфотонном возбуждении в ближнем ИК диапазоне спектра сосуды и эритроциты могут быть селективно визуализированы, в том числе, *in vivo*, по сверхбыстрой (<100 пс) релаксации флуоресценции, связанной с образованием фотопродуктов гемоглобина.
6. В случае, если средние времена затухания флуоресценции эндогенных флуорофоров отличаются не менее, чем на ~200 пс, возможна селективная визуализация содержащих их структур в биотканях, в частности, иммунных клеток в коже человека *in vivo*.
7. Сечение двухфотонного поглощения меланина как гетерогенной системы флуорофоров в ближней ИК области по порядку составляет ~100 ГМ и свидетельствует о нерезонансном двухфотонном возбуждении меланина в данном спектральном диапазоне.
8. Микроскопия насыщения флуоресценции позволяет определять абсолютные значения сечения двухфотонного поглощения флуорофоров в диапазоне 1-100 ГМ и визуализировать распределение эндогенных флуорофоров в клетках и тканях в случае, если их разделение по параметрам релаксации флуоресценции невозможно.

#### **Степень достоверности результатов работы**

Достоверность полученных экспериментальных результатов подтверждена совпадением результатов измерений тестовых образцов с соответствующими результатами из научных баз данных и их многократным воспроизведением. Калибровка спектральных измерений (спектров поглощения, эмиссии и возбуждения флуоресценции, комбинационного рассеяния) и измерений параметров затухания флуоресценции с субпикосекундным и субнаносекундным временным разрешением выполнялась с помощью аттестованных образцов. В случаях, когда это было возможно, фотофизические параметры исследуемых систем определялись несколькими независимыми методами. Для верификации результатов по визуализации структур с использованием эндогенной флуоресценции использовались независимые методы анализа, в частности, взятие биопсийного материала и иммуногистохимическая окраска. Полученные результаты были неоднократно подтверждены в литературе другими научными группами, цитирующими статьи, лежащие в основе данной диссертационной работы.

#### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были представлены автором лично на научных семинарах Института спектроскопии РАН, кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Сколковского института науки и технологий, Сеченовского университета, Университета Тель-Авива (Израиль), а также на конференциях, конгрессах и симпозиумах, основными из которых являются приглашенные

доклады на конференциях: Saratov Fall Meeting (2018, 2019, 2020, 2021, Саратов, Россия), Laser Applications in Life Sciences (2016, Шеньжень, Китай; 2018, Израиль; 2022, Нанси, Франция), Advanced Laser Technologies (2015, Фару, Португалия; 2016, Голуэй, Ирландия; 2017, Пусан, Республика Корея; 2018, Таррагона, Испания; 2021, Москва, Россия), Sechenov International Biomedical Summit (2020, 2021, 2022, Москва, Россия), IHSS (2018, Болгария; 2021, США), НИТ (2017, 2019, 2021, Москва, Россия), International Conference on Laser Optics (2018, 2019, 2022, Санкт-Петербург, Россия), PIVM (2021, Китай), AdFLIM (2016, Дагомыс, Россия; 2017, Санкт-Петербург, Россия; 2018, Саратов, Россия), ICBC (2014, Янтай, Китай), Троицкая конференция по медицинской физике (2020, Троицк, Россия), Advanced Imaging Microscopy (2022, США), VI Съезд биохимиков России (2019, Сочи, Россия).

Работа выполнялась при финансовой поддержке грантов РФ (гранты 19-75-10077, 17-75-10215, в которых соискатель выполнял роль руководителя; гранты 20-45-08004, 14-17-00451, 14-15-00602, в которых соискатель выполнял роль основного исполнителя), РФФИ (19-02-00947-а, 18-32-20116-мол\_а\_вед, 17-52-04103-Бел\_мол\_а, 16-05-01110-а, 12-05-31388-мол\_а, в которых соискатель выполнял роль руководителя), Минобрнауки РФ (соглашения № 14.515.11.0080, №075-15- 2022-304). Также исследования были поддержаны Советом по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (гранты МК-2999.2019, МК-9394.2016).

### **Публикации**

Основные результаты диссертации изложены в 34 печатных работах, в том числе 33 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих «Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова» и 1 главе в монографии. Список работ автора приведён в конце автореферата перед списком литературы. Общее количество индексируемых публикаций по данным Scopus — 116.

### **Личный вклад автора**

. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю. Все представленные в диссертационной работе результаты получены автором лично или при его определяющем участии, автором определялись постановка задач, выбор объектов исследования, методология исследований, подходы к обработке экспериментальных данных, формулировка выводов. Лично автором проведены эксперименты по двухфотонной микроскопии, микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции, нелинейной флуориметрии, спектроскопии КР и флуоресцентной спектроскопии. Для обработки полученных экспериментальных данных автором

применены оригинальные методы обработки данных оптической микроскопии с временным разрешением.

Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад соискателя был определяющим. Вклад автора в научных трудах [A1-A8, A10, A13, A16, A18, A20, A21, A22, A24, A25, A26, A28, A31-A34] составлял от 1/2 до 1/3; в научных трудах [A9, A11-A15, A23, A24, A26-A29, A34] от 1/3 до 1/4.

### **Структура и объём диссертационной работы**

Диссертация состоит из введения, восьми глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 344 страницах, включает в себя 131 рисунок и 8 таблиц. Общее число ссылок на литературные источники составляет 622, а также 34 публикации по теме диссертационной работы.

### **Краткое содержание диссертационной работы**

Как было показано в данной обзорной Главе, методы оптической спектроскопии и микроскопии, основанные на использовании эндогенного контраста, активно применяются в задачах биомедицинской диагностики. Целью данной диссертационной работы являлась систематизация данных об эндогенных флуорофорах в организме человека и дальнейшее исследование механизмов формирования оптических свойств в них, нацеленное на расширение диагностических возможностей биофотоники. Далее в работе будут продемонстрированы новые особенности фотофизических свойств в эндогенных флуорофорах, а также рассмотрены новые классы флуорофоров и возможности, открывающиеся в анализе живых систем с их использованием. Указанная цель определяет структуру диссертационной работы, приведенную ниже.

В **Главе 2** данной работы рассматриваются некоторые нерешенные вопросы из области собственной флуоресценция белковых молекул и возможностей ее применения для исследования конформационных изменений и межмолекулярного взаимодействия. В первой части Главы обсуждаются вопросы о возможности измерения конформации белковых молекул с использованием скорости переноса с триптофановых остатков на хромофоры, связанные белком, в качестве индикатора. Собственная флуоресценция белков часто используется для анализа процесса комплексообразования, в частности, известен метод тушения флуоресценции для определения константы связывания и числа сайтов связывания. В Главе 2 продемонстрированы ограничения данного метода, а также предложен модифицированный алгоритм для анализа параметров взаимодействия из данных тушения флуоресценции. В третьей части Главы 2 продемонстрирована возможность определения фотофизических параметров тирозиновых остатков в триптофан-

содержащих белках, а также проиллюстрированы возможности тирозиновой флуоресценции в исследовании конформационных изменений в белках.

**Глава 3** посвящена исследованию «нетрадиционной» (то есть не связанной с триптофановыми и тирозиновыми остатками) флуоресценции белков в видимой области спектра. Как было обсуждено в Главе I, в ряде работ показано, что при агрегации белков и пептидов у них может появляться флуоресценция в видимой области спектра, которая может представлять интерес для визуализации агрегатов и исследования кинетики их образования. В первой части Главы 3 показано, как присутствие экзогенных зондов может влиять на кинетику самосборки и морфологию агрегатов пептидов, что определяет актуальность использования эндогенного сигнала. Далее показано, как с помощью флуоресценции в видимой области спектра можно визуализировать фибриллярные агрегаты в клетках, а также отслеживать раннюю стадию фибриллообразования. Во второй части Главы 3 исследуются механизмы формирования указанной эндогенной флуоресценции, предлагается и верифицируется гипотеза о роли химических модификаций белков, вызванных процессом окисления, в появлении полосы эмиссии в видимой области спектра. В контексте данной гипотезы далее рассмотрена эволюция оптических свойств растворов аминокислот, ДНК, а также живых клеток при воздействиях, приводящих к запуску процессов окисления. Показано, как в указанных системах может возникать возбуждение и эмиссия флуоресценции в ближней ИК области спектра. На основе результатов, полученных в Главе 3, сформулирована гипотеза об общности оптических свойств и механизмов их формирования в гетерогенных системах флуорофоров.

В **Главе 4** изложены результаты исследования фотофизических процессов и механизмов формирования оптического отклика в гетерогенных системах флуорофоров (ГСФ). В первой части показана общность спектральных свойств ГСФ, возникающих в результате окисления молекул, содержащих ароматические фрагменты. Исследована взаимосвязь свойств длинноволнового края поглощения и химической гетерогенности ГСФ. Проведено исследование кинетики релаксации возбуждения в ГСФ на масштабах времен от 100 фс до 50 пс, продемонстрировано присутствие компоненты с характерным временем затухания 1 пс и спектральной диффузии во всех ГСФ. На основе результатов измерения кинетики анизотропии флуоресценции, зависимости параметров кинетики релаксации возбуждения в ГСФ от размера частиц в них и свойств растворителя показано, что наличие сверхбыстрой компоненты не связано с процессами переноса энергии между флуорофорами ГСФ. Во второй части Главы 4 концепция о единообразии оптических свойств ГСФ применена к широкому классу объектов – природному органическому веществу, для которого была

изучена взаимосвязь химического состава, спектральных свойств и свойств кинетики затухания флуоресценции.

В **Главе 5** на основе результатов, полученных в Главах 2-4, рассмотрена задача диагностики патологических состояний на основе флуоресцентной спектроскопии плазмы крови. На основе данных для пациентов с колоректальным раком проанализирована вариабельность и информативность спектральных свойств и интенсивности собственной флуоресценции белков плазмы, как триптофановой, так и тирозиновой, согласно процедуре, описанной в Главе 2. Доказано, что за полосу флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра в основном ответственен белок альбумин, а именно локализованные на нем флуорофоры, образующиеся в результате процессов окисления. Таким образом, за флуоресценцию плазмы крови при возбуждении на длинах волн  $>350$  нм определяется наличием ГСФ, фотофизические процессы в которых исследованы в Главах 3-4. На основе параметров флуоресценции белковых молекул, как в УФ, так и в видимой области спектра, предложен метод классификации образцов плазмы крови в норме и при патологии.

**Главы 6-7** посвящены развитию оптических методов с эндогенным контрастом, прежде всего двухфотонной микроскопии, для диагностики тканей на примере кожи. Основным фокусом в **Главе 6** является флуоресцентная визуализация микрососудов – показано, что их можно идентифицировать с помощью метода картирования времени жизни флуоресценции, а флуорофором являются фотопродукты, возникающие при облучении гемоглобина, представляющие из себя ГСФ. Обсуждены параметры флуоресценции, в том числе кинетики затухания флуоресценции, всех основных компонентов крови. С помощью метода двухфотонной томографии исследована морфология области кожи вокруг сосудов (периваскулярной области) и ее изменения для пациентов с отечным синдромом, на основе чего предложен метод оценки степени отечного синдрома.

В **Главе 7** анализируются оптические свойства структурных белков (коллагена и эластина) и клеток (макрофагов и тучных клеток) в дерме кожи при двухфотонном возбуждении их флуоресценции. В случае структурных белков за флуоресценцию ответственны ГСФ, показано, как с помощью метода FLIM можно определять их локализацию в коже. В случае клеток дермы решалась задача визуализации и определения их типа *in vivo*, для чего анализировалась флуоресценция НАД(Ф)Н. С помощью численного моделирования исследован вопрос о том, насколько малые отличия в параметрах флуоресценции НАД(Ф)Н в субпопуляциях клеток для детектирования бимодальности в данных FLIM. Проведено исследование затухания флуоресценции клеток дермы и их подтипов *in vitro* и *ex vivo*, предложен метод их диагностики *in vivo* с помощью двухфотонной микроскопии и FLIM.



В **Главе 8** обсуждаются возможности диагностики меланина как гетерогенной системы флуорофоров. Предложена методика анализа распределения меланина в коже по глубине на основе данных о его ИК флуоресценции и спектрах КР. Показана взаимосвязь формы ИК флуоресценции меланина и его структурной организации, проявляющейся в спектрах КР. Предложена методика анализа данных микроспектроскопии КР кожи и выделения спектров молекулярных компонент на основе неотрицательной матричной факторизации. Продемонстрирована ИК флуоресценция белков дермы, связанная с наличием ГСФ. Исследована гипотеза о возможности двухквантового возбуждения меланина. Предложен метод микроскопии насыщения флуоресценции для локализации флуорофоров различного типа в единичных клетках.

## **Глава 1. Современное состояние науки в области фотофизики и диагностики**

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A1-A2].*

### **1.1 Оптический эндогенный контраст: молекулярная специфичность**

Обладая рядом принципиальных преимуществ, оптические методы нашли широкое распространение в исследовании живых систем. С помощью методов оптической спектроскопии и микроскопии изучаются межмолекулярные взаимодействия, биохимические процессы в клетках, а также создаются различные сенсорные системы. В то же время имеют место два ограничения, затрудняющие использование оптической диагностики в клинической практике. Во-первых, глубина зондирования биотканей световым излучением относительно мала и варьируется от десятых долей до нескольких единиц миллиметров [7], в исключительных случаях достигая нескольких сантиметров [8]. Во-вторых, использование внешних (экзогенных) меток для повышения чувствительности и специфичности детектирования патологических участков тканей затруднено при измерениях на пациентах *in vivo* – при том, что именно создание новых типов меток привело к прорыву в исследовании живых систем с помощью оптики [9]. Таким образом, интерес представляет использование эндогенного контраста – оптического сигнала от молекул и систем молекул, уже присутствующих в образце (клетке, биожидкости, ткани).

В случае оптического эндогенного контраста можно ввести следующую классификацию. Во-первых, в оптическом диапазоне частот возможно использование молекулярного контраста, при этом детектируемый сигнал определяется параметрами определенных молекул – например, параметрами их электронных (поглощение и флуоресценция в УФ и видимой области спектра) и колебательных переходов. Во-вторых, влияние различных структур и неоднородностей на распространение оптического излучения позволяет построить диагностические методы на основе морфологического контраста, например, использующие разницу показателей преломления, возникающую на границе раздела сред. К методам, основанным на молекулярном эндогенном контрасте, можно отнести флуоресцентную и абсорбционную спектроскопию и микроскопию (стационарную и с временным разрешением), спектроскопию и микроскопию комбинационного рассеяния, методы фотоакустики. К методам, основанным на морфологическом контрасте, можно отнести оптическую когерентную томографию, фазовую микроскопию, методы, базирующиеся на измерении упругого рассеяния – например, лазерную сканирующую

микроскопию, спекл-интерферометрию и Допплеровскую флуориметрию. Схематически классификация методов, основанных на эндогенном контрасте, приведена на рисунке 1.1.

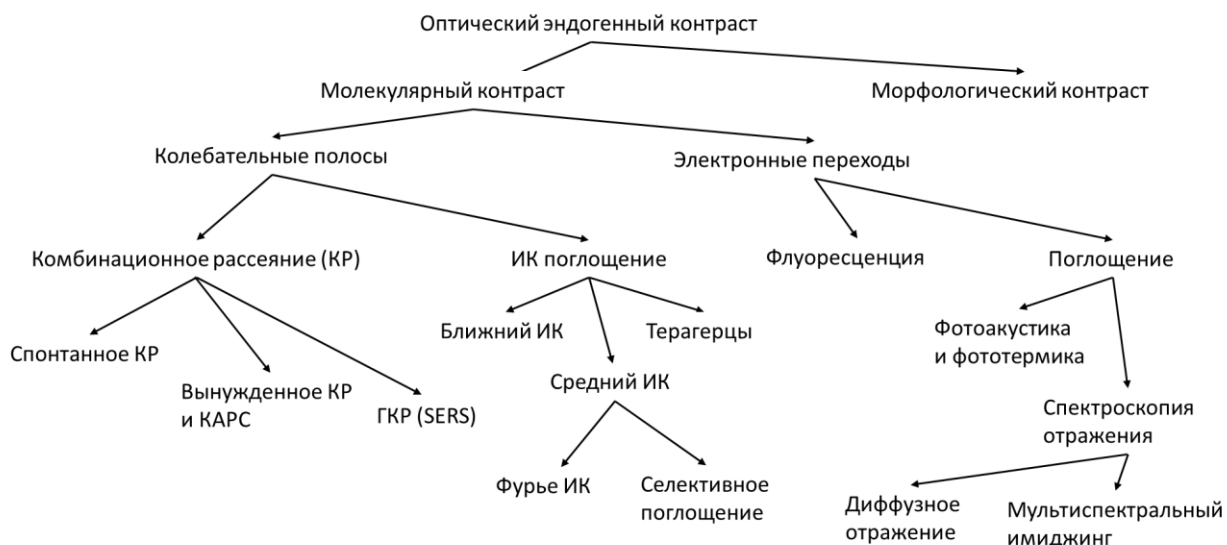


Рисунок 1.1 — Классификация оптических методов диагностики, основанных на эндогенном контрасте.

Данная диссертационная работа посвящена рассмотрению молекулярного эндогенного контраста, а именно, поиску новых его источников (флуорофоров) и исследованию механизмов формирования их оптического отклика, а также созданию методов диагностики на базе оптического молекулярного эндогенного контраста. Основное внимание уделено свойствам электронных переходов молекул в УФ, видимой и ближней ИК областях спектра и связанным с ними поглощению и эмиссии флуоресценции, то есть, хромофорам и флуорофорам в организме человека. Прежде чем перейти к рассмотрению основных эндогенных флуорофоров, мы кратко обсудим преимущества и недостатки их использования в сравнении с другими методами, основанными на эндогенном контрасте с молекулярной специфичностью.

### 1.1.1 Эндогенный контраст, основанный на колебательных спектрах молекул

#### 1.1.1.1 Спектроскопия спонтанного комбинационного рассеяния

Общим правилом является наличие у молекул, в которых есть ароматические системы, электронных переходов в УФ-области (в районе 260-280 нм – сюда можно отнести ароматические аминокислоты и их метаболиты, все содержащие их белки, ДНК, РНК), тогда как для наличия поглощения и связанной с ним флуоресценции в видимой области спектра необходима более протяженная сопряженная система  $\pi$ -орбиталей. Полосы поглощения и флуоресценции эндогенных флуорофоров достаточно широкие (50-100 нм,

т.е.  $1000-2000\text{ см}^{-1}$ ), в результате чего они перекрываются, и специфичность детектирования определенного типа молекул невысока. С другой стороны, ширины линий (полос) в спектрах комбинационного рассеяния (КР) эндогенных биомолекул составляют  $1-10\text{ см}^{-1}$ , и по спектру КР в области  $100-2000\text{ см}^{-1}$  (т.н. область «отпечатков пальцев», *fingerprint region*, Рис. 1.1) можно не только идентифицировать молекулу, но и, например, отследить изменение ее пространственной конформации. Таким образом, информативность эндогенного сигнала, связанного с колебаниями молекул, обычно выше, чем в случае анализа спектров поглощения и флуоресценции. Однако, сечение спонтанного КР составляет по порядку  $10^{-29}\text{ см}^2$ , то есть оно значительно ниже, чем сечения поглощения и флуоресценции ( $10^{-18}-10^{-16}\text{ см}^2$ ), наблюдаемые в типичном эксперименте с органическими молекулами. Указанное соображение можно проиллюстрировать следующим примером: концентрация белков, для которой можно уверенно детектировать сигнал КР при возбуждении на  $785\text{ нм}$  в схеме конфокальной микроскопии за время  $1-10\text{ с}$  и мощности излучения на образце  $50\text{ мВт}$ , составляет по порядку  $10^{-3}\text{ М}$ , тогда как сигнал собственной (триптофановой) флуоресценции от тех же белков за то же время при мощности излучения  $\sim 1\text{ мкВт}$  на стандартном флуориметре можно померить для концентрации  $10^{-9}\text{ М}$ . Данная оценка является субъективной и приведена для типичных условий экспериментов и стандартных приборов. Тем не менее в большинстве случаев верным является утверждение, что спектры КР более специфичны в определении состава образца, представляющего собой сложную смесь (например, биожидкость, клетку или ткань), чем спектры поглощения и флуоресценции, однако они при этом менее интенсивны, и зарегистрировать их значительно сложнее. Одним из исключений является случай, когда детектируется сигнал, связанный с высокочастотными колебаниями (N-H, C-H, O-H,  $2500-3700\text{ см}^{-1}$ ), например, валентная полоса колебаний воды или полоса C-H колебаний, связанная с белками и липидами. При этом интенсивности полос достаточно велики из-за высокой концентрации веществ – как пример можно привести случай картирования воды в тканях методом КР, реализуемый при определении границы опухоли языка (плоскоклеточной карциномы) [10], и использование полосы КР воды в качестве внутреннего референса для нормировки интенсивности флуоресценции органических молекул [11].

Несмотря на указанные ограничения, спектроскопия КР является одной из наиболее распространенных и успешных методик в биомедицинской диагностике и применяется в задачах интраоперационной навигации [12], неинвазивной диагностики и диагностики по месту лечения (*point of care*) [13–16]. Первому направлению посвящены обзоры [17,18]. По второму направлению отметим работы группы Г. Пуппелса по неинвазивному анализу физиологии кожи методом микроспектроскопии КР *in vivo*, который был реализован в

коммерческой системе компанией RiverD (Нидерланды) [19]. Анализ спектров КР кожи будет уделено внимание в Главе 8. По третьему направлению можно привести в качестве примера работы по спектроскопии плазмы крови, направленные на диагностику онкозаболеваний [20] и анализ бактерий с целью определения антибиотикорезистентных штаммов [21].

Чувствительность метода КР можно повысить, используя вместо сигнала спонтанного рассеяния метод вынужденного КР и когерентной антистоксовой рамановской спектроскопии (КАРС). При этом в эксперименте на образец обычно подается два лазерных импульса. Длины волн излучения двух лазерных импульсов выбираются так, чтобы разность частот накачек  $\omega_P$  и  $\omega_S$  соответствовала интересующей колебательной частоте  $\Omega = \omega_P - \omega_S$ . В таком случае происходит резонансное возбуждение колебательных мод, и эффективность отклика на частоте колебаний в среднем увеличивается в  $10^3$ - $10^4$  раз по сравнению с сигналом нерезонансного спонтанного КР. Этот факт позволяет картировать распределение молекул, обладающих выделенной колебательной линией, например, липидов или белков. Метод КАРС, в частности, реализован компанией JenLab (Германия) в приборе для *in vivo* диагностики кожи. Решением на основе ВКР, дошедшим до коммерческого прибора, является система INVENIO [22], реализующая визуализацию нативных участков тканей *ex vivo* [23]. Системы, основанные на КАРС и ВКР, достаточно сложны и дороги, что является ограничением на пути их применения в задачах биомедицины.

Еще одним способом повышения интенсивности сигнала КР является его усиление за счет различных наноструктур, на поверхности которых наблюдается эффект гигантского КР (ГКР, surface enhanced Raman scattering, SERS). Существует достаточно много реализаций данной методики, наиболее популярным является использование структур с поверхностным плазмонным резонансом, например, золотых наночастиц различной формы [24], при этом селективность детектирования обычно достигается путем иммобилизации молекул-аналитов с помощью модификации поверхности, например, антителами [25]. Потенциально фактор усиления в методе ГКР может превышать  $10^{10}$ , и с помощью него возможно детектирование даже единичных молекул [26,27]. Данный факт определяет популярность метода ГКР в point-of-care диагностике [13]. В то же время метод ГКР имеет ряд ограничений. Критичным является вопрос о воспроизводимости результатов – сигнал КР из различных областей подложки может значительно варьироваться из-за неоднородности нанесения образца и неоднородности свойств подложки. В результате не всегда очевидно, сколько точек нужно измерить, чтобы можно было количественно охарактеризовать концентрацию аналита в образце.

Альтернативой методу КР в детектировании сигнала, связанного с внутримолекулярными колебаниями, является абсорбционная спектроскопия или спектроскопия диффузного отражения в ИК и ТГц диапазоне частот.

### 1.1.1.2 Спектроскопия в ближнем ИК и среднем ИК диапазонах

Наиболее просто реализуемым является детектирование оптического сигнала полос в ближнем ИК диапазоне, где наблюдаются линии обертонов и комбинационных частот колебаний – например, в области 980 нм находится полоса поглощения воды, связанная с обертонами симметричных и антисимметричных ОН-колебаний [28,29]. Спектры поглощения воды, белков и липидов в ближней ИК (БИК) области представлены на рисунке 1.2 – коэффициент поглощения растет с длиной волны, что, в совокупности с их высокой концентрацией, является причиной эффективного поглощения света в БИК области спектра. Данный факт определяет малую глубину проникновения излучения в ткани в БИК области спектра. Высокая эффективность поглощения света в БИК диапазоне используется в лазерной хирургии, когда воздействие на объект (резка тканей, дробление камней в почках) осуществляется путем нагрева воды излучением с длиной волны, попадающей в полосу ее поглощения [30].

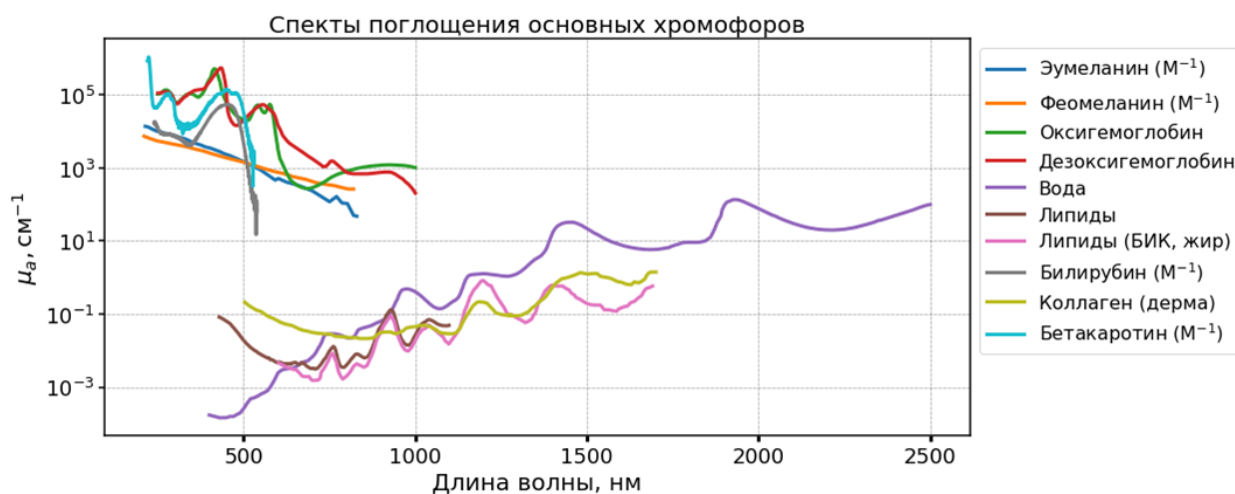


Рисунок 1.2 — Коэффициенты поглощения некоторых эндогенных хромофоров в видимой и ближней ИК областях спектра. Данные взяты с сайта [31][31].

В то же время ширины полос поглощения в БИК области сопоставимы с ширинами полос электронных переходов в видимой и УФ области, то есть в случае БИК спектроскопии теряется селективность, являющаяся преимуществом метода КР. Несмотря на это, на БИК-спектроскопии (NIRS, near infrared spectroscopy) построено несколько диагностических методик, некоторые из которых уже дошли до клинической практики. В частности, при внутрисосудистой визуализации атеросклеротических бляшек актуальным является получение биохимической информации об их составе одновременно с анатомической

информацией (получаемой методами УЗИ и ОКТ) для предсказания их стабильности. Методика, основанная на БИК-спектроскопии в диапазоне длин волн от 800 до 2500 нм, позволяющая визуализировать распределение липидов, реализована в системе Makoto компании InfraredX [32]. Данная методика позволяет работать с бляшками в присутствии крови и кровотока, а список исследований, в которых проводились испытания NIRS-системы *in vivo*, можно найти в работе [33].

Как было указано, полосы в БИК диапазоне соответствуют обертонам внутримолекулярных колебаний – длина волны 1000 нм соответствует частоте  $10000\text{ см}^{-1}$ , тогда как характерные частоты внутримолекулярных колебаний (fingerprint region) лежат в диапазоне  $100\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ , то есть, в среднем ИК диапазоне (3-10 мкм). В данном диапазоне линии поглощения являются узкими, а коэффициент поглощения велик, что делает его потенциально интересным для диагностических применений. Однако спектроскопия в среднем ИК диапазоне спектра осложняется малой доступностью источников и детекторов излучения. В последнее время активно развивается направление, связанное с квантово-каскадными лазерами, длина волны генерации которых как раз находится в среднем ИК диапазоне [34]. При этом имеется возможность перестройки длины волны, например, при использовании лазеров с внешним резонатором, что позволяет осуществлять, например, дифференциальную абсорбционную спектроскопию, определяя концентрацию вещества по поглощению излучения с длинами волн в полосе поглощения и вне ее. Данная методика применяется для анализа состава выдыхаемого человеком газа (определения  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{CO}$ , ацетона,  $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$  и т.д. [35–37]), биожидкостей (определения глюкозы в крови [38–40], наркотических веществ в слюне [44] и др.), а также для оптической биопсии [43,44].

За средним ИК диапазоном находится терагерцовый диапазон частот, соответствующий низкомолекулярным колебаниям ( $1\text{ ТГц} \approx 300\text{ мкм} \approx 33.4\text{ см}^{-1}$ ). В литературе имеется множество работ по применению ТГц спектроскопии в задачах биомедицинской диагностики, от анализа крови [45–47] до определения границы опухоли головного мозга [48–50]. Основным ограничением является высокий коэффициент поглощения водой излучения ТГц диапазона (Рис. 1.3) – в области 1 ТГц он составляет  $100\text{ см}^{-1}$ , то есть глубина проникновения излучения составляет около 10 мкм.

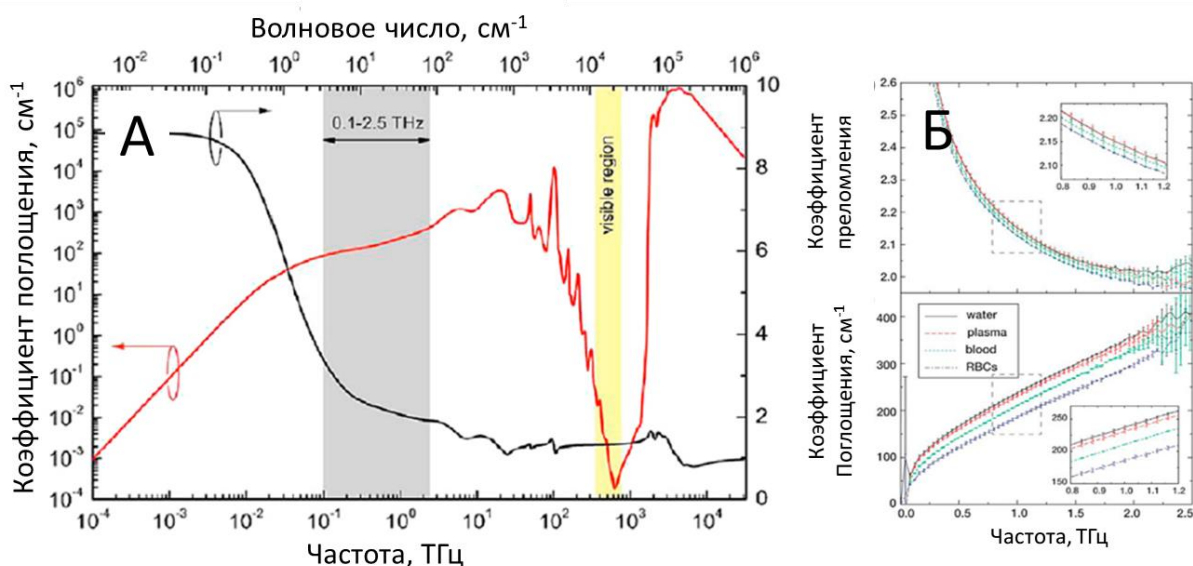


Рисунок 1.3 — А) Спектральные зависимости коэффициента поглощения (красная кривая) и показателя преломления (черная кривая) воды. Б) Спектры показателя преломления (сверху) и коэффициента поглощения (снизу) воды, плазмы крови, цельной крови и эритроцитов [51].

Вторым фактором является то, что спектры поглощения биологических образцов, например, тканей, не имеют выраженных максимумов в ТГц диапазоне (Рис. 1.3Б), т.к. они уширены за счет континуума частот поглощения водородными связями в воде. В результате спектры поглощения и показателя преломления представляют собой гладкие кривые. Так, на рисунке 1.3Б приведены указанные зависимости для воды, плазмы крови, цельной крови и эритроцитов – как видно, в спектрах отсутствуют полосы, соответствующие каким-либо конкретным низкочастотным колебаниям. Тем не менее наблюдаемых различий хватает для того, чтобы проводить классификацию объектов с помощью ТГц спектроскопии [52–54]. Отметим также, что большая часть методов биомедицинской диагностики в ТГц диапазоне так или иначе завязана на молекулы воды, для которых по зависимости компонент диэлектрической проницаемости от частоты можно разделять свободную и связанную (например, участвующую в гидратации белковых молекул) составляющие.

### 1.1.2 Эндогенный контраст, основанный на свойствах электронных переходов молекул

В предыдущем разделе были кратко обсуждены возможности диагностики, открывающиеся при использовании в качестве эндогенного контраста свойств колебательных переходов молекул. Для любой молекулы имеется набор колебательных частот и связанных с ними колебательных подуровней основного состояния, и путем анализа колебательных спектров можно осуществлять детектирование и анализ пространственной конформации этих



молекул. Классическими примерами из области биомедицинской диагностики являются колебательные спектры белковых макромолекул, из которых можно извлечь информацию как о вторичной структуре, так и о третичной структуре, а также о межмолекулярных взаимодействиях [55]. Альтернативным способом получения информации о молекуле является анализ ее электронных спектров, то есть спектров, связанных с переходами между электронными состояниями. Частоты таких переходов, представляющих интерес для биофотоники, лежат в диапазоне от УФ (~200 нм, пример – поглощение пептидных связей белков) до БИК (~900 нм, пример – поглощение гемоглобина и меланина). С процессом поглощения фотона и вызванного им электронного перехода напрямую связаны процессы релаксации энергии возбуждения.

Наличие в образце поглотителей энергии (хромофоров) открывает ряд возможностей для его диагностики. Во-первых, в спектре отраженного от образца (или прошедшего через образец) излучения будут присутствовать особенности (локальные минимумы), соответствующие полосам поглощению хромофоров, если связанная с ними оптическая плотность достаточно велика для детектирования. На использовании спектральных особенностей отраженного сигнала построены методы спектроскопии диффузного рассеяния, мультиспектральной визуализации, в простейшем случае – фотометрии. Классическим примером является исследование процессов с использованием в качестве молекулярного контраста поглощения гемоглобина – этот пример будет рассмотрен в разделе 1.2 для иллюстрации принципов работы диагностических методов биофотоники. Во-вторых, релаксация возбуждения не всегда сопровождается излучением фотона, и значительная часть энергии возбуждения может рассеиваться в тепло за счет процессов нерадиационной релаксации [56]. В результате поглощение света хромофорами может приводить к локальному нагреву и генерации акустического сигнала, на детектировании которых основаны методы фототермической спектроскопии и фотоакустика.

С точки зрения диагностики интерес представляет радиационная релаксация возбужденного состояния – флуоресценция. Характерный временной масштаб внутримолекулярных колебаний составляет примерно 1 пс, в связи с чем использование время-разрешенных техник в колебательной спектроскопии представляет в основном фундаментальный интерес и используется для анализа конформационной динамики молекул [57–59]. Релаксация возбужденных электронных состояний, в целом, может происходить на временах от пикосекунд до секунд, однако наиболее характерным масштабом является ~1 нс. Так, типичные времена жизни флуоресценции эндогенных флуорофоров в организме человека, как будет обсуждено ниже, составляют обычно от сотен пикосекунд до единиц наносекунд. Поскольку время жизни флуоресценции

молекулы в большинстве случаев зависит от изменения структуры ее микроокружения, оно также может являться оптическим эндогенным контрастом, что реализовано, например, в методе FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy, визуализация времени жизни флуоресценции). Кинетику процессов, связанных с релаксацией возбужденных состояний, можно исследовать с помощью нескольких экспериментальных техник – метода накачки-зондирования (измерение поглощения из возбужденного состояния), кинетической флуориметрии, флэш-фотолиза и т.д. Наличие в живых системах и биомакромолекулах многочисленных процессов на широком диапазоне времен от долей пикосекунд до секунд определило распространенность метода время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

Флуоресцентная спектроскопия в фундаментальных исследованиях живых систем во многом завязана на использование экзогенных зондов, с помощью которых можно селективно пометить определенные молекулы, повысить интенсивность и фотостабильность сигнала, а также увеличить глубину зондирования и увеличить соотношение сигнал-шум за счет смещения спектра эмиссии в длинноволновую область. Несмотря на трудности со внедрением данного подхода в клинику, в последнее время наметился явный прогресс, о котором можно судить по недавним обзорам [9]. Тем не менее применимость эндогенного контраста в клинических условиях при исследовании людей *in vivo*, несомненно, выше. Помимо этого обстоятельства, как будет показано ниже, преимущества эндогенного контраста заключаются в его высоких чувствительности и специфичности к изменению состояния объекта.

Таким образом, генеральной линией данной диссертационной работы являлось исследование систем как индивидуальных молекул, так и их гетерогенных смесей, которые присутствуют в организме человека, а их поглощение и флуоресценцию можно использовать в качестве оптического эндогенного контраста. В данном исследовании можно выделить три основных подзадачи: (1) поиск новых эндогенных флуорофоров; (2) исследование фотофизических процессов в эндогенных флуорофорах, хромофорах и содержащих их системах; (3) разработка новых диагностических методов, а также методов визуализации и анализа состояния эндогенных флуорофоров.

## **1.2 Биомедицинская диагностика с использованием оптического эндогенного контраста**

Фундаментальное ограничение, связанное с тем, что глубина зондирования биотканей световым излучением мала, приводит к вопросу о месте методов фотоники среди других методов, используемых в медицине: какова ниша оптической биомедицинской диагностики

*in vivo*, в решении каких биомедицинских задач оптические методы превосходят конкурентов и какие новые технологии на основе фотоники уже внедрены в современную клиническую практику.

Задачей данного раздела является получение ответа на эти вопросы на примере задач, в решении которых исследователям удалось дойти до конечной точки – создания коммерчески доступных медицинских приборов и устройств, сертифицированных для работы с пациентами.

### **1.2.1 Методы и технологии биомедицинской диагностики, использующие в качестве эндогенного контраста гемоглобин**

Несколько методов оптической диагностики, получивших широкое распространение, основаны на эндогенном контрасте, связанном с гемоглобином. Высокая концентрация гемоглобина в эритроцитах (~100 мг/мг,  $\sim 10^{-3}$  М) в совокупности с его характерным спектром поглощения и высоким коэффициентом экстинкции определяют цвет крови и во многом формируют оптический отклик биотканей в организме человека. В спектре поглощения гемоглобина имеются полосы в видимой области спектра: в районе 400 нм (полоса Soret,  $\epsilon \approx 100\,000\text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ ), 500-600 нм (Q-band,  $\epsilon \approx 10\,000\text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$ ), а также в ближней ИК области (Рис. 1.2). Принципиально важным является тот факт, что в зависимости от формы гемоглобина (оксигенированный/деоксигенированный, то есть связан ли ион железа  $\text{Fe}^{2+}$  с молекулой кислорода; карбоксигемоглобин – связан ли ион железа  $\text{Fe}^{2+}$  с молекулой СО) меняется его электронная структура и, соответственно, спектр поглощения.

Так, пульсация крови прежде всего в артериях [60], лежит в основе метода фотоплетизмографии – измерения пульсовой волны по изменению отраженного или прошедшего через ткань оптического сигнала, интенсивность которого модулируется поглощением гемоглобина в пульсирующей крови. На данном принципе основано измерение частоты пульса, частоты сердечных сокращений (ЧСС) и ее вариабельности с помощью носимых устройств (различных браслетов и фитнес-трекеров [61]), а также в дистанционном варианте с помощью камер [62]. Данная методика, помимо измерения ЧСС, позволяет по изменению амплитуды пульсовой волны измерять перфузию («кровенаполнение») тканей, что принципиально важно при проведении хирургических операций [63].

На контрастировании сосудов путем визуализации ткани при освещении на длинах волн, соответствующих максимумам в спектрах поглощения гемоглобина, основан метод интраоперационной диагностики злокачественных опухолей внутренних органов на ранних

стадиях, получивший название узкополосной визуализации (narrow band imaging, NBI) [64]. Для визуализации используется излучение в спектральных диапазонах 400-430 нм и 525-555 нм, соответствующих локальным максимумам спектра поглощения гемоглобина, различающимся на два порядка по амплитуде коэффициента экстинкции. В связи с этим синий свет проникает сравнительно неглубоко и поглощается поверхностной капиллярной сетью, а зеленый свет поглощается более глубоко расположенными кровеносными сосудами, за счёт чего увеличивается контраст визуализации между поверхностью слизистой оболочки и сосудами. Так как раковые опухоли часто сопровождаются повышенной васкуляризацией, с помощью метода NBI оказывается возможным диагностировать злокачественную опухоль.

Далее, путем анализа амплитуды пульсовой волны на двух длинах волн, попадающих в локальные максимумы поглощения окси- и дезоксигемоглобина, становится возможным определение оксигенации крови (SpO<sub>2</sub>). Данная методика лежит в основе функционирования пульсоксиметров, повсеместно применяемых в клинической практике. Еще одним применением, основанным -на детектировании фотоплетизмограммы и пульсовой волны, является безманжетное измерение артериального давления (АД) [65].

Схожий принцип имеет метод функциональной спектроскопии инфракрасного диапазона (functional near-infrared spectroscopy, fNIRS), совмещающей в себе подходы спектроскопии диффузного отражения в БИК диапазоне и диффузно оптическую томографию. В данном методе на голове исследуемого человека располагается матрица источников и детекторов излучения БИК диапазона на двух длинах волн, с помощью которой производится картирование распределения оксигенации в верхней части мозга. Пространственное разрешение при этом получается путем детектирования сигнала при различных расстояниях между источником и детектором, а глубина детектирования составляет около 1 см [66,67]. Исследование карты оксигенации мозга в динамике позволяет оценивать его функциональную активность, и методика fNIRS позиционируется как альтернатива методике функциональной МРТ (fMRI) в исследовании патологий, связанных с когнитивными процессами [68].

Приведём ещё несколько примеров технически сложных методик, в которых поглощение гемоглобина используется в качестве эндогенного контраста. В частности, в диагностике рака молочной железы широкое применение получили методы оптической томографии, а именно оптоакустическая (ОА) томография и диффузно-оптическая томография [69–71]. Данные методы обладают наибольшей глубиной зондирования из всех оптических методик. Оптоакустическая томография – это гибридный метод, который объединяет оптическое возбуждение и ультразвуковое детектирование. Поскольку чисто оптические методы

визуализации не могут осуществлять визуализацию с высоким разрешением в глубоких слоях биологических тканей из-за наличия рассеяния и поглощения света, возможность получения контрастных изображений с высоким разрешением в биологических тканях на глубине до единиц сантиметров делает ОА перспективным методом для клинической визуализации. В ОА обычно используется наносекундный импульсный лазер (длительность импульса  $<100$  нс) для освещения биологического образца, а измеряемая частота акустического сигнала находится в пределах 5-10 МГц (Рис. 4.2А). Молекулы поглощают фотоны и преобразуют энергию в тепло, вызывая повышение температуры [72]. Термоупругое расширение в результате повышения температуры генерирует акустические волны, которые регистрируются с помощью ультразвуковых преобразователей. Поскольку звук рассеивается в тканях в среднем в 1000 раз меньше света [70], акустический сигнал гораздо дольше распространяется в биологической ткани без значительного затухания.

В качестве молекулярного контраста при ОА визуализации молочной железы выступают молекулы окси- и дезоксигемоглобина – в качестве диагностических критериев используются параметры васкуляризации и оксигенации. ОА выявляет наличие неангиогенеза опухоли – формирования новых кровеносных сосудов вокруг злокачественных образований, которые не могут без этого вырасти более чем на 2–3 мм. Было показано, что использование в качестве маркеров распознавания опухолевых тканей сочетания концентрации гемоглобина и его оксигенации дает хорошую диагностическую точность [75] – злокачественные опухоли имеют повышенную концентрацию крови (гемоглобина) при пониженном содержании кислорода. Данная функциональная информация имеет прямое отношение к патофизиологии опухоли и помогает клиницисту принимать решения относительно злокачественного новообразования и необходимости биопсии. ОА визуализация позволяет идентифицировать опухоли размером до 3 мм и обладает способностью визуализировать субмиллиметровые сосудистые структуры. Важность раннего обнаружения опухолей связана с необходимостью предотвращения их метастазирования. Метод ОА, совмещенный с УЗ визуализацией, лежит в основе прибора, выпускаемого компанией Senomedical [76], совмещающего в себе получение анатомической (УЗ) и физиологической (ОА) информации.

Из приведенных примеров хорошо видно, насколько эффективными и информативными могут быть методы оптической диагностики с эндогенным контрастом.

### **1.3 Эндогенные флуорофоры и хромофоры в организме человека: локализация, фотофизические свойства и применения в биофотонике**

Далее в рамках этой главы мы рассмотрим основные эндогенные флуорофоры в организме человека. Несмотря на разнообразие биомолекул, список таких флуорофоров в обзорных статьях насчитывает обычно до десяти систем [77–79]. Более того, с пониманием механизмов формирования оптических свойств эндогенных флуорофоров ситуация еще более запутанная: так, достаточно хорошо изучены вопросы формирования спектра и кинетики релаксации флуоресценции триптофановых остатков в белках, имеются теоретические и фундаментальные работы в области фотофизики НАД(Ф)Н, флавинов и билирубина. Однако для флуоресценции белков (например, коллагена, эластина и кератина) в видимой области спектра, меланина и липофусцина вопросы формирования оптических свойств остаются дискуссионными [80–83]. Еще больше вопросов вызывает природа флуоресценции биологических систем в БИК области спектра [79,84–88]. Таким образом, несмотря на многолетнее применение флуоресцентной спектроскопии к биологическим системам, остается ряд открытых вопросов о фотофизических процессах в них, а также ряд нерешенных проблем визуализации и диагностики с эндогенным контрастом. Данная проблематика изначально стимулировала постановку задач диссертационной работы. Далее в Главе 1 мы рассмотрим основные сведения об известных эндогенных флуорофорах, их фотофизике и применениях, а также отметим нерешенные задачи, связанные с эндогенным молекулярным контрастом.

#### **1.3.1 УФ-хромофоры и флуорофоры: ароматические молекулы**

##### 1.3.1.1 Ароматические аминокислоты и белковые молекулы

Большинство биомолекул обладают поглощением в области 200 нм. Так, пептидные связи в белковых молекулах характеризуются наличием полос поглощения в области 190 нм ( $\epsilon \sim 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) и 210 нм ( $\epsilon \sim 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [89]. Исследование свойств соответствующих электронных переходов актуально с точки зрения определения вторичной структуры белков методом кругового дихроизма.

Поглощением на больших длинах волн, обладают биомолекулы, в которых присутствует ароматический фрагмент. К таким молекулам можно отнести ароматические аминокислоты – триптофан (Trp,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ нм} / \lambda_{\text{em}} = 350 \text{ нм}$ ), тирозин (Tyr,  $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ нм} / \lambda_{\text{em}} = 310 \text{ нм}$ ) и фенилаланин (Phe,  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ нм} / \lambda_{\text{em}} = 280 \text{ нм}$ ) – наличие которых в белках ответственно за их собственную УФ флуоресценцию. Спектры поглощения (коэффициента экстинкции) Trp, Tyr и Phe, а также аминокислоты гистидина, представлены на рисунке 1.4А. Как видно,

у ароматических аминокислот имеется полоса поглощения с максимумом в области 260-280 нм, за которую ответственны  $\pi$ - $\pi^*$  переходы, тогда как полосы поглощения в области <230 нм, связанные с возбуждением электронов в химических связях, присутствуют во всех аминокислотах.

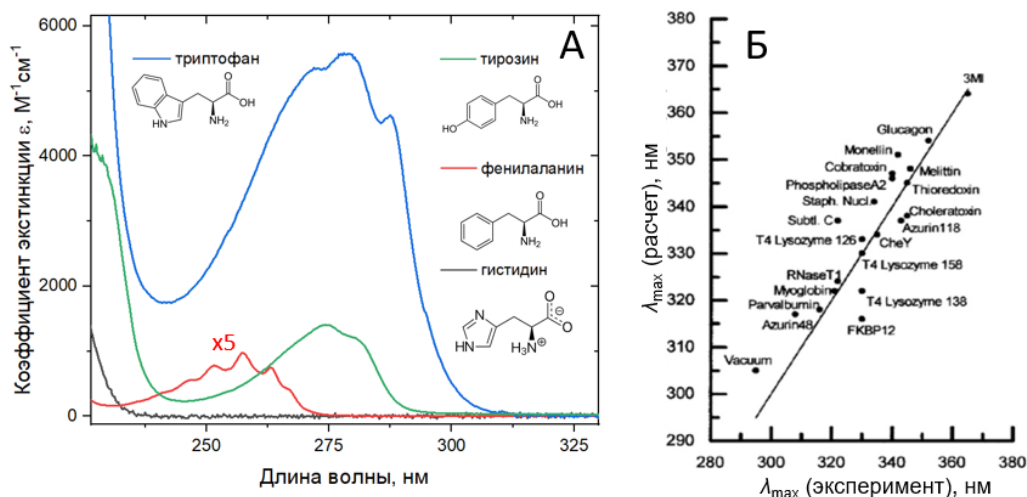


Рисунок 1.4 — А) Спектральная зависимость коэффициента экстинкции аминокислот триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина. Данные взяты с сайта [31]. Б) Корреляция между расчётными и экспериментально определёнными значениями положения максимума спектра флуоресценции  $\lambda_{max}$  для триптофана в белках по данным работы [90].

Из трех ароматических аминокислот в белках наиболее интенсивной является флуоресценция триптофановых остатков [56], тогда как флуоресценция тирозиновых остатков в триптофан-содержащих белках обычно «затухает» [91]. Несмотря на то, что, как будет показано в Главе 2, в ряде случаев тирозиновая флуоресценция может служить чувствительным индикатором конформационных перестроек белков, в литературе под собственной флуоресценцией белков подразумевается именно флуоресценция Тгр. Оптические свойства Тгр являются основой для диагностики процессов, происходящих с белковыми макромолекулами – так, в зависимости от полярности микроокружения, спектр флуоресценции Тгр может сдвигаться от 360 нм (в воде) до 308 нм в неполярном окружении (азурин). Было показано, что напряженность электрического поля, а именно ее проекция на направление дипольного момента возбужденного состояния Тгр, определяет форму полосы эмиссии белка [92]. В рамках данной модели с учетом данных о конформационной динамике белка, полученных методом молекулярной динамики, методом квантовой химии был рассчитан максимум положения эмиссии для 16 белков, который хорошо коррелировал с экспериментальными данными (Рис. 1.4Б).

### 1.3.1.2 Фотофизические процессы в триптофане, обуславливающие вариabельность его оптических свойств в белках

Вариabельность фотофизических параметров Тгр в белках, в частности квантового выхода (от 0.35 до <0.01 [93]) и времени релаксации флуоресценции, определяется в первую очередь процессом переноса электрона с Тгр при его фотовозбуждении. Так, Тгр обладает низкой энергией ионизации в основном состоянии (7.4 эВ) в сравнении со многими ароматическими молекулами, например, бензолом (9.2 эВ). Это означает, что энергетически электрон, занимающий НОМО-орбиталь в Тгр, лежит выше, чем в большинстве других молекул, и даже в основном состоянии Тгр участвует в роли восстановителя в некоторых биологических окислительно-восстановительных реакциях [94]. Энергия низших возбужденных состояний ( $^1L_b$  и  $^1L_a$ ) Тгр на 4 эВ выше основного, следовательно, электрон может быть перенесен с возбужденного Тгр с еще большей вероятностью.

Локальные электростатические поля в белках способствуют или подавляют перенос электрона с Тгр на амидные группы. Процесс переноса электрона требует сохранения энергии, и СТ-состояние (состояние с переносом заряда, Charge Transfer) и флуоресцентные состояния ( $^1L_a$ ) должны иметь одинаковую энергию в момент переноса электрона. Для этого необходимо, чтобы положительные заряды были близко к акцептору и/или отрицательные заряды находились рядом с донором. Таким образом, изменение параметров локального электрического поля в области Тгр – как напряженности, так и направления – модулирует скорость переноса электрона и, соответственно, определяет квантовый выход и скорость затухания его флуоресценции [95].

### 1.3.1.3 Оптические свойства ДНК и РНК

Азотистые основания в молекулах ДНК и РНК также содержат ароматический фрагмент, обуславливающий у них наличие поглощения в УФ с максимумом в области 260 нм (Рис. 1.5А) за счет  $\pi$ - $\pi^*$  переходов, однако квантовый выход их флуоресценции при возбуждении в данную полосу мал ( $\sim 10^{-4}$ ), и в большинстве работ молекулы ДНК и РНК считаются нефлуоресцирующими [96].



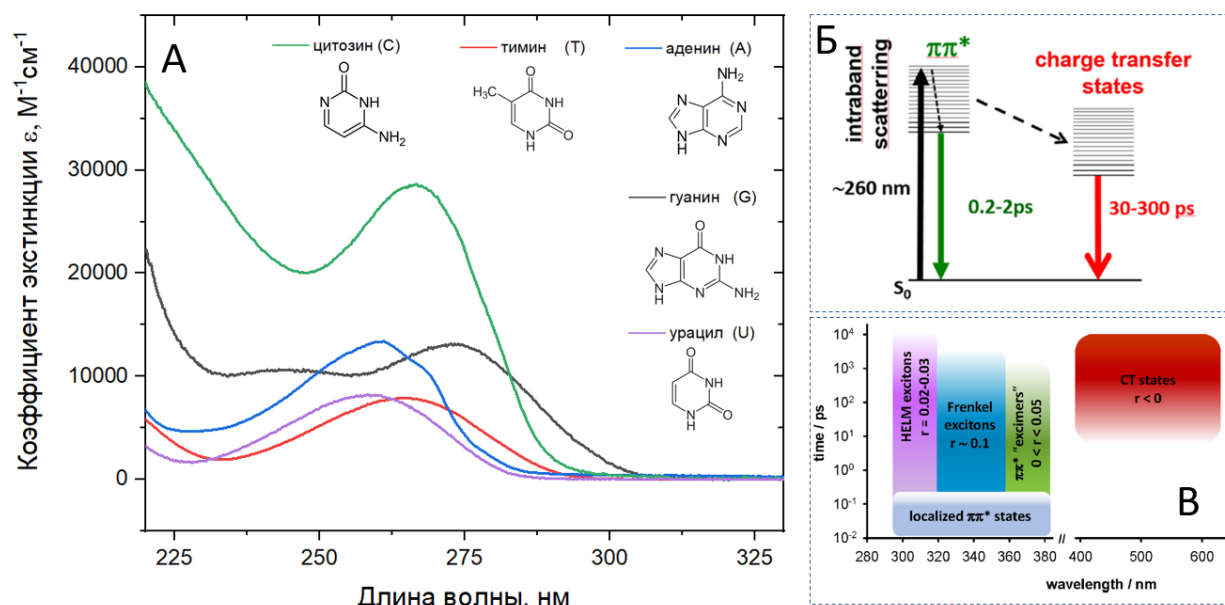


Рисунок 1.5 — А) Спектральная зависимость коэффициента экстинкции азотистых оснований цитозина, тимина, аденина, гуанина и урацила. Данные взяты с сайта [31]. Б) Модель фотофизических процессов в ДНК при возбуждении в области 260 нм согласно [96]. В) Схематическое представление модели формирования флуоресценции ДНК согласно [96]. HELM (high energy long-lived mixed)-экситон – долгоживущее возбужденное состояние в ДНК.  $r$  – анизотропия флуоресценции.

Согласно модели фотофизических процессов в азотистых основаниях и ДНК, схематически представленной на рисунке 1.5Б и верифицированной в экспериментах по измерению поглощения из возбужденного состояния, возбуждение их в области 260 нм приводит к быстрому (0.2-2 пс) образованию комплексов с переносом заряда (СТ, charge transfer), которые безызлучательно релаксируют на масштабе времен 30-300 пс в зависимости от последовательности нуклеотидов и пространственной организации молекулы [97–100]. Данный факт обуславливает сверхбыстрое затухание флуоресценции ДНК и ее низкий квантовый выход. Отметим, что фотофизика ДНК сложнее, чем рассмотренная модель. Так, в работе [96] показано наличие нескольких типов долгоживущих состояний: HELM (high energy long-lived mixed)-экситонов, долгоживущих возбужденных состояний в ДНК, являющихся смесью  $\pi$ - $\pi^*$  и СТ состояний, экситонов Френкеля и эксимеров.

В целом, все физиологически важные молекулы с ароматическим фрагментом будут оптически активны в УФ, а возможность их детектирования будет определяться тем, достаточна ли их концентрация для отделения их оптического сигнала от белков и нуклеиновых кислот. В качестве резюме еще раз отметим, что число молекул-хромофоров с поглощением в области 260-280 нм и флуоресценцией в области 300-350 нм в организме велико, однако доминирующим в УФ отклике является вклад белков и нуклеиновых кислот.

### 1.3.2 Структурные белки: флуоресценция сшивок и модификации ароматических молекул

Как было указано в предыдущем разделе, собственная флуоресценция белков определяется наличием в их структуре ароматических аминокислот, при этом наиболее длинноволновой является флуоресценция Trp с максимумом в области 350 нм. В то же время ряд структурных белков, являющихся основными компонентами соединительной ткани – коллаген, эластин и кератин – обладают эмиссией флуоресценции с максимумом в области 450 нм при возбуждении в области 350 нм [101,102]. Данный факт связан с химической модификацией аминокислот в них и образованием так называемых сшивок (cross-links) [103]. В качестве примера того, как биохимические процессы могут влиять на спектральные свойства флуорофоров, вновь обратимся к триптофану и его производным, представленным на рисунке 1.6.

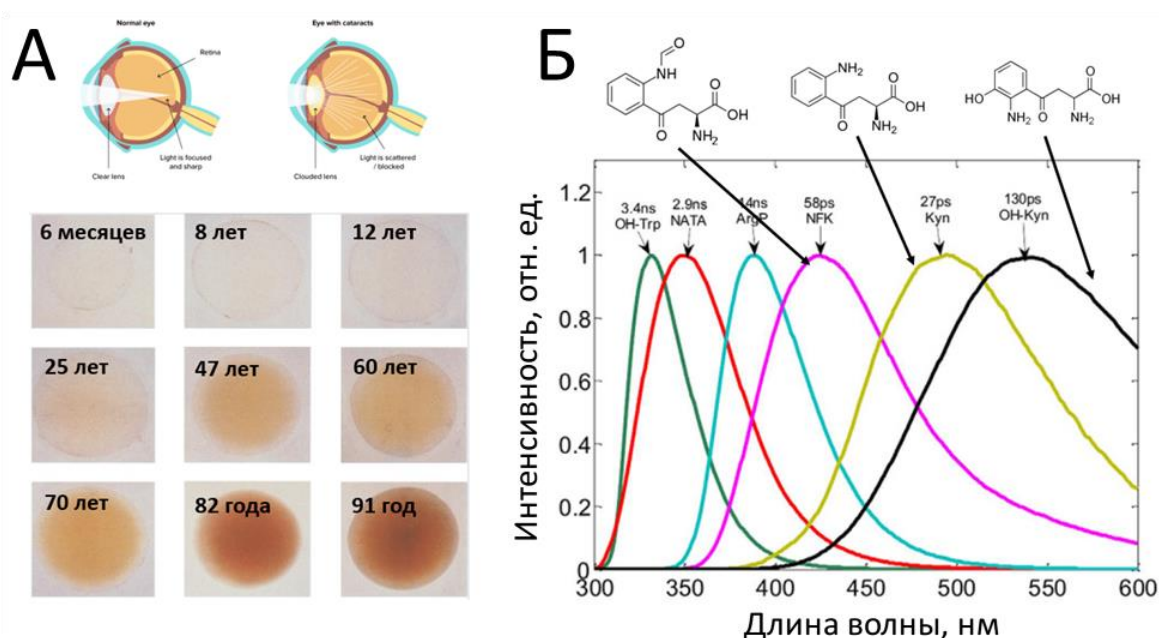


Рисунок 1.6 — А) Схематическое изображение глаза в норме и при катаракте (наблюдается помутнение и пожелтение хрусталика, сверху) и возраст-ассоциированное изменение цвета хрусталика. Б) Спектры продуктов посттрансляционной модификации триптофана в кристаллине. Сверху приведены структурные формулы N-формил кинуренина (NFK), кинуренина (Кун) и гидроксид-кинуренина (ОН-Кун). В поле рисунка также приведены времена жизни соответствующих флуорофоров. Рисунок адаптирован из работы [104].

В качестве примера рассмотрим посттрансляционные модификации белка кристаллина, входящего в состав хрусталика глаза. Поскольку время существования кристаллина в организме велико, с возрастом в нем могут накапливаться модификации, в том числе приводящие к появлению хромофоров (центров окраски), обладающих поглощением в видимой области спектра (Рис. 1.6А). Одним из путей образования хромофоров являются

модификации триптофановых остатков в структуре кристаллина – так, в работе [104] методом масс-спектрометрии было показано наличие в кристаллине N-формил кинуренина (NFK), кинуренина (Куп) и гидрокси-кинуренина (ОН-Куп), спектры поглощения и эмиссии которых сдвинуты относительно  $T_{tr}$  в длинноволновую область (Рис. 1.6Б). Так, максимум эмиссии N-формил кинуренина находится в области 435 нм, что совпадает с положением максимума спектра флуоресценции хрусталика. Таким образом, химические модификации аминокислот могут приводить к появлению новых хромофоров и флуорофоров в организме.

Помимо окисления ароматических аминокислот в организме имеет место ряд других процессов, приводящих к посттрансляционным модификациям белков и образованию новых хромофоров. Именно генерация новых хромофоров, имеющая накопительный эффект для структурных белков в организме, приводит к появлению у них эмиссии в синей области спектра. Химическая структура и оптические свойства образующихся хромофоров (сшивок) могут отличаться для эластина [105], коллагена [106] и кератина [107]. Так, на рисунке 1.7А приведены характерные спектры флуоресценции эластина и коллагена типа I и III при возбуждении на длине волны 357 нм [108], а на рисунке 1.7Б приведены спектры возбуждения флуоресценции двух классов сшивок в коллагене по работе [109]. Детальное рассмотрение сшивок, которые могут образовываться в коллагене и эластине в результате энзиматических и неэнзиматических процессов можно найти в работе [110]. Основным же посылом с точки зрения эндогенных флуорофоров и хромофоров в организме человека является то, что за флуоресценцию структурных белков ответственны не какие-то несколько определенных типов структур, а гетерогенный набор химических модификаций, который может различаться от молекулы к молекуле, зависеть от конкретных биохимических процессов и т.д. Однако, несмотря на разнообразие флуоресцентных сшивок, спектры эмиссии коллагена, кератина и эластина достаточно близки, и положение максимума их флуоресценции при одной длине волны возбуждения различается незначительно (например, при возбуждении на 350 нм максимум эмиссии будет находиться в районе  $450 \pm 20$  нм). Автофлуоресценция структурных белков подробно исследуется в контексте задач биомедицинской диагностики [102,111], в частности, анализа процессов в коже, а коллаген и эластин часто рассматриваются как основные флуорофоры внеклеточного матрикса [112].

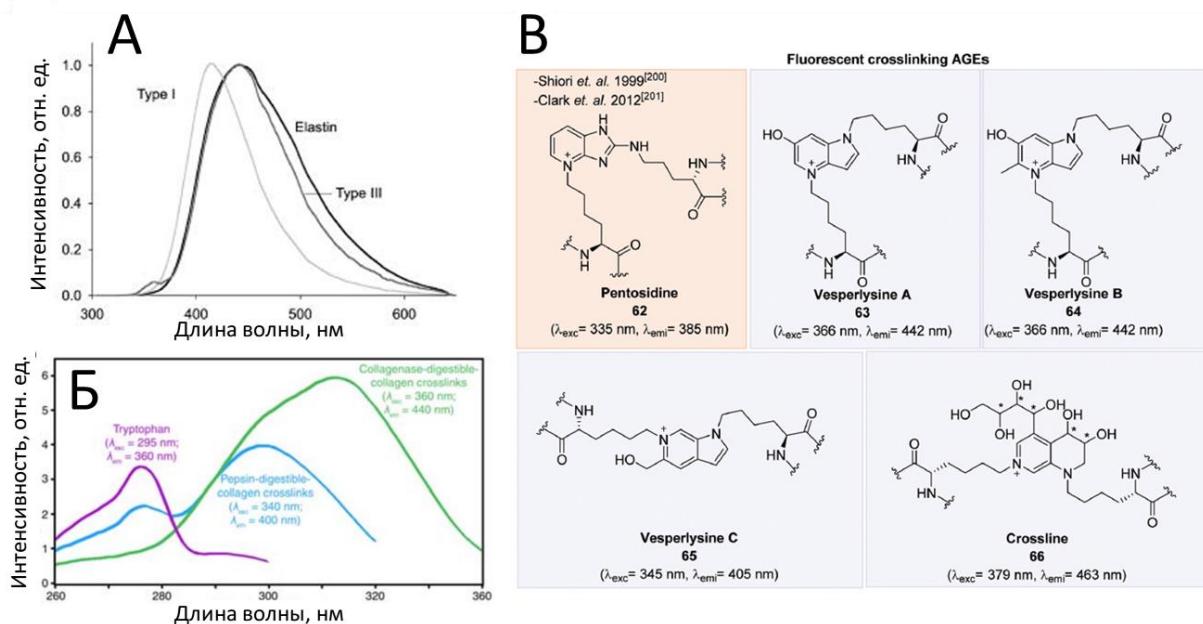


Рисунок 1.7 — А) Нормированные на максимум спектры флуоресценции эластина и коллагена типа I и III [108]. Б) Спектры возбуждения флуоресценции коллагеназо-расщепляемых (зеленый) и пепсин-расщепляемых (синий) сшивок в коллагене [113]. В) Химическая структура флуоресцирующих конечных продуктов гликирования, которые могут образовываться в коллагене и эластине [108]. Для каждого хромофора указаны характерные длины волн максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции.

Еще одним важным биохимическим процессом, который также может влиять на оптические свойства структурных белков, является их гликирование. Конечные продукты гликирования образуются в результате химической реакции между восстанавливающими сахарами (их карбонильной группой) и аминок группой аминокислот или аминокислотных остатков белков. Для структурных белков возможно выделить конкретные флуорофоры – конечные продукты гликирования (AGE, advanced glycation end-products), вносящие вклад во флуоресцентный отклик в видимом диапазоне, например, пентозидин, пиридинолин, дезоксипиридинолин [114] – на рисунке 1.7В приведены структурные формулы некоторых конечных продуктов гликирования коллагена и эластина с указанием положения максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции согласно [108]. При диабете наблюдается покоричневение кожи, связанное с гликированием коллагена [115], а флуоресцентный сигнал от образующихся продуктов гликирования широко используется для диагностики заболеваний и количественной оценки степени гликирования структурных белков [116,117].

Резюмируя, отметим, что в организме в результате ряда химических модификаций могут образовываться различные хромофоры и флуорофоры в ближней УФ области спектра (возбуждение ~320-360 нм, эмиссия ~390-470 нм). Посттрансляционными модификациями

объясняется наличие флуоресценции у ряда важных для биомедицинской диагностики белков – коллагена, эластина, кератина, кристаллина и др., при этом образуется набор структурно и спектрально различающихся флуорофоров (см., например, Рис. 1.6В и 1.7В).

### **1.3.3 «Классические» эндогенные флуорофоры в видимой области спектра: НАД(Ф)Н и флавины**

#### 1.3.3.1 Фотофизические процессы в НАД(Ф)Н

Никотинамиддинуклеотид (НАД) и никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ) (Рис. 1.8А) являются универсальными кофакторами, задействованными во множестве окислительно-восстановительных процессов в клетках живых организмов. Будучи флуорофорами, данные молекулы являются, по всей видимости, наиболее часто используемым эндогенным маркером при проведении исследований живых объектов методами флуоресцентной спектроскопии.

Редокс-состояние клетки является определяющим фактором в биоэнергетических процессах и метаболизме и имеет непосредственное отношение к патологическим процессам в организме. Окисленные и восстановленные никотинамиддинуклеотид (НАД<sup>+</sup>/НАДН) и никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН) играют важную роль в редокс-состоянии клетки, будучи вовлеченными в ряд ключевых метаболических процессов.

Никотинамидный фрагмент НАДН обладает поглощением в области 340±30 нм и эмиссией флуоресценции в области 460±50 нм, при этом спектральные свойства НАДФН аналогичны в связи с удаленностью фосфатной группы от никотинамидного кольца (Рис. 1.8А), являющегося хромофором и флуорофором в НАД(Ф)Н. В связи с этим в литературе в качестве названия флуорофора используется обозначение НАД(Ф)Н, поскольку однозначная идентификация источника флуоресценции является затрудненной. При этом окисленные формы НАД(Ф)<sup>+</sup> не обладают указанными полосами поглощения и, соответственно, флуоресценции, что делает возможным определение соотношения НАД(Ф)Н/НАД(Ф)<sup>+</sup> – редокс-статуса клетки – с использованием флуоресцентной спектроскопии при однофотонном возбуждении в области 360 нм либо при двухфотонном возбуждении в области 700-800 нм. Помимо интенсивности флуоресценции, в литературе большое распространение получил подход к исследованию метаболических процессов на основе измерения кинетики затухания флуоресценции НАД(Ф)Н. В частности, для раковых клеток наблюдается эффект Варбурга – смена метаболизма с окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз, проявляющаяся в том числе в изменении соотношения НАД(Ф)Н/НАД(Ф)<sup>+</sup> и связанной и свободной форм НАД(Ф)Н, которые можно

количественно измерять с использованием метода FLIM. В связи с этим, вопросу исследования фотофизических свойств НАД(Ф)Н посвящено множество работ.

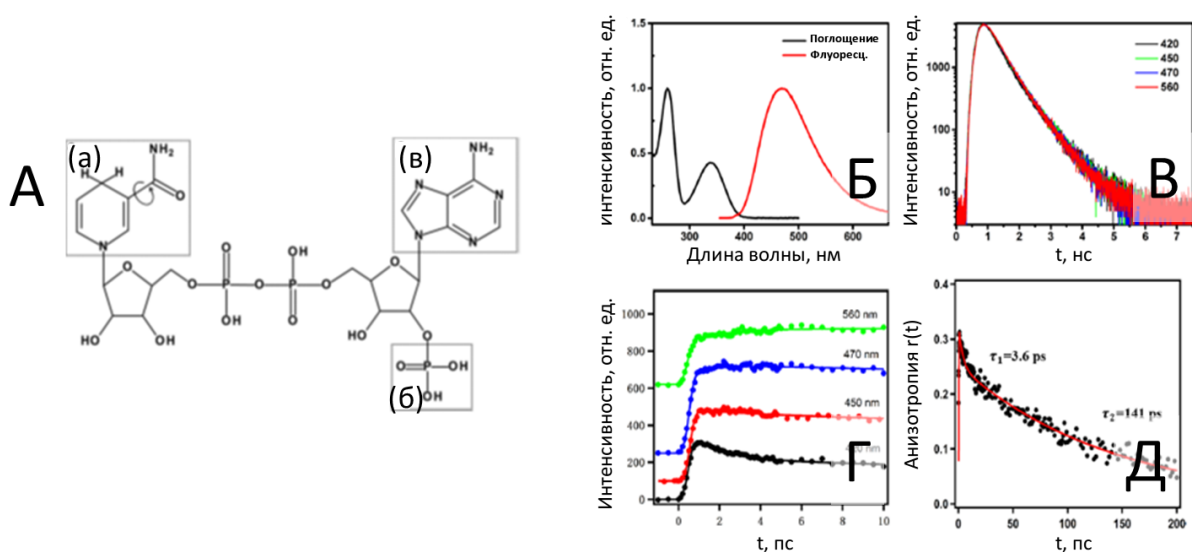


Рисунок 1.8 — А) Структура молекулы НАД(Ф)Н. За флуоресценцию ответственен никотинамидный фрагмент (а), в котором амидная группа может находиться в цис- (как показано на рисунке) или транс-конфигурации (при вращении на  $180^\circ$  относительно С-С связи, отмечено стрелкой). НАДФН отличается от НАДН наличием фосфатной группы (б) в области аденинового фрагмента молекулы (в). Б) Нормированные спектры поглощения и эмиссии свободной формы НАДН в Tris-буфере. В) Кинетика затухания флуоресценции свободной формы НАДН, измеренная в Tris-буфере на длине волны возбуждения 340 нм. Г) Кинетика флуоресценции свободной формы НАДН на пикосекундном временном масштабе. Д) Кинетика анизотропии флуоресценции свободной формы НАДН на пикосекундном временном масштабе. [118]

На наносекундном и субнаносекундном временных масштабах свободная форма НАДН в водном растворе характеризуется биэкспоненциальным затуханием флуоресценции с характерными временами 0.3 и 0.7 нс [119] с преобладающим вкладом первой компоненты, однако часто при исследовании более сложных систем с использованием FLIM время жизни свободной формы НАДН фиксируют равным 0.4 нс, пренебрегая вариациями времени затухания свободной формы [120]. В литературе имеется несколько гипотез относительно природы возникновения двух указанных временных компонент: рассматривается как роль конформации всей молекулы, так и отдельно роль никотинамидного фрагмента НАДН в формировании двух субпопуляций молекул, флуоресцирующих с разными временами [121,122]. В рамках первого класса гипотез считается, что свободная форма НАД(Ф)Н в растворе может существовать в двух конформациях [122], находящихся в динамическом равновесии, – свернутой и развернутой. Кинетика релаксации свободной формы НАД(Ф)Н описывается двумя компонентами с временами около 0.2 и 0.6 нс, при этом их спектральные свойства идентичны [119]. Большее время жизни соответствует свернутой конформации,

что было объяснено в статье [123] образованием эксиплекса (комплекса с переносом заряда, образующегося в возбужденном состоянии) при взаимодействии никотинамидного и аденинового колец. В рамках второго класса гипотез, которым на настоящий момент в литературе отдается предпочтение, показано, что неоднородность измеренных времен затухания НАДН обусловлена различным распределением заряда в цис- и транс-конфигурациях никотинамидного кольца, приводящим к различиям в распределении электростатического поля и скоростей безызлучательного затухания [121]. В рамках данной модели был также объяснен одноэкспоненциальный характер затухания флуоресценции в комплексе НАДН с ферментом алкоголь дегидрогеназой [124] как следствие малого разделения зарядов в никотинамидном фрагменте в условиях неполярного микроокружения в сайте связывания [122,125]. Было предположено, что аналогичными причинами можно объяснить также рост времени жизни флуоресценции НАДН при связывании его другими ферментами [126].

Рост времени жизни НАД(Ф)Н при связывании ферментами определяется конформацией кофактора в сайте связывания и ограничением его подвижности [121] и обусловлен, в первую очередь, уменьшением скорости нерадиационной релаксации. При этом время затухания флуоресценции увеличивается с 0.4 нс до 1 – 7 нс в зависимости от типа фермента, с которым взаимодействует молекула НАД(Ф)Н [122]. В клетках, где одновременно могут присутствовать связанная и свободная формы НАД(Ф)Н, кинетика релаксации флуоресценции НАД(Ф)Н обычно интерпретируется следующим образом: при биэкспоненциальной аппроксимации первая (короткая) компонента времени жизни флуоресценции приписывается свободной форме, а вторая – связанной. При этом известно, что, в связи с тем, что НАД(Ф)Н является кофактором для разнообразных ферментов, измеряемая кинетика релаксации является усредненной по системе флуорофоров с разными временами жизни.

Резюмируя, интенсивность флуоресценции и кинетика релаксации НАД(Ф)Н являются инструментами исследования биохимических процессов в клетках, в первую очередь связанных с метаболизмом, и широко применяются для фундаментальных исследований и биомедицинской диагностики, некоторые примеры чего приведены в Главе 7. В то же время подробный анализ фотофизических процессов с их участием в клетках до сих пор является актуальной задачей. Одним из подходов, позволяющих получить дополнительную информацию о редокс-состоянии клетки, является одновременное измерение с НАД(Ф)Н сигнала флавинадениндинуклеотида, ФАД, являющегося «комплиментарным» кофактором-индикатором метаболического состояния клеток.



### 1.3.3.2 Фотофизические процессы в ФАД и ФМН

В клетках флавинадениндинуклеотид (ФАД, структура изображена на рисунке 1.9А), флавинмононуклеотид (ФМН) и другие флавины являются кофакторами для ферментов, вовлеченных в окислительно-восстановительные процессы. Число флавопротеинов (ФП, фермент, с которыми взаимодействуют флавины) весьма велико, однако в большинстве из них флуоресценция флавиновых кофакторов затухает вследствие взаимодействия с белком [127,128].

Спектры поглощения ФАД в свободной и связанной формах практически идентичны и характеризуются наличием двух полос с максимумами в области 350 и 450 нм (Рис. 1.9Б), тогда как флуоресцентные свойства различаются заметным образом (Рис. 1.9В). Так, при связывании белками может наблюдаться тушение флуоресценции ФАД за счет переноса на него электрона с ароматических аминокислотных остатков [129]. Определяющую роль играет конформация ФАД при связывании – при наличии взаимодействия между двумя фрагментами молекулы время жизни и квантовый выход флуоресценции уменьшаются. Таким образом, флуоресцентные свойства ФАД сильно зависят от его окружения при встраивании в белковую макромолекулу.

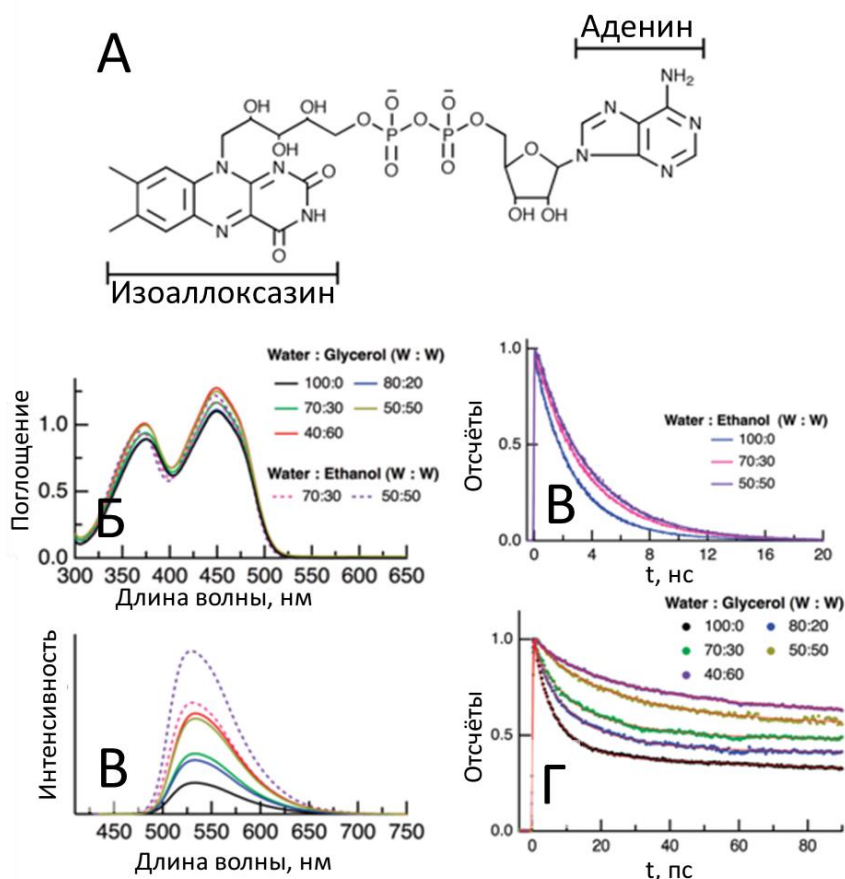


Рисунок 1.9 — А) Структура ФАД, флуоресценция обусловлена наличием в структуре изоаллоксазинового кольца. Б) Спектры поглощения ФАД. В) Спектры флуоресценции



ФАД. Г) Кинетика флуоресценции ФАД на наносекундном временном масштабе. Д) Кинетика флуоресценции ФАД на пикосекундном временном масштабе [130].

В отличие от НАД(Ф)Н, ФАД флуоресцирует, будучи в окисленной форме, тогда как квантовый выход флуоресценции его восстановленной формы незначителен [56]. Аналогично НАД(Ф)Н, флуоресцентные свойства ФАД зависят от его конформации: при стэкинге его фрагментов имеет место процесс переноса электрона, приводящий к тушению флуоресценции [131,132]; время жизни при этом составляет несколько пикосекунд. На наносекундном масштабе времен ФАД в растворах и живых клетках демонстрирует многоэкспоненциальный характер затухания флуоресценции. При физиологических рН и температурных условиях в растворе кинетика флуоресценции ФАД чаще всего описывается двумя экспонентами с временами жизни около 2.3 нс и 3.5÷4.5 нс [133–136]. Несмотря на многочисленные исследования, природа двух указанных компонент остается малоизученной.

Многоэкспоненциальное затухание флуоресценции для НАДН и ФАД также наблюдается на пикосекундном масштабе времен. Так, время затухания около 1 пс наблюдалось несколькими группами в НАДН [118,137,138] и ФАД [130,131,135,139–141], что было объяснено релаксацией воды вокруг возбужденного хромофора. Другое типичное пикосекундное время затухания – около 26 пс для НАДН [118,137] и около 5-9 пс для ФАД [130,135,139,140] – связано с пикосекундной релаксацией  $S_1 \rightarrow S_0$  и квазистатическим самогашением [142], приводящим к уменьшению наблюдаемого квантового выхода флуоресценции.

#### **1.3.4 Каротиноиды**

Каротиноиды представляют собой широкий класс пигментов, которые можно найти в грибах, водорослях, а также в фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих растительных клетках [143]. Они также присутствуют в тканях и клетках насекомых, рыб, моллюсков, птиц и отвечают за окраску этих животных. Благодаря своим противовоспалительным и антиоксидантным свойствам каротиноиды рассматриваются как перспективные терапевтические средства при лечении многих тяжелых патологий, таких как сердечно-сосудистые [144] и нейродегенеративные заболевания [145].

Каротиноиды необходимы для нормального функционирования некоторых органов и тканей в организме человека и выступают в качестве прекурсоров физиологически важных соединений. В частности, каротиноиды являются прекурсорами зрительных пигментов, отвечающих за свето- и цветовосприятие. Поскольку в организме человека каротиноиды не синтезируются, их наличие определяется поступлением в составе потребляемых продуктов

и фармакологических веществ. Каротиноиды широко представлены в коже [146,147] и в желтом пятне в макулярной области сетчатки [148].

Механизм абсорбции каротиноидов клетками человека реализуется за счет градиента концентрации, при этом возможна и пассивная их диффузия в абсорбирующие клетки кишечника (энтероциты) [149]. Также имеются данные о существовании специфических механизмов распознавания, захвата и транспорта каротиноидов специализированными белками в клетках человека [179]. Каротиноиды, циркулирующие в крови человека, в основном связаны с липопротеинами плазмы, выполняя роль дополнительных антиоксидантных протекторов в кровотоке [153]. Кроме того, сообщалось, что сывороточный альбумин человека способен образовывать специфические пигментно-белковые комплексы с каротиноидами [154,155], и эффективность связывания сильно зависит от типа каротиноида.

Фотофизические свойства каротиноидов удобно рассматривать, пользуясь моделью полиенов – линейных сопряженных цепочек атомов углерода (то есть с чередующимися одинарными и двойными связями). (Рис. 1.10) Поглощение света каротиноидами происходит через второе синглетное возбужденное состояние ( $S_2$ ), т.к. переход в низшее ( $S_1$ ) состояние является запрещенным. В предположении о том, что полиеновая цепь описывается группой симметрии  $C_{2h}$ , состояние  $S_2$  имеет симметрию  $B_u^+$ , и переход в него соответствует переходу электрона с HOMO на LUMO орбиталь, тогда как переход на уровень  $S_1$  (симметрия  $A_g^-$ , такая же, как у состояния  $S_0$ ) соответствует двойному переходу HOMO→LUMO. После фотовозбуждения состояние  $S_2$  распадается за несколько сотен фемтосекунд в состояние  $S_1$ , которое затем релаксирует в  $S_0$  на пикосекундном масштабе времени. При этом основным управляющим параметром, определяющим оптические свойства каротиноидов, является эффективная длина сопряжения  $N$   $\pi$ -орбиталей в них [156]: так, имеет место обратная зависимость между энергией  $S_0$ → $S_2$  перехода и длиной сопряжения  $N$  (то есть, спектры поглощения каротиноидов с большей длиной сопряжения сдвинуты в длинноволновую область) и между временем релаксации возбужденного состояния и  $N$ .

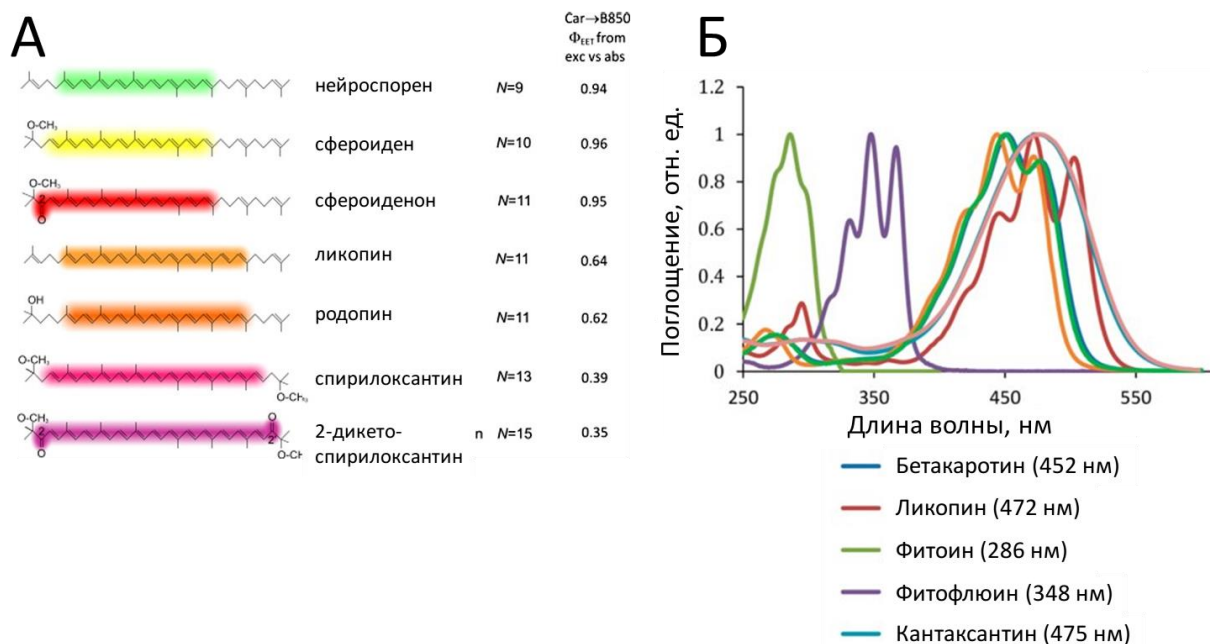


Рисунок 1.10 — А) Структура некоторых каротиноидов [157]. Б) Спектры поглощения некоторых каротиноидов в видимой области спектра [158].

Данная упрощенная модель релаксации, оперирующая двумя возбужденными состояниями, была далее дополнена промежуточными темными состояниями, локализованными между уровнями  $S_1$  и  $S_2$ , наличием которых можно объяснить ряд спектроскопических наблюдений, в частности, кинетику поглощения из возбужденного состояния.

Время жизни каротиноидов в возбужденном состоянии намного меньше, чем в других биологически значимых пигментах. Показано, что время жизни низшего возбужденного состояния каротиноидов укорачивается с увеличением длины сопряжения  $N$ . Для самого длинного природного каротиноида время жизни состояния  $S_1$  составляет 1 пс, а для наиболее длинных синтетических каротиноидов оно уменьшается до 500 фс [159,160]. Сверхбыстрая дезактивация возбуждения определяет низкий квантовый выход флуоресценции каротиноидов, и можно сказать, что в стационарных спектрах эмиссии и кинетике релаксации на субнаносекундном масштабе флуоресценция каротиноидов пренебрежимо мала.

Отметим также некоторые области биомедицинской фотоники, в которых исследуются и используются оптические свойства каротиноидов. Ряд работ посвящен детектированию каротиноидов в коже и крови с использованием методов резонансной спектроскопии КР [161] и спектроскопии диффузного рассеяния света [162], на которой основан прибор для неинвазивной оценки антиоксидантного статуса [163].

### 1.3.5 Тетрапирролы как основа некоторых эндогенных флуорофоров

В основе структуры нескольких физиологически важных молекул, обладающих ярко выраженными спектральными особенностями в видимой области спектра, лежат тетрапирролы. В данном разделе мы рассмотрим следующие классы эндогенных флуорофоров: порфирины (протопорфирин IX, уропорфирин, копропорфирин), комплекс порфирина с железом – гем (простетическая группа в гемопroteинах, в том числе в гемоглобине), а также продукты деградации гема.

#### 1.3.5.1 Порфирины

Порфирины представляют собой большую группу природных пигментов, структура которых состоит из тетрапиррольных макроциклов и металлических комплексов. На рисунке 1.11 представлена схема биосинтеза порфирина.

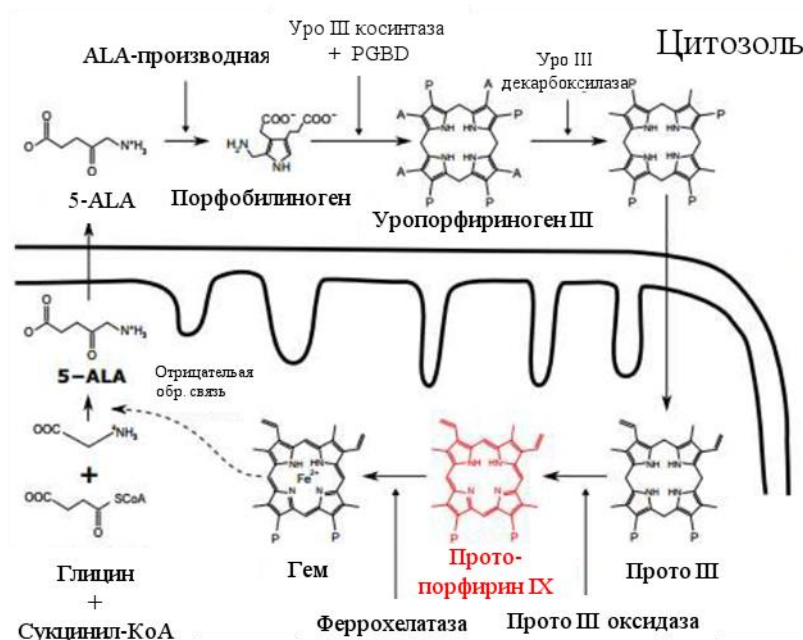


Рисунок 1.11 — Схема биосинтеза порфирина.

Биосинтез порфирина начинается в митохондриях с присоединения сукцинил-кофермента-А (CoA) к глицину, в результате чего образуется δ-аминолевулиновая кислота (АЛК). При конденсации двух молекул 5-АЛК образуется порфобилиноген, содержащий пиррольное кольцо, а затем в результате конденсации четырех молекул порфобилиногена синтезируется уропорфириноген. Из уропорфириногена образуется копропорфириноген III, который затем превращается в протопорфириноген IX. Окисление протопорфириногена IX приводит к образованию протопорфирина IX.

Порфобилиноген обладает полосой поглощения лишь в УФ области спектра, так же, как и порфириногены (уро-, копро- и прото-). Однако их окисление приводит к потере шести

атомов водорода и образованию сопряженной системы  $\pi$ -электронами (рис. 1.12А-Б), в результате чего у порфиринов появляются характерные оптические свойства – полосы поглощения в области 400-600 нм и полосы флуоресценции в области 600-700 нм (рис. 1.12В-Г).

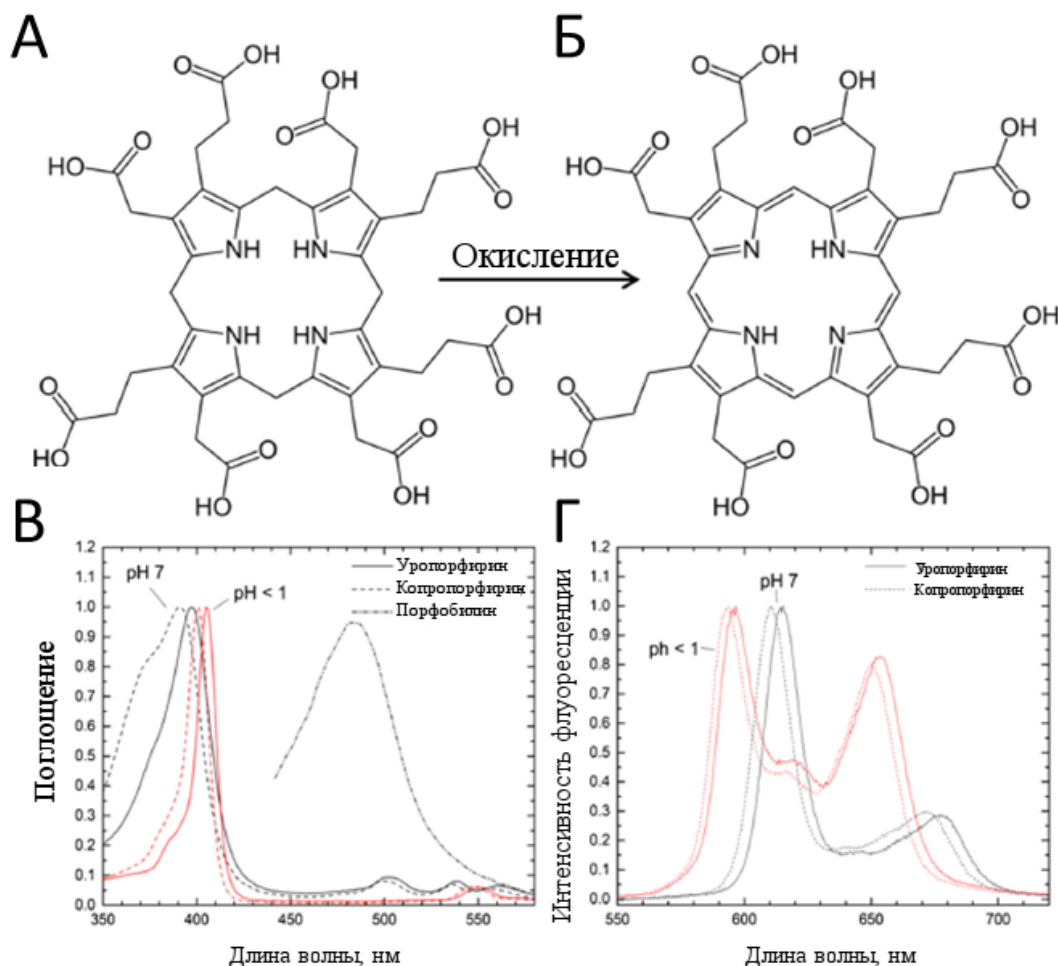


Рисунок 1.12 — А) Структурная формула уропорфириногена, который затем окисляется до уропорфирина (Б). Образование при этом сопряженной системы  $\pi$ -электронами приводит к появлению оптических свойств в видимом диапазоне спектра. В) Спектры поглощения уропорфирина, копропорфирина и протопорфирина. Г) Спектры поглощения уропорфирина, копропорфирина и протопорфирина. Красным и черным цветом показаны спектры для pH 1 и pH 7 соответственно.

Механизмы формирования оптических свойств порфиринов хорошо изучены, а их флуоресценция широко применяется в задачах биомедицинской диагностики. Во-первых, нашел применение в клинике метод фотодинамической диагностики, при котором в кровь пациента вводится  $\delta$ -аминолевулиновая кислота, прекурсор на пути образования протопорфирина IX в организме (см. рис. 1.11), повышенное накопление которой в раковых клетках приводит к появлению у них характерной красной флуоресценции (рис. 1.12Г), с помощью чего можно визуализировать раковую опухоль. Данный подход активно применяется, в частности, в нейроонкологии [164]. Во-вторых, согласно ряду работ

флуоресценция, связанная с наличием порфиринов, сама по себе (т.е. без введения δ-аминолевулиновой кислоты в кровотоки) значительно отличается для онкологических пациентов. Данный факт был продемонстрирован как для опухолевых тканей [165–167], так и для плазмы крови [168,169]. В-третьих, с использованием флуоресценции возможна диагностика некоторых заболеваний бактериальной природы. Например, флуоресцентная визуализация в красной области спектра используется для диагностики акне (угревой сыпи), при которой в порах кожи находятся бактерии, активно синтезирующие копропорфирин [170,171]. Также флуоресценция порфиринов применяется в стоматологии – флуоресцентная диагностика кариеса реализована в коммерчески доступных устройствах, например, Diagnodent [172].

#### 1.3.5.2 Гем и продукты его деградации

Большую роль в организме человека играют комплексы порфиринов с металлами (металлопорфирины), в первую очередь, гем – комплекс протопорфирина IX с ионом железа. Гем является протетической группой гемопroteинов (гемоглобина, миоглобина, цитохромов) и определяет их оптические свойства. Так, выше было показано, что ряд методов биомедицинской диагностики можно построить, используя спектральные особенности гемоглобина в качестве эндогенного контраста. Отметим, что несмотря на наличие нескольких интенсивных полос в спектре поглощения в области 400–600 нм, гем сам по себе не флуоресцирует, что связано с тушением возбужденного состояния тетрапиррольного макроцикла ионом железа и сверхбыстрым образованием нефлуоресцирующего комплекса с переносом заряда [173]. Вопрос о возможности использования флуоресценции производных гема для визуализации сосудов будет далее рассмотрен в Главе 6.

Механизмы релаксации возбужденного состояния гемоглобинов (карбоксигемоглобина, нитроксигемоглобина и дезоксигемоглобина) при возбуждении в Q-полосу были изучены в работе [174] с использованием время-разрешенной резонансной КР спектроскопии и спектроскопии поглощения из возбужденного состояния (Рис. 1.13). Было показано единообразие механизмов релаксации возбужденного гема в комплексе с лигандом и без него. Так, возбужденное состояние  $^1Q$  распадается последовательно через промежуточные состояния как  $^1Q \rightarrow \text{Hb}^*_{\text{I}} \rightarrow \text{Hb}^*_{\text{II}} \rightarrow \text{Hb}$  (основное состояние), а времена жизни этих состояний составляет 50 фс, 300 фс и 3 пс для  $^1Q$ ,  $\text{Hb}^*_{\text{I}}$  и  $\text{Hb}^*_{\text{II}}$  соответственно. При возбуждении происходит фотолиз (диссоциация лиганда) и образование состояния  $\text{Hb}^*_{\text{I}}$ , которое является результатом сверхбыстрого переноса заряда с иона железа на порфирин. Состояние  $\text{Hb}^*_{\text{II}}$  возникает в результате обратного переноса заряда с порфиринового кольца

на железо, при котором порфирин переходит в основное состояние, а железо находится в неравновесном состоянии (электрон находится на d-орбитали). Наконец, восстановление взаимодействия d- $\pi^*$  электронных подсистем железа и порфирина в состоянии  $\text{Hb}^*_{\text{II}}$  происходит на масштабе 3 пс. Таким образом, перенос заряда от железа к порфируну является ключевым событием в фотолизе двухатомных лигандов после  $\pi$ - $\pi^*$  перехода в порфириновом кольце и определяет низкий квантовый выход (по сути, отсутствие) флуоресценции у гемоглобина.

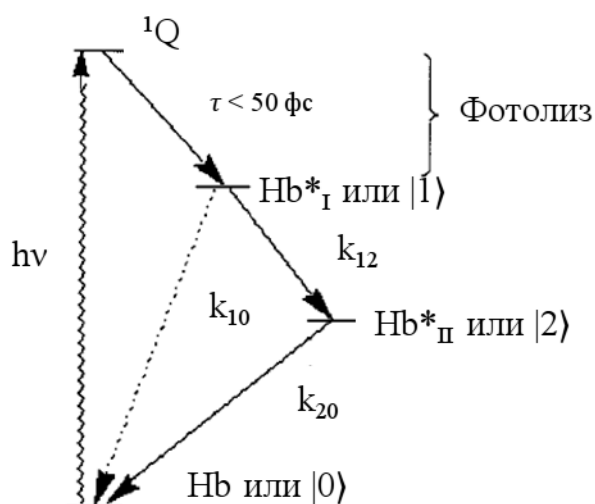


Рисунок 1.13 — Схема фотофизических процессов в гемоглобине при возбуждении в Q-полосу (волнистая стрелка). Фотоллиз (диссоциация лиганда) и перенос электрона с железа на порфирин приводят к образованию состояния  $\text{Hb}^*_{\text{I}}$ . Релаксация из состояния  $\text{Hb}^*_{\text{I}}$  в основное состояние (Hb) может происходить как напрямую (пунктирная линия), так и через промежуточное состояния  $\text{Hb}^*_{\text{II}}$ . [175]

В контексте фотофизики гема необходимо обсудить два вопроса. Во-первых, это изменение его электронной структуры при образовании ионом железа комплексов с лигандами – кислородом, CO, NO. При этом изменяется конформация как белковой матрицы, так и самого гема, в результате чего наблюдаются значительные изменения его спектров поглощения [176]. Во-вторых, при деградации гема от него отщепляется ион железа, и происходят другие химические модификации, приводящие к значительному изменению электронных спектров и, в частности, появлению флуоресценции [177].

В результате метаболизма гема в организме человека происходит его деградация, которая сопряжена с образованием новых хромофоров и флуорофоров, представляющих интерес для биомедицинской диагностики (Рис. 1.14).

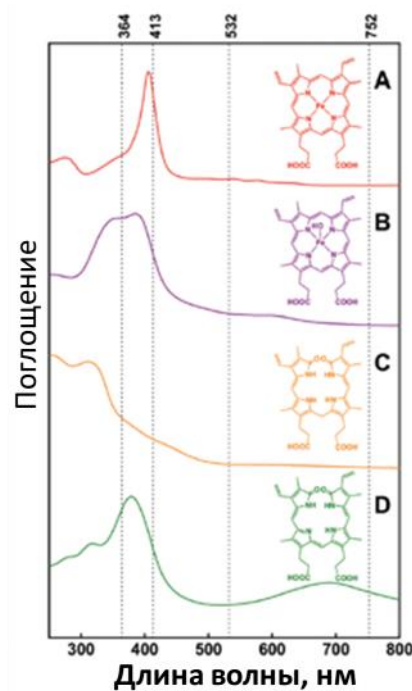


Рисунок 1.14 — Спектры поглощения гема (А), гематина (В), билирубина (С) и биливердина (D) [178].

В результате ряда биохимических процессов происходит отщепление гема от белковой матрицы и диссоциация иона железа. Далее из гема образуется биливердин, из которого потом образуется билирубин. Билирубин в крови присутствует в связанной форме, в основном в комплексе с альбумином. Билирубин в желчи попадает в печень, оттуда в малый кишечник и большой кишечник, где из него образуется уробилиноген. Железо, высвободившееся при деградации гемоглобина, связывается трансферрином и переносится обратно в костный мозг, где вновь используется для синтеза гема. Таким образом, в процессе метаболизма гема в организме образуются три хромофора: гем, биливердин и билирубин, а из билирубина образуются хромофоры уробилин и стеркобилин. Также отметим, что при деградации гемоглобина, отсоединении от гема железа и денатурации ферритина (белка-переносчика железа в организме) может образовываться пигмент гемосидерин, состоящий из оксидов железа. Спектральные особенности гемосидерина в видимой области спектра могут быть использованы для его детектирования в организме [179].

### 1.3.5.3 Билирубин

Одним из интересных с точки зрения оптики продуктов деградации гема является билирубин, фотофизические свойства которого представляют интерес в контексте определения его форм в крови, оценки связывающей способности компонентов плазмы крови (прежде всего альбумина) и управления процессом его фотоизомеризации.



Указанные задачи имеют прямое отношение к необходимости оптимизации диагностических и лечебных процедур для борьбы с токсичностью билирубина при гипербилирубинемии [210]. Второй областью интереса является гепатология, а именно оптическая биопсия печени и изучение патогенеза пигментных желчных камней [215].

Билирубин можно рассматривать как бихромофорную молекулу – в результате разрыва общей цепи сопряжения в циклическом тетрапирроле (геме) образуется линейная тетрапиррольная молекула (билирубин), которую можно рассматривать как соединение двух хромофоров [191,192] (Рис. 1.15А). С точки зрения фотофизики интерес представляет электронное взаимодействие между близко расположенными фрагментами-хромофорами билирубина и его влияние на кинетику релаксации возбужденного состояния [193,194], а также процессы фотоизомеризации билирубина [193].

Из-за различия структуры и микроокружения двух хромофорных фрагментов билирубина его спектральные характеристики могут меняться в зависимости от внешних условий, например, при связывании его белковой молекулой. Данный факт проявляется как в изменении формы спектра поглощения, так и в зависимости формы спектра флуоресценции от длины волны возбуждения (Рис. 1.15Б). В литературе имеется ряд работ, в которых изменение формы полосы поглощения билирубина в различном окружении описывается эффектами димеризации молекул [181,189,195], экситонного взаимодействия фрагментов молекулы и изменения их индивидуальных спектральных свойств [186,190,196–198].

Возбуждение раствора билирубина в фосфатном буфере в диапазоне длин волн 366–465 нм приводит к флуоресценции в области 500–600 нм, обладающей низким квантовым выходом в связи со сверхбыстрой релаксацией возбуждения (Рис. 1.15В)[199].

### Экситонное взаимодействие в билирубине

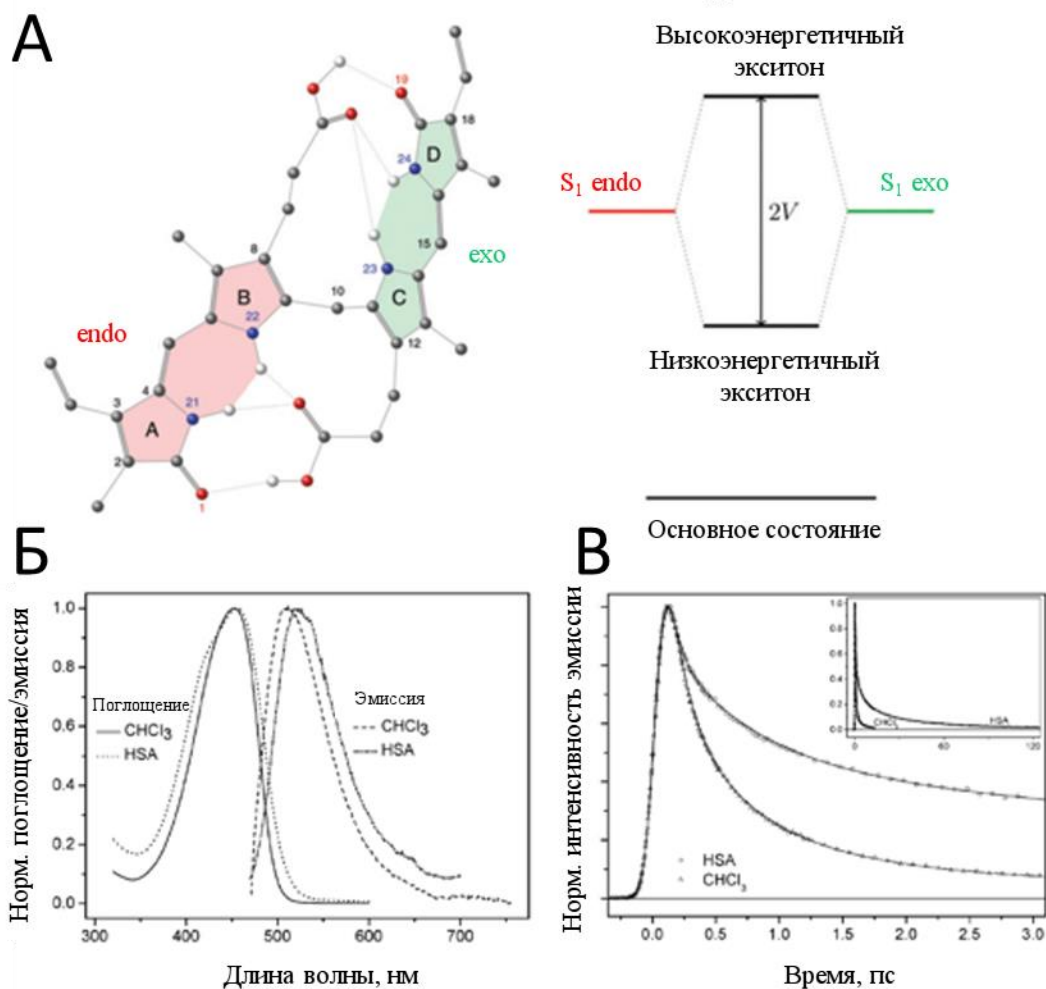


Рисунок 1.15 — А) Схематическое изображение молекулы билирубина как бихромофора, фрагменты которого обозначены красным (endo) и зеленым (exo) цветом [194]. Б) Спектры поглощения билирубина в фосфатном буфере в присутствии альбумина и в растворителе  $\text{CHCl}_3$ . В) Кинетика релаксации флуоресценции билирубина в фосфатном буфере в присутствии альбумина и в растворителе  $\text{CHCl}_3$  [193].

Методами сверхбыстрой спектроскопии для билирубина было показано наличие компоненты в затухании флуоресценции с характерным временем 150 фс и амплитудой около 50% [193], а также ее отсутствие в молекулах-фрагментах (половинах) билирубина. Таким образом, было предположено, что за наличие сверхбыстрой компоненты ответственно экситонное взаимодействие между фрагментами билирубина как бихромофора. В экситонной модели за счет взаимодействия дипольных моментов мономеров на близком расстоянии (при отсутствии ван-дер-ваальсового контакта) в спектре поглощения системы наблюдается расщепление. Относительная интенсивность возникающих в спектре поглощения полос определяется ориентацией дипольных моментов взаимодействующих мономеров, в результате чего для органических молекул могут

наблюдаться как сдвиги полосы поглощения в коротковолновую или длинноволновую область, так и уширение спектра.

С точки зрения биомедицинской диагностики важно, что свойства спектра поглощения билирубина можно использовать для определения его концентрации как в крови, так и транскутанным образом (т.е. через кожу). Точным неинвазивным способом диагностики и прогнозирования развития гипербилирубинемии является транскутанное (чрескожное) определение билирубина [200], основанное на измерении отражения света видимого спектрального диапазона от кожи. Вторым вопросом, связанным с гипербилирубинемией, является возможность ее лечения методом фототерапии, в основе которого лежит фотоизомеризация билирубина [206,214].

### 1.3.6 Меланин

Одним из ключевых хромофоров, определяющих оптические свойства в организме человека (например, цвет кожи, глаз и волос) является пигмент меланин. В литературе имеется ряд модельных структур меланинов, но, в целом, можно сказать, что они представляют собой гетерогенные полимеры, образующиеся в результате окисления фенолов и последующей полимеризации промежуточных фенолов и образующихся из них хинонов [204].

Спектр поглощения меланина в видимой и ближней ИК областях спектра хорошо описывается экспонентой, спадающей с длиной волны. При однофотонном возбуждении спектр автофлуоресценции меланина лежит в диапазоне 400-700 нм, также меланин способен флуоресцировать в ближней ИК области (820-920 нм) при ИК-возбуждении (~785 нм) [205–207]. Обзор методов детектирования и визуализации меланина методами классической и нелинейной оптики представлен в [208], а развитию методов КР спектроскопии, двухфотонной микроскопии с визуализацией времени жизни флуоресценции и сверхбыстрой спектроскопии для анализа меланина *in vivo* посвящена Глава 8.

Интересным является тот факт, что, несмотря на широкое использование оптических свойств меланина в биомедицинской диагностике, фотофизические механизмы, ответственные за формирование его спектральных особенностей, в частности спектра поглощения, до сих пор неизвестны. Так, в работе [209] с использованием квантово-механического моделирования было предположено, что экспоненциально спадающее с длиной волны поглощение меланинов определяется экситонным взаимодействием между олигомерами субъединиц в его структуре, при этом принципиально необходимым условием является наличие беспорядка в системе, то есть случайного распределения расстояний

между агрегатами и ориентаций их дипольных моментов. Второй класс гипотез предполагает, что спектральные свойства меланина определяются наложением спектров его компонент – такая модель носит название «химического беспорядка» [209–211]. Исследованию фотофизических процессов в меланине и верификации моделей формирования его оптического отклика посвящен ряд работ, в том числе с использованием методов сверхбыстрой спектроскопии [212]. Тем не менее на данный момент имеются подтверждения в пользу каждой из гипотез, что, вероятно, говорит о том, что оба механизма дают вклад в формирование оптических свойств меланина. Ниже мы кратко рассмотрим модель экситонного взаимодействия, которая, на наш взгляд, интересна по двум причинам: (1) она дает представление о пространственной организации меланина как частицы, составленной из множества флуорофоров и (2) показывает, как взаимодействие между флуорофорами может приводить к единообразию оптических свойств системы вне зависимости от состава ее компонент.

Отдельные субъединицы меланина (например, тетрамеры) образуют агрегаты, что подтверждается как результатами молекулярной динамики, так и с помощью просвечивающей электронной микроскопии [209,213]. Таким образом, из-за близости флуорофоров в данной системе нельзя пренебрегать межмолекулярным электронным взаимодействием при рассмотрении ее оптических свойств [209,214].

В работе [209] с помощью методов молекулярной динамики и квантовой химии исследуется вопрос влияния межмолекулярного взаимодействия олигомеров меланина на оптические свойства системы [215,216]. Авторы [209] показывают, что для наблюдения монотонной зависимости величины поглощения от длины волны достаточно использовать один тип олигомера, по-разному взаимодействующего с его ближайшим окружением. Для оценки оптических свойств агрегатов авторами используется модель экситонов Френкеля, в рамках которой за счёт взаимодействия 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 [217].

### **1.3.7 Эндогенные флуорофоры в красном и ближнем ИК спектральных диапазонах**

Как было указано выше, одним из основных преимуществ экзогенных меток для оптической визуализации и диагностики является то, что их спектр возбуждения и эмиссии флуоресценции может быть смещен в красную область видимой части спектра и в ближний ИК диапазон. Такой диапазон длин волн (от 650 до 900 нм) соответствует окну прозрачности биологических тканей, в котором основная часть эндогенных хромофоров

обладает небольшим поглощением [218]. Использование сигнала флуоресценции, возбуждаемого в красном/ближнем ИК диапазоне, таким образом, позволяет увеличить глубину проникновения зондирующего излучения в ткани. В связи с этим актуальным является исследование возможности использования флуоресцентного отклика от эндогенных флуорофоров, которые обладали бы возбуждением и эмиссией в красной области видимой части спектра и в ближнем ИК диапазоне.

Интересным фактом является то, что природа автофлуоресценции тканей и клеток в красном и ближнем ИК спектральных диапазонах по большей части остается неизвестной. Далее мы кратко рассмотрим важные с точки зрения биомедицинской оптики примеры, когда эндогенную красную и ИК флуоресценцию можно использовать в качестве диагностического критерия, а также основные гипотезы, объясняющие механизмы формирования этой флуоресценции.

Экспериментальные факты говорят о том, что существует ряд эндогенных флуорофоров, которые обладают флуоресцентным откликом при возбуждении в красной области и в ближнем ИК диапазоне. Так, в работе [219] было показано, что для анализа степени опасности атеросклеротических бляшек может быть использована ИК автофлуоресценция (АФ). Была обнаружена повышенная ИК АФ у бляшек, в которых наблюдались геморрагии, и на основе колокализации сигнала ИК АФ с окраской на билирубин было предположено, что именно он является ее источником. На лабораторных животных с модельным атеросклерозом с помощью диффузной оптической томографии было показано, как можно детектировать бляшки неинвазивно. Параллельно с этим ИК АФ для анализа состояния бляшек активно применялась группами G. Tearney и F. Jaffer [220]. В работе было предположено, что флуорофором, ответственным за ИК флуоресценцию, является цероид – пигмент, образующийся в клетках при окислении липидов [221]. Клинические испытания интракоронарной ИК АФ/ОКТ системы продемонстрировали ее возможности в обнаружении опасных бляшек [220]. В то же время вопрос о природе ИК АФ атеросклеротических бляшек до сих пор остается дискуссионным.

Еще одной актуальной областью применения ИК АФ является эндокринология, а именно визуализация паращитовидных желез (ПЩЖ). ПЩЖ имеют размер всего несколько миллиметров и находятся в жировой ткани, что делает трудным их визуальное обнаружение во время операции. Кровоснабжение ПЩЖ может быть нарушено во время операции, а повреждение всех четырех ПЩЖ приводит к гипопаратиреозу и гипокальциемии [222]. Детектирование и визуализация ПЩЖ является одним из успешных примеров клинического применения биомедицинской фотоники. Было обнаружено, что ПЩЖ обладает интенсивной по сравнению с окружающими тканями флуоресценцией в ближнем

ИК спектральном диапазоне (700-1000 нм) [223–226]. Данное свойство позволяет идентифицировать ПЩЖ во время операции как с помощью волоконного зонда (коммерчески доступный прибор – РТeye (Medtronic, США) [260]), так и за счет визуализации с помощью камеры, например прибора Fluobeam (Fluoptics, Франция) [259]. Интересно, что, несмотря на использование флуоресценции ПЩЖ в качестве клинического диагностического метода, природа флуорофора, ответственного за свечение ПЩЖ в ИК, остается неизвестной [231,232].

Также интересно, что в некоторых работах эндогенный флуоресцентный отклик клеток в красном и ИК диапазонах используется сугубо феноменологически как предиктор, позволяющий выявлять изменения в тканях или же классифицировать нормальные и патологические участки тканей. Так, флуоресцентный отклик тканей, наблюдаемый в красном и инфракрасном диапазоне спектра, позволяет дискриминировать здоровые и опухолевые различных типов тканей *ex vivo* и *in vivo*[233–235]. При этом сигнал в опухолевых тканях обычно является пониженным, но причина данного эффекта не обсуждается.

В большинстве случаев, системы эндогенных флуорофоров тканей, которые обладают флуоресцентным откликом при возбуждении в красной области, представляют собой не какую-то конкретную молекулу-флуорофор, а гетерогенную систему, состоящую из большого числа различных по химическому строению молекул. Отличительной особенностью таких систем является то, что спектр поглощения не имеет каких-то выделенных линий поглощения, а монотонно спадает в зависимости от длины волны возбуждения во всем видимом и ближнем ИК диапазоне, при этом спектры поглощения хорошо описываются экспонентой, спадающей с ростом длины волны. Благодаря наличию поглощения во всем видимом и ближнем ИК диапазоне длин волн, в таких системах может быть возбуждена флуоресценция, причём спектральные характеристики флуоресцентного отклика будут зависеть от длины волны возбуждения – максимум спектра флуоресценции сдвигается при изменении длины волны возбуждения, изменяется интенсивность флуоресценции, а также спектральная ширина линии флуоресценции на полувысоте.

Наиболее исследованным объектом в данном классе гетерогенных систем является меланин, рассмотренный в предыдущем разделе. Спектры однофотонной флуоресценции и поглощения меланина приведены в работе [236] и, действительно, спектр поглощения не имеет характерных линий поглощения и монотонно спадает с длиной волны, а максимум спектра флуоресценции сдвигается с изменением длины волны возбуждения, при этом сигнал флуоресценции может быть возбужден даже с использованием длин волн  $>700$  нм. Однако не только меланин обладает такими фотофизическими свойствами. Так, в работе

[5] было показано, что агрегаты белков и амилоидные фибриллы, образованные из различных полипептидов (бета-амилоидные пептиды, альфа-синуклеин, HSA, инсулин, альфа-лактальбумин, лизоцим) обладают ИК-флуоресценцией, при этом положение максимума спектра флуоресценции также сдвигается при изменении длины волны возбуждения. Флуоресцентный сигнал в ИК диапазоне от белковых образований позволил производить неинвазивное детектирование амилоидных бляшек. Также известно, что липофусцин – гетерогенный пигмент, образующийся в результате процессов старения – тоже обладает монотонно спадающим в зависимости от длины волны спектром поглощения и флуоресценцией, которая изменяется при изменении длины волны возбуждения [83]. Также следует отметить, что интенсивный флуоресцентный фон при возбуждении на 690 и 785 нм наблюдается при измерениях спектров комбинационного рассеяния от участков нормальных и опухолевых тканей почек [237], при этом в некоторых случаях уровень флуоресцентного сигнала для опухолевых тканей ниже, чем для нормальных тканей. Флуоресцентный фон наблюдается при измерении спектров комбинационного рассеяния от кожи при возбуждении на 638 и 785 нм [238] – по всей видимости, флуоресцентный отклик также обусловлен наличием системы гетерогенных флуорофоров, однако систематического описания того, как именно наблюдаемый флуоресцентный сигнал зависит от свойств тканей, нет в литературе. Из приведенного выше краткого обзора следует, что совершенно различные по исходному составу системы – меланин, представляющий собой агрегаты мономеров и олигомеров 5,6-дигидроксииндола и других аминокислот, амилоидные фибриллы, образованные из различных типов белков, липофусцин – обладают схожими фотофизическими свойствами. Исследованию гетерогенных систем флуорофоров и механизмам формирования оптических свойств в них посвящены Главы 3 и 4 данной работы.

## **Глава 2. Эндогенные флуорофоры в УФ диапазоне: собственная флуоресценция белков**

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A3-A8].*

### **2.1 Введение и постановка задачи**

Естественные ограничения, связанные с необходимостью работы с УФ излучением и сопутствующими ему высоким поглощением и фототоксичностью при измерении собственной флуоресценции белков, определили нишу применения данного метода в биомедицинской диагностике. В связи с достаточно высокой чувствительностью параметров собственной флуоресценции белков к изменению их структуры и окружения, данный подход используется для решения трех основных классов задач:

1. исследование структурных изменений белковых макромолекул, в том числе конформационной динамики;
2. определение эффективности взаимодействия (констант комплексообразования) для систем белок-лиганд и белок-белок;
3. диагностика патологических процессов в организме человека с использованием спектроскопии биожидкостей (плазмы крови, спинномозговой жидкости, мочи).

При решении всех трех вышеуказанных задач можно проводить измерения собственной флуоресценции в растворах, что, безусловно, является преимуществом в сравнении с измерениями на клетках и тканях. С другой стороны, для исследования структуры и взаимодействия молекул в растворе (задачи 1 и 2) и, тем более, анализа сложной смеси (задача 3) на данный момент существует множество неоптических методов, обладающих чувствительностью, специфичностью и информативностью, превышающими таковые для собственной флуоресценции белков. В качестве примера приведем спектроскопию ядерного магнитного резонанса и малоугловое рентгеновское рассеяние для анализа структуры (задача 1), калориметрию, хроматографию и биохимические методы для определения константы комплексообразования (задача 2) и омиксные технологии (протеомику, метаболомику, липидомику и др.) в контексте анализа биожидкостей (задача 3). Тем не менее методы, основанные на собственной флуоресценции белков, остаются популярными в связи с рядом преимуществ, которые будут рассмотрены ниже для каждой из задач.

В рамках данной Главы будут рассмотрены два вопроса из области эндогенной флуоресценции белковых молекул. В разделе 2.2 будет представлен анализ возможностей использования собственной флуоресценции белков для определения параметров межмолекулярного взаимодействия (задача 1), а именно продемонстрирована



некорректность подхода на основе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения параметров и числа сайтов связывания в системе, а затем предложен оригинальный алгоритм для решения этой задачи. В разделе 2.3 проанализированы возможности выделения вклада тирозиновой флуоресценции из сигнала собственной флуоресценции белков и использования его для отслеживания конформационных изменений (задача 2): на ряде модельных систем доказано, что флуоресценция Туг может служить более чувствительным индикатором структурных перестроек и связывания лигандов, чем флуоресценция Тгр. Обсуждению возможностей решения задачи (3), т.е. анализу биожидкостей с использованием сигнала эндогенных флуорофоров, посвящена Глава 5.

## **2.2 Использование УФ флуоресценции белковых макромолекул для исследования межмолекулярных взаимодействий**

### **2.2.1 Определение константы комплексообразования с использованием собственной флуоресценции белков**

Одной из областей применения собственной флуоресценции белков и пептидов является измерение параметров межмолекулярного взаимодействия. Данная задача является одной из центральных в биохимии и фармакологии и заключается в оценке эффективности комплексообразования между веществами. Для ее решения существует множество методов, суть которых заключается в том, что к веществу А добавляется известная концентрация вещества В, и при этом имеет место концентрационная зависимость некоторого физического параметра – оптической плотности, выделяемого тепла (соответствующий метод – изотермическая калориметрия [239], показателя преломления (а также интерферометрии обратного рассеяния [240]), размера молекулы, спектральных характеристик и т.д. Альтернативным подходом является препаративный анализ системы, например, с использованием микродиализа [241] или хроматографии [242]. Далее, концентрационная зависимость измеряемого параметра обрабатывается с использованием заданной модели комплексообразования. В первом приближении параметрами модели комплексообразования является число сайтов связывания (стехиометрия комплекса) и константы комплексообразования для каждого из сайтов.

В связи с тем, что во многих классах задач одним из участников взаимодействия является белковая молекула, использование собственной флуоресценции белков для оценки константы комплексообразования оказалось достаточно удобным методом. В основе данного метода лежит чувствительность формы полосы и интенсивности флуоресценции

белка к образованию им комплекса с лигандом. В частности, на измерении собственной флуоресценции белков основана коммерческая система NanoTemper Label-free, реализующая метод микротермофореза [243]. Также весьма распространенным является метод тушения собственной флуоресценции в случаях, когда флуоресценция белка уменьшается при связывании им лиганда [56] – некоторые вопросы относительно этой методики будут рассмотрены в данном разделе.

Поскольку до сих пор существует путаница в терминологии, касающейся различных типов тушения, рассмотрим кратко возможные механизмы тушения флуоресценции в соответствии с терминологией работы [244]. В системах, где флуорофор и тушитель являются разными молекулами, можно выделить два типа тушения: столкновительное тушение (при этом требуется диффузия, чтобы тушитель оказался достаточно близко к флуорофору) и тушение, вызванное непосредственно связыванием (часто называемое «статическим», подразумевающее, что в образовавшемся комплексе процесс тушения происходит немедленно после возбуждения (за  $\sim 1$  пс), например, за счет конического пересечения потенциальных поверхностей или переноса заряда) [244]. Эффективность тушения, вызванного образованием комплекса белок-лиганд, определяется константой диссоциации комплекса, следовательно, измеряя зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации лиганда, можно определить параметры связывания в системе [56]. Однако даже в предположении статического тушения следует рассматривать два различных случая: первый – когда флуоресценция комплекса белок-лиганд незначительна по сравнению с флуоресценцией белка (т.е. полное тушение), второй – когда флуоресценция комплекса белок-лиганд меньше, но сопоставима с флуоресценцией белка (т.е. неполное тушение). Очевидно, что константы диссоциации, рассчитанные на основе параметров тушения флуоресценции, полученные в случае неполного тушения, могут существенно отличаться от реальных. Следовательно, понимание зависимости квантового выхода флуорофора (белка) от числа занятых сайтов связывания имеет определяющее значение для правильной интерпретации данных метода тушения флуоресценции.

Следует отметить, что связывание лиганда с белком не обязательно приводит к тушению флуоресценции, известны также системы с усилением флуоресценции [245]. Действительно, изменение параметров флуоресценции при связывании лигандов с белками может быть довольно сложным [246], однако в данной работе мы сосредоточимся на наиболее распространенном случае, когда интенсивность собственной флуоресценции белка уменьшается при связывании лиганда. В литературе предложен ряд методов, позволяющих оценить количество сайтов связывания по зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации лиганда [247–249]. Тем не менее, эти методы требуют

измерения нескольких кривых титрования в режиме, когда концентрация лиганда должна быть высокой и значительно превышать характеристическую константу диссоциации комплекса [248,249], что иногда невозможно из-за артефактов типа эффекта внутреннего фильтра или малого количества доступного лиганда. В данном разделе мы рассмотрим вопрос о том, насколько корректны используемые в литературе методы определения параметров связывания по кривым тушения собственной флуоресценции белков, а также проанализируем, какую информацию теоретически можно получить из подобных экспериментов.

### 2.2.2 Ограничения метода тушения флуоресценции для определения константы комплексообразования

Рассмотрим сначала случай образования комплекса белок-лиганд со стехиометрией 1:1:



где P, Q и PQ соответствуют белку, тушителю и комплексу соответственно. Связь между равновесными концентрациями в этой системе может быть выражена как

$$\frac{[P]_T}{[P]} = 1 + K_A[Q], \quad (2.2)$$

где  $[P]_T$ ,  $[P]$  и  $[Q]$  – полная концентрация белка и равновесные концентрации белка и тушителя, соответственно, а  $K_A$  – константа связывания. Уравнение Штерна-Фольмера выводится из (2.2) при следующих предположениях:

- (i) концентрация комплекса намного меньше концентрации тушителя ( $[PQ] \ll [Q]$ ), что дает  $[Q] \approx [Q]_T$ ;
- (ii) квантовый выход флуоресценции комплекса приблизительно равен нулю (полное тушение), таким образом, интенсивность флуоресценции  $F$  пропорциональна  $[P]$ .

При этих предположениях уравнение (2.2) переходит в уравнение Штерна-Фольмера:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q]_T, \quad (2.3)$$

где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя, а  $K_{SV}$  – константа Штерна-Фольмера, которая используется в качестве меры эффективности связывания в экспериментах по тушению флуоресценции.

Нарушение предположений (i–ii) может привести к несоответствию между  $K_{SV}$  и истинной константой связывания  $K_A$  рассматриваемой системы лиганд-белок. Во-первых, влиянием равновесной концентрации комплекса  $[PQ]$  нельзя пренебрегать при больших константах связывания  $K_A$ , когда связана значительная часть молекул лиганда. Этот факт становится особенно важным при использовании метода тушения флуоресценции для изучения связывания белков с лекарствами (фармакологическими субстанциями), которые обычно

характеризуются высокими значениями констант комплексообразования [250]. Кроме того, вывод уравнения Штерна-Фольмера (2.3) подразумевает, что квантовый выход  $\eta$  комплекса равен нулю, что, как будет показано ниже, не выполняется для ряда систем.

Для того чтобы учесть, что полная концентрация тушителя не равна его равновесной концентрации, следует использовать процедуру нелинейной аппроксимации и модифицированное уравнение Штерна-Фольмера [251]. Коррекция на невыполнение условия (i), которая может быть применена к экспериментальным данным, чтобы визуально проверить, является ли влияние разницы между общей и равновесной концентрацией значительной, может быть осуществлена следующим образом.

Равновесная концентрация тушителя может быть вычислена как:

$$[Q] = [Q]_T - [PQ] = [Q]_T - [P]_T \left(1 - \frac{[P]}{[P]_T}\right). \quad (2.4)$$

Предполагая, что квантовый выход комплекса равен нулю, уравнение (3) можно переписать в виде:

$$y = 1 + K_A \left( [Q]_T - [P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right) \right), \quad (2.5)$$

где  $y = F_0/F$ . Тогда, если перестроить кривые тушения в новых осях, а именно в координатах  $y$  от  $[Q]_T - [P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right)$  (вместо  $y([Q]_T)$ ), можно провести коррекцию нелинейности, связанной с различиями между полной и равновесной концентрациями тушителя. Кривые тушения флуоресценции, рассчитанные для  $K_A = 10^6 \text{ M}^{-1}$  и различных  $[P]_T$ , представлены на рисунке 2.1А, где видна значительная разница в их наклоне. Этот факт связан с нарушением предположения (i) при высоких значениях  $[P]_T$ . Предложенная поправка, то есть перестроение кривых тушения флуоресценции в осях  $y$  от  $[Q]_T - [P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right)$ , дает совпадающие линии с наклоном, равным  $K_A$  (Рис. 2.1Б).

В качестве критерия существенного различия между  $[Q]$  и  $[Q]_T$  нами было выбрано ограничение  $[Q]/[Q]_T \leq 0.9$  (т.е.  $[PQ] > 10\%$  от  $[Q]_T$ ) – в данном случае нужна коррекция на нарушение предположения (i). На рисунке 2.1В приведена диаграмма в координатах  $(K_A \cdot [P]_T; [Q]_T/[P]_T)$ , на которой серым цветом отмечена область  $[Q]/[Q]_T \leq 0.9$ , с использованием которой можно оценить необходимость коррекции на невыполнение (i) для систем с комплексообразованием 1:1 – в противном случае применение уравнения Штерна-Фольмера (2.2) будет приводить к большой погрешности при оценке  $K_A$ .

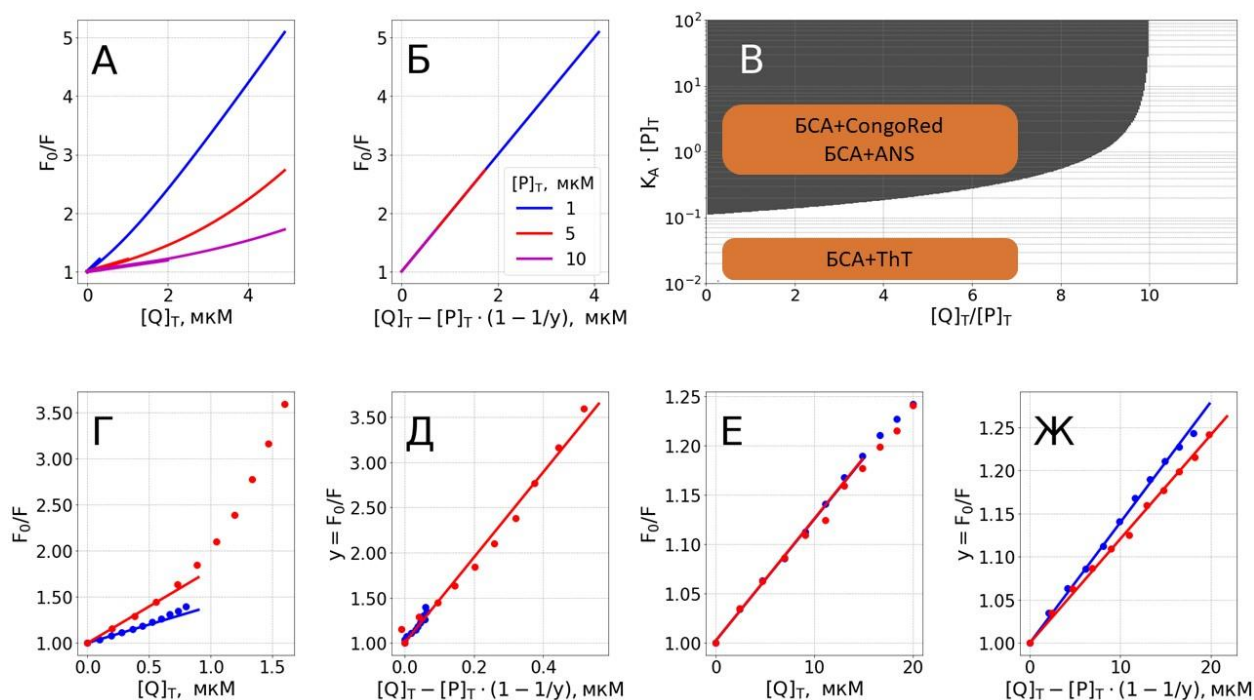


Рисунок 2.1 — А) Кривые тушения флуоресценции, рассчитанные для  $K_A = 10^6 \text{ M}^{-1}$  и различных  $[P]_T$  с использованием уравнения (2). Б) Кривые тушения флуоресценции с рис. 1а с поправкой на разницу между полной и равновесной концентрациями тушителя путем построения графика в координатах  $y$  от  $[Q]_T - [P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right)$ . В) Диаграмма параметров ( $K_A \cdot [P]_T$ ;  $[Q]_T/[P]_T$ ) для модели комплексообразования 1:1 с указанием областей значений параметров, в которых необходимо учитывать поправку на разницу между полной и равновесной концентрациями тушителя (серая область). Г-Д) Кривые тушения флуоресценции  $T_{gr}$  для системы БСА-Congo Red до (Г) и после (Д) процедуры коррекции. Е-Ж) Кривые тушения флуоресценции для системы БСА-ThT до (Е) и после (Ж) процедуры коррекции.

Чтобы проиллюстрировать важность учета невыполнения соотношения (i), т.е.  $[Q] \approx [Q]_T$ , были проведены эксперименты для модельных систем с высокой и низкой константами комплексообразования: БСА и красителями Congo Red (CR) тиофлавинов Т (ThT), соответственно. Все эксперименты по измерению эндогенной флуоресценции белков в данной Главе были выполнены с использованием флуориметра FluoroMax-4 (Horiba, Япония); возбуждение флуоресценции  $T_{gr}$  проводилось на длине волны 295 нм (если не указано иное), спектральные ширины щелей на монохроматорах возбуждения и эмиссии составляли 5 нм, измерения проводились в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см, при этом оптическая плотность на длине волны возбуждения всегда была ниже 0.1. Система БСА-CR характеризуется значением  $K_A \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$  [252,253], следовательно, при изменении полной концентрации белка в диапазоне 1–10 мкМ необходимо учитывать разницу между равновесной и полной концентрацией тушителя. В то время как кривые тушения флуоресценции для различных  $[P]_T$  существенно различались (Рис. 2.1Г), поправка на  $[Q] \neq [Q]_T$  с использованием уравнения (2.5) привела к их совпадению (Рис. 2.1Д).

Наклон кривых тушения флуоресценции (т.е., в соответствии с (2.2),  $K_A$ ), полученных из нескорректированных графиков тушения флуоресценции (Рис. 2.1Г, варьировался в два раза для различных концентраций белка ( $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  для  $[P]_T = 2.6 \text{ мкМ}$  и  $10^6 \text{ M}^{-1}$  для  $[P]_T = 1.5 \text{ мкМ}$ ), тогда как для скорректированных графиков константа комплексообразования составила  $4.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $5.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  для  $[P]_T = 1.5 \text{ мкМ}$  и  $[P]_T = 2.6 \text{ мкМ}$  соответственно. Для системы БСА-ThT, напротив, константа комплексообразования низка [253], кривые тушения флуоресценции, измеренные при разных концентрациях белка, совпадают, и коррективка на различия между  $[Q]$  и  $[Q]_T$  не нужна (Рис. 2.1Е–Ж).

Обратимся теперь ко второму предположению, использованному при выводе уравнения Штерна-Фольмера, о том, что квантовый выход  $\eta$  комплекса равен нулю. Поскольку это предположение нарушается в ряде систем, возникает вопрос, можно ли доказать путем анализа кривых флуоресценции, что величина  $\eta$  отлична от нуля. Отношение  $F_0/F$  для комплексообразования 1:1 в случае ненулевого квантового выхода может быть описано следующим выражением:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\eta_{\text{Protein}}[P]_T}{\eta_{\text{Protein}}[P] + \eta_{\text{PQ}}[PQ]} = \frac{[P]_T}{[P] + \eta[PQ]} = \frac{[P]_T}{[P]_T + (\eta - 1)[PQ]}, \quad (2.6)$$

где  $\eta = \eta_{\text{PQ}}/\eta_{\text{Protein}}$  – относительный квантовый выход комплекса ( $0 \leq \eta < 1$ ). Измеряя  $y = F_0/F$ , можно оценить значение  $[PQ]$ :

$$[PQ] = \frac{[P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right)}{1 - \eta}. \quad (2.7)$$

Концентрация свободного тушителя может быть выражена как:

$$[Q] = [Q]_T - [PQ] = [Q]_T - \frac{[P]_T \left(1 - \frac{1}{y}\right)}{1 - \eta}. \quad (2.8)$$

Затем, комбинируя уравнение (2.2) и уравнение (2.7), получим:

$$y = \frac{F_0}{F} = \frac{[P]_T}{[P] + \eta[PQ]} = \frac{1 + K_A[Q]}{1 + \eta K_A[Q]}. \quad (2.9)$$

Наконец, подставив (2.8) в (2.9), можно получить следующее параметрическое уравнение:

$$\frac{y-1}{1-\eta y} = K_A \left( [Q]_T - [P]_T \frac{1-\frac{1}{y}}{1-\eta} \right). \quad (2.10)$$

Уравнение (2.10) описывает зависимость коэффициента тушения флуоресценции  $F_0/F$  от общей концентрации флуорофора  $[P]_T$  и тушителя  $[Q]_T$  без предположений  $[Q] \approx [Q]_T$  и  $\eta_{\text{PQ}} \approx 0$ . Чтобы определить значения  $\eta$  и  $K_A$ , требуется измерить по крайней мере две кривых тушения флуоресценции для разных значений  $[P]_T$ , а затем совместно аппроксимировать их

формулой (2.10). Основная идея этого подхода заключается в том, что уравнение (2.10) позволяет рассматривать значения  $y$  как функцию  $y = y([Q]_T, [P]_T, K_A, \eta)$  с двумя независимыми переменными  $[P]_T$  и  $[Q]_T$  и двумя параметрами  $K_A$  и  $\eta$ . Таким образом, становится возможным оценить эти параметры.

Уравнение (2.10) можно было бы также переписать в форме, предложенной в работе [251], однако использование кривой титрования для одной концентрации белка может привести к плохой точности определения константы связывания  $K_A$  и относительного квантового выхода  $\eta$ . Чтобы продемонстрировать это, были смоделированы кривые тушения флуоресценции для системы со стехиометрией 1:1 и неполным тушением с  $K_A = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $\eta = 0.3$  для двух концентраций белка  $[P]_T = 1 \text{ мкМ}$  и  $[P]_T = 10 \text{ мкМ}$ , при этом общая концентрация тушителя  $Q$  варьировалась таким образом, что соотношение  $F_0/F$  было ниже 1.5 для обеих концентраций белка. Было обнаружено, что константа связывания и относительный квантовый выход флуоресценции комплекса, полученные при  $[P]_T = 1 \text{ мкМ}$ , равны  $K_A = (1.53 \pm 0.21)10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $\eta = 0.15 \pm 0.08$ , в то время как для  $[P]_T = 10 \text{ мкМ}$   $K_A = (9 \pm 4) 10^5 \text{ M}^{-1}$  и  $\eta = 0.0001 \pm 0.0019$ . При этом одновременное использование двух кривых титрования и уравнения (2.10) дает значения  $K_A = (1.8 \pm 0.3) 10^6 \text{ M}^{-1}$  и  $\eta = 0.26 \pm 0.02$ , что в пределах погрешности совпадает с истинными значениями. Следовательно, необходим анализ как минимум двух кривых, измеренных при разных значениях  $[P]_T$ .

### **2.2.3 Неприменимость модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения числа сайтов связывания**

Обсудим далее вопрос о возможности определения числа сайтов связывания с использованием метода тушения флуоресценции. В настоящее время для решения данной задачи часто используется модифицированное, или «log-log» уравнение Штерна-Фольмера. Однако ряд авторов, в том числе наша группа [254], показали, что такой подход некорректен [251,255–257]. Вопрос о возможности получения информации о стехиометрии комплекса с помощью флуоресцентных методов подробно рассмотрен в работах [248,249]. Как было показано в предыдущем разделе, для определения точного количества сайтов связывания критически важно измерить несколько кривых титрования с концентрациями лиганда до значений, значительно превышающих  $1/K_A$ . В данной работе был предложен метод обработки данных тушения флуоресценции в области параметров, где насыщение не достигается, чтобы достоверно проверить гипотезу о том, имеется ли в системе один сайт связывания ( $n = 1$ ) или несколько. Обратимся сначала к вопросу о том, почему использование модифицированной формы уравнения Штерна-Фольмера, реализующейся во множестве работ, является некорректным.

Предпосылки к выводу модифицированного уравнения Штерна-Фольмера следующие. Рассмотрим систему с  $n$  сайтов связывания и взаимодействие в ней по аналогии с (2.1):



Далее, константа комплексообразования в предположении идентичности сайтов связывания определяется как

$$K_A = \frac{[PQ_n]}{[P][Q]^n}. \quad (2.12)$$

Далее делается предположение, что

$$[PQ_n] = [P]_T - [P], \quad (2.13)$$

откуда

$$K_A = \frac{[P]_T - [P]}{[P][Q]^n}. \quad (2.14)$$

Тогда в предположении о статическом тушении при связывании лиганда, т.е. когда  $[P]_T/[P] = F_0/F$  (предположение (ii) в разделе 2.2.2), получаем, взяв логарифм от обеих частей (14):

$$\log K_A + n \cdot \log[Q] = \log \frac{F_0 - F}{F}. \quad (2.15)$$

Уравнение (2.15) и является модифицированным (или log-log) уравнением Штерна-Фольмера. При его выводе делается два неверных предположения. Во-первых, это предположение (2.13) – в реальности по мере увеличения концентрации лиганда сайты связывания будут занимать последовательно, а не одновременно. Во-вторых, неверным является предположение о статическом тушении – в действительности связывание каждого последующего лиганда должно приводить к падению квантового выхода флуоресценции на свою величину [254].

Так, на рисунке 2.2 представлен расчет концентрации комплексов белка с  $i$  лигандами  $[PQ_i]$  от полной концентрации лиганда  $[Q]_T$  для системы с  $[P]_T = 10^{-5}$  М,  $n = 5$ ,  $\log K_A = 4$ . Методика моделирования описана в работе [254] для модели  $n$  независимых идентичных сайтов связывания на одной молекуле белка. Как видно, по мере увеличения концентрации лиганда наблюдается постепенный рост доли занятых сайтов, и в большинстве точек сосуществуют несколько комплексов с разным числом лигандов. С использованием рассчитанного распределения комплексов можно получить кривую тушения флуоресценции – так, на рисунке 2.2Б показана кривая в log-log масштабе (согласно (2.15)) для случая статического тушения (связывание хотя бы одного лиганда делает белок нефлуоресцирующим). Аппроксимация ее в области концентраций  $[Q]_T$  до  $10^{-4}$  М дает наклон, равный 1, тогда как число сайтов, заложенное в модель, было  $n = 5$ . Рассмотренный пример говорит о



неправомерности использования уравнения (2.15) для оценки числа сайтов связывания в системе.

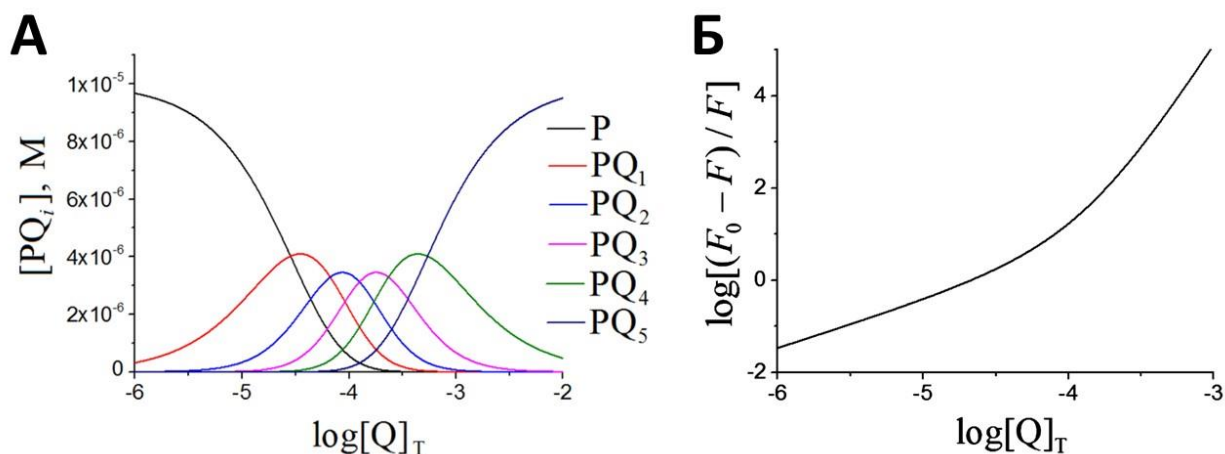


Рисунок 2.2 — А) Зависимость концентрации комплексов белка с  $i$  лигандами  $[PQ_i]$  от полной концентрации лиганда  $[Q]_T$ , рассчитанная для системы с  $[P]_T = 10^{-5}$  М,  $n = 5$ ,  $\log K_A = 4$ . Б) Кривая тушения флуоресценции системы, рассчитанная на панели А), в предположении о статическом тушении при связывании белком хотя бы одного лиганда [254].

Изначально вопрос о правомерности применения модифицированного уравнения Штерна-Фольмера встал перед нами при исследовании связывания белками ионов тяжелых металлов [254,258]. Анализ литературы, посвященной исследованию взаимодействия белков (на примере альбумина, основного белка плазмы крови) с ионами металлов разными методами, показывает, что количество сайтов связывания практически во всех случаях превышает 1. Например, в работе [259] авторы указывают, что в литературе имеет место хронологический тренд к уменьшению числа сайтов связывания в системах типа белок-ионы металлов из-за перехода от модели простых сайтов связывания (например, один ион металла на поверхностный аминокислотный остаток в матрице белка) к меньшему количеству более сложных сайтов. Не фокусируясь на природе сайтов связывания ионов металлов альбумином, можно резюмировать, что общепринятая концепция постулирует существование одного [260] или двух [260] сайтов, характеризующихся высоким значением константы связывания и обладающих физиологической значимостью, и набор неспецифических сайтов связывания. В то же время использование метода тушения собственной флуоресценции и модифицированного уравнения Штерна-Фольмера всегда дает один сайт связывания альбумина с металлами [261–264]. Далее, анализ около 65 работ, в которых аналогичным методом исследуется связывание альбумином различных лигандов (лекарств, токсинов и т. д.) показал, что определяемое число сайтов связывания также всегда равнялось единице.

Для иллюстрации указанного несоответствия было проведено экспериментальное исследование системы с  $n > 1$  – комплексообразования между белком альбумином и ионами  $\text{Eu}^{3+}$ . Путем анализа зависимости отношения интенсивности линий на 594 нм (магнитный дипольный  $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_1$  переход) и 616 нм («гиперчувствительный»  $^5\text{D}_0\text{--}^7\text{F}_2$  переход) в спектре люминесценции  $\text{Eu}^{3+}$  были рассчитаны концентрации свободных и связанных ионов в зависимости от концентрации белка, что позволило определить число сайтов связывания в системе с использованием метода Скэтчарда [265]. Этот подход позволяет анализировать параметры сайтов связывания системы, обладающих различными константами комплексообразования. В соответствии с моделью Скэтчарда среднее число связанных ионов  $\text{Eu}^{3+}$  на молекулу БСА  $\nu$  можно выразить как

$$\nu = \frac{c_B}{[\text{BCA}]_T} = \frac{\sum_i^N i[\text{Eu}_i\text{BCA}]}{[\text{BCA}]_T} = \sum_i^N \frac{n_i K_A^i c_F}{1 + K_A^i c_F}, \quad (2.16)$$

где  $N$  — количество типов сайтов связывания,  $[\text{Eu}_i\text{BCA}]$  – концентрация молекул БСА с  $i$  связанными ионами,  $n_i$  – количество сайтов связывания  $i$ -го типа на одну молекулу БСА,  $K_A^i$  – константа комплексообразования для сайта  $i$ -го типа,  $[\text{BCA}]_T$  – общая концентрация белка,  $c_F$  – концентрация свободных ионов европия в растворе,  $c_B$  – концентрация связанных БСА ионов европия в растворе. В случае, если известно количество свободных и связанных лигандов в зависимости от их концентрации, можно представить данные в виде графика Скэтчарда, ордината которого соответствует количеству связанного лиганда в расчете на общее количество белка, деленное на концентрацию свободного лиганда, а абсцисса – отношению концентраций связанного лиганда к полной концентрации белка. Доля свободного и связанного европия определялась путем разложения спектров люминесценции европия, измеренных для разных концентраций БСА, на базовые спектры свободного и связанного  $\text{Eu}^{3+}$ . Полученный таким образом график, показанный на рисунке 2.3А, свидетельствует о наличии в системе двух типов сайтов связывания с ( $n_1 = 1.8 \pm 0.2$ ,  $\log K_A^1 = 5.4 \pm 0.3$ ;  $n_2 = 4.4 \pm 0.4$ ,  $\log K_A^2 = 4.4 \pm 0.2$ ).

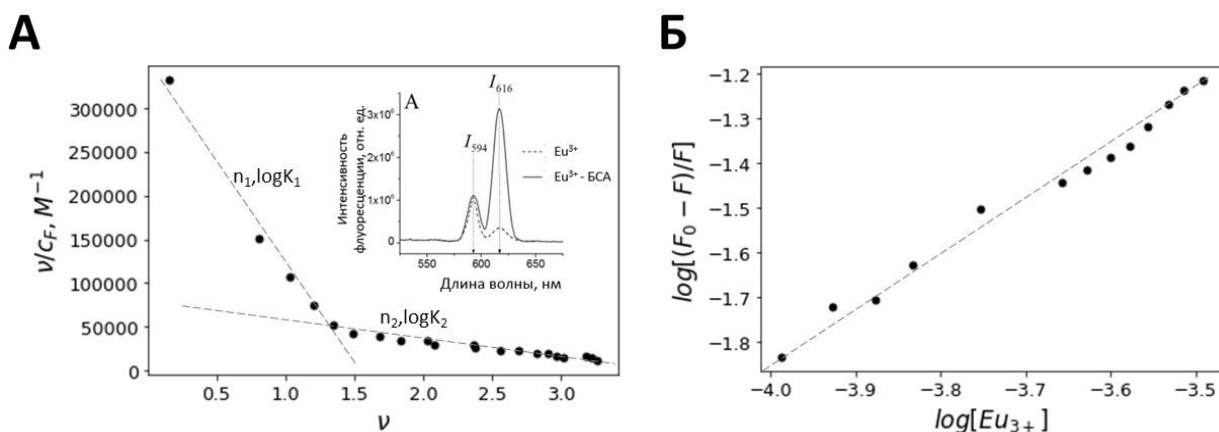


Рисунок 2.3 — А) График Скэтчарда для связывания ионов  $\text{Eu}^{3+}$  молекулами альбумина и его аппроксимация моделью с двумя типами сайтов связывания. На вставке – спектры люминесценции свободного и связанного  $\text{Eu}^{3+}$ . Б) Зависимость интенсивности Тгр флуоресценции альбумина от концентрации  $\text{Eu}^{3+}$ , представленная в виде (15). Пунктирная линия – аппроксимация прямой с наклоном 1.

При этом анализ зависимости флуоресценции Тгр белка от концентрации  $\text{Eu}^{3+}$  согласно уравнению (15) дает значение  $n = 1$  (Рис. 2.3Б), что для данной системы является некорректным и подтверждает результаты моделирования [254].

Значения числа сайтов связывания ( $n = 1$  при обоих значениях рН) и константы комплексообразования ( $\log K_A \sim 3$ ), определенные из кривых тушения собственной флуоресценции БСА с помощью модифицированного уравнения Штерна-Фольмера (2.15) оказываются значительно ниже, чем соответствующие значения, полученные из измерений люминесценции  $\text{Eu}^{3+}$ . Литературные данные также говорят о том, что в альбумине имеется более одного сайта связывания лантаноидов. Так, в работе [266], где исследовались параметры связывания в системе  $\text{Gd}^{3+}$ -САЧ, были получены значения  $n = 4$  и  $\log K_A \approx 4$ . В работе [267] было показано наличие двух сайтов связывания  $\text{Er}^{3+}$  САЧ с  $\log K_A^1 = 8.4$  и  $\log K_A^2 = 7.8$ . Наличие двух типов сайтов связывания европия с альбумином ( $n_1 = 1.7$  для специфических сайтов и  $n_2 = 6.6$  для неспецифических) было показано в работе [268] – данные значения близки к результатам, полученным в нашей работе с помощью уравнения Скэтчарда.

Таким образом, некорректность использования модифицированного уравнения Штерна-Фольмера была доказана как экспериментально, так и теоретически [254]. Причина этого лежит в неверных предположениях, сделанных при его выводе, рассмотренных выше. В то же время остается актуальным вопрос о том, можно ли извлечь информацию о числе сайтов связывания в системе из данных тушения флуоресценции. Ответу на него посвящен следующий подраздел.

#### 2.2.4 Метод анализа числа сайтов связывания в системе по данным тушения флуоресценции

В качестве альтернативы некорректному методу, основанному на модифицированном уравнении Штерна-Фольмера, нами была предложена следующая процедура для проверки гипотезы, превышает ли число сайтов связывания в системе единицу. Последовательность действий при этом выглядит следующим образом.

**Шаг 1.** Необходимо измерить кривые тушения флуоресценции для двух (или более) серий титрования для разных начальных значений  $[P]_T$ . В идеальном случае значения  $[P]_T$  должны быть выбраны таким образом, чтобы  $K_A \cdot [P]_T^{(1)} \ll 1$  и  $K_A \cdot [P]_T^{(2)} \sim 1$ , так как для этих значений кривые тушения флуоресценции будут значительно отличаться. При этом следует найти компромисс между двумя экспериментальными артефактами. С одной стороны, низкие значения  $[P]_T$  приводят к сигналам с низкой интенсивностью. С другой стороны, высокие значения  $[P]_T$  приводят к эффекту внутреннего фильтра. Например, для БСА эти значения можно положить равными  $[P]_T^{(1)} = 1$  мкМ и  $[P]_T^{(2)} = 10$  мкМ. Если кривые тушения флуоресценции, измеренные при различных значениях  $[P]_T$ , совпадают, можно утверждать, что оба предположения в уравнении Штерна-Фольмера (i) и (ii) выполняются и дальнейшие корректировки не требуются.

**Шаг 2.** Если кривые тушения флуоресценции, измеренные при двух значениях  $[P]_T$ , различаются, необходимо выполнить процедуру оценки квантового выхода флуоресценции путем совместной аппроксимации их уравнением (2.10). В результате будут получены значения  $K_A$  и  $\eta$ .

**Шаг 3.** Если для обеих кривых тушения флуоресценции  $R^2 > 0.95$  и невязки не являются скоррелированными (что можно проверить визуально или с помощью статистического теста Дарбина-Ватсона), процедуру аппроксимации можно считать успешной. В этом случае можно утверждать, что  $n = 1$  и относительный квантовый выход флуоресценции комплекса  $\eta$  и константа связывания  $K_A$  определены правильно. Если  $R^2 < 0.95$  или невязки скоррелированы, можно сделать вывод, что система не описывается уравнением (2.10) и  $n > 1$ .

Предложенный алгоритм схематически представлен на рисунке 2.4.

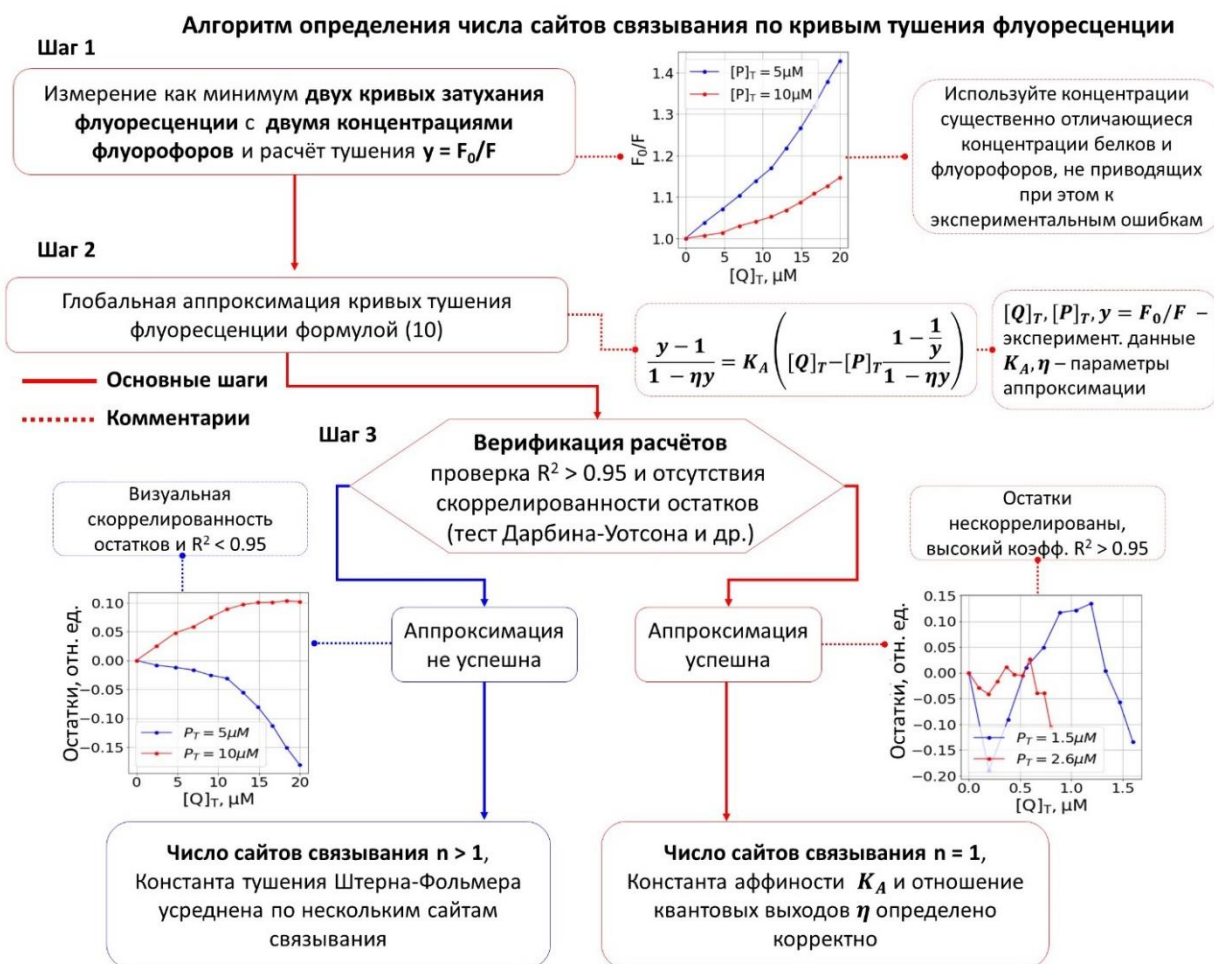


Рисунок 2.4 — Схема предлагаемого алгоритма оценки числа сайтов связывания по данным тушения собственной флуоресценции.

Для иллюстрации того, как работает предложенный метод, были проведены тестовые эксперименты на следующих системах: (1) БСА-миристанат натрия (жирная кислота, туг), где  $n > 1$  [269,270]; (2) БСА-ANS (1-анилино-8-нафталинсульфонат), для которой известно, что количество сайтов связывания равно 2 и флуоресценция комплекса не тушится полностью [271]; и (3) БСА-Congo Red, где  $n = 1$  [253,272]. Для всех систем были измерены две кривые тушения флуоресценции при разных  $[P]_T$  (Рис. 2.5А-В), после чего был применен предложенный подход.

Значение  $R^2$  при совместной аппроксимации кривых тушения флуоресценции для системы БСА-туг было равно 0.407, и были четко видны тренды в невязках (Рис. 2.5Г), а значение статистики Дарбина-Ватсона было равно 0.05. Статистика Ватсона, близкая к нулю, означает наличие положительной корреляции между невязками, отсутствие корреляции соответствует значению статистики Дарбина-Ватсона, равному 2. Таким образом, было подтверждено, что в исследуемой системе  $n > 1$ .

Анализ данных тушения собственной флуоресценции в системе БСА-ANS также показал низкое значение  $R^2 = 0.915$  и коррелированные невязки (Рис. 2.5Д).

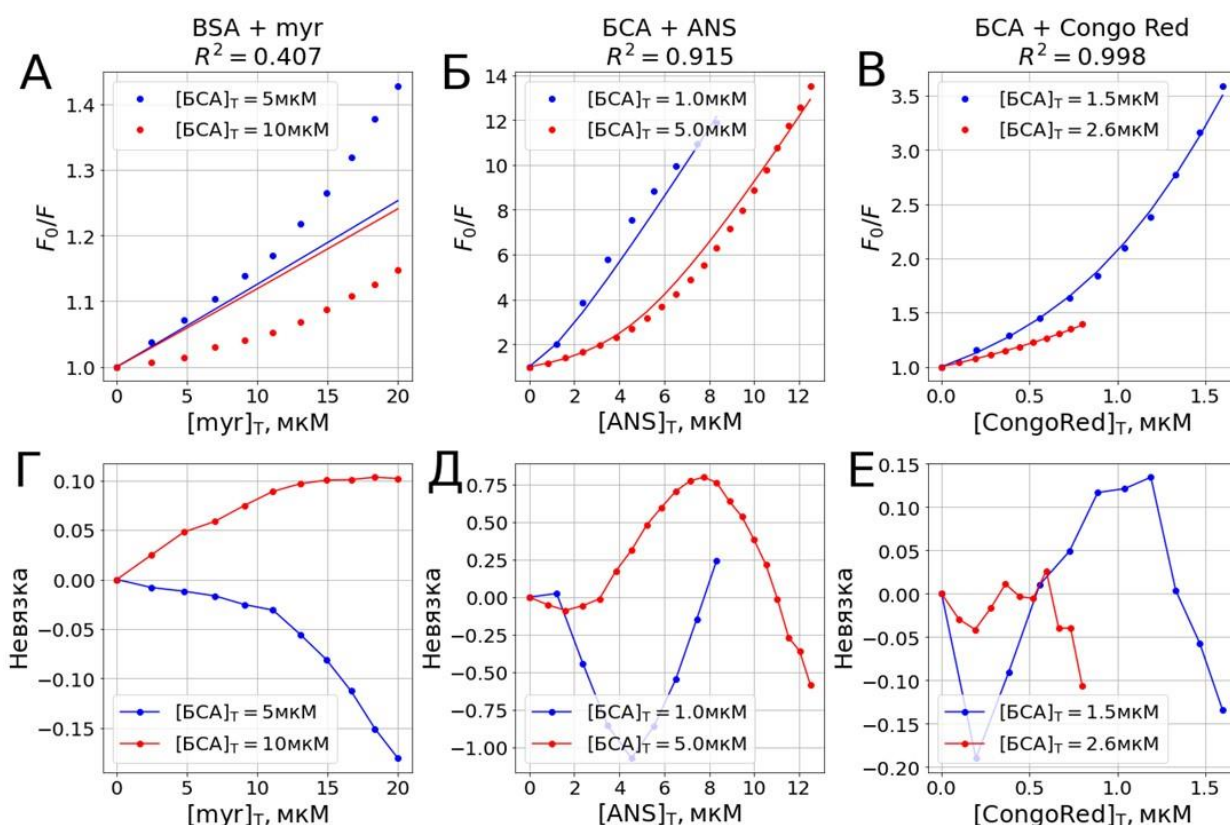


Рисунок 2.5 — Кривые тушения флуоресценции для систем А) БСА-миристанат натрия (myr), Б) БСА-ANS, В) БСА-Congo Red, измеренные для концентраций БСА 1  $\mu M$  (синий) и 10  $\mu M$  (красный). Сплошными линиями показан результат совместной аппроксимации кривых, измеренных при двух концентрациях белка, уравнением (2.10). Невязки аппроксимации кривых тушения флуоресценции уравнением (2.10) для систем Г) БСА-миристанат натрия (myr), Д) БСА-ANS, Е) БСА-Congo Red, измеренные для концентраций БСА 1  $\mu M$  (синий) и 10  $\mu M$  (красный).

Напротив, когда предложенный алгоритм применялся к системе БСА-CR, где  $n = 1$ , значение  $R^2$  было равно 0.998 (Рис. 2.5Е), а значение статистики Дарбина-Ватсона было равно 1.5. Следовательно, можно сделать вывод, что в данной системе  $n = 1$ , что соответствует литературным данным. Значения, полученные при аппроксимации кривых тушения флуоресценции уравнением (10), составили  $K_A = (4.6 \pm 0.4) 10^6 M^{-1}$  и  $\eta = 0.003 \pm 0.018$ , что свидетельствует о статическом тушении в системе.

Предложенный алгоритм был также исследован численно. Рассматривалось несколько систем: (а) система с одним сайтом связывания и нулевым квантовым выходом комплекса, (б) система с одним сайтом связывания и ненулевым квантовым выходом комплекса и (в) система с несколькими сайтами связывания ( $n = 2 \div 5$  и  $K_A^i = K_A^{(i-1)}/2$ ,  $\eta_i = 0$ ). Для каждой системы моделировалась серия экспериментов тушения флуоресценции (две кривые при  $[P]_T^{(1)} = 1 \mu M$ ,  $[P]_T^{(2)} = 10 \mu M$ ). Чтобы смоделировать экспериментальную ошибку, к

значениям  $F$  был добавлен пятипроцентный шум с равномерным распределением. Затем к модельным данным был применен предложенный метод оценки  $K_A$  и квантового выхода флуоресценции. Всего было смоделировано 10000 экспериментов для всех наборов параметров. На рисунке 2.6 показаны результаты предсказаний алгоритма для модельных систем с низкими и высокими значениями  $K_A$  ( $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  и  $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  соответственно).

Для систем с высоким значением  $K_A$  алгоритм успешно (с точностью  $>99.5\%$ ) классифицировал три случая: стехиометрия 1:1 с нулевым квантовым выходом комплекса, комплексообразование 1:1 с ненулевым квантовым выходом и случай  $n > 1$ , что дает почти 100% точность. Более высокая частота ошибок наблюдалась для систем с низким  $K_A$ : алгоритм классификации был склонен ошибочно относить системы с  $n = 1$  с ненулевым квантовым выходом к системам с  $n > 1$ . Однако, во-первых, случай высоких  $K_A$  представляет больший интерес для биохимии и фармакологии, и, во-вторых, как было продемонстрировано в разделе I.2.2, кривые тушения флуоресценции, измеренные при разных  $[P]_T$  для констант  $K_A$ , совпадают до процедуры коррекции, поэтому можно классифицировать случай низкого связывания, основываясь только на этом факте.

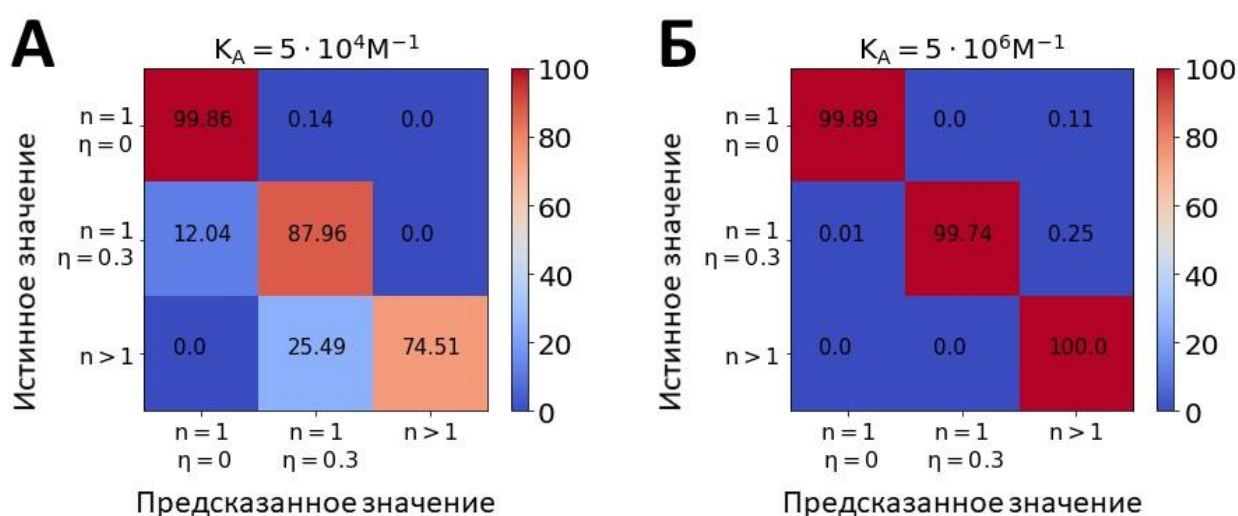


Рисунок 2.6 — Результаты работы алгоритма, классифицирующего три типа систем (с одним сайтом связывания и нулевым квантовым выходом комплекса, с одним сайтом связывания и ненулевым квантовым выходом комплекса и с несколькими сайтами связывания) на смоделированных кривых тушения флуоресценции с А)  $K_A = 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  и Б)  $K_A = 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .



## 2.3 Анализ флуоресценции тирозиновых остатков в триптофан-содержащих белках

### 2.3.1 Тирозиновая флуоресценция как индикатор конформационных изменений белков

Поскольку конформационные изменения белковых молекул сопутствуют ряду патологических процессов в организме человека, методы их анализа представляют интерес для биомедицинской диагностики. Так, ряд работ посвящен анализу конформации сывороточного альбумина при патологиях [273–275], в частности, существует методика онкодиагностики, основанная на анализе связывания альбумином лигандов (жирных кислот с парамагнитной меткой) методом ЭПР [276]. В литературе имеется множество работ по исследованию конформационных изменений альбумина с использованием его собственной триптофановой флуоресценции, однако вариабельность формы полосы и интенсивности этого сигнала в образцах плазмы крови достаточно мала [277,278]. В то же время в белковых макромолекулах помимо Trp присутствуют аминокислотные остатки Tyr, флуоресценцией которых в триптофан-содержащих белках обычно пренебрегают. Задачей, решаемой в данном подразделе, является анализ параметров флуоресценции Tyr в альбумине и исследование возможности их использования в качестве индикатора конформационных изменений, дополняющего классический подход, основанный на флуоресценции Trp.

Сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок, имеющий при физиологических условиях сердцевидную форму, образованную тремя доменами (Рис. 2.7А-Б) [279]. Эффективность связывания лигандов сывороточным альбумином, одной из основных функций которого транспортная, определяется наличием в его структуре различных сайтов связывания [280,281]. На рисунке 2.7А-Б показано расположение аминокислотных остатков Trp (красный) и Tyr (синий) в САЧ (Рис. 2.7А) и гомологичном ему БСА (Рис. 2.7Б). В обоих белках присутствует триптофановый остаток, локализованный в их внутренней гидрофобной области (Trp214 в САЧ и Trp213 в БСА, расположенные в домене II), тогда как в БСА присутствует также второй остаток Trp134, расположенный в домене I ближе к поверхности белка. В то же время в САЧ и БСА содержится 18 и 20 тирозиновых остатков, соответственно, равномерно распределённых по объёму белка (синий на Рис. 2.7). В случае, если флуоресценцию Tyr можно было бы анализировать отдельно от флуоресценции Trp, потенциально она могла бы служить более чувствительным индикатором в случае локальных конформационных изменений, происходящих на большом (>2 нм) удалении от триптофановых остатков в матрице белка. Исследованию этого вопроса посвящен данный раздел.



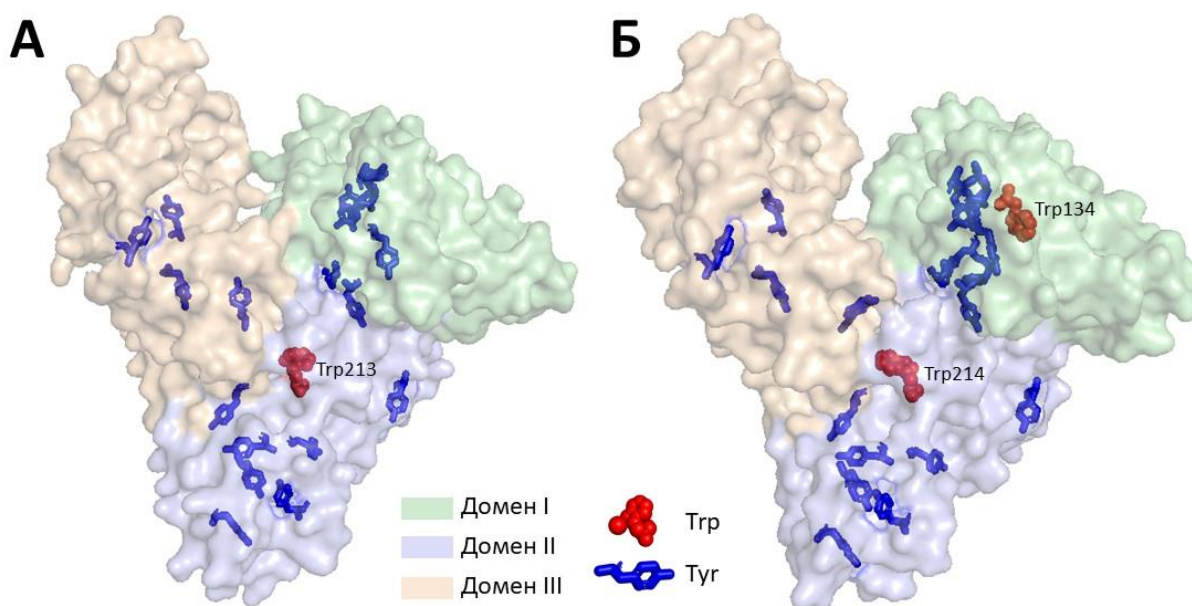


Рисунок 2.7 — А) Структура комплекса САЧ-жирная кислота (pdb ID: 1ef723, Tyr – синий, Trp – красный, жирные кислоты – зеленый). Б) Структура БСА (pdb ID: 3v0326, Tyr - синий, Trp – красный).

Было рассмотрено несколько модельных воздействий на альбумин, при которых сравнивался отклик Tyr, а также Trp в БСА и САЧ. На основе работы [282] будет показано, что флуоресценция Tyr чувствительна к специфическому связыванию молекул детергента (додецилсульфата натрия, ДСН) с САЧ (данная система моделирует конформационные изменения альбумина при связывании им физиологических лигандов, жирных кислот [279]), в то время как во флуоресценции Trp изменения не проявляются. Также в данном разделе будет рассмотрена чувствительность флуоресценции Tyr к конформационным изменениям БСА и САЧ, индуцированным различными денатурирующими агентами. Помимо определения интенсивности флуоресценции Tyr в работе был реализован подход, позволяющий проанализировать кинетику релаксации флуоресценции Tyr в триптофан-содержащих белках. Отметим также, что в Главе 5 разработанная методика была применена к анализу плазмы крови пациентов с онкологическими заболеваниями.

### 2.3.2 Взаимодействие альбумина с детергентом ДСН: анализ флуоресценции Tyr

Первой системой для анализа влияния конформационных изменений альбумина на флуоресценцию Tyr являлась модель, в которой растворы БСА и САЧ титровались анионным детергентом ДСН. Выбор данной модели определяется двумя факторами. Во-первых, данная система моделирует взаимодействие альбумина с физиологически важными лигандами, жирными кислотами [283]. Во-вторых, из имеющихся в литературе данных

известно [284], что в зависимости от концентрации ДСН во взаимодействии его с альбумином присутствует несколько стадий, которые по-разному проявляются в конформационных изменениях белка и его оптических свойствах, в том числе в флуоресценции Тгр.

Рассмотрим сначала изменения флуоресценции Тгр при взаимодействии САЧ и БСА с ДСН. Эксперименты проводились с растворами БСА (4.7 мкМ) и САЧ (4.1 мкМ) в Tris-HCl буфере (0.1 М, рН 7.4) при температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , методики приготовления образцов и измерения критической концентрации мицеллообразования в них детально описаны в работе [282]. Зависимость интенсивности флуоресценции Тгр от концентрации ДСН, полученная при возбуждении на 295 нм для САЧ и БСА, представлена на рисунке 2.8 – как видно, на ней наблюдаются четыре стадии. Многостадийный характер взаимодействия белков, в частности альбуминов, с детергентами проявляется и в других физических параметрах, например в поверхностном натяжении [285–289], данных калориметрического титрования [290], данных кондуктометрии [291].

При низких концентрациях ДСН (стадия I) флуоресценция Тгр в САЧ не изменяется, в то время как флуоресценция БСА снижается примерно на 70% от исходного значения. Согласно работам [270,292] данный факт объясняется наличием сайтов связывания ДСН в домене I альбумина, где расположен остаток Тгр134 в БСА. Поскольку на данной стадии взаимодействия изменений во вторичной структуре альбумина не происходит [289,293,294], изменения флуоресценции Тгр определяются изменениями третичной структуры альбумина [270,293,295], которые не проявляются в оптических свойствах остатков Тгр, локализованных в домене II (Тгр214 в САЧ и Тгр213 в БСА).

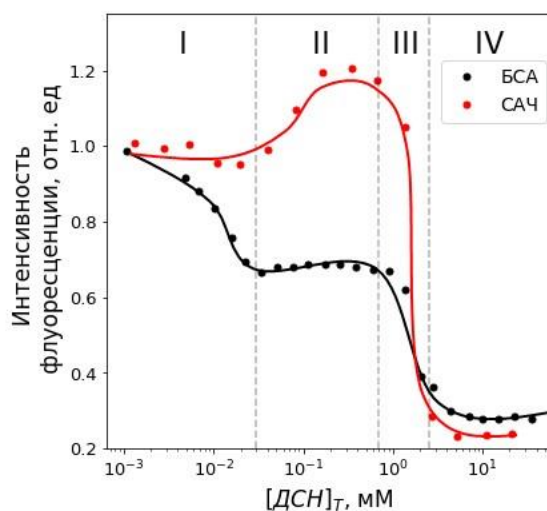


Рисунок 2.8 — Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции БСА (черный) и САЧ (красный) от концентрации ДСН,  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм. Концентрации БСА и САЧ составляли

4.7 мкМ и 4.1 мкМ соответственно. Кривые нормированы на значение, полученное в отсутствие ДСН.

Далее, наблюдалось увеличение интенсивности Trp в САЧ, в то время как флуоресценция БСА оставалась неизменной (стадия II). Данный факт связан с уменьшением тушения флуоресценции Trp214 в САЧ соседними группами, тогда как для Trp213 в БСА рост флуоресценции Trp213 компенсируется тушением Trp134 [292]. На следующей стадии происходит образование мицеллоподобных агрегатов на остове белков, приводящее к резкому снижению интенсивности флуоресценции как САЧ, так и БСА (стадия III на Рис. 2.8). После этого происходит насыщение структуры белков молекулами детергента, и изменений флуоресценции с дальнейшим ростом концентрации ДСН не наблюдается (область IV на Рис. 2.8).

Таким образом, при низкой концентрации ДСН (примерно  $1 \div 10$  молекул ДСН на молекулу белка) интенсивность флуоресценции Trp в САЧ не изменяется, в то время как в случае БСА она уменьшается, что связано с числом и расположением остатков Trp (в домене I Trp есть только в БСА). В то же время количество остатков тирозина составляет 18 для САЧ и 20 для БСА, 5 из которых находится в домене I. Соответственно, гипотеза, которая была далее проверена, заключалась в том, что флуоресценция Trp в САЧ может являться индикатором структурных изменений в домене I и предоставлять дополнительную информацию о связывании лигандов с сайтами, удаленными от остатков триптофана.

Спектральный вклад Trp может быть получен из спектров флуоресценции белков, полученных при возбуждении на длинах волн 280 нм (возбуждаются и Trp, и Trp) и 295 нм (где поглощение Trp незначительно, а возбуждается только Trp – см. Рис. 2.9). Предполагая, что форма полосы флуоресценции Trp не зависит от длины волны возбуждения, можно получить спектр флуоресценции Trp из разностных спектров. Спектры флуоресценции БСА ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм), полученные в отсутствие ДСН и при максимальной концентрации ДСН (32.8 мМ), а также их разложение на индивидуальные спектры Trp и Trp, представлены на рисунке 2.9А.

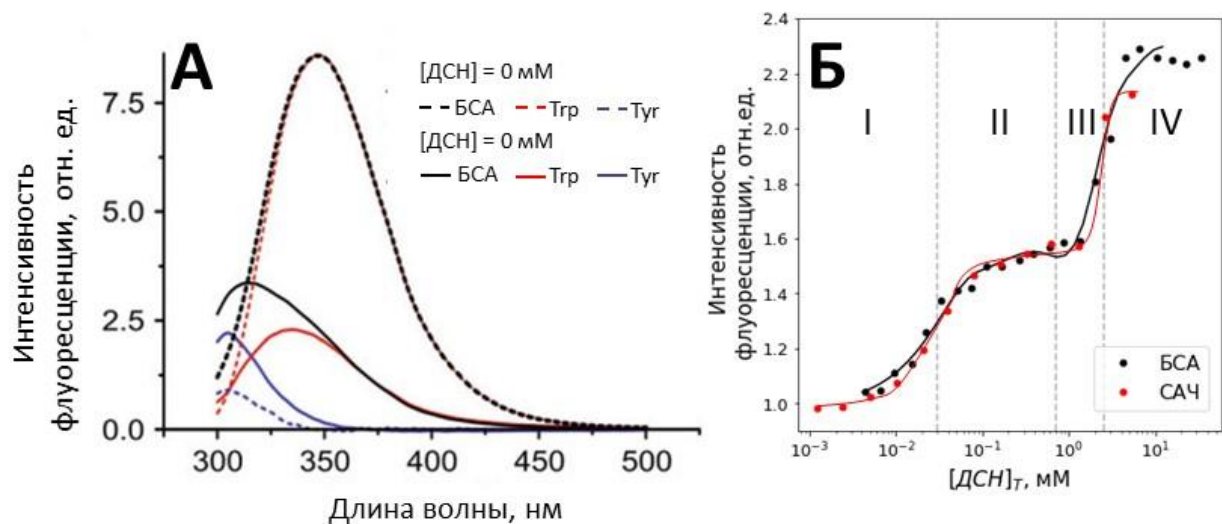


Рисунок 2.9 — А) Спектры флуоресценции БСА (черный) и вклады Тур (синий) и Тгр (красный) в присутствии 32.8 мМ ДСН (сплошные линии) и без ДСН (пунктирные линии);  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм, концентрация БСА 4.8 мкМ. Б) Интенсивности флуоресценции Тур для БСА (черный) и САЧ (красный) как функция концентрации ДСН,  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм. Концентрации БСА и САЧ составляли 4.7 мкМ и 4.1 мкМ соответственно. Кривые нормированы на значение, полученное в отсутствие ДСН.

В спектрах флуоресценции альбумина, полученных при высоких концентрациях ДСН при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм, наблюдается положение максимума, близкое к спектру Тур (~308 нм, см. Рис. 2.9А). Этот эффект ранее наблюдался для денатурированных белков и интерпретировался как следствие снижения переноса энергии возбуждения с Тур на Тгр [296–304]. Нормированная интенсивность флуоресценции Тур ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм) как функция концентрации ДСН для БСА и САЧ представлена на рисунке 2.9Б. Зависимость флуоресценции Тур от концентрации ДСН одинакова для обоих белков, что позволяет предположить, что связывание ими детергента происходит по одному и тому же механизму. На данной зависимости также видны имеет четыре характерные стадии, аналогично кривым, полученным для флуоресценции Тгр (Рис. 2.8). На стадии I ( $[\text{ДСН}]_{\text{T}} = 9\div 40$  мкМ) не происходит глобальных изменений структуры белка, следовательно, полярность микроокружения Тгр в САЧ и распределение параметров локального поля остаются неизменными (Рис. 2.8), при этом наблюдается усиление эмиссии Тур (Рис. 2.9Б). Рост флуоресценции Тур при этом может быть связан со снижением эффективности тушения ее аминоклупами, расположенными вблизи остатков Тур, вызванным локальными структурными изменениями, обусловленными связыванием ДСН. Данный механизм представляется более вероятным, поскольку в случае, если бы тушение флуоресценции Тур было бы вызвано переносом энергии возбуждения на Тгр, его эффективность менялась бы по-разному для САЧ и БСА в связи с наличием у БСА дополнительного триптофанового остатка.

Возможность отслеживания конформационных изменений альбумина с использованием интенсивности флуоресценции  $T_{gr}$ , продемонстрированная на рисунке 2.9, стимулировала разработку подхода для выделения вклада  $T_{gr}$  в кинетику затухания флуоресценции белков и определения его времени жизни. Измерения кинетики затухания флуоресценции производились с помощью пикосекундного флуориметра, описанного в [282]. Регистрация сигнала осуществлялась с помощью 16-канального многоанодного фотоумножителя Hamamatsu R5900 (система PML-16, Becker&Hickl, Германия), присоединенного к полихроматору со спектральной полосой пропускания 200 нм (разрешение 12.5 нм/канал). Возбуждение осуществлялось импульсным лазерным светодиодом с излучением на длине волны 280 нм (Edinburgh Instruments, Великобритания), с шириной аппаратной функции 700 пс, средней мощностью импульсов 0.8 мкВт при частоте повторения 10 МГц. Регистрация сигнала осуществлялась в течение 30 с. Кривые затухания флуоресценции  $T_{gr}$  детектировались в канале, соответствующем длине волны около 355 нм, где сигнал  $T_{gr}$  пренебрежимо мал, и аппроксимировались моделью биэкспоненциального затухания. Для выделения вклада флуоресценции  $T_{gr}$  анализировалась кинетика затухания флуоресценции белков на коротковолновом краю спектра эмиссии, при этом для достижения минимальной невязки необходима была аппроксимация моделью, использующей три компоненты. На рисунке 2.10А представлена зависимость кинетики релаксации собственной флуоресценции альбумина от длины волны эмиссии, а также репрезентативные кинетики затухания для на длинах волн 310 нм (максимум эмиссии  $T_{gr}$ ) и 350 нм (область максимума эмиссии  $T_{gr}$ ).

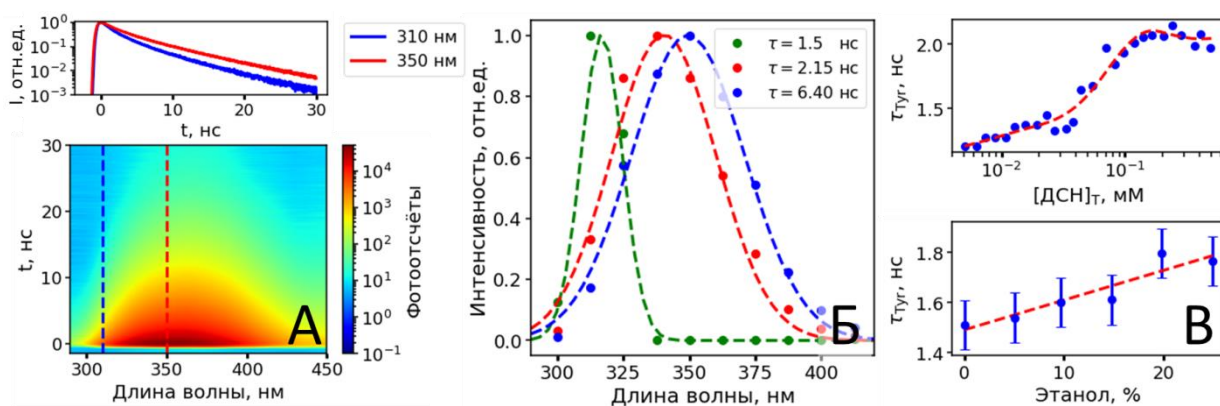


Рисунок 2.10 — А) Зависимость кинетики релаксации собственной флуоресценции альбумина от длины волны эмиссии (снизу) и также кривые затухания флуоресценции для на длинах волн 310 нм (синий) и 350 нм (красный). Длина волны возбуждения 280 нм. Б) Спектры эмиссии компонент в кинетике затухания флуоресценции альбумина с характерными временами релаксации 1.5, 2.1 и 6.4 нс. В) Зависимость времени жизни флуоресценции  $T_{gr}$  в БСА от концентрации ДСН (сверху) и этанола (снизу).

Аппроксимация кинетики релаксации собственной флуоресценции белков  $F(\lambda, t)$  производилась суммой трех компонент со спектрами эмиссии  $S_i(\lambda)$ , обладающих временами затухания  $\tau_i$ :

$$F(\lambda, t) = \sum_i S_i(\lambda) \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right). \quad (2.17)$$

При этом две восстановленные компоненты обладали параметрами, соответствующими флуоресценции Trp, а коротковолновая компонента с максимумом в области 310 нм и временем релаксации  $\sim 1.5$  нс – флуоресценции Tug (Рис. 2.10В). Верификация соотношения компонент в затухании флуоресценции альбумина Tug и Trp проводилась также путем анализа зависимостей их вкладов от концентрации денатурирующих агентов. Как видно из рис. 2.10В, на стадии I взаимодействия белка с ДСН увеличение интенсивности флуоресценции и времени жизни Tug является синхронным, что также свидетельствует в пользу корректности процедуры выделения вклада Tug в кинетику затухания флуоресценции белка.

### **2.3.3 Механизмы усиления флуоресценции Tug при конформационных изменениях альбумина**

В области исследований собственной флуоресценции белков известно [91], что в триптофан-содержащих белках флуоресценция Tug либо не наблюдается, либо сильно затухает, что привело к предположению об эффективном переносе энергии с Tug на Trp. Радиус Ферстера для пары Tug-Trp составляет  $\sim 10-18$  Å, т.е. сравним с типичными расстояниями между этими остатками в белках [305]. В то же время квантовый выход флуоресценции Tug в белках, не содержащих остатков триптофана, также очень низкий по сравнению с водным раствором, что позволяет предположить, что флуоресценция Tug тушится соседними аминокислотами, например, соседними заряженными амино- или карбоксилатными группами [91,305].

Флуоресценция Tug обычно увеличивается при денатурации белка и при переходе его в состояние расплавленной глобулы. В ряде работ было высказано предположение, что усиление флуоресценции Tug [91,300,306] связано с изменениями в третичной структуре белков. Ряд работ посвящен исследованию переноса энергии Tug-Trp [91,296–298,300,305–307], например, в [91] был предложен метод для оценки эффективности передачи энергии возбуждения (ЕЕТ) от Tug к Trp на основе сравнения квантовых выходов флуоресценции Trp при возбуждении на 280 и 295 нм. В работе [308] методом сверхбыстрой спектроскопии показано, что перенос энергии Tug-Trp в модельных пептидах может происходить на масштабах времен от 2 пс до 500 пс. В то же время роль переноса энергии Tug-Trp в тушении флуоресценции Tug была поставлена под сомнение в ряде работ [307].

Наши результаты также показывают увеличение флуоресценции Туг при связывании ДСН и разворачивании белка (включая стадию I, на которой вторичная структура альбумина должна оставаться неизменной). Это наблюдение находится в соответствии с общим трендом, представленным в литературе [305]. Показано, что уменьшение флуоресценции Тгр в БСА при связывании им ДСН происходит синхронно для возбуждения на 280 и 295 нм, тогда как в случае эффективного переноса энергии с Туг на Тгр следовало бы ожидать более резкого падения флуоресценции Тгр при возбуждении 280 нм за счет уменьшения канала возбуждения, связанного с переносом с Туг. Отсутствие таких различий может говорить о том, что перенос энергии Туг-Тгр не является доминирующим процессом тушения флуоресценции Туг в альбумине. В пользу этой гипотезы свидетельствует также одинаковое поведение интенсивности и времени жизни флуоресценции Туг в БСА и САЧ, поскольку наличие дополнительного триптофанового остатка в БСА должно было бы приводить к отличию в эффективности переноса энергии Туг-Тгр в этих белках в зависимости от конформации (Рис. 2.9А).

Резюмируя, было продемонстрировано, что связывание ДСН с БСА и САЧ приводит к одинаковым изменениям у них флуоресценции Туг, что может свидетельствовать о схожести связывания детергента этими белками. В то же время флуоресценция Тгр в исследованных системах изменялась по-разному, что связано с наличием в БСА дополнительного остатка Тгр (Тгр134) на его поверхности в домене I. Следовательно, сравнительное исследование связывания лиганда с БСА и САЧ с использованием флуоресценции как Туг, так и Тгр позволяет получить детальную информацию о связывании лиганда в домене I САЧ. Наличие большого количества тирозиновых остатков, равномерно распределенных по структуре белка, делает флуоресценцию Туг в САЧ чувствительным индикатором тонких структурных изменений. Этот факт принципиально важен в контексте задачи диагностики патологических процессов в организме с использованием спектроскопии плазмы крови – поскольку САЧ является основным белком, и есть данные о его конформационных изменениях при ряде заболеваний [273–275], наличие методов анализа его малых структурных изменений вызывает большой интерес.

Различные межмолекулярные взаимодействия, включая связывание небольших лигандов, могут влиять на фотофизические процессы с участием остатков тирозина в альбумине. С этой точки зрения подход, примененный для систем альбумин-ДСН, может быть расширен на другие системы.



### 2.3.4 Флуоресценция Туг как индикатор конформационных изменений альбумина под действием денатурирующих агентов

Как было указано выше, интерес представляет анализ конформации альбумина непосредственно в плазме крови. Несмотря на большое число работ, исследующих структурную динамику белков в модельных системах, аналогичные процессы для сложных систем, в частности биожидкостей, анализируются намного реже. Одним из редких примеров такого анализа является применение спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) плазмы крови человека для диагностики рака и сепсиса [309,310]. Этот метод основан на определении изменений в параметрах связывания жирных кислот белком в присутствии этанола (EtOH) [310]. При низких концентрациях EtOH (<2%) конформационные изменения САЧ связаны с изменением сети водородных связей в первой гидратационной сфере белковой молекулы [311,312], а также со связыванием молекул EtOH [311–313]. По мере увеличения концентрации EtOH (2–30%) происходит разворачивание белковых молекул, что приводит к образованию интермедиатов на пути денатурации белка [311]. Наконец, при высоких концентрациях EtOH (30–60%) начинается агрегация белка [311]. Целью данного раздела являлось исследование возможностей флуоресценции Туг в детектировании изменений структуры альбумина, индуцированных EtOH.

Была исследована чувствительность флуоресценции Туг к конформационным изменениям БСА и САЧ в смесях вода-EtOH с целью дальнейшего выяснения структурных детерминант, лежащих в основе чувствительности флуоресценции Туг к конформационным изменениям альбумина. С помощью фазовых диаграммы на основе собственной флуоресценции остатков Туг и Тгр была показана эволюция конформации альбумина под действием этанола и существование интермедиатов на пути денатурации белка. Полученные результаты позволили предположить, что флуоресценция Туг может давать информацию о конформационных изменениях в домене III альбуминов вдали от остатков Тгр. Это утверждение было дополнительно проверено с помощью денатурирующего агента гидрохлорида гуанидина (GdnHCl), который непосредственно нарушает структуру домена III в альбумине.

Зависимости интенсивности флуоресценции Тгр от концентрации EtOH, полученные при возбуждении 295 нм для САЧ и БСА, представлены на рисунке 2.11А. Для обоих белков не происходит изменений интенсивности флуоресценции вплоть до концентрации EtOH 15%, что позволяет предположить, что конформационные изменения белковых структур (если таковые имеются) происходят вдали от остатков Тгр в САЧ и БСА, например в домене III (Рис. 2.7). По мере увеличения концентрации EtOH флуоресценция Тгр белков меняется



разным образом: интенсивность Тгр в САЧ увеличивается, а в БСА падает. Увеличение флуоресценции Тгр214 в САЧ, который находится в домене II белка, может происходить за счет уменьшения статического тушения флуоресценции соседними группами, имеющего место в нативном белке [314]. Такое же уменьшение статического тушения должно происходить для Тгр213 в БСА, поскольку его локальное окружение аналогично таковому для Тгр214 в САЧ. Следовательно, уменьшение флуоресценции Тгр в БСА может быть следствием конформационных изменений в окрестности Тгр134, который расположен в домене I и характеризуется большими значениями сечения поглощения и времени жизни флуоресценции [90] и, таким образом, имеет большой вклад в интенсивность флуоресценции.

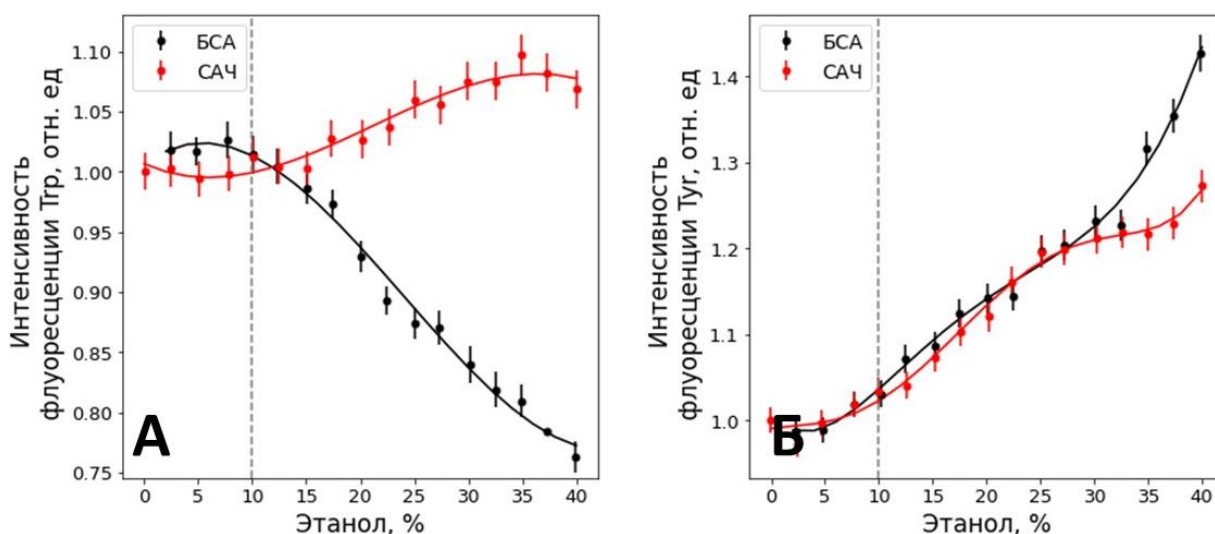


Рисунок 2.11 — А) Интенсивность флуоресценции Тгр в САЧ (красный) и в БСА (черный) как функция концентрации этанола,  $\lambda_{\text{возб}} = 295$  нм. Б) Интенсивность флуоресценции Туг в САЧ (красный) и БСА (черный) как функция концентрации этанола,  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм. Концентрации САЧ и БСА составляли 4.1 мкМ и 4.7 мкМ соответственно. Максимальную интенсивность флуоресценции нормировали на значение, полученное в отсутствии этанола.

При низких концентрациях EtOH (<15%) положение максимума флуоресценции Тгр исследуемых белков практически не изменяется, в то время как при более высоких концентрациях имеет место

Нормированная интенсивность флуоресценции Туг, полученная при возбуждении на 280 нм для САЧ и БСА по процедуре, описанной выше, представлена на рисунке 2.11Б как функция концентрации EtOH. Для обоих белков зависимость флуоресценции Туг была сходной, что свидетельствует о сходстве конформационных изменений исследуемых белков. При низких концентрациях EtOH (<15%) интенсивность флуоресценции Тгр практически не изменяется как для БСА, так и для САЧ, поэтому наблюдаемое увеличение флуоресценции Туг говорит

о конформационных изменениях белковых молекул вдали от остатков Trp, например, в домене III (т.к. у обоих белков есть Trp в домене II, а у БСА есть также Trp в домене I).

Кривые затухания флуоресценции белков были проанализированы аналогично тому, как это было описано выше для системы альбумин-ДСН. Аппроксимация кривых затухания флуоресценции в области  $\lambda_{Trp}$  проводилась с использованием двух компонент. Для минимизации невязки при аппроксимации кинетики затухания на длине волны  $\lambda_{Tyr}$  необходимым был учет трех компонент. При этом время жизни тирозиновой флуоресценции БСА росло с концентрацией этанола (Рис. 2.10В).

Для исследования чувствительности флуоресценции Tyr к конформационным изменениям в домене III альбумина была выполнена прямая денатурация этого домена с помощью гидрохлорида гуанидина (GndHCl) [315]. Как было показано в работе [315], домен III САЧ является наиболее лабильным к денатурации GndHCl, в то время как общая структура других доменов остается неизменной вплоть до концентрации GndHCl 1.4 М.

Полученные с использованием флуоресценции Trp и Tyr данные свидетельствуют о том, что денатурация сывороточных альбуминов происходит последовательно. На первом этапе (до 0.3 М GndHCl) интенсивность флуоресценции Trp в БСА незначительно увеличивается, в то время как интенсивность Trp в САЧ остается неизменной (Рис. 2.12А). На следующем этапе (0.3–0.9 М GndHCl), соответствующем конформационным изменениям в домене III [315], флуоресценция Trp лишь незначительно снижается для обоих белков, в то время как флуоресценция Tyr увеличивается (Рис. 2.12Б). Дальнейшее добавление GndHCl приводит к значительным конформационным изменениям структуры белка, а именно, в этом диапазоне концентраций 0.9–2.3 М начинается разрушение структур доменов I и II и увеличивается экспозиция остатков Trp в растворитель. Таким образом, увеличение флуоресценции Tyr более выражено, чем изменения флуоресценции Trp, во время конформационных изменений в домене III БСА.

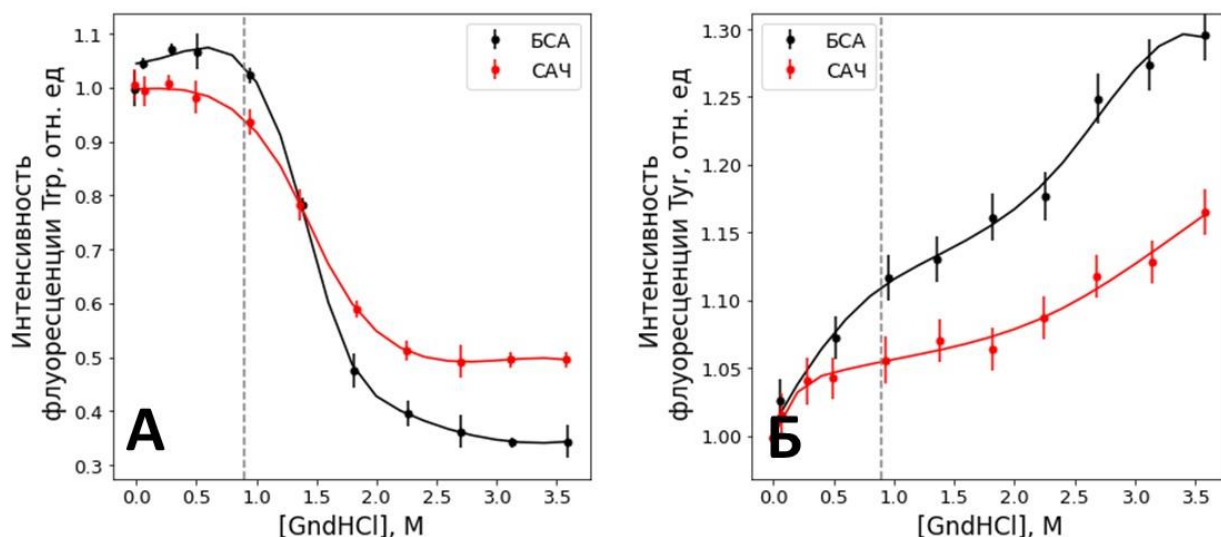


Рисунок 2.12 — А) Зависимость интенсивность максимума эмиссии триптофановых остатков в БСА и САЧ при возбуждении на 295 нм. Б) Зависимость интенсивности максимума эмиссии тирозиновых остатков в БСА и САЧ при возбуждении на длине волны 280 нм. Концентрации БСА и САЧ составляли 4.0 мкМ и 4.3 мкМ соответственно. Значения нормированы на величину сигнала, соответствующего отсутствию гидрохлорида гуанидина в растворе.

Таким образом, было показано, что конформационные изменения альбумина, индуцированные EtOH при низкой концентрации, локализуются в домене III, в котором отсутствуют остатки Trp как в БСА, так и в САЧ. Наличие четырех остатков Tug в домене III делает флуоресценцию Tug чувствительным индикатором структурных изменений альбумина в случае, когда флуоресценция Trp остается неизменной.

## Выводы

В данной Главе был детально разобран метод тушения собственной флуоресценции белков для определения значений констант комплексообразования и числа сайтов связывания. Рассмотрены ограничения методики и предложена процедура коррекции на неравенство полной и свободной концентраций лиганда. Теоретически и экспериментально показана некорректность использования модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для анализа параметров связывания в системе белок-лиганд. Предложен оригинальный алгоритм, позволяющий классифицировать и анализировать по данным тушения флуоресценции системы следующих типов: с одним сайтом связывания и нулевым квантовым выходом комплекса, с одним сайтом связывания и ненулевым квантовым выходом комплекса и с несколькими сайтами связывания. Работоспособность данного алгоритма показана экспериментально на трех системах и на смоделированных данных 10000 экспериментов по тушению флуоресценции для разных параметров, при этом

точность работы алгоритма для высоких ( $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) констант комплексообразования составила  $>99.5\%$ .

Была исследована возможность использования собственной флуоресценции белков в исследовании их конформационных изменений путем анализа тирозиновой флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции Туг в триптофан-содержащих белках низок, однако ее вклад в общий сигнал может быть выделен путем декомпозиции спектров флуоресценции, измеренных на длине волны возбуждения 280 нм (возбуждается одновременно флуоресценция Туг и Тгр) и 295 нм (возбуждается только флуоресценция Тгр). Помимо определения интенсивности флуоресценции Туг в работе был реализован подход, позволяющий проанализировать кинетику релаксации флуоресценции Туг в триптофан-содержащих белках.

Проведен сравнительный анализ возможностей исследования конформационных изменений белков с помощью флуоресцентной спектроскопии Туг и Тгр на примере альбуминов. Проверяемая гипотеза заключалась в следующем: за счет более равномерного распределения тирозиновых остатков по структуре белка флуоресценция Туг может служить индикатором конформационных изменений, не затрагивающих окружение Тгр. Для проверки данной гипотезы осуществлялись воздействия на альбумин денатурирующими агентами, по-разному влияющими на структуру белка (ионным детергентом ДСН (додецил сульфат натрия) [282], этанолом, гидрохлоридом гуанидина ( $\text{GdnHCl}$ ) [316]). Доказано, что интенсивность и время жизни тирозиновой флуоресценции являются чувствительными индикаторами конформационных изменений альбумина в доменах I и III в случаях, когда флуоресценция Тгр остается неизменной.

## Глава 3. Эндогенная флуоресценция белков и пептидов в видимой области спектра

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A9-,A16, A34].*

### 3.1. Собственная флуоресценция белков в видимой области спектра

Как было обсуждено в Главе 2, под собственной флуоресценцией белков в литературе обычно подразумевается их УФ флуоресценция, связанная с наличием ароматических аминокислот – фенилаланина, тирозина и триптофана. Наиболее длинноволновой из них является флуоресценция триптофановых остатков, обладающая максимумом эмиссии в районе 350 нм. В то же время имеется обширный пласт работ, в которых у белков без каких-либо хромофоров и связанных лигандов наблюдается эмиссия флуоресценции в видимой области спектра. Эти наблюдения можно разделить на несколько основных классов:

1. Традиционно в биофотонике при исследовании тканей методами флуоресцентной спектроскопии уделяется внимание флуоресценции белков внеклеточного матрикса, в основном коллагена и эластина, в сине-зеленой области спектра. Также похожими спектральными свойствами обладает другой структурный белок – кератин. Коллаген, эластин и кератин обладают эмиссией флуоресценции с максимумом в области 450 нм при возбуждении в области 350 нм [317]. Данный факт связан с возникновением пострасляционных химических модификаций функциональных групп коллагена – сшивок (cross-links) – связывающих части полипептидной цепи одной или нескольких молекул коллагена [318]. Автофлуоресценция структурных белков подробно рассматривается в контексте задач биомедицинской диагностики [5,223], а обсуждение потенциальных флуорофоров в них приведено в Главе 1.

2. Отдельное направление исследований посвящено так называемой агрегационно-индуцированной флуоресценции: было обнаружено, что белки, не обладающие флуоресценцией в видимой области спектра в нативном (мономерном) состоянии, начинают ее демонстрировать при агрегации [319]. Аналогичные наблюдения были представлены в литературе для пептидов и для агрегатов некоторых аминокислот. Принципиальным отличием данного класса систем от описанных в п. 1 структурных белков является то, что считается, что в них не происходит никаких химических модификаций молекул. То есть предполагается, что изменения структуры белка и окружения его аминокислотных остатков достаточно для появления эмиссии в видимой области спектра. Сигнал флуоресценции, обладающий характерным максимумом в ЕЕМ-матрицах на длинах волн возбуждения ~350 нм и эмиссии 450 нм, будем далее для краткости называть ВЭФБ

(видимая эндогенная флуоресценция белков, в литературе – ВЭФБ, deep blue autofluorescence). Сигнал ВЭФБ наблюдался для кристаллов белков [320], агрегатов белков и пептидов [321–323]. Также в ряде работ показано, что ВЭФБ может присутствовать в мономерах белков, что было объяснено электронным взаимодействием между аминокислотными остатками [324,325]. Краткое обсуждение основных гипотез формирования ВЭФБ у белков и пептидов без химических модификаций будет приведено в разделе 3.2.

3. Еще одним способом получить флуоресцентный сигнал в видимой области спектра у белков, в которых он исходно отсутствует, является их химическая модификация – например, в результате окисления или гликирования. Так, при гликировании белковых молекул возможно образование флуоресцентных конечных продуктов гликирования (AGEs, Advanced Glycation End-products) [318,326,327]. При диабете наблюдается покоричневение кожи, связанное с гликированием коллагена [328], а флуоресцентный сигнал от образующихся продуктов гликирования широко используется для диагностики заболевания и количественной оценки степени гликирования структурных белков [82].

Процессы окисления также могут значительно влиять на флуоресцентные свойства структурных белков в первую очередь за счет модификации ароматических аминокислотных остатков [81,317,320]. В частности, в обзоре [329] рассмотрен процесс фотоокисления белков, а в обзоре [330] – влияние окислительного стресса на образование дитиозиновых сшивок в белках.

Таким образом, ряд процессов в живых системах может приводить к тому, что у белков помимо собственной флуоресценции в УФ диапазоне спектра появляется эмиссия в видимой области спектра, обусловленная появлением новых флуорофоров – либо за счет электронного взаимодействия, либо за счет химических модификаций. Данная флуоресценция вызывает интерес в связи с возможностью ее использования для диагностических целей – визуализации белков и их агрегатов [5,331–339], исследования кинетики агрегации белков [5,340]. В то же время механизм формирования ВЭФБ остается во многом дискуссионным [173,320,341].

В данной главе сначала будут кратко изложены представления о механизмах формирования ВЭФБ (3.2), в основном в контексте вопроса об агрегационно-индуцированной флуоресценции. Затем будет показано, что использование экзогенных флуоресцентных меток для анализа взаимодействия белков и пептидов может влиять на кинетику процесса агрегации и свойства образующихся структур, что делает актуальным вопрос об использовании эндогенной флуоресценции (3.3) [342]. В соответствии с этим в разделе 3.4 продемонстрирована возможность визуализации агрегатов (метаболических фибрилл) в

клетках с помощью ВЭФБ [343,344], а в разделе 3.5 – возможность анализа разных стадий агрегации белков с использованием оптических индикаторов, в том числе ВЭФБ [81]. Далее в том же разделе исследован вопрос о спектральных свойствах и фотофизических параметрах ВЭФБ в нескольких системах, а также предложена гипотеза о роли окислительных модификаций в формировании оптических свойств при исследовании агрегационно-индуцированной флуоресценции и ВЭФБ. Развитию этой гипотезы и демонстрации ее применимости к флуоресценции клеток посвящен раздел 3.6 [345].

### **3.2. Эффект агрегационно-индуцированной флуоресценции белков и аминокислот: феномен и его возможные механизмы**

Поскольку в данной главе представлено достаточно много данных и их интерпретаций, связанных с эффектом агрегации белков и пептидов, поясним кратко его суть. Ряд белковых макромолекул, пептидов и аминокислот существуют в водном растворе в форме мономеров, однако при определенных внешних условиях (изменениях температуры, pH раствора, полярности растворителя, высушивания образца) их структурная организация нарушается, и происходит образование агрегатов. Агрегаты представляют собой супрамолекулярные структуры, состоящие из мономеров, взаимодействующих за счет определенного механизма (например, электростатического и гидрофобного взаимодействия). Морфология агрегатов может быть различной: они могут быть как аморфными, так и организовываться в упорядоченные структуры. Особый интерес представляет организация молекул в фибриллы, представляющие из себя нитевидные структуры, т.к. ряд заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа и прионные заболевания, связаны с агрегацией белков и полипептидов и образованием амилоидных фибрилл (амилоидов) [346]. В связи с этим в литературе имеется множество работ, посвященных исследованию механизмов агрегации белков, разработке методов влияния на кинетику агрегации, а также методов детектирования агрегатов, в частности, фибрилл.

Так, эндогенная флуоресценция белков и пептидов в видимой области спектра представляет интерес для детектирования [5,331–339] и анализа кинетики образования [5,340] белковых агрегатов, в частности, амилоидных фибрилл. Аналитические возможности данного сигнала в детектировании и визуализации белковых агрегатов в тканях головного мозга были впервые продемонстрированы в работе [331]: при исследовании срезов лобной и теменной коры головного мозга человека с диагнозом деменция альцгеймеровского типа был сделан вывод, что голубая флуоресценция, возбуждающаяся в диапазоне 350-380 нм и регистрируемая на длине волны >430 нм, обусловлена амилоидным компонентом

сенильных бляшек. Позже возможность возбуждения и детектирования автофлуоресценции (в тех же спектральных диапазонах) от отложений бета-амилоида была продемонстрирована в [332], а в [333] также утверждалось, что специфичность и чувствительность сигнала автофлуоресценции от амилоидных фибрилл может превышать чувствительность и специфичность флуоресцентного сигнала, наблюдаемого от красителей, которые связываются с амилоидными фибриллами. Эндогенный сигнал ВЭФБ агрегатов белков используется также в методе двухфотонной микроскопии – так, в тканях мозга была обнаружена яркая двухфотонно-возбуждаемая флуоресценция неокрашенных нейрофибриллярных клубков [336]. Авторы [5] показали также, что в дополнение к видимой АФ сигнал флуоресценции белковых агрегатов может возбуждаться и детектироваться в ближнем ИК-диапазоне.

Обнаружение роста ВЭФБ в растворах белков при их агрегации привело к появлению работ, в которых данный сигнал используется для отслеживания кинетики фибриллообразования [320,341,347–350]. ВЭФБ связывали с дипольным взаимодействием между возбужденными состояниями ароматических аминокислотных остатков [351,352]. Используя моделирование *ab initio*, авторы [173] продемонстрировали, что некоторые водородные связи в белковых фибриллах могут способствовать переносу протона и связанной с ним делокализации электронной плотности, приводящей к появлению полос длинноволнового поглощения и флуоресценции. Далее, в ряде работ [353–357] выдвигается гипотеза, что внутри- и межмолекулярное взаимодействие между заряженными функциональными группами аминокислотных остатков [356,357] может приводить к возникновению бесструктурной полосы поглощения и видимой флуоресценции в агрегатах, а также в мономерах белков и коротких пептидах.

Гипотеза о роли переноса заряда в формировании ВЭФБ получила развитие применительно не только к агрегатам, но и к мономерам белков и пептидов. Так, было продемонстрировано наличие поглощения в ближней УФ и видимой спектральных областях и видимой флуоресценции с особенностями, характерными для ВЭФБ, у растворов различных белков [353–357].

Наконец, в [320] было показано, что ВЭФБ можно наблюдать как для белковых растворов, так и для растворов ароматических и неароматических аминокислот. ВЭФБ наблюдалась как для заряженных, так и для нейтральных аминокислот, что противоречит гипотезе об определяющей роли переноса заряда между остатками заряженных аминокислот. Универсальность флуоресцентных свойств аминокислот привела авторов к выводу о том, что источником флуоресценции является карбонильная связь в аминокислотах. Это предположение сделано авторами на основе сравнения других простых органических



соединений, имеющих в своем составе карбонильную группу и обладающих ВЭФБ, в то время как их ближайшие аналоги по молекулярной структуре без карбонильной группы ей не обладают [320].

Резюмируя, эндогенная флуоресценция агрегатов белков и пептидов вызывает интерес в связи с возможностью их визуализации и исследования процессов межмолекулярного взаимодействия без использования экзогенных меток. В то же время работы по изучению и применению этого сигнала являются по большей части феноменологическими, а механизм возникновения эндогенной видимой флуоресценции остается предметом дискуссий.

### **3.3 Возможность влияния экзогенных зондов на кинетику самосборки пептидов и свойства образующихся структур**

#### **3.3.1 Флуоресцентный зонд тиофлавин Т и его влияние на кинетику самосборки пептида Fmoc-FF**

В контексте вопроса об актуальности детектирования эндогенной флуоресценции макромолекул и их агрегатов важным представляется вопрос о влиянии экзогенных меток на кинетику самосборки и свойства агрегатов. Так, одним из наиболее популярных флуоресцентных зондов для детектирования и изучения образования амилоидных фибрилл является тиофлавин Т (ThT) [392]. ThT связывается с амилоидными фибриллами с высокой ( $>10^6 \text{ M}^{-1}$  [360]) константой комплексообразования, при этом интенсивность его флуоресценции возрастает на три порядка в сравнении со свободным ThT в водном растворе. Данный факт связан с тем, что ThT представляет собой молекулярный ротор – при фотовозбуждении происходит поворот одного фрагмента молекулы относительно другого, что приводит к перераспределению заряда и образованию нефлуоресцирующего ICT (internal charge transfer) состояния, в котором время релаксации в основное состояние составляет порядка пикосекунды. При увеличении локальной вязкости (например, при встраивании в фибриллы) и ограничении подвижности молекулы вероятность перехода в ICT-состояние понижается, в результате чего уменьшается скорость нерadiационного затухания флуоресценции и время жизни, и, соответственно, интенсивность флуоресценции ThT может возрасть на три порядка [361].

Высокий контраст, достигаемый при окрашивании фибрилл ThT, делает его удобным для исследования кинетики агрегации *in vitro*. В то же время в ряде исследований поднимался вопрос о том, может ли присутствие ThT влиять на агрегацию белков [362–364]. Несмотря на различные результаты таких исследований, общепринятым является представление о том, что влияние ThT незначительно [365,366]. В данном разделе нами будет показано на примере самосборки дипептида фенилаланина (Fmoc-FF, N-

флуоренилметоксикарбонилдифенилаланин), что при определенных условиях влияние ThT как на кинетику агрегации, так и на морфологию и механические свойства фибрилл может быть достаточно сильным.

В работе [342] была рассмотрена система, в которой суспензия Fmoc-FF претерпевает фазовый переход и образует фибриллярный гидрогель. А именно, гидрогель готовили методом смены растворителя путем смешивания стокового раствора пептида Fmoc-FF (GL Biochem, Китай) (190 мМ) в диметилсульфоксиде (ДМСО) с водой до конечной концентрации 0.1% (1.9 мМ), при этом конечная концентрация ДМСО в растворе составляла 1%. Поскольку исходная суспензия являлась непрозрачной, а гидрогель в видимой области спектра оптически прозрачен, следить за кинетикой самосборки пептида можно путем измерения мутности системы (здесь и далее под мутностью будет подразумеваться оптическая плотность системы на длине волны 500 нм).

Измерение мутности системы Fmoc-FF показало, что кинетика самосборки замедляется с ростом концентрации ThT (Рис. 3.1А). Увеличение концентрации ThT приводило к удлинению лаг-фазы кинетики гелеобразования, при этом точка перегиба s-образной (сигмоидальной) кинетической кривой сдвигалась при условиях эксперимента линейно от значения 7 минут в отсутствие ThT до 23 минут при концентрации ThT 40 мкМ (Рис. 3.1Б). Эффект ингибирования процесса гелеобразования хорошо заметен при концентрации ThT 5 мкМ, что соответствует отношению концентраций пептида и ThT, равному  $C_{\text{Fmoc-FF}}/C_{\text{ThT}} = 360$ .

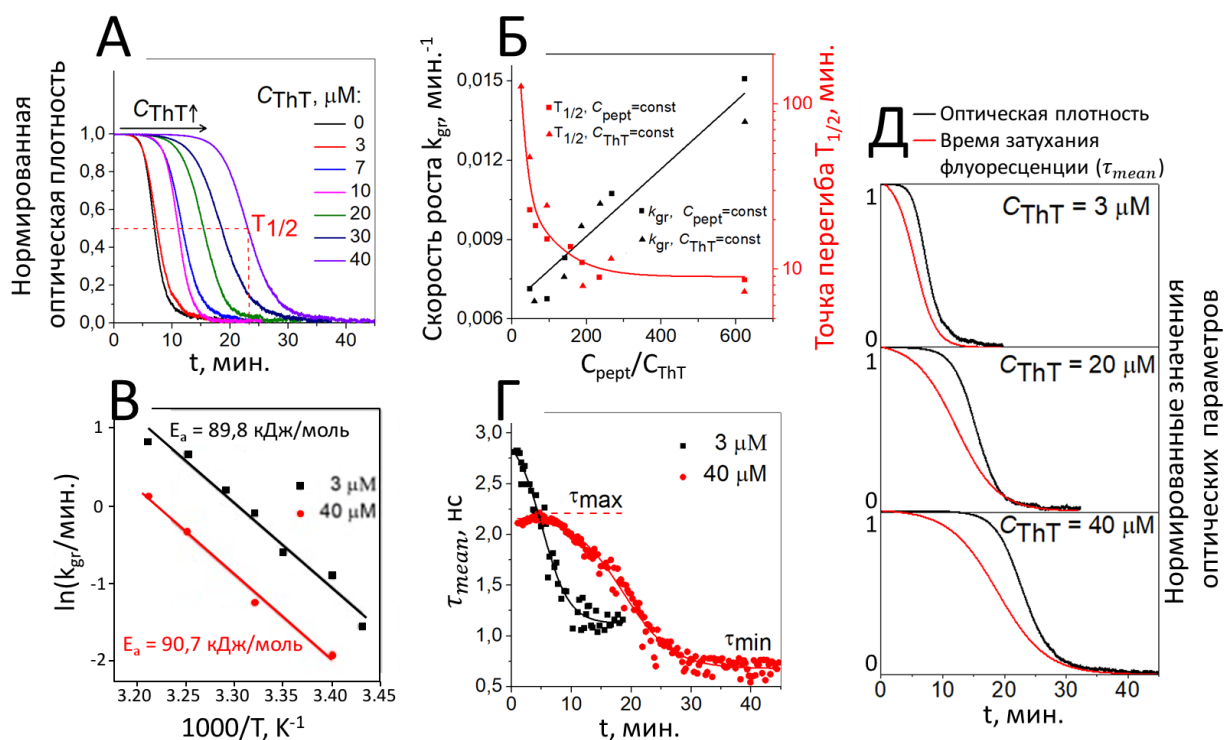


Рисунок 3.1. — А) Кинетика изменения оптической плотности на длине волны 500 нм для суспензии пептида Fmoc-FF, измеренная при различных концентрациях ThT:  $C_{ThT} = 0 \div 40$  мкМ,  $C_{Fmoc-FF} = 1.87$  мМ (1 мг/мл). Кривые нормированы на интервал от 0 до 1. Горизонтальная пунктирная линия соответствует уровню 0.5 (точке перегиба). Б) Зависимость положения точки перегиба нормированной кинетики изменения оптической плотности и скорости роста (наклон кинетики в точке перегиба) от концентрации ThT. В) Графики Аррениуса для скорости роста, полученные для  $C_{ThT} = 3$  мкМ (черная линия) и  $C_{ThT} = 40$  мкМ (красная линия). Г) Кинетика изменения среднего времени жизни флуоресценции ThT во время самосборки пептида Fmoc-FF ( $C_{ThT} = 3$  мкМ (черный) и  $C_{ThT} = 40$  мкМ (красный)). Д) Сравнение кинетики изменения мутности и среднего времени жизни флуоресценции ThT при самосборке пептида Fmoc-FF. Во всех экспериментах температура поддерживалась равной 30°C.

Была также измерена температурная зависимость кинетики гелеобразования для образцов с  $C_{ThT} = 3$  мкМ и  $C_{ThT} = 40$  мкМ, из которой были получены графики Аррениуса для скорости роста  $k_{gr}$ , определявшейся как наклон кинетической кривой в точке перегиба (Рис. 3.1В). Несмотря на то, что скорость роста при концентрации ThT 40 мкМ была почти в десять раз ниже, чем в отсутствие ThT, значение энергии активации, рассчитанной из закона Аррениуса, не зависело от присутствия ThT в системе и составляло  $90 \pm 1$  кДж/моль (0.93 эВ).

Далее проводилось измерение времени жизни флуоресценции ThT как индикатора процессов, сопровождающих гелеобразование. Кинетика изменения среднего времени жизни ThT в процессе гелеобразования имела s-образную форму (Рис. 3.1Г), а его значение варьировалось от 0.6 нс до 3 нс. Поскольку время жизни флуоресценции свободной формы ThT составляет  $\sim 1$  пс, в кинетике затухания она проявляется как компонента, совпадающая

по параметрам с аппаратной функцией установки ( $\sim 100$  пс), соответственно, наблюдавшиеся длинные значения времени жизни говорят о том, что на протяжении всего процесса самосборки молекулы ThT встроены в агрегаты дипептида Fmoc-FF.

Кинетика самосборки Fmoc-FF, измеренная по изменению времени жизни флуоресценции ThT, заметно замедлялась с ростом концентрации красителя (Рис. 3.1Г). Было также показано, что оптическая плотность системы на длине волны 500 нм и время жизни флуоресценции ThT изменяются асинхронно: уменьшение времени жизни флуоресценции ThT предшествует уменьшению мутности, причем для времени жизни ThT диапазон перехода между начальным и конечным состояниями шире (Рис. 3.1Г). Так, во временной динамике мутности системы наблюдается более длительная лаг-фаза и более резкий переход между состояниями (от мутного к прозрачному), тогда как время жизни ThT начинает изменяться значительно раньше и выходит на плато одновременно с просветлением системы. Следовательно, можно сделать вывод, что мутность и время жизни флуоресценции ThT являются индикаторами различных стадий гелеобразования Fmoc-FF. Применение метода FLIM, то есть картирования времени жизни флуоресценции ThT по образцу, позволило визуализировать структурные переходы, сопутствующие гелеобразованию Fmoc-FF. На рисунках 3.2А-Б приведены репрезентативные изображения FLIM, полученные для двух различных концентраций ThT, низкой (3 мкМ) и высокой (40 мкМ). На основании результатов кинетических измерений (Рис. 3.1) было сделано предположение, что ThT в низкой концентрации не оказывает существенного влияния на процесс гелеобразования.

Измерения FLIM проводились с использованием установки MicroTime 200 STED (PicoQuant GmbH, Германия). Возбуждение осуществлялось на длине волны 405 нм при частоте импульсов 40 МГц, длительности импульса 40 пс, максимальной мощности 50 мкВт. Лазерный луч фокусировался на образце объективом с увеличением  $100\times$  (UplanSApo, Olympus, Япония). Флуоресценция детектировалась с использованием модулей счета единичных фотонов (Excelitas, США) и фильтра с длинноволновым пропусканием ( $\lambda > 425$  нм). Время накопления одного изображения размером  $400 \times 400$  пикселей ( $80 \times 80$  мкм<sup>2</sup>) составляло 48 с.

При самосборке Fmoc-FF можно выделить несколько этапов [367]. Сразу после разбавления исходного раствора пептида в воде наблюдались сферические структуры (стадия I), которые со временем увеличивались в размерах и образовывали более крупные сферы (стадия II). Далее происходил переход от сфер к волокнистым структурам (стадия III), а конечным состоянием системы был фибриллярный гидрогель (стадия IV). Эти четыре этапа, схематически проиллюстрированные в верхней части рисунка 3.2А, наблюдались с

помощью FLIM как при низких, так и при высоких концентрациях ThT. Как и в случае измерений, проведенных в суспензии (Рис. 3.1), время жизни флуоресценции ThT начинало уменьшаться на самых ранних стадиях гелеобразования (стадия I), а затем постепенно уменьшалось по мере увеличения размера сфер (стадия II) и далее при переходе от сфер к фибриллярным структурам (стадии III и IV). Таким образом, более широкий диапазон перехода, наблюдаемый для времени жизни флуоресценции ThT по сравнению с измерениями мутности (Рис. 3.1Е-Д), связан с тем, что все структурные переходы влияют на время жизни ThT (Рис. 3.2В), в то время как только переход от сфер к фибриллам влияет на мутность суспензии.

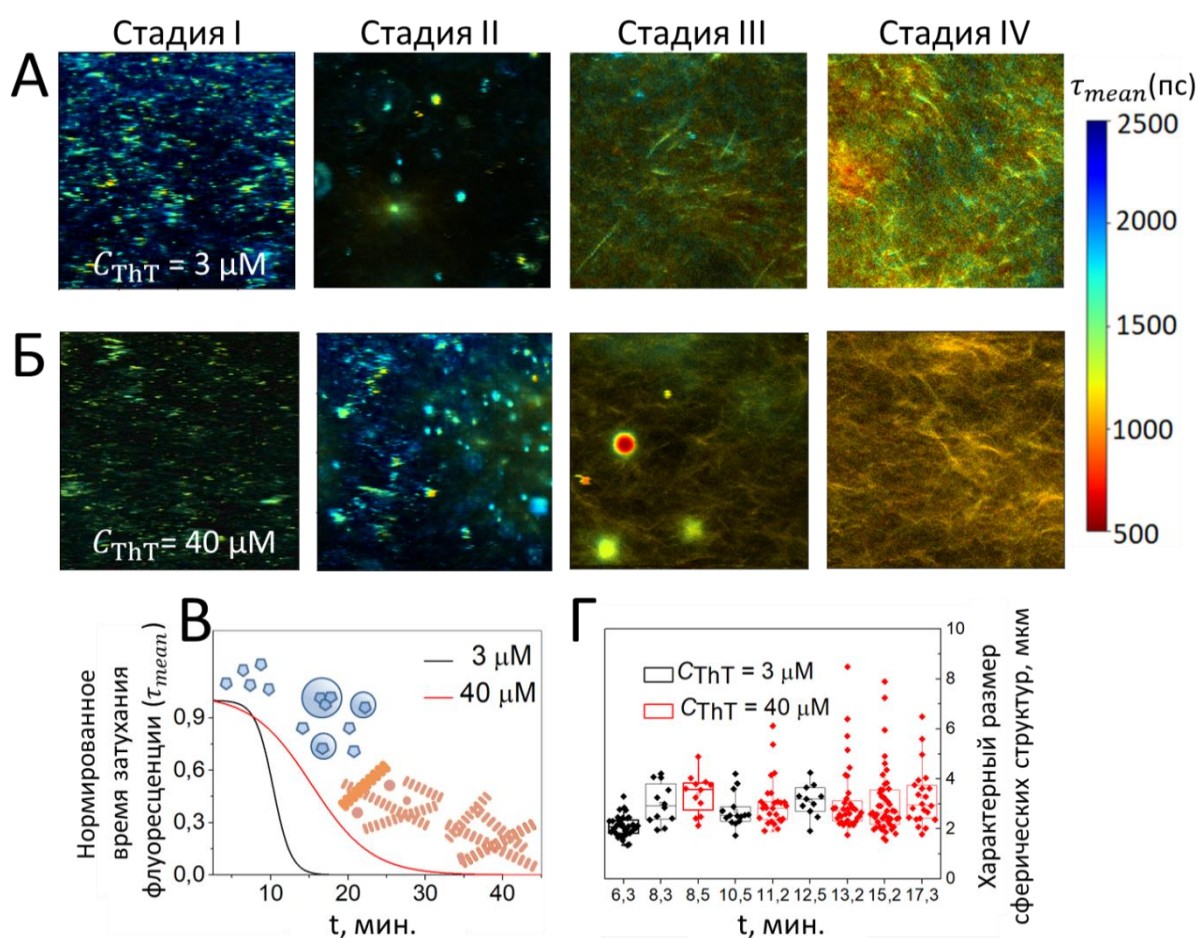


Рисунок 3.2. — Репрезентативные FLIM-изображения суспензии пептида Fmoc-FF на разных стадиях гелеобразования (схематически представлены сверху) в присутствии А)  $C_{ThT} = 3 \mu M$  и Б)  $C_{ThT} = 40 \mu M$  ThT. Во время измерений FLIM температура составляла  $20 \text{ }^\circ C$ . Размер изображений  $80 \times 80 \mu m^2$ . В) Зависимость среднего времени жизни флуоресценции ThT в системе Fmoc-FF+ThT от времени гелеобразования. Время жизни ThT усреднялось по каждому FLIM-изображению, а кривые нормировались на интервал (0,1). Изображения в поле панели иллюстрируют различные стадии гелеобразования по данным микроскопии. Г) Распределение размеров сферических частиц Fmoc-FF, полученных для разного времени гелеобразования в присутствии  $3 \mu M$  (черный) и  $40 \mu M$  (красный) ThT.

Чтобы охарактеризовать структурные изменения самосборки Fmoc-FF в присутствии низких и высоких концентраций ThT, было проанализировано распределение количества и размеров сферических структур, которые можно наблюдать на стадиях гелеобразования II и III (Рис. 3.2А, Б). Медианы размеров частиц (~10 мкм) были близки для обеих систем, а основное различие заключалось в наличии крупных структур при высокой концентрации ThT (Рис. 3.2Г). А именно, при концентрации ThT 40 мкМ ( $C_{\text{Fmoc-FF}}/C_{\text{ThT}} = 45$ ) наблюдались сферические структуры диаметром в диапазоне 15÷35 мкм, которые отсутствовали при низкой концентрации ThT. Таким образом, накопление пептида в более крупных сферах замедляет кинетику гелеобразования.

### **3.3.2 Влияние ThT на морфологию и механические свойства фибриллярных структур**

Для оценки влияния ThT на морфологию волокон (фибриллярных структур) в гидрогеле Fmoc-FF было применено два метода микроскопии: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) в режиме флуоресценции (с использованием ThT в качестве зонда) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Хотя КЛСМ, обладающая пространственным разрешением ~1 мкм, не позволяет сделать однозначных выводов о морфологических свойствах волокон, можно констатировать, что волокна, сформированные при более низкой концентрации ThT (3 мкМ, Рис. 3.3А), толще, длиннее и распределены более редко по сравнению с волокнами, образующимися при высокой концентрации ThT (40 мкМ, Рис. 3.3В).

АСМ-изображения высушенных гидрогелей были получены с использованием прибора Bruker Bioscope Resolve (Bruker, США) и кантилеверов ScanAsyst Air (Bruker AFM Probes, США) с жесткостью 0.4 Н/м и радиусом 2 нм. Изображения размером 10x10 мкм<sup>2</sup> и 3x3 мкм<sup>2</sup> были получены при максимальной силе <2 нН при разрешении 256 × 256 или 512 × 512 пикселей. Измерения с помощью АСМ также показали разницу в морфологии волокон, образующихся при низких и высоких концентрациях ThT (Рис. 3.3Б, Г). Видно, что присутствие ThT делает волокна тоньше, короче и увеличивает их плотность (Рис. 3.3Г), подтверждая тем самым тот факт, что ThT не только влияет на кинетику гелеобразования, но также изменяет морфологию и структуру гидрогеля Fmoc-FF.



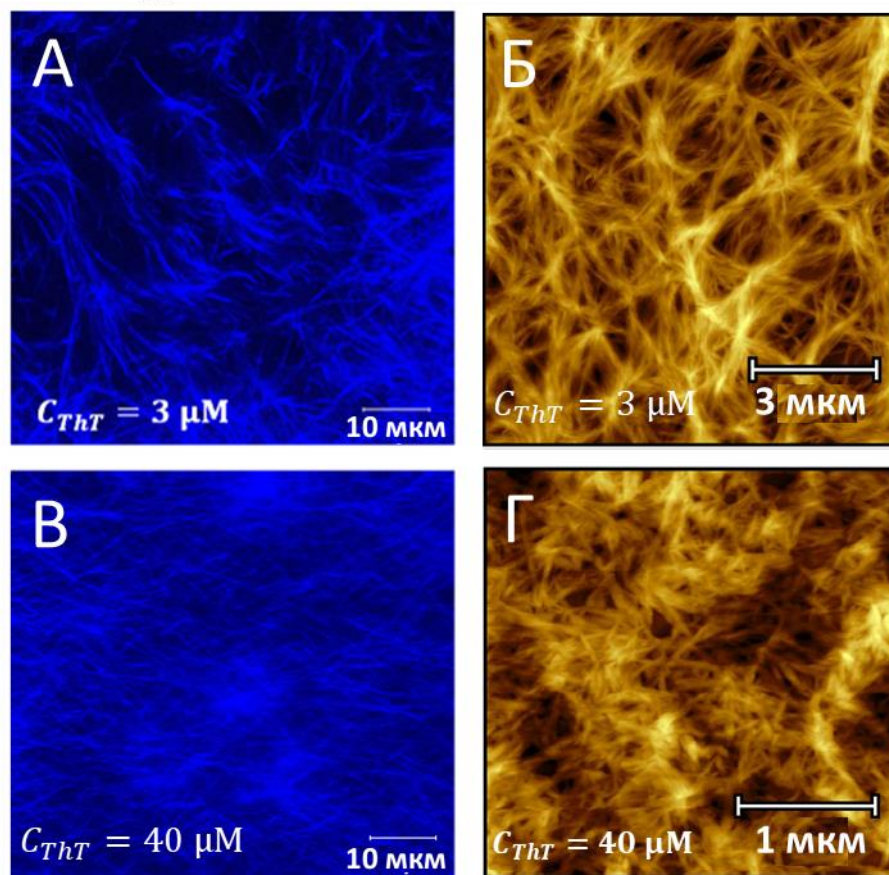


Рисунок 3.3. — Анализ структур, образующихся при самосборке дипептида Fmoc-FF в присутствии ThT. Изображения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, измеренные для гидрогеля Fmoc-FF, образованного в присутствии ThT при А) 3 мкМ и Б) 40 мкМ. АСМ-изображения гидрогеля Fmoc-FF, образованного В) в отсутствие ThT и Г) в присутствии 40 мкМ ThT.

Далее, для оценки влияния ThT на механические свойства гидрогеля Fmoc-FF были проведены реологические измерения. Реологические свойства гелей измеряли с помощью реометра Physica MCR 302 (Anton Paar GmbH, Грац, Австрия) при 30 °С с геометрией параллельной пластины (25 мм в диаметре).

Зависимость модуля упругости  $G'$  и модуля потерь  $G''$  от времени гелеобразования показана на рисунке 3.4А. Модуль упругости  $G'$  в отсутствие ThT увеличился с 50 до 200 Па в течение 3 минут, тогда как модуль упругости гидрогеля, образующегося при добавлении 40 мкМ ThT, достигал значения 2200 Па через 10 минут. Таким образом, присутствие ThT приводит к десятикратному увеличению модуля упругости гидрогеля Fmoc-FF. Поведение кинетики гелеобразования при добавлении ThT также согласуется с данными, полученными путем измерения мутности и времени жизни флуоресценции ThT (Рис. 3.2).

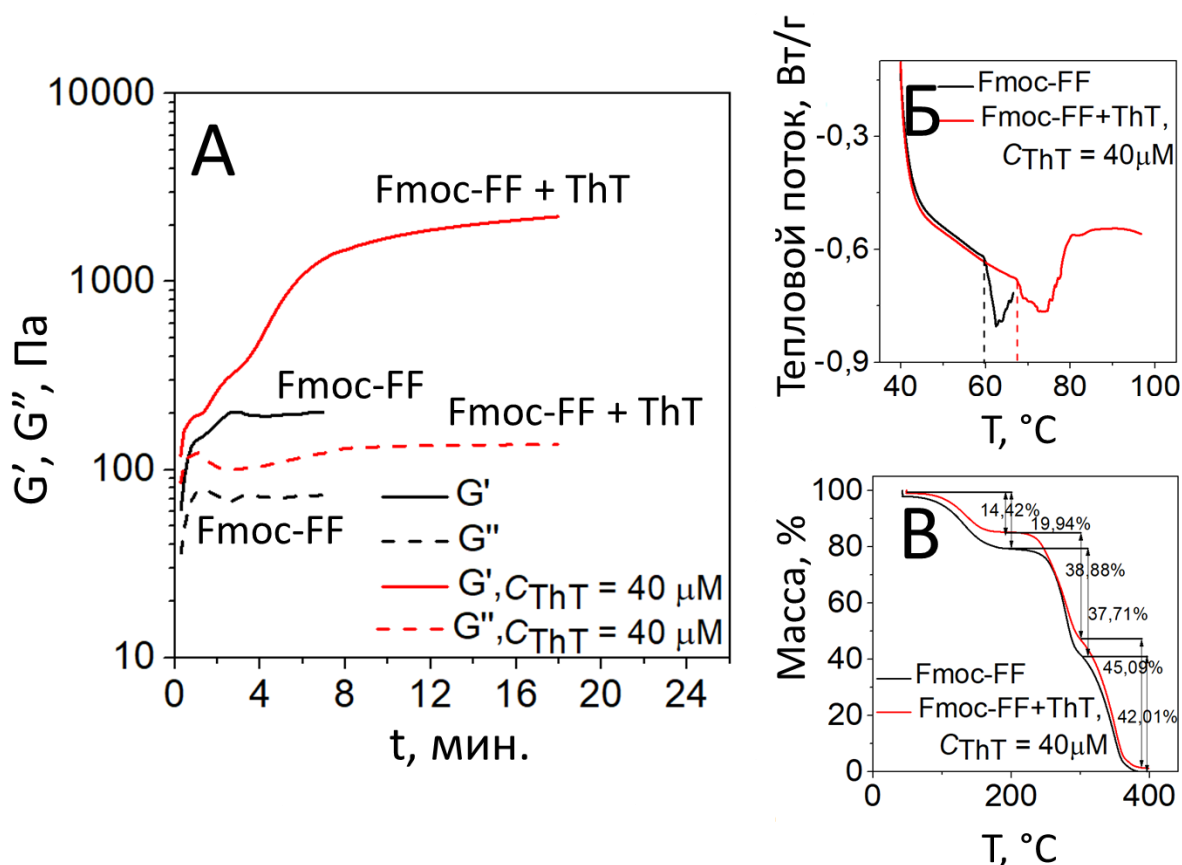


Рисунок 3.4. — А) Осцилляторный тест для гидрогеля Fmoc-FF в отсутствие (черный) и в присутствии (40 мкМ, красный) ThT. Сплошная кривая – модуль упругости ( $G'$ ), пунктирная кривая – модуль потерь ( $G''$ ). Б) Данные дифференциальной сканирующей калориметрии для гидрогелей Fmoc-FF, образованных в отсутствие (черный) и в присутствии (40 мкМ, красный) ThT. В) Данные термогравиметрического анализа для гидрогелей Fmoc-FF, образованных в отсутствие (черный) и в присутствии (40 мкМ, красный) ThT.

Наряду с изменением механических свойств гидрогель Fmoc-FF, сформированный в присутствии ThT, характеризовался повышенной термостабильностью. Этот факт был установлен с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (прибор DSC Q2000, TA Instruments, США). Гидрогель, образованный в присутствии 40 мкМ ThT, демонстрировал структурный переход (плавление) при  $67^\circ\text{C}$  по сравнению с  $60^\circ\text{C}$  для геля, сформированного в отсутствие ThT (Рис. 3.4Б). Таким образом, более плотная и жесткая система, образованная в присутствии ThT, оказалась более устойчивой к нагреву. Этот вывод подтверждается также данными термогравиметрического анализа (прибор TGA-IR Q5000 IR, TA Instruments, США), который показал, что потеря массы при нагревании была меньше в случае геля, содержащего ThT (Рис. 3.4.В).

Полученные результаты показывают, что присутствие ThT замедляет кинетику гелеобразования, а также сильно влияет на механические свойства и стабильность гидрогеля за счет изменения морфологии и структуры волокон. Эффект ингибирования



гелеобразования обнаруживается при низких концентрациях ThT (5 мкМ, CFmoc-FF/CThT = 360, Рис. 3.2), а добавление ThT в концентрации 40 мкМ (CFmoc-FF/CThT = 45) увеличивает модуль упругости гидрогеля на порядок (Рис. 3.4).

Влияние ThT на процесс гелеобразования можно объяснить в рамках двухэтапной модели нуклеации самосборки пептидов [368]. Эта модель предполагает существование метастабильных состояний на пути фибрилляции (Рис. 3.5). Первоначально для пересыщенного раствора пептида происходит зарождение частиц, которые растут за счет расщедования мономеров (стадии I и II на Рис. 3.2А). После этого внутри метастабильных частиц (сфер) происходит зарождение упорядоченных агрегатов («протофибрилл»), которые после роста до критического размера выходят в раствор – на микроскопических изображениях на рисунке 3.2 эти процессы не проявляются.

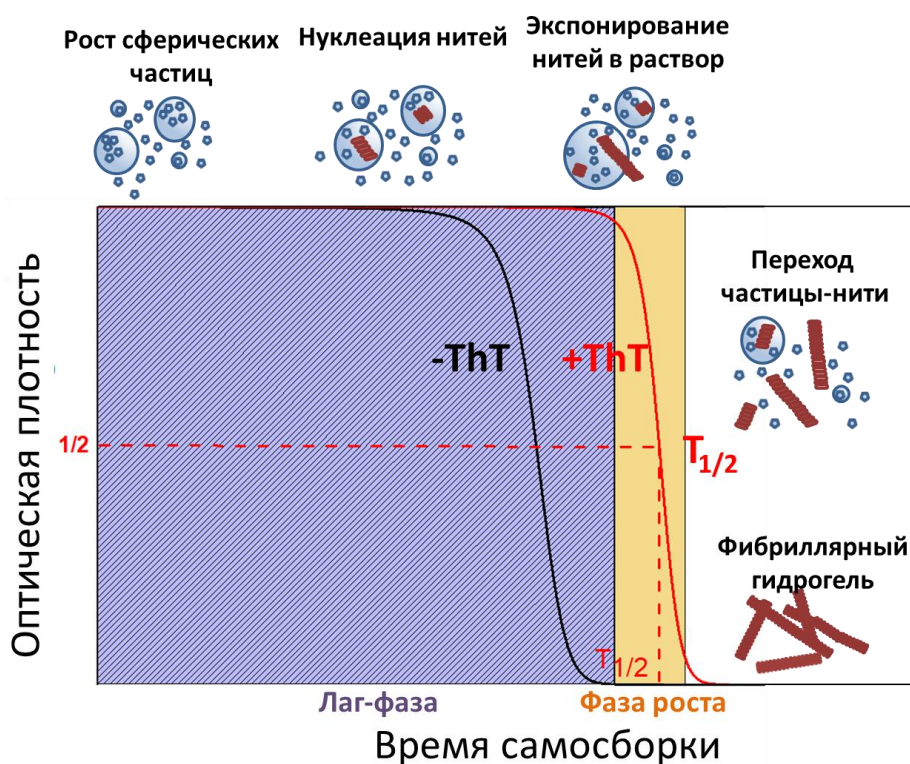


Рисунок 3.5. — Схема процессов, сопровождающих самосборку пептида Fmoc-FF, представленная в рамках модели двухступенчатой нуклеации. Формирование метастабильных частиц (сфер) в перенасыщенном растворе пептида, нуклеация и рост протофибрилл внутри сфер соответствуют лаг-фазе кинетики гелеобразования. Переход от сфер к фибриллярным структурам соответствуют фазе роста и резкому уменьшению мутности системы. Присутствие ThT приводит к удлинению лаг-фазы и снижению скорости роста из-за нарушения взаимодействия между пептидами внутри фибриллярных структур [367].

До того, как их размеры достигнут критического значения, протофибриллы остаются внутри сфер. Далее начинается переход от сфер к частицам (стадия III на Рис. 3.2А), который сопровождается уменьшением мутности системы (фаза роста). Наконец, рост

фибрилл вызывает обеднение раствора мономерами и последующее растворение метастабильных частиц, в результате чего система достигает своего конечного состояния – состояния гидрогеля (стадия IV).

Присутствие ThT значительно снижает как скорость роста (Рис. 3.2В), так и увеличивает продолжительность лаг-фазы (Рис. 3.2Б) кинетики гелеобразования, т.е. ThT может влиять на несколько процессов, описанных выше. Продолжительность лаг-фазы определяется скоростью нуклеации и роста протофибрилл внутри метастабильных частиц, а скорость роста определяется соотношением между стабильностью сферических частиц и фибриллярных ансамблей (Рис. 3.5). Так, эффективность нуклеации и образования протофибрилл внутри частиц определяется свободной энергией  $\Delta G$  пептидного стэкинга, т.е. чем сильнее стэкинг-взаимодействие, тем стабильнее упорядоченные пептидные агрегаты (протофибриллы). Аналогичные рассуждения можно распространить на скорость перехода от сфер к фибриллярным структурам. Более того, меньшей энергией взаимодействия между пептидами можно объяснить изменение морфологии гидрогеля: в присутствии ThT фибриллы становятся короче и тоньше, так как уменьшение энергии взаимодействия пептидов в ансамблях препятствует образованию длинных структур, подобных тем, которые формируются в отсутствие ThT (Рис. 3.3). Следовательно, прямое взаимодействие ThT с фибриллярными структурами изменяет кинетику, структурные и механические свойства гидрогеля за счет уменьшения энергии взаимодействия пептидов внутри волокон.

Резюмируя, в данном разделе показано, что использование экзогенных меток хотя и является удобным инструментом для исследования агрегации белков и пептидов, но при этом может влиять на сам процесс агрегации. Этим фактом обусловлен интерес к исследованию эндогенной флуоресценции белков и пептидов, которую потенциально можно использовать для изучения процессов самосборки и фибриллообразования. Анализу собственной флуоресценции белков и пептидов, возникающей в видимой области спектра, будут посвящены последующие разделы данной главы.

### **3.4 Применение ВЭФБ для визуализации амилоидных фибрилл**

Ряд заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет II типа и прионные заболевания, связаны с агрегацией белков и полипептидов и образованием амилоидных фибрилл (амилоидов) [369]. Мониторинг образования белковых и полипептидных амилоидов и их обнаружение представляют интерес для биомедицины, однако традиционный подход, основанный на использовании флуоресцентных меток, может влиять на процесс самосборки и межмолекулярное взаимодействие [370–373]. Так, в

предыдущем разделе на примере самосборки дипептида Fmoc-FF в фибриллярные структуры было показано, что наличие в системе флуоресцентного зонда тиофлавина T, рутинно используемого для исследования фибриллообразования, может замедлять кинетику самосборки, а также влиять на морфологию и механические свойства образующихся фибрилл [342]. Как было обсуждено в разделе 3.2, в ряде работ имеются данные о наличии у фибриллярных структур, образующихся в результате агрегации белков, полосы собственной флуоресценции в сине-зеленой области спектра (ВЭФБ) [173,348]. Потенциально этот эффект может использоваться для разработки новых методов обнаружения заболеваний, связанных с амилоидами, без необходимости использования экзогенных меток [5]. В данном разделе будет рассмотрен пример использования ВЭФБ для визуализации так называемых метаболических амилоидов, то есть фибриллярных структур, образующихся при агрегации метаболитов (в рассматриваемом случае, аминокислот).

Одним из направлений исследования амилоидов в литературе является изучение самоассоциации небелковых метаболитов в амилоидоподобные структуры. Образующиеся при этом фибриллярные структуры обладают такими же биологическими и биофизическими характеристиками, как белковые и полипептидные амилоиды [374–376]. Кроме того, агрегаты метаболитов демонстрируют общий механизм запуска амилоидной апоптотической гибели клеток [374,375]. Типичным примером метаболического амилоидного расстройства является накопление аминокислоты фенилаланина при фенилкетонурии. Фенилаланин способен к самосборке с образованием амилоидоподобных фибрилл, обладающих структурными свойствами, сходными с белковыми амилоидами. Было продемонстрировано, что фибриллы фенилаланина являются цитотоксическими, а антитела к ним снижают токсичность фибрилл [377].

Для иллюстрации возможности самосборки аминокислот в фибриллярные структуры и наличия у образующихся структур сигнала эндогенной флуоресценции в видимой области спектра были проведены эксперименты с фенилаланином (Phe, Рис. 3.6) [343]. Самосборку Phe в водном растворе инициировали охлаждением перенасыщенного раствора, как описано в работе [344]. L-фенилаланин (Panreac Applichem, CAS 63-91-2, без дополнительной очистки) в концентрации 40 мг/мл растворяли в дистиллированной воде (Millipore-Q) при 90 °C (температура контролировалась термостатом Qpod2e, Quantum Northwest, США) и перемешивали в течение 1 часа с использованием магнитной мешалки для полного растворения. Для получения агрегатов нагретый раствор Phe охлаждали до комнатной температуры 23-25 °C при нормальных условиях в кюветах или на предметных стеклах, в зависимости от типа проводимого измерения. Данная процедура приводила к образованию агрегатов, представляющих из себя нитевидные структуры (Рис. 3.6А).

Агрегаты Phe демонстрировали эмиссию флуоресценции в видимой области спектра, которая характеризовалась зависящим от длины волны стоксовым сдвигом: спектры, измеренные при более длинноволновом возбуждении, были смещены в длинноволновую область (Рис. 3.6Б).

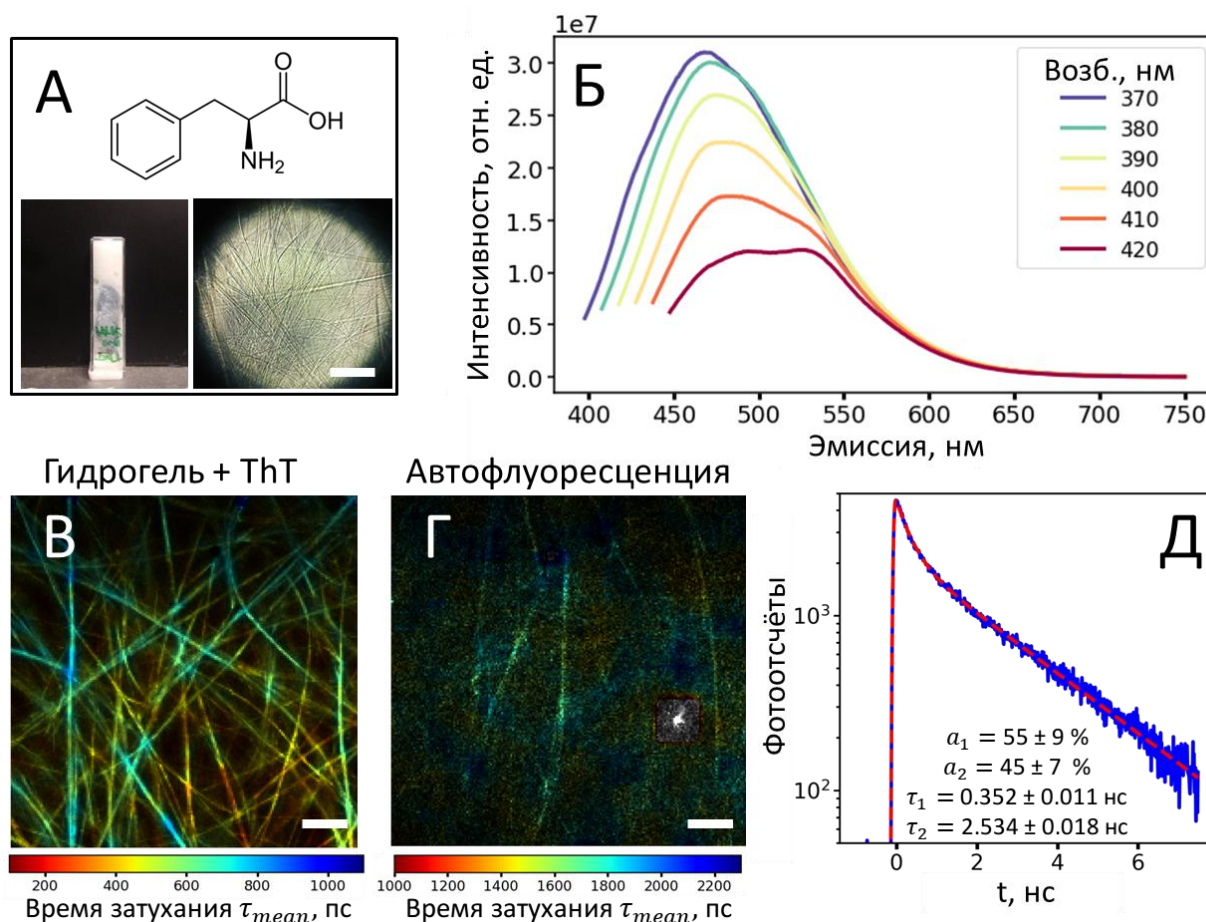


Рисунок 3.6. — А) Структура аминокислоты Phe и изображение образца Phe после агрегации. Б) Спектры флуоресценции агрегатов Phe для длин волн возбуждения 370÷420 нм. Визуализация фибрилл, образованных в результате агрегации Phe, методом FLIM с использованием окрашивания красителем ThT (В) и с использованием сигнала эндогенной флуоресценции (Г). Е) Кривая затухания (авто)флуоресценции фибрилл Phe. Возбуждение ThT автофлуоресценции осуществлялось в двухфотонном режиме на длинах волн накачки 880 и 700 нм соответственно.

Окрашивание образцов красителем ThT позволило визуализировать наличие фибрилл в исследуемой системе методом FLIM (Рис. 3.6В). Для этого к раствору Phe перед охлаждением добавляли ThT в концентрации 40 мкМ. Широкое распределение времени жизни флуоресценции ThT в диапазоне от 400 до 1000 пс свидетельствует о неоднородности микроокружения сайтов связывания ThT фибриллами Phe. Визуализация нативных (т.е. без окрашивания) образцов с использованием только сигнала автофлуоресценции также выявила наличие вытянутых фибриллярных структур (рис. А0Г). Репрезентативная кривая затухания автофлуоресценции для фибрилл Phe была описана

бизэкспоненциальной моделью с временами релаксации 0.35 и 2.53 нс. Таким образом, было показано, что в результате самосборки Phe в водном растворе могут образовываться фибриллярные агрегаты, обладающие сигналом флуоресценции в видимом диапазоне спектра. Данный факт был использован в работе [344] для визуализации метаболических амилоидов в клетках.

В качестве «строительных блоков» метаболических амилоидов в работе [344] использовались аминокислоты аденин (Ade), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe) (Рис. 3.7А), возможность самосборки которых в фибриллы была показана ранее [374,375]. Аминокислоты растворяли в фосфатном буферном растворе путем нагревания раствора до 90°C для увеличения растворимости, а последующее охлаждение раствора приводило к образованию в системе агрегатов. Для всех приготовленных систем были измерены матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции (ЕЕМ-матрицы, Рис. 3.7Б). Как видно, у всех агрегатов аминокислот присутствует полоса флуоресценции в видимой области спектра, по своим параметрам схожей с ВЭФБ [173,348]. При этом у мономеров тех же аминокислот данная полоса флуоресценции отсутствует [378,379]. Далее была измерена зависимость интенсивности собственной флуоресценции растворов аминокислот в процессе их агрегации (Рис. 3.7Г) на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции 405 и 450 нм соответственно. По мере самосборки наблюдался рост сигнала флуоресценции. В качестве отрицательного контроля использовался раствор аминокислоты аланина (Ala), которая не образует агрегатов в условиях проведенного эксперимента [348]. Флуоресценция Ala не была обнаружена ни в растворе, ни при условиях, использованных для запуска агрегации других аминокислот.

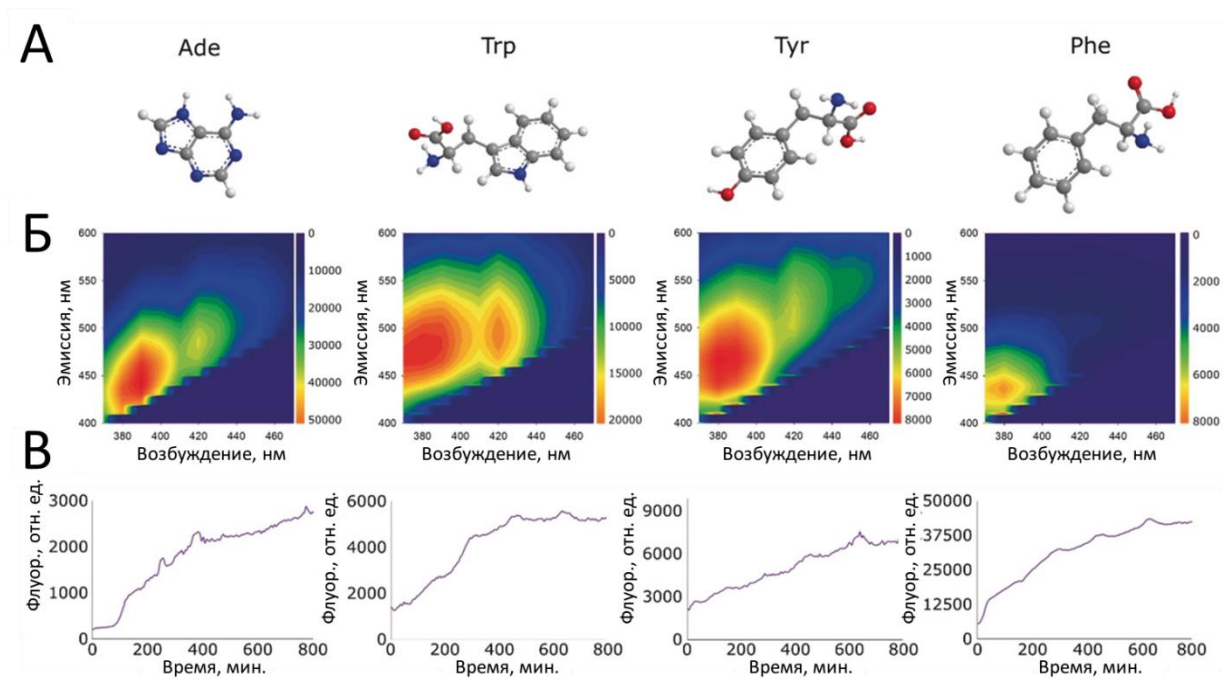


Рисунок 3.7. — А) Структура аминокислот (аденина, триптофана, тирозина и фенилаланина), способных к агрегации в фибриллярные структуры. Б) Матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции для агрегатов указанных аминокислот (концентрация аденина – 8 мг/мл, триптофана – 4 мг/мл, тирозина – 4 мг/мл и фенилаланина – 4 мг/мл). В) Кинетика роста собственной флуоресценции растворов аминокислот при их агрегации ( $\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм).

Обнаруженный факт наличия у метаболических амилоидов собственной флуоресценции был далее использован для оценки возможности визуализации их в клетках. Визуализация небелковых агрегатов в культурах живых клеток является сложной задачей, поскольку большинство экзогенных меток, способных селективно связываться с определенными структурами в клетках, заточены под белковые системы.

Для экспериментов были использованы растворы агрегатов Ade, Trp, Tyr и Phe в концентрациях, которые, как было показано ранее, являются цитотоксичными (4 мг/мл в расчете на мономеры аминокислот) [375]. В качестве модельных систем были выбраны клеточные линии нейробластомы (SH-SY5Y) и почки (HEK 293) в связи с их релевантностью задаче детектирования амилоидов. Агрегаты метаболитов добавляли в клеточную среду, после чего клетки инкубировали в течение 5 часов.



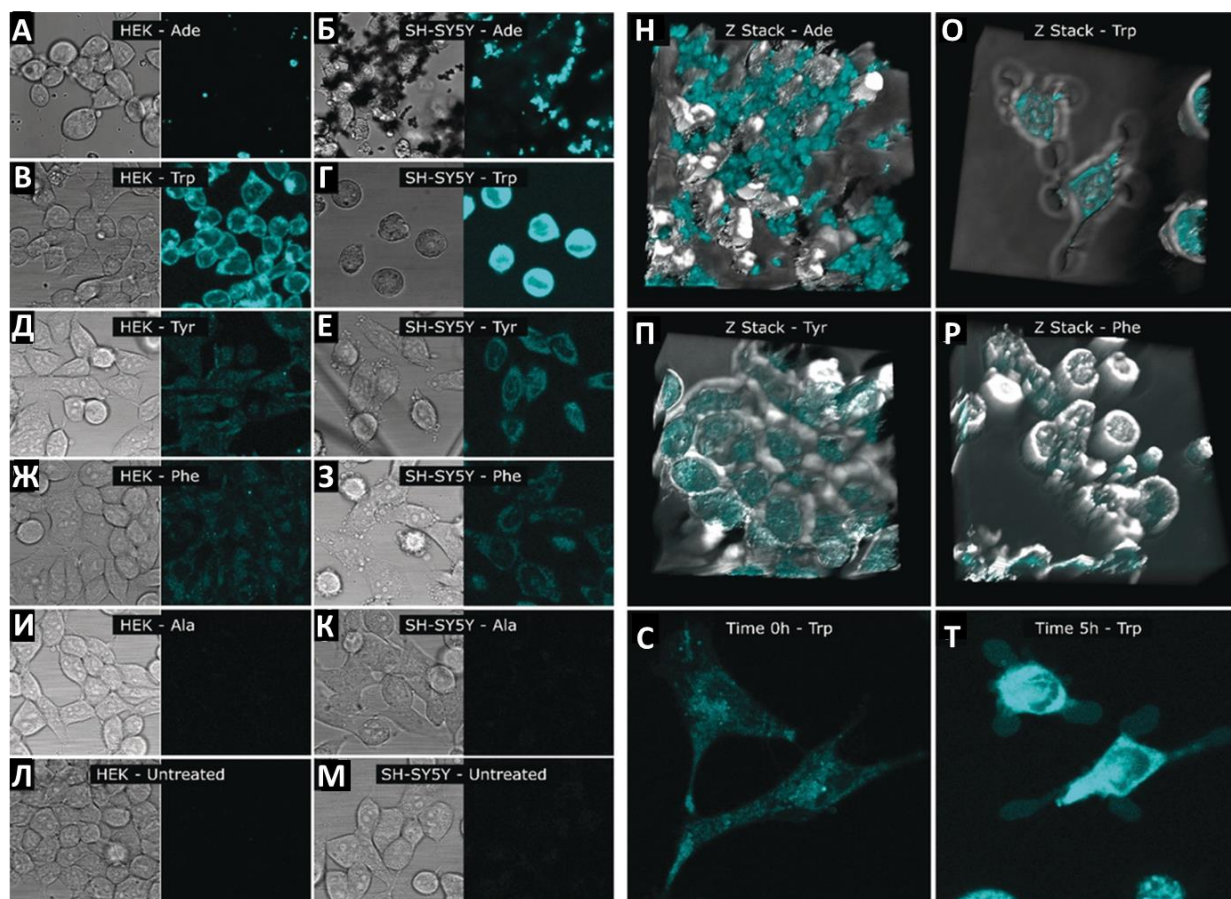


Рисунок 3.8. — Конфокальная микроскопия живых клеток (линии HEK 293 и SH-SY5Y) при взаимодействии их с фибриллярными структурами, образующимися в результате агрегации аминокислот. (А-К) и контрольных образцов клеток (Л,М), не инкубированных в присутствии агрегирующих аминокислот. Изображения слева получены методом микроскопии в белом свете,, панели справа – с использованием эндогенной флуоресценции (ВЭФБ) метаболитических амилоидов. (Н-Р) 3D-изображения клеток SH-SY5Y, проинкубированных с агрегатами аминокислот. (С,Т) Изображения клеток SH-SY5Y до (0 ч) и после (5 ч) их инкубации с агрегатами аминокислот. Длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$ .

Как показано на рисунке 3.8, для обеих клеточных линий наблюдалась собственная флуоресценция (возбуждение на 405 нм и регистрация на 450 нм) после инкубации с агрегатами аминокислот (метаболическими амилоидами). Далее с помощью конфокальной микроскопии была осуществлена визуализация распределения амилоидов по клеткам с использованием их собственной флуоресценции (Рис. 3.8А-З). В качестве отрицательного контроля клетки были инкубированы с раствором Ala, подвергнутым тем же манипуляциям, что и растворы других четырех аминокислот, при этом сигнала эндогенной флуоресценции не наблюдалось (Рис. 3.8И-М).

Было показано, что агрегаты Trp, Tyr и Phe локализуются преимущественно внутри клеток, тогда как агрегаты Ade не проникали в цитоплазму и взаимодействовали с мембраной.

Данный факт был верифицирован путем конфокального сканирования клеток по высоте (Рис. 3.8М).

Таким образом, была продемонстрирована возможность визуализации метаболических амилоидов в клетках с использованием сигнала их эндогенной флуоресценции в синезеленой области спектра. Данный сигнал отсутствовал у мономеров метаболитов (аминокислот) и возникал по мере их агрегации (Рис. 3.7Г). Предложенный метод визуализации может быть использован для исследования самосборки амилоидов и ее ингибирования *in vitro*, что особенно актуально в случаях, когда экзогенные метки либо не существуют, либо влияют на процесс самосборки (как было продемонстрировано в разделе 3.3 на примере тиофлавина Т).

### **3.5 Исследование кинетики фибриллообразования с использованием ВЭФБ**

#### **3.5.1 Оптические методы в исследовании кинетики агрегации белков**

Среди подходов к исследованию агрегации белков *in vitro* и, в частности, образования фибриллярных структур, широко используются флуоресцентные методы из-за их чувствительности к структурным перестройкам белков и относительной простоты анализа. Наибольшее распространение получило использование различных флуоресцентных красителей. Так, изменение конформации белков можно изучать с помощью сольватохромных красителей (например, 8-(анилино)-1-нафталинсульфоната (АНС) и бис-АНС), образующих комплексы с неправильно свернутыми белками за счет гидрофобных или электростатических взаимодействий [380,381]. Некоторые красители селективно встраиваются в фибриллярные структуры, например Congo Red и тиофлавин Т (ThT) [382]. Как было указано во введении к данной главе, собственная флуоресценция может служить альтернативным индикатором стадий фибрилляции. А именно, для ряда белков, образующих амилоидоподобные фибриллы, сообщалось о появлении при агрегации синезеленой автофлуоресценции (ВЭФБ) [341,347–349]. Хотя изначально считалось, что ВЭФБ появляется именно в результате агрегации молекул [347], последующий анализ показал, что данный сигнал можно детектировать на уровне мономеров белков [320]. Как было обсуждено в разделе 3.2, механизм формирования ВЭФБ в агрегатах белков является дискуссионным [173,320,341].

В данном разделе будут изложены полученные результаты по исследованию природы ВЭФБ, для чего была проведена серия экспериментов, в которой исследовались оптические свойства белков и пептидов при агрегации. Основной вопрос заключался в том, чтобы



понять, на каком этапе агрегации возникает новая полоса флуоресценции, и как ее появление коррелирует с изменением других физических параметров системы.

### 3.5.2 Проявление фибрилообразования в изменениях оптических свойств системы

Для исследования влияния фибриллообразования на оптические свойства системы, прежде всего, ВЭФБ, были использованы модельные белки – инсулин и лизоцим, которые, согласно литературе, могут образовывать фибриллы при определенных внешних условиях. Появление фибриллярных структур в растворах белков было подтверждено с помощью просвечивающей электронной микроскопии для двух образцов инсулина, отобранных через 220 мин и 340 мин (Рис. 3.9). Оба отобранных образца содержали фибриллы со «скрученной» морфологией и различающейся шириной и степенью фрагментации.

На рисунках 3.9А-Б показаны временные зависимости среднего времени жизни флуоресценции ThT  $\tau_{av}$  (синий) и интенсивности флуоресценции ThT,  $I_{max}$  (черный), для индуцированной нагревом при низком pH агрегации инсулина и лизоцима. Для обоих модельных белков можно наблюдать схожую тенденцию:  $\tau_{av}$  начинает возрастать раньше, чем интенсивность флуоресценции, и выходит на плато ( $1.9 \pm 0.2$  нс для инсулина и  $1.8 \pm 0.2$  нс для лизоцима) в тот момент, когда интенсивность флуоресценции ThT только начинает расти. Согласно работе [383], данный факт связан с тем, что время жизни флуоресценции ThT является более чувствительным индикатором для детектирования префибриллярных агрегатов белков [383]. Однако в наших последующих работах было доказано, что причиной асинхронного роста времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT является неучтенная короткая компонента в кинетике затухания флуоресценции ThT со временем жизни порядка единиц пикосекунд [361].

Кинетика смещения положения максимума спектра поглощения ThT ( $\Delta\lambda_{ThT}$ ) и увеличения мутности раствора (рассчитанной как оптическая плотность на длине волны 500 нм,  $R_{500}$ ) совпадала с кинетикой роста  $I_{max}$ . Исследование структурной динамики вторичной структуры инсулина (переходов из  $\alpha$ -спиралей в  $\beta$ -листы при образовании) при образовании им фибрилл, выполненное с помощью метода кругового дихроизма, показало, что данный переход совпадает по времени с ростом интенсивности флуоресценции ThT [384]. Таким образом, рост интенсивности флуоресценции ThT в процессе агрегации белков связан с образованием в растворе олигомеров, богатых бета-листами в своей вторичной структуре.

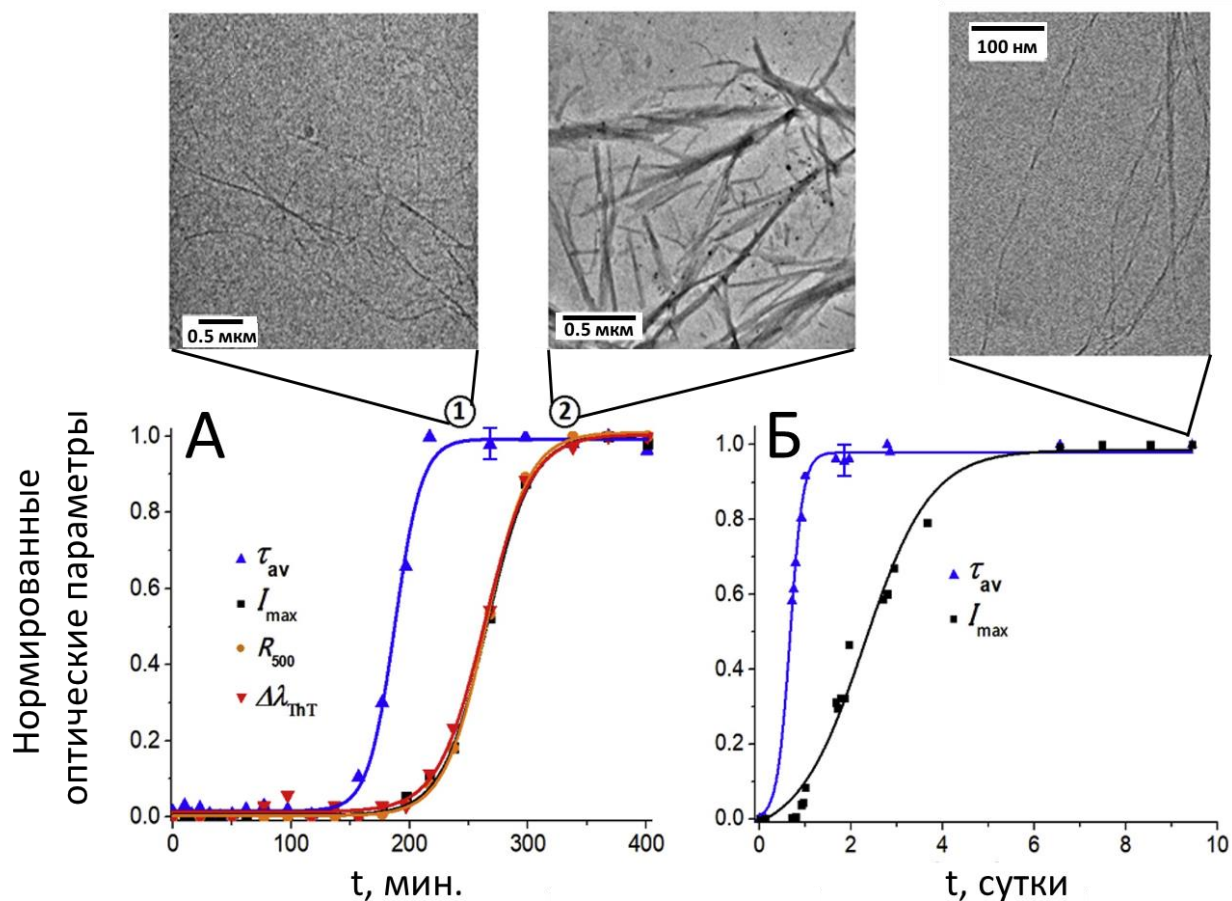


Рисунок 3.9. — Нормированная на отрезок(0, 1) зависимость среднего времени жизни ( $\tau_{av}$ , синий) и интенсивности флуоресценции ThT ( $I_{max}$ , черные квадраты), мутности раствора ( $R_{500}$ , оранжевый) и сдвига положения максимума спектра поглощения ThT ( $\Delta\lambda_{ThT}$ , красный) для систем (А) инсулин-ThT и (Б) лизоцим-ThT. Точки 1 и 2 указывают время инкубации, для которого был проведен анализ образцов с помощью электронной микроскопии.

Далее на примере образования фибриллярных структур инсулином была исследована кинетика формирования ВЭФБ в сравнении с другими оптическими параметрами системы (Рис. 3.10)

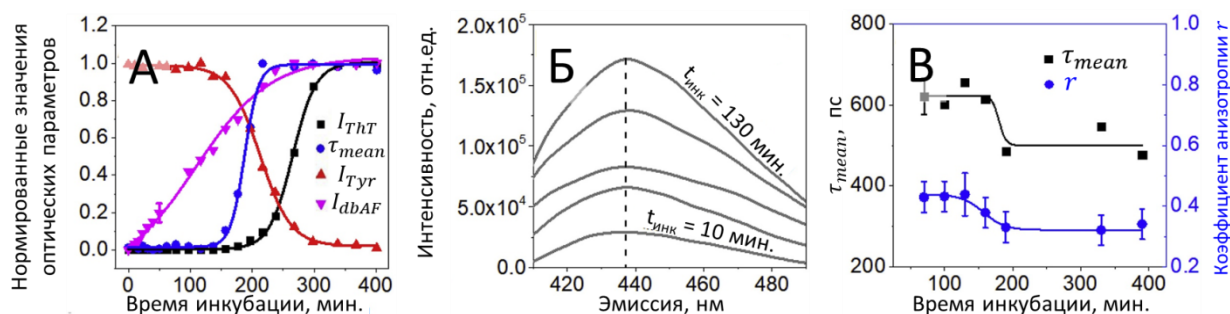


Рисунок 3.10. — А) Изменение оптических свойств раствора инсулина в процессе его агрегации. Красные треугольники – интенсивность флуоресценции Tyr в системе инсулин-ThT; синие кружки – среднее время жизни ThT; черные квадраты – интенсивность флуоресценции ThT; пурпурные треугольники – ВЭФБ ( $\lambda_{возб} = 350$  nm). Кривые

нормированы на отрезок  $[0, 1]$ . Сигнал ВЭФБ был измерен в отсутствие ThT. Б) Спектры ВЭФБ, полученные в процессе агрегации инсулина при возбуждении на  $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм. (В) Кинетика изменения среднего времени жизни ВЭФБ ( $\tau_{\text{av}}$ , левая ось, черные квадраты) и ее анизотропии флуоресценции ( $r$ , правая ось, синие круги) в ходе агрегации инсулина.

Поскольку инсулин не имеет остатков Trp в своей структуре, его собственная УФ-флуоресценция определяется четырьмя остатками Trp, которые можно использовать в качестве флуоресцентных репортеров конформационных изменений белка [385]. Вне зависимости от присутствия в растворе ThT интенсивность флуоресценции остатков Trp в инсулине снижалась во время его агрегации (Рис. 3.10А, красная линия). Наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции Trp может быть вызвано изменением конформации инсулина и связанным с ним усилением тушения Trp молекулами воды [385]. Кинетика уменьшения интенсивности флуоресценции Trp в инсулине коррелирует с увеличением среднего времени жизни ThT, что служит дополнительным свидетельством связывания ThT с олигомерами инсулина на ранних стадиях его агрегации.

На рисунке 3.10А также показана динамика изменения интенсивности сигнала ВЭФБ (возбуждение на 350 нм, регистрация на 420 нм). В то время как в исходном растворе инсулина ВЭФБ практически отсутствует, ее рост наблюдается с самого начала агрегации (инкубации при повышенной температуре), и ее интенсивность увеличивается более чем в 10 раз к тому моменту, когда интенсивность флуоресценции ThT выходит на плато. Измерение ВЭФБ при агрегации инсулина проводилось в отсутствие ThT. Спектры ВЭФБ, полученные в разные моменты времени при агрегации инсулина, приведены на рис. 3.10Б. Аналогичное поведение сигнала ВЭФБ наблюдалось для лизоцима.

Зависимости среднего времени жизни и анизотропии флуоресценции ВЭФБ от времени во время формирования фибрилл приведены на рисунке 3.10В, на котором можно наблюдать изменения в диапазоне времен, соответствующем изменению времени жизни флуоресценции ThT (Рис. 3.10А, синяя линия). Снижение анизотропии и времени жизни ВЭФБ может быть связано с изменением микроокружения флуорофоров, ответственных за ВЭФБ, или их взаимодействием. Для изолированного флуорофора деполаризация эмиссии которого вызвана вращательной диффузией, анизотропия должна быть обратно пропорциональна времени жизни флуоресценции. В случае переноса энергии между одинаковыми флуорофорами, локализованными на одной молекуле, время жизни флуоресценции постоянно, а анизотропия уменьшается в зависимости от геометрии агрегата и определяется количеством соседних флуорофоров, для которых возможен перенос энергии, и их взаимным расположением. В случае ВЭФБ изменения времени жизни

флуоресценции могут быть связаны с изменениями в микроокружении флуорофоров, а снижение анизотропии может быть связано с переносом энергии между флуорофорами.

### 3.5.3 Спектральные свойства ВЭФБ в различных модельных системах

Для дальнейшего анализа механизма формирования ВЭФБ были изучены ее свойства в системах, отличных от агрегатов инсулина и лизоцима. Так, известно, что дипептид фенилаланина (FF) может агрегировать в фибриллярные структуры в водном растворе [386]. Помимо этого, как было показано в работе [378] и в разделе 3.4, аминокислота фенилаланин сама по себе может образовывать фибриллы при определенных условиях.

На рисунке 3.11 представлены ЕЕМ-матрицы, измеренные для агрегатов инсулина, лизоцима, дипептида фенилаланина и фенилаланина. Для всех систем наблюдался пик флуоресценции с центром при возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} \sim 350$  нм и пиком эмиссии на  $\lambda_{\text{эм}} \sim 450$  нм, что согласуется с описанными в литературе параметрами ВЭФБ для белковых агрегатов [320,341,347–350].

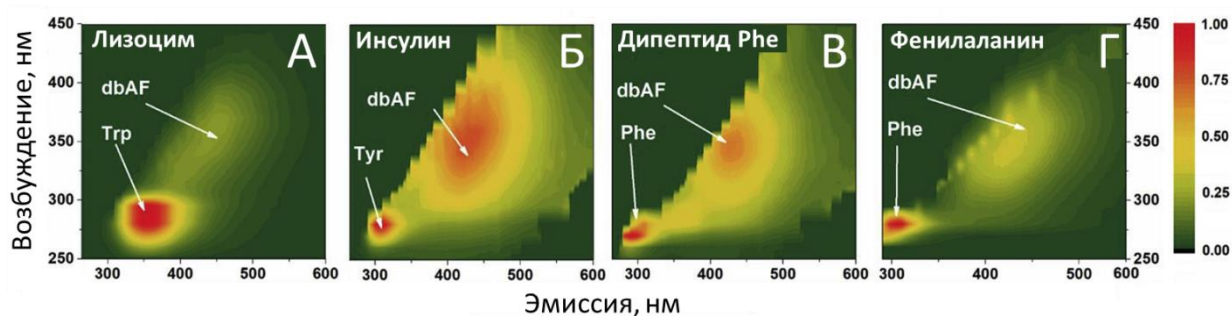


Рисунок 3.11. — ЕЕМ-матрицы, измеренные для растворов лизоцима (А), инсулина (В), дипептида FF (С), фенилаланина (D). Лизоцим (14 мкМ, рН 2) инкубировался при 62°С в течение 8 дней. Инсулин (34 мкМ, рН 2) - при 62°С в течение 5 часов. Дипептид FF (16 мМ, рН 6.5) - при 40°С в течение 1 часа. Раствор Phe (0.6 мМ, рН 2.0) - при 62°С в течение 4 часов.

Как видно из рисунка 3.11Г, после инкубации раствора Phe при 62°С в течение 4 часов, у него появляется сигнал ВЭФБ с параметрами, близкими к таковым для белковых агрегатов (Рис. 3.11). Условия инкубации Phe были аналогичны использованным при исследовании агрегации инсулина и лизоцима (рН 2, инкубация при 62°С).

Аналогичные эксперименты были выполнены с растворами других ароматических аминокислот (Trp и Tyr) и с неароматической аминокислотой глицина (Gly) (Табл. 3.1). В то время как для глицина это увеличение при инкубации при 62°С практически отсутствовало, для ароматических аминокислот наблюдался сильный и необратимый рост ВЭФБ (Рис. 3.12).

Таблица 3.1. Параметры ВЭФБ для растворов Phe, Trp, Tyr и Gly, инкубированных при 62°С в течение 4 часов: среднее время жизни флуоресценции ( $\tau_{\text{ав}}$ ) и коэффициент усиления

(enhancement factor, EF), представляющий собой отношение интенсивности ВЭФ после инкубации к таковой в исходном растворе.

	Концентрация, мг/мл	$\tau_{av}$ , нс	Фактор усиления
Phe	0.1	$2.3 \pm 0.2$	4.6
Trp	0.1	$2.7 \pm 0.3$	20.7
Tyr	0.05	$3.5 \pm 0.3$	4.1
Gly	10	-	1.2

Также была измерена концентрационная зависимость ВЭФ для Phe, Trp, Tyr и Gly, а также для модельного белка (бычьего сывороточного альбумина, БСА), оказавшаяся линейной, что может говорить о том, что сигнал ВЭФ связан с мономерами [320], а не с олигомерами, которые могут образовываться спонтанно при повышенных концентрациях (Рис. 3.12В).

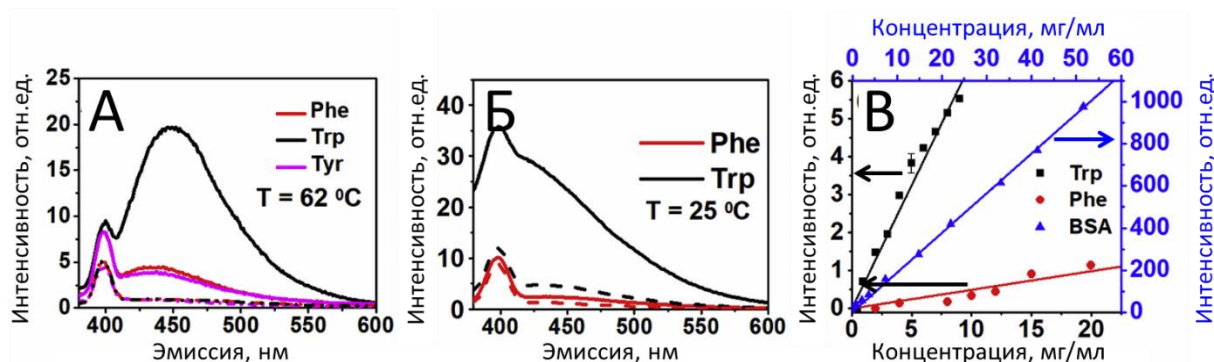


Рисунок 3.12. — А) Спектры флуоресценции ВЭФ исходных и инкубированных при 62°C в течение 4 часов растворов Phe, Trp и Tyr. Б) Спектры ВЭФ для Trp и Phe при концентрациях 0.05 мг/мл (пунктирная линия) и 10 мг/мл (сплошная линия), измеренные при 25 °С до нагрева. В) Зависимость интенсивности ВЭФ для БСА, Trp и Phe от концентрации растворенного вещества, измеренная при  $T = 25^\circ\text{C}$ . Длина волны возбуждения составляла 350 нм. Пик с максимумов в районе 400 нм связан с комбинационным рассеянием воды.

Как показано на рисунке 3.12Б-В, для всех систем наблюдались линейные зависимости интенсивности ВЭФ от концентрации. В случае БСА неизменность олигомерного состояния дополнительно подтверждалась с помощью гель-фильтрующей хроматографии [387], которая показала, что при концентрациях 30-500 мкМ в растворе БСА присутствуют только мономерная и димерная фракции с постоянным молярным соотношением 1/12. Далее, время жизни ВЭФ для БСА было неизменным для всех концентраций. Неизменность олигомерного состояния БСА, линейные зависимости ВЭФ от

концентрации растворенного вещества для БСА и аминокислот свидетельствуют о том, что ВЭФБ не обязательно связана с наличием агрегации в системе.

Была проведена идентификация химических модификаций, ответственных за появление ВЭФБ в растворах аминокислот при их нагреве с применением масс-спектрометрии высокого разрешения. Полученные масс-спектры раствора Phe при pH 2.0, инкубированного 4 часа при 62°C и обладающего интенсивным сигналом ВЭФБ (Рис. 3.12А), приведены на рисунке 3.13. В исследованном образце было обнаружено наличие ионов, соответствующих продуктам превращения фенилаланина. В частности, при температуре выше 50°C может происходить дегградация фенилаланина (Рис. 3.13, панель 1,  $m/z = 166.08$ ) по механизму Штреккера [388]. Продуктами реакции при этом являются фенилацетальдегид (2,  $m/z = 121.08$ ) и бензальдегид (3,  $m/z = 107.05$ ), пики которых были обнаружены в масс-спектре инкубированного при повышенной температуре фенилаланина (Рис. 3.13). Также наблюдался низкий выход типичных продуктов термоллиза фенилаланина – фенилпропионовой (4,  $m/z = 151.11$ ) и фенилпировиноградной (5,  $m/z = 165.05$ ) кислот [389] в виде однозарядных ионов. Кроме того, нагрев фенилаланина в воде приводит к гидроксированию ароматического кольца с образованием тирозина (6,  $m/z = 182.08$ ) с последующим дальнейшим окислением до хинона (7),  $m/z = 196.07$ . Окисленный фенилэтиламин (8) ( $m/z=152,07$ ) является типичным продуктом декарбоксилирования фенилаланина. Наблюдаемые пути реакции позволяют предположить также образование конечных продуктов конденсации фенилаланина – стильбена, стирола, толуола [390], которые также могут быть отчасти ответственны за ВЭФБ. Однако из-за отсутствия основных функциональных групп они не могут быть обнаружены использованным в работе методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.



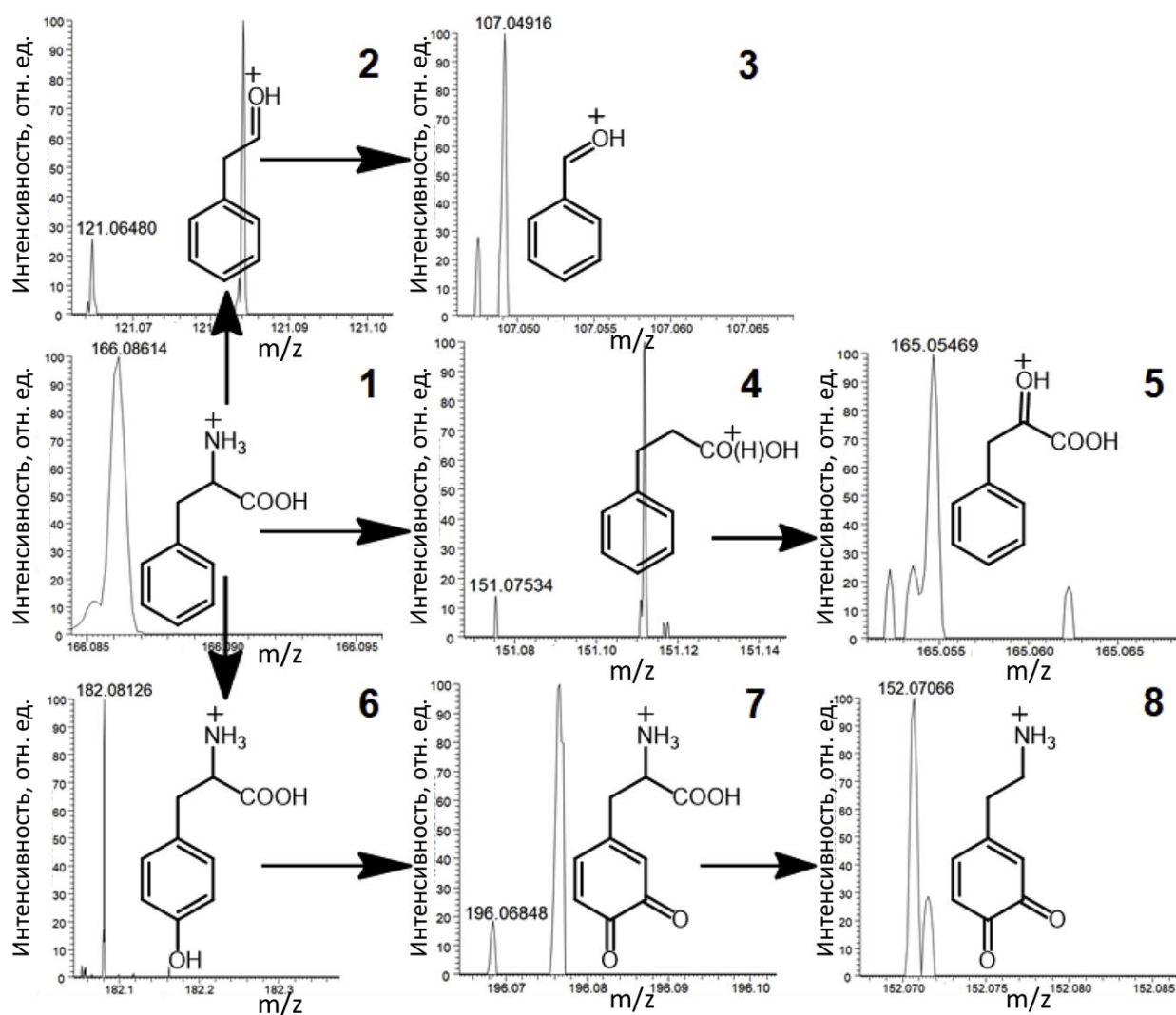


Рисунок 3.13. — Вероятные продукты реакции, образующиеся при нагреве фенилаланина, наблюдаемые в масс-спектрах высокого разрешения. Панели соответствуют областям масс-спектра образца Phe, инкубированного при 62°C, в которых были обнаружены соединения (1)-(8) – подробнее см. текст.

Таким образом, было показано, что при исследовании агрегации с использованием ВЭФБ следует учитывать процесс окисления, который может привести к образованию флуоресцентных продуктов окисления с повышенной автофлуоресценцией. Рисунки 3.11Г и 3.12А демонстрируют, что в условиях, соответствующих используемым при исследовании фибрилляции инсулина, для водных растворов Phe, Tyr и Trp при низких концентрациях (~ 0.1 мг/мл) имеет место появление полосы ВЭФБ, обладающей сходными спектральными свойствами с ВЭФБ, возникающей при образовании фибрилл инсулином и лизоцимом. Для этих модельных систем (на примере Phe) с помощью масс-спектропии был проведен поиск признаков химических модификаций в нагретом образце Phe. Было замечено, что имеет место ряд химических реакций, потенциально приводящих к образованию продуктов окисления аминокислот.

### 3.6 Гипотеза о роли окислительных процессов в формировании эндогенной флуоресценции биомолекул и клеток

Следующей стадией исследований являлась проверка гипотезы о том, что окисление макромолекул различной природы может приводить к появлению новых эндогенных флуорофоров и хромофоров как в модельных системах, так и в живых клетках.

Первым шагом являлось исследование фотофизических процессов в модельных системах продуктов окисления *in vitro*. В качестве модельных растворов были использованы водные растворы аминокислоты триптофана (0.05 мг/мл,  $\sim 10^{-4}$  М) и ДНК (плазмидная ДНК E.Coli, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), 7500 пар оснований, концентрация 1 мкг/мл). Для окисления образцов использовалось УФ излучение ртутной лампы (длина волны 254 нм, средняя интенсивность 10 мВт/см<sup>2</sup>). Фотоокисление производилось при 20°C в течение 3 часов (доза  $\sim 100$  Дж/см<sup>2</sup>).

Было получено, что, в отличие от контрольных растворов, не подвергавшихся окислению, в окисленных образцах модельных растворов возникало поглощение в видимом диапазоне (в том числе и в длинноволновой области,  $>600$  нм) не обладающее какими-либо выраженными полосами и монотонно спадающее с длиной волны (Рис. 3.14А). Появление длинноволнового поглощения сопровождалось возникновением флуоресцентного отклика, возбуждаемого и детектируемого в видимом и ИК диапазоне спектра, обладающего характерными особенностями (Рис. 3.14Б,В). Во-первых, положение максимума спектров флуоресценции сдвигалось с изменением длины волны возбуждения (Рис. 3.14Г), что нехарактерно для случая индивидуальных молекулярных флуорофоров, для которых выполняется правило Каши. Во-вторых, квантовый выход флуоресценции монотонно спадал с ростом длины волны возбуждения (на рисунке 3.14Б,В видно падение интенсивности флуоресценции при увеличении роста длины волны возбуждения). Из кривых затухания флуоресценции, измеренных с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов (временное разрешение  $\sim 100$  пс, длина волны возбуждения 405 нм, регистрация в диапазоне 430-750 нм), было обнаружено, что возникающие продукты окисления обладают несколькими характерными временами затухания флуоресценции (0.8 нс, 3.5 нс), а среднее время затухания флуоресценции, рассчитанное как  $\tau_m = (a_1\tau_1 + a_2\tau_2)/(a_1 + a_2)$ , где  $a_1$  и  $a_2$  – амплитуды затухания кинетик, составляет 2.2 нс. Сигнал эндогенной флуоресценции в видимой области спектра, возникающий при фотоокислении, в  $\sim 40$  раз возрастал для образцов аминокислоты и в  $\sim 15$  для раствора ДНК (Рис. 3.14Е).



Наличие длинноволнового поглощения у продуктов окисления биомacroмолекул говорит в пользу того, что их отклик также может быть зарегистрирован в красной и ИК области спектра, где большинство эндогенных флуорофоров не обладают флуоресцентным откликом.

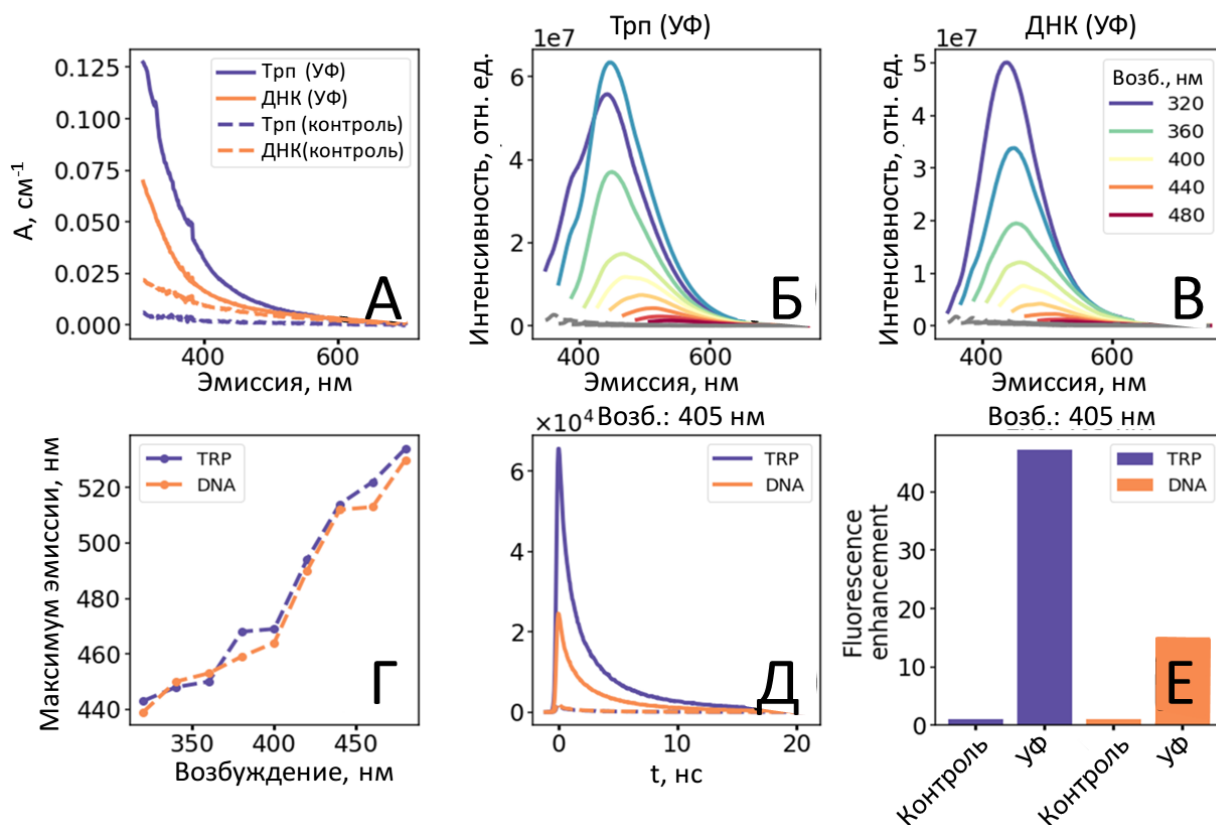


Рисунок 3.14. — А) поглощение в видимом диапазоне спектра, возникающее при фотоокислении модельных образцов (пунктиром обозначены спектры поглощения контрольных образцов). Б,В) спектры эмиссии флуоресценции для образцов Трп и ДНК, измеренные на длинах волн возбуждения в диапазоне 320–480 нм с шагом 20 нм. Г) Зависимость положения максимума эмиссии флуоресценции от длины волны возбуждения. Д) Характерный вид кривых затухания флуоресценции при возбуждении на длине волны 405 нм. Пунктиром обозначен сигнал, регистрируемый от контрольных образцов. Е) Фактор усиления флуоресценции при фотоокислении модельных образцов.

Было получено, что флуоресцентный отклик от продуктов окисления аминокислот и белков может быть возбужден в красном/ближнем инфракрасном диапазоне спектра. Для этого водный раствор триптофана (1 мг/мл, 2 мл) был окислен различными дозами УФ излучения (до  $\sim 600$  Дж/см<sup>3</sup>), а сигнал его флуоресценции детектировался при возбуждении на 635 нм в спектральном диапазоне 650-750 нм с помощью метода время-коррелированного счёта единичных фотонов с временным разрешением порядка  $\sim 150$  пс. Исходные кинетики затухания флуоресценции представлены на рисунке 3.15А. Было установлено интегральный сигнал флуоресценции, возбуждаемой на 635 нм растёт линейно с увеличением времени УФ-облучения (и, соответственно, дозы поглощенного излучения,

Рис. 3.15Б), при этом зависимость времени затухания флуоресценции от длительности окисления имеет сигмоидальную зависимость (Рис. 3.15В), и среднее время затухания флуоресценции, определяемого при биэкспоненциальной аппроксимации кинетик затухания флуоресценции выходит на стационарное значение 0.4 – 0.5 нс. Такая зависимость интегральной интенсивности флуоресцентного фона и времени затухания флуоресценции  $\tau_{\text{mean}}$  может свидетельствовать в пользу формирования (до 50 – 100 мин. облучения), а затем накопления фотопродуктов. Подробно природа формируемого оптического отклика УФ-облученного триптофана и других систем с похожими оптическими свойствами будет представлена в Главе 4.

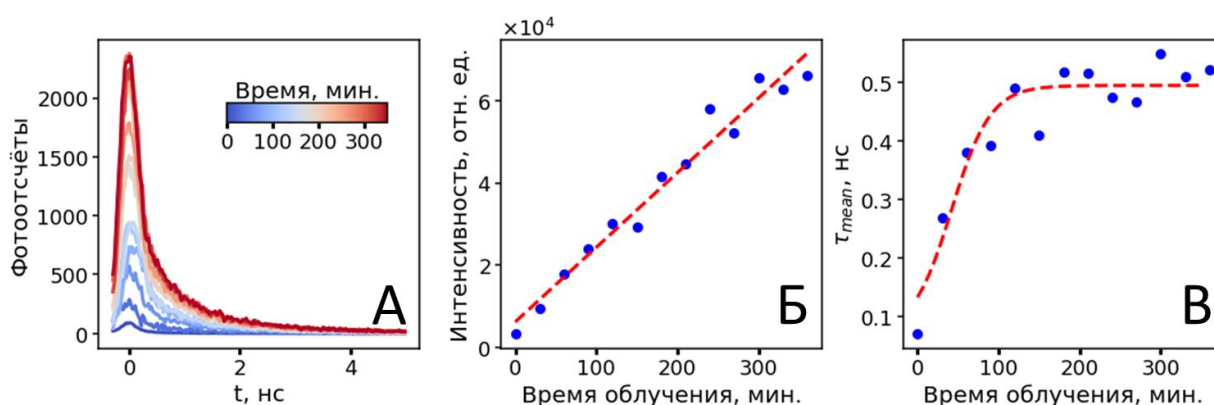


Рисунок 3.15. — А) Кинетики затухания флуоресценции растворов Трип, облученного УФ-излучением ( $\sim 10 \text{ мВт/см}^2$ ) в течение различного времени, задетектированные в диапазоне 650-750 нм при возбуждении 635 нм. Б, В) Зависимость интегрального сигнала (Б) и среднего времени затухания флуоресценции (В), возбуждаемой на 635 нм, от длительности УФ-облучения.

Таким образом, было показано, что характерной чертой продуктов окисления ароматических биомолекул также является наличие флуоресцентного отклика, который может быть возбужден в видимом и инфракрасном диапазоне спектра. Данный факт может быть использован для их оптического детектирования *in vivo*. Отметим, что спектральные свойства флуоресценции, возникающей в результате окисления, аналогичны описанным в литературе свойствам ВЭФБ.

Для проверки гипотезы о возможности детектирования продуктов окисления *in vivo* было изучено поведение эндогенного оптического отклика клеток при окислительном стрессе. В качестве исследуемой системы была использована клеточная культура кератиноцитов человека (линия HaCaT), а моделями для окислительного стресса служило воздействие УФ-излучением (длина волны 254 нм, дозы облучения варьировались в диапазоне от 25 до 100 мДж/см<sup>2</sup>, что является допустимыми дозами при облучении кожи человека) и перекисью водорода (концентрация 1500 мкМ). Изменения оптического отклика наблюдались на

уровне единичных клеток с помощью проточной цитометрии с несколькими длинами волн возбуждения и детектирования.

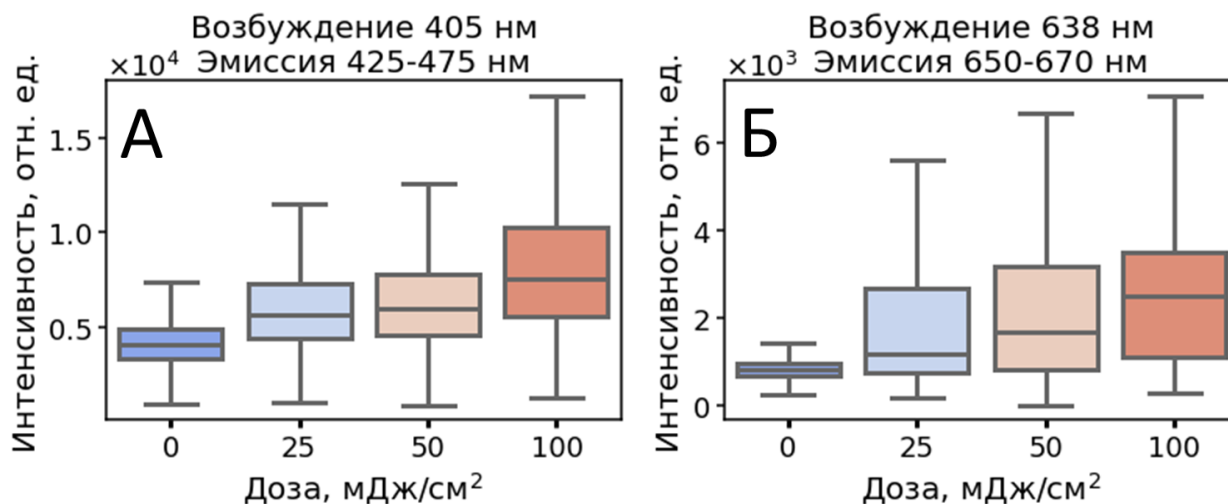


Рисунок 3.16. — Распределение факторов усиления флуоресценции (отношение флуоресцентного отклика к медиане флуоресцентного отклика в том же канале детектирования в контрольной группе) для кератиноцитов (линия HaCaT) при окислительном стрессе, индуцированном УФ облучением различной дозы ( $\lambda = 254$  нм). Спектральные каналы: А) Blue (ex = 405 / em = 450 (45) нм); Б) Red (ex = 638 / em = 660 (10) нм).

На рисунке 3.16 представлены данные проточной цитометрии для клеточных культур с индуцированным окислительным стрессом, вызванным УФ облучением, при возбуждении на 405 нм и детектировании в диапазоне 425 – 475 нм и возбуждении на 638 нм и детектировании в диапазоне 650–670 нм. Было получено, в согласии с результатами экспериментов с модельными растворами, что усиление флуоресцентного отклика наблюдается во всех каналах детектирования. При этом наибольший контраст (усиление флуоресценции по сравнению с контрольной группой клеток) наблюдался при возбуждении в красной области, на 638 нм спустя 20 часов после облучения. Это может быть объяснено тем фактом, что вклад от других эндогенных флуорофоров в данном канале детектирования низок. При этом возникновение флуоресценции в красном диапазоне только спустя 20 часов после облучения свидетельствует о том, что к накоплению продуктов окисления приводят именно биохимические процессы внутри клетки, индуцированные первичным воздействием УФ излучения, а не прямое фотоокисление. Аналогичные результаты были получены при воздействии на клетки пероксидом водорода (Рис. 3.17).

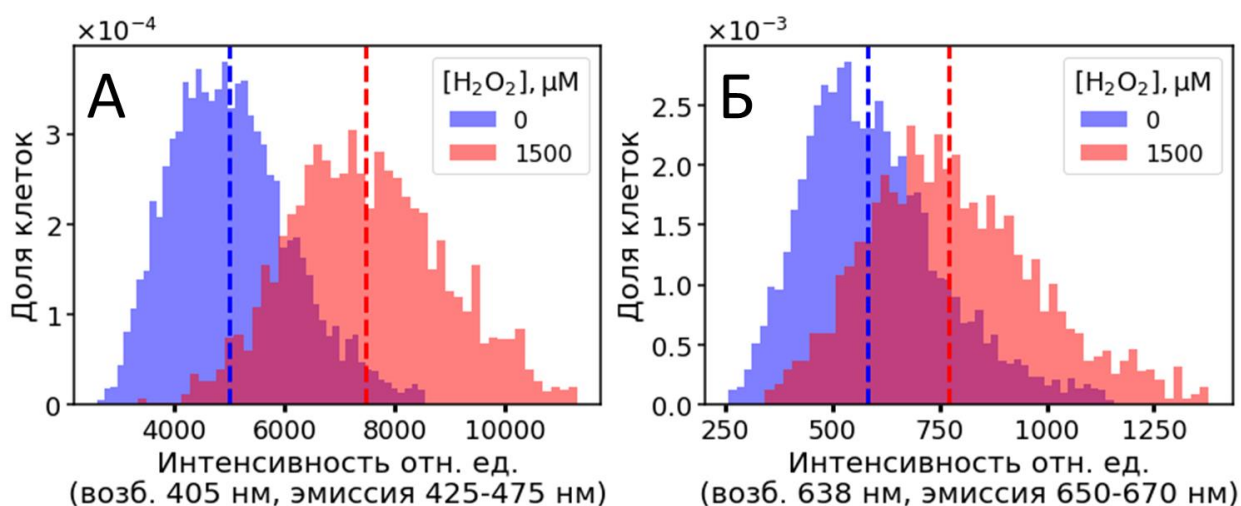


Рисунок 3.17. — Распределение флуоресценции для кератиноцитов (линия HaCaT) с окислительным стрессом, индуцированным воздействием перекиси водорода (1500 мкМ, измерения проведены спустя 20 часов после воздействия) при возбуждении на 405 нм и детектировании в диапазоне 425–475 нм (А) и возбуждении на 638 нм и детектировании в диапазоне 650–670 нм (Б).

Таким образом, были выявлены основные фотофизические характеристики гетерогенных продуктов окисления аминокислот, белков, липидов *in vitro* и *in vivo* на моделях культур клеток. Детальному рассмотрению фотофизики таких систем посвящена Глава 4.

## Выводы

В данной главе были исследованы свойства и механизмы формирования эндогенной флуоресценции белков и агрегатов пептидов, возбуждаемой в видимом диапазоне спектра (видимая эндогенная флуоресценция белков, ВЭФБ). Кратко рассмотрены оптические свойства полосы ВЭФБ, прорезюмированы основные предполагаемые механизмы формирования флуоресцентного отклика для агрегатов белков и пептидов в видимом диапазоне, представленные в литературе.

Продемонстрирована актуальность использования ВЭФБ для мониторинга процессов агрегации в системе белков. На примере флуоресцентного зонда тиофлавина Т показано существенное влияние экзогенных маркеров на кинетику формирования агрегатов коротких пептидов на примере короткого пептида Fmoc-FF. Показано, что время формирования фибриллярных структур, образующихся путём самосборки из мономеров Fmoc-FF, а также морфологические особенности формируемого гидрогеля и его механические свойства, существенным образом зависят от соотношения между концентрацией экзогенного красителя, добавляемого для мониторинга процесса самосборки, и мономера пептида, даже в случае малых концентраций тиофлавина-Т  $[ThT]/[Fmoc-FF] \ll 1$ . Так, эффект ингибирования гелеобразования обнаруживается при

соотношении концентраций мономер пептида:краситель равной 360:1, а добавление экзогенного красителя в водный раствор мономера в соотношении мономер:краситель 45:1 увеличивает модуль упругости на порядок. Данный факт может быть интерпретирован с точки зрения двухступенчатой модели формирования агрегатов фибрилл, в которой прямое взаимодействие экзогенного красителя с фибриллярными структурами, изменяет их физико-химические свойства.

Показана возможность визуализации агрегатов аминокислот, пептидов и белков с использованием сигнала ВЭФБ без использования сигнала красителей *in vitro* широком диапазоне длин волн (возбуждение 280—500 нм, эмиссия 300—700 нм), а также *in vivo* в клетках нейробластомы (клеточная линия SH-SY5Y) и клетках почек (клеточная линия НЕК 293) при возбуждении на 405 нм при инкубации клеток с агрегатами аминокислот Trp, Tyr, Phe и Ade в течение 5 часов.

Продемонстрирована возможность исследования кинетики фибриллообразования из мономеров белков с использованием сигнала ВЭФБ на примере систем с модельными белками — инсулином и лизоцимом. Показано, что интенсивность сигнала ВЭФБ является более чувствительной величиной в сравнении с временем затухания флуоресценции и интенсивностью стандартного зонда тиофлавина Т, используемого в качестве красителя. Аналогично, фибриллообразование может быть детектировано по изменению времени затухания флуоресценции ВЭФБ и изменению коэффициента анизотропии флуоресценции. Также, на модельных системах агрегатов белков и пептидов из лизоцима, инсулина, дипептида Phe и фенилаланина оценены времена затухания флуоресценции на наносекундном масштабе – характерные времена затухания флуоресценции ВЭФБ варьировались в диапазоне 1-3 нс.

Наконец, в настоящей Главе предложена гипотеза о влиянии окислительных процессов на формирование наблюдаемой полосы ВЭФБ. На модельных растворах триптофана и ДНК, окисленных с помощью УФ-излучения на 254 нм, продемонстрировано возникновение сигнала со спектральными характеристиками, схожими с сигналом ВЭФБ, растущим линейно со временем облучения. На клетках клеточной линии кератиноцитов человека (клеточная линия HaCaT), продемонстрировано возникновение сигнала эндогенной флуоресценции, возбуждаемой в широком диапазоне длин волн, в частности, на 405 и 638 нм, при индуцировании окислительного стресса УФ-излучением и пероксидом водорода. Полученные результаты говорят в пользу формирования ВЭФБ как сигнала от гетерогенных продуктов аминокислот, белков и липидов, образующихся в результате окислительных процессов, протекающих в исследуемых системах.

## Глава 4. Механизмы формирования оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A17-A19].*

### 4.1 Введение и постановка задачи

В предыдущей Главе был рассмотрен вопрос о формировании у белков и пептидов сигнала флуоресценции в видимой области спектра. Был рассмотрен ряд гипотез, объясняющих данный феномен, в частности гипотеза о роли процессов окисления в генерации новых флуорофоров. Данная гипотеза была верифицирована сначала на примере инкубации аминокислот при условиях, моделирующих условия, используемые при исследовании агрегации белков и образования амилоидных фибрилл (Глава 3.5), а затем было показано, что при окислении растворов модельных молекул – триптофана и ДНК – у них появляется длинноволновое поглощение и флуоресценция в видимой области спектра. При этом особенности спектральных свойств (бесструктурное поглощение и наличие характерной зависимости формы спектра флуоресценции от длины волны), а также тот факт, что окисление может приводить к появлению широкого спектра химических модификаций, свидетельствуют о том, что системы, образующиеся при окислении биологических молекул, представляют из себя гетерогенные по молекулярному составу смеси флуорофоров. В данной Главе будет подробно рассмотрена гипотеза о том, что гетерогенные системы флуорофоров, возникающие в результате процессов окисления биоорганических соединений, обладают общими закономерностями формирования фотофизических свойств.

В отличие от «классических» эндогенных флуорофоров – НАД(Ф)Н, флавинов, билирубина, ароматических аминокислотных остатков в белках (см. Главу 1) – в организме человека существует ряд флуоресцирующих систем, для которых свойственно отклонение эмиссии флуоресценции от правила Вавилова и Каши – положение максимума эмиссии и квантовый выход флуоресценции в них существенно зависят от длины волны возбуждения. Флуоресценцию таких систем можно возбудить в широком диапазоне длин волн, а их спектр поглощения не имеет характерных локальных максимумов в видимом и ИК диапазоне и монотонно убывает с ростом длины волны. Структурно такие системы представляют собой гетерогенную смесь, состоящую из нескольких различных по химическому строению молекул флуорофоров, поэтому далее такие системы будут называться гетерогенными системами флуорофоров (ГСФ), подразумевая, однако, при этом и особенности их оптических свойств. Для описания механизмов формирования оптических свойств ГСФ имеются две основных гипотезы [391]. В рамках первой из них

спектры поглощения и флуоресценции ГСФ формируются за счет наложения и усреднения спектров молекул-хромофоров и флуорофоров в их составе. В рамках второй гипотезы предполагается, что центральную роль играет электронное взаимодействие между молекулами-хромофорами и флуорофорами в составе ГСФ, приводящее к появлению новых полос поглощения и флуоресценции [392,393].

В данной главе исследованы механизмы формирования оптических свойств ГСФ на примере двух принципиально разных моделей. Первая из моделей реализует подход «снизу вверх» (bottom-up), когда путем воздействия на молекулы одного типа, в данном случае, растворы триптофана (Trp, молекулярная масса 204 Да) и дигидроксибензойной кислоты (ДНВ, молекулярная масса 154 Да), генерируется гетерогенная система флуорофоров. Как будет показано, в результате окисления у данных систем формируются оптические свойства, аналогичные описанным выше, при этом имеет место эволюция молекулярного состава (определяемого методом масс-спектрометрии) и спектральных свойств (спектров поглощения и флуоресценции) со временем воздействия. Вторая из моделей реализует подход «сверху вниз» (top-down), когда изначально берется гетерогенная смесь молекул, обладающая характерными оптическими свойствами ГСФ, после чего исследуется взаимосвязь оптических и структурных свойств системы, в том числе после воздействия на нее. В данной работе для экспериментов в рамках второй модели рассматривается природное органическое вещество.

Таким образом, основной целью данной главы было исследование взаимосвязи структурных и оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров на примерах синтетических систем, образующихся путём окисления “снизу вверх”, и гетерогенных систем флуорофоров на примере природного органического вещества.

Основными задачами данной Главы являются:

- (1) Исследование эволюции спектральных свойств ГСФ, образующихся при воздействиях на растворы Trp и ДНВ, индуцирующих процесс окисления – УФ облучении и озонировании. Изучение взаимосвязи молекулярного состава и оптических свойств ГСФ в процессе воздействия.
- (2) Исследование параметров кинетики релаксации возбуждения ГСФ, сгенерированных в рамках подхода «снизу вверх», на временных масштабах от 100 фс до 10 нс. Верификация гипотезы о роли электронного взаимодействия и переноса энергии возбуждения в формировании оптических свойств ГСФ.
- (3) Исследование спектральных свойств и свойств кинетики релаксации флуоресценции ГСФ в рамках подхода «сверху вниз» на наборе образцов природного органического

вещества с разным происхождением и молекулярным составом. Изучение взаимосвязи оптических и структурных свойств исследуемых ГСФ.

## **4.2 Исследование механизма формирования оптических свойств ГСФ, формируемых «снизу вверх»**

### **4.2.1 Объекты и методы исследования**

#### 4.2.1.1. Приготовление образцов

Для исследования механизмов формирования оптического отклика ГСФ в рамках подхода «снизу вверх» в качестве модельных систем были рассмотрены водные растворы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (DHB, Sigma-Aldrich) с концентрацией 1 мг/мл и L-триптофана (Trp, Sigma-Aldrich) с концентрацией 0.1 мг/мл. Растворы были подвергнуты либо озонированию с использованием генератора, вырабатывающего озон со скоростью 100 мг/ч, либо УФ облучению ртутной лампой (длина волны 254 нм, интенсивность  $\approx 10$  мВт/см<sup>2</sup>). Значения pH исходных растворов составляли 2.8 для DHB и 7.4 для Trp и незначительно снижались при использованных методах воздействия.

Для исследования зависимости оптических свойств от размера частиц в системе растворы продуктов окисления Trp и DHB сначала фильтровались с помощью целлюлозных фильтров с диаметром пор 0.22 мкм, после чего полученные растворы фильтровались с помощью центрифужных 3 кДа фильтров (Microcon YM-3, Millipore). Растворы центрифужировались при ускорении 12100×g в течение 100 минут. Для удаления возможных примесей центрифужные фильтры предварительно дважды промывались дистиллированной водой в течение 20 мин при ускорении 12100×g. Для сбора достаточного объема пробы использовалось несколько центрифужных фильтров.

#### Измерение спектральных свойств

Спектры поглощения измерялись с помощью спектрофотометра UV-Vis Lambda 25 (Perkin-Elmer, США) в кварцевых кюветах с величиной оптического пути 1 см. Измерения спектров флуоресценции производились с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 (Horiba, Jobin Yvon, Япония). Матрицы флуоресценции измерялись с шагом по возбуждению 20 нм, спектральные ширины щелей возбуждения и эмиссии составляли 5 нм. Исходные растворы разбавлялись так, чтобы величина оптической плотности на длине волны 320 нм составляла не более 0.1 см<sup>-1</sup>. Все спектры предобрабатывались путем вычитания сигнала рассеяния накачки и сигнала КР воды.

Относительный квантовый выход флуоресценции рассчитывался как отношение интегрального сигнала флуоресценции к величине поглощения на длине волны возбуждения флуоресценции:



$$\varphi = \frac{\int_{\lambda_{exc}+20}^{700} F(\lambda_{em}, \lambda_{exc}) d\lambda_{em}}{A(\lambda_{exc})}, \quad (4.1)$$

где  $F(\lambda_{em}, \lambda_{exc})$  – сигнал флуоресценции для данной длины волны эмиссии  $\lambda_{em}$  и длины волны возбуждения  $\lambda_{exc}$ ;  $A(\lambda_{exc})$  – величина поглощения исследуемого раствора на длине волны возбуждения. Для получения абсолютных значений квантового выхода величина  $\varphi$  нормировалась на значения квантового выхода для образца SRNA, сообщенные в [394].

#### Кинетическая флуориметрия

Измерение кривых затухания флуоресценции на субнаносекундном масштабе производилось с помощью флуориметра, реализующего метод время-коррелированного счёта единичных фотонов. В качестве источника возбуждения использовался импульсный лазерный диод (длительность импульса 40 пс, энергия в импульсе 10 пДж, частота повторений 10 МГц, InTop, Россия). Флуоресценция образца собиралась с помощью коллимирующей линзы и волокна, идущего на вход монохроматора MonoScan-2000 (спектральное разрешение 5 нм, OceanOptics, США). Регистрация кинетик затухания флуоресценции производилась с помощью ФЭУ PMC-100 и платы SPC-130EM (Becker&Hickl, Германия).

Для измерения кривых затухания флуоресценции с разрешением  $\sim 100$  фс была использована система FOG100 (CDP Systems, Россия), реализующая метод ап-конверсии флуоресценции. Принципиальная схема установки продемонстрирована на рисунке 4.1. Для возбуждения флуоресценции образца использовался сигнал второй гармоники импульсного излучения титан-сапфирового лазера с длиной волны 800 нм, длительностью импульса  $\sim 150$  фс, частотой следования импульсов 80 МГц и средней мощностью излучения на частоте второй гармоники 30 мВт. После возбуждения флуоресценции образца импульсом второй гармоники ( $2\omega$ ), флуоресцентный отклик ( $\omega_{fl}$ ) сбивался на нелинейном кристалле бета-бората бария с лазерным импульсом на фундаментальной частоте  $\omega$ , 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. Таким образом осуществлялось оптическое стробирование сигнала флуоресценции.

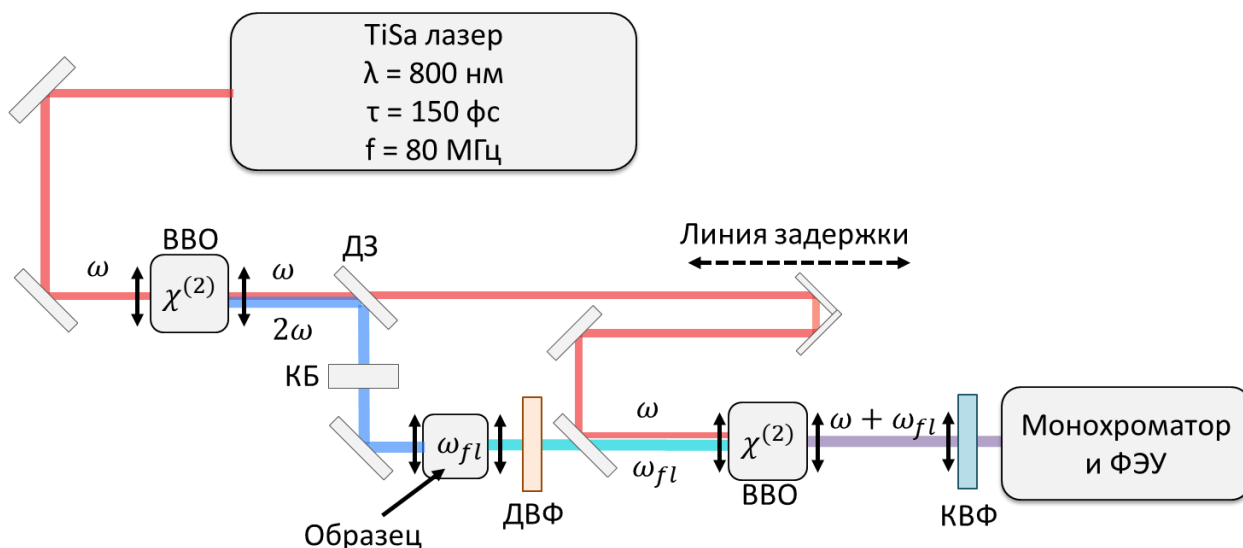


Рисунок 4.1 — Принципиальная схема установки, использованной для измерения кинетики затухания флуоресценции с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. ДЗ – дихроичное зеркало (длина волны отсечки 450 нм), КБ – компенсатор Берека, используемый для контроля поляризации возбуждающего излучения, ДВФ – длинноволновый фильтр, ослабляющий сигнал на удвоенной частоте накачки, возбуждающий флуоресценцию, КВФ – коротковолновый фильтр, ослабляющий фоновую засветку от стробирующего импульса, ВВО – нелинейные кристаллы бета-бората бария, используемые для генерации удвоенной и суммарной частот.

#### 4.2.1.2 Исследование молекулярного состава методом масс-спектрометрии

Эксперименты по анализу молекулярного состава проводились с использованием масс-спектрометра QExactive Orbitrap (Thermo), оснащенного ионной воронкой и источником ионизации электрораспылением. Масс-спектры записывались в режиме отрицательных ионов, разрешающая способность составляла 140 000. Масс-спектры обрабатывались с использованием программного обеспечения Thermo Xcalibur 3.0 и Transhumus [395]. Перед измерениями образцы разводили водно-метанольной смесью (1:1) до концентрации 0.1 мг/мл. Образцы вводили непосредственно в источник ионизации электрораспылением с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 120 мкл/ч.

Сгенерированные химические формулы, соответствующие пикам в зарегистрированных масс-спектрах, были отфильтрованы с учетом следующих ограничений: отношение  $O/C \leq 1$ ,  $0.3 < H/C \leq 2.2$ ,  $C \leq 120$ ,  $H \leq 200$ ,  $0 < O \leq 60$ , точность соответствия массы  $< 0.5$  ppm. Для каждого образца масс-спектры измерялись трижды, и в рассмотрение принимались только молекулярные формулы, обнаруженные во всех измерениях.

#### 4.2.2 Спектральные свойства ГСФ, полученных подходом «снизу вверх»

В результате УФ-облучения и озонирования растворов Тгр и ДНВ имело место значительное изменение их оптических свойств. В результате воздействия для обеих систем

наблюдалось появление у них поглощения в видимой области спектра (>400 нм), отсутствовавшего в исходных растворах (Рис. 4.2).

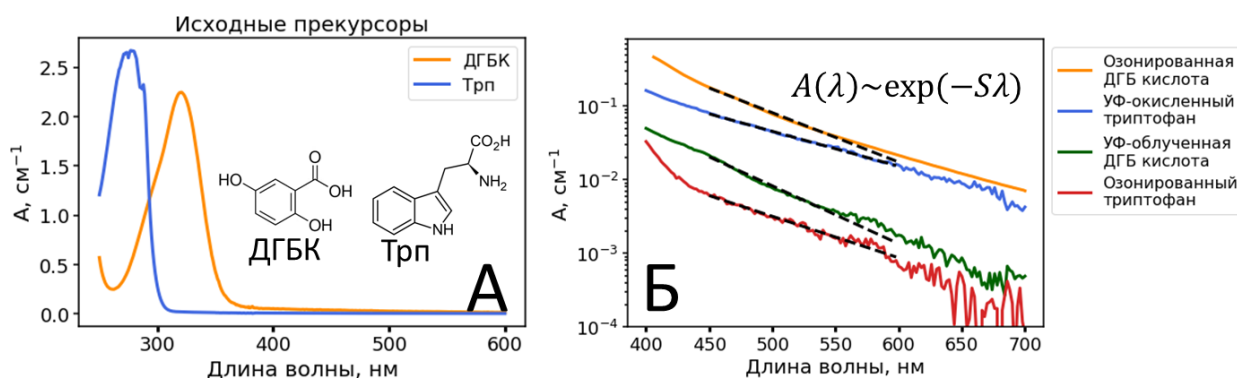


Рисунок 4.2 — А) Спектры поглощения растворов Трп и ДГБК до воздействия (УФ-облучения и озонирования). Поглощение в области длин волн >400 нм отсутствует. В поле рисунка представлены также структурные формулы Трп и ДНВ. Б) Спектры поглощения растворов Трп и ДНВ после воздействия (УФ облучения и озонирования).

Появлению поглощения в видимой области спектра сопутствовало возникновение сигнала флуоресценции (Рис. 4.3А-Б), при этом с ростом длины волны возбуждения “центр масс” спектра флуоресценции (средневзвешенное по интенсивности значение длины волны эмиссии) сдвигался в длинноволновую область (Рис. 4.3В), а квантовый выход флуоресценции уменьшался (Рис. 4.3Г). Значения квантового выхода флуоресценции в видимой области спектра для озонированного раствора ДНВ варьировались в диапазоне от  $10^{-2}$  (360 нм) до  $10^{-3}$  (480 нм), а для УФ-облученного для раствора Трп от  $5 \cdot 10^{-3}$  (360 нм) до  $10^{-3}$  (480 нм).

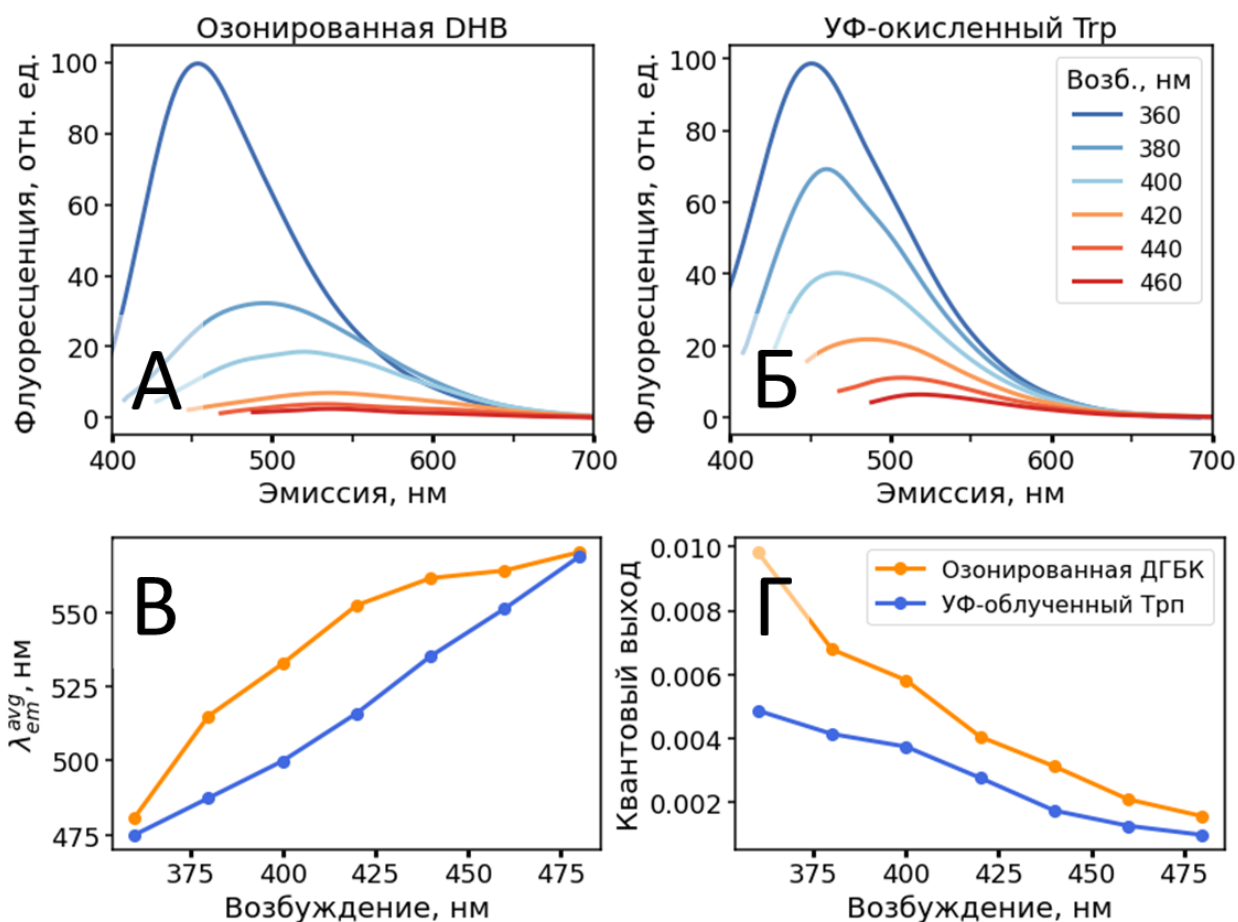


Рисунок 4.3 — Полученные для возбуждения в диапазоне 350-470 нм спектры флуоресценции растворов А) DNB, озонированного в течение 120 минут Б) и УФ-облученного Trp В) Зависимость положения центра масс спектра флуоресценции от длины волны возбуждения для растворов Trp и DNB после воздействия. Г) Зависимость квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения для растворов Trp и DNB после воздействия.

Таким образом, воздействие на растворы Trp и DNB приводило к появлению бесструктурной полосы поглощения в видимой области спектра и появлению флуоресценции, которую можно было возбудить в широком диапазоне длин волн. Значения Стоксова сдвига для спектров флуоресценции монотонно снижались с увеличением длины волны возбуждения (от  $\approx 120$  нм для возбуждения на 360 нм до  $\approx 80$  нм для возбуждения на 480 нм). Подобное поведение оптических свойств характерно и для других гетерогенных систем флуорофоров – например, природного органического вещества [391,396], меланина [236,397,398], оксида графена [399], углеродных квантовых точек [400]. Далее для исследуемых ГСФ была изучена взаимосвязь эволюции их молекулярного состава и эволюции оптических свойств в процессе окисления.

### 4.2.3 Эволюция молекулярного состава ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх»

На рисунке 4.4А представлены масс-спектры для раствора Тгр, полученные при различных временах облучения: как видно, со временем воздействия растет число пиков, соответствующих индивидуальным молекулярным соединениям. Зависимость числа пиков от времени представлена на рисунке 4.4Б, где сверху также проиллюстрировано изменение цвета образцов со временем воздействия.

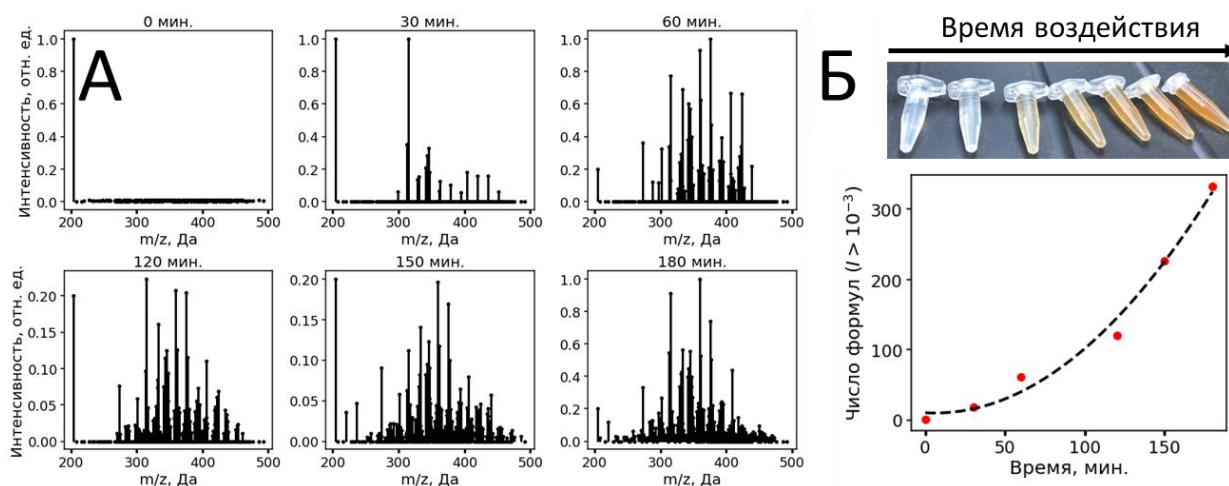


Рисунок 4.4 — А) Эволюция масс-спектров раствора Тгр при УФ-облучении. Б) Зависимость числа пиков с относительной интенсивностью  $>10^{-2}$  в масс-спектре УФ-облученного раствора Тгр от времени воздействия. Сверху приведены фото образцов с различным временем воздействия, иллюстрирующие изменение цвета, связанное с появлением поглощения в видимой области спектра.

Аналогичный тренд имел место при озонировании растворов Тгр и ДНВ (Рис. 4.5). Сразу после начала озонирования в системе образовались новые соединения ( $\sim 40$  новых пиков в масс-спектре через 1 минуту воздействия), а дальнейшее увеличение времени озонирования привело к росту числа уникальных соединений. Так, после 120 минут озонирования количество пиков с относительной интенсивностью  $>10^{-2}$  достигало более 700 (Рис. 4.5В). Увеличение количества молекулярных соединений коррелировало с ростом оптической плотности в видимой области спектра и изменением наклона спектра поглощения (коэффициент корреляции Спирмена  $r = -0.83$ ,  $p = 0.04$ ), что свидетельствует о том, что появление бесструктурного экспоненциального края в спектре поглощения (Рис. 4.2) взаимосвязано с возникновением новых химических соединений в составе системы.

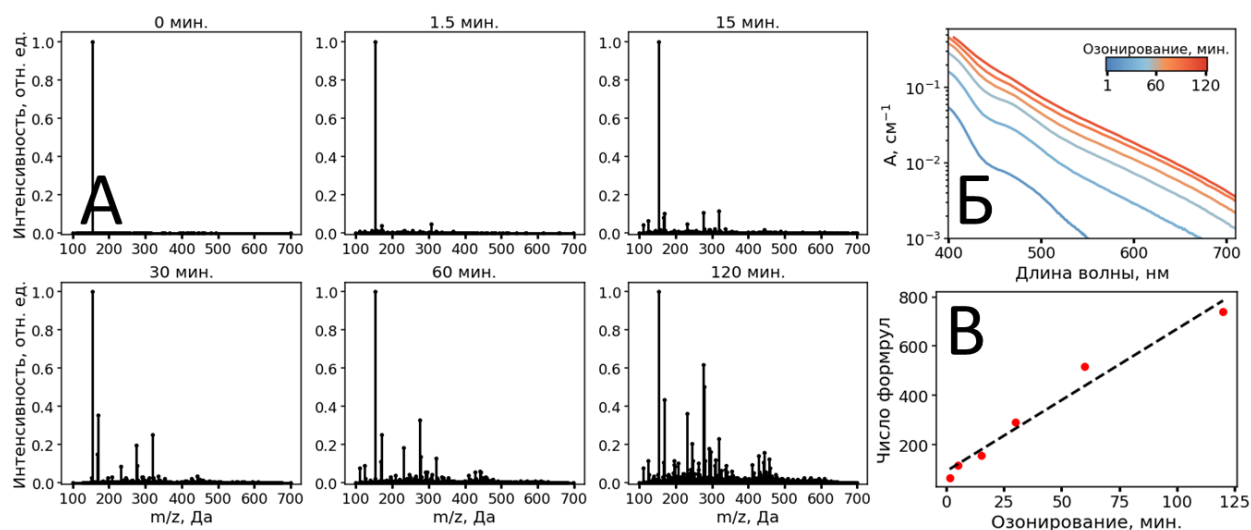


Рисунок 4.5 — А) Масс-спектры раствора ДНВ, полученные при различном времени озонирования (0, 1.5, 15, 30, 60, 120 минут). Б) Изменение спектров поглощения раствора ДНВ (1 мг/мл) в зависимости от времени озонирования. В) Зависимость числа молекулярных формул в масс-спектрах с относительным содержанием  $>10^{-2}$  и спектрального наклона спектра поглощения  $S$  (верхняя ось) от времени озонирования раствора ДНВ.

Таким образом, в результате УФ-облучения и озонирования растворов Трп и ДНВ, приводящих к гетерогенному окислению молекул, образовывались ГСФ, обладающие экспоненциально спадающим с длиной волны поглощением (Рис. 4.2) и флуоресценцией с характерным эффектом вложенности при возбуждении в видимой области спектра (Рис. 4.3), состоящие из сотен различных молекулярных компонент (Рис. 4.4-4.5). Следующим шагом являлось исследование фотофизических механизмов, приводящих к единообразному поведению оптических свойств ГСФ, полученных методом «снизу вверх». Как было указано во введении к данной Главе, в рамках первой рассматриваемой гипотезы оптические спектры ГСФ формируются за счет наложения спектров ее компонент. В рамках второй гипотезы предполагается, что между некоторыми компонентами ГСФ возможно электронное взаимодействие, в результате которого образуются новые спектральные полосы. Для верификации указанных гипотез были проведены эксперименты с использованием время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

#### 4.2.4. Кинетика релаксации ГСФ, полученных методом «снизу вверх»

В случае электронного взаимодействия между флуорофорами, например, по диполь-дипольному механизму, может наблюдаться перенос энергии возбуждения. При этом время жизни молекул-доноров, спектр поглощения которых сдвинут в коротковолновую область относительно молекул-акцепторов, уменьшается за счет наличия дополнительного канала релаксации. В результате может наблюдаться эффект спектральной диффузии, когда

флуоресценция быстрее затухает на коротковолновом краю спектра, в результате чего спектр со временем сдвигается в длинноволновую область. Для того, чтобы исследовать электронное взаимодействие в ГСФ, были проведены эксперименты с использованием время-разрешенной флуориметрии в диапазоне времен  $200 \text{ фс} \div 100 \text{ пс}$  (метод ап-конверсии флуоресценции) и  $100 \text{ пс} \div 50 \text{ нс}$  (метод время-коррелированного счета единичных фотонов).

Кинетика затухания флуоресценции, измеренная с субнаносекундным временным разрешением на различных длинах волн эмиссии при возбуждении на  $405 \text{ нм}$  для ГСФ, образованной в результате УФ-облучения раствора Тгр, представлена на рисунке 4.6А. Аппроксимация полученных кривых затухания флуоресценции осуществлялась трехэкспоненциальной моделью. Зависимость среднего времени жизни флуоресценции от длины волны эмиссии представлена на рисунке 4.6В – как видно, она является немонотонной, и эффекта спектральной диффузии, то есть роста времени жизни на длинноволновом краю эмиссии, не наблюдается. Более того, имеет место обратный тренд: время жизни флуоресценции уменьшается с длиной волны эмиссии в диапазоне  $450\text{-}600 \text{ нм}$ . Аналогичные зависимости наблюдались также для озонированного раствора ДНВ (Рис. 4.6Б).

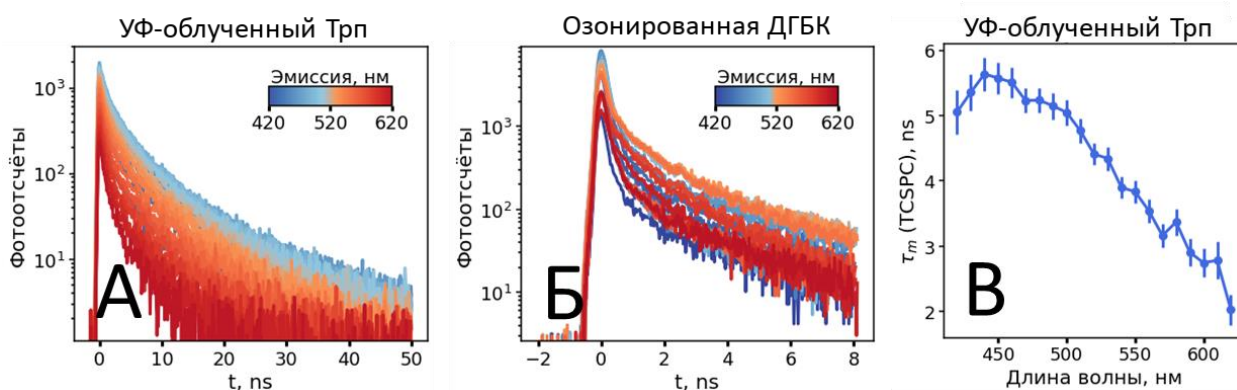


Рисунок 4.6 — А) Кривые затухания флуоресценции УФ-облученного раствора Тгр, полученные на наносекундном временном масштабе с временным разрешением  $\sim 200 \text{ пс}$  на различных длинах волн эмиссии ( $420\text{-}620 \text{ нм}$  с шагом  $10 \text{ нм}$ ) при возбуждении на  $405 \text{ нм}$ . Б) Кривые затухания флуоресценции озонированного раствора ДНВ, полученные на наносекундном временном масштабе с временным разрешением  $\sim 200 \text{ пс}$  на различных длинах волн эмиссии ( $420\text{-}620 \text{ нм}$  с шагом  $10 \text{ нм}$ ) при возбуждении на  $405 \text{ нм}$ . В) Зависимости среднего времени жизни флуоресценции  $\tau_m$  для УФ-облученного раствора Тгр от длины волны эмиссии, измеренные с временным разрешением  $\sim 200 \text{ пс}$ .

Измерения параметров затухания флуоресценции ГСФ, выполненные с субпикосекундным временным разрешением, показали принципиально другую картину кинетики релаксации возбуждения в них. Так, на рисунке 4.7 представлены кривые затухания флуоресценции УФ-облученного раствора Тгр и озонированного раствора ДНВ, полученные с временным



разрешением 200 фс в диапазоне длин волн эмиссии 480–580 нм при возбуждении на длине волны  $\lambda_{exc} = 390$  нм.

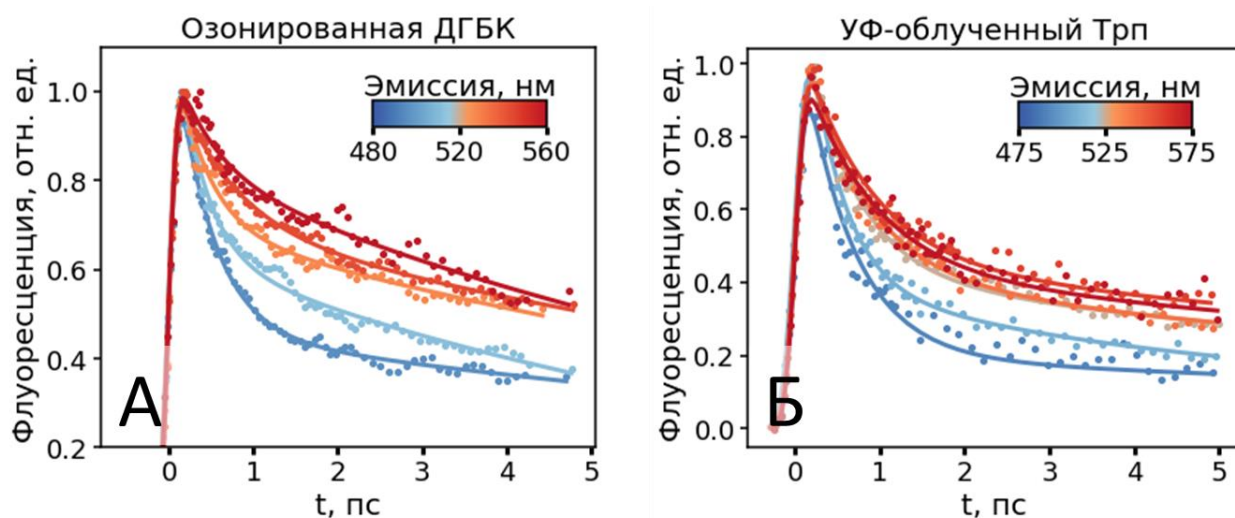


Рисунок 4.7 — Кривые затухания флуоресценции, полученные с временным разрешением 200 фс в диапазоне длин волн эмиссии 480–580 нм при возбуждении на длине волны  $\lambda_{exc} = 390$  нм для А) озонированного раствора ДНВ и Б) УФ-облученного раствора Трп.

Как видно, в кинетике затухания флуоресценции исследованных ГСФ на всех длинах волн эмиссии присутствует сверхбыстрая компонента с характерным временем  $\sim 1$  пс. При этом наблюдается также спектральная диффузия на пикосекундном временном масштабе: амплитуда сверхбыстрой компоненты уменьшается с  $\sim 75\%$  до  $\sim 54\%$ , а ее время увеличивается с 0.32 пс до 0.62 пс в диапазоне длин волн эмиссии от 480 до 580 нм. Параметры сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания исследованных ГСФ приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Параметры сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции УФ-облученного раствора Трп и озонированного раствора ДНВ в зависимости от длины волны эмиссии. Длина волны возбуждения 390 нм.

Параметр сверхбыстрой компоненты	Длина волны эмиссии, нм	480	500	520	540	560	580



УФ- облученный Тгр	$\tau_1$ , пс	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.03	0.52 ± 0.05	0.52 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.62 ± 0.07
	$a_1$ , %	75 ± 3	72 ± 3	62 ± 3	60.3 ± 2.8	55 ± 3	54 ± 3
Озонированный DHB	$\tau_1$ , пс	0.43 ± 0.03	0.63 ± 0.08	0.58 ± 0.05	0.77 ± 0.08	1.64 ± 0.23	-
	$a_1$ , %	63 ± 3	53.1 ± 2.9	41.5 ± 1.1	38.5 ± 2.6	45 ± 4	-

#### 4.2.5 Механизмы формирования кинетики релаксации ГСФ, полученных методом «снизу вверх»

В результате УФ-облучения и озонирования растворов Тгр и DHB за счет процессов окисления генерируются новые соединения-хромофоры. Эволюция молекулярного состава образующихся ГСФ была продемонстрирована методом масс-спектрометрии (Рис. 4.4-4.5). Параллельно с эволюцией молекулярного состава наблюдается единообразное изменение оптических свойств системы: (1) появление бесструктурного экспоненциально спадающего с длиной волны поглощения в видимой области спектра (Рис. 4.2), (2) появление флуоресценции с положением максимума эмиссии и квантовым выходом зависящим от длины волны возбуждения (Рис. 4.3), (3) наличие сверхбыстрой компоненты в кинетике релаксации флуоресценции ГСФ на всех длинах волн эмиссии и эффекта спектральной диффузии (Рис. 4.7). Наблюдаемые оптические свойства можно интерпретировать либо в рамках модели суперпозиции оптических свойств индивидуальных хромофоров и флуорофоров в составе ГСФ, либо наличием в ГСФ электронного взаимодействия между ее компонентами. Во втором случае могут иметь место экситонное взаимодействие, приводящее к сдвигу энергетических уровней (см. пример меланина в Главе 1 [209]), перенос заряда в комплексах молекул в составе ГСФ [393], а также перенос энергии электронного возбуждения.

Спектральная диффузия – сдвиг спектра в длинноволновую область со временем, обнаруженный для ГСФ на пикосекундном временном масштабе (Рис. 4.7) – может быть связана с наличием в системе переноса энергии возбуждения. Обычно в фотофизике

органических соединений механизмом переноса энергии является резонансный перенос энергии по Фёрстеру, реализующийся для двух молекулярных флуорофоров (донора и акцептора), находящихся друг от друга на расстоянии порядка нескольких нанометров. Нанометровые расстояния между донором и акцептором с перекрывающимися спектрами соответствуют переносу энергии на масштабе времени от 100 пс до 1 нс [56], тогда как сверхбыстрая компонента в кинетике релаксации ГСФ на два порядка быстрее. В то же время в случае близкого расположения донора и акцептора (<1 нм) перенос энергии может происходить на временном масштабе 1-10 пс. Это явление наблюдается, например, для сопряженных полимеров, в которых перенос энергии происходит между субъединицами полимерной цепи [401–403]. При этом перенос энергии все еще является диполь-дипольным взаимодействием, но, поскольку расстояние между донором и акцептором меньше размера молекул, модель точечных диполей становится неприменимой, и взаимодействие описывается моделями с использованием приближения распределенных диполей [402]. Так, взаимодействие  $V$  между донором и акцептором в дипольном приближении можно представить следующим образом:

$$V = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \int \frac{P_D(r_1)P_A(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad (4.2)$$

$$\approx \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\kappa\mu_A\mu_D}{R^3}, \quad (4.3)$$

где  $P_D$ ,  $P_A$  – электронная плотность донора и акцептора, соответственно. Когда молекулы А и D находятся на расстоянии, превышающем их размеры, формула (4.2) может быть представлено как взаимодействие между точечными диполями (формула (4.3)), где  $\kappa$  – ориентационный фактор, а  $R$  – расстояние между центрами молекул А и D. Данное представление (формула (4.3)), однако, неприменимо в случае малых расстояний между А и D, что и имеет место, например, в случае сопряженных полимеров.

Таким образом, потенциально возможно, что сверхбыстрая компонента в кинетике затухания флуоресценции ГСФ соответствует переносу энергии между ее компонентами.

Альтернативным механизмом, приводящим к появлению сверхбыстрой компоненты в кинетике релаксации флуоресценции и к эффекту спектральной диффузии, является эффект релаксации растворителя. Когда молекула-флуорофор находится в основном состоянии, дипольные моменты окружающих молекул растворителя вблизи нее ориентированы так, чтобы компенсировать дипольный момент флуорофора в основном состоянии. При поглощении флуорофором фотона происходит перераспределение в нем электронной плотности, приводящее к изменению величины и ориентации дипольного момента, что

запускает процесс переориентации молекул растворителя для компенсации дипольного момента флуорофора в возбужденном состоянии. Релаксация растворителя может происходить на пикосекундном масштабе времени ( $10^{-12}$ – $10^{-10}$  с [56,404]), при этом в процессе релаксации дипольные моменты молекул растворителя стремятся ориентироваться в направлении, противоположном направлению дипольного момента флуорофора, в результате чего со временем имеет место понижение энергии возбужденного состояния, проявляющееся в кинетике релаксации, как быстрая компонента на коротковолновом краю эмиссии. То есть, сверхбыстрая компонента в кинетике релаксации ГСФ потенциально может быть связана с релаксацией растворителя. В то же время для индивидуальных флуорофоров в случае эффекта релаксации растворителя сверхбыстрая компонента на длинноволновом краю эмиссии пропадает, тогда как в ГСФ она присутствует на всех длинах волн.

Для проверки вышеуказанных гипотез была проведена серия экспериментов по измерению оптических свойств ГСФ при различных воздействиях на них:

- (1) Было исследовано влияние фракционирования ГСФ по размеру на их оптические свойства. ГСФ, сгенерированные путем воздействия на растворы Trp и DNB, фракционировались с использованием мембранных фильтров с отсечкой по молекулярной массе 1 кДа. Такая фильтрация должна приводить к удалению частиц-агрегатов молекул и оставлять преимущественно молекулярную фракцию ГСФ, то есть раствор индивидуальных молекул. Соответственно, вклад в общий сигнал флуоресценции молекулярных агрегатов, в которых возможен перенос энергии между близко ( $<1$  нм) расположенными флуорофорами, должен уменьшаться. В предположении о том, что сверхбыстрая компонента в кинетике затухания флуоресценции связана с переносом энергии, фильтрация молекулярных агрегатов размером более 1 кДа должна приводить к значительному уменьшению ее вклада.
- (2) Для проверки влияния полярности растворителя на оптические свойства ГСФ и роли эффекта релаксации растворителя в формировании сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции ГСФ были измерены кривые затухания их флуоресценции в различных растворителях, а затем была исследована зависимость спектральных параметров и параметров затухания флуоресценции от свойств растворителя.
- (3) Была измерена кинетика затухания анизотропии флуоресценции с пикосекундным временным разрешением. В случае переноса энергии имеет место частичная деполяризация флуоресценции за счет случайной ориентации дипольных моментов донора и акцептора. В связи с этим наличие в ГСФ переноса энергии с характерным временем, соответствующим сверхбыстрой компоненте в кинетике затухания,

должно было приводить к затуханию анизотропии флуоресценции ГСФ на аналогичном временном масштабе.

Рассмотрим сначала поведение анизотропии флуоресценции ГСФ на масштабе времени 0–100 пс. Анизотропия флуоресценции  $r(t)$ , характеризующая скорость деполяризации флуоресценции при возбуждении линейным поляризованным светом, рассчитывалась как:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (4.4)$$

где  $I_{\parallel}$ ,  $I_{\perp}$  – интенсивности флуоресцентного отклика, поляризованного параллельно и ортогонально возбуждающему излучению. Деполяризация флуоресценции может быть связана с рядом процессов, в частности, с пространственной переориентацией возбужденных флуорофоров, однако данный процесс происходит на временном масштабе  $>100$  пс для молекул в водном растворе с размерами более 200 Да (исходный размер прекурсора) [56]. В случае наличия в системе переноса энергии частичная деполяризация флуоресценции должна наблюдаться за счет усреднения сигнала от донорно-акцепторных пар с разной взаимной ориентацией дипольных моментов, при этом скорость деполяризации должна быть близка к скорости миграции энергии возбуждения [402].

Для ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх», анизотропия флуоресценции оставалась неизменной на временном диапазоне 0–100 пс (Рис. 4.8А), при этом величина анизотропии флуоресценции в нулевой момент времени была ниже, чем максимально возможное значение (0.32 для УФ-облученного Trp). Отсутствие деполяризации флуоресценции на масштабе пикосекунд свидетельствует о том, что пикосекундная компонента, наблюдаемая в кинетике релаксации флуоресценции, не связана с некогерентным переносом возбуждения в таких системах. Далее, была измерена кинетика затухания флуоресценции ГСФ до и после 1 кДа фильтрации, позволяющей выделить молекулярную фракцию и удалить из системы супрамолекулярные агрегаты. Было показано, что после фильтрации в кинетике релаксации возбуждения также наблюдается сверхбыстрая компонента переноса с характерным масштабом времени порядка 1 пс, при этом ее время и амплитуда остаются практически неизменными (Рис. 4.8А-Б).

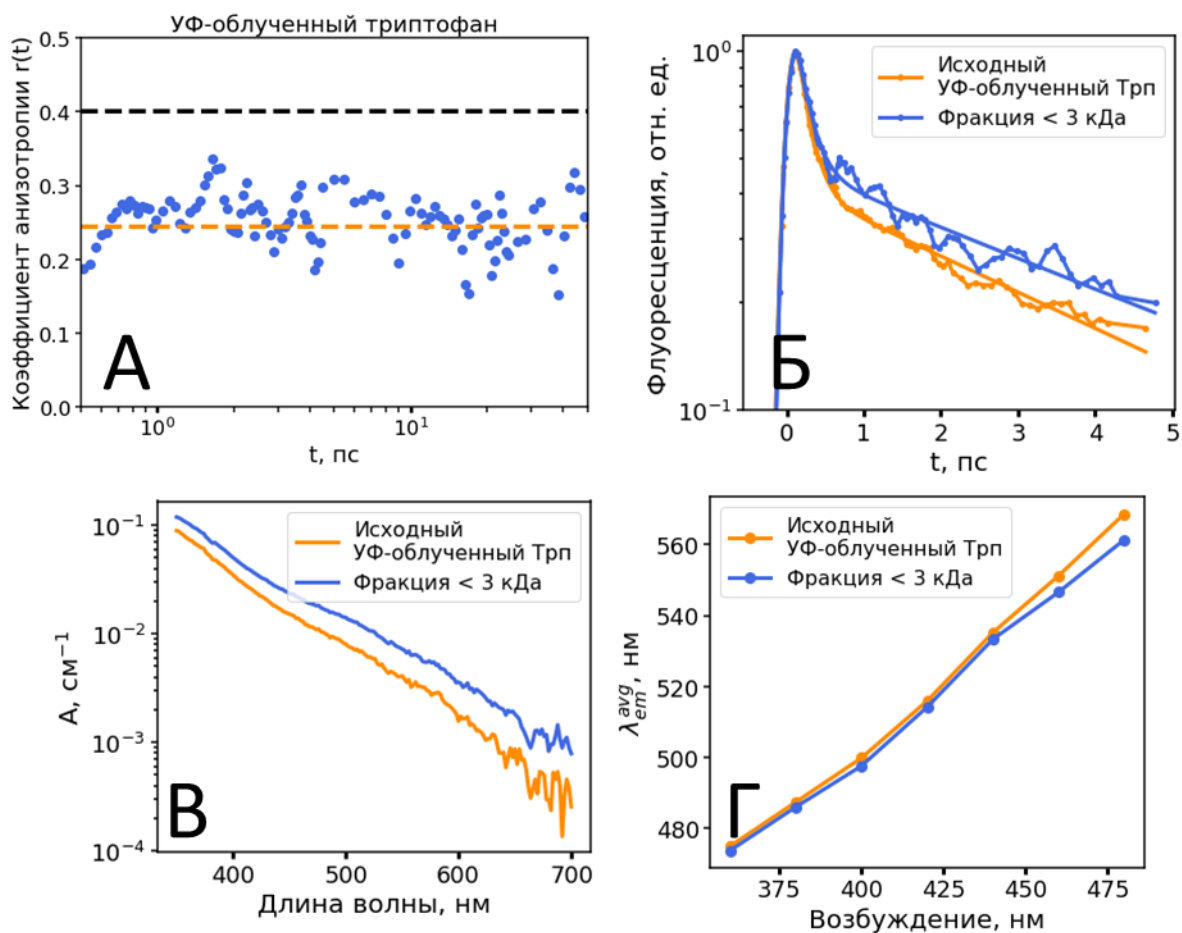


Рисунок 4.8 — А) Кинетика затухания анизотропии флуоресценции ГСФ, образованной в результате УФ-облучения раствора Трп при возбуждении на длине волны 400 нм и регистрации на длине волны 500 нм, измеренная с временным разрешением  $\sim 150$  фс на временном интервале 0–100 пс. Б) Кинетики затухания флуоресценции для исходного нефракционированного по размеру УФ-облученного раствора Трп и его фракции с молекулярной массой менее 3 кДа. В) Спектры поглощения ГСФ, образованной в результате УФ-облучения раствора Трп, до и после 3 кДа фильтрации. Г) Зависимость положения центра масс спектра флуоресценции ГСФ от длины волны возбуждения до и после 3 кДа фильтрации.

Отметим, что молекулярная фракция, полученная после фильтрации, обладала спектральными признаками, типичными для ГСФ – экспоненциально спадающим с длиной волны поглощением (Рис. 4.8В) и поведением спектров флуоресценции, полученных для различных длин волн возбуждения (Рис. 4.8Г, зависимость положения центра масс спектра флуоресценции ГСФ от длины волны возбуждения). Таким образом, выделение из ГСФ фракции с молекулярной массой  $< 1$  кДа не изменило принципиальным образом ни спектральные характеристики системы, ни свойства кинетики релаксации флуоресценции, то есть наличие агрегатов молекул в ГСФ не является необходимым для формирования их оптических свойств.

Третьим экспериментом являлось исследование влияния на оптические свойства ГСФ параметров растворителя. Для этого измерения были проведены в тетрагидрофуране (диэлектрическая восприимчивость  $\epsilon = 7.68$ , показатель преломления  $n = 1.407$ ), изопропаноле ( $\epsilon = 19.92$ ,  $n = 1.377$ ), этаноле ( $\epsilon = 24.5$ ,  $n = 1.361$ ), глицерине ( $\epsilon = 42.5$ ,  $n = 1.472$ ) и воде ( $\epsilon = 78.4$ ,  $n = 1.333$ ) [405].

Для ГСФ, образовавшейся в результате УФ-облучения раствора Trp, было исследовано влияние растворителей различной полярности на наблюдаемые стационарные оптические свойства. На рисунках 4.9А,Б представлены спектры поглощения и флуоресценции (на длине волны возбуждения  $\lambda_{\text{exc}} = 400$  нм), измеренные в разных растворителях. Как видно, при смене растворителя изменяется как спектральный наклон поглощения, так и форма спектра флуоресценции.

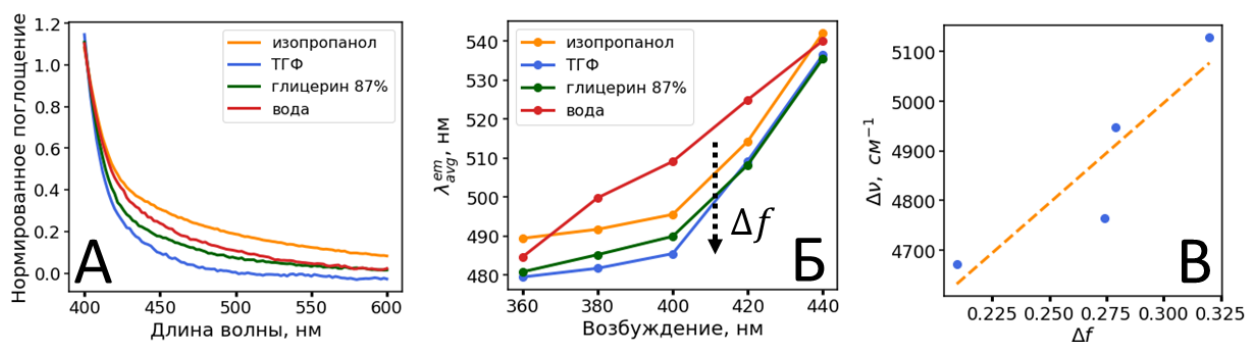


Рисунок 4.9 — А) Нормированный на величину поглощения на 400 нм спектр поглощения ГСФ, образовавшейся в результате УФ-облучения раствора Trp, в растворителях различной полярности: в тетрагидрофуране (ТГФ), в изопропаноле, 87% смеси глицерина и воды и в воде. Б) Зависимость положения центра масс спектров флуоресценции от длины волны возбуждения для образцов УФ-облученных растворов триптофана в различных растворителях. В) Зависимость Стоксова сдвига флуоресценции на длине волны возбуждения 380 нм ( $\Delta\nu$ ) от полярности растворителя ( $\Delta f$ ).

Наблюдаемые изменения формы спектра флуоресценции ГСФ находятся в соответствии с теоретическими представлениями о связи Стоксова сдвига с полярностью растворителя, которая описывается формулой [56]:

$$\Delta\nu \sim \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{2(\vec{\mu}_e - \vec{\mu}_g)^2}{a^3} + const., \quad (4.5)$$

где  $\vec{\mu}_e$  и  $\vec{\mu}_g$  – дипольные моменты молекулы в возбужденном и основном состоянии, соответственно,  $a$  – характерный размер молекулы флуорофора,  $\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость растворителя,  $n$  – показатель преломления растворителя на длине волны возбуждения. Поскольку при изменении растворителя дипольные моменты флуорофора в основном и возбужденном состояниях в первом приближении не должны изменяться,

Стоксов сдвиг в первую очередь должен быть пропорционален полярности  $\Delta f = \left( \frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1} \right)$ .

На рисунке 4.9В представлена зависимость Стоксова сдвига флуоресценции от полярности растворителя  $\Delta f$ . С увеличением полярности величина Стоксова сдвига растёт от 3200  $\text{см}^{-1}$  для растворителя ТГФ ( $\varepsilon = 7.68$ ) до 4400  $\text{см}^{-1}$  в воде ( $\varepsilon = 76.4$ ).

Далее было показано, что параметры кинетики затухания флуоресценции на пикосекундном временном масштабе также зависят от свойств растворителя (Рис. 4.10): при уменьшении полярности уменьшается амплитуда и растёт время релаксации сверхбыстрой компоненты.

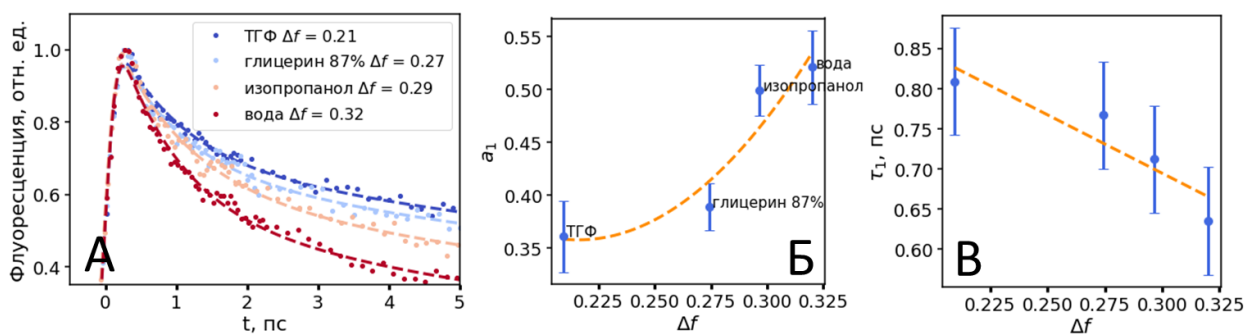


Рисунок 4.10. А) Кинетика затухания флуоресценции ГСФ, полученной УФ-облучением раствора Тгр, измеренная в растворителях с различной полярностью. Длина волны возбуждения  $\lambda_{\text{exc}} = 400$  нм, длина волны эмиссии  $\lambda_{\text{em}} = 530$  нм. Зависимости Б) амплитуды сверхбыстрой компоненты  $a_1$  В) времени затухания сверхбыстрой компоненты от полярности растворителя  $\Delta f$ .

Полученные зависимости спектральных параметров и параметров кинетики затухания флуоресценции от полярности растворителя свидетельствуют о существенной роли влияния релаксации растворителя на наблюдаемые оптические свойства ГСФ.

### Выводы по разделу

В данном разделе были резюмированы результаты модельных экспериментов по генерации ГСФ в рамках подхода «снизу вверх». В результате воздействия на растворы простых ароматических молекул, Тгр и ДНВ, наблюдалось появление в них новых молекулярных соединений ( $n > 500$ ), сопровождавшееся эволюцией оптических свойств. По мере воздействия возрастала оптическая плотность в видимой области спектра и появлялся характерный для ГСФ спектр поглощения, который можно было параметризовать спадающей с длиной волны экспонентой. Наблюдалась прямая корреляция между числом соединений в системе, обнаруженных в масс-спектре, со спектральным наклоном спектра поглощения ( $R = 0.83$ ). Одновременно с этим возникал сигнал флуоресценции, обладающий эффектом вложенности спектров, проявлявшимся также в монотонном уменьшении

квантового выхода флуоресценции (с  $10^{-2}$  до  $10^{-3}$ ) и Стоксова сдвига (со 120 до 80 нм) с ростом длины волны возбуждения (360-480 нм). Таким образом, системы, сгенерированные методом «снизу вверх», представляли собой ГСФ и демонстрировали типичные для ГСФ оптические свойства.

Для выявления механизмов формирования оптических свойств полученных систем была изучена кинетика релаксации их флуоресценции. Было продемонстрировано наличие у всех исследованных образцов сверхбыстрой (пикосекундной) компоненты в кинетике затухания флуоресценции, вклад которой уменьшался с длиной волны регистрации. При этом наблюдалась также спектральная диффузия на пикосекундном масштабе времени.

С помощью дополнительных экспериментов было доказано, что сверхбыстрая компонента в кинетике затухания флуоресценции не связана с электронным взаимодействием в составе ГСФ.

Во-первых, было установлено, что анизотропия флуоресценции ГСФ, полученных методом «снизу вверх», является постоянной на масштабе времен до 100 пс, тогда как в случае, если бы пикосекундная компонента в кинетике затухания флуоресценции была связана с переносом энергии в системе, имела бы место деполяризация флуоресценции на аналогичных временных масштабах.

Во-вторых, было показано, что выделение из сгенерированных ГСФ молекулярной фракции массой  $<1$  кДа и сопутствующее данной процедуре удаление супрамолекулярных агрегатов не изменяет существенным образом поведение оптических свойств ГСФ. Так, у выделенной фракции имеется экспоненциально спадающее с длиной волны поглощение в видимой области спектра и флуоресценция с характерным эффектом вложенности. Также во фракции молекул массой  $<1$  кДа наблюдается пикосекундная компонента в кинетике затухания флуоресценции и спектральная диффузия. В случае принципиальной необходимости межмолекулярного взаимодействия для формирования оптических свойств ГСФ удаление из нее частиц массой  $>1$  кДа (агрегатов и полимеров) приводило бы к значительному уменьшению вклада сверхбыстрой компоненты в релаксации флуоресценции. Соответственно, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что все характерные оптические свойства ГСФ можно наблюдать в смеси индивидуальных молекул без агрегации.

В-третьих, была продемонстрирована зависимость оптических свойств ГСФ от параметров растворителя. С ростом полярности наблюдалось линейное увеличение Стоксова сдвига, что находится в соответствии с представлениями о влиянии растворителя на спектральные свойства флуорофоров. Также при уменьшении полярности растворителя было обнаружено



снижение вклада (увеличение времени и уменьшение амплитуды) пикосекундной компоненты в кинетику релаксации флуоресценции ГСФ.

### **4.3 Оптические свойства природных гетерогенных систем флуорофоров: природное органическое вещество**

Следующим шагом являлось исследование оптических свойств ГСФ, полученных в рамках подхода «сверху вниз» на примере природного органического вещества (ПОВ). Были детально изучены как спектральные параметры, так и параметры затухания флуоресценции ГСФ, при этом внимание уделялось детектированию процессов на пикосекундном временном масштабе и влиянию на них внешних воздействий. Аналогично случаю ГСФ, полученных методом «снизу вверх», была измерена кинетика затухания анизотропии и были исследованы оптические свойства фракций с различной молекулярной массой и влияние растворителя на кинетику затухания флуоресценции ПОВ. Целью при этом являлось установление общности механизмов формирования оптических свойств ГСФ, полученных в рамках подходов «снизу вверх» и «сверху вниз».

#### **4.3.1 Природное органическое вещество как ГСФ**

В предыдущем разделе были рассмотрены спектральные свойства ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх», которые могут формироваться в живых системах в результате процессов окисления. Характерными свойствами таких систем, помимо схожести поведения оптических свойств, является наличие молекулярной гетерогенности и супрамолекулярных агрегатов. Интересным является тот факт, что в природе существует несколько классов систем, обладающих всеми типичными для ГСФ свойствами. Во-первых, это углеродные материалы – оксид графена [399], углеродные квантовые точки [400]. Во-вторых, это такие природные объекты как нефти [406], некоторые аэрозоли [407] и природное органическое вещество [408]. Для всех вышеуказанных систем в литературе ведется дискуссия относительно механизмов формирования их оптических свойств. В данном разделе мы обратимся к природному органическому веществу, включающему в себя растворенное органическое вещество, органическое вещество угля и почв. Оптические свойства этих систем широко исследуются в различных задачах диагностики [409,410]. Будет показано, что, несмотря на принципиальные различия в происхождении и молекулярном составе, все указанные системы обладают единообразием поведения оптических свойств, как спектральных свойств, так и свойств кинетики релаксации флуоресценции. При этом целью являлось доказательство общности механизмов

формирования оптических свойств ГСФ, полученных в рамках подходов «снизу вверх» и «сверху вниз».

К природному органическому веществу (ПОВ, natural organic matter, NOM) относят гетерогенные молекулярные системы, образующиеся в результате процесса биodeградации биомассы. В связи с гетерогенностью молекулярного состава ПОВ и невозможностью однозначно приписать оптические свойства всей системы каким-то определенным молекулам, в литературе получил широкое распространение подход, основанный на расчете так называемых оптических дескрипторов.

Для сложных систем, содержащих тысячи различных хромофоров и флуорофоров, можно было бы ожидать немонотонного изменения спектральных характеристик, связанных, например, с большей концентрацией молекул определенного типа, однако в эксперименте наблюдается обратная ситуация – спектры всех ПОВ схожи. Факт организации ПОВ в растворе в виде супрамолекулярных структур [411] делает возможность электронного взаимодействия между молекулами в его составе вероятной из-за малого расстояния между ними. В схожем с механизмами формирования ГСФ ключе, в литературе имеют место две основных гипотезы о механизмах формирования оптических свойств ПОВ: гипотеза «суперпозиции», которая предполагает, что наблюдаемые спектры являются простым наложением спектров от различных компонент системы, и гипотеза «взаимодействия», в рамках которой единообразие спектральных свойств ПОВ считается следствием электронного взаимодействия молекул в их составе. В данном разделе будут представлены результаты исследования оптических свойств ПОВ с различной структурой с помощью методов, аналогичных примененным в предыдущем разделе для исследования ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх». Особое внимание будет уделено кинетике релаксации флуоресценции ПОВ на пикосекундном временном масштабе и исследованию влияния внешних факторов и структурных особенностей ПОВ на параметры сверхбыстрой компоненты в релаксации возбуждения.

#### **4.3.2. Объекты и методы исследования**

Для анализа оптических свойств ПОВ была подобрана выборка образцов природных органических веществ, значительно отличающихся своим источником (природные воды, торф, почва, уголь), молекулярным составом (см. Таблицу 4.2) и параметрами спектров поглощения и флуоресценции. Образцы были предоставлены профессором химического факультета МГУ И.В. Перминовой. Образцы были охарактеризованы с помощью элементного анализа, наличие и доля различных функциональных групп в образцах были охарактеризованы с помощью ЯМР-спектроскопии, оценка молекулярной массы

производилась с помощью эксклюзионной хроматографии. Для всех образцов были измерены спектры поглощения и флуоресценции, свойства релаксации флуоресценции на субнаносекундном и субпикосекундном временных масштабах. Оптические измерения осуществлялись аналогично описанному в разделе 4.2.

Растворы ПОВ с концентрацией 1 мг/мл готовили в 28 мМ фосфатном буфере (pH 6.8). Перед экспериментами растворы фильтровали с помощью одноразовых шприцевых целлюлозных фильтров с диаметром пор 0.22 мкм (Chromafil CA 20/25 (S), Macherey-Nagel GmbH, Германия). Образцы хранили при температуре 4°C.

В экспериментах по фракционированию по размеру использовались растворы ПОВ SHA-CtK15, SHA-CtK04, CHF-LDe00, SRHA, PFA-T1098, SRDOM (см. Таблицу 4.2) с концентрацией 1 мг/мл в 28 мМ фосфатном буфере (pH 6.8). Приготовленные растворы фильтровали с использованием мембранного центрифужного фильтра на 3 кДа (Microcon YM-3, Millipore). Расшифровка кодировок образцов (включающей место, процедуру пробоотбора и состав), может быть найдена в [396].

Таблица 4.2. Параметры образцов ПОВ, исследованных в данной работе. ПОВ – растворенное органическое вещество, ГК – гуминовые кислоты, ФК – фульвокислоты, нефракц. – нефракционированные образцы, QY – квантовый выход.

Название образца	Природа ПОВ	Состав	Наклон поглощения S, нм <sup>-1</sup>	FWHM, нм	$\lambda_{avg}$ , нм (exc. 380 нм)	QY (exc. 380 нм)
SRDOM	ПОВ	Нефракц.	0.0151	125	500	0.0055
PFA-T1098	Торф	ФК	0.0148	127	498	0.0095
SFA-Pw16	Почва	ФА	0.0142	128	500	0.0091
SRHA	ПОВ	ГК	0.0134	133	507	0.0035
TSFA	Почва	ФК	0.0132	127	501	0.0070
SFA-CtK15	Почва	ФК	0.0130	130	497	0.0179
PHF-T10L98	Торф	Нефракц.	0.0129	132	504	0.0024
PHA-T10L98	Торф	ГК	0.0110	139	510	0.0017
PHF-T598	Торф	Нефракц.	0.0103	124	509	0.0021

PHF-Sk300	Торф	Нефракц.	0.0101	146	512	0.0022
PHА-T598	Торф	ГК	0.0096	148	518	0.0012
PHА-TTL98	Торф	ГК	0.0098	145	513	0.0014
PHА-Sk300	Торф	ГК	0.0096	162	515	0.0028
CHF-LDe00	Уголь	Нефракц.	0.0093	165	516	0.0061
SHA-CtK04	Почва	ГК	0.0068	180	528	0.0026
SHA-CtK15	Почва	ГК	0.0065	186	530	0.0025

### 4.3.3 Стационарные оптические свойства систем ПОВ. Их связь с моделью не взаимодействующих флуорофоров

#### 4.3.3.1 Спектральные свойства ПОВ

В качестве первого шага была подтверждена общность стационарных оптических свойств различных ПОВ. Все исследованные ПОВ имели характерное экспоненциально убывающее с ростом длины волны поглощение с различающейся величиной спектрального наклона, характеризующего величину наклона поглощения в полулогарифмическом масштабе в случае параметризации зависимости поглощения от длины волны  $\lambda$  как  $A(\lambda) \sim \exp(-S\lambda)$  (Рис. 4.11А). Значения спектрального наклона  $S$  для исследуемых образцов ПОВ приведены в Таблице 4.2. Оранжевая и зеленая кривые на рисунке 4.11А соответствуют образцам SRDOM и SHA-CtK15, для которых наблюдалось минимальное и максимальное значение спектрального наклона  $S$  соответственно.

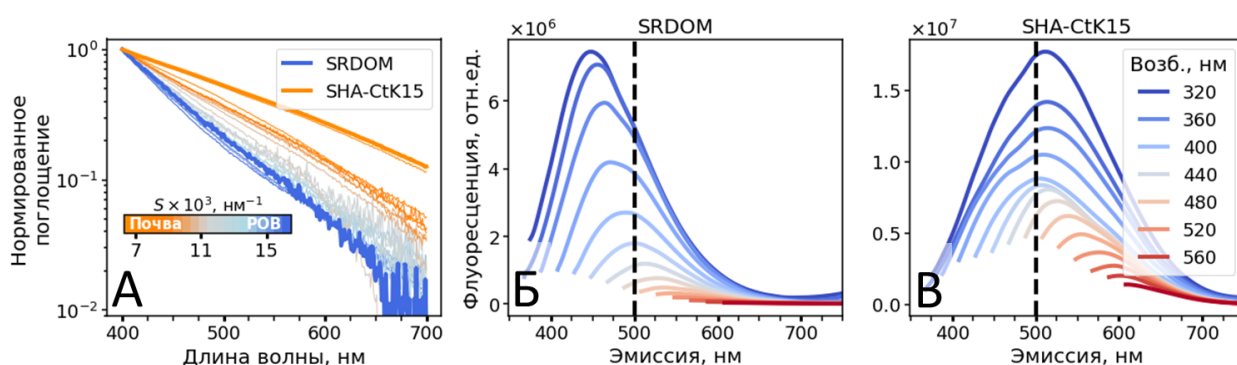


Рисунок 4.11 — А) Спектры оптической плотности для выборки природных органических веществ, приведенных в Таблице 4.2. Спектры нормированы на значение оптической плотности на длине волны 400 нм. Синяя и оранжевая кривые соответствуют образцам SRDOM и SHA-CtK15, для которых наблюдалось минимальное и максимальное значение спектрального наклона  $S$  соответственно. Б, В) Спектры флуоресценции для образцов SRDOM (Б) и SHA-CtK15 (В) для различных длин волн возбуждения. Вертикальная пунктирная линия соответствует длине волны 500 нм.

В спектрах флуоресценции всех исследованных образцов ПОВ также наблюдались закономерности, характерные для ГСФ:

- (1) спектры флуоресценции представляли собой широкие полосы (ширина на полувысоте ~100-200 нм, (Рис. 4.11Б-В));
- (2) наблюдалась вложенность спектров флуоресценции (спектр с меньшей длиной волны возбуждения является огибающей для спектров с большей);
- (3) спектральные параметры, такие как Стоксов сдвиг (Рис. 4.12А), FWHM (Рис. 4.12Б) и квантовый выход флуоресценции (Рис. 4.12В) монотонно убывали с длиной волны возбуждения, начиная с определенного порогового значения (350-400 нм).

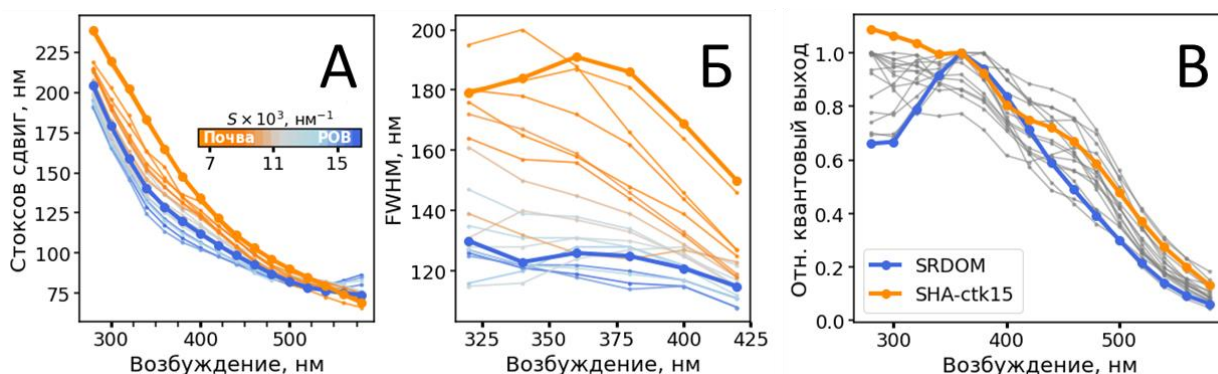


Рисунок 4.12 — Зависимости А) Стоксова сдвига, Б) полуширины спектра флуоресценции, В) квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения для исследованных образцов ПОВ. Синяя и оранжевая кривые соответствуют образцам SRDOM и SHA-СтК15, для которых наблюдалось минимальное и максимальное значение спектрального наклона  $S$  соответственно.

Характеристики спектров флуоресценции исследованных образцов ПОВ сильно скоррелированы с параметрами их спектров поглощения, в частности, со спектральным наклоном поглощения  $S$ . Так, для образца SRDOM ( $S = 0.0151$  нм) максимум эмиссии флуоресценции при возбуждении в области 350-400 нм расположен левее 500 нм (черная пунктирная линия на рисунке 4.11Б), тогда как для образца SHA-СтК15 ( $S = 0.0065$  нм) аналогичные спектры значительно смещены в длинноволновую область (Рис. 4.11В). Данная взаимосвязь проиллюстрирована на рисунке 4.13, где показана линейная зависимость между спектральным наклоном  $S$  и средневзвешенной по интенсивности длиной волны флуоресценции (центром масс спектра)  $\lambda_{\text{avg}}$  ( $r = -0.93$ ,  $p$ -уровень значимости  $< 10^{-5}$ ) и FWHM ( $r = -0,86$ ,  $p$ -уровень значимости  $< 10^{-4}$ ). Зависимости на рисунке 4.13 получены для длины волны возбуждения 380 нм.

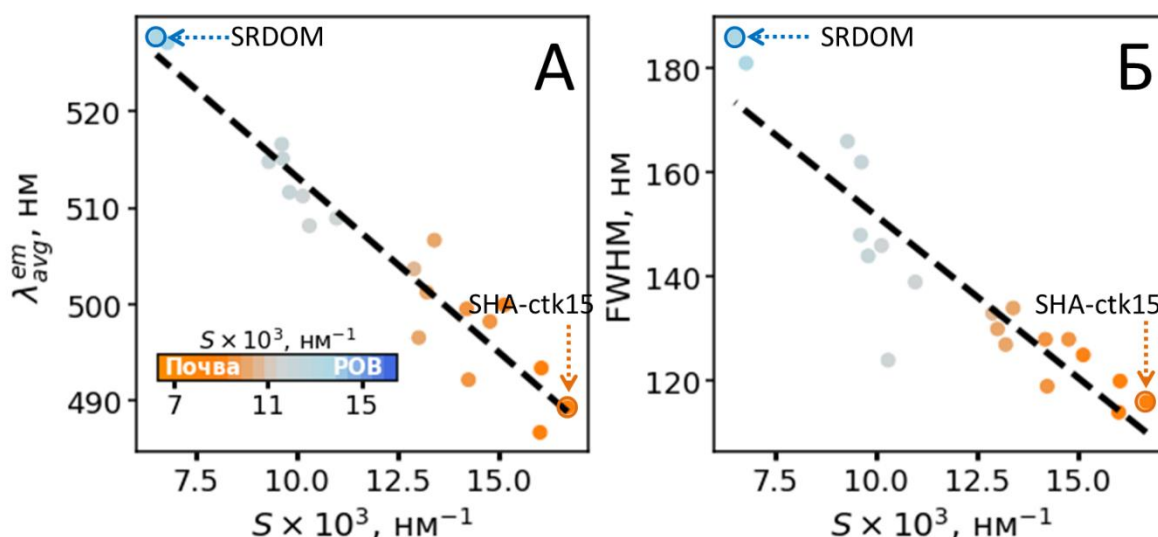


Рисунок 4.13 — Зависимость А) средневзвешенной по интенсивности длины волны флуоресценции  $\lambda_{avg}$  ( $r = -0.93$ ,  $p$ -уровень значимости  $< 10^{-5}$ ) и Б) полуширины спектра флуоресценции FWHM ( $r = -0.86$ ,  $p$ -уровень значимости  $< 10^{-4}$ ) от спектрального наклона  $S$ , полученная для исследованных образцов ПОВ. Параметры флуоресценции были определены для спектров, измеренных на длине волны возбуждения 380 нм.

Наблюдаемое поведение спектральных свойств было одинаковым для всех образцов ПОВ вне зависимости от их происхождения и фракционного состава. Необходимо отметить, что Стоксов сдвиг величиной  $\sim 200$  нм (наблюдаемый для ПОВ при возбуждении в области 300 нм), сильно зависящий от длины волны возбуждения, не характерен для индивидуальных молекулярных флуорофоров и наблюдается обычно для ГСФ, в частности, для оксида графена [399] и органических углеродных точек [400]. Во-вторых, монотонное уменьшение квантового выхода флуоресценции с ростом длины волны возбуждения (Рис. 4.12В) не является ожидаемым для случайной смеси молекул, поскольку, в целом, более длинноволновые флуорофоры не обязательно должны характеризоваться более низкой эффективностью флуоресценции. В частности, закон энергетической щели (energy gap law) [217,412], постулирующий снижение квантового выхода с увеличением длины волны эмиссии флуорофора, справедлив только в ряду молекул, обладающих аналогичной структурой (например, для полиароматических углеводородов), но не выполняется в случае случайно выбранных молекул. Зависимость квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения (Рис. 4.12В) является одним из аргументов, приводимых в литературе для опровержения применимости модели суперпозиции для описания оптических свойств ПОВ [392,393,413]. Наконец, корреляция между формой полосы флуоресценции и наклоном спектра поглощения  $S$  (Рис. 4.13) предполагает возможность возбуждения длинноволновых флуорофоров в широком спектральном диапазоне.

#### 4.3.3.2 Описание флуоресценции ПОВ моделью усреднения вкладов компонент: феноменологический подход

С учетом того, что каждый образец ПОВ содержит множество спектрально различных хромофоров, одной из гипотез формирования оптических свойств является модель суперпозиции. В рамках этой модели предполагается, что оптические спектры всей системы возникают за счет наложения спектров ее компонент, то есть спектры флуоресценции  $F(\lambda, \lambda_{exc})$  можно описать в виде следующей суммы:

$$F(\lambda, \lambda_{exc}) \sim \sum_i n_i \eta_i \sigma_i(\lambda_{exc}) S_i(\lambda), \quad (4.5)$$

где  $n_i$  и  $\eta_i$  – концентрация и квантовый выход флуоресценции  $i$ -ой компоненты,  $\sigma_i(\lambda_{exc})$  – эффективность поглощения  $i$ -ой компоненты на длине волны возбуждения  $\lambda_{exc}$ , а  $S_i(\lambda)$  – форма спектра флуоресценции  $i$ -ой компоненты, не зависящая от длины волны возбуждения.

Данная модель широко применяется в литературе для анализа флуоресценции ПОВ и лежит в основе метода PARAFAC (parallel factor analysis), который позволяет провести декомпозицию полного спектра флуоресценции (ЕЕМ-матрицу) на набор отдельных компонентов, каждый из которых характеризуется своим уникальным спектром возбуждения и эмиссии флуоресценции [403,405,414–416]. Данную процедуру для набора ЕЕМ-матриц образцов ПОВ можно представить в виде следующего разложения:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (4.6)$$

где  $x_{ijk}$  – интенсивность флуоресценции  $i$ -го образца на  $j$ -ой длине волны эмиссии при  $k$ -ой длине волны возбуждения, коэффициенты  $a_{if}$  прямо пропорциональны концентрации  $f$ -ой компоненты в  $i$ -ом образце, коэффициенты  $b_{jf}$  линейны связаны с квантовым выходом флуоресценции  $f$ -ой компоненты на  $j$ -ой длине волны эмиссии, коэффициенты  $c_{kf}$  линейно пропорциональны коэффициенту поглощения  $f$ -ой компоненты на  $k$ -ой длине волны возбуждения,  $F$  – число компонент в модели, а  $e_{ijk}$  – остаточный тензор третьего порядка.

Итоговое разложение находится путем минимизации суммы квадратов невязок.

В данном разделе метод PARAFAC был применен к ЕЕМ-матрицам исследуемых образцов ПОВ, обладающих различным происхождением и молекулярным составом, чтобы показать принципиальную возможность описания флуоресцентных свойств ГСФ в рамках феноменологического подхода и модели суперпозиции. Реализация метода PARAFAC осуществлялась с помощью программного пакета stardom [417].

Анализ показал, что ЕЕМ-матрицы исследуемых образцов можно описать как сумму четырех независимых компонент с  $R^2 > 0.99$  между экспериментальными и

восстановленными методом PARAFAC спектрами. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции четырех восстановленных компонент приведены на рисунке 4.14. Использование спектральных параметров и концентраций компонент, восстановленных методом PARAFAC, позволяет также воспроизвести зависимости средневзвешенной по интенсивности длины волны излучения флуоресценции  $\lambda_{avg}$  (Рис. 4.14Д) и FWHM (Рис. 4.14Е) от наклона поглощения  $S$ .

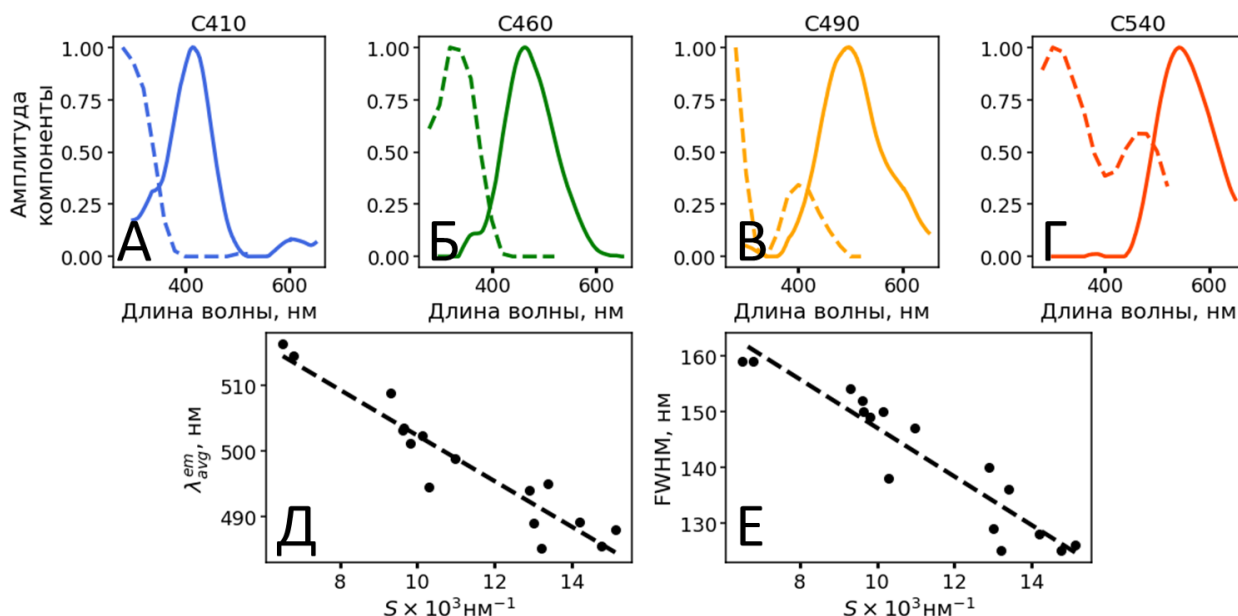


Рисунок 4.14 — А-Г) - спектры возбуждения (пунктирные линии) и эмиссии (сплошные линии) четырех компонент PARAFAC, необходимых для описания флуоресценции ГВ. Д)-Е) - корреляции между взвешенной по интенсивности средней длиной волны флуоресценции Д) и полушириной (FWHM, Е) спектров флуоресценции, восстановленных из разложения PARAFAC, и спектральным наклоном  $S$ .

Несмотря на высокую точность описания матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции ПОВ с помощью независимых компонент, получаемых с помощью метода PARAFAC, остается открытым вопрос о том, можно ли отнести восстановленные компоненты, к каким-то конкретным классам молекул [418]. Также продемонстрированная возможность линейного разложения широких бесструктурных спектров ПОВ на набор компонент не исключает возможности электронных взаимодействий в системе, т. е. описание данных с помощью более сложной нелинейной модели. Так, наличие многочисленных спектрально различных флуорофоров в ПОВ делает возможными электронные взаимодействия между ними, а модель взаимодействия, предложенная для описания формирования оптических свойств ПОВ [25], объясняет поведение спектральных свойств вкладом процессов переноса энергии возбуждения и донорно-акцепторных комплексов с переносом заряда. В рамках данной модели предполагается, что длинноволновое поглощение возникает в результате образования комплекса в основном состоянии между донорами и акцепторами электронов,



представленными в ПОВ полифенольными системами и сопряженными карбонильными и карбоксильными группами, соответственно [393]. При этом, аналогично гипотезе, рассмотренной в предыдущем разделе для ГСФ, полученных методом «снизу вверх», для ПОВ в литературе предполагается наличие ступенчатой миграции энергии электронного возбуждения между флуорофорами в их составе [391,392]. Преимуществом модели взаимодействия в сравнении с моделью суперпозиции в описании оптических свойств ПОВ является ее способность предсказывать, как будут изменяться спектры при внешних воздействиях, изменяющих количество электронных донорно-акцепторных пар в системе [428,450]. В связи с этим для исследования роли электронного взаимодействия в формировании оптических свойств ПОВ были, аналогично рассмотренному выше случаю ГСФ, полученных методом «снизу вверх», исследованы свойства кинетики затухания флуоресценции на временном масштабе от 100 фс до 10 нс.

#### **4.3.4 Параметры кинетики затухания флуоресценции ПОВ на временах от 100 фс до 10 нс**

В качестве первого шага были проведены измерения кинетики затухания флуоресценции образцов ПОВ на субнаносекундном временном масштабе (временное разрешение метода 150 пс) на различных длинах волн эмиссии (450-600 нм). Для всех образцов из рассматриваемой выборки наблюдались схожие зависимости среднего времени жизни флуоресценции от длины волны эмиссии: оно убывало с ростом длины волны эмиссии на длинноволновом краю (Рис. 4.15), аналогично экспериментам с ГСФ, полученным в рамках подхода «снизу вверх» (Рис. 4.6). Таким образом, на субнаносекундном временном масштабе спектральной миграции возбуждения в ПОВ обнаружено не было.

Следующим шагом являлось исследование кинетики релаксации флуоресценции ПОВ на пикосекундном временном масштабе. Согласно литературе, ПОВ представляют собой высокомолекулярные органические соединения с относительно низкой молекулярной массой и различной длиной сопряжения, которые объединены в плотно упакованные частицы (размером порядка 10 нм) [420]. Так как флуорофоры в ПОВ расположены близко (~1 нм), то между ними может иметь место сильное электронное взаимодействие, вследствие чего перенос энергии возбуждения в системе может происходить на более коротких временных масштабах, чем доли наносекунды. Аналогичные соображения были рассмотрены в предыдущем разделе в контексте кинетики релаксации флуоресценции ГСФ, полученных в рамках подхода «снизу вверх».

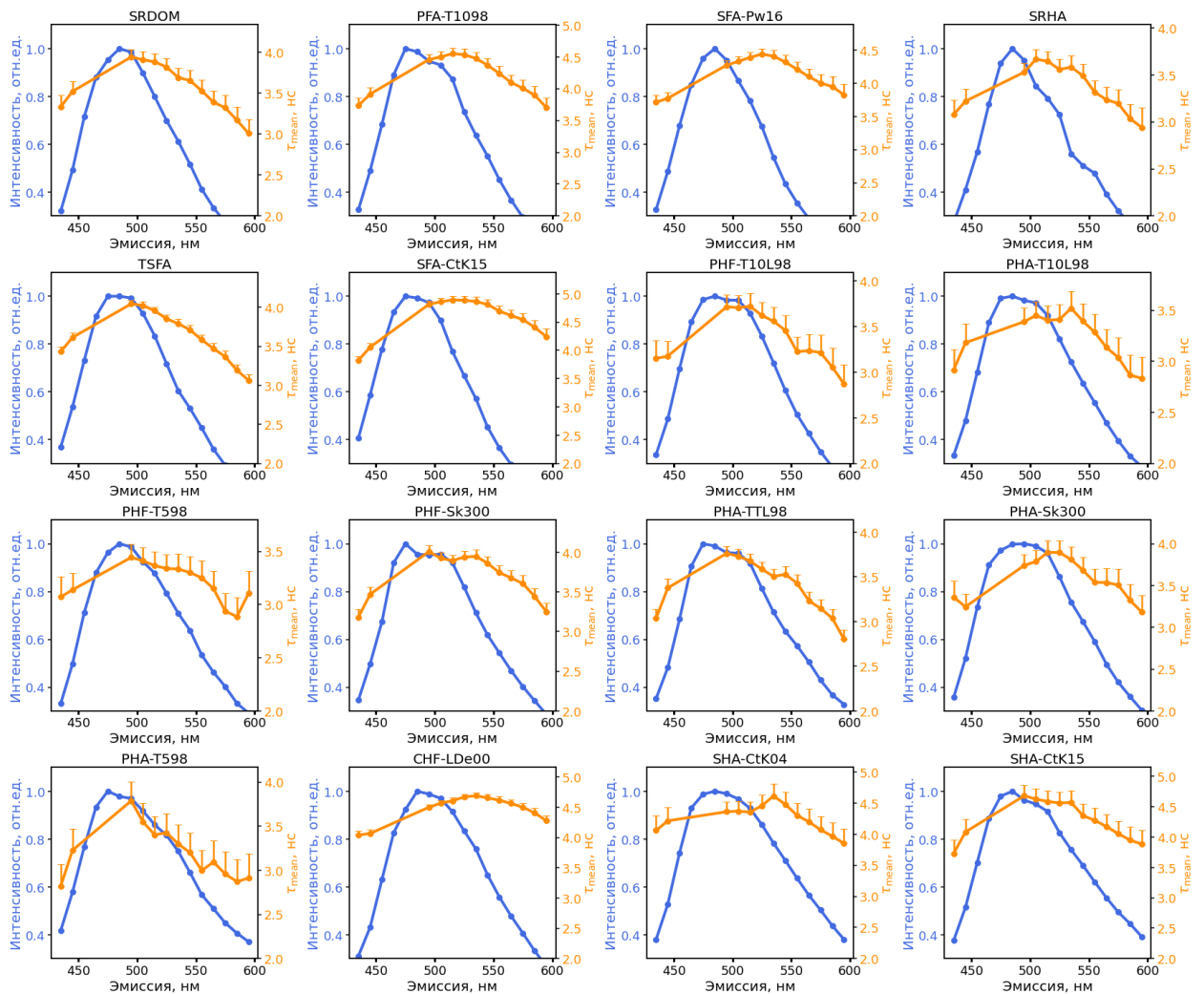


Рисунок 4.15 — Зависимости интенсивности флуоресценции (синий) и среднего времени жизни флуоресценции  $t_{\text{mean}}$  (красный) от длины волны эмиссии для образцов ПОВ. Длина волны возбуждения 405 нм. Отсутствие данных в спектральном диапазоне 450-500 нс связано с наличием в нем сигнала КР молекул воды.

На рисунке 4.16 представлены кинетики затухания флуоресценции, полученные на нескольких длинах волн эмиссии при возбуждении образца SRHA на длине волны 380 нм.

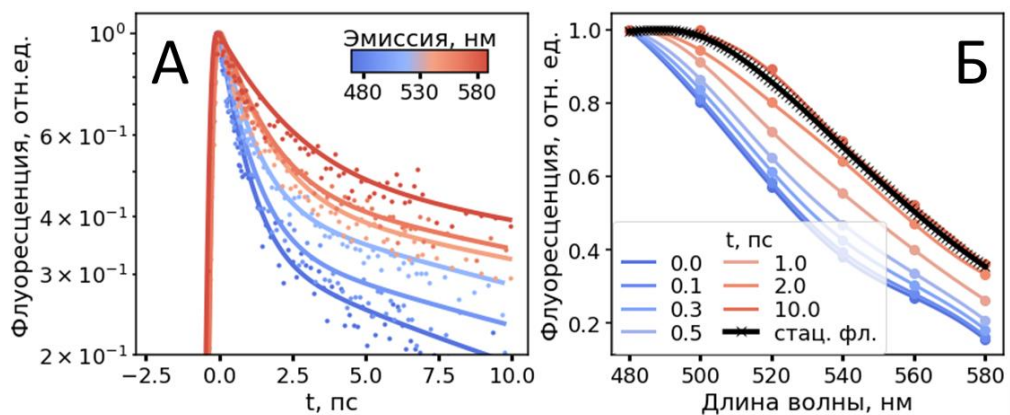


Рисунок 4.16 — А) Кинетики затухания флуоресценции образца ПОВ (SRHA), измеренные на различных длинах волн эмиссии с субпикосекундным временным разрешением

(представлены первые 10 пс затухания). Б) Эволюция спектра флуоресценции образца ПОВ (SRHA) во времени.

Как видно, в кривых затухания флуоресценции репрезентативного образца ПОВ (SRHA, Рис. 4.16А) на всех длинах волн регистрации присутствовала сверхбыстрая компонента со временем  $\sim 1$  пс. Амплитуда этой компоненты монотонно уменьшалась с длиной волны эмиссии, в результате чего со временем наблюдалось смещение спектров флуоресценции в длинноволновую область на масштабе времени 10 пс (Рис. 4.16Б, спектральная миграция). Аналогичная закономерность наблюдалась для всех измеренных образцов ПОВ: на рисунке 4.17А представлены кинетики сверхбыстрой релаксации для всех образцов на фиксированной длине волны эмиссии (530 нм). Наличие пикосекундной компоненты говорит о том, что во всех образцах может иметь место общий сверхбыстрый фотофизический процесс.

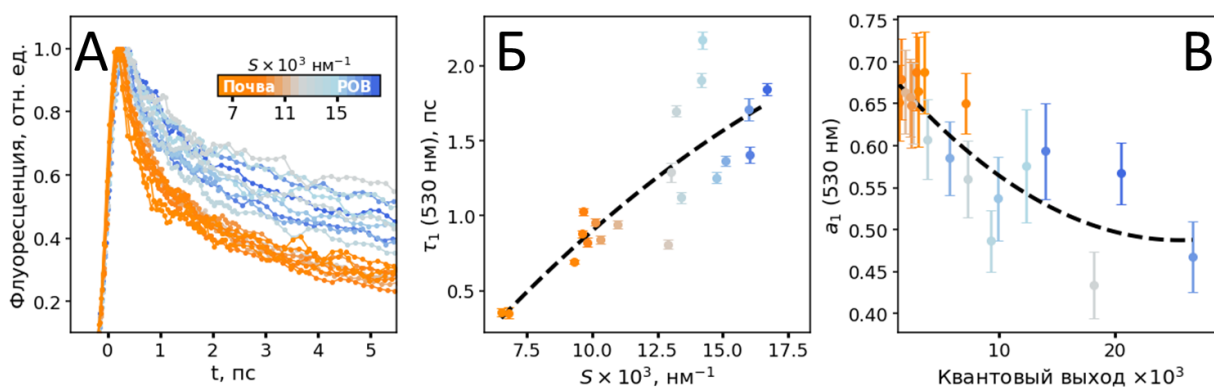


Рисунок 4.17 — А) Кинетики затухания флуоресценции для всей выборки исследуемых ПОВ ( $\lambda_{\text{exc}} = 380$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 530$  нм). Цветом кодирована величина спектрального наклона поглощения. Б) Корреляция между временем релаксации сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции ( $\tau_1$ ) и спектральным наклоном поглощения  $S$ . В) Корреляция между нормированной амплитудой сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции ( $a_1$ ) и квантовым выходом флуоресценции (при возбуждении на 380 нм).

Было также установлено, что параметры сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции (время жизни  $\tau_1$  и амплитуда  $a_1$ ) скоррелированы со спектральными характеристиками ПОВ (Рис. 4.17Б-В). Во-первых, наблюдалась положительная корреляция между временем жизни сверхбыстрой компоненты  $\tau_1$  и наклоном спектра поглощения  $S$ , т.е. чем меньше  $S$ , тем быстрее происходит релаксация возбуждения (Рис. 4.17Б). Во-вторых, имела место обратная корреляция между амплитудой сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции и квантовым выходом флуоресценции, т.е. чем больше вклад сверхбыстрой компоненты, тем меньше квантовый выход эмиссии (Рис. 4.17В). Данный факт можно объяснить тем, что пикосекундная компонента в кинетике

затухания флуоресценции дает малый вклад в интегральный сигнал, следовательно, чем больше ее амплитуда, тем ниже наблюдаемый квантовый выход флуоресценции.

Отметим также, что для второй компоненты в кинетике затухания флуоресценции, обладавшей временем  $\sim 10$  пс, была выявлена статистически значимая корреляция между ее параметрами и спектральным наклоном  $S$  (Рис. 4.18), тогда как для более медленных компонент корреляции не наблюдалось. Так, наблюдались значимые корреляции между параметрами  $a_2$ ,  $\tau_2$  и  $S$  ( $p < 10^{-3}$ ), в то время как для  $a_3$ ,  $\tau_3$  и  $S$   $p$ -уровень значимости превышал  $10^{-2}$ .

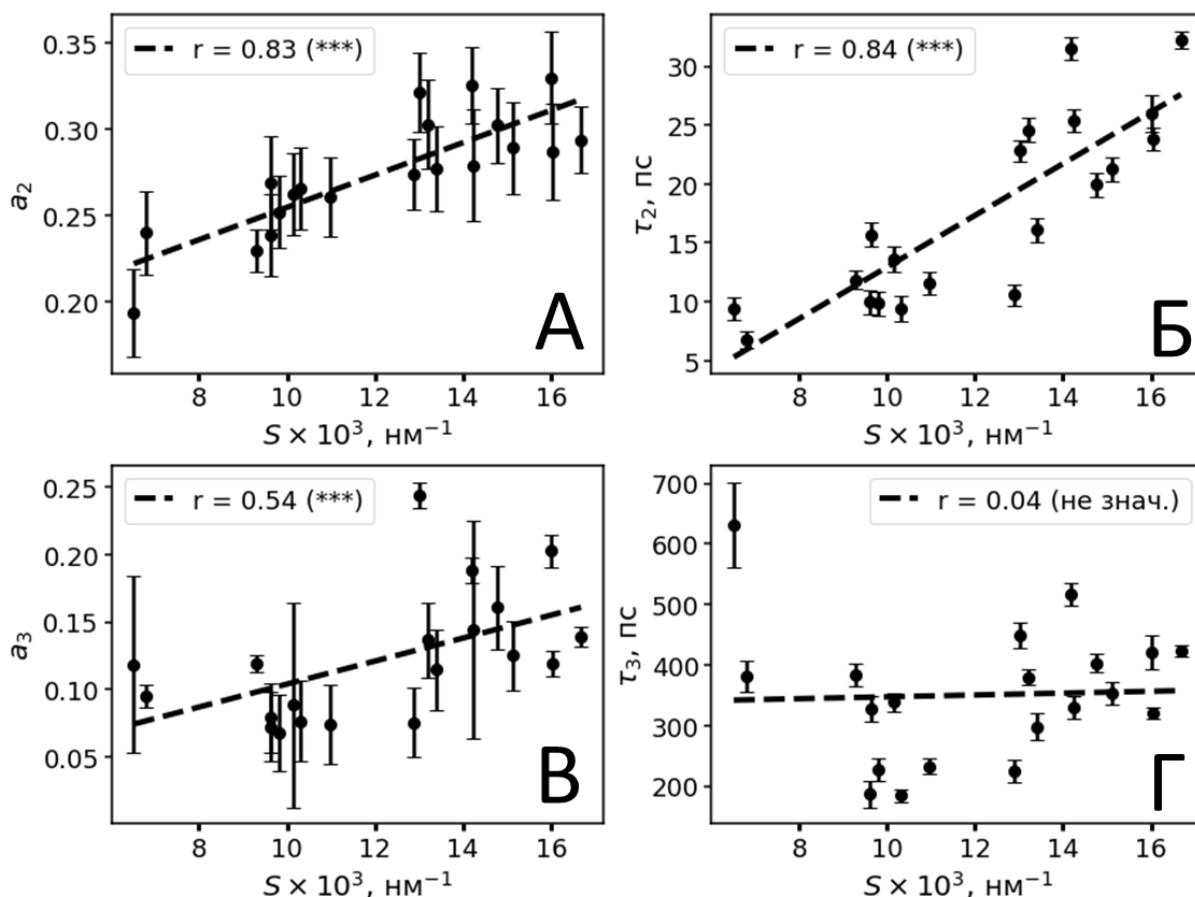


Рисунок 4.18 — Корреляция между параметрами затухания флуоресценции, измеренной с субпикосекундным разрешением и аппроксимированной суммой трех экспонент, нормированными амплитудами  $a_2$  (А),  $a_3$  (В), временами затухания  $\tau_2$  (Б),  $\tau_3$  (Г) и наклоном спектра поглощения  $S$ .

#### 4.3.5 Связь параметров пикосекундной релаксации возбужденного состояния с молекулярным составом ПОВ

Чтобы понять, преобладание каких типов молекулярных структур в составе ПОВ увеличивает вклад сверхбыстрого затухания флуоресценции, был проведен корреляционный анализ между структурными и оптическими характеристиками исследованных образцов (Рис. 4.19). В состав ПОВ входят как ароматические, так и не

ароматические (то есть алифатические) классы соединений. Оценка соотношения доли ароматических соединений в составе ПОВ к доле алифатических соединений производилась с использованием метода ЯМР-спектроскопии.

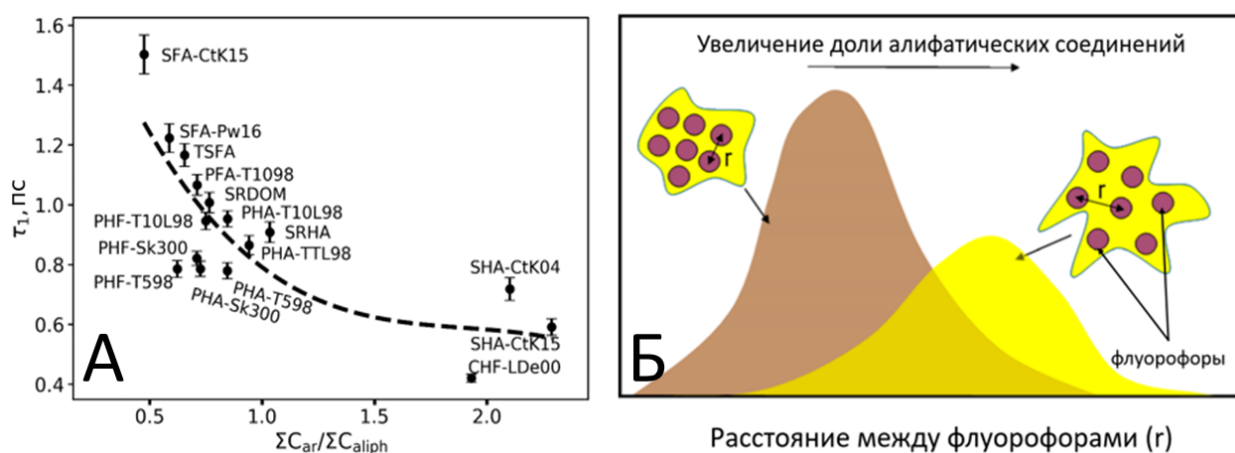


Рисунок 4.19 — А) Корреляция между временем жизни пикосекундной компоненты в затухании флуоресценции и соотношением количества ароматических и алифатических соединений в составе ПОВ. (Б) Схематическое изображение распределения по расстояниям между флуорофорами в зависимости от доли алифатических соединений в составе ПОВ. Схема взята из работы [420].

Было получено, что между временем сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции и соотношением количества ароматических и алифатических соединений в составе ПОВ наблюдается обратная корреляция (Рис. 4.19А). Соответственно, скорость релаксации энергии возбуждения выше в системах с меньшим содержанием алифатических соединений в составе. Данный факт, однако, напрямую не подтверждает гипотезы о формировании ПОВ по модели невзаимодействующих или взаимодействующих флуорофоров. С одной стороны, ароматические соединения, входящие в состав ПОВ, могут иметь более короткое время затухания сверхбыстрой компоненты. С другой стороны, как было предположено в [420], поскольку в ПОВ могут образовываться молекулярные агрегаты, с уменьшением количества ароматических соединений расстояние между флуорофорами, содержащими ароматические субъединицы, может уменьшаться, что будет приводить к увеличенной скорости переноса энергии внутри агрегата, что потребовало дополнительных экспериментов, верифицирующих ту или иную гипотезу.

#### 4.3.6 Механизмы формирования оптических свойств ПОВ

Аналогично случаю ГСФ, сгенерированных в рамках подхода «снизу вверх» (раздел 4.2) для оценки влияния переноса энергии возбуждения в формирование оптических свойств ПОВ были проведены измерения кинетики анизотропии флуоресценции, кинетики

затухания флуоресценции фракций ПОВ с разной молекулярной массой, а также в разных растворителях.

В рамках данной модели сверхбыстрый перенос в ПОВ возможен за счёт “плотной упаковки” хромофоров, находящихся в агрегатах различного размера, при этом часть электронных состояний может быть образована именно за счёт взаимодействия между флуорофорами. Было предположено, что параметры сверхбыстрой компоненты релаксации возбужденного состояния должны в этом случае зависеть от размера агрегатов в системе (чем больше размер частицы, тем больше вероятность переноса).

Для проверки данной гипотезы была проведена дополнительная серия измерений кинетики затухания флуоресценции с субпикосекундным временным разрешением для образцов различного происхождения, фильтрованных с помощью мембранных фильтров, пропускающих частицы с молекулярной массой ниже 3 кДа. Было установлено, что фракция с молекулярной массой ниже 3 кДа обладает меньшей амплитудой и большим временем релаксации по сравнению с нефитрированными образцами (Рис. 4.20).

При этом для образцов с меньшей средней молекулярной массой изменение в амплитуде сверхбыстрой компоненты было меньше (Рис. 4.20А, SRDOM), чем в образцах с большей средней молекулярной массой до фильтрации (Рис. 4.20В, SHA-CtK15). Таким образом, параметры пикосекундной компоненты действительно зависели от размера частиц в системе, но наиболее выраженной эта зависимость была для образцов, в которых изначально присутствовали большие (>3 кДа) частицы. В случае выделения молекулярной фракции с массой менее 3 кДа пикосекундная компонента не пропадала, что говорит о том, что, аналогично случаю ГСФ, полученных методом «снизу вверх», для ее существования наличие супрамолекулярных агрегатов не является необходимым.

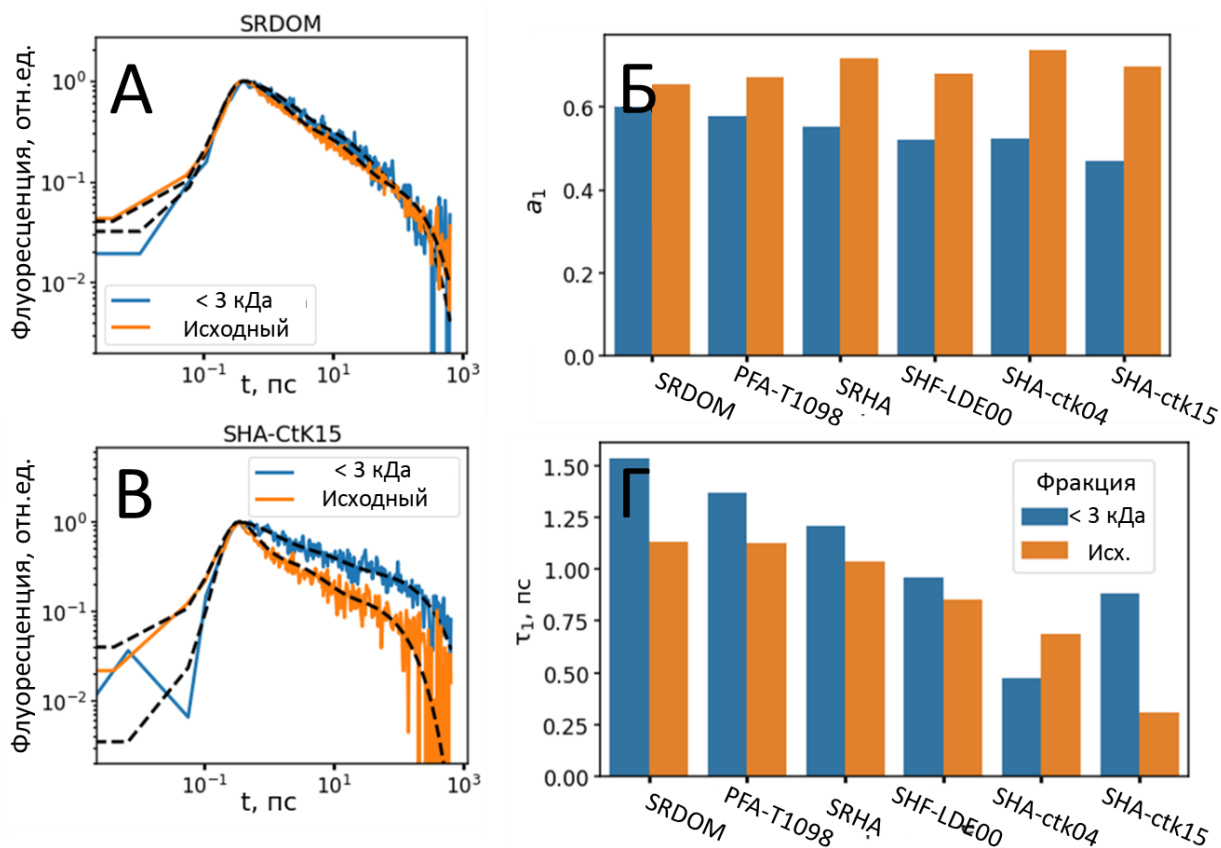


Рисунок 4.20 — А), В) Кинетика затухания флуоресценции для образцов SRDOM (А) и SHA-СтК15 (В) (длина волны возбуждения 380 нм, длина волны эмиссии 500 нм). Б), Г) Нормированные значения амплитуды пикосекундной компоненты (Б) и ее времени (Г) для фракции ПОВ с размером менее 3 кДа (синий) и нефiltroванных образцов (оранжевый).

Далее, была измерена кинетика затухания анизотропии флуоресценции ПОВ: аналогично ГСФ, полученным в рамках подхода «снизу вверх», было обнаружено, что на масштабе времени 0-10 пс анизотропия флуоресценции остается неизменной (Рис. 4.21). Данный факт говорит в пользу гипотезы о том, что пикосекундная компонента не является следствием сверхбыстрого переноса энергии в ПОВ.

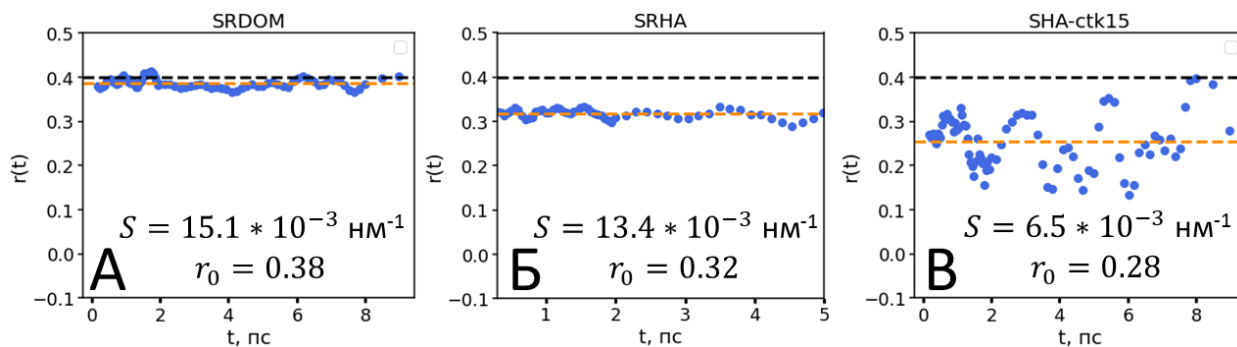


Рисунок 4.21 — Репрезентативная кинетика затухания анизотропии флуоресценции образцов ПОВ различной природы: А) SRDOM, Б) SRHA, В) SHA-ctk15. Длина волны возбуждения - 380 нм, длина волны регистрации - 540 нм.

Наконец, были проведены измерения оптических свойств ПОВ в растворителях с разной полярностью. Как было обсуждено в разделе 4.2, релаксация растворителя является явлением, которое необходимо учитывать при интерпретации смещения спектра флуоресценции в длинноволновую область на пикосекундном временном масштабе. В связи с этим были измерены кривые затухания ПОВ в растворителях с различной ориентационной поляризуемостью (тетрагидрофуран, изопропанол, этанол, глицерин и вода) и, следовательно, с разными характерными временами релаксации растворителя. Было показано, что параметры затухания пикосекундной флуоресценции чувствительны к полярности микроокружения (таблица 4.3, Рис. 4.22).

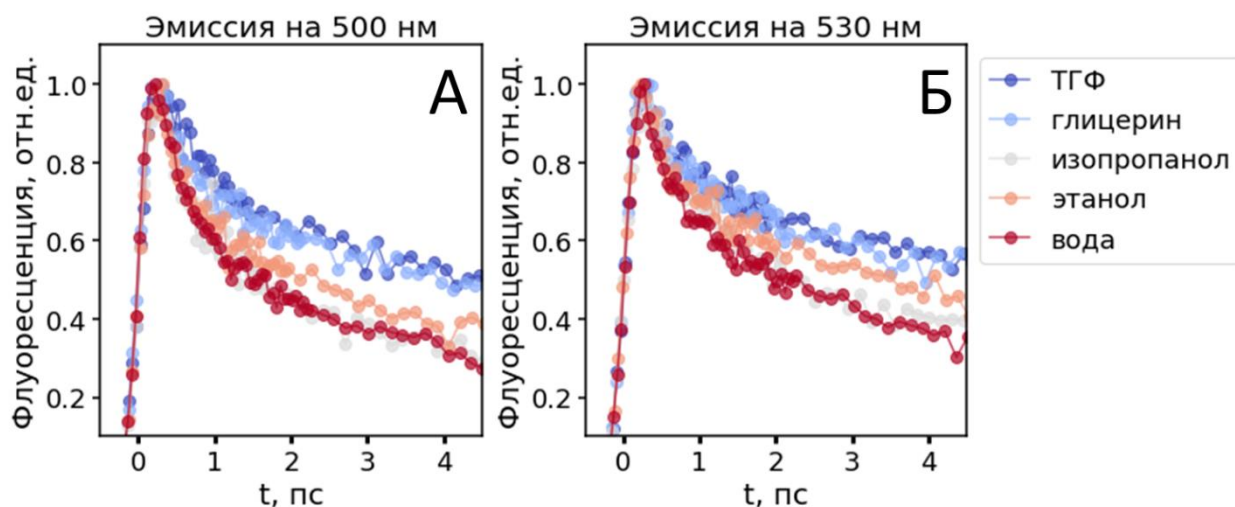


Рисунок 4.22 — Кинетика затухания флуоресценции образца ПОВ (SRHA) в разных растворителях, полученная при возбуждении на длине волны 380 нм и регистрации на длинах волн А) 500 нм и Б) 530 нм.

Таблица 4.3. Параметры пикосекундной компоненты в кинетике затухания флуоресценции образца ПОВ (SRHA), измеренные в растворителях с различными значениями диэлектрической проницаемости  $\epsilon$ , коэффициента преломления  $n$ , полярности  $\Delta f$ . Длина волны возбуждения 380 нм.

Растворитель	$\epsilon$	$n$	$\Delta f = \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right)$	$\lambda_{эм}, \text{нм}$	$\tau_1, \text{пс}$	$a_1, \%$
Вода	78.36	1.333	0.320	500	$0.95 \pm 0.05$	$67 \pm 4$
Этанол	24.5	1.361	0.289		$1.09 \pm 0.05$	$62 \pm 5$



Пропанол	19.92	1.377	0.276		$0.98 \pm 0.07$	$66 \pm 7$
Глицерин	42.5	1.473	0.264		$0.94 \pm 0.06$	$50 \pm 4$
Тетрагидрофуран	7.68	1.407	0.210		$1.56 \pm 0.10$	$51 \pm 6$
Вода	78.36	1.333	0.320	530	$1.37 \pm 0.07$	$61 \pm 6$
Этанол	24.5	1.361	0.289		$1.43 \pm 0.06$	$57 \pm 6$
Пропанол	19.92	1.377	0.276		$1.48 \pm 0.07$	$63 \pm 5$
Глицерин	42.5	1.472	0.264		$1.33 \pm 0.10$	$46 \pm 5$
Тетрагидрофуран	7.68	1.4072	0.210		$1.98 \pm 0.12$	$48 \pm 5$

Также было показано, что образцы ПОВ демонстрируют сольватохромный сдвиг (Рис. 4.23А), величина которого скоррелирована с параметрами пикосекундной компоненты в кинетике релаксации флуоресценции. На рисунке 4.23Б-В представлены зависимости времени жизни флуоресценции  $\tau_1$  и амплитуды сверхбыстрой компоненты  $a_1$  от средней по спектру длины волны флуоресценции (центра масс спектра) для образца SRНА в различных растворителях (красные точки) и образцов разного происхождения (растворенное органическое вещество, торф, уголь). Характерные значения параметров сверхбыстрой компоненты ( $\tau_1$ ,  $a_1$ ) SRНА в различных растворителях не сильно отклоняются от зависимостей  $\tau_1(\lambda_{avg})$  и  $a_1(\lambda_{avg})$ , полученных для образцов разного происхождения. Это свидетельствует о том, что полярность растворителя синхронно влияет как на спектры ПОВ, так и на кинетику затухания флуоресценции ПОВ на пикосекундном временном масштабе.

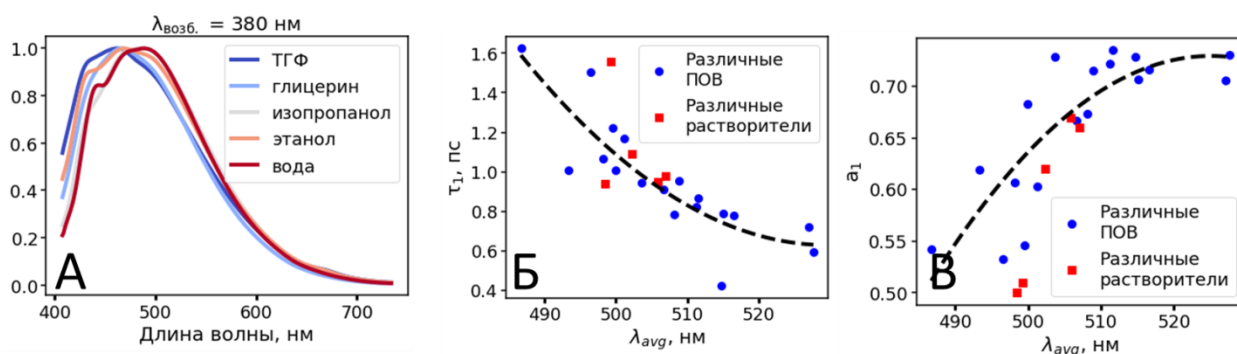


Рисунок 4.23 — (а) Спектры флуоресценции SRHA в различных растворителях, полученные для длины волны возбуждения 380 нм. (б, в) Зависимость времени затухания флуоресценции  $\tau_1$  (б) и амплитуды  $a_1$  (в) от средней длины волны эмиссии флуоресценции ( $\lambda_{\text{avg}}$ ), рассчитанной для спектров, измеренных на длине волны возбуждения 380 нм.

## Выводы

В рамках данной главы рассмотрена гипотеза об общности закономерностей фотофизических свойств продуктов окисления биоорганических соединений на основе изучения моделей «снизу вверх», то есть при изучении продуктов, образующихся при воздействии на молекулы одного типа, а также модели «сверху вниз» при изучении гетерогенных смесей природного происхождения.

Были изучены особенности эволюции спектральных свойств гетерогенных систем флуорофоров, образующихся в процессе окисления при УФ облучении и озонировании. Показано, что по мере увеличения длительности воздействия на растворы триптофана и дигидроксибензойной кислоты образуется большое число новых молекулярных соединений (более 500), и процесс их образования сопровождается эволюцией оптических свойств. Была выявлена корреляция числа соединений в системе, обнаруженных с помощью масс-спектрометрии и спектральным наклоном спектров поглощения ( $R = 0.83$ ). Было показано, что в данных системах имеют место флуоресцентные свойства характерные для ГСФ: при увеличении длины возбуждения спектры флуоресценции вложены друг в друга, имеет место уменьшение квантового выхода и Стоксова сдвига.

Изучены особенности кинетик релаксации ГСФ на временных масштабах от 100 фс до 10 нс, проведена проверка гипотезы о роли электронного взаимодействия и переноса энергии возбуждения в формировании их оптических свойств. В образующихся системах выявлено затухание флуоресценции на субпикосекундном масштабе времени, показано что сверхбыстрая компонента не обусловлена внутримолекулярным электронным взаимодействием, поскольку в системе не наблюдается сверхбыстрой деполяризации флуоресценции, характерной для сверхбыстрого переноса энергии, а также в связи с тем фактом, что сверхбыстрая компонента наблюдается у низкомолекулярной ( $< 1 \text{ кДа}$ )

фракции продуктов окисления. Продемонстрировано, что существенную роль при формировании сверхбыстрой компоненты оказывает релаксация растворителя. С увеличением полярности растворителя вклад сверхбыстрой компоненты растет, кроме того, имеет место рост Стоксова сдвига.

Проведено исследование спектральных свойств и кинетики релаксации флуоресценции для ГСФ природного происхождения различного состава, показано, что данные системы обладают схожими характеристиками с системами, полученными в подходе «снизу вверх». Для систем природных органических веществ выявлена корреляция параметров спектров поглощения и флуоресценции: спектральный наклон поглощения антикоррелирует со средневзвешенной длиной волны эмиссии и шириной полосы флуоресценции. Показано, что полные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции природных органических веществ различного происхождения могут быть описаны суммой малого количества независимых компонент, что указывает на возможность интерпретации спектров в рамках гипотезы без взаимодействия компонент. Анализ кинетик релаксации флуоресценции ПОВ на наносекундном масштабе времени не выявил указаний на наличие переноса в системах, при этом во всех системах была обнаружена сверхбыстрая компонента с характерным масштабом времени около одной пикосекунды. Показано, что вклад сверхбыстрой компоненты флуоресценции скоррелирован со спектральными характеристиками ПОВ: имеет место положительная корреляция с наклоном спектра поглощения и обратная корреляция с квантовым выходом флуоресценции. С помощью ЯМР-спектроскопии показано, что скорость затухания сверхбыстрой компоненты выше в системах с меньшим содержанием алифатических соединений, однако как и для случая систем полученных методом «снизу вверх» сверхбыстрая компонента имеет место и в низкомолекулярной фракции (<3 кДа), что указывает на то, что для ее объяснения не требуется привлечения гипотезы о переносе энергии электронного возбуждения. Выявленное отсутствие зависимости анизотропии флуоресценции от времени на сверхбыстрых масштабах и наличие зависимости скорости сверхбыстрой компоненты от полярности растворителя указывает, что для ПОВ аналогично системам, получаемых методом «сверху вниз», природа сверхбыстрой компоненты связана с релаксацией растворителя после оптического возбуждения данных систем.

Таким образом, проведенные исследования указывают на общность оптических свойств систем гетерогенных флуорофоров получаемых с помощью методов «снизу вверх», из элементарных соединений, и «сверху вниз», выделяемых из природных веществ.

## Глава 5. Эндогенная флуоресценция в анализе биожидкостей

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A20-A21].

### 5.1 Введение и постановка задачи

Эндогенная флуоресценция получила широкое распространение в исследовании биологических образцов, в частности биожидкостей, клеток и тканей. Среди биожидкостей особый интерес представляют плазма и сыворотка крови, флуоресцентные свойства которых активно исследуются с 60-х годов XX века с целью разработки методик диагностики онкологических заболеваний [168,277,421,422], диабета [423–425], нейродегенеративных заболеваний [426,427], инфекционных заболеваний [428]. В основном, логика таких исследований заключается в поиске спектральных различий между образцами контрольной группы и группы пациентов с заболеванием. Некоторые примеры применения флуоресцентной спектроскопии плазмы крови для диагностики можно найти в обзоре 2021 года [427].

В полных спектрах (ЕЕМ-матрицах) флуоресценции плазмы крови в первом приближении можно выделить две основных группы флуорофоров (Рис. 5.1): белковые флуорофоров с максимумом эмиссии в УФ области ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм,  $\lambda_{\text{эм}} = 350$  нм) и флуорофоров с эмиссией в видимой области спектра ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{эм}} = 450$  нм).

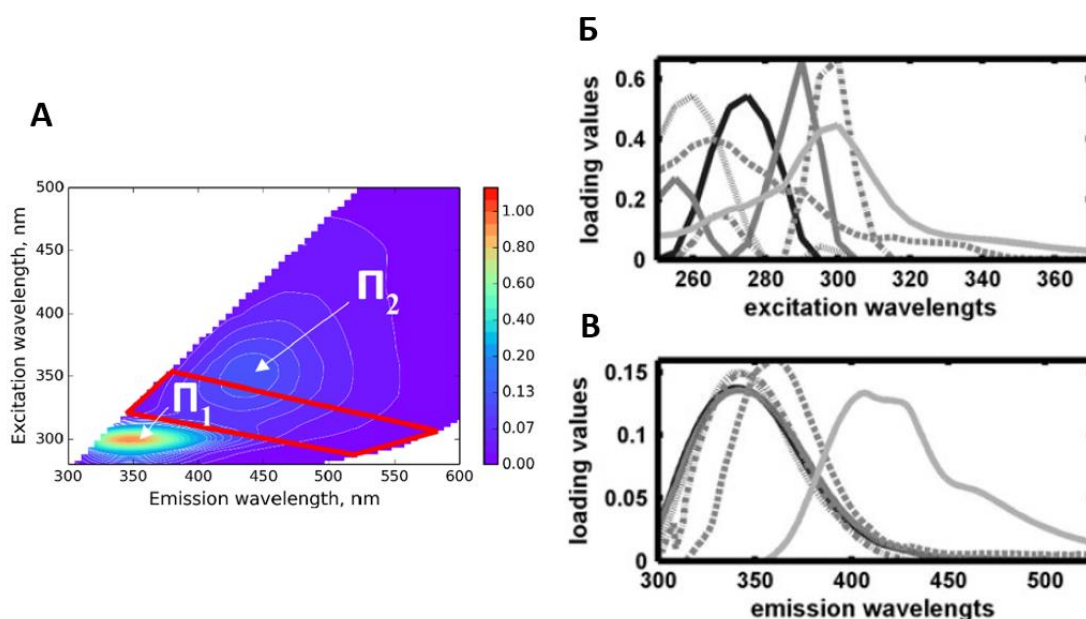


Рисунок 5.1. — А) Пример матрицы флуоресценции (Excitation-emission matrix, EEM), измеренной для образца плазмы крови [425]. Б) Спектры возбуждения и В) эмиссии флуоресценции спектральных компонент, полученные при анализе методом PARAFAC матриц флуоресценции плазмы крови пациентов с колоректальным раком и контрольной группы [429].

В соответствии с этим в ряде исследований основное внимание уделяется белковой компоненте [277,430,431], механизм формирования флуоресценции которой достаточно хорошо изучен. Концентрация белков в плазме крови высока (~80 мг/мл), а их собственная флуоресценция определяется, в основном, триптофановыми остатками (см. Главу 2). Далее, в предположении, что при некоторых заболеваниях, например, при раке [432] или диабете [433], меняется компонентный состав и структура белков плазмы крови, а флуоресценция Тгр чувствительна к изменению конформации, проводится поиск различий в форме и интенсивности полосы эмиссии Тгр для образцов контрольной группы и группы пациентов с заболеванием. Так, в работе 1982 года ученых из СССР было установлено, что для флуоресценции плазмы крови онкологических пациентов характерна повышенная интенсивность и сдвиг эмиссии Тгр в коротковолновую область на величину ~1.5 нм. Аналогичные результаты были получены группой [434], а в последующей работе [435], основываясь на данных капиллярного электрофореза, было предположено, что синий сдвиг максимума флуоресценции Тгр в плазме крови онкологических пациентов связан с пониженным соотношением концентраций альбумина и глобулинов. Изменения формы полосы флуоресценции Тгр плазмы крови для пациентов с онкологическими заболеваниями также анализировались в работах [430].

Использование параметров флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра совместно с УФ флуоресценцией позволяет получить больше информации об образце и улучшить точность диагностики [427]. Так, в работе [429,436] представлены результаты флуоресцентного анализа образцов плазмы крови пациентов с колоректальным раком. Данное исследование интересно по нескольким причинам: во-первых, размер исследуемой выборки был достаточно большим ( $N \sim 300$ ), во-вторых, некоторые из авторов работы являются разработчиками метода PARAFAC (parallel factor analysis для анализа EEM матриц [429,437,438], в-третьих, данные, использовавшиеся в указанной работе, выложены в открытый доступ и служат основой для других работ, посвященных методам анализа флуоресценции плазмы крови [439–441].

Применение метода PARAFAC к набору EEM позволяет разложить все имеющиеся матрицы флуоресценции по независимым компонентам, каждой из которых соответствует определенный спектр возбуждения и эмиссии флуоресценции. Результаты использования PARAFAC были представлен в Главе 4 на примере анализа EEM-матриц природного органического вещества. Спектры возбуждения и эмиссии полученных в работе [429] независимых компонент приведены на рисунке 5.1Б и 5.1В, соответственно. Всего авторы [429] анализируют 19 спектральных компонент и показывают, что их амплитуды можно использовать для построения классификационных моделей для диагностики

онкозаболеваний. В то же время природа флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра (то есть, второй полосы на рисунке 5.1 ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{возб}} = 450$  нм)) остается предметом дискуссий. По аналогии с флуоресценцией клеток данную полосу ассоциируют с флавинами и НАДН [427], а также с пост-трансляционными модификациями белков – дитирозином [107], продуктами гликирования [442] и т.д. Отметим, что параметры указанной полосы совпадают с параметрами нетриптофановой флуоресценции белков и аминокислот (Главы 3 и 4), таким образом, в формировании флуоресценции плазмы крови в видимой области могут также играть роль процессы окисления.

Несмотря на прогресс в области флуоресцентного анализа плазмы крови, имеется ряд проблем, осложняющих его применение в клинической практике:

- 1) Большинство работ выполнено на сравнительно малом количестве образцов, что затрудняет анализ вариабельности параметров флуоресценции и точности классификационных моделей,
- 2) В большинстве случаев механизмы, стоящие за формированием флуоресцентных дескрипторов, неясны – данный факт особенно актуален в случае флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра,
- 3) Параметры автофлуоресценции плазмы крови могут быть малочувствительными к ряду патологических процессов, в связи с чем актуальным является исследование возможности использования других фотофизических параметров, например, параметров кинетики релаксации флуоресценции, для целей диагностики.

В соответствии с указанными проблемами, в данной Главе было проведено систематическое исследование механизмов формирования флуоресценции плазмы крови, вариабельности фотофизических свойств основных эндогенных флуорофоров, как спектральных, так и параметров кинетики релаксации флуоресценции на широком диапазоне времен, а также предложены новые методы диагностики конформационных изменений белков плазмы крови. Для этого решались следующие задачи:

- 1) На открытом наборе ЕЕМ-матриц флуоресценции здоровых пациентов и пациентов с подтвержденным колоректальным раком была исследована вариабельность и прогностическая способность собственной флуоресценции белков, как «классической» флуоресценции  $T_{gr}$ , так и флуоресценции  $T_{ug}$ , методика анализа которой была рассмотрена в Главе 2. Для интерпретации вариабельности анализируемых параметров была проведена серия модельных экспериментов с растворами белков, а также с белковыми фракциями крови, полученными методом гель-фильтрующей хроматографии.

- 2) С использованием анализа фракций плазмы крови была исследована природа ее флуоресценции в видимой области спектра. Особое внимание было уделено доказательству вклада в видимую флуоресценцию плазмы крови продуктов окисления белков, в основном, альбумина. Исследованию механизмов формирования оптических свойств таких систем посвящены Главы 3 и 4, и цель заключалась в трансляции полученных результатов на анализ флуоресценции биожидкостей. Для этого были проанализированы вклады как низкомолекулярных флуорофоров (НАДН и билирубина) в интегральный сигнал флуоресценции, так и гетерогенных систем флуорофоров, ассоциированных с белковыми макромолекулами.
- 3) Помимо анализа свойств стационарной флуоресценции плазмы крови, была выполнена серия исследований кинетики затухания ее флуоресценции. Целью являлось установление вкладов различных эндогенных флуорофоров в измеряемый сигнал .

Полученные результаты объясняют ряд закономерностей формирования оптических свойств плазмы крови, на основе чего предлагаются подходы к диагностике патологических процессов в организме.

## **5.2 Стационарная флуоресценция плазмы крови: механизмы формирования, вариабельность параметров, диагностические возможности**

### **5.2.1 Объекты и методы исследований**

Для исследования свойств стационарной флуоресценции плазмы крови анализировался открытый массив данных ЕЕМ-матриц плазмы крови здоровых пациентов и пациентов с подтвержденным колоректальным раком [429], на примере которого верифицировались гипотезы о вариабельности и диагностической значимости некоторых оптических параметров, определяемых из спектров флуоресценции. При этом для исследования влияния патологических процессов на параметры автофлуоресценции и механизмов ее формирования выполнялись эксперименты на модельных системах, плазме крови и ее белковых фракциях, полученных методом гель-фильтрующей хроматографии.

Использованный открытый массив данных представляет собой набор полных спектров флуоресценции (ЕЕМ-матриц) образцов плазмы крови, разбавленной в фосфатном буфере в 100 раз, для 289 пациентов, у которых был заподозрен колоректальный рак. Из исследованных пациентов 73 были здоровы (группа 1), 73 с незлокачественными опухолями (группа 2), 72 с патологической аденомой (группа 3), 71 с подтвержденным

диагнозом колоректального рака (группа 4) [429]. При проведении анализа данные из групп (1)-(3) были объединены в группу с целевой переменной «0» (нет злокачественных образований), случаи с подтвержденным раком были помечены меткой «1» (подтвержденный рак).

ЕЕМ-матрицы были измерены в диапазоне длин волн эмиссии 300-600 нм (с шагом 1 нм, 301 точка) и длин волн возбуждения 250-450 нм (с шагом 5 нм, 41 точка). Из спектров были вычтены сигналы комбинационного рассеяния воды и пики, соответствующие рассеянию Рэлея.

На наборе данных ЕЕМ анализировались параметры и вариабельность флуоресценции Trp, Tug, а также флуоресценции в видимой области спектра.

Для фракционирования образцов плазмы крови использовался метод гель-проникающей хроматографии (ГПХ, size-exclusion chromatography, SEC), при этом детектирование оптического отклика осуществлялось с помощью диодной матрицы. Образцы плазмы крови предварительно центрифугировали течение 5 мин при 20 000 g и 4°C, а затем аликвоты супернатанта наносили на колонку Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную 20 mM Tris-HCl буфером (pH 7.6), содержащим 150 mM NaCl. Скорость потока устанавливалась равной 1 мл/мин с использованием системы Varian ProStar 335 (Varian Inc., Мельбурн, Австралия). Во время измерения хроматограммы регистрировали спектры поглощения в диапазоне 240–700 нм с шагом 1 нм (ширина щели 4 нм) с частотой 2.5 Гц и отбирали фракции один раз в минуту. Отобранную фракцию САЧ объемом ~500 мкл подвергали диализу против воды (1 л) в течение 12 часов, после чего центрифугировали для удаления возможных примесей. Часть полученного супернатанта повторно измеряли методом ГПХ для того, чтобы получить отдельно профиль САЧ, а остальную часть использовали для измерений с использованием флуоресцентной спектроскопии.

Серия экспериментов была также выполнена на образцах плазмы крови пациентов, отобранной в лаборатории клинической диагностики ГКБ №67. Образцы плазмы крови центрифугировали течение 10 мин при 2000 g. Для всех образцов имелись данные общего и биохимического анализа крови. Пациенты, принимавшие участие в исследовании, давали своё письменное согласие, исследование было одобрено локальным этическим комитетом ГКБ №67.



## 5.2.2 Триптофановая флуоресценция белков плазмы крови

Сигнал флуоресценции плазмы крови, возбуждаемый на длинах волн менее 300 нм, определяется, в основном, флуоресценцией Трп в белках [56]. Спектр поглощения триптофана сдвигнут в красную область относительно остатков Туг и Phe, и флуоресценцию Трп можно селективно возбудить на длине волны 295 нм. Поскольку форма спектра и интенсивность флуоресценции Трп в белковой макромолекуле зависят от ее конформации, данные параметры неоднократно предлагались в качестве диагностических индикаторов при различных патологических процессах [277,430,431]. В то же время в литературе отсутствует анализ вариабельности флуоресценции Трп в плазме крови на большой выборке образцов ( $n > 100$ ). В связи с этим первым шагом в анализе флуоресценции плазмы крови в данной Главе являлся анализ флуоресценции Трп.

Было установлено, что спектры флуоресценции Трп для пациентов с колоректальным раком демонстрируют небольшое ( $\sim 1$  нм) смещение в синюю область спектра по сравнению с контрольной группой (Рис. 5.2А, В). Также было показано, что интенсивность флуоресценции Трп статистически значимо ( $p < 5 \cdot 10^{-3}$ , тест Манна-Уитни) повышена у онкологических больных (Рис. 5.2Б). Аналогичные изменения для онкопациентов были ранее отмечены в литературе [434,435].

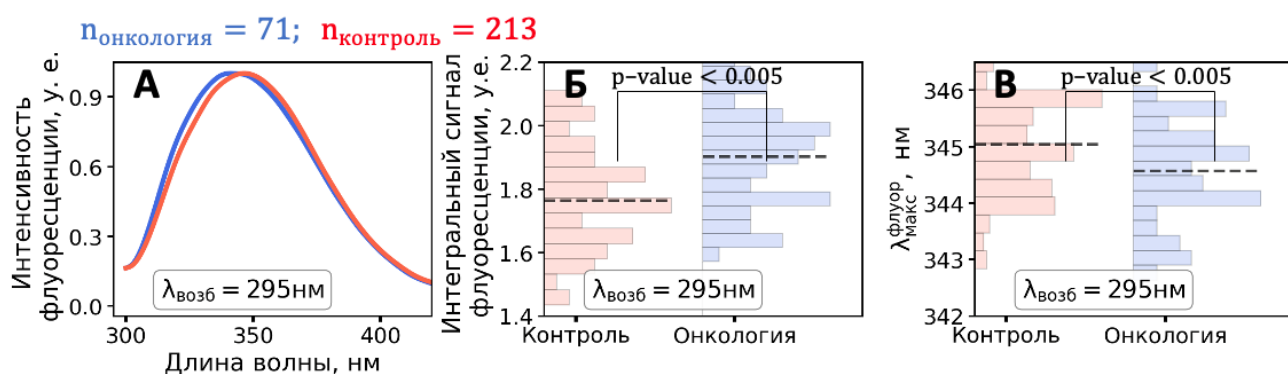


Рисунок 5.2 — А) Репрезентативные спектры флуоресценции плазмы крови для контрольной группы (красный) и онкологических больных (синий), полученные при возбуждении на 295 нм. Б) Гистограммы распределения положения максимума флуоресценции плазмы крови контрольной группы (красная) и онкологических пациентов (синяя), полученные при возбуждении на длине волны 295 нм. В) Гистограммы распределения интегральной интенсивности флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 295 нм.

Причиной указанных отличий может являться как изменение конформации белков, так и изменение соотношения концентраций белковых компонентов плазмы крови. Так, в работах [434,435] было высказано предположение, что синий сдвиг собственной флуоресценции белков в плазме крови онкопациентов может быть связан с изменением у них соотношения концентраций альбумина и иммуноглобулинов (Ig). Данная гипотеза

была нами напрямую верифицирована путем разделения белков плазмы крови по фракциям методом гель-проникающей хроматографии.

Хроматографический профиль плазмы крови здорового добровольца, соответствующий детектированию на длине волны 280 нм, представлен на рисунке 5.3А. Среди наблюдаемых пиков время выхода 14.5 мин соответствует мономерам альбумина, а время выхода 13 мин – иммуноглобулинам. Далее были отобраны все белковые фракции, и для каждой из них были измерены спектры поглощения и ЕЕМ-матрицы флуоресценции.

Из измеренных данных было определено, что наибольший вклад в флуоресценцию плазмы крови при возбуждении на 295 нм вносят иммуноглобулины (~16%, Ig) и САЧ (~70%), соответственно, а форма спектра их флуоресценции и соотношение их концентраций определяют параметры триптофановой флуоресценции плазмы крови (Таблица 5.1).

Таблица 5.1. Оптические свойства белков плазмы крови, их относительный вклады в общий интегральный сигнал плазмы крови.

	Плазма крови	САЧ	Ig
Концентрация белка, мМ	--	0.52-0.83	0.047-0.1
Коэффициент молярной экстинкции (280нм), $M^{-1}cm^{-1}$	--	35700	206000
Сигнал флуоресценции Trp, % от общего сигнала плазмы	100	68	15
Положение максимума эмиссии флуоресценции, нм	345	345.9	342.4
Сигнал флуоресценции Tyr, % от общего сигнала плазмы	--	82	9
Отношение интенсивностей Tyr/Trp	0.138	0.228	0.075

Спектры флуоресценции отобранных фракций, соответствующих Ig и САЧ, представлены на рисунке 5.3Б. Изменение соотношения концентраций этих белков может приводить к сдвигу спектра флуоресценции плазмы крови (Рис. 5.3В). В то же время средняя длина волны максимума эмиссии для онкологических пациентов (синяя прямая на рисунке 5.3В) соответствует минимально возможному (физиологически) соотношению концентраций

САЧ и Ig [434,435], что свидетельствует о том, что за спектральные различия в спектрах триптофановой флуоресценции плазмы крови частично могут быть ответственны конформационные изменения белков.

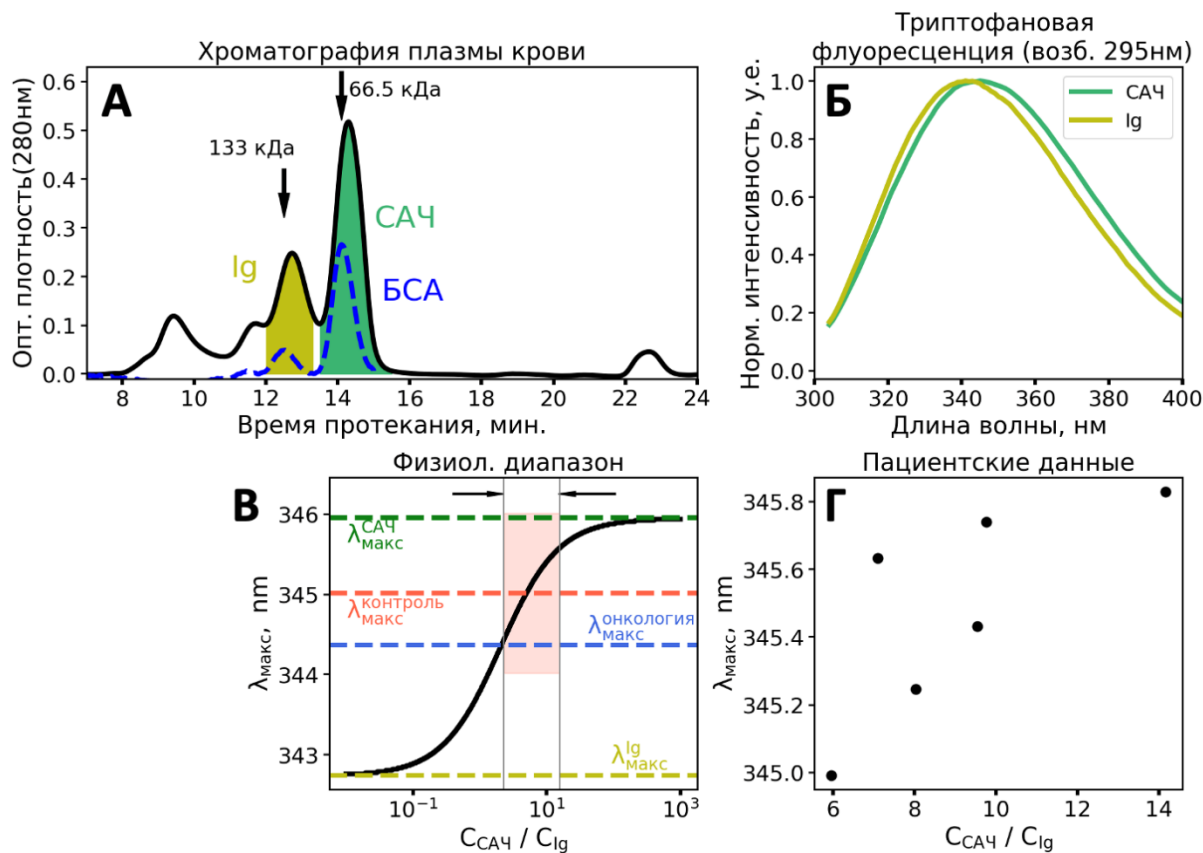


Рисунок 5.3 — А) Хроматограмма цельной плазмы крови человека, измеренная при детектировании на длине волны 280 нм. Б). Нормированные спектры флуоресценции белковых фракций Ig и САЧ, длина волны возбуждения 295 нм. В). Зависимость положения максимума эмиссии флуоресценции смеси Ig и САЧ от соотношения их молярных концентраций. Красной и синей горизонтальными линиями отмечено положение максимумов флуоресценции плазмы крови контрольной группы и онкологических пациентов, соответственно. Зеленой и желтой горизонтальными линиями отмечено положение максимумов флуоресценции САЧ и Ig. Вертикальные линии соответствуют физиологически возможным границам соотношения концентраций САЧ и Ig. Г) Зависимость положения средневзвешенной по интенсивности длины волны в спектре флуоресценции образцов плазмы крови при возбуждении на 295 нм от соотношения концентраций САЧ и Ig, определенная экспериментально на образцах плазмы крови.

Для верификации гипотезы о том, что положение максимума спектра флуоресценции Trp в плазме крови определяется, в основном, соотношением концентраций САЧ и Ig, были проведены дополнительные эксперименты с 6 образцами. Для исследованных образцов были измерены спектры флуоресценции, после чего они были фракционированы с помощью хроматографии, в результате чего для них было известно соотношение концентраций САЧ и Ig.

Как видно из рисунка 5.3Г, в исследованных образцах плазмы крови имеет место тренд к коротковолновому сдвигу спектра флуоресценции T<sub>гр</sub> при росте соотношения концентраций Ig/САЧ.

Таким образом, можно сделать следующие выводы относительно триптофановой флуоресценции плазмы крови:

- 1) 85% интенсивности флуоресценции определяется белками САЧ и Ig, при этом интенсивность флуоресценции САЧ в 5 раз выше, чем у Ig.
- 2) Интенсивность флуоресценции T<sub>гр</sub> статистически значимо повышена в плазме крови онкобольных в сравнении с контрольной группой (рис. 5.2), что может быть связано как с различиями в концентрации белков, так и с их конформационными изменениями
- 3) Спектры флуоресценции плазмы крови онкологических пациентов статистически значимо сдвинуты в синюю область спектра, что может быть связано как с конформационными изменениями белков, так и с изменением соотношения их концентраций. Дополнительные эксперименты показали, что имеет место тренд к коротковолновому сдвигу спектра флуоресценции T<sub>гр</sub> при росте соотношения концентраций Ig/САЧ.

В случае использования более коротковолнового возбуждения, например, 280 нм, в белках возбуждается флуоресценция всех ароматических аминокислот. Несмотря на то, что флуоресценция T<sub>уг</sub> обычно затухает в триптофан-содержащих белках, ее вклад можно выделить с помощью описанной в Главе 2 процедуры. В следующем разделе нами впервые была проанализирована тирозиновая флуоресценция белков плазмы крови и изучена ее ценность для диагностики онкозаболеваний.

### **5.2.3 Тирозиновая флуоресценция белков плазмы крови**

При анализе спектров флуоресценции плазмы крови информативным может являться отношение интегральной интенсивности флуоресценции T<sub>уг</sub> по отношению к T<sub>гр</sub>. Как было показано в Главе 2, при изменении структуры белка (например, при частичной денатурации), сигнал флуоресценции T<sub>гр</sub> обычно снижается, в то время как сигнал флуоресценции T<sub>уг</sub> растёт [282,316], а отношение интенсивностей T<sub>уг</sub>/T<sub>гр</sub> является чувствительным индикатором конформационных изменений.

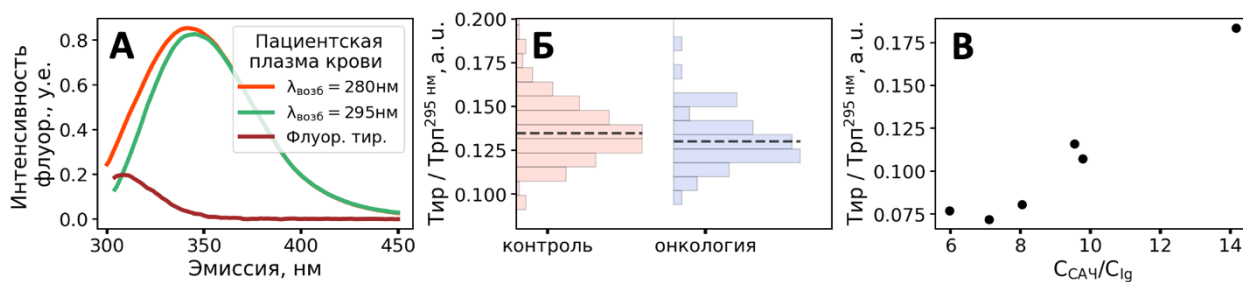


Рисунок 5.4 — А) Нормированные на длинноволновом краю спектры флуоресценции плазмы крови, полученные на длинах волн возбуждения 280 нм (красный) и 295 нм (зеленый). Разностный спектр соответствует флуоресценции Туг. Б) Гистограмма распределения соотношений сигнала тирозиновой к триптофановой флуоресценции для контрольной группы (красный) и онкологических пациентов (синий). В) Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции Туг и Тгр образцов плазмы крови при возбуждении на 295 нм от соотношения концентраций САЧ и Ig.

На рисунке 5.4А продемонстрирован пример выделения флуоресценции Туг как разностного спектра между полосами эмиссии при возбуждении 280 нм (Тгр, Туг) и 295 нм (Тгр). Аналогично процедуре, описанной в Главе 2, таким образом удается получить спектр флуоресценции Туг, форма которого слабо меняется от образца к образцу.

Было установлено, что соотношение сигналов тирозиновой к триптофановой флуоресценции статистически значимо понижено у пациентов с онкозаболеваниями (Рис. 5.4Б). Поскольку, как показано в таблице 2.1, более 80% тирозиновой флуоресценции плазмы крови приходится на САЧ, изменение параметра Туг/Тгр может свидетельствовать о нарушениях конформации САЧ. В то же время, изменение соотношения концентраций САЧ и Ig также может влиять на интенсивность тирозиновой флуоресценции. Представленная на рисунке 5.4В зависимость демонстрирует, что для образцов плазмы крови имеет место корреляция соотношения интенсивностей флуоресценции Туг/Тгр и соотношения концентраций САЧ и Ig, что говорит в пользу доминирующей роли второй из гипотез, изложенных выше.

#### 5.2.4 Флуоресценция плазмы крови в видимой области спектра: роль белков и их химических модификаций

В полном спектре флуоресценции плазмы крови помимо полосы, связанной с УФ флуоресценцией белков, имеется выраженная полоса эмиссии в видимой области спектра. В литературе имеются данные, что за этот сигнал ответственны флуорофоры небелковой природы, находящиеся в плазме крови, например, НАД(Ф)Н. Вторым флуорофором, который может вносить вклад в сигнал эмиссии в видимой области спектра, является билирубин, также присутствующий в плазме крови [443]. В то же время, как было показано в Главах 3 и 4, при окислении белков и ароматических аминокислот у них появляется

флуоресценция в видимом диапазоне, схожая по спектральным свойствам с флуоресценцией плазмы крови. Спектры поглощения и эмиссии указанных флуорофоров приведены на рисунке 5.5.

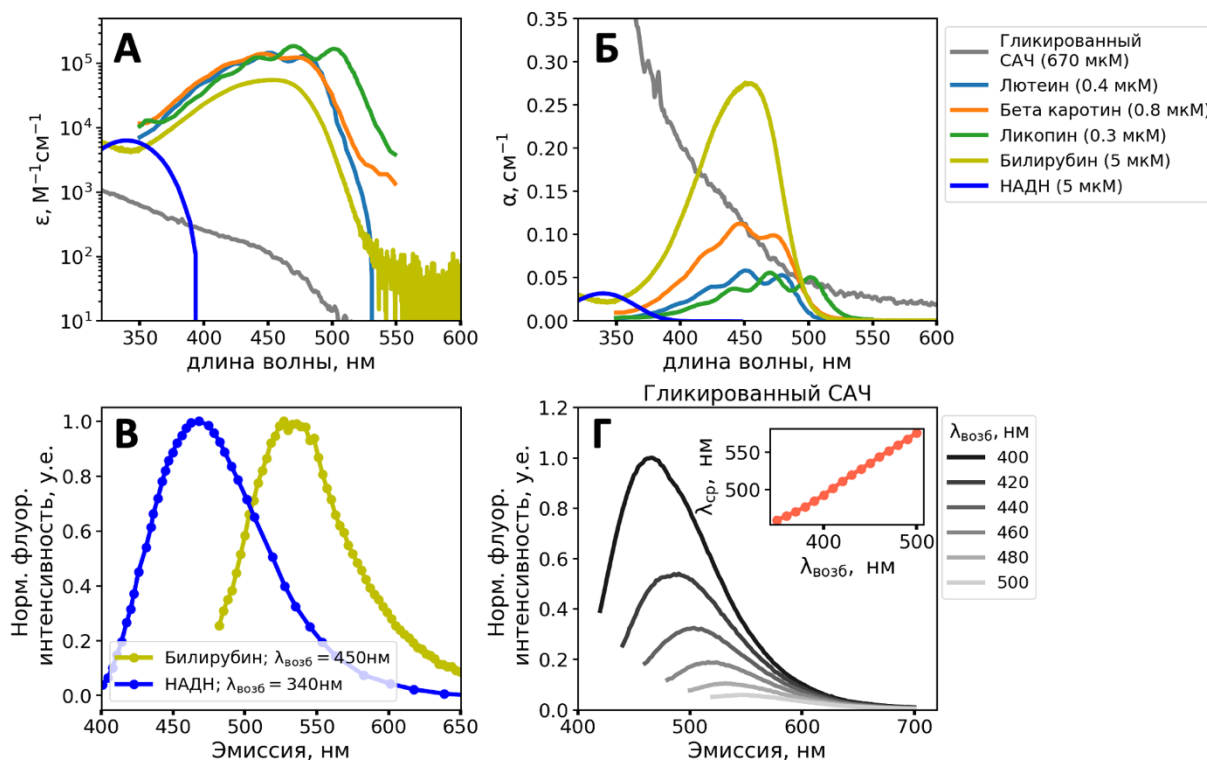


Рисунок 5.5 — А) Спектры молярной экстинкции хромофоров, присутствующих в плазме крови. Б) Спектры поглощения хромофоров, присутствующих в плазме крови, приведенные для их типичных концентраций: каротиноидов (представленных как сумма ликопена (0.3 мкМ), бета-каротина (0.8 мкМ) и лютеина (0.4 мкМ) [444] ), НАДН (5 мкМ [445]) билирубина (10 мкМ) [446]). В) Нормированные спектры флуоресценции НАДН и билирубина. Г) Спектры флуоресценции гликированного САЧ, демонстрирующие типичные для ГСФ свойства: вложенность спектров флуоресценции, зависимость максимума эмиссии от длины волны возбуждения.

Репрезентативная ЕЕМ-матрица плазмы крови представлена на рисунке 5.6А. Для того, чтобы объяснить природу полосы флуоресценции в видимой области спектра, были измерены ЕЕМ-матрицы всех фракций плазмы крови, отобранных при помощи хроматографии (рис. 5.6Б-Е). Было показано, что белки плазмы крови помимо УФ флуоресценции обладают эмиссией в видимой области спектра, при этом >70% от общей флуоресценции плазмы крови в видимом диапазоне спектра (для определенности – при возбуждении на 340 нм) приходится на фракцию САЧ.

Далее нами был исследован механизм формирования флуоресценции в видимой области спектра у белковых фракций плазмы крови. При этом рассматривались две основные гипотезы: (1) сигнал флуоресценции связан с лигандами, образующими комплекс с белками

(НАД(Ф)Н, билирубином), (2) сигнал флуоресценции связан с флуорофорами, образующимися при пост-трансляционных модификациях белков.

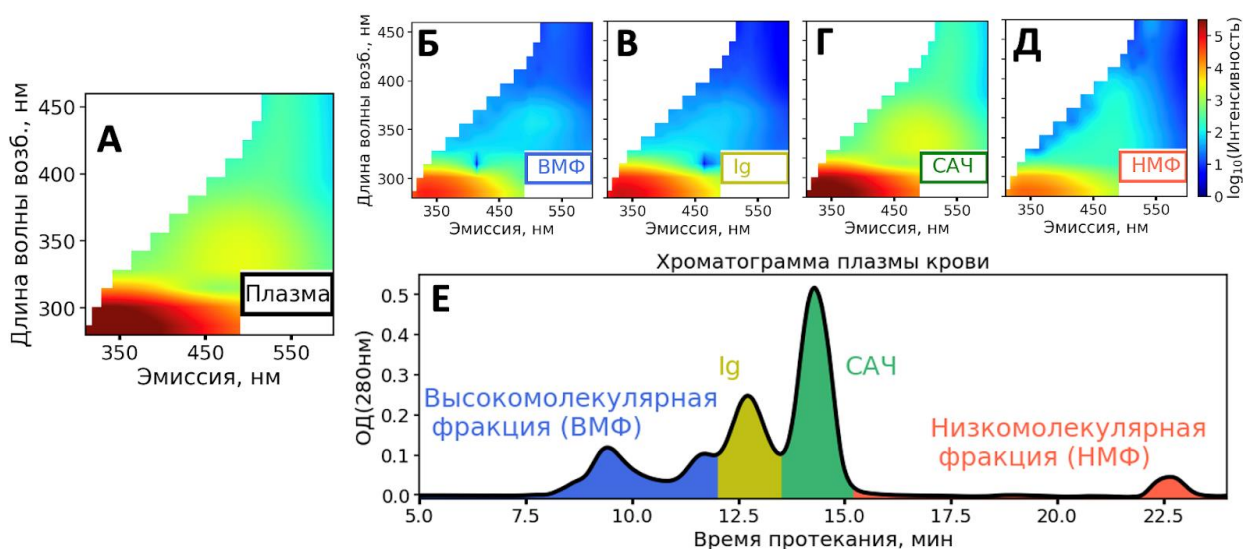


Рисунок 5.6 — EEM-матрицы флуоресценции цельной плазмы крови А) и фракций плазмы: Б) высокомолекулярной фракции (BMF); В) фракции иммуноглобулинов (Ig); Г) фракции сывороточного альбумина человека (САЧ); Д) низкомолекулярной фракции (НМФ). Хроматограмма цельной плазмы крови человека, измеренная при детектировании поглощения на длине волны 280 нм (е).

#### 5.2.4.1 Оценка вклада НАДН в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра

Для оценки возможного вклада во флуоресценцию фракции САЧ плазмы крови связанных им молекул НАД(Ф)Н был проведён равновесный диализ отобранных фракций белка. Результат анализа флуоресценции фракции альбумина, на который приходится >70% флуоресценции плазмы крови при возбуждении на длине волны 340 нм, представлен на рисунке 5.7.

В то время как собственная флуоресценция САЧ после диализа не изменилась (возбуждение 295 нм, Рис. 5.7А), сигнал флуоресценции при возбуждении 340 нм уменьшился на 40% (Рис. 5.7Б). Эти данные позволяют предположить, что альбумин в плазме крови связан лигандом-флуорофором, комплекс с которым распадается при диализе. Измерение флуоресценции на длинах волн >400 нм, то есть в области, где НАД(Ф)Н не поглощает свет, показало, что интенсивность сигнала не претерпевает изменений после диализа (Рис. 5.7В). В совокупности с тем фактом, что спектр возбуждения разностного сигнала флуоресценции фракции альбумина до и после диализа при регистрации сигнала в максимуме эмиссии НАД(Ф)Н (470 нм) совпадает со спектром возбуждения НАДН (Рис. 5.7Г), а форма спектров эмиссии фракции САЧ в диапазоне длин волн возбуждения 320-



380 нм близка к форме спектра возбуждения НАД(Ф)Н (Рис. 5.7Д), можно сделать вывод о вкладе НАД(Ф)Н в флуоресценцию крови в области длин волн возбуждения 320-380 нм.

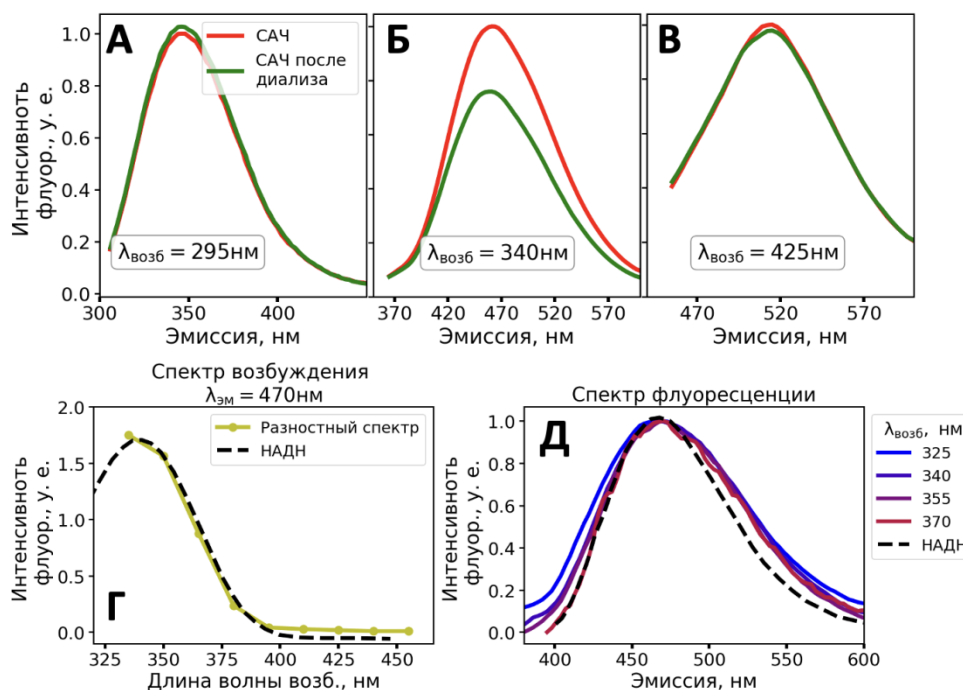


Рисунок 5.7 — Спектры флуоресценции альбумина, выделенного из плазмы крови методом гель-фильтрующей хроматографии, измеренные до (красный) и после (зеленый) диализа при возбуждении на А) 295 нм, Б) 340 нм, В) 425 нм. Г) Спектр возбуждения флуоресценции разностного сигнала альбуминовой фракции до и после диализа (оливковый) и спектр возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н (черная пунктирная линия, взято из [445]). Д) Разностные спектры флуоресценции альбуминовой фракции, измеренные для длин волн возбуждения 325÷370 нм, а также спектр флуоресценции НАД(Ф)Н (взято из [447]).

Поскольку интенсивность полосы флуоресценции в области возбуждения >400 нм практически не изменяется после диализа, и ее источник локализован, главным образом, на САЧ (>70% сигнала), можно предположить, что эмиссия в данном случае связана либо с лигандом-флуорофором, комплекс с которым не распадается при диализе (например, из-за гидрофобности лиганда), либо с пост-трансляционными модификациями белка, обладающими флуоресценцией. Одним из потенциальных гидрофобных лигандов альбумина в плазме крови является билирубин, который обладает поглощением и флуоресценцией в видимой области спектра, и концентрация которого составляет в норме порядка 10 мкМ. В связи с этим далее был исследован вопрос о вкладе билирубина в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра.

#### 5.2.4.2 Оценка вклада билирубина в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра



Для исследования вклада билирубина в оптические свойства плазмы крови была проведена серия измерений образцов плазмы крови, концентрация билирубина в которых определялась независимым стандартным методом с использованием диазотированной сульфаниловой кислоты и образованием азопигмента [443]. Для всех образцов были измерены спектры поглощения в диапазоне длин волн 300-700 нм, полные спектры флуоресценции, а также кинетики затухания флуоресценции с возбуждением на длине волны 405 нм.

Концентрация билирубина в исследованных образцах варьировалась в диапазоне от 3 до 50 мкМ, что при коэффициенте экстинкции  $\varepsilon = 53846 \text{ см}^{-1}\text{М}^{-1}$  (на длине волны 460 нм) соответствует коэффициенту поглощения 0.16-2.69  $\text{см}^{-1}$ . Коэффициент поглощения исследованных образцов плазмы крови варьировался в диапазоне 0.25-3.4  $\text{см}^{-1}$  (Рис. 5.8), соответственно, вклад в них билирубина может быть значительным.

Была проведена процедура неотрицательной матричной факторизации [448] спектров поглощения плазмы крови в области длин волн 350-700 нм, при этом из спектров были восстановлены четыре независимые компоненты, суммой которых можно описать исходные спектры с невязкой 4%. Форма полученных независимых компонент представлена на рисунке 5.8.

Как видно, спектр второй независимой компоненты похож на спектр билирубина, форма спектра третьей компоненты схожа со спектром гемоглобина, который мог в некотором количестве присутствовать в образцах плазмы крови из-за частичного гемолиза эритроцитов. Природа первой и четвертой компонент менее очевидна, однако можно предположить, что четвертая компонента связана со вкладом каротиноидов, о чем можно сделать вывод по характерным для ликопена максимумам в области 500-550 нм, а первая компонента, поглощение которой монотонно спадает с длиной волны, может быть связана с продуктами окисления и/или гликирования белков в плазме крови, а также с рассеянием света в образце. Сопоставление амплитуд компонент, полученных из разложения спектров поглощения, с концентрацией билирубина в образце показало, что амплитуда второй компоненты коррелирует с концентрацией билирубина с коэффициентом корреляции  $r = 0.91$  ( $p < 10^{-4}$ ). Таким образом, было показано, что наличие билирубина дает вклад в поглощение плазмы крови в видимой области спектра, который может достигать 50%. Следующей задачей являлась оценка вклада билирубина в стационарный сигнал флуоресценции при возбуждении на различных длинах волн.

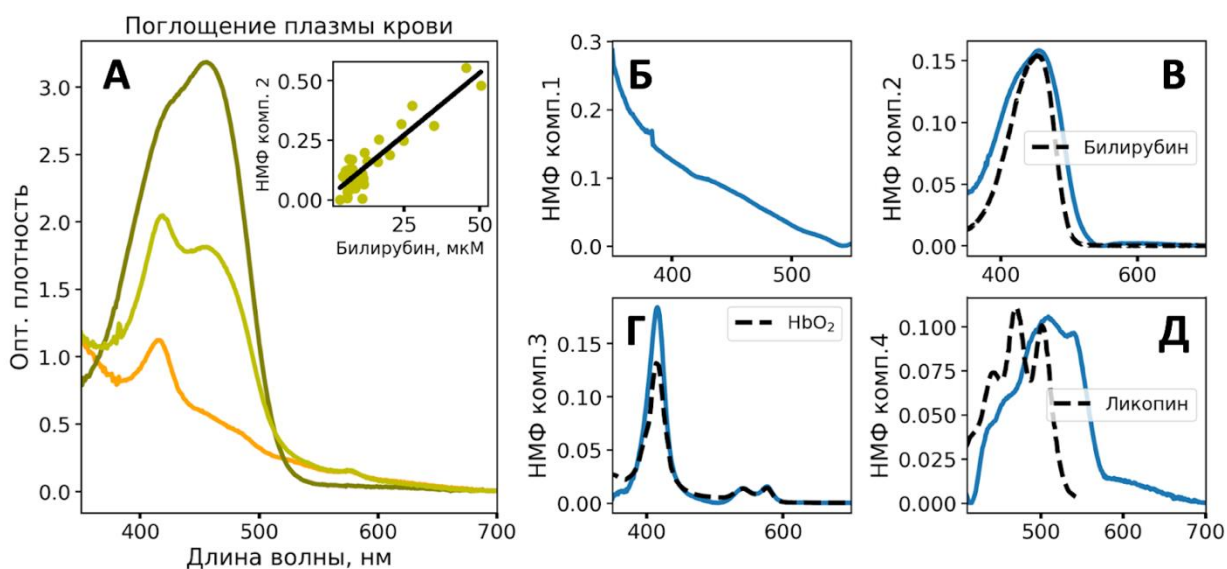


Рисунок 5.8 — А) Репрезентативные спектры поглощения плазмы крови пациентов с различным уровнем билирубина. Вставка: корреляция компоненты 2, полученной методом неотрицательной матричной факторизации (НМФ), с концентрацией билирубина в образцах плазмы крови. Б) Первая компонента, выделенная методом НМФ. В) Вторая компонента НМФ, пунктирной линией показан спектр поглощения билирубина. Г) Третья компонента НМФ, пунктирной линией показан спектр поглощения гемоглобина ( $\text{HbO}_2$ ). Д) Четвертая компонента НМФ, пунктирной линией показан спектр поглощения ликопина.

На рисунке 5.9 приведены репрезентативные спектры флуоресценции плазмы крови, полученные для различных длин волн возбуждения, в присутствии различных концентраций билирубина. Концентрация билирубина в исходном образце плазмы крови определялась независимым методом и составляла 12 мкМ. Как видно, добавление к образцу плазмы крови билирубина в концентрации 10 мкМ заметно влияет на форму и интенсивность спектра флуоресценции.

Как видно из рисунке 5.9 В, добавление билирубина в концентрации 10 мкМ (характерная физиологическая концентрация) к плазме крови (с исходной концентрацией билирубина 12 мкМ) увеличивает ее флуоресценцию на ~15% на длине волны возбуждения 400 нм и на >70% на длине волны возбуждения 460 нм (в максимуме возбуждения билирубина). При этом если детектировать сигнал на коротковолновом краю спектра флуоресценции (например, в диапазоне 460-500 нм), аналогичный рост сигнала составляет <5% на длине волны возбуждения 400 нм и на ~20% на длине волны возбуждения 460 нм (Рис. 5.10). Для оценки концентрации билирубина в плазме крови можно использовать как интенсивность сигнала флуоресценции плазмы крови, так и форму спектра флуоресценции. Поскольку при возбуждении на длинах волны 400-450 нм максимум в спектре флуоресценции билирубина находится в области 520 нм, а максимум флуоресценции плазмы крови при низкой (<5 мкМ) концентрации билирубина расположен в районе 470 нм, увеличение концентрации билирубина приводит к сдвигу «центра масс» спектра, что представлено на рисунке 5.10А.

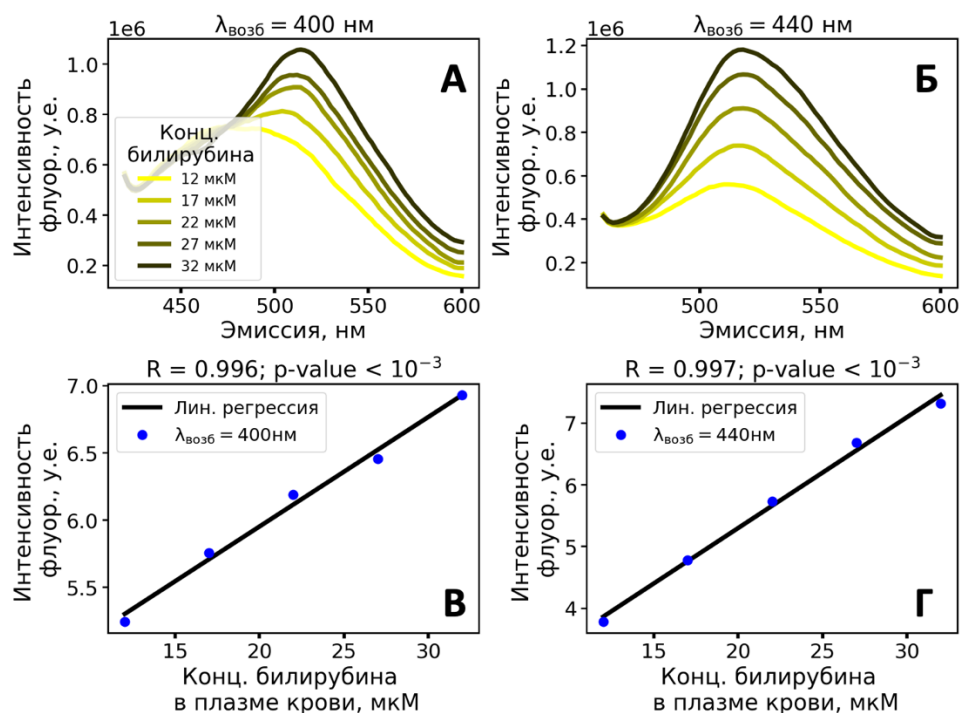


Рисунок 5.9 — А,Б) Репрезентативные спектры флуоресценции плазмы крови, полученные для длин волн возбуждения 400 нм (А) и 440 нм (Б), в присутствии различных концентраций билирубина. В,Г) Зависимость интегральной по спектру интенсивности флуоресценции плазмы крови от концентрации добавляемого к ней билирубина для длин волн возбуждения В) 400 нм и Д) 440 нм.

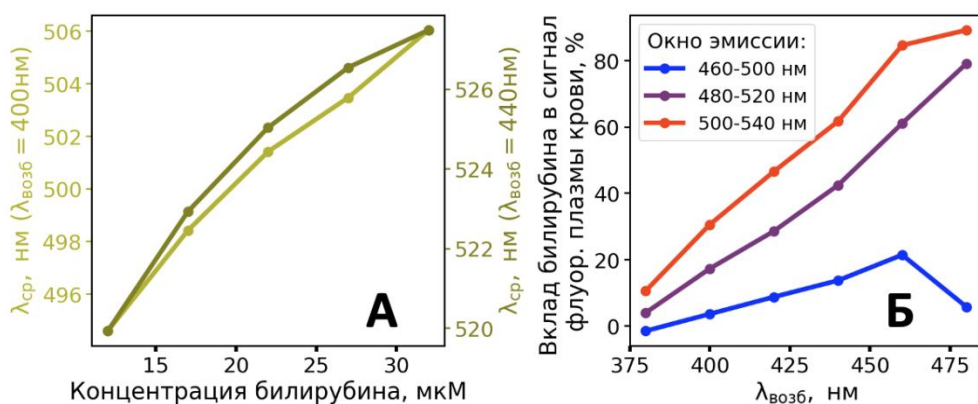


Рисунок 5.10 — А) Зависимость положения средней длины волны флуоресценции  $\lambda_{\text{ср}}$  на длинах волн возбуждения 400 и 440 нм от концентрации билирубина в плазме крови. Б) Зависимость оценки вклада 10  $\mu\text{M}$  билирубина в суммарный сигнал плазмы крови в различных спектральных окнах эмиссии.

Для дальнейшей оценки вклада билирубина в оптические свойства плазмы крови были выполнены эксперименты с использованием кинетической флуориметрии с субнаносекундным временным разрешением. Возбуждение осуществлялось на длине волны 405 нм, регистрация производилась в спектральном диапазоне 480-520 нм.

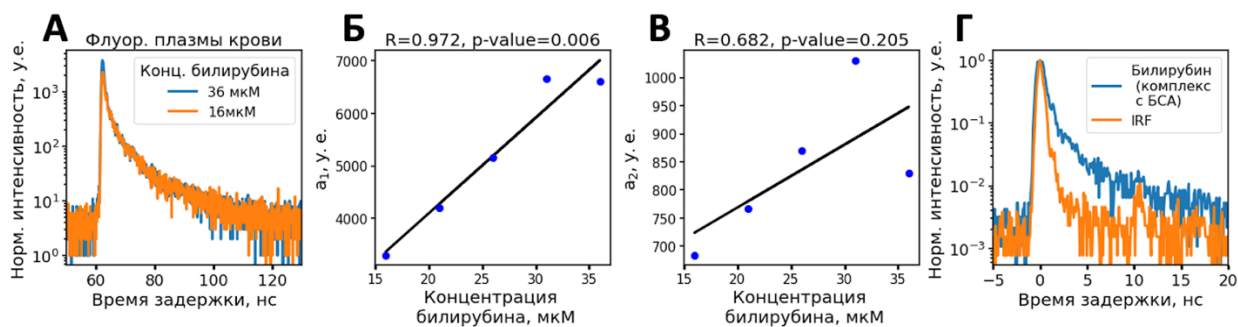


Рисунок 5.11 — А) Кинетика затухания флуоресценции образца плазмы крови (16 мкМ билирубина) до (оранжевый) и после (синий) добавления к нему билирубина в концентрации 20 мкМ. Б) Зависимость амплитуды первой компоненты со временем затухания  $\sim 500$  пс от концентрации билирубина в образце плазмы крови. В) Зависимость амплитуды второй компоненты со временем затухания  $\sim 2$  нс от концентрации билирубина в образце плазмы крови. Г) Кинетика флуоресценции комплекса билирубина с БСА (синяя кривая) и аппаратная функция установки (IRF, instrument response function, оранжевая кривая).

Кинетика затухания флуоресценции плазмы крови наилучшим образом аппроксимировалась трехэкспоненциальным затуханием с временами компонент 0,5, 2 и 8 нс. Было измерено затухание флуоресценции того же образца при добавлении к нему различных концентраций билирубина (Рис. 5.11А). Показано, что время жизни первой компоненты в кинетике затухания плазмы крови близко к времени затухания флуоресценции билирубина в комплексе с альбумином (Рис. 5.11 Б), при этом ее амплитуда линейно коррелирует с концентрацией билирубина в образце. Более того, вклад первой компоненты в интегральный сигнал флуоресценции соответствует вкладу билирубина, оцененному из стационарных флуоресценции. Так, в спектральном диапазоне 480-520 нм добавление к образцу плазмы крови билирубина в концентрации 10 мкМ интенсивность флуоресценции возрастает на  $\sim 17\%$  (Рис. 5.11), а вклад компоненты со временем жизни  $\sim 500$  пс  $\alpha = \frac{a_1 \tau_1}{\sum a_i \tau_i}$  – на 20%.

Далее были измерены кривые затухания флуоресценции плазмы крови на разных длинах волн эмиссии, и полученный набор кинетик был аппроксимирован суммой трех спектральных компонент  $S_i(\lambda_{эм})$ , обладающих временами жизни  $\tau_i$ :

$$S(\lambda, t) = \sum_i S_i(\lambda) \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right). \quad (5.1)$$

Результаты анализа представлены на рисунке 5.12. Компоненте со временем затухания 500 пс соответствует спектр с максимумом на 520 нм, близкий к спектру эмиссии билирубина, тогда как двум другим компонентам соответствуют спектры с максимумом в области 470 нм. Таким образом, показано, что быстрая компонента в кинетике затухания флуоресценции плазмы крови полностью обусловлена наличием в ней билирубина, а ее амплитуда коррелирует с концентрацией билирубина в образце. В то же время вклад

билирубина в сигнал флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 400 нм и регистрации на синем краю спектра (460-500 нм, Рис. 5.11) при физиологической концентрации (<20 мкМ) составляет менее 10%, а две длинные компоненты в кинетике затухания флуоресценции не связаны с билирубином. Данные факты свидетельствуют о наличии других флуорофоров (отличных от НАДН и билирубина), локализованных в плазме крови на альбумине. Как было показано в предыдущей Главе, в результате пост-трансляционных модификаций белков – окисления и гликирования – образуется ГСФ, флуоресценцию которых можно возбудить в видимой области спектра. Далее была рассмотрена гипотеза о роли таких флуорофоров в формировании оптических свойств плазмы крови.

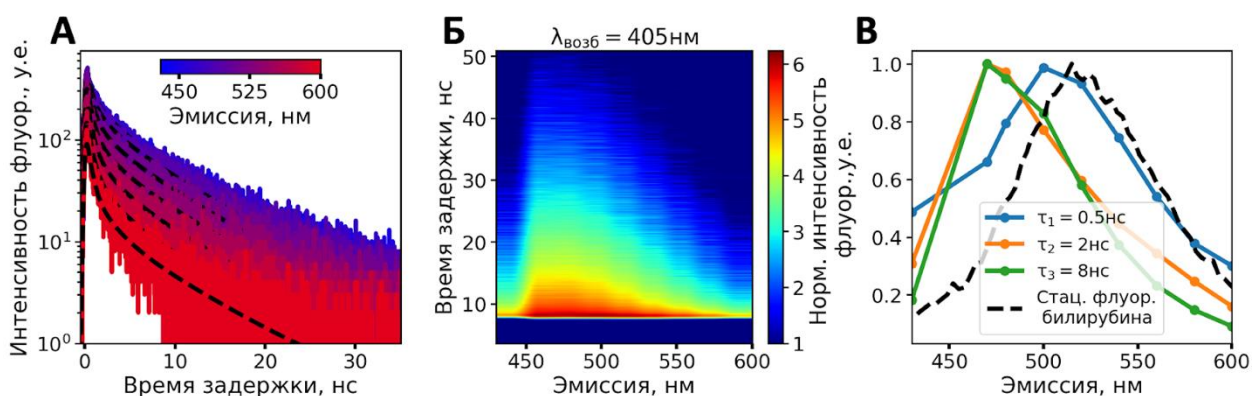


Рисунок 5.12 — А) Кинетики затухания флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 405нм для разных длин волн эмиссии. Б) Двумерная карта зависимости интенсивности флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 405нм от времени и длины волны эмиссии. В) Спектры флуоресценции, соответствующие компонентам с временами 0.5, 2 и 8 нс в кинетике затухания флуоресценции плазмы крови. Длина волны возбуждения 405 нм, сигнал флуоресценции детектировался в спектральном окне 480-520 нм.

#### 5.2.4.3 Оценка вклада ГСФ, связанных с пост-трансляционными модификациями белков, в формирование флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра

Для спектров флуоресценции как плазмы крови (Рис. 5.6А), так и альбуминовой фракции до и после диализа (Рис. 5.6Г) для длин волн возбуждения >400 нм (т.е. когда флуоресценция НАДН не возбуждается, а вклад билирубина не превышает 20% при концентрациях <20 мкМ) наблюдается монотонное уменьшение интенсивности и квантового выхода флуоресценции, а также длинноволновый сдвиг флуоресценции с ростом длины волны возбуждения (что, иногда, называют эффектом “вложенности” спектров флуоресценции [393,449]), характерным для ГСФ. Данные факты свидетельствуют в пользу того, сигнал флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра частично связан с пост-трансляционными модификациями белков, прежде всего, альбумина. Указанная зависимость представлена дополнительно на рисунке 5.13А.

Для дополнительного подтверждения того, что флуоресценция плазмы крови при возбуждении в области длин волн более 400 нм связана с флуоресценцией ГСФ, образующихся при модификациях альбумина, были проведены эксперименты с использованием время-разрешенной флуориметрии. Была измерена кинетика анизотропии флуоресценции цельной плазмы крови при возбуждении на 405 нм (Рис. 5.13 Б), из времени затухания которой ( $28.3 \pm 1.3$  нс) в предположении о деполяризации флуоресценции за счет вращательной диффузии можно оценить радиус гирации флуорофора как  $R = 5.4 \pm 0.4$  нм. Данная величина близка к радиусу альбумина, таким образом, можно предположить, что флуорофоры, ответственные за эмиссию плазмы крови в видимой области спектра, будучи, как показано выше, локализованы на альбумине, вращаются с ним в растворе как одно целое, а электронное взаимодействие между ними мало, т.к. отсутствует деполяризация флуоресценции на малых временах.

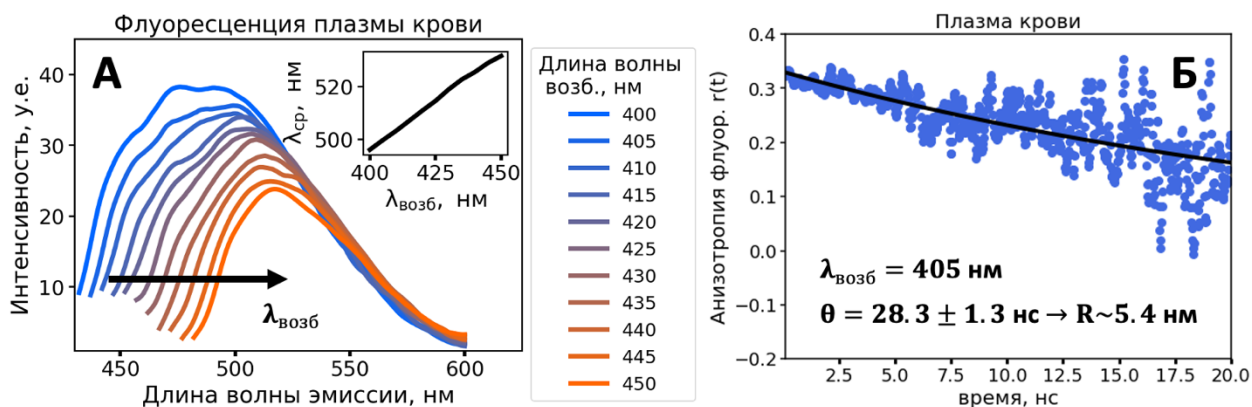


Рисунок 5.13 — А) Спектры флуоресценции плазмы крови при возбуждении  $>400$  нм. Б) Кинетика затухания анизотропии флуоресценции плазмы крови. Длина волны возбуждения 405 нм, сигнал флуоресценции детектировался в спектральном окне 480-520 нм.

Далее для количественной характеристики эффекта “вложенности” спектров флуоресценции (Рис. 5.13, 5.14), была рассмотрена зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны накачки. Вид такой зависимости для флуоресценции плазмы крови контрольной группы и пациентов с онкозаболеванием представлен на рисунке 5.14Б. Как видно, наклон приведенных зависимостей, рассчитанный как отношение интегральных интенсивностей при возбуждении на длинах волн 420 и 440 нм ( $O_{\lambda 420}/O_{\lambda 440}$ ), отличается – интенсивность флуоресценции для контрольной группы быстрее спадает с длиной волны.



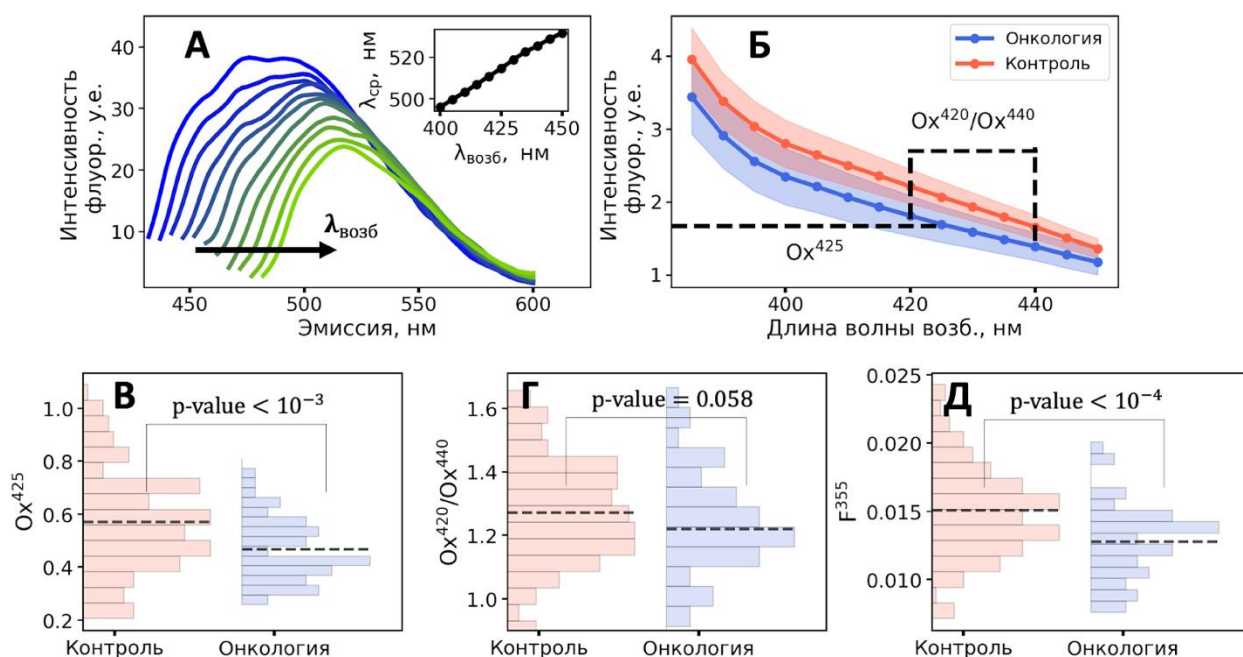


Рисунок 5.14 — А) Спектры флуоресцентного отклика репрезентативного образца плазмы крови для длин волн возбуждения 400–450 нм. На вставке показана зависимость положения максимума спектра флуоресценции от длины волны возбуждения. Б) Зависимость интенсивности флуоресценции плазмы крови от длины волны возбуждения в диапазоне 340÷450 нм для контрольной группы (красный) и онкологических пациентов (синий). Распределение параметров, характеризующих полосу флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра: В)  $\text{OX}^{425}$ , Г)  $\text{OX}^{420}/\text{OX}^{440}$ , Д)  $F_{355}$ . Пунктирные линии соответствуют средним значениям параметров для контрольной группы и онкологических пациентов.

Дополнительно для характеристики спектральных свойств флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра были использованы следующие параметры. Во-первых, была оценена интенсивность флуоресценции при возбуждении на длине волны 425 нм, связанной с формированием гетерогенных систем флуорофоров в результате химических модификаций белков ( $\text{OX}^{425}$ ). Во-вторых, была оценена интенсивность флуоресценции при возбуждении на длине волны 355 нм – данный сигнал связан одновременно с эмиссией НАД(Ф)Н и химических модификаций белков. В-третьих, оценивалось соотношение интенсивности флуоресценции при возбуждении на 420 и 440 нм ( $\text{OX}^{420}/\text{OX}^{440}$ ) как дескриптор спектральных свойств гетерогенной системы флуорофоров белков плазмы крови. Как видно на рисунках 5.14В-Д, все указанные дескрипторы статистически значимо понижены у пациентов с онкологическим заболеванием.

Таким образом, было впервые показано, что сигнал флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра определяется, в том числе, не наличием в ней флуорофоров небелковой природы, НАД(Ф)Н и билирубина, а белками и флуорофорами, связанными с продуктами их химической модификации. Показано, что 70% флуоресценции плазмы крови

при возбуждении на длине волны 340 нм связано с альбумином, и 40% из них пропадает после диализа и связано с лигандом, предположительно, НАД(Ф)Н. При возбуждении на длине волны >400 нм также 70% флуоресценции плазмы крови связано с альбумином, и данная флуоресценция САЧ не уменьшается после диализа.

### 5.2.5 Классификационный анализ данных по флуоресценции плазмы крови

Для демонстрации диагностической значимости обсужденных выше параметров флуоресценции плазмы крови, определяющихся флуоресценцией белков, был построен классификатор, диагностирующий наличие злокачественной опухоли. В качестве признаков для классификации были выбраны следующие параметры:

- 1) Интегральный сигнал флуоресценции при возбуждении на 295нм и эмиссии в регионе 310-500нм – данный сигнал ассоциирован с сигналом автофлуоресценции триптофана –  $\text{Trp}^{295}$ .
- 2) Отношение сигнала флуоресценции тирозина к флуоресценции триптофана –  $\text{Tyr}/\text{Trp}^{295}$ .
- 3) Положение максимума полосы флуоресценции  $\text{Trp}$  –  $\lambda^{\text{Trp}}$ . Ввиду того, что спектральное разрешение в области эмиссии составляет 1нм, вариабельность и количество уникальных значений данного признака мало. Чтобы преодолеть эту проблему, был реализован следующий подход – для каждого пациента вычислялись положение пика флуоресценции триптофана при возбуждении в диапазоне 270÷295 нм с последующим усреднением этих значений.
- 4) Интегральная интенсивность флуоресценции, ассоциированной с продуктами окисления альбумина, рассчитанная в спектральном диапазоне 450-600 нм при возбуждении на 425нм –  $\text{Ox}^{425}$ .
- 5) Отношение интегральных значений интенсивности флуоресценции, связанной с продуктами окисления альбумина, вычисляемых в диапазоне 450-600 нм при возбуждении на 420 нм и 450нм –  $\text{Ox}^{425}/\text{Ox}^{450}$ .
- 6) Интенсивность флуоресценции, определяющаяся суммой сигналов флуоресценции НАД(Ф)Н и продуктов окисления белков, рассчитанная как интеграл в области длин волн 450-500нм при возбуждении на 340 нм, отнесенный к сигналу флуоресценции триптофана ( $\text{Trp}^{295}$ ) –  $F^{350}$ .

Для каждого образца из открытого набора ЕЕМ-матриц флуоресценции [429] были рассчитаны вышеуказанные признаки. Далее для регуляризации работы классификатора данные были отфильтрованы от выбросов согласно процедуре интерквартильного диапазона, описанной в [450]. После фильтрации данных в выборке осталось 243 пациента:



185 в контрольной группе и 58 в группе с патологией. Данные были разделены на тренировочный и тестовый наборы в соотношении 2/3 и 1/3 от исходного объема выборки, соответственно. Тренировочный набор использовался для подбора параметров модели классификации, на тестовом множестве окончательно верифицировалось качество классификации.

Все алгоритмы машинного обучения были реализованы при помощи библиотеки sklearn на языке программирования Python 3. В качестве алгоритма классификации в данной работе использовался случайный лес [451]. После подбора наиболее оптимальных параметров на тренировочных данных методом поиска на регулярной сетке параметры модели случайного леса оказались следующими:

- количество деревьев – 300;
- минимальное число образцов для сплита в дереве – 12;
- минимальное число образцов в листе дерева – 7;
- каждый образец был сбалансирован весами, пропорционально числу образцов в классе 0 и классе 1 соответственно;
- максимальная глубина дерева – 8;
- для сплита в дереве использовался критерий Джини.

С целью оценки качества работы бинарного классификатора (наличие/отсутствие злокачественных образований), в данной работе использовались такие метрики как чувствительность, специфичность и точность. Также была рассчитана ROC-кривая и соответствующая численная характеристика ROC AUC как площадь под ROC-кривой. При помощи метода перебора находились оптимальные параметры по ROC AUC на кросс-валидации [452] (количество подвыборок = 5). После обучения модели на тренировочных данных находился оптимальный порог принятия решения отнесения объекта к классу с меткой «0» и «1» по тренировочным данным. Также модель была охарактеризована при помощи кросс-валидации на тренировочных данных (количество разбиений было равно 5), при помощи которой были рассчитаны средние значения метрик качества работы классификатора и их среднеквадратичные отклонения. Результаты оценки работы классификатора на тестовых данных представлены в таблице 5.2, а также на рисунке 5.15.

Таблица 5.2 – Результаты оценки работы классификатора на тренировочных и тестовых данных.

	Чувствительность	Специфичность	Точность	ROC-AUC
--	------------------	---------------	----------	---------

Тренировочная выборка	$0.83 \pm 0.07$	$0.818 \pm 0.024$	$0.821 \pm 0.018$	$0.82 \pm 0.03$
Тестовая выборка	0.823	0.813	0.815	0.818

ROC-кривая для обученной модели представлена на рисунке 5.15Б. Для оценки значимости признаков классификатора были применены два подхода – расчёт взаимной информации [453] признака с целевой переменной (наличие/отсутствие рака) и оценка важности признака с точки зрения обученной модели случайного леса (рис. 5.15А) – как видно, все предложенные дескрипторы содержат независимую информацию и важны для построения классификационной модели.

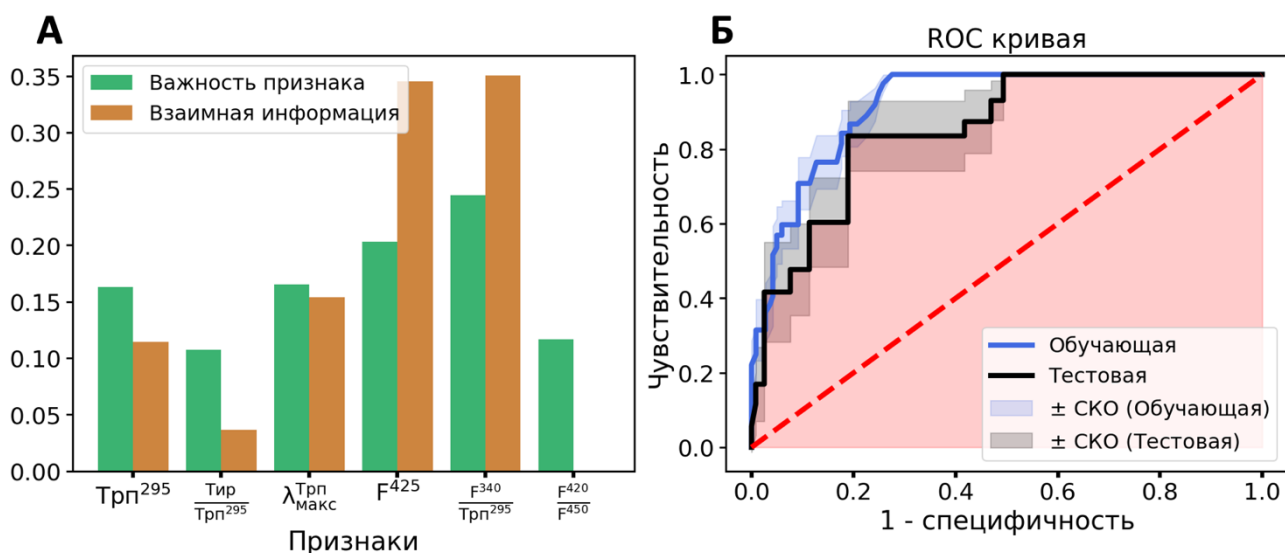


Рисунок 5.15 — А) Оценка значимости выбранных признаков с точки зрения точности работы классификатора. Б) ROC-кривая для тестовой и обучающей выборок как метрика оценки качества работы классификатора.

## Выводы

Белковые молекулы и пептиды являются неотъемлемыми компонентами биожидкостей и клеток, а их флуоресценция может служить индикатором патологических процессов. Как было показано в данной Главе, в автофлуоресценции белков можно выделить три компоненты – флуоресценцию Трп, Тур, а также сигнал, связанный с пост-трансляционными модификациями белков. Помимо этого, на оптические свойства системы влияют молекулы-хромофоры, которые могут находиться с белками в комплексе – в случае плазмы крови это каротиноиды, билирубин и порфирины. В данной Главе в разделе 5.2 был проведен систематический анализ механизмов формирования и вариабельности белковой флуоресценции в плазме крови, на основе чего была предложена классификационная

модель, позволяющая разделять образцы пациентов контрольной группы и пациентов с онкологическими заболеваниями.

Флуоресценция Tgr является наиболее широко используемым индикатором для обнаружения конформационных изменений белков и количественной оценки межмолекулярных взаимодействий (подробно этот вопрос освещался в Главе 2). Несмотря на чувствительность интенсивности флуоресценции и формы полос Tgr к микроокружению в модельных экспериментах, в том числе, в случае САЧ, их вариабельность в плазме достаточно мала (рис. 5.2). Так, у больных с колоректальным раком по сравнению с контрольной группой наблюдалось небольшое (~ 1 нм) синее смещение и увеличение средней интенсивности флуоресценции Tgr на ~ 10%, что согласуется с предыдущими работами [434,435].

Флуоресценция Tug является менее популярным, но перспективным индикатором, используемым в модельных экспериментах с белками, и, насколько нам известно, она никогда не оценивалась для плазмы крови. Как было показано в Главе 2, отношение интенсивности флуоресценции Tug к Tgr может служить чувствительным дескриптором конформационных изменений белка. Флуоресценция Tug в плазме крови связана, в основном, с САЧ (>80%, таблица 5.1, рис. 5.3), и незначительно (<5%) понижена у онкологических больных.

Наибольший интерес с точки зрения различий между контрольной группой и пациентами с онкозаболеванием представляет сигнал автофлуоресценции плазмы крови в видимой области спектра. Как было обсуждено в данном разделе, вклад в этот сигнал могут вносить несколько флуорофоров: НАДН, билирубин и пост-трансляционные модификации белков, связанные с процессами неэнзиматического гликирования и окисления. Анализ флуоресценции фракций плазмы крови позволил установить, что 70% эмиссии локализовано на альбумине, причем после диализа часть сигнала (возбуждение в области 320-380 нм) уменьшается за счет удаления из белка НАДН, а часть сигнала (>400 нм) остается неизменной. Факты наличия у этой флуоресценции эффекта вложенности спектров и времени деполяризации флуоресценции, совпадающего с временем вращательной анизотропии альбумина, говорят в пользу гипотезы о роли ГСФ в структуре белка в формировании флуоресценции плазмы крови в видимой области спектра.

Используя параметры флуоресценции плазмы крови, связанные с белковыми молекулами в ее составе, была получена точность классификации образцов пациентов с колоректальным раком 82%. Хотя в некоторых работах [439,441] на тех же данных получались и более высокие значения точности классификации, использованные там модели работают по принципу «чёрного ящика», то есть, выявить и интерпретировать результаты

классификации не всегда представляется возможным ввиду сложности архитектуры нейронных сетей или входных признаков модели. Это обстоятельство сильно ограничивает применимость такого метода диагностики для трансляции в клиническую практику. В данной работе в качестве диагностических предикторов было предложено использовать физически осмысленные параметры, которые могут быть интерпретированы в терминах окислительного/конформационного состояния белков плазмы крови.

## Глава 6. Исследование капилляров кожи и перикапиллярной области методом ДФТ-FLIM

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A22-A26].

### 6.1 Введение и постановка задачи

В связи со своей доступностью для измерений и сравнительно малой глубиной проникновения оптического излучения в биологические ткани кожа является одним из основных объектов исследования *in vivo* для биофотоники. В то же время структура кожи такова, что множество клинически важных биохимических и физиологических процессов протекает в ее поверхностном слое толщиной в сотни микрон, что определяет широкий спектр применения оптической спектроскопии и микроскопии в исследовании патофизиологии кожи.

Структурно кожа состоит из эпидермиса, дермы и подкожной жировой ткани (гиподермы) (рисунок 6.1). Дерма, в свою очередь, состоит из двух слоёв – папиллярного и ретикулярного. Папиллярная дерма – это внешний слой дермы, который расположен сразу за базальной мембраной и характеризуется наличием сосочков (лат. *papilla* – сосок), которые за счет «холмистого» рельефа значительно увеличивают площадь поверхности между дермой и эпидермисом и способствуют обмену кислорода, питательных веществ и продуктов метаболизма между этими слоями.

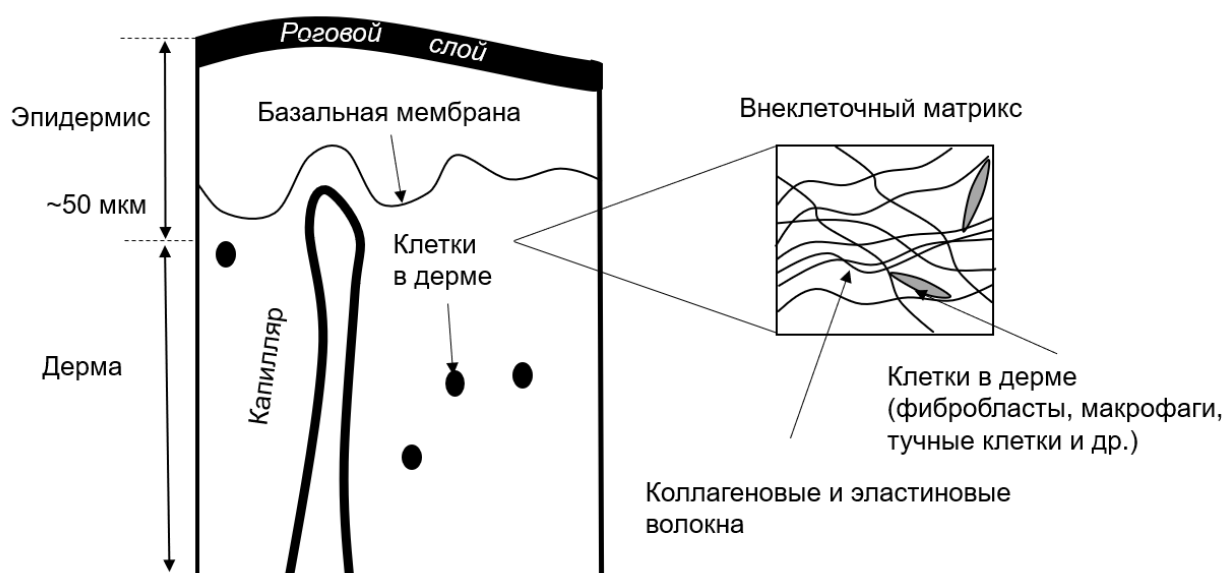


Рисунок 6.1 — Схема строения верхних слоёв кожи: продольное сечение (слева) и поперечное сечение на уровне дермы (справа).

Папиллярная дерма имеет сложную структуру, в ней находятся кровеносная и лимфатическая сеть, окруженная тучными и стволовыми клетками, фибробластами, макрофагами. Клетки дермы находятся внутри внеклеточного матрикса, состоящего из

связывающих воду гликозамингликанов и белков – в основном, коллагенов типа I и III и эластина. Как будет показано ниже, большинство работ с использованием методов оптической микроскопии посвящено исследованию эпидермиса, тогда как в данной работе основные объекты изучения будут локализованы в дерме.

Для диагностики кожи и связанных с кожей патологий клинически чаще всего используются инвазивные методы, часто применяется биопсия тканей для проведения гистологических исследований. Гистологическое исследование является «золотым стандартом» диагностики кожных заболеваний, требующим при этом выполнения технически сложных, длительных и трудозатратных анализов. Существование большого количества социально значимых болезней, связанных с соединительной тканью, выступает мотивирующим фактором для разработки неинвазивных высокочувствительных методов диагностики структурных параметров кожи.

В этой связи развиваются оптические методы *in vivo* диагностики, позволяющие проводить изучение процессов в организме на молекулярном и клеточном уровнях. К таким методам можно отнести оптическую когерентную томографию (уже имеющую ряд клинических приложений), лазерную сканирующую микроскопию (имеет клинические применения в дерматологии), оптоакустические методы диагностики, спектроскопию КР, Фурье-спектроскопию инфракрасного диапазона (FTIR), спектроскопию диффузного отражения, спектроскопию флуоресценции, двухфотонную томографию (ДФТ) с визуализацией времени затухания флуоресценции (FLIM). Благодаря развитию данных методик за последние 10-15 лет результаты, получаемые оптическими методами, по чувствительности и специфичности стали сравнимы с результатами гистологических исследований, что позволило говорить о концепции неинвазивной оптической биопсии.

Спектроскопические методы, такие как ИК-спектроскопия ближнего диапазона, спектроскопия диффузного отражения и мультиспектральный анализ, могут быть использованы для получения информации о молекулярном составе *in vivo*, но эти методы обладают сравнительно низким пространственным разрешением ( $> 10$  мкм), что не позволяет визуализировать клетки. Проведение структурного анализа различных слоёв кожи на молекулярном уровне неинвазивно и *in vivo* возможно с использованием спектроскопии комбинационного рассеяния, FTIR и ДФТ-FLIM.

Спектроскопия комбинационного рассеяния и Фурье-спектроскопия ИК диапазона чувствительны к химическому составу исследуемых веществ, благодаря чему их использование широко распространено для анализа тканей и, в частности, кожи, и, потенциально, данные методики могут быть реализованы в виде микроскопии для *in vivo* визуализации тканей. Первое ограничение в использовании КР-спектроскопии и FTIR

заключается в высоком времени накопления сигнала. Вторым лимитирующим фактором является малая глубина зондирования этих методов:  $\approx 100$  мкм и  $\approx 20$  мкм для КР-спектроскопии и FTIR спектроскопии, соответственно (для неповрежденной кожи без дополнительных воздействий на роговой слой). Третьим ограничением является низкое латеральное разрешение, которое играет важную роль в визуализации представляющих интерес участков кожи.

Метод ДФТ отличается от упомянутых выше методов высокой скоростью получения 2D и 3D снимков кожи (1 кадр в секунду) с субклеточным ( $\leq 1$  мкм) разрешением и глубиной детектирования до 300 мкм (также для неповрежденной кожи без дополнительных воздействий на роговой слой). Непрерывный *in vivo* скрининг областей с размерами порядка  $500 \times 500$  мкм позволяет производить быстрый поиск интересующих областей. Метод визуализации времени жизни флуоресценции, FLIM, способен при определенных условиях предоставить информацию о молекулярном составе исследуемых тканей, поскольку различные молекулы характеризуются различными временами жизни флуоресценции, зависящими как от типа излучающих молекул, так и от их ближайшего микроокружения.

Целью этой и последующей глав является решение задач визуализации и анализа структур в дерме с использованием эндогенного контраста и метода ДФТ-FLIM. Так, в разделе 6.2 рассмотрен вопрос о возможности визуализации микрососудов (капилляров) с помощью ДФТ и эндогенного контраста. Показано, что капилляры могут быть визуализированы по сигналу эндогенной флуоресценции с быстрым ( $< 150$  пс) затуханием флуоресценции. Механизм формирования данного сигнала рассмотрен в разделе 6.3, где показано, что он является следствием образования флуоресцентных фотопродуктов при измерении гемоглобина. В разделе 6.2 также рассмотрены флуоресцентные свойства компонентов крови, отличных от эритроцитов, а именно, плазмы крови при двухфотонном возбуждении и лейкоцитов при однофотонном возбуждении – показано, что с использованием только сигнала автофлуоресценции возможна классификация лейкоцитов по субпопуляциям. Далее, в разделе 6.4 с использованием подхода к визуализации капилляров, предложенного в разделе .2, исследуется вопрос о свойствах области в коже вокруг капилляров – периваскулярной зоны. Показано, что геометрические свойства периваскулярной зоны являются маркером степени тяжести сердечной недостаточности. Такому изменению геометрии сопутствует изменение размера эпидермиса при отежном синдроме, сопровождающем сердечную недостаточность.

## 6.2 Визуализация микрососудов в дерме методом ДФТ-FLIM

### 6.2.1 Основы метода двухфотонной микроскопии

Методы оптической микроскопии, которые используют однофотонные (линейные по напряженности электромагнитного поля) процессы для создания контраста, не применимы для визуализации глубоких слоев тканей: четкие изображения могут быть получены лишь вблизи поверхности, поскольку в более глубоких слоях превалирует эффект многократного рассеяния света, из-за чего теряется контраст изображения [480]. Методы нелинейной оптической микроскопии обладают рядом свойств, которые делают их подходящими для визуализации с высоким разрешением в тканях на глубинах более 500 мкм (при выполнении ряда условий) [456].

Основными наблюдаемыми и используемыми в микроскопии нелинейными оптическими эффектами являются: процессы генерации второй (ГВГ,  $\hat{\chi}^{(2)}$ ) и третьей (ГТГ,  $\hat{\chi}^{(3)}$ ) гармоник, процесс двухфотонного (ДФ) возбуждения флуоресценции ( $\hat{\chi}^{(3)}$ ), процесс когерентного антистоксового рассеяния света (КАРС,  $\hat{\chi}^{(3)}$ ) [455]. В контексте обсуждаемых далее результатов нас будет интересовать сигнал двухфотонной флуоресценции и ГВГ.

Двухфотонное возбуждение флуоресценции – это нелинейный эффект третьего порядка, заключающийся в “одновременном” (время взаимодействия  $\sim 0.5$  фс) поглощении двух фотонов накачки молекулой вещества и последующей эмиссии флуоресценции [481]. При этом флуоресценция – это всегда однофотонный процесс, и спектральные, и временные характеристики сигнала флуоресценции при многофотонном поглощении не должны отличаться от флуоресценции, индуцируемой однофотонно. Квантово-механическое описание процесса ДФ поглощения дано в литературе [459].

Процесс двухфотонного поглощения можно представить так: “первый” из пришедших фотонов падающего излучения может перевести молекулу вещества из основного состояния  $g$  в некоторое виртуальное состояние  $v$ , после чего “второй” фотон может перевести молекулу из виртуального возбужденного состояния в реальное возбужденное состояние  $e$ . Таким образом, интенсивность двухфотонно возбуждаемой флуоресценции  $I_{TPEF}$  будет пропорциональна квадрату интенсивности накачки  $I_p$  и сечению ДФ поглощения  $\sigma^{(2)}$ :

$$I_{TPEF} \sim \sigma^{(2)} I_p^2. \quad (6.1)$$

Сечение ДФ поглощения, имеющего размерность  $\text{см}^4 \cdot \text{с}$ , можно оценить как:

$$\sigma^{(2)} \sim \sigma_{gv}^{(1)} \sigma_{ve}^{(1)} \tau_v, \quad (6.2)$$



где  $\sigma_{gv}^{(1)}, \sigma_{ve}^{(1)}$  – сечения однофотонных поглощений, характерное значение которых составляет  $10^{-17} \div 10^{-16}$  см<sup>2</sup>, а  $\tau_v$  – время жизни виртуального состояния, которое, для фотонов с частотой  $\omega$  и перехода с частотой  $\omega_{ev}$ , оценивается из соотношения неопределенностей Гейзенберга как  $\tau_v \sim 1/|\omega_{ev} - \omega| \approx 10^{-16} \div 10^{-15}$  с. Таким образом, сечение ДФ поглощения по порядку составляет  $\sigma^{(2)} \approx 10^{-49}$  см<sup>4</sup>с = 10 ГМ (Гёпперт-Майер). Аналогично можно провести обобщение на случай n-фотонного поглощения.

Принципиально отличающимся от многофотонного поглощения является эффект генерации оптических гармоник. Экспериментально проще всего наблюдать генерацию второй и третьей оптических гармоник. В этих процессах два (три) фотона рассеиваются на электронах молекулы, превращаясь в один фотон с энергией в точности в два (три) раза больше энергии исходных фотонов. Генерация гармоник, являясь эффектом нелинейного рассеяния, не требует поглощения падающей волны в образце, однако усиливается при его наличии в связи с резонансным возрастанием поляризуемости при приближении частоты излучения к частоте электронного перехода молекул [455,460] .

Обратим внимание, что, несмотря на меньшую величину показателя рассеяния в ближнем ИК диапазоне, число баллистических (не рассеянных) фотонов накачки в тканях экспоненциально затухает с глубиной проникновения. Так, например, сигнал двухфотонной флуоресценции  $F$  определяется как  $F \propto \left[ P_0 \exp\left(-z/l_s^{(ex.)}\right) \right]^2$ , где  $P_0$  – мощность возбуждающего излучения, падающего на поверхность образца,  $l_s^{(ex.)}$  – длина свободного пробега фотона при рассеянии на длине волны возбуждения. Максимальную глубину проникновения можно охарактеризовать как:

$$z_{max} \approx l_s^{(ex.)} \ln\left(\alpha P_0 \frac{T}{\tau} \sqrt{\Phi(z_{max})}\right), \quad (6.3)$$

где  $\Phi$  – доля фотонов флуоресценции, которые были зарегистрированы,  $\alpha$  – параметр, характеризующий эффективность излучения флуорофоров и шумовых характеристик детектора,  $\tau$  и  $1/T$  – характерная длительность импульсов и частота их следования [456]. Таким образом, улучшение эффективности светосбора или увеличение мощности возбуждающего излучения, приведёт к незначительному приросту максимальной глубины проникновения (формула (6.3)), при этом увеличение плотностей мощности может привести к фотохимическому повреждению метаболитов и термическому повреждению тканей. Значительное увеличение глубины проникновения (до 1.6 мм) может быть достигнуто при смещении возбуждающего излучения в длинноволновую область (1000÷1300 нм) [461,462], однако увеличение длины волны возбуждающего излучения может привести к снижению детектируемого сигнала за счёт низкого сечения нелинейных

оптических процессов в длинноволновой области. Подробное исследование ограничений проникающей способности ДФТ приведено, например, в работе [463].

### 6.2.2 Метод визуализации параметров затухания флуоресценции FLIM

В связи с тем, что в Главах 6-7 значительная часть экспериментов выполнена с использованием метода время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM) как с двухфотонным, так и с однофотонным режимом возбуждения, в данном подразделе будут кратко рассмотрены основы FLIM и метода представления данных FLIM на фазовой плоскости (phasor plot).

Визуализация времени жизни предоставляет способ контрастирования, который, в первом приближении, не зависит от таких факторов как интенсивность падающего излучения и длина оптического пути. При этом время жизни флуоресценции зависит как от свойств самого флуорофора, так и от его взаимодействия с ближайшим окружением: в кинетике затухания могут проявляться эффекты динамического тушения, резонансного переноса энергии или изменения конформации самого флуорофора.

После возбуждения зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от времени  $F(t)$  обычно описывается многоэкспоненциальным затуханием:

$$F(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad t > 0, \quad (6.4)$$

где  $a_i$  и  $\tau_i$  – амплитуда и характерное время затухания  $i$ -й компоненты. Такая зависимость справедлива лишь в случае, если длительность импульсов возбуждения пренебрежимо мала в сравнении масштабом времени затухания и детектирования, а также идеального детектора, который откликается на воздействие мгновенно, и при этом отсутствуют какие-либо шумы. В действительности, детектируемый сигнал  $S(t)$  представляет собой свёртку сигнала флуоресценции  $F(t)$  с аппаратной функцией системы  $IRF(t)$  (Instrument Response Function), обуславливаемой длительностью импульса возбуждения и временем срабатывания системы регистрации:

$$S(t) \propto \int_0^t IRF(t') \cdot F(t - t') dt'. \quad (6.5)$$

Методы обработки данных FLIM можно условно разделить на параметрические и непараметрические. В параметрических подходах детектируемый временной сигнал аппроксимируется функцией, вид которой задан аналитически и определяется некоторыми параметрами. Например, предполагают, что закон затухания является двухэкспоненциальным и пытаются подобрать параметры  $a_1, \tau_1, a_2, \tau_2$  так, чтобы свёртка сигнала (6.5) наилучшим образом повторяла экспериментальный сигнал.

В непараметрических методах анализа временного сигнала не предполагается аналитического выражения для зависимости интенсивности от времени [464–466].

Широкое распространение получил метод фазовых диаграмм (phasor plot) [464]. В данном подходе временной сигнал сворачивается с функциями синуса и косинуса:

$$C = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}, \quad S = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}, \quad (6.6)$$

где  $I(t)$  – зависимость сигнала флуоресценции от времени,  $\omega$  – частота, которая обычно выбирается равной величине, обратной к длительности окна детектирования. Данное преобразование схоже с выделением Фурье-амплитуды временного сигнала на частоте  $\omega$ . Для моноэкспоненциальной кривой со временем затухания  $\tau$  величины  $C$  и  $S$  выражаются соотношениями:

$$C = \frac{1}{1+(\omega\tau)^2}, \quad S = \frac{\omega\tau}{1+(\omega\tau)^2}. \quad (6.7)$$

Если теперь отметить данную точку на плоскости  $C$ - $S$ , то она будет лежать на полуокружности с единичным диаметром и центром в точке  $(0.5; 0)$  (рис. 6.2).

Если же временной сигнал представляет собой сумму нескольких экспонент, величины  $C$  и  $S$  будут представлять собой сумму вида:

$$C = \sum_i \frac{f_i}{1+(\omega\tau_i)^2}, \quad S = \sum_i \frac{f_i\omega\tau_i}{1+(\omega\tau_i)^2}, \quad (6.8)$$

где  $f_i = \frac{a_i\tau_i}{\sum_j a_j\tau_j}$  – относительный вклад  $i$ -го флуорофора в среднюю интенсивность флуоресценции. Так, если кинетика затухания флуоресценции имеет биэкспоненциальный вид, то соответствующая точка на фазовой диаграмме будет расположена на отрезке, который соединяет точки, соответствующие моноэкспоненциальному распаду с временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Близость к каждой из точек будет определяться относительными вкладами первой и второй компонент в кинетике релаксации. Таким образом, на плоскости  $C$ - $S$  работает правило сложения векторов (рис. 6.2).

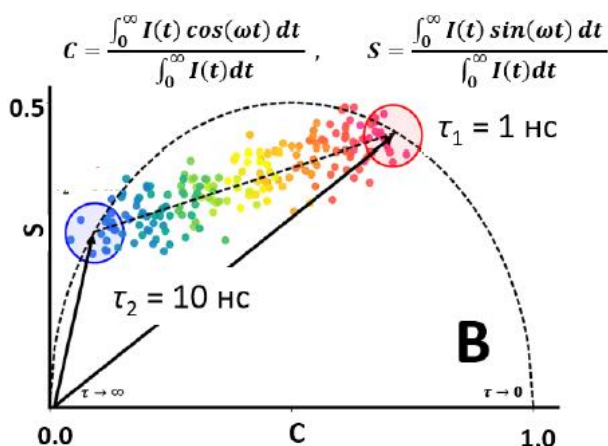


Рисунок 6.2 — Представление данных FLIM на фазовой плоскости (phasor plot).

### **6.2.3 Метод ДФТ-FLIM в исследовании кожи**

Метод ДФТ реализуется в ряде коммерческих систем. Особенный интерес представляют системы, позволяющие проводить измерения на людях *in vivo*. Такие системы выпускаются, в частности, компанией JenLab (Германия), и все *in vivo* измерения в данной работе были выполнены на установке DermaInspect.

Тот факт, что метод ДФТ-FLIM позволяет визуализировать распределение оптических параметров флуорофоров, в том числе, параметров релаксации их флуоресценции, в реальном времени с субклеточным (<1 мкм) пространственным разрешением на глубине до 200 мкм, делает его подходящим инструментом для исследования кожи. При этом из всего многообразия процессов и структур в коже данным методом изучалась лишь малая их часть, преимущественно, в эпидермисе.

Так, в работе [467] методом ДФТ была измерена морфология кератиноцитов при наличии процессов воспаления в коже *in vivo*, при этом было продемонстрировано перераспределение митохондрий внутри клеток, а именно их локализация в области около ядра при воспалении. Неинвазивный морфометрический подход к анализу распределения митохондрий в клетках эпидермиса *in vivo* был применен в работе [468] для исследования онкологических заболеваний. Анализ морфологии клеток в разных слоях эпидермиса позволил найти отличия между здоровой кожей, плоскоклеточным раком и предшествующим ему кератозом [469].

Возможность неинвазивного доступа к клеткам кожи, в первую очередь, в эпидермисе, позволяет анализировать биохимические процессы в них. В частности, методом ДФТ-FLIM было показано, что в кератиноцитах по мере их дифференцировки наблюдается смена основного типа метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование [470]. На основе ДФТ-FLIM также были разработаны методы детектирования рака кожи, базальной карциномы [471] и меланомы [470,472]. В то же время возможности ДФТ-FLIM в анализе кожи использованы не в полной мере: так, в данной и последующей главах будут показаны применения метода для *in vivo* визуализации сосудов, коллагенов различного типа и клеток дермы (макрофагов и тучных клеток) в измерениях на коже человека.

### **6.2.4 Визуализация микрососудов в дерме методом ДФТ-FLIM: эндогенный контраст**

#### 6.2.4.1 Оптическая визуализация капилляров

В дермальном слое кожи находится капиллярная сеть, поддерживающая метаболизм эпидермиса, и задача анализа состояния капилляров и микроциркуляции является классической областью исследования биофотоники. В связи с этим актуальным является

вопрос о визуализации капилляров и области вокруг них (периваскулярной зоны) как в норме, так и при различных патологиях. Несмотря на то, что глубина сканирования ДФТ-FLIM и возможности этого метода в анализе различных молекулярных компонент потенциально подходят для визуализации сосудов *in vivo* с использованием эндогенного контраста, таких работ в литературе не было. В этом направлении нами был получен ряд результатов [177,473–475], которые легли в основу данной главы.

#### 6.2.4.2 Объекты и методы исследования

В данном разделе для анализа кожи применялись методы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и ДФТ-FLIM.

Для реализации метода КЛСМ была использована система VivaScope 1500 Multilaser (Mavig, Германия). Использовались два режима измерения: режим на отражение с использованием длины волны 785 нм и флуоресцентный режим с длиной волны накачки 488 нм. Полученные изображения обрабатывались в программе ImageJ.

Двухфотонная визуализация кожи методом ДФТ-FLIM *in vivo* была выполнена с помощью прибора DermaInspect (JenLab GmbH, Германия), в котором в качестве накачки использовался перестраиваемый фемтосекундный титан-сапфировый лазер (Mai Tai XF, Spectra Physics, США) с длительностью импульсов 100 фс и частотой следования импульсов 80 МГц. Возбуждение осуществлялось на длине волны 760 нм, сигнал детектировался в двух спектральных каналах: 410–680 нм для автофлуоресценции и <400 нм для сигнала ГВГ.

Схема установки представлена на рисунке 6.3А: излучение титан-сапфирового лазера через гальваносканер попадает на объектив (увеличение 20х, числовая апертура 1, масляная иммерсия), способный передвигаться по трем осям (механически по X-Y и с использованием пьезоэлектрической подвижки по оси Z, что позволяет осуществлять сканирование образца по глубине). Сигнал от объекта попадает в схему регистрации, где с помощью дихроичных зеркал делится спектрально на два канала – ГВГ и АФ, при этом детектор в канале АФ, представляющий собой ФЭУ в режиме счета фотонов, позволяет реализовать метод FLIM с помощью время-коррелированного счета единичных фотонов. Схема закрепления объектива на исследуемом объекте показана на рисунке 6.3Б: к поверхности держателя, внутри которого находится объектив, прикрепляется переходник в виде усеченного конуса, внутри которого крепится с помощью наклейки одноразовое круглое покровное стекло толщиной 170 мкм. Между объективом и покровным стеклом наносится иммерсионное масло, а между покровным стеклом и исследуемым объектом

(кожей) – дистиллированная вода, после чего конусовидный переходник приклеивается к коже. Внешний вид установки DermaInspect показан на рисунке 6.3В.

Анализ данных FLIM проводился в программе SPC Image (Becker&Hickl, Германия), аппроксимация производилась биекспоненциальной моделью, для обработки использовалось значение биннинга, равное трем. Визуализация данных осуществлялась с помощью программ SPC Image и Image J.

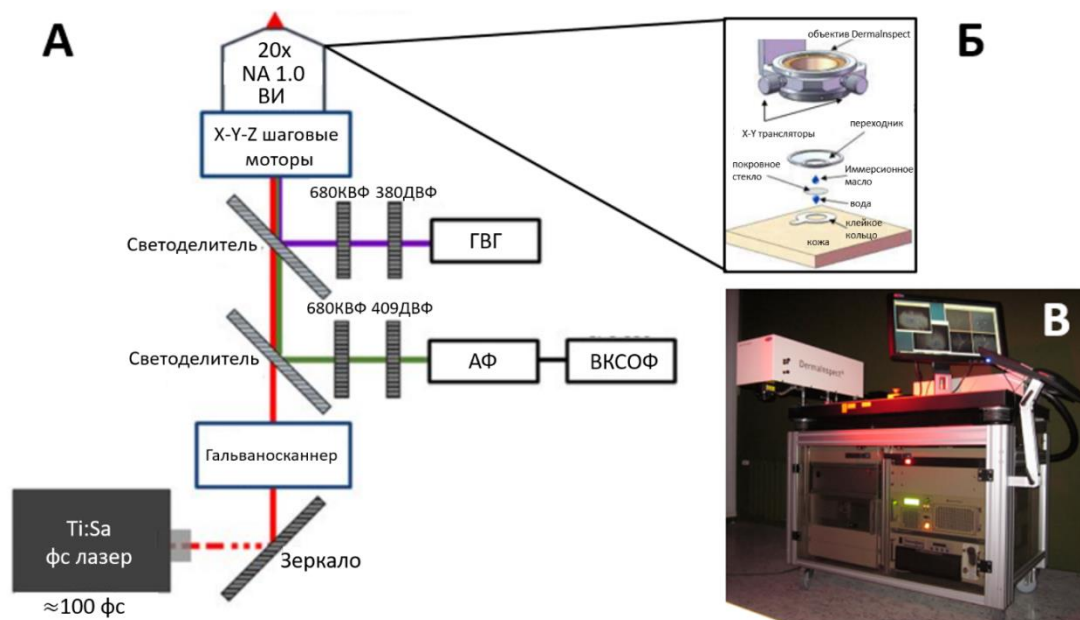


Рисунок 6.3 — А) Схема установки DermaInspect (JenLab, Германия) для реализации метода ДФТ-FLIM *in vivo*. Б) Схема закрепления объектива установки на исследуемой области. В) Внешний вид установки DermaInspect (адаптировано из работы [476]).

Измерения *in vivo* были выполнены на шести здоровых добровольцах на ногтевом ложе и внутренней области предплечья. Всего было получено более 500 изображений дермы. Добровольцы не пользовались косметическими средствами в течение как минимум 48 часов до начала измерений.

Для анализа двухфотонной флуоресценции образцы крови, взятой у здорового человека, центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об/мин (Hettich Zentrifugen, Universal 320R) для получения плазмы крови. Измерения суспензии эритроцитов проводили в 0.1 М растворе NaCl. Все экспериментальные протоколы и набор испытуемых были одобрены Этическим комитетом клиники Charité (Берлин, Германия).

#### 6.2.4.3 Визуализация капилляров в дерме методами КЛСМ и ДФТ-FLIM

Первой стадией эксперимента являлась визуализация капилляров ногтевого ложа с помощью метода КЛСМ, позволяющего в режиме на отражение послойно сканировать кожу *in vivo*. На рисунке 6.4А показано изображение капилляров ногтевого ложа,

полученное с методом КЛСМ при использовании лазерного излучения с длиной волны 785 нм на глубине ~100 мкм. Видно, что метод КЛСМ позволяет визуализировать капиллярные петли (отмечены красными линиями), что может быть использовано для детального анализа их морфологии.

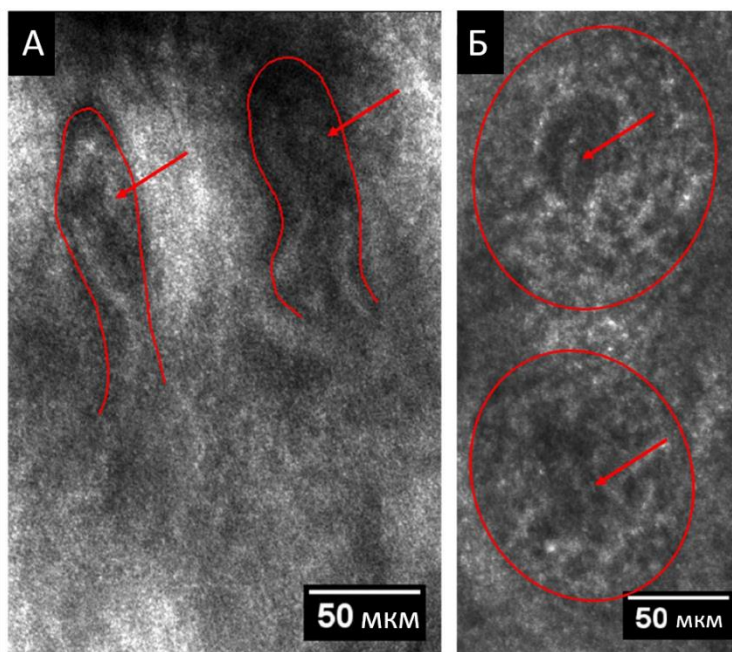


Рисунок 6.4 — Изображение капилляров А) ногтевого ложа и Б) предплечья, полученное методом КЛСМ (VivaScope 1500 Multilaser, Mavig, Германия) в режиме отражения на длине волны 785 нм.

Капиллярные петли, визуализированные методом КЛСМ на внутренней части предплечья на глубине ~ 60 мкм, представлены на рис. К2б. Визуализация капилляров методом КЛСМ в режиме видео позволяет наблюдать в них кровоток [477]. Использование флуоресцентного режима при длине волны возбуждения 488 нм на той же установке не позволило наблюдать сигнала из области капилляров, что может быть связано с сильным поглощением и рассеянием света в коже. Изображения областей кожи, аналогичных приведенным на рисунке 6.4, были затем получены методом ДФТ-FLIM.

Применение метода ДФТ-FLIM для визуализации области ногтевого ложа позволило различить несколько структур в коже. Во-первых, в дерме на глубине ~ 100 мкм в канале ГВГ наблюдались протяженные структуры (рис. 6.5А), соответствующие горизонтально расположенным сосочкам папиллярной дермы. Сигнал ГВГ в коже человека генерируется преимущественно волокнами коллагена типа I, являющимися основными компонентами дермы [478,479].

zz



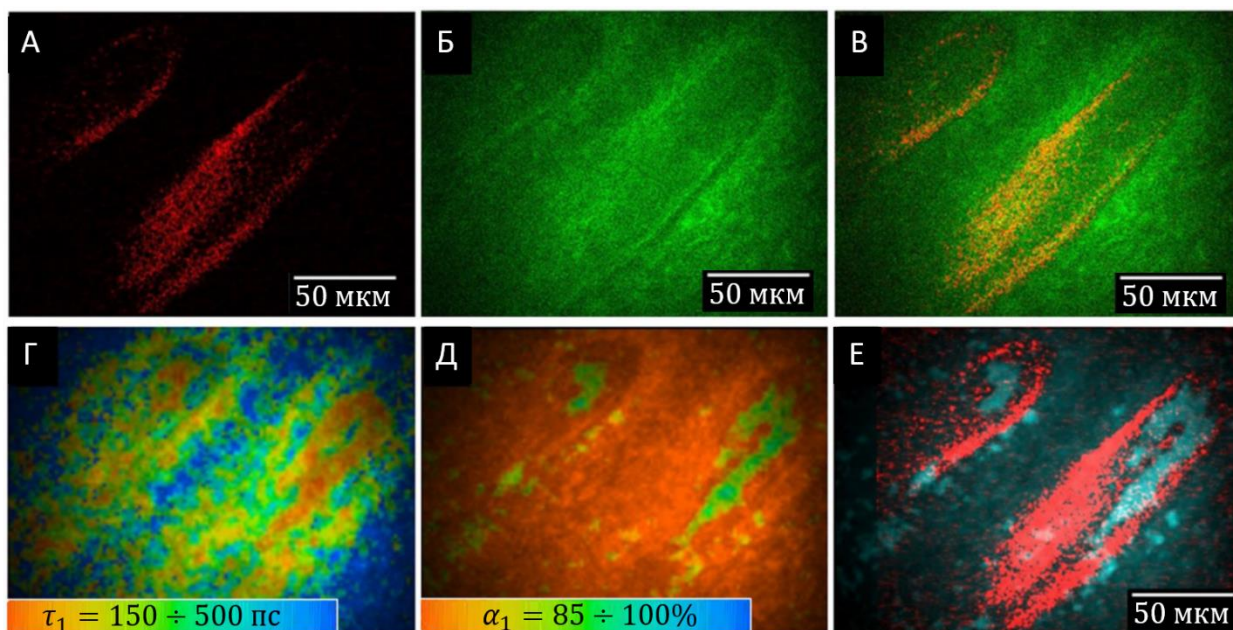


Рисунок 6.5 — Изображение области ногтевого ложа, полученное на глубине 100 мкм методом ДФТ-FLIM в канале А) ГВГ и Б) двухфотонной АФ. В) Совмещенное изображение в каналах ГВГ и двухфотонной АФ. Изображения ногтевого ложа, полученные методом ДФТ-FLIM: цветом кодированы значения Г) времени релаксации флуоресценции  $\tau_1$  и Д) амплитуды быстрой компоненты  $a_1$ , полученные при биэкспоненциальной аппроксимации кинетики релаксации. Е) Совмещенное изображение интенсивности ГВГ (красный цвет) и распределения амплитуды быстрой компоненты  $a_1$  (бирюзовый цвет соответствует отсечке  $a_1/a_2 > 9$ ).

Распределение двухфотонной АФ для той же области приведено на рисунке 6.5Б, а на рисунке 6.5В приведено наложение сигналов ГВГ и АФ. Видно, что в изображении, полученном в канале ГВГ, внутри вытянутой области сосочка имеется темное пространство, в котором, предположительно, находятся капилляры. В то же время на изображениях ГВГ и двухфотонной АФ капилляров в явном виде не наблюдается (рис. 6.5А-В).

Напротив, на изображениях, полученных методом FLIM и представляющих из себя карту параметров, полученных путем биэкспоненциальной аппроксимации кривых затухания флуоресценции, видны области, напоминающие по форме и локализации капилляры. Эти области характеризуются быстрой релаксацией флуоресценции, а именно временем  $\tau_1 \sim 200$  пс (рис. 6.5Г), сопоставимым с шириной аппаратной функции установки, и соотношением амплитуд быстрой и медленной компонент  $a_1/a_2 > 9$  (рис. 6.5Д). На рисунке 6.5Е представлено совмещенное изображение, на котором красным цветом показана интенсивность ГВГ, а бирюзовым – области, соответствующие быстрому затуханию флуоресценции (соотношению амплитуд  $a_1/a_2 > 9$ ): видно, что они расположены непосредственно внутри папиллярных структур, образованных коллагеном типа I, там, где сигнала ГВГ не наблюдается. Также было установлено, что при сильном давлении на



ногтевое ложе во время измерений FLIM сигнал, характеризующийся быстрым затуханием флуоресценции, пропадает, что связано с перекрытием кровотока.

Таким образом, было показано, что методы ГВГ и ДФ-FLIM могут использоваться для визуализации морфологии структур дермы при измерениях *in vivo* на коже человека.

### 6.3 Двухфотонная флуоресценция компонентов крови

Рассмотрим далее, с чем связан сигнал, обладающий быстрым (порядка обратной ширины аппаратной функции установки) затуханием флуоресценции, наблюдаемый из области капилляра. Для ответа на этот вопрос были измерены кинетики затухания основных компонентов крови – эритроцитов, лейкоцитов и плазмы крови.

#### 6.3.1 Кинетика затухания эндогенной флуоресценции эритроцитов

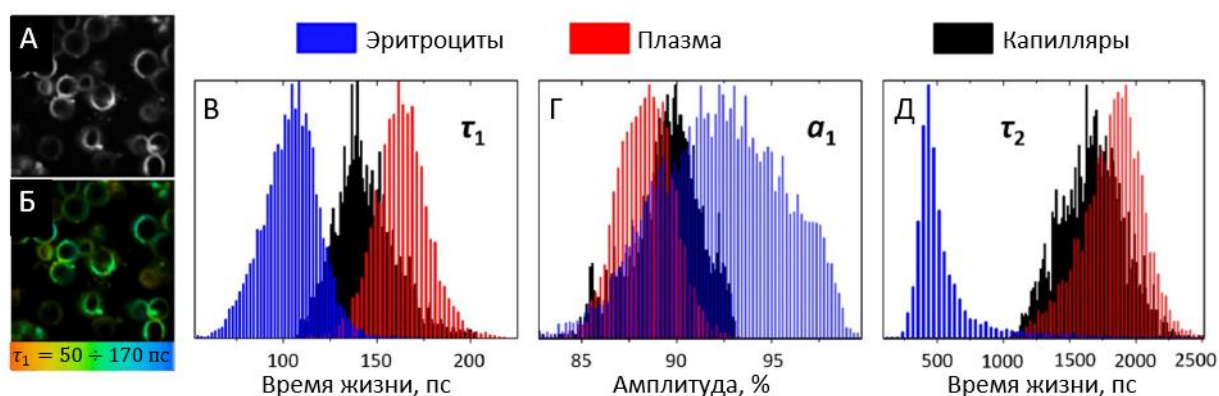


Рисунок 6.6 — А) Изображение суспензии эритроцитов, полученное с использованием сигнала двухфотонной флуоресценции. Б) Изображение суспензии эритроцитов, полученное методом FLIM, цветом картировано время затухания быстрой компоненты  $\tau_1$ . Распределения параметров затухания флуоресценции для эритроцитов (синий), плазмы крови (красный) и капилляров *in vivo* (черный), полученные при биэкспоненциальной аппроксимации кинетики релаксации флуоресценции: Г)  $\tau_1$ , Д)  $a_1$ , Е)  $\tau_2$ .

На рисунке 6.6А приведено изображение суспензии эритроцитов, полученное с использованием сигнала двухфотонной флуоресценции при возбуждении на длине волны 760 нм, а на рисунке 6.6Б – распределение времени жизни флуоресценции в них (показана карта распределения времени  $\tau_1$ ). Видно, что кинетика затухания флуоресценции эритроцитов характеризуется параметрами затухания, аналогичными измеренным для области капилляра *in vivo*. Распределения параметров релаксации флуоресценции для эритроцитов, плазмы крови и области капилляров *in vivo* приведены на рисунке 6.6В-Д. Из

полученных данных можно заключить, что природа быстрого затухания флуоресценции из области капилляров, благодаря которому их можно контрастировать методом FLIM, связана с быстрым затуханием флуоресценции эритроцитов. В то же время, механизм, ответственный за быстро затухающую флуоресценцию эритроцитов не является очевидным – основной компонент эритроцитов – гемоглобин – сам по себе не является флуоресцирующей молекулой [175], при этом неизвестно о возможном встраивании в мембрану эритроцитов каких-либо эндогенных флуорофоров с такими параметрами флуоресценции.

### **6.3.2 Кинетика затухания эндогенной флуоресценции лейкоцитов**

Более детальный анализ флуоресцентного отклика компонентов крови был также проведен на образцах лейкоконцентрата, в которых одновременно на изображениях присутствуют лейкоциты, эритроциты и плазма крови. Для того, чтобы сравнить оптические свойства эритроцитов при одно- и двухфотонном возбуждении, то есть чтобы понять, возбуждается ли флуоресценция с быстрым затуханием только в результате двухфотонного поглощения или нет, образцы лейкоконцентрата исследовались с помощью метода микроскопии с визуализацией времени жизни в конфокальной схеме с однофотонным режимом возбуждения (система Microtime 200, Picoquant, Германия).

#### 6.3.2.1 Объекты и методы исследования

Возбуждение сигнала флуоресценции производилось на длине волны 402 нм (частота повторений 40 МГц, максимальная мощность 50 мкВт, длительность импульса 40 пс). Измерения проводились с помощью 100х объектива (NA 1.4, Olympus UPLSApo), при этом регистрировались поля зрения  $80 \times 80 \text{ мкм}^2$  в спектральных каналах 420-460 нм и 520-800 нм, время накопления сигнала флуоресценции в одном пикселе составляло 0.2 мс. Кинетики затухания флуоресценции, получаемые в каждой точке изображения, усреднялись по окну из  $5 \times 5$  ближайших пикселей, после чего аппроксимировались биэкспоненциальным затуханием с амплитудами  $a_1$ ,  $a_2$  и временами  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  с учётом свертки с функцией отклика детектора.

Образцы концентрированной суспензии лейкоцитов (лейкоконцентрат) были получены из крови добровольцев по следующему протоколу: (1) забор крови осуществлялся натошак между 8 и 10 утра при нормальной температуре (21-24 °C) в вакуумные пробирки с ЭДТА (PUTN Vacumine, 4 мл), (2) кровь выдерживалась 30 минут при комнатной температуре для естественного осаждения эритроцитов, (3) после чего производился отбор верхней фракции крови (лейкоцитов и плазмы крови) и центрифугирование его при 200 g в течение 10 минут;

(4) далее, после центрифугирования супернатантная часть раствора удалялась, оставшиеся 200 мкл были использованы в качестве концентрата лейкоцитов. Все измерения проводились не позже 3 часов после забора крови.

### 6.3.2.2 Параметры затухания флуоресценции клеток крови

Репрезентативное изображение лейкоконцентрата, полученное методом FLIM, приведено на рисунке 6.7. Как видно, при однофотонном возбуждении у эритроцитов так же, как и в случае двухфотонного возбуждения, наблюдается флуоресценция, характеризующаяся сверхбыстрым затуханием (кинетика затухания совпадает с аппаратной функцией) и низкой интенсивностью в сравнении с другими компонентами крови. Как будет показано в разделе 6.3, этот сигнал не обусловлен рассеянием света. Средние времена жизни затухания флуоресценции плазмы крови и нейтрофилов составили  $1.1 \pm 0.2$  нс и  $1.25 \pm 0.15$  нс соответственно, а их усредненная по клетке интенсивность флуоресценции превышала таковую для эритроцитов примерно в 5 раз (рис. 6.7В-Г).

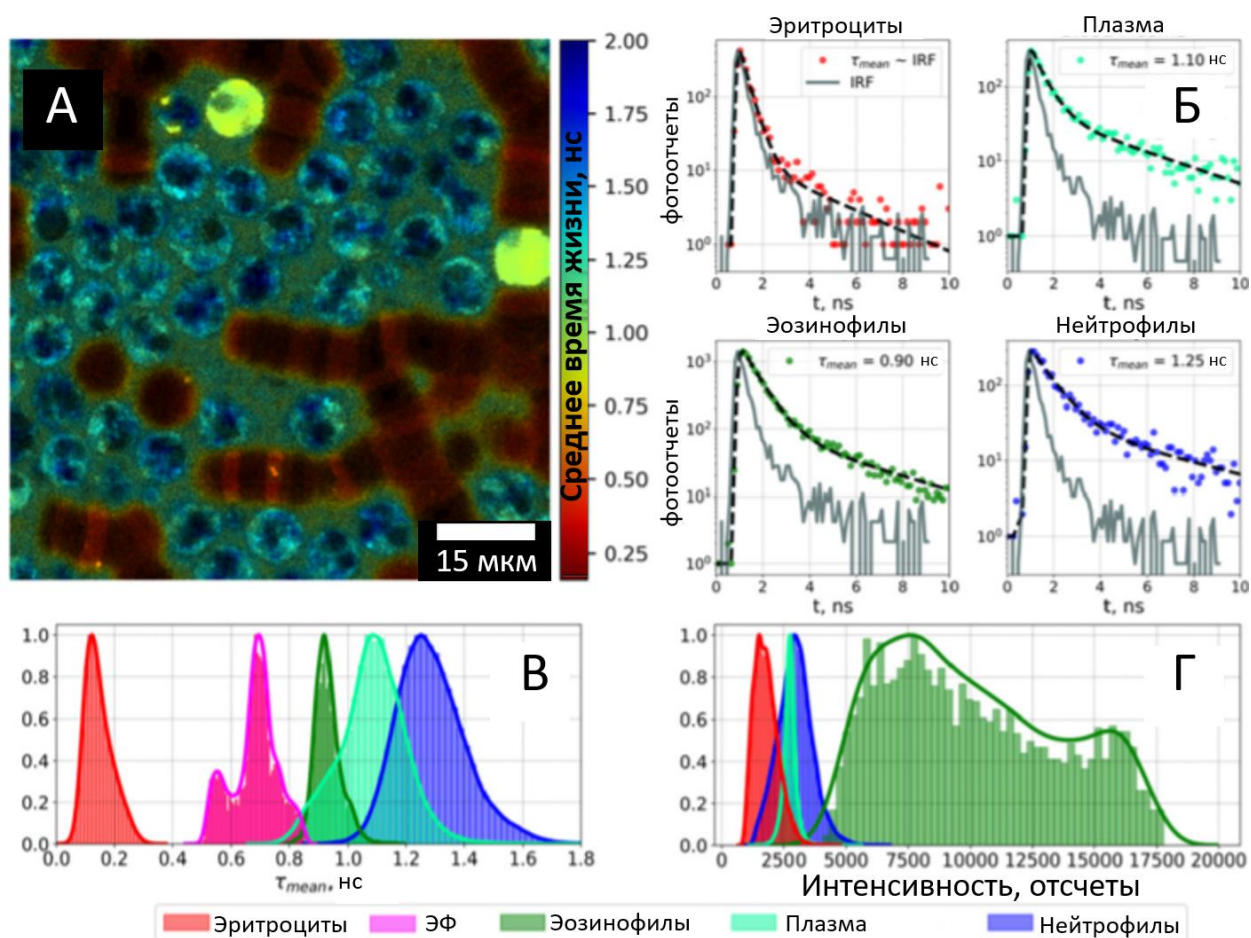


Рисунок 6.7 — А) Изображение клеток крови, полученное методом FLIM при возбуждении на 402 нм. Цветом кодировано среднее время затухания флуоресценции. Б) Репрезентативные кинетики затухания флуоресценции для эритроцитов, плазмы крови, эозинофилов и нейтрофилов. Серым цветом представлена аппаратная функция установки.

Сплошные линии соответствуют аппроксимации моделью биэкспоненциального затухания флуоресценции. В) Распределение среднего времени жизни флуоресценции для эритроцитов, плазмы крови, нейтрофилов и эозинофилов. Г) Распределение интенсивности флуоресценции эритроцитов, плазмы крови, нейтрофилов и эозинофилов.

Анализ данных FLIM для образцов лейкоконцентрата был выполнен также с помощью представления данных на фазовой плоскости (phasor plot). Репрезентативная фазовая диаграмма лейкоконцентрата представлена на рис. 6.8А, где отмечены области, соответствующие разным типам клеток.

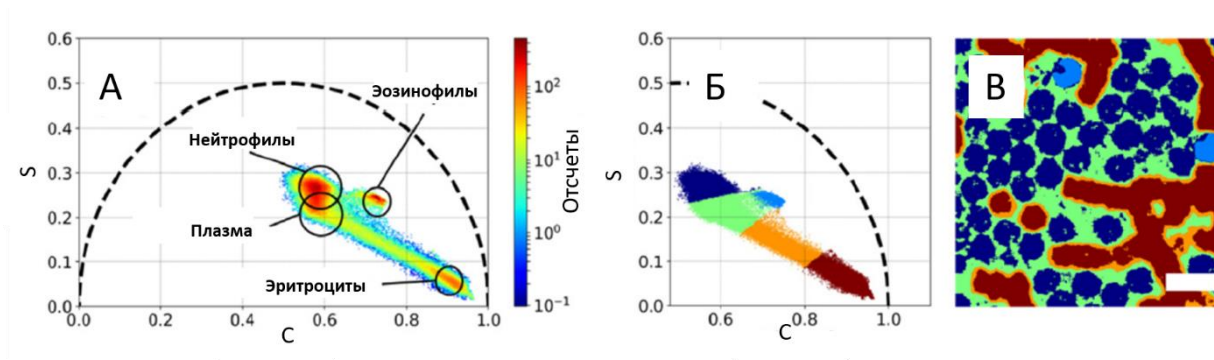


Рисунок 6.8 — А) Визуализация данных FLIM лейкоцитов, эритроцитов и плазмы крови в виде фазовой плоскости. Б) Кластеризация объектов с помощью алгоритма К-средних ( $K = 5$ ) на фазовой плоскости. В) Исходное изображение лейкоконцентрата, соответствующее рисунку 6.7, на котором различными цветами отмечены пиксели, соответствующие разным кластерам на фазовой плоскости. Масштабный отрезок соответствует 15 мкм.

Далее была осуществлена процедура автоматической сегментации изображений FLIM с использованием кластеризации методом К-средних данных, где каждый элемент характеризовался двумя координатами на фазовой плоскости ( $C$ ,  $S$ ) и интенсивностью. Результаты представлены на рисунке 6.8Б-В, где показана кластеризация точек на фазовой диаграмме и на исходном изображении соответственно. Как видно, предложенный подход позволил автоматически сегментировать эритроциты, плазму крови, эозинофилы и нейтрофилы.

Обсудим также кратко возможные источники автофлуоресценции плазмы [425] и клеток крови (прежде всего, лейкоцитов) при возбуждении в области 400 нм. При возбуждении на длине волны  $>350$  нм автофлуоресценция клеток обычно объясняется эмиссией свободной и связанной форм НАД(Ф)Н и наличием флавинов (ФМН, ФАД), рибофлавина и липофусцина [77]. Длина волны 402 нм соответствует краю спектра поглощения НАД(Ф)Н, т.е. сечение поглощения там почти на два порядка меньше, чем в максимуме поглощения на 340 нм ( $155$  и  $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  соответственно) [56]. Тем не менее в некоторых работах анализируется флуоресценция НАД(Ф)Н при возбуждении  $>400$  нм, например путем разложения спектра на несколько компонент и соотнесения наиболее коротковолновой

компоненты с НАД(Ф)Н [480]. Корректность такой интерпретации в литературе подтверждается контролируемыми изменениями вышеупомянутого сигнала при использовании химических агентов, таких как ингибиторы дыхательной цепи [480]. Для проверки, является ли данный сигнал откликом НАД(Ф)Н, перед детектором устанавливался фильтр с полосой пропускания до 450 нм, где флуоресценция НАД(Ф)Н является доминирующей. Поскольку в наших экспериментах значимого сигнала в данном спектральном диапазоне не было обнаружено даже при увеличении мощности лазера в 50 раз (от 20 мкВт до 1 мВт), был сделан вывод, что отклик не относится к данному веществу. В результате было предположено, что обнаруженная флуоресценция лейкоцитов определяется преимущественно наличием в них флавинов.

Резюмируя, сигнал флуоресценции с коротким временем затухания, наблюдаемый из области капилляров при ДФТ-FLIM, связан с флуоресценцией эритроцитов. В случае как двухфотонного возбуждения, так и однофотонного возбуждения (в схеме конфокальной микроскопии) эритроциты обладают низкой интенсивностью флуоресценции, но могут быть контрастированы методом FLIM, т.к. заметно отличаются по параметрам затухания флуоресценции от других компонентов крови и внеклеточного матрикса.

#### **6.4 Механизм формирования флуоресценции эритроцитов: образование фотопродуктов при облучении гемоглобина**

Двухфотонная флуоресценция эритроцитов – эффект, редко используемый в экспериментах по ДФТ несмотря на то, что это явление было описано в 2011 году [481]. Известно, что гемоглобин не флуоресцирует при однофотонном возбуждении, т.к. имеет место сверхбыстрый перенос энергии с порфириновых колец на d-орбиталь ионов железа (см. Главу 1), приводящий к тушению флуоресценции, при этом механизм эмиссии флуоресценции эритроцитов при двухфотонном возбуждении по-прежнему является вопросом дискуссий. Нами было показано, что наблюдаемый от эритроцитов сигнал является результатом образования фотопродукта при облучении эритроцита и содержащегося в нем гемоглобина. Данный экспериментальный факт является новым для фотофизики эритроцитов и может быть применен для *in vivo* визуализации с помощью ДФТ-FLIM.

##### **6.4.1 Объекты и методы исследования**

Измерения ДФТ проводились с использованием системы Nikon A1R MP (Nikon, Япония) [475], в которой возбуждение осуществлялось с помощью титан-сапфирового лазера Chameleon Vision-II (Coherent, США) с диапазоном перестройки 700–1000 нм,

длительностью импульсов 140 фс и частотой повторения 80 МГц. Сигнал детектировался одновременно в трех спектральных каналах (350–458 нм, 458–492 нм и 492–593 нм). Данная установка позволяла измерять образцы одновременно с использованием двухфотонного и однофотонного возбуждения. В последнем случае возбуждение осуществлялось с помощью ртутной лампы Intensilight (Nikon, Япония), а детектирование осуществлялось либо в белом свете на отражение, либо в режиме эпифлуоресценции с использованием дихроичных фильтров. Эксперименты с использованием FLIM выполнялись на установке DermaInspect, описанной в разделе 6.2.

Образцы капиллярной крови (50 мкл), взятые у здоровых добровольцев, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин (Hettich Zentrifugen, Universal 320R). Измерения эритроцитов проводили в 0.1 М растворе NaCl. Поскольку основным хромофором в эритроцитах является гемоглобин, отдельно были проведены исследования с растворами гемоглобина для подтверждения факта, что в результате облучения образуются именно фотопродукты деградации гемоглобина. Растворы готовились в фосфатном буфере (pH 7.4), концентрация контролировалась по оптической плотности образца. Гемоглобин был приобретен у Sigma Aldrich (номер по каталогу H7379) и использован без дополнительной очистки.

Для микроскопических измерений образец (суспензия эритроцитов в NaCl) помещали между двумя покровными стеклами толщиной 170 мкм и измеряли с использованием масляного иммерсионного объектива  $60 \times 1.4$  NA (Nikon CFI Apo, Япония).

#### **6.4.2 Механизм эндогенной флуоресценции эритроцитов**

Были исследованы спектральные характеристики двухфотонного возбуждения и эмиссии эритроцитов. Для исследований отбирались образцы капиллярной крови здоровых добровольцев, часть образцов была нанесена на предметные стёкла в качестве мазков по стандартным клиническим процедурам, а другая часть была центрифугирована для получения эритроцитарной массы, которая затем была разбавлена в физрастворе. При этом были измерены характеристики двухфотонной флуоресценции эритроцитов для различных мощностей и длин волн накачки (средние мощности излучения на образце от 2 до 10 мВт, длины волн от 700 до 850 нм).

ДФТ-FLIM изображение суспензии эритроцитов, полученное при возбуждении 760 нм, представлено на рисунке 6.9. Кинетика затухания флуоресценции эритроцитов является сверхбыстрой и совпадает с аппаратной функцией установки (рис. 6.9Б).



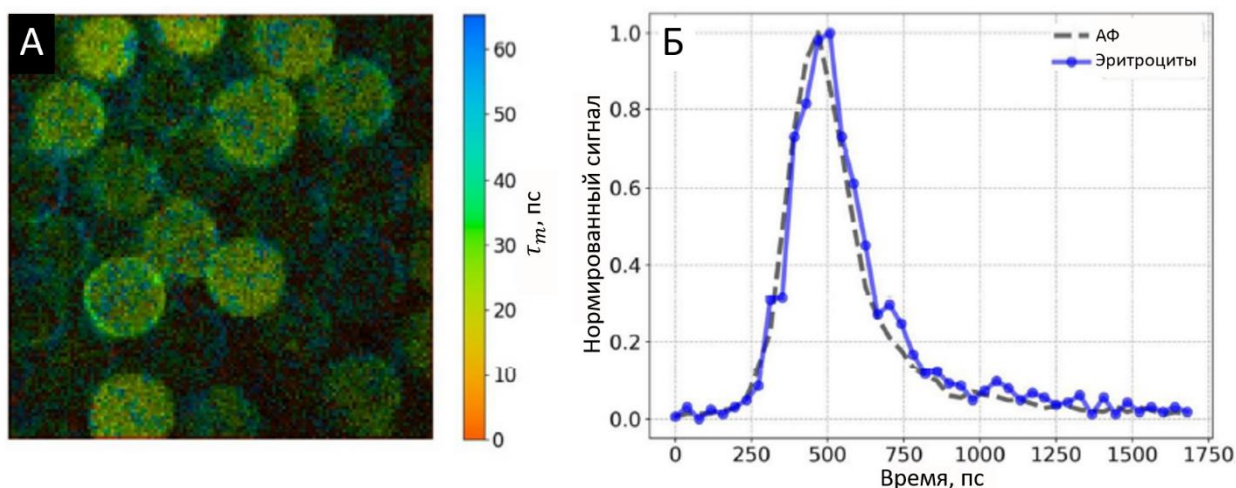


Рисунок 6.9 — А) FLIM-изображение суспензии эритроцитов, полученное при двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм, цветом картировано среднее время затухания флуоресценции. Б) Кинетика релаксации флуоресценции эритроцитов (синий) и аппаратная функция установки (серый).

Было также установлено, что интенсивность флуоресценции эритроцитов имеет практически линейную зависимость от времени облучения (рис. 6.10А). Скорость роста интенсивности, рассчитанная путем линейной аппроксимации зависимости двухфотонной флуоресценции от времени, увеличивалась с мощностью накачки (рис. 6.10Б). Данная зависимость росла быстрее, чем линейная функция, и хорошо аппроксимировалась полиномом второй степени. Обнаруженное поведение двухфотонной флуоресценции эритроцитов со временем и увеличением мощности накачки можно объяснить накоплением флуоресцирующего фотопродукта, возникающего в результате процесса двухфотонного поглощения.

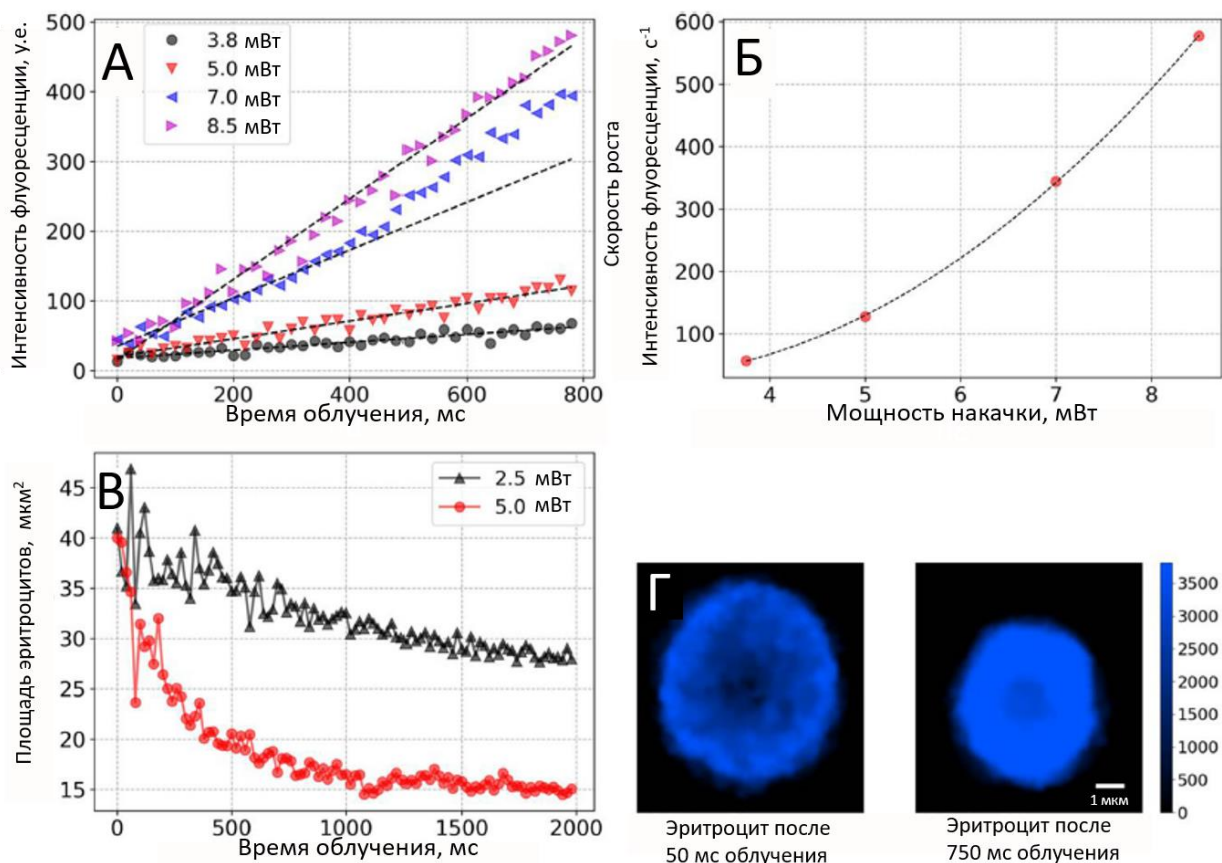


Рисунок 6.10 — А) Зависимость интенсивности двухфотонной флуоресценции эритроцитов от времени облучения при разных мощностях накачки (длина волны возбуждения 760 нм). Б) Зависимость скорости роста двухфотонной флуоресценции эритроцитов от мощности накачки (красные точки) и ее аппроксимация полиномом второй степени (черная кривая). В) Зависимость площади эритроцита от времени облучения при двух мощностях накачки – 2.5 мВт (черный) и 5 мВт (красный). Время облучения приведено в расчете на одну клетку. Д) Изображение эритроцита, полученное путем детектирования его двухфотонной флуоресценции, для двух времен экспозиции (50 и 750 мс).

Также было обнаружено, что со временем облучения меняется морфология эритроцитов, а именно они уменьшаются в размере (рис. 6.10В-Г). Зависимость площади клетки от времени экспозиции  $\tau_{exp}$  представлена на рисунке 6.10В, при этом  $\tau_{exp}$  было рассчитано как:

$$\tau_{exp} = \frac{S_{RBC}}{S_{scan}} \cdot f^{-1} \cdot N, \quad (6.9)$$

где  $S_{RBC}$  и  $S_{scan}$  – площади эритроцита и области сканирования ( $500 \times 500 \text{ мкм}^2$ ),  $f$  – частота сканирования (1 Гц),  $N$  – номер скана. Изменение размера и морфологии эритроцитов при большой дозе облучения можно объяснить нагревом за счет двухфотонного поглощения излучения гемоглобином. Дальнейшие эксперименты проводились в режиме, когда изменение морфологических параметров эритроцитов было минимальным.



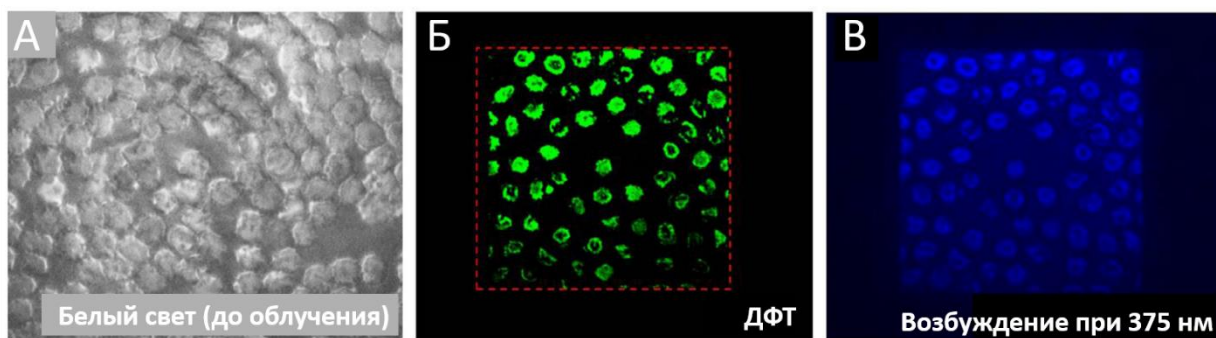


Рисунок 6.11 — А) Изображение эритроцитов, полученное с помощью широкопольной микроскопии до облучения. Б) Изображение, полученное с использованием сигнала двухфотонной флуоресценции после облучения области, отмеченной красным квадратом, излучением с длиной волны 760 нм. В) Изображение, полученное методом эпифлуоресцентной микроскопии в канале DAPI (возбуждение 375 нм, эмиссия >410 нм) для суспензии эритроцитов, часть которой (красный квадрат на панели Б) была облучена на длине волны 760 нм. Видно, что в облученной области наблюдается сигнал флуоресценции, связанный с накопленным в эритроцитах фотопродуктов.

Для того чтобы проверить, что образование фотопродукта при облучении гемоглобина является необратимым, а также для того, чтобы охарактеризовать его оптические свойства, был проведен следующий эксперимент. Суспензия эритроцитов, изображение которой приведено на рисунке 6.11А, облучалась в некоторой области, отмеченной на рисунке 6.11Б красным квадратом, на длине волны 760 нм при мощности 2.5 мВт в течение 30 секунд. Как и в описанных выше экспериментах (рис. 6.10) наблюдалось увеличение двухфотонной флуоресценции в области облучения (рис. 6.11Б). После этого система Nikon A1R MP переключалась из режима многофотонной микроскопии в режим эпифлуоресценции, и измерялось флуоресцентное изображение той же области при возбуждении на длине волны 375 нм (в канале DAPI). На рисунке 6.11В видно, что из облученной области с эритроцитами наблюдается сигнал флуоресценции, который не пропадает со временем. Таким образом, облучение, соответствующее типичным параметрам при ДФТ-FLIM, приводит к необратимому образованию фотопродуктов, которые флуоресцируют и при двухфотонном (рис. 6.11Б), и при однофотонном возбуждении.

Следующий вопрос заключался в том, можно ли аналогично облучению в ИК области, когда поглощение является двухфотонным, получить флуоресцентный фотопродукт при однофотонном возбуждении. Для этого выполнялись как эксперименты по конфокальной микроскопии крови с накачкой на 405 нм, так и эксперименты с раствором гемоглобина.

Так, раствор гемоглобина с оптической плотностью на длине волны облучения  $\sim 1 \text{ см}^{-1}$ , облучался при поддержании постоянной температуры 25 °С светодиодом мощностью 100 мВт и длиной волны излучения 420 нм, попадающей в полосу Соре поглощения гемоглобина. Во время облучения измерялись спектры поглощения и флуоресценции

системы. Было показано, что в результате длительного облучения появляется новая полоса флуоресценции с возбуждением в видимой области спектра, что проиллюстрировано с помощью матриц флуоресценции на рисунках 6.12А-Б. Рост флуоресценции сопровождался уменьшением поглощения, который был более выраженным для Q-полосы (в районе 550 нм) гемоглобина, чем для полосы Sore (в районе 400 нм, рис. 6.12Г). Кинетика затухания флуоресценции облученного раствора гемоглобина, полученная при возбуждении на 405 нм, совпадала с аппаратной функцией установки (рис. 6.12Д). Таким образом, флуоресцентный фотопродукт образуется при облучении раствора гемоглобина излучением видимого спектрального диапазона и обладает теми же фотофизическими свойствами, что и флуоресценция эритроцитов при ДФТ-FLIM.

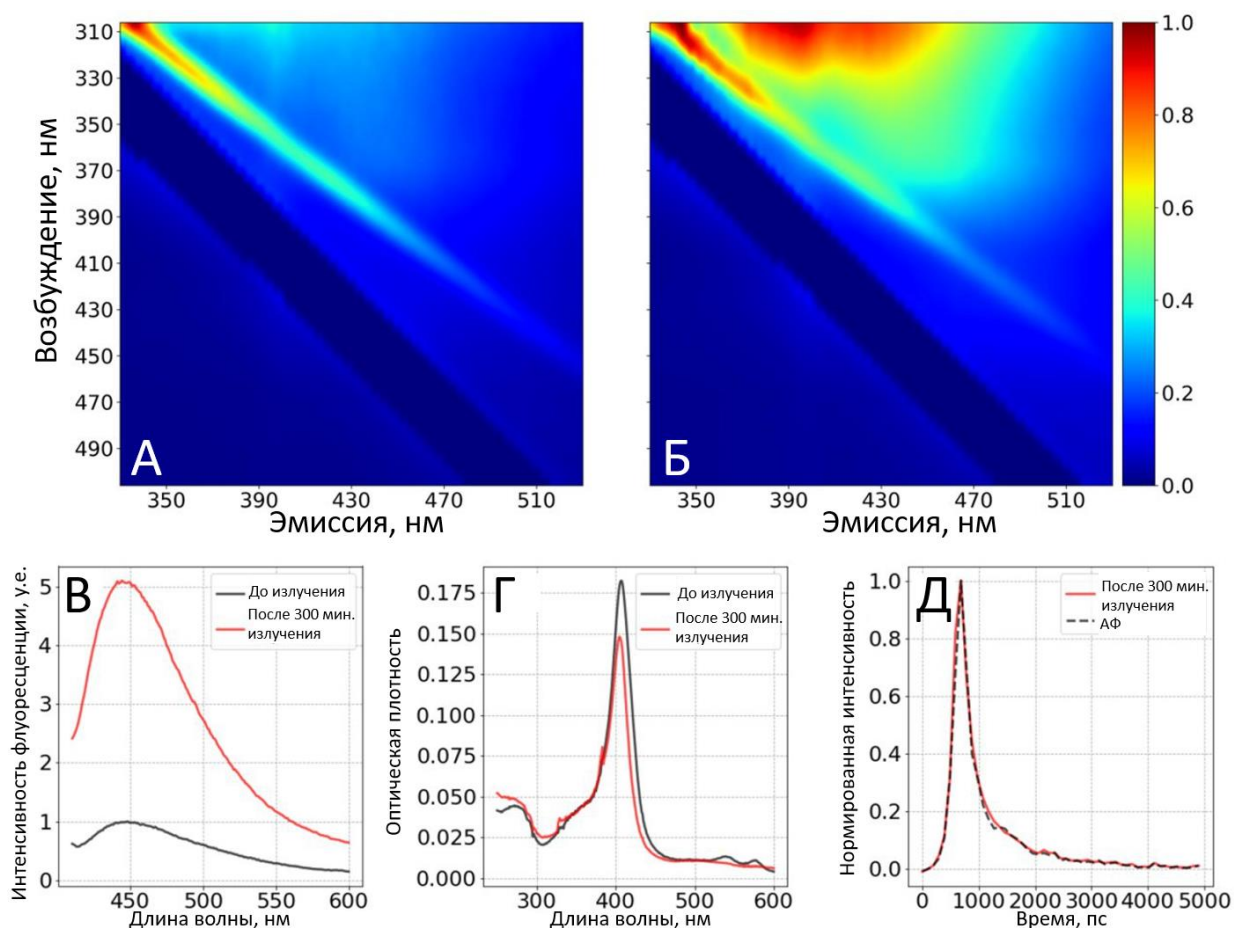


Рисунок 6.12 – Матрицы флуоресценции (ЕЕМ) раствора гемоглобина А) до и Б) после 5 часов облучения светодиодом с длиной волны 420 нм и мощностью 100 мВт. В) Спектры флуоресценции раствора гемоглобина, полученные при возбуждении на длине волны 405 нм до (черный) и после (красный) облучения. Г) Спектры поглощения раствора гемоглобина до (черный) и после (красный) облучения. Д) Кинетика релаксации флуоресценции облученного раствора гемоглобина, измеренная на длине волне возбуждения 405 нм (красный). Черным показана аппаратная функция установки, измеренная по сигналу комбинационного рассеяния воды.

Таким образом, кратко развитие исследования флуоресценции гемоглобина и оригинальный вклад данной работы можно изложить следующим образом. Возможность детектирования двухфотонной флуоресценции эритроцитов была показана в ряде работ [477,481–484], при этом также была установлена роль гемоглобина в формировании данного сигнала [482–484]. В работе [484] было показано, что растворы димера и мономера гема также обладают двухфотонной флуоресценцией, характеризующейся сверхбыстрым затуханием, в то время как для глобина (белковой матрицы) такого сигнала не наблюдалось. Природа двухфотонной флуоресценции гемоглобина тем не менее оставалась неясной, поскольку известно, что флуоресценция гемоглобина эффективно тушится из-за переноса электрона от порфирина к иону железа [485,486]. В то же время эффект двухфотонной флуоресценции гемоглобина использовался для визуализации сосудов у мышей [487], анализа морфологии эритроцитов при хранении [482], исследования локализации гемоглобина по эритроциту [488]. В ходе нашей работы было показано, что данный сигнал связан с необратимым образованием фотопродукта гемоглобина, который флуоресцирует и при одно-, и при двухфотонном возбуждении. Данная интерпретация была принята, в частности, группой, впервые обнаружившей эффект двухфотонной флуоресценции гемоглобина, в их статье 2020 года [487].

## **6.5 Метод ДФТ-FLIM для анализа периваскулярной зоны и диагностика отечного синдрома оптическими методами**

Интерес к исследованию капилляров верхнего слоя дермы методом ДФТ в нашей работе изначально был вызван результатами, полученными с помощью оптической капилляроскопии. А именно было установлено, что линейный размер области вокруг капилляров (периваскулярной зоны, ПЗ) является чувствительным индикатором степени хронической сердечной недостаточности (ХСН). Основной гипотезой на момент обнаружения данного факта являлось то, что размер ПЗ увеличивается за счет накопления воды в тканях, то есть определяется степенью отечности, возникающей при ХСН. В то же время понимания структуры и природы ПЗ на микроуровне не было, в связи с чем была поставлена задача об исследовании ПЗ методом ДФТ-FLIM. В разделе 6.4.1 будут изложены результаты, свидетельствующие о диагностической ценности параметров ПЗ в диагностике ХСН, в разделе 6.4.2 будут рассмотрены гипотезы о природе ПЗ и результаты, полученные при ее исследовании методом ДФТ-FLIM, а в разделе 6.4.3 будут представлены результаты по диагностике отечного синдрома другими оптическими методами.

### **6.5.1 Размер ПЗ как индикатор степени тяжести сердечной недостаточности**

Диагностика ранних стадий ХСН может быть затруднена из-за отсутствия специфических симптомов и объективных признаков заболевания, поэтому разработка новых методов диагностики сердечно-сосудистых заболеваний и мониторинга динамики их лечения является актуальной проблемой биомедицинской диагностики. Сердечно-сосудистые заболевания на самых ранних своих стадиях в той или иной степени оказывают влияние на микроциркуляторное русло [489,490]. Было показано, что параметры изображений, получаемых с использованием капилляроскопии, можно использовать для диагностики тяжести ХСН. В данной части работы была исследована чувствительность параметра ширины периваскулярной зоны, оцениваемой с помощью оптической капилляроскопии, в задаче предсказания риска ХСН у пациента. Работы по оптической капилляроскопии были выполнены совместно с группой проф. Ю.И. Гурфинкеля, в частности, измерения на пациентах были проведены в клинике ОАО РЖД; от всех испытуемых было получено информированное согласие. Ниже приведено краткое описание полученных результатов.

#### 6.5.1.1 Группы пациентов, участвовавшие в исследовании

В исследовании приняли участие 109 взрослых, в том числе 79 пациентов, страдающих сердечной недостаточностью I–III классов по классификации NYHA (New York Heart Association), и 50 здоровых добровольцев без клинических симптомов сердечно-сосудистых заболеваний. Все пациенты прошли стандартное клиничко-лабораторное обследование в соответствии с рекомендациями по ведению пациентов с сердечной недостаточностью [491]. Диагноз ХСН был установлен на основании наличия типичных симптомов и признаков ХСН, функциональные классы определялись согласно критериям NYHA. Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Подробно описание исследованной когорты пациентов представлено в работе [474].

Для выявления чувствительности и селективности размера ПЗ в определении тяжести ХСН проводился статистический анализ с использованием критерия Краскела-Уоллиса и дисперсионного анализа (ANOVA test), при этом исследовалась возможность соотнесения больного классу ХСН по NYHA с использованием ширины ПЗ как предсказательного параметра. Аналогичные тесты проводились для других параметров, как определенных с помощью капилляроскопии (плотность капиллярной сети, диаметры артериального, венозного и переходного отделов и их отношений), так и определенных независимыми методами (например, с использованием эхокардиографии – фракции выброса левого желудочка).

### 6.5.1.2 Размер ПЗ как индикатор степени тяжести ХСН

На рисунках 6.13А-Б показано типичное изображение капилляров ногтевого ложа здорового человека, полученное с помощью цифрового капилляроскопа с увеличением 125х и 400х. При малом увеличении можно наблюдать рисунок поверхностных (первый ряд) капилляров: петли капилляров имеют U-образную форму и параллельны поверхности и друг другу. Важно отметить, что у всех обследованных лиц наблюдалась светлая область вокруг капилляров, которая и идентифицировалась как ПЗ. Рисунок 6.13Б демонстрирует изображение капилляров, измеренное при большем увеличении (400х), где ПЗ более выражена и ее размер может быть количественно охарактеризован как расстояние между вершиной капиллярной петли и ее визуально наблюдаемой границей. Размер ПЗ определялся как среднее значение по крайней мере шести независимых измерений при 400-кратном увеличении для различных капилляров. Отметим, что при таком увеличении ПЗ выглядит как «капсула» вокруг капилляров, как показано красной кривой на рисунке 6.13Б и К10В, а при меньшем увеличении граница ПЗ может быть «сглажена» (рис. 6.13А).

В результате исследования было выявлено наличие достоверных различий линейных размеров ПЗ для групп пациентов с различной стадией ХСН. Так, размер ПЗ в первой группе составил  $107 \pm 13$  мкм, во второй -  $120 \pm 20$  мкм, а в третьей группе -  $151 \pm 21$  мкм (рис. 6.14А). Статистический анализ не выявил каких-либо существенных различий в размере ПЗ, связанных с возрастом, индексом массы тела, полом или другими клиническими или инструментальными параметрами. На рисунке 6.14Б также представлено разделение пациентов различной тяжестью ХСН на диаграмме, по осям которой стоят линейный размер ПЗ и фракция выброса левого желудочка.

Таким образом, было выявлено, что морфологические параметры периваскулярной зоны, а именно ее линейный размер, являются чувствительным индикатором тяжести ХСН. В то же время в литературе не было понимания того, чему именно морфологически соответствует ПЗ на изображениях, полученных методом оптической капилляроскопии. Для того, чтобы ответить на данный вопрос, были проведены исследования области ногтевого ложа методом ДФТ-FLIM.



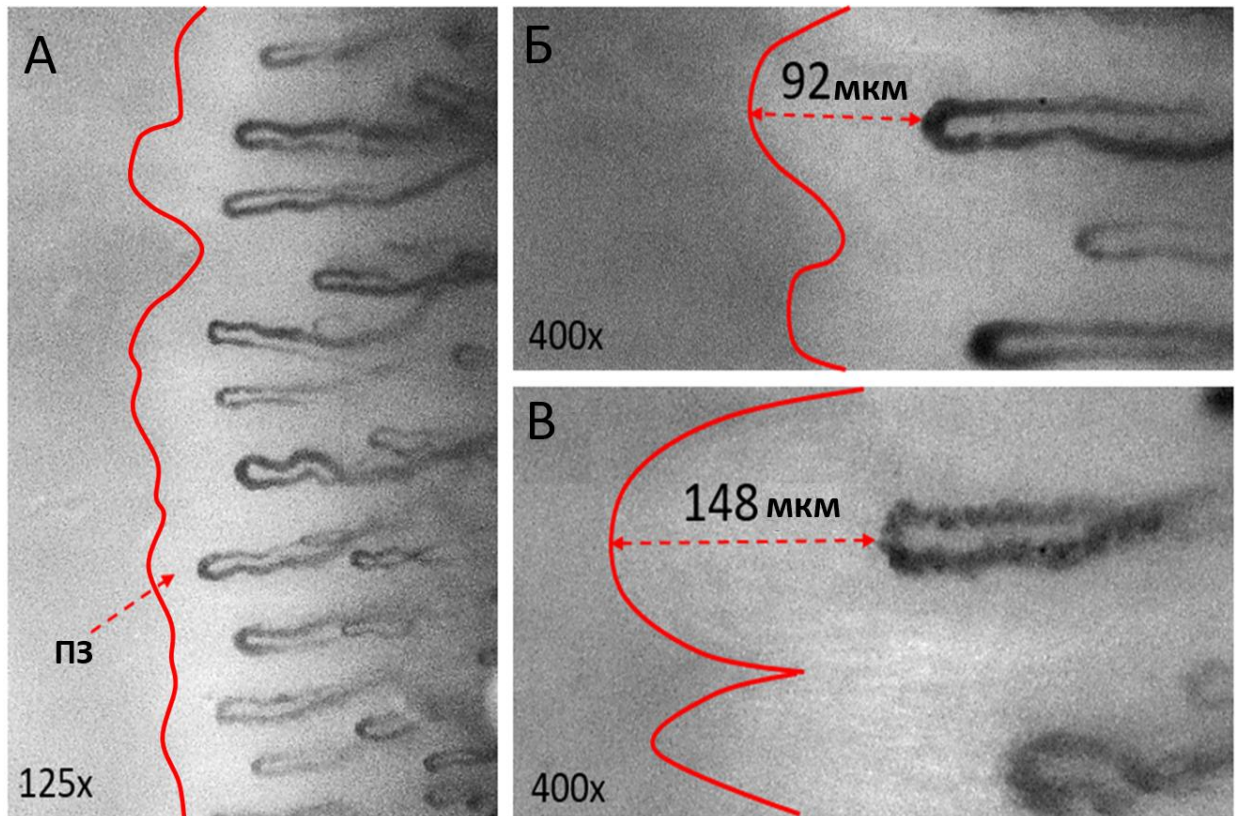


Рисунок 6.13 – А) Изображение капилляров ногтевого ложа, полученное при 125-кратном увеличении. Красные стрелки указывают периваскулярную зону (ПЗ) вокруг капилляров. Б-В) Изображения капилляров ногтевого ложа здорового человека и пациента с ХСН (класс III по NYHA), полученные при 400-кратном увеличении. Красные линии очерчивают контуры ПЗ, представляющей собой «капсулу» вокруг капилляра.

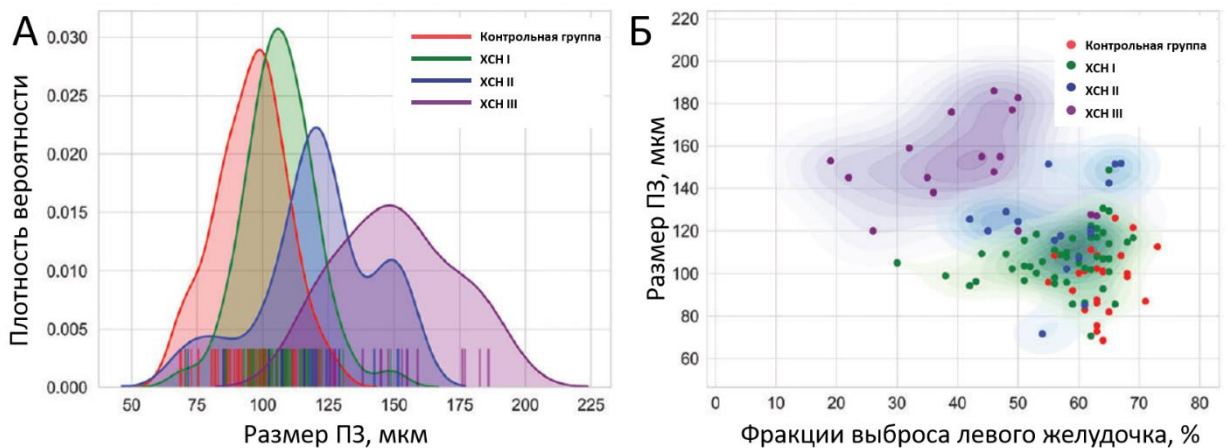


Рисунок 6.14 – А) Распределение испытуемых в контрольной и ХСН-группах по размеру ПЗ. Б) Двумерное распределение плотности пациентов в контрольной группе и группах пациентов с ХСН по размеру ПЗ и фракции выброса левого желудочка. Области, соответствующие одинаковой плотности, очерчены сплошными линиями.

## 6.5.2 Природа периваскулярной зоны: гипотезы и анализ методом ДФТ-FLIM

Схема ногтевого ложа представлена на рисунке 6.15А-Б. Капилляры расположены в сосочках, ориентированных параллельно поверхности кожи [492]. Рядом с папиллярным слоем дермы расположен эпидермис, внешним слоем которого является роговой слой, состоящий из корнеоцитов (мертвых кератиноцитов).

На рис. 6.15В показано изображение *in vivo* ногтевого ложа человека с использованием распределения сигнала ГВГ в XY, XZ и YZ плоскостях. Как видно, в ногтевом ложе в первом ряду (в непосредственной близости к ногтю) расположены слои папиллярных структур.

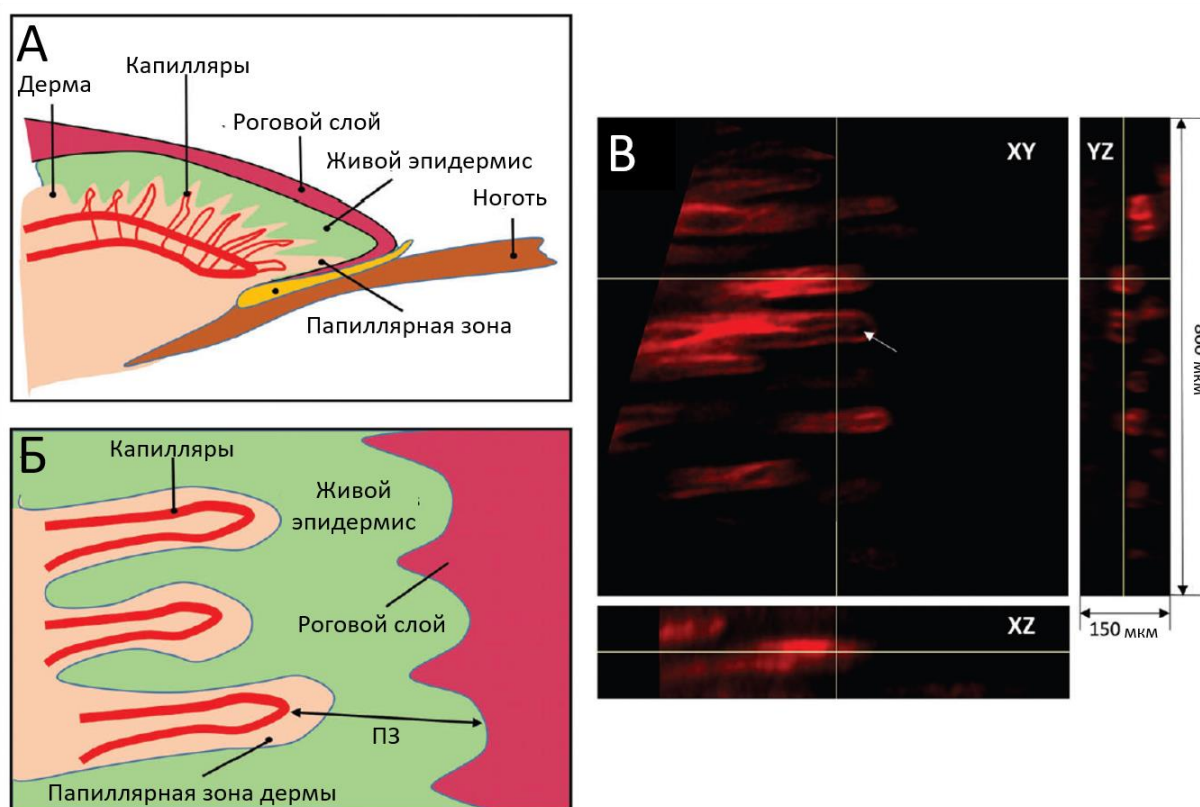


Рисунок 6.15 — А) Схема ногтевого ложа: вид сбоку (плоскость XZ). Б) Схема ногтевого ложа: вид сверху (плоскость XY). В) Изображение ногтевого ложа *in vivo*, полученное с использованием сигнала ГВГ от коллагена I типа в дерме. На рисунке представлены репрезентативные XY, YZ и XZ проекции, иллюстрирующие расположение сосочков папиллярной дермы в ногтевом ложе.

Репрезентативное изображение капилляров ногтевого ложа, полученное методом ДФТ-FLIM с использованием сигнала ГВГ (красный цвет) и двухфотонной флуоресценции (зеленый цвет), представлено на рисунке 6.16А.

Видно, что расстояние от переходного отдела капилляра, который можно визуализировать либо по быстрому затуханию флуоресценции методом FLIM (рис. 6.16Б), либо как темную «петлеобразную» область на изображениях ГВГ (рис. 6.16А), до границы сосочка, в

котором он расположен, составляет до 10 мкм, что значительно меньше типичного размера ПЗ (около 100 мкм). Наиболее соответствующей ПЗ по структуре областью является область живого эпидермиса – эта область хорошо видна на рисунке 6.16А, в ней расположены кератиноциты, флуоресценция которых при длине волны возбуждения 760 нм определяется, в основном, наличием НАД(Ф)Н. Граница, соответствующая роговому слою, четко контрастируется на изображениях ДФТ-FLIM как морфологически (пропадают кератиноциты), так и по параметрам флуоресценции. Расстояние от капилляров до рогового слоя, соответствующее области живого эпидермиса, составляет около 100 мкм, что близко к значениям ширины ПЗ.

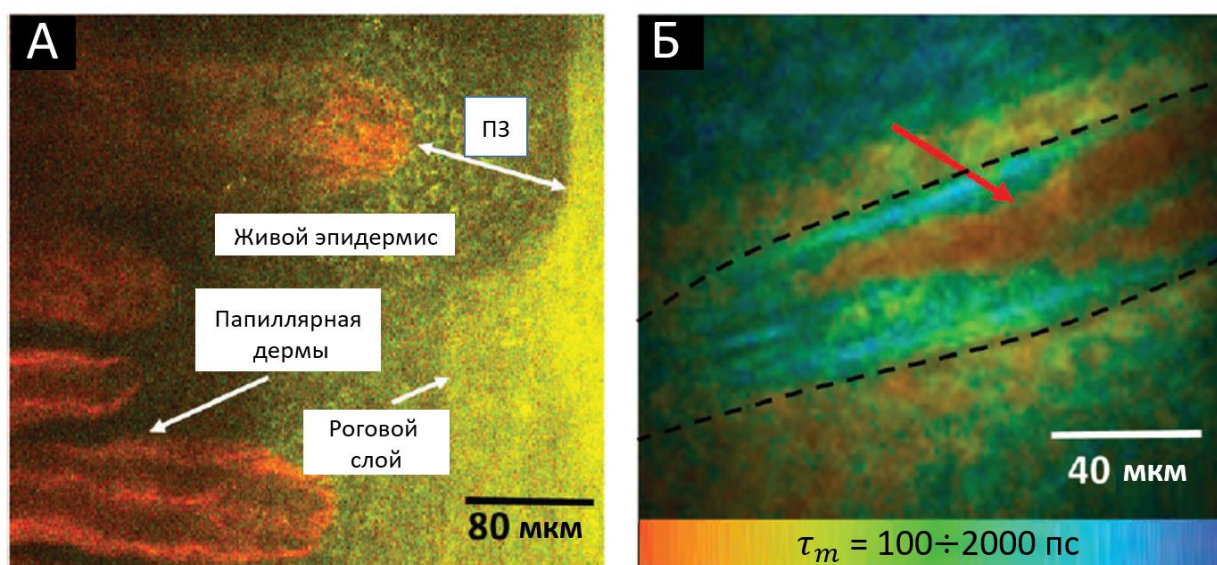


Рисунок 6.16 – А) Изображение ногтевого ложа *in vivo*, полученное методом ДФТ-FLIM. Красный цвет соответствует сигналу ГВГ от коллагена I типа, зеленый цвет соответствует двухфотонной флуоресценции клеток эпидермиса и кератина. Отмечены элементы, изображенные на схеме, представленной на рис. 6.15А-Б. Б) Карты среднего времени затухания флуоресценции капилляров ногтевого ложа. Черным пунктиром отмечен микрососуд. Стрелкой указана область короткого времени затухания флуоресценции, соответствующая сверхбыстрой флуоресценции гемоглобина.

Для того, чтобы убедиться, что область ПЗ соответствует живому эпидермису, было выбрано несколько капилляров, для которых были проведены измерения обоими методами: оптической широкопольной микроскопии (капиллярскопии) и ДФТ-FLIM. Репрезентативные изображения приведены на рисунке 6.17А-Б. Из них видно, что ширина ПЗ, определенная методом оптической капиллярскопии, соответствует расстоянию от конца капиллярной петли до рогового слоя. То есть у пациентов с большей тяжестью ХСН наблюдается увеличение размера живого эпидермиса в ногтевом ложе.



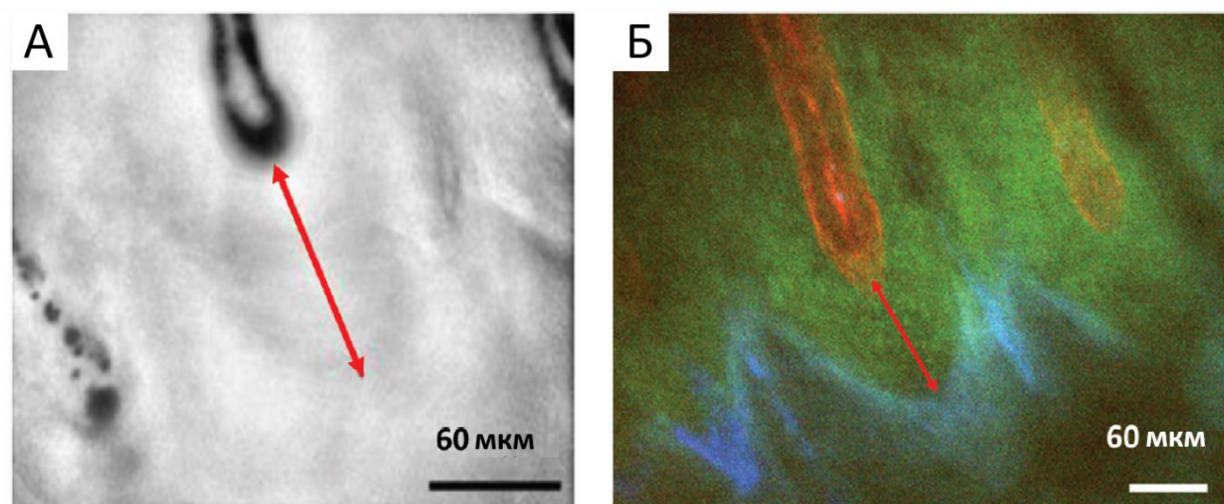


Рисунок 6.17 – А) Изображение капилляра, полученное методом широкопольной микроскопии в белом свете на отражение. Б) Изображение того же капилляра, что и на рас. К15в, полученное методом ДФТ-FLIM. Граница ПЗ соответствует границе живого эпидермиса.

В случае ХСН одним из наиболее важных патофизиологических процессов является изменение фракции выброса левого желудочка сердца, что приводит к сдвигу равновесия Старлинга в сторону роста выхода плазмы крови из капилляров и накопления жидкости в тканях. Таким образом, увеличение размера ПЗ у пациентов с ХСН может быть связано с накоплением межклеточной жидкости в живом эпидермисе.

Задержка внеклеточной жидкости с последующим клинически значимым отечным синдромом легко диагностируется на поздних стадиях ХСН, в то время как его обнаружение и количественное определение на ранних стадиях остается сложной задачей. В ряде исследований было показано, что многие пациенты с сердечной недостаточностью не имеют явных клинических признаков отеков. Многочисленные методы, включая простое взвешивание и более сложные подходы [493], были предложены для диагностики латентного отечного синдрома, но эта задача так и остается во многом нерешенной.

Подход, основанный на капилляроскопии, позволяет оценить накопление воды в жизнеспособном эпидермисе по его размеру, что позволяет использовать размер ПЗ как индикатор отечного синдрома. Увеличение размера ПЗ не является специфическим симптомом ХСН и может быть обнаружено при отечном синдроме другой этиологии (при хронической венозной недостаточности, системных заболеваниях соединительной ткани и т. д.) или пищевого происхождения (большое количество жидкости, повышенное потребление соли, алкоголя и т. д.). То есть одно только обнаружение увеличенного размера ПЗ не может быть достаточным для диагностики ХСН. Однако при наличии симптомов, указывающих на ХСН, размер ПЗ может быть использован как надежный количественный маркер эффективности лечения. Выявление отечного периваскулярного

синдрома у пациентов без клинических признаков ХСН может применяться как сигнал к диагностическому обследованию.

### **6.5.3 Анализ степени отечного синдрома и транскапиллярной диффузии оптическими методами**

Для проверки возможности использования ширины ПЗ как маркера отечности в динамике были проведены измерения с помощью двух методов. Первым из методов являлась венозная окклюзия – в работе [494] было предложено использовать венозный окклюзионный тест для оценки проницаемости капилляров путем анализа гематокрита до и после окклюзии. Вторым методом являлось нанесение гистамина, при котором возникает кожный отек, вызванный расширением сосудов [495].

Водный раствор гистамина (5 мг/мл) наносился на кожу добровольцев и вводился с помощью ионофореза, чтобы вызвать локальный отек. Нанесение гистамина проводилось в области ногтевого ложа безымянного пальца левой руки. Через 5–10 минут после нанесения гистамина наблюдался значительный местный отек с эритемой вокруг него.

В случае венозной окклюзии манжету надевали на верхнюю часть предплечья испытуемых, накачивали давление до 100 мм рт. ст. и поддерживали его в течение 5–7 мин. При этом предполагалось, согласно [494], что остановка венозного кровотока приведет к усиленному выходу жидкости (плазмы крови) из сосудов за счет повышенного давления.

Во время обоих тестов проводились измерения с помощью оптической капилляроскопии. Проверяемая гипотеза заключалась в том, что локальный кратковременный отек может проявиться в увеличении размера живого эпидермиса и, как следствие, размера ПЗ. В результате экспериментов было установлено, что размер ПЗ при венозной окклюзии остается неизменным, а при нанесении гистамина имеет место следующий эффект.

После нанесения гистамина изображения, полученные методом капилляроскопии, становились мутными, то есть наблюдалось уменьшение контраста видимости капилляров (рис. 6.18). Количественная оценка контраста изображения капилляров проводилась следующим образом. В качестве первого шага к изображениям применялся фильтр *difference of gaussians* со значениями параметров фильтрации  $\sigma_{\text{low}} = 0.5$  и  $\sigma_{\text{high}} = 8$ . Данный вид фильтрации с выбранными параметрами выполнял роль фильтра пространственных высоких частот и позволял обнаруживать только мелкие объекты с хорошо видимыми границами, такие как капилляры. На втором этапе вычислялось среднее абсолютное значение амплитуды отфильтрованного изображения, которое и рассматривалось как мера резкости изображения.

На рисунке 6.18А приведены изображения капилляров, полученные до и после нанесения гистамина, а соответствующая кинетика изменения резкости изображений приведена на рисунке 6.18Б. Видно, что резкость изображений сначала уменьшается с развитием локального отека, вызванного гистамином, а затем, по мере спадания отека, растет.

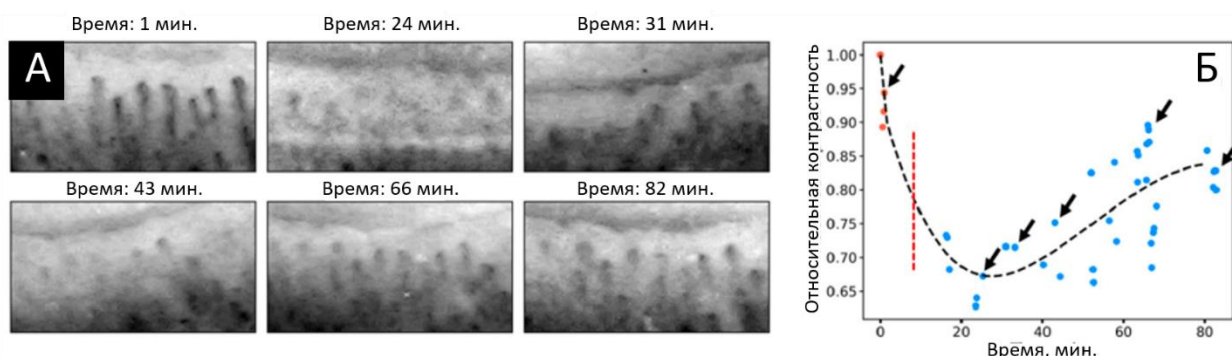


Рисунок 6.18 – А) Изображения капилляров ногтевого ложа человека, полученные с помощью капилляроскопии до и после нанесения гистамина. Б) Временная зависимость контрастности изображений во время нанесения гистамина. Каждая точка при одном и том же времени соответствует анализу различных изображений. Пунктирная черная линия представляет собой аппроксимацию зависимости резкости от времени полиномом третьего порядка с использованием метода наименьших квадратов. Вертикальная пунктирная линия обозначает время нанесения гистамина; черные стрелки соответствуют изображениям капилляров, представленных на панели (А).

Тот факт, что резкость изображений определяется содержанием воды во внеклеточном пространстве, можно объяснить тем, что глубина проникновения излучения и контраст изображения в тканях в основном определяются рассеянием света, которое, в свою очередь, зависит от разницы показателей преломления между структурами кожи [496]. Важно также, что в ряде статей, посвященных применению капилляроскопии, «мутность» изображений упоминается как индикатор отека [497–499]. Например, в статье о поражении микрососудов при COVID-19 признаки перикапиллярного отека описываются как «появление туманной области вокруг капилляров из-за скопления жидкости». Результаты, полученные при нанесении гистамина, находятся в согласии с этой интерпретацией. Таким образом, использованные модели краткосрочного отека (венозная окклюзия и нанесение гистамина) не повлияли на размер ПЗ, т. е. размер живого эпидермиса, который изменяется только при длительном отеке, например, при ХСН. Резкость изображения, в свою очередь, может использоваться как индикатор перикапиллярного отека в клинических условиях [473].

## Выводы

В рамках данной главы была продемонстрирована возможность оценки морфологических и молекулярных свойств строения кожи с помощью метода ДФТ-FLIM. В первую очередь, акцент был сделан на анализе свойств микрокапилляров кровеносного русла, находящихся

в приповерхностных слоях кожи. Была продемонстрирована возможность визуализации стенок сосудов, окружающих их тканей и клеток, находящихся в сосудах, с помощью двухфотонной микроскопии и эффектов генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции.

Был изучен вопрос формирования одно- и двухфотонной флуоресценции эритроцитов в экспериментах *in vitro*. Показано, что в результате облучения в эритроцитах происходит необратимое накопление флуоресцирующих фотопродуктов с характерным временем затухания флуоресценции менее 100 пс. Фотопродукты могут образовываться как в результате однофотонного поглощения в синей области спектра, так и при двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм характерной для экспериментов по наблюдению двухфотонной флуоресценции.

Измерения кинетики двухфотонной флуоресценции других компонент крови таких как нейтрофилов, эозинофилов и плазмы крови показано, что флуоресцентный отклик фотопродуктов в эритроцитах существенно отличается по временным характеристикам, таким образом при наблюдениях систем *in vivo* он может использоваться для селективного наблюдения эритроцитов.

Было показано, что сигнал двухфотонной флуоресценции фотопродуктов, накапливаемых в эритроцитах, может быть использован для задач визуализации *in vivo*. В частности, сверхбыстрый флуоресцентный отклик наблюдался в области, локализованной внутри капилляров ногтевого ложа.

Анализ микроскопических изображений, показал, что размер периваскулярной зоны - светлой области, наблюдаемой вблизи капилляров ногтевого ложа с помощью капилляроскопа - является чувствительным индикатором тяжести хронической сердечной недостаточности. Его значения для первой, второй и третьей групп ХСН составляют  $107 \pm 13$  мкм,  $120 \pm 20$  мкм и  $151 \pm 21$  мкм соответственно.

С помощью метода ДФТ-FLIM установлена природа формирования наблюдаемой периваскулярной зоны. Показано, что данная область связана с расширением области живого эпидермиса, окружающего капилляры “первого слоя”. При этом показано, что изменения ширины периваскулярной зоны, наблюдаемые у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, связаны с медленным накоплением воды в тканях, а отёки, возникающие краткосрочно, проявляются в изменении контрастности капилляров, наблюдаемых в отражённом свете с помощью оптической капилляроскопии, что связано с изменением локального показателя преломления среды за счёт выхода жидкости из капилляров в межклеточное пространство.

## **Глава 7. Метод FLIM в визуализации и анализе компонентов кожи *in vivo***

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A27-A29].*

### **7.1. Введение и постановка задачи**

Идеология использования метода FLIM для визуализации определенных структур в биологических тканях заключается в возможности идентификации объектов, содержащих вещества-флуорофоры, обладающих различающимися значениями параметров затухания флуоресценции. Данная информация используется в совокупности с информацией о морфологии объекта, т.е. о пространственном распределении интенсивности флуоресценции и локализации областей со схожими параметрами затухания флуоресценции. В качестве примера можно привести метод визуализации капилляров на изображениях ДФТ-FLIM, описанный в главе 6, когда область, соответствующая сосуду, видна по характерному быстрому затуханию флуоресценции (связанному с фотопродуктами гемоглобина).

Одним из преимуществ использования параметров релаксации флуоресценции в качестве контраста на изображении является их зависимость от типа флуорофора, его структуры и параметров его микроокружения. На основе этого принципа нами была предпринята попытка идентифицировать в коже микроструктуры, которые ранее не анализировались неинвазивно с помощью оптических методов, а именно, проанализировать белки внеклеточного матрикса, а также визуализировать и идентифицировать клетки в дерме.

В случае коллагена, основного белка внеклеточного матрикса, флуорофорами являются флуоресцентные сшивки, например, продукты окисления и гликирования аминокислот (см. Главу 1). Совокупность таких модификаций представляют собой гетерогенную систему флуорофоров, характеризующуюся набором времен затухания флуоресценции. Различия в первичной структуре белков и организации волокон естественным образом приводят к различиям в составе флуорофоров, что проявляется в параметрах FLIM. Использование таких отличий лежит в основе метода локализации белков внеклеточного матрикса на изображениях дермы, который был применен в данной главе (раздел 7.2, в основе которого лежит работа [477]). В случае коллагена типа I дополнительная верификация может быть получена путем наложения на изображение маски, соответствующей сигналу ГВГ, а в случае эластина – маски, соответствующей повышенному сигналу автофлуоресценции.

Отдельным направлением в литературе является применение FLIM для анализа типа и состояния клеток. При этом обычно используется АФ сигнал от молекул НАД(Ф)Н и флавинов, вовлеченных в клеточные метаболические процессы. Анализируя распределение параметров затухания флуоресценции, можно оценить метаболическую гетерогенность

клеточной популяции, а также выявить различные субпопуляции клеток. Для такого подхода остро стоит вопрос о технической возможности выделения групп клеток на изображениях со значимо отличающимися параметрами, то есть, выявления мультимодальности в распределении параметров затухания флуоресценции. Другими словами, необходимо определить, какой должна быть разница параметров между субпопуляциями, чтобы их можно было достоверно дифференцировать. Данная задача была решена в данной работе с использованием численного моделирования (раздел 7.3, в основе которого лежит работа [367]), после чего предложенные подходы к анализу данных были применены для анализа метаболической гетерогенности клеток *in vitro*.

Подходы, отработанные на клетках *in vitro*, были затем транслированы на анализ клеток кожи *in vivo* у людей на примере клеток в дерме. Задача анализа клеток дермы состоит из двух частей: (1) создание алгоритма идентификации единичных клеток на изображениях и (2) классификация обнаруженных клеток по данным FLIM. Указанные задачи решались для двух типов клеток – макрофагов и тучных клеток, а внутри этих типов клеток выделялись подтипы: макрофаги про- и противовоспалительного фенотипа и покоящиеся и дегранулированные тучные клетки. В разделах 7.4 (в основе которого лежит работа [500]) и 7.5 (в основе которого лежит работа [501]) данной главы будет показано, как с использованием распределения параметров релаксации флуоресценции при измерении ДФТ можно получить дополнительную информацию о состоянии компонентов кожи. Разработанный подход можно применить и к другим биотканям и их компонентам, например, для анализа опухолей.

Таким образом, основной идеей данной главы является создание и верификация методов визуализации и анализа различных структур в биологических тканях *in vivo* с использованием параметров затухания эндогенной флуоресценции в качестве контраста. Будет показано, что регистрация методом ДФТ сигнала от эндогенных флуорофоров и анализ параметров его релаксации позволяют при измерении *in vivo* у людей без использования окраски выделять компоненты, которые другими методами в аналогичных условиях исследовать затруднительно или невозможно.

## **7.2. Локализация молекулярных компонент в дерме *in vivo* с использованием параметров релаксации флуоресценции**

### **7.2.1 Оптическая спектроскопия компонентов внеклеточного матрикса**

Несмотря на то, что верхний (папиллярный) слой дермы идеально подходит для исследования методом ДФТ, число работ по его анализу значительно ниже, чем по анализу эпидермиса. Наиболее популярным направлением является анализ параметров волокон

коллагена типа I с использованием сигнала ГВГ, а также соотношения содержания эластиновых и коллагеновых волокон. Рассмотрим кратко возможности оптической спектроскопии и микроскопии для анализа указанных компонентов кожи.

Коллаген является наиболее распространенным белком в теле человека, его массовая доля составляет порядка 30% от всех белков. Молекулы коллагена, в зависимости от его структуры, разделяются на типы – I, II, III, IV, V и т.д., при этом характеристики соединительной ткани зависят от содержания различных типов коллагена, входящих в её состав. Так, коллаген типа I, локализованный в верхнем слое дермы, отвечает за упругие свойства кожи, при этом уменьшение его концентрации с возрастом или при фотодеградациии приводит к потере эластичности и упругости кожи (эластозу). Коллаген типа I является наиболее распространенным типом коллагена в соединительных тканях, а определение его концентрации и локализации является актуальной задачей дерматологии, косметологии и других областей медицины. При ряде патологий, в частности, остеогенезе, фиброзе и заживлении ран, часть коллагена I замещается коллагеном III, поэтому контроль данного процесса позволяет отслеживать процесс восстановления соединительной ткани [502]. Помимо различия, связанного с типом коллагена, на характеристики коллагеновых структур влияют также его возможные химические модификации. В частности, в процессе гликирования значительно меняются как структурные, так и оптические свойства коллагена[503–506].

В настоящий момент наиболее распространенным решением для визуализации и количественной характеристики коллагена являются иммуногистохимия и микроскопическое исследование с использованием специфичного окрашивания тканей [507,508]. В то же время активно развиваются методы биомедицинской диагностики, основанные на оптической спектроскопии. В частности, широкое применение для детектирования коллагена типа I и исследования его организации в ткани получил метод ГВГ.

Другим распространенным методом исследования коллагена является флуоресцентная спектроскопия. Коллаген различных типов, а также коллаген, полученный из различных источников, обладают отличающимися спектральными свойствами и временами жизни флуоресценции [509,510], однако, на данный момент не существует работ, в которых был бы реализован подход к разделению и локализации коллагена различного типа *in vivo*. Другой проблемой анализа времени затухания флуоресценции коллагена является противоречивый характер данных, представленных в литературе. Так, данные об абсолютных значениях времен жизни возбуждённого состояния различных типов коллагена значительно разнятся: например, в [511] показано, что коллаген обладает более

коротким временем жизни флуоресценции, чем эластин, в [512] показано, что короткая компонента в кинетике затухания флуоресценции коллагена и эластина практически одна и та же, тогда как медленная компонента для коллагена короче, а в [513] показано, что время жизни коллагена больше, чем у эластина. Таким образом, неинвазивной методики для визуализации анализа компонентов внеклеточного матрикса, включая коллагены разного типа, в литературе не представлено.

### **7.2.2 Анализ коллагенов и эластина в дерме методом ДФТ**

Для анализа возможности идентификации компонент внеклеточного матрикса, отличных от коллагена типа I и эластина с использованием ДФТ-FLIM *in vivo* проводились измерения в области внутренней стороны предплечья здоровых добровольцев. Аналогично работе по визуализации сосудов, изложенной в главе 6, измерения выполнялись с использованием системы DermaInspect (JenLab, Германия) и длины волны возбуждения 760 нм.

В отличие от измерений в области ногтевого ложа, описанных в предыдущей главе, где капилляры расположены параллельно поверхности кожи, в области предплечья они расположены перпендикулярно поверхности. Таким образом, послойное измерение срезов U-образных капиллярных петель должно давать сечение в виде двух небольших областей, характеризующихся быстрым затуханием флуоресценции (Рис. 7.1А). При визуализации дермы методом ДФТ-FLIM, где в качестве контраста используются интенсивность ГВГ, интенсивность двухфотонной АФ и параметры затухания флуоресценции, наблюдаются следующие основные закономерности.



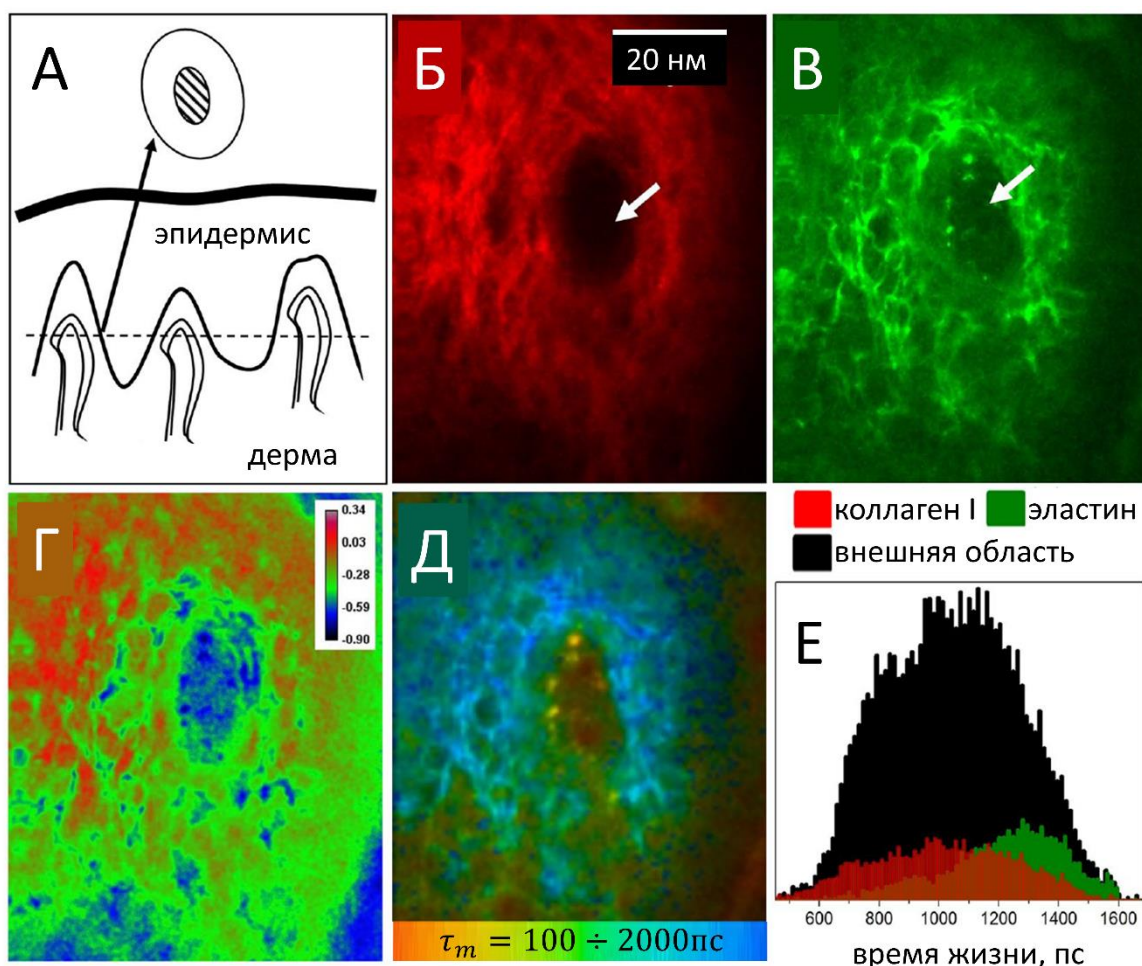


Рисунок 7.1 — А) Схематическое изображение структуры кожи и ее сечения в области папиллярной дермы, соответствующего изображениям, получаемым методом ДФТ-FLIM. Б) Изображение папиллярной дермы, полученное на глубине 60 мкм, в канале ГВГ. В) Изображение папиллярной дермы, полученное на глубине 60 мкм, в канале двухфотонной АФ. Г) Карта распределения параметра SAAID (отношение разности сигналов ВГ и АФ к сумме сигналов ВГ и АФ  $SAAID = (ВГ - АФ) / (ВГ + АФ)$ ) по папиллярной дерме. Д) Изображение папиллярной дермы, полученное методом FLIM – цветом кодировано значение среднего времени затухания флуоресценции в диапазоне от 100 до 2000 пс. Две красные точки в центре соответствуют поперечному сечению U-образного капилляра. Е) Распределение среднего времени жизни релаксации флуоресценции коллагена типа I (красный), эластина (зеленый) и всей области вокруг капилляра (черный).

Распределение сигнала ГВГ по папиллярной дерме (Рис. 7.1Б) соответствует коллагену типа I. На изображениях видна волокнистая структура, внутри которой находится темная область (отмечена стрелкой), соответствующая локализации капиллярной петли. В изображениях, на которых приведено распределение интенсивности двухфотонной АФ (Рис. 7.1В) также видны волокнистые структуры, которые, однако, не совпадают со структурами, характеризующимися интенсивной ГВГ. Согласно литературе, эти области соответствуют эластиновым волокнам, для которых характерна повышенная интенсивность АФ [514].

В работах по ДФТ кожи был ранее введен параметр SAAID (Second harmonics generation to Autofluorescence Aging Index of Dermis), определяемый как  $SAAID = (ВГ - АФ) / (ГВГ + АФ)$ , характеризующий соотношение коллагена и эластина в дерме. Меньшее значение данного индекса соответствует развитию процессов старения кожи, при которых содержание в ней коллагена понижается [514,515]. На рисунке 7.1Д приведено распределение индекса SAAID по папиллярной дерме, цветом представлены значения индекса от высоких (красный, больше коллагена) к низким (зеленый, больше эластина). Круглая область внутри изображения соответствует локализации капилляра, однако, как и в случае с ногтевым ложем, в явном виде он не заметен. При измерении FLIM становятся видны области с быстрым затуханием флуоресценции, соответствующие сосудам – так, в центральной области изображения (Рис. 7.1Д) видны две точки, соответствующие горизонтальному сечению U-образного капилляра.

Далее, для областей папиллярной дермы, характеризующихся высокими значениями сигналов ГВГ и АФ (15% наиболее интенсивных пикселей) были построены распределения среднего времени жизни флуоресценции, полученного в результате аппроксимации кинетик затухания флуоресценции биэкспоненциальным законом затухания с учётом свёртки с функцией отклика, и рассчитанного как  $\tau_m = (a_1\tau_1 + a_2\tau_2)/(a_1 + a_2)$  (Рис. 7.1Е). Видно, что области, соответствующие коллагену типа I (маска по сигналу ГВГ), характеризуются широким распределением среднего времени  $\tau_m = 1000 \pm 200$  пс, тогда как области, соответствующие эластину, характеризуются более медленным затуханием флуоресценции ( $\tau_m = 1300 \pm 100$  пс).

Более детальный анализ распределения времени жизни флуорофоров в дерме представлен на рисунке 7.2. Изображение папиллярного слоя дермы, полученное методом ДФТ-FLIM (Рис. 7.2А) было сегментировано следующим образом (Рис. 7.2Б): (1) желтая область соответствует «кольцу» вокруг сосочка, в котором наблюдается быстрое (с характерным временем около ширины аппаратной функции, менее 200 пс) затухание флуоресценции, связанное с наличием меланина в области базальной мембраны; (2) синие области соответствуют пикселям внутри сосочка, характеризующимся наибольшими значениями АФ (с интенсивностью более 0.8 от максимального значения интенсивности на изображении, то есть, предположительно, эластиновым волокнам); (3) красная область внутри папиллы соответствует низким значениям сигнала ГВГ (менее 10% от максимального значения интенсивности ВГ), то есть свободной от коллагена типа I «полости»; (4) черная область соответствует всей папиллярной дерме внутри «кольца» с быстрым затуханием флуоресценции (соответствующим меланину, выделенному желтым). Распределения параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $a_1$ ,  $\tau_m$  для областей (2)-(4)

представлены на рисунке 7.2В-Е, соответственно. Из представленных распределений видно, что причиной медленного затухания эластина является малый вклад амплитуды быстрой компоненты в кинетику релаксации ( $\sim 55\%$ ) в сравнении с другими молекулярными компонентами. Также интерес представляет тот факт, что в области внутри сосочка (область (3), красный на рисунке 7.2Б), где отсутствует сигнал ГВГ, наблюдается молекулярная компонента со средним временем затухания флуоресценции  $\tau_m = 700 \pm 100$  пс. Пик с быстрым ( $\tau_m < 200$  пс) затуханием флуоресценции в области (3) соответствует флуоресценции из области капилляров и связан с образованием фотопродуктов гемоглобина [177].

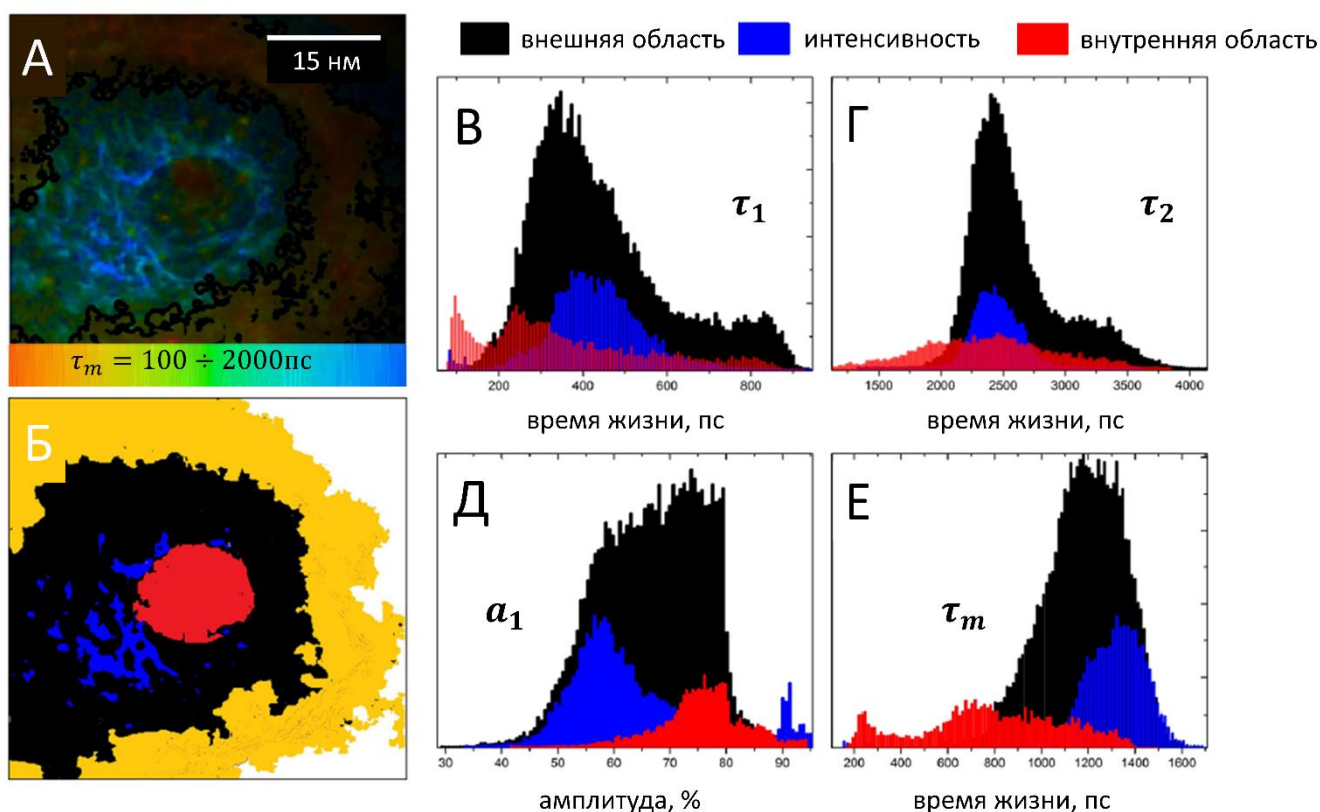


Рисунок 7.2 — А) Изображение папиллярного слоя дермы, полученное методом ДФТ-FLIM. Б) Сегментация изображения с панели А, детали сегментации описаны в тексте. В-Е) Распределения параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $a_1$ ,  $\tau_m$  для синей, черной и красной областей, отмеченных на панели Б.

По своим фотофизическим параметрам молекулярная компонента в области (3), отмеченной красным, отличается и от эластина (его флуоресценция интенсивнее и характеризуется более медленным затуханием) и от коллагена типа I (от него наблюдается сигнал ГВГ). Таким образом, применение ДФТ-FLIM позволяет выявить дополнительный флуорофор и соответствующую ему структуру в коже. Предположительно, в области (3) вокруг капилляра может находиться коллаген типа III, который не обладает сигналом ГВГ и является наиболее распространенным типом коллагена в папиллярной дерме после

коллагена типа I [516,517]. Таким образом, совместный анализ распределений ГВГ, двухфотонной АФ и параметров релаксации флуоресценции позволил идентифицировать компоненты внеклеточного матрикса и количественно охарактеризовать их оптические параметры.

Согласно полученным данным (Рис. 7.2), различия в параметрах затухания флуоресценции компонентов внеклеточного матрикса достаточно велики. Следующей решаемой задачей являлось детектирование и классификация клеток в дерме. Из литературы известно, что при двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм основным флуорофором в клетках является кофактор НАД(Ф)Н, параметры затухания флуоресценции которого определяются метаболическим состоянием клетки. Различия в параметрах затухания флуоресценции НАД(Ф)Н при воздействиях на клетку могут быть достаточно малыми, на уровне 100-200 пс для значений среднего времени жизни флуоресценции. В этой связи в следующем разделе мы обратимся к рассмотрению методов анализа данных FLIM и возможностям FLIM в исследовании метаболически гетерогенных субпопуляций клеток.

### **7.3. Анализ метаболической гетерогенности клеток методом FLIM – поиск клеточных субпопуляций**

#### **7.3.1 FLIM НАД(Ф)Н в анализе метаболического состояния клеток**

Обсудим кратко основные предположения из области фотофизики НАД(Ф)Н, на котором основано его использования в оптическом метаболическом имиджинге (МИ) – подробная информация по этим вопросам содержится, например, в обзорах [518–520], а также в нашем обзоре [521]. Принято считать, что сигнал флуоресценции клеток при двухфотонном возбуждении в области 700-760 нм связан, в основном, с НАД(Ф)Н. Идея использования FLIM для реализации МИ основана на предположении, что первая (быстрая) компонента в кинетике затухания флуоресценции связана со свободными молекулами НАД(Ф)Н, а за вторую (медленную) компоненту ответственны молекулы НАД(Ф)Н, связанные с ферментами клетки [520]. Для оценки метаболических изменений (редокс-статуса) в клетках используются соотношения амплитуд  $a_1/a_2$  (доля несвязанного НАД(Ф)Н) и время жизни второй компоненты  $\tau_2$  (которое определяет распределение связанной формы НАД(Ф)Н по различным ферментам) [520].

### 7.3.2 Постановка задачи детектирования метаболически различающихся субпопуляций клеток

Рассмотрим типичную задачу по анализу клеточных популяций, решаемую методом FLIM с использованием МИ. Для каждого пикселя изображения измеряется кинетика релаксации флуоресценции, из которой затем определяются параметры релаксации флуоресценции. В итоге для каждой клетки на изображении имеется набор параметров, определяемых кинетикой релаксации НАД(Ф)Н, связанных с ее метаболическим состоянием (рис. 7.3).

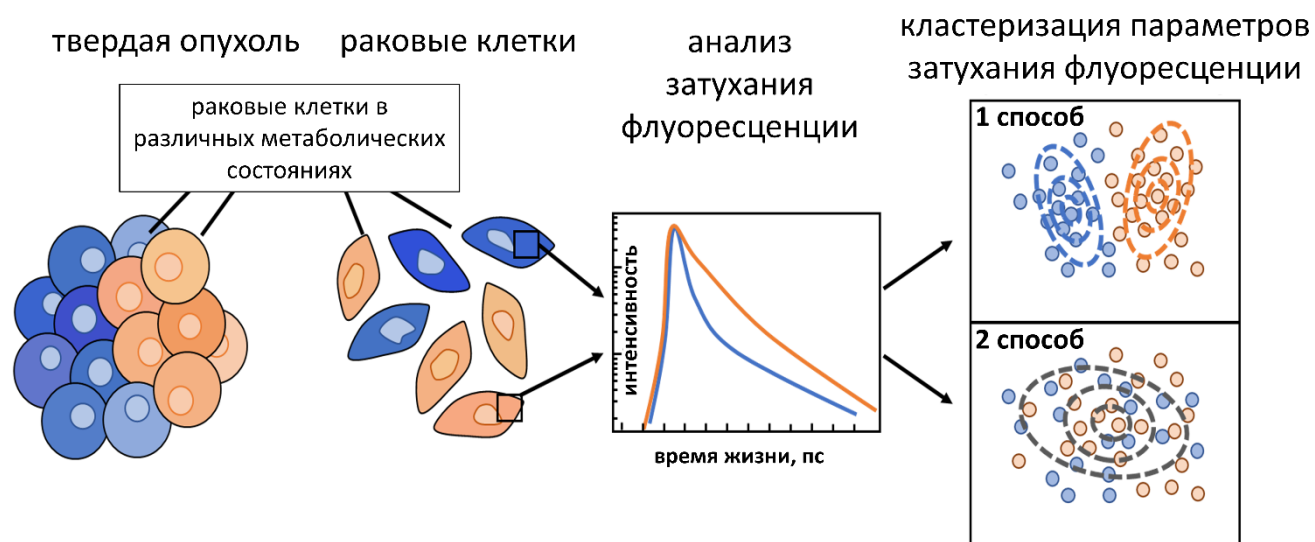


Рисунок 7.3 — Схема применения метода FLIM для поиска субпопуляций клеток. Изначально в общем ансамбле клеток присутствуют субпопуляции, различающиеся метаболическим состоянием. С помощью FLIM для каждого пикселя изображения измеряется кинетика затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, параметры которой отражают метаболические процессы с участием данной молекулы. Далее, для каждой клетки можно получить набор параметров релаксации флуоресценции НАД(Ф)Н, после чего могут быть использованы те или иные математические методы определения в распределении этих параметров мультимодальности и ответственных за нее субпопуляций клеток.

По ряду причин, например, из-за процессов дифференцировки, окислительного стресса и др., среди общего ансамбля клеток могут присутствовать субпопуляции, обладающие различным метаболизмом. Так, гетерогенность является характерным свойством клеток раковых опухолей, во многом определяющим их отклик на терапию. В литературе при анализе степени гетерогенности раковых клеток внимание уделяется, в том числе, их метаболической гетерогенности, которая определяется с использованием FLIM НАД(Ф)Н [522–529]. Другим примером задачи, в которой надо выделять подгруппы клеток, является анализ смеси клеток различного фенотипа – такая задача будет рассмотрена далее при обсуждении экспериментов по детектированию и классификации клеток в дерме *in vivo* и *ex vivo*.

Технически, основной задачей при поиске субпопуляций клеток с использованием данных FLIM с эндогенным контрастом является анализ распределений параметров затухания флуоресценции по всему изображению или по единичным клеткам на предмет мультимодальности. В данном разделе нами будет обсуждаться вопрос о том, насколько сильно должны отличаться параметры затухания флуоресценции в субпопуляциях клеток, чтобы их можно было достоверно разделить, а также какие методы анализа данных FLIM являются наиболее чувствительными к наличию субпопуляций. Анализ данного вопроса проводился с использованием численного моделирования, для этого генерировались данные FLIM для большого числа объектов (клеток), в которые закладывалось наличие субпопуляций, отличающихся распределением параметров флуоресценции.

### 7.3.3 Моделирование данных FLIM для оценки возможностей выделения субпопуляций клеток

Моделирование производилось следующим образом. На модельном изображении размером 512x512 пикселей генерировалось случайным образом положение  $N = 50$  клеток размером 45x45 пикселей, без пересечений (наложений) соответствующих областей. Внутри каждой клетки генерировалось ядро – область 20x20 пикселей в центре клетки. Далее всем пикселям фона (т.е. области, свободной от клеток) присваивались случайные значения параметров затухания флуоресценции  $\{a_1^{bg}, a_2^{bg}, \tau_1^{bg}, \tau_2^{bg}\}$  так, чтобы интенсивность фона в начальной точке кинетики была по крайней мере на порядок ниже интенсивности сигнала клеток. Параметры фона в отдельных пикселях имели разброс, а именно были распределены нормально, их среднеквадратичные отклонения составляли 15% от среднего значения.

Для моделирования межклеточной гетерогенности использовалась следующая процедура. В моделировании использовалось представление, что клетки относятся к двум субпопуляциям с отличающимися средними наборами параметров  $\{a_1^{cell}, a_2^{cell}, \tau_1^{cell}, \tau_2^{cell}\}_i$ , где индекс  $i$  нумерует субпопуляции, и принимает значения  $i = 1, 2$ . При моделировании в первую очередь клетки изображения случайным образом делились на две субпопуляции так, чтобы число клеток соответствовало заданным  $N_1$  и  $N_2 = N - N_1$ . После этого для каждой клетки в соответствующей субпопуляции выбирались случайные значения параметров затухания флуоресценции из нормального распределения со средним  $\{a_1^{cell}, a_2^{cell}, \tau_1^{cell}, \tau_2^{cell}\}_i$  и среднеквадратичным отклонением 15% от среднего значения. Таким образом, каждая клетка характеризовалась набором параметров  $\{a_1^{cell}, a_2^{cell}, \tau_1^{cell}, \tau_2^{cell}\}_{i,j}$ , где индекс  $j$  нумерует клетки в субпопуляции и  $j = 1..N_i$ . Для задания

внутриклеточной дисперсии параметров каждый пиксель внутри клетки заполнялся случайной величиной из нормального распределения со средним  $\{a_1^{cell}, a_2^{cell}, \tau_1^{cell}, \tau_2^{cell}\}_{i,j}$  и среднеквадратичным отклонением равным 15% от среднего значения. Среднеквадратичное отклонение в 15% от среднего было выбрано из тех соображений, чтобы межклеточная и внутриклеточная дисперсии были на уровне 100 пс, что соответствует наблюдаемым в литературе изменениям при измерении FLIM НАД(Ф)Н (см. таблицу 7.1).

Таблица 7.1. Характерные значения среднеквадратичного отклонения среднего времени жизни флуоресценции  $\sigma_{inter}$  внутри одной популяции и различия  $\Delta\tau_m$  между средними значениями популяций в экспериментах по анализу метаболической гетерогенности клеток с помощью FLIM.

Исследуемая система	Значения $\Delta\tau_m$ и $\sigma_{inter}$	Ссылка
Две субпопуляции раковых клеток (SKBr3 & MDA-MB-231)	$\Delta\tau_m = 450$ ps $\sigma_{inter} \sim 100$ ps	[530]
Ответ раковых клеток на химиотерапию	$\Delta\tau_m = 400$ ps $\sigma_{inter} \sim 100$ ps	[529]
Две клеточные культуры	$\Delta\tau_m = 300$ ps $\sigma_{inter} \sim 100$ ps	[531]
Ответ раковых клеток на химиотерапию	$\Delta\tau_m = 100$ ps $\sigma_{inter} \sim 100$ ps	[84]
Ответ раковых клеток на химиотерапию	$\Delta\tau_m = 370$ ps $\sigma_{inter} \sim 140$ ps	[526]

Типичные значения параметров затухания флуоресценции были выбраны из экспериментальных данных по FLIM клеток колоректального рака (клеточные линии HT29 и HCT119 [532]) и составляли в области внутри клеток для первой субпопуляции  $\{a_1^{cell} = 7, a_2^{cell} = 2.2, \tau_1^{cell} = 400$  пс,  $\tau_2^{cell} = 2700$  пс}, внутри ядер первой субпопуляции  $\{a_1^i = 3.5, a_2^i = 1, \tau_1^i = 400$  пс,  $\tau_2^i = 2200$  пс}; для фона  $\{a_1^i = 0.5, a_2^i = 0.5, \tau_1^i = 600$  пс,  $\tau_2^i = 3000$  пс}. Значения для второй субпопуляции выбирались так, чтобы среднее время затухания  $\tau_m = (\tau_1 \cdot a_1 + \tau_2 \cdot a_2)/(a_1 + a_2)$  отличалось от первой на заданную



величину, которая варьировалась в численном эксперименте. Для моделирования кинетики использовалось 100 временных бинов по 100 пс, в результате среднее число фотоотсчетов в пикселе для клетки составляло  $\sim 100$ , для ядра  $\sim 35$ , для фона  $\sim 15$ .

Далее для каждого пикселя вычислялась кинетика затухания флуоресценции  $I(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}$ , после этого для моделирования дробового шума полученное значение числа фотонов во временном бине  $I(t_k)$  заменялось на случайную величину, распределенную по Пуассону, с соответствующим средним значением:  $S(t_k) = \text{Poiss}(\lambda = I(t_k))$ . Для каждого численного эксперимента моделировалось по 10 изображений, суммарное количество клеток в выборке для каждого эксперимента составляло 500. Репрезентативные модельные кинетические кривые для области клетки вне ядра, ядра клетки и фона приведены на рисунке 7.4.

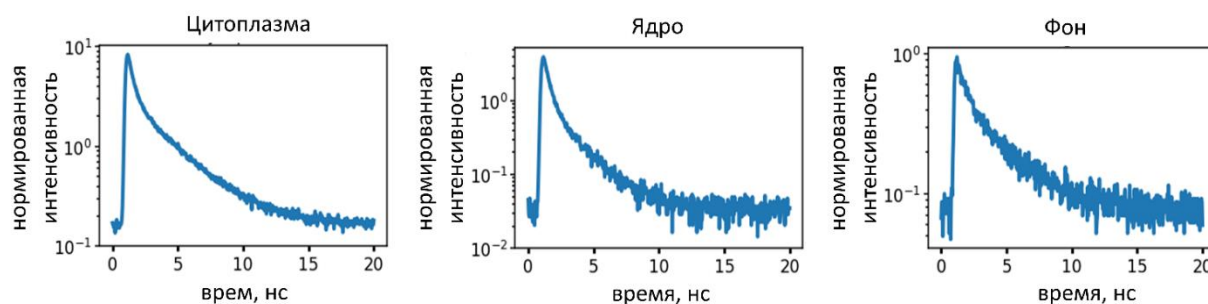


Рисунок 7.4 — Репрезентативные модельные кривые затухания флуоресценции для области цитоплазмы, ядра клетки и фона (области на изображении, свободной от клеток).

Для оценки чувствительности различных методов анализа данных FLIM применялся следующий подход. Управляющими параметрами моделирования служили  $\pi = N_1/(N_1 + N_2)$ , доля клеток в одной из субпопуляций относительно всех клеток (в силу симметрии этой величины относительно 0.5 при замене  $N_1$  и  $N_2$  анализировались значения параметра  $\pi$  в пределах от 0.5 до 0.9 включительно), и  $\Delta\tau_m$ , разница между средними значениями распределений  $\tau_m$  в двух субпопуляциях, которая варьировалась в пределах от 50 до 400 пс. Для оценки свойств распределения был выбран индекс бимодальности (BI, bimodality index), предложенный в работе [533]. Данный параметр был рассчитан для распределений FLIM-параметров, получаемых в результате работы трех алгоритмов, используемых для поиска мультимодальности в данных FLIM. А именно индекс бимодальности был оценен: (1) для одномерных распределений параметров затухания флуоресценции, полученных из аппроксимации кривых затухания, (2) для распределения C- и S- параметров затухания на двумерной фазовой плоскости и (3) для кривых затухания флуоресценции, кластеризованных методом K-средних. Рассмотрим использованные определения индекса бимодальности для каждого из трех упомянутых подходов.



В случае анализа распределений параметров затухания флуоресценции, в частности, среднего времени жизни флуоресценции  $\tau_m$ , для распределения  $\rho(\tau_m)$  выполнялась аппроксимация суммой двух нормальных распределений с центрами  $\tau_m^{(1)}$  и  $\tau_m^{(2)}$  и среднеквадратичными отклонениями  $\sigma^{(1)}$  и  $\sigma^{(2)}$ :

$$\rho(\tau_m) = \pi \cdot N(\tau_m^{(1)}, \sigma^{(1)}) + (1 - \pi) \cdot N(\tau_m^{(2)}, \sigma^{(2)}), \quad (7.1)$$

после чего выполнялся расчет ВІ по формуле:

$$BI = \sqrt{\pi(1 - \pi)} \cdot \frac{|\tau_m^{(2)} - \tau_m^{(1)}|}{\sqrt{\sigma^{(1)}\sigma^{(2)}}} \quad (7.2)$$

где  $\pi = \frac{N_1}{N_1 + N_2}$ .

В случае анализа данных FLIM на фазовой плоскости [464] расчет индекса бимодальности осуществлялся следующим образом. Распределение точек на фазовой плоскости в координатах  $(c, s)$ , полученного для множества кинетик, соответствующих набору анализируемых изображений, аппроксимировалось суммой двух двумерных нормальных распределений:

$$\rho(c, s) = \pi \cdot N(\overrightarrow{\mu^{(1)}}, \hat{\sigma}^{(1)}) + (1 - \pi) \cdot N(\overrightarrow{\mu^{(2)}}, \hat{\sigma}^{(2)}), \quad (7.3)$$

где  $N(\overrightarrow{\mu^{(i)}}, \hat{\sigma}^{(i)})$  – функция плотности двумерного нормального распределения.

Поскольку двумерное нормальное распределение в общем случае может быть «растянуто» вдоль направлений, не соответствующих координатным осям, дисперсия описывается матрицей ковариации размера  $2 \times 2$   $\hat{\sigma}^{(i)}$ . Для оценки общей дисперсии субпопуляции вычислялся корень из суммы квадратов собственных значений матрицы  $\sigma^{(i)}$ . После этого с использованием значений положения центров двух распределений  $(\mu_c^{(1)}, \mu_s^{(1)})$  и  $(\mu_c^{(2)}, \mu_s^{(2)})$ , а также параметров  $\sigma^{(1)}$  и  $\sigma^{(2)}$  величина индекса бимодальности рассчитывалась как

$$BI_{c,s} = \sqrt{\pi(1 - \pi)} \cdot \frac{\|\overrightarrow{\mu^{(1)}} - \overrightarrow{\mu^{(2)}}\|_{L_2}}{\sqrt{\sigma^{(1)}\sigma^{(2)}}} = \sqrt{\pi(1 - \pi)} \cdot \frac{\sqrt{(\mu_c^{(1)} - \mu_c^{(2)})^2 + (\mu_s^{(1)} - \mu_s^{(2)})^2}}{\sqrt{\sigma^{(1)}\sigma^{(2)}}}, \quad (7.4)$$

Третьим методом обработки данных FLIM для детектирования мультимодальности параметров затухания флуоресценции являлась кластеризация кривых затухания флуоресценции методом К-средних. При кластеризации данным методом кривые затухания флуоресценции нормировались на интервал  $[0,1]$ , чтобы исключить зависимость результатов кластеризации от интенсивности флуоресценции. Затем значения интенсивности в нормированных кривых затухания флуоресценции были прологарифмированы, чтобы уменьшить разницу между интенсивностями в разных временных интервалах и таким образом придать больший вес значениям интенсивности, получаемым для больших времен задержек между возбуждающим импульсом и моментом детектирования. После этого каждая кривая затухания флуоресценции рассматривалась как

объект с вектором признаков  $\{I(t_1), I(t_2), \dots, I(t_{100})\}$ , где  $I(t_i)$  соответствует преобразованной интенсивности во временном бине  $I(t_i)$ . Затем к матрице признаков объекта, состоящей из предварительно обработанных кривых затухания флуоресценции, был применен алгоритм кластеризации K-средних с двумя кластерами. Используя полученные метки кластеров для каждой кривой затухания и центроиды кластеров, то есть кривые затухания флуоресценции, усредненные в пределах каждого кластера, рассчитывался индекс бимодальности с использованием следующей процедуры.

Для каждого из полученных методом K-средних кластеров определялись внутрикластерные стандартные отклонения:

$$\sigma^{(1)} = \sqrt{\frac{\sum_{j \in \text{cluster } 1} \|y_j - y^{(1)}\|_{L_2}^2}{N_1}}; \sigma^{(2)} = \sqrt{\frac{\sum_{j \in \text{cluster } 2} \|y_j - y^{(2)}\|_{L_2}^2}{N_2}} \quad (7.5)$$

где суммирование производится по всем кривым затухания, относящимся к первому или второму кластерам,  $N_1$  и  $N_2$  – число кривых затухания в соответствующем кластере, а  $y^{(1)}$ ,  $y^{(2)}$  – центроиды кластеров.

Индекс бимодальности рассчитывался с использованием  $L_2$  расстояния между центроидами  $y^{(1)}$ ,  $y^{(2)}$  и значений стандартных отклонений  $\sigma^{(1)}$ ,  $\sigma^{(2)}$ :

$$BI_{Km} = \sqrt{\pi(1 - \pi)} \frac{\|y^{(1)} - y^{(2)}\|_{L_2}}{\sqrt{\sigma^{(1)}\sigma^{(2)}}}. \quad (7.6)$$

Для каждого из описанных методов обработки кинетик затухания флуоресценции было рассмотрено два подхода к анализу кинетических данных. Первый – анализ кинетик, полученных без сегментации изображения. Обычной процедурой предобработки при этом является «биннинг» или суммирование сигнала в соседних пикселях изображения в скользящем окне для увеличения сигнала в отдельных пикселях (с некоторой потерей пространственного разрешения). Типичными являются значения размеры окна от единиц до малых десятков пикселей. В нашем случае был рассмотрен вариант с биннингом в окне 9x9 пикселей. После биннинга, кинетики каждого пикселя анализировались с использованием трех описанных методов. Такой подход будет называться ниже анализом по всему изображению. Второй подход заключался в сегментации изображений с использованием известных из модели данных о локализации каждой клетки и фона и усреднении кинетик затухания по соответствующим областям. Аналогом такого подхода при обработке изображения будет предварительная разметка областей (ручная или алгоритмическая) с последующим усреднением.

Для оценки предсказательной способности использованных алгоритмов в обнаружении бимодальности в данных FLIM и метаболической гетерогенности была использована чувствительность (Sensitivity):

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN} \cdot 100\% \quad (7.7)$$

где TP – количество клеток (либо пикселей для случая анализа по всему изображению), правильно отнесенных к первой субпопуляции (истинно положительные, true positive), FN – количество клеток (пикселей) из первой субпопуляции, которые были неправильно отнесены ко второй субпопуляции (ложноотрицательные, false negative). В случае моделирования соответствие объекта (клетки или пикселя) определенному кластеру известно *a priori*, что позволяло рассчитать TP и FN.

Моделирование и анализ данных выполнялись с использованием программ, написанных на языке программирования Python 3.7 с использованием модулей Numpy, Scipy, Pandas и LmFit. В расчетах использовались реализации алгоритмов K-средних и максимизации ожидания из модуля Scikit-learn.

### **7.3.4 Сравнительный анализ методов обработки FLIM для оценки возможностей выделения субпопуляций клеток**

Рассмотрим основные результаты анализа возможностей детектирования мультимодальности (т.е., наличия субпопуляций клеток) в данных FLIM. На рисунке 7.5А схематически представлено распределение среднего времени жизни флуоресценции и определяемые из него параметры, используемые для расчета индекса бимодальности. Далее, на рисунке 7.5Б и 7.5В представлены распределения среднего времени жизни флуоресценции, полученные в результате численного моделирования для различных параметров  $\pi$  (доля клеток в одном из кластеров) и  $\Delta\tau_m$  (расстояние между центрами распределений параметров, задаваемое при моделировании), для анализа данных по отдельным клеткам и по всему изображению. Для каждого из смоделированных распределений был рассчитан индекс бимодальности. Случаи, когда  $BI > 1.1$  (бимодальность обнаружена) отмечены рамкой зеленого цвета, а  $BI < 1.1$  (бимодальности не обнаружено) – красного.

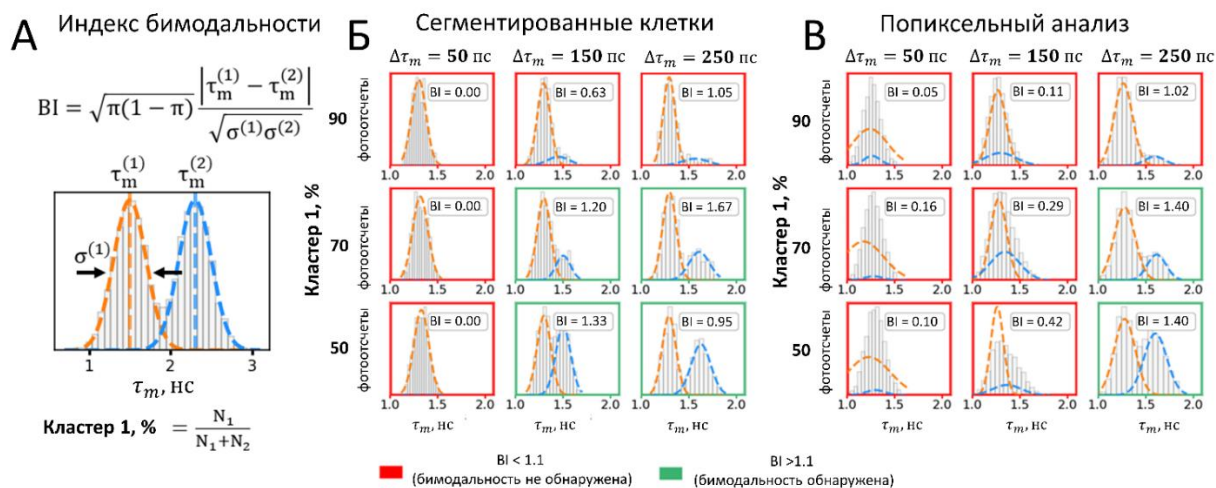


Рисунок 7.5 — Анализ распределений среднего времени жизни флуоресценции  $\tau_m$ , рассчитанных для различных значений управляющих параметров  $\pi$  (“Кластер 1, %” – доля клеток в одной из субпопуляций) и разницы между средними значениями  $\tau_m$  двух субпопуляций клеток ( $\Delta\tau_m$ ). А) Схематическое изображение бимодального распределения  $\tau_m$  и рассчитываемых для него параметров. Примеры модельных распределений  $\tau_m$ , рассчитанных для различных значений  $\pi$  и  $\Delta\tau_{mean}$  для обработки Б) по единичным клеткам и В) по всему изображению. Цвет рамки вокруг распределений соответствует значениям  $BI < 1.1$  (красный) и  $BI > 1.1$  (зеленый, наличие бимодальности).

Из рисунке 7.5 видны следующие основные закономерности: в случае больших различий между параметрами затухания флуоресценции  $\Delta\tau_m$  (~350 пс) в распределениях отчетливо видны две моды, а значения  $BI$  превышают 1.1. С уменьшением  $\Delta\tau_m$  пики в распределении сближаются,  $BI$  уменьшается, и кластеры становятся неразличимыми. Преобладание клеток в одном из кластеров ( $\pi \sim 90\%$ ) также значительно понижает  $BI$ . Важно отметить, что значения  $BI$ , рассчитанные для одинаковых параметров  $\pi$  и  $\Delta\tau_m$ , значительно выше в случае анализа по отдельным клеткам, чем по всему изображению по픽сельно. Таким образом, уменьшение внутриклеточной дисперсии и ошибки аппроксимации в случае анализа по отдельным клеткам приводит к лучшей способности алгоритма обнаруживать наличие двух кластеров (субпопуляций клеток) в системе.

Индекс бимодальности был также рассчитан для тех же модельных данных, что и на рисунке 7.5, при использовании метода фазовой плоскости для визуализации данных FLIM. На рисунке 7.6А представлена иллюстрация распределения параметров затухания FLIM на фазовой плоскости, а оранжевые и синие линии соответствуют аппроксимации этого распределения двумя двухмерными нормальными распределениями.

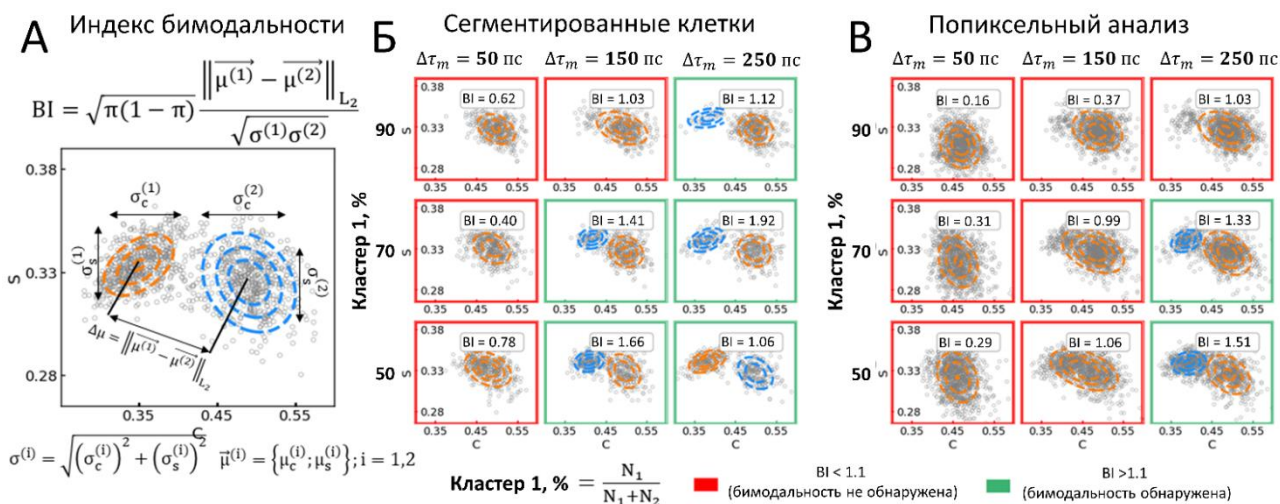


Рисунок 7.6 — Анализ бимодальности в данных FLIM с использованием метода фазовой плоскости. А) Схематическое представление распределения параметров затухания FLIM на фазовой плоскости и параметров, определяемых из данного распределения и используемых для расчета индекса бимодальности. Оранжевые и синие линии соответствуют аппроксимации двумя двумерными нормальными распределениями. Репрезентативные распределения параметров затухания флуоресценции на фазовой плоскости, рассчитанные для различных значения параметров  $\pi$  и  $\Delta\tau_m$  для обработки Б) по единичным клеткам и В) по всему изображению. Цвет рамки вокруг распределений соответствует значениям  $BI < 1.1$  (красный) и  $BI > 1.1$  (зеленый, наличие бимодальности).

Далее, на рисунке 7.6Б-В представлены распределения на фазовой плоскости, полученные путем анализа модельных кинетик, усредненных по отдельным клеткам и рассчитанные по всему изображению, соответственно. Аналогично обработке с использованием распределений времени жизни флуоресценции (Рис. 7.5) можно показать, что значения  $BI$  снижаются с уменьшением  $\pi$  и  $\Delta\tau_m$ , а также то, что анализ по отдельным клеткам является более чувствительным к наличию бимодальности в данных. Подробное сравнение алгоритмов, основанных на анализе распределений параметров затухания флуоресценции, полученных путем аппроксимации кинетических кривых, и анализа данных FLIM на фазовой плоскости, будет приведено ниже.

Третий метод анализа данных FLIM и поиска мультимодальности в данных заключался в использовании кластеризации кривых затухания флуоресценции методом К-средних. При этом кривые затухания флуоресценции группировались в два кластера в соответствии с расстоянием между ними в Евклидовом пространстве признаков, преобразованных по процедуре, описанных ранее. Далее для каждого кластера рассчитывалась средняя кривая затухания флуоресценции (центроид), а также разброс (среднеквадратичное отклонение) внутри кластера (Рис. 7.7А). Результаты применения кластеризации к модельным данным затухания флуоресценции для анализа по единичным клеткам и по всему изображению приведены на рисунке 7.7Б и В, соответственно.

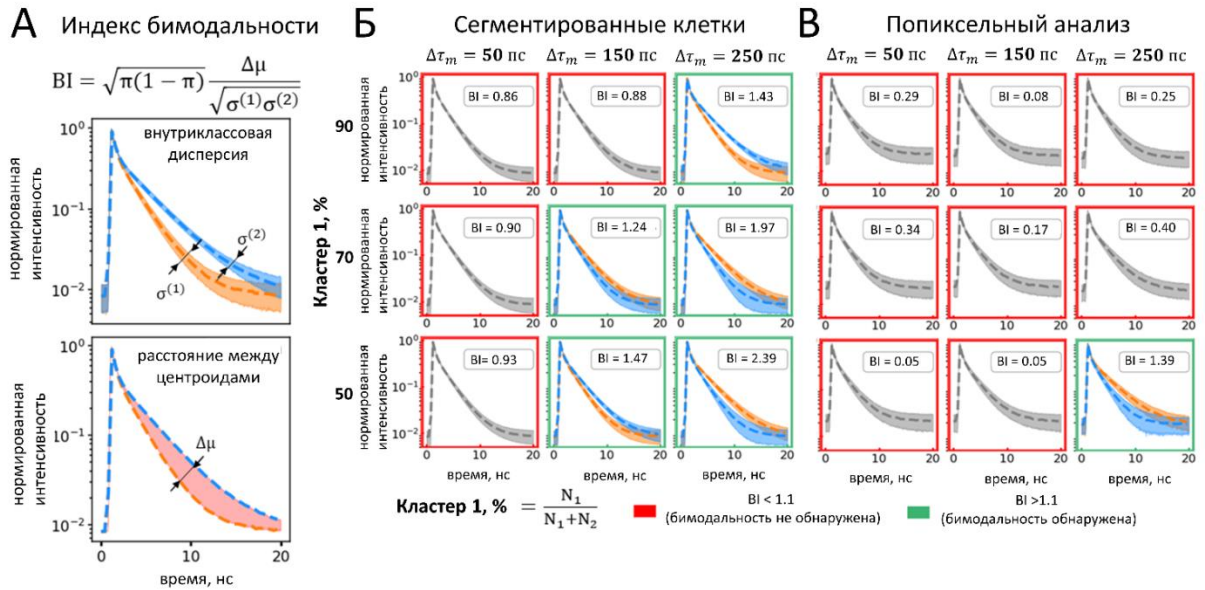


Рисунок 7.7 — Анализ бимодальности в данных FLIM с использованием кластеризации методом К-средних. А) Схематическое представление кластеризации кривых затухания флуоресценции и параметров кластеров, используемых для расчета индекса бимодальности. Примеры кластеризации кривых затухания флуоресценции для данных FLIM, рассчитанных для различных значения параметров  $\pi$  и  $\Delta\tau_m$  и обработки Б) по единичным клеткам и В) по всему изображению. Цвет рамки вокруг распределений соответствует значениям BI < 1.1 (красный) и BI > 1.1 (зеленый, наличие бимодальности).

Для сравнения трех рассмотренных методов анализа данных FLIM к наличию в данных мультимодальности была рассчитана метрика чувствительности, определяемая как доля клеток, правильно отнесенных к соответствующему кластеру. На рисунке 7.8 представлена зависимость точности от управляющего параметра  $\Delta\tau_m$  при трех значениях соотношения клеток в субпопуляциях  $\pi = N_1 / (N_1 + N_2) = 90, 70$  и 50%.

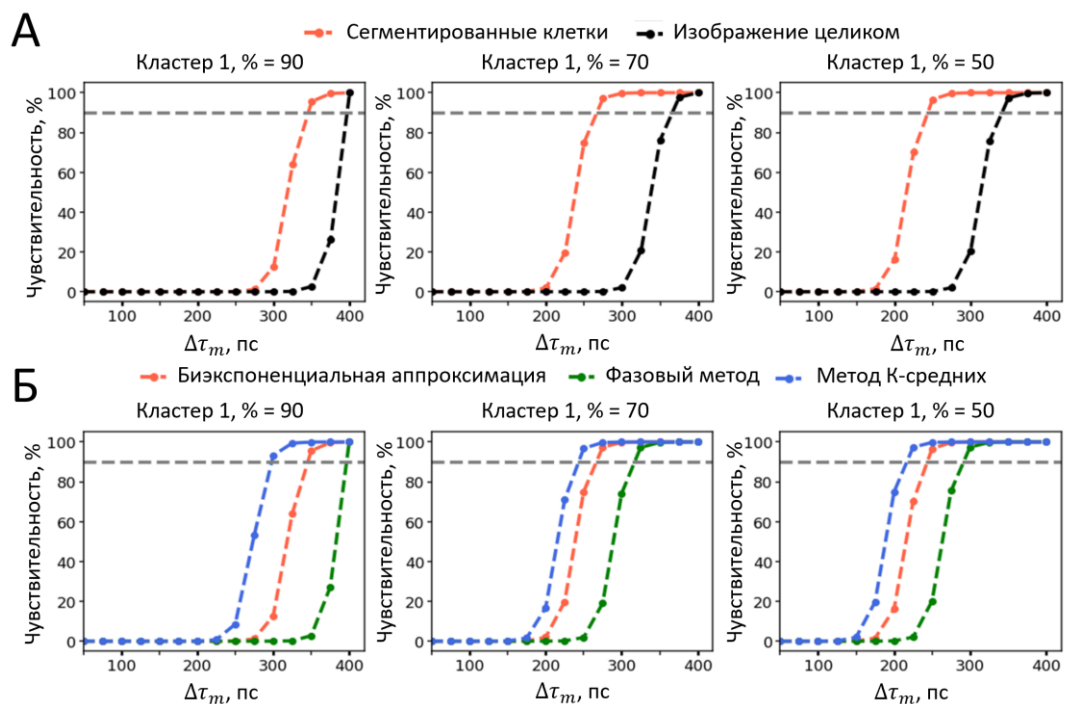


Рисунок 7.8 — А) Зависимость чувствительности идентификации кластера (субпопуляции), к которому принадлежит клетка, от разницы средних значений  $\Delta\tau_m$  в кластерах, полученная из распределений  $\tau_m$  и анализа по отдельным клеткам (оранжевая кривая) и по всему изображению (черная кривая). Б) Зависимость чувствительности идентификации кластера (субпопуляции), к которому принадлежит клетка, от разницы средних значений  $\Delta\tau_m$  в кластерах, полученная при поклеточном анализе тремя методами: из распределения параметра  $\tau_m$ , путем анализа параметров затухания флуоресценции (оранжевый) на фазовой плоскости (зеленый) и с помощью кластеризации методом К-средних (синий). Анализ выполнен для трех значений соотношения клеток в субпопуляциях  $\pi = N_1/(N_1 + N_2) = 90, 70$  и  $50\%$ .

Из результатов моделирования видно, что чувствительность поклеточного анализа всегда превосходит точность анализа по всему изображению, в связи с чем в дальнейшем для всех задач клетки на изображениях сегментировались и расчет параметров затухания флуоресценции производился для каждой клетки отдельно. Во-вторых, в результате моделирования было показано, что при значительном различии параметров затухания флуоресценции в кластерах  $\Delta\tau_m \sim 300$  пс все три метода анализа демонстрируют сравнимую чувствительность детектирования субпопуляций клеток, однако при слабых отличиях параметров точность методов значительно отличается. Так, при преобладании клеток в одном из кластеров ( $N_1/(N_1 + N_2) = 90\%$ ) точность  $90\%$  достигается при использовании кластеризации методом К-средних для значений параметра  $\Delta\tau_m$  на  $100$  пс меньших, чем при использовании анализа распределения параметров затухания флуоресценции на фазовой плоскости. Данный факт может оказаться важным в случае анализа метаболических различий у клеток при использовании FLIM НАД(Ф)Н, когда отличия параметров затухания флуоресценции клеток из двух субпопуляций малы.

Полученные результаты для анализа распределений параметров, получаемых по целому изображению и для распределений параметров для сегментированных областей, можно также пояснить следующим образом.

Ширина (дисперсия) распределения среднего времени жизни флуоресценции определяется совокупностью трёх факторов: (1) внутриклеточная дисперсия – так как любая клетка имеет внутреннюю структуру и различные части клетки могут обладать разными параметрами затухания флуоресценции, разброс параметров затухания флуоресценции по ним приводит к уширению дисперсии параметров затухания флуоресценции по клетке в целом, (2) межклеточная дисперсия: характеристика метаболической гетерогенности популяции клеток, (3) ошибка аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. Эти три величины дают вклад в общую дисперсию, получаемую при обработке изображения. Предпочтение между анализом по отдельным клеткам и анализом по всему изображению будет отдаваться



тому методу, который характеризуется наименьшей дисперсией распределения, так как при этом более высокой будет достоверность кластеризации клеток по субпопуляциям. При поклеточном анализе для каждой клетки усредняется большее число кинетических кривых, что минимизирует внутриклеточную дисперсию. Межклеточная дисперсия является характеристикой гетерогенности ансамбля клеток и не зависит от способа обработки FLIM (по единичным клеткам или по всему изображению). Наконец, ошибка аппроксимации зависит напрямую от количества фотонов в кинетике, соответственно, она будет меньше в случае поклеточного анализа, когда кинетика затухания флуоресценции усредняется по всей площади клетки. Таким образом, дисперсия распределения при поклеточном анализе будет существенно меньше за счёт минимизации ошибки аппроксимации и внутриклеточной дисперсии. В эксперименте зачастую реализуется типичная ситуация, при которой ширина распределения при анализе всего изображения оказывается больше разницы в значениях параметров между самими кластерами, в результате чего решение задачи выявления субпопуляций клеток становится невозможным. Соответственно, для анализа гетерогенности ансамбля клеток и выявления мультимодальности в данных FLIM критичной является сегментация клеток на изображениях.

Возможность классификации клеток по типам (кластерам) с использованием FLIM и сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н была нами в дальнейшем использована для анализа клеток в дерме *in vivo* методом ДФТ. А именно, анализировались клетки двух типов: макрофаги и тучные клетки, а также их субпопуляции. Отметим, что ранее задача о визуализации клеток в дерме у людей *in vivo* ранее не решалась, а в случае работы с лабораторными животными для аналогичных целей используются экзогенные метки. Данный факт связан, в том числе, с необходимостью четкого соотнесения оптических параметров клеток с их типом, для чего требуется измерение более специфичных параметров, чем интенсивность флуоресценции. В данной работе для решения задачи классификации использовался метод FLIM. Опираясь на описанные результаты моделирования, для исследования распределений параметров и выявления субпопуляций использовался подход с расчетом средних кинетик по областям соответствующим клеткам с последующим применением биэкспоненциальной аппроксимации и анализа кинетик на фазовой плоскости.



## 7.4. ДФТ-FLIM для визуализации и анализа макрофагов *in vitro* и в коже *in vivo*

### 7.4.1 Основные свойства макрофагов в дерме

Как было рассмотрено выше, метод ДФТ при анализе кожи ориентирован, в основном, на эпидермис, и большая доля работ посвящена метаболическому имиджингу кератиноцитов, в том числе, для решения задач онкодерматологии [534,535]. В то же время ряд важных физиологических процессов в коже в норме и патологии связан с клетками в дерме, визуализация и анализ состояния которых *in vivo* на людях является актуальной нерешенной задачей. В данном и последующем разделах будут представлены результаты решения этой задачи с помощью ДФТ-FLIM и анализа параметров затухания эндогенных флуорофоров как дискриминирующих признаков на примере макрофагов и тучных клеток. Макрофаги (МФ) являются важными иммунными клетками в тканях и органах, являющихся «границей» с окружающей средой – например, в кишечнике, дыхательных путях и в коже [536]. МФ в коже дифференцируются из моноцитов, попадающих из кровотока в дерму [537], и располагаются, в основном, в папиллярной и ретикулярной дерме в непосредственной близости от кровеносных сосудов [538].

Гетерогенность МФ с точки зрения их морфологии, локализации в тканях и свойств окрашивания (то есть, экспрессии различных поверхностных рецепторов) известна более 30 лет [538]. Сравнительно недавняя классификация МФ основана на их функции: в первом приближении, МФ подразделяются на два фенотипа, называемые провоспалительными макрофагами, М1, и противовоспалительными макрофагами, М2 [539] (Рис. 7.9). Макрофаги поляризуются в фенотип М1 при воздействии интерферона- $\gamma$ , липополисахаридов и фактора некроза опухоли. Поляризация в фенотип М2 происходит в ответ на интерлейкины (ИЛ) ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-33.

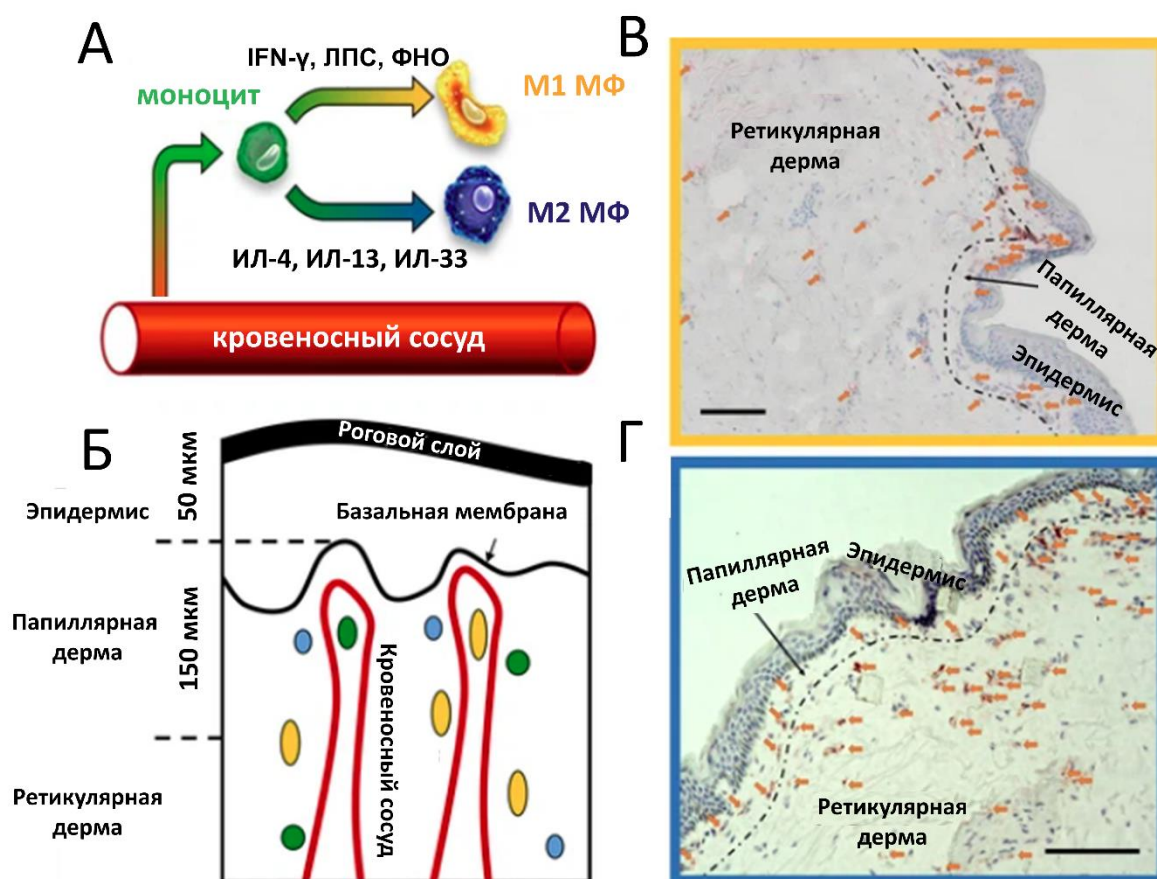


Рисунок 7.9 — А) Схематическое изображение инфильтрации моноцитов (МО) в ткани и дальнейшей поляризации макрофагов (МФ) в сторону фенотипа М1 при воздействия факторами  $IFN-\gamma$ , липосахаридами (ЛПС) и фактором некроза опухоли (ФНО) и в сторону фенотипа М2 путем воздействия ИЛ-4, ИЛ-13 и ИЛ-33. Б) Схематическое изображение структуры кожи, где в дерме отмечены моноциты (зеленый), М1 и М2 макрофаги (желтый и синий, соответственно). Пунктирными горизонтальными линиями условно отмечены границы папиллярной дермы. Иммуногистохимический анализ криосрезов кожи толщиной 10 мкм, в которых окрашены В) макрофаги фенотипа М1 антителами CD68 и Г) макрофаги фенотипа М2 антителами CD163. Макрофаги отмечены оранжевыми стрелками, пунктирная линия соответствует условной границе папиллярной дермы.

Роль макрофагов и их фенотипов М1 и М2 в различных заболеваниях кожи является предметом активных исследований. Экспериментальные методы этих исследований включают количественную оценку числа МФ в здоровой коже человека, а также в поврежденной и неповрежденной коже пациентов с кожными заболеваниями. В настоящее время наиболее распространенным подходом является получение биопсии кожи и визуализация макрофагов и их фенотипов с помощью иммуногистохимии. Однако биопсия кожи имеет несколько важных ограничений, в том числе рубцевание, риск инфекции и кровотечения. Также возможна ложная интерпретация результатов, связанная с использованием местной анестезии. Кроме того, гистопатологические анализы биопсий кожи не подходят для характеристики функций макрофагов, таких как фагоцитоз, и для

долгосрочного мониторинга распределения макрофагов в коже. В данном подразделе будут изложены результаты работы по детектированию макрофагов в коже *in vivo* методом ДФТ-FLIM.

#### 7.4.2 Возможности анализа свойств макрофагов методом FLIM: литературные данные

Как было изложено в разделе 7.3, идея использования FLIM для анализа типа клеток и различий их состояния основана, в первом приближении, на гипотезе о различии в параметрах флуоресценции кофакторов НАД(Ф)Н. Данное различие может появляться, например, за счет изменения вкладов свободной и связанной форм НАД(Ф)Н в кинетику затухания флуоресценции (соотношение  $a_1/a_2$ ), перераспределения связанных молекул НАД(Ф)Н по различным ферментам, приводящего к изменению времени затухания флуоресценции  $\tau_2$ , изменения доли окисленной и восстановленной форм НАД(Ф)Н в результате вариации уровня метаболизма, приводящего к изменению интенсивности флуоресценции. В литературе имеется ряд работ, в которых данная логика применяется к макрофагам *in vitro* и *in vivo* на лабораторных животных.

Возможность разделения M1 и M2 макрофагов по параметрам затухания их флуоресценции была продемонстрирована в [540]. Было установлено, что M1 и M2 макрофаги характеризуются более быстрым и медленным затуханием флуоресценции, соответственно. В работе [541] также была продемонстрирована возможность разделения макрофагов по фенотипам с использованием ДФТ-FLIM и таких параметров как доля связанной формы НАД(Ф)Н, редокс-соотношение (ФАД/(ФАД + НАД(Ф)Н)). Возможность разделения фенотипов макрофагов *in vitro* методом ДФТ-FLIM была также показана в работе [542]. В работе [543] был предложен метод детектирования опухоль-ассоциированных макрофагов *in vivo* в модели рака груди на мышах. В статье [544] исследовались метаболические различия в резидентных и опухоль-ассоциированных макрофагах методом FLIM *in vivo* на лабораторных животных. Опухоль-ассоциированные макрофаги характеризовались пониженным редокс-соотношением (НАД(Ф)Н/ФАД) в сравнении с резидентными макрофагами в коже, помимо этого, среднее время жизни и НАД(Ф)Н, и ФАД было выше в резидентных макрофагах в дерме.

Таким образом, из литературы следует, что метод ДФТ-FLIM дает принципиальную возможность классифицировать макрофаги по фенотипу *in vitro* и *in vivo*. В связи с этим нами была поставлена ранее не рассмотренная в литературе задача о реализации метода для детектирования макрофагов, а также анализа их фенотипа (M1/M2) *in vivo* в коже человека. Последовательность действий при этом была следующей.

Во-первых, были исследованы методом ДФТ-FLIM макрофаги кожи человека *in vitro* на предмет их флуоресцентных свойств и возможности разделения сигнала их флуоресценции от других клеток дермы (фибробластов, тучных клеток и дендритных клеток) и компонентов внеклеточного матрикса. Далее, с использованием параметров затухания флуоресценции, измеренных *in vitro*, были идентифицированы клетки в биоптатах кожи человека, соответствующие по значениям макрофагам *in vitro*, и данное соответствие было подтверждено с помощью иммуногистохимической окраски. Наконец, с использованием данных, полученных *in vitro* и *ex vivo*, были выделены макрофаги в коже людей *in vivo*, которые были далее исследованы на предмет гетерогенности популяции.

### 7.4.3 Анализ распределения параметров затухания флуоресценции макрофагов *in vitro*

Первым шагом исследований являлся анализ параметров затухания флуоресценции макрофагов *in vitro*. Сначала исследовались моноциты – клетки, которые, попадая в ткань из сосудов, могут дифференцироваться в макрофаги. Изображения FLIM моноцитов, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови человека, и соответствующие им параметры затухания флуоресценции приведены на рисунке 7.10.

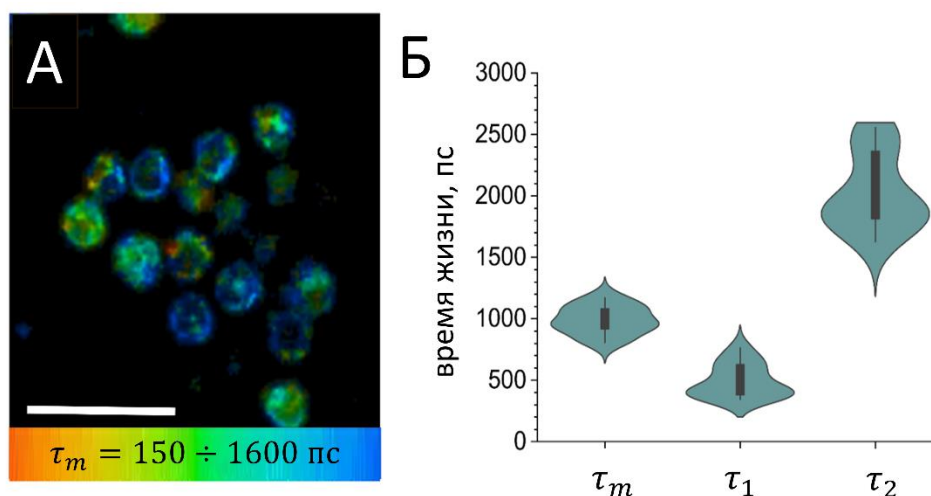


Рисунок 7.10 — А) ДФТ-FLIM изображение моноцитов, выделенных из периферической крови человека. Цветом кодировано среднее время жизни флуоресценции. Б) Распределения параметров затухания флуоресценции, полученные для моноцитов *in vitro*.

Моноциты имели круглую форму с диаметрами до 10 мкм. Макрофаги, дифференцированные из моноцитов и поляризованные в фенотип M1 интерфероном- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ;  $n = 21$ ) и в фенотип M2 интерлейкином-4 (ИЛ-4;  $n = 27$ ), существенно не отличались значениями диаметров, которые менялись в диапазоне от 10 до 12 мкм (Рис. 7.11А-В). Макрофаги M1 и M2 характеризовались сравнимыми значениями интенсивности флуоресценции, при этом параметры затухания их флуоресценции значительно отличались. Так, среднее время затухания флуоресценции было значительно короче у макрофагов

фенотипа М1 ( $\tau_m = 479 \pm 106$  пс,  $n = 21$ ), чем у М2 ( $\tau_m = 1185 \pm 170$  пс,  $n = 27$ ;  $p < 0,05$ ), и оба фенотипа макрофагов значительно отличались по своим параметрам затухания флуоресценции от моноцитов ( $\tau_m = 989 \pm 111$  пс,  $n = 15$ ;  $p < 0,05$ ; таблица 7.2). Полученные тренды в изменении параметров затухания флуоресценции макрофагов при их поляризации *in vitro* находятся в соответствии с литературными данными [545].

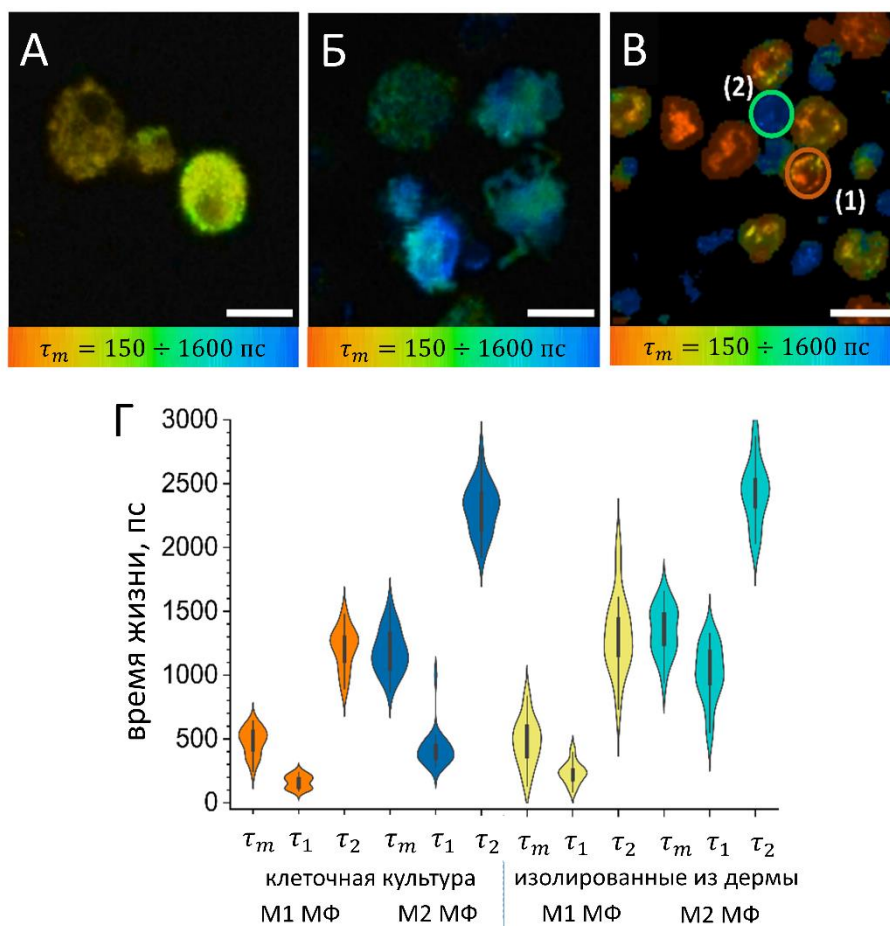


Рисунок 7.11 — Изображения ДФТ-FLIM, на которых цветом кодировано среднее время жизни флуоресценции  $\tau_m$ , для А) макрофагов, полученных из моноцитов и поляризованных в фенотип М1 путем воздействия IFN- $\gamma$ , Б) макрофагов, полученных моноцитов и поляризованных в фенотип М2 путем воздействия ИЛ-4, В) макрофагов, выделенных из кожи человека, показаны субпопуляции, соответствующие фенотипу М1 (оранжевая окружность) и М2 (зеленая окружность). Отмеченный масштаб соответствует 10 мкм. Г) Распределение параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_m$  для полученных из моноцитов М1-поляризованных ( $n = 21$ , оранжевый), М2-поляризованных ( $n = 27$ , темно-синий) макрофагов и выделенных из дермы М1-поляризованных ( $n = 34$ , желтый) и М2-поляризованных ( $n=28$ , голубой) макрофагов.

Далее были проанализированы макрофаги, выделенные из дермальной ткани из области века. При этом проводились как измерения с помощью ДФТ-FLIM, так и анализ с использованием иммуногистохимической окраски. Анализ данных FLIM выявил наличие двух субпопуляций клеток, а именно кластер 1 ( $n = 34$ ) с более высокой интенсивностью флуоресценции ( $\approx 3000 \pm 500$  фотонов / мВт) и с более коротким временем жизни и кластер

2 ( $n = 28$ ), характеризующийся меньшей интенсивностью флуоресценции ( $\approx 800 \pm 200$  фотонов / мВт) и большими временами затухания (Рис. 7.11). По параметрам затухания флуоресценции эти две субпопуляции дермальных макрофагов были подобны M1 и M2 макрофагам, полученным из моноцитов – данная гипотеза была верифицирована специфичной окраской антителами, результаты представлены в [501]. Данный факт говорит о том, что макрофаги кожи человека на основе параметров затухания их флуоресценции можно отнести к одному из двух фенотипов, что может быть потенциально использовано для их диагностики *in vivo*.

Таблица 7.2. Параметры затухания флуоресценции ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_m$ ,  $a_1/a_2$ ) и интенсивность флуоресценции клеток в различных условиях наблюдения: макрофагов (M1 и M2), полученных из моноцитов, выделенных из кожи; M1 (CD68) и M2 (CD163) макрофагов, измеренных *ex vivo* в криосрезах кожи человека; M1 и M2 макрофагов, измеренных на предплечье здоровых добровольцев *in vivo*; моноцитов; покоящихся и активированных тучных клеток кожи человека; дендритных клеток; фибробластов и нейтрофилов *in vitro*.

Объект		Число клеток	$\tau_m$ , пс	$\tau_1$ , пс	$\tau_2$ , пс	$a_1/a_2$	Интенсивность, фотонов /мВт
<i>in vitro</i>	Полученные из моноцитов M1-поляризованные макрофаги	21	479±106	163±50	1209±161	2.4±0.6	600±100
	Полученные из моноцитов M2-поляризованные макрофаги	27	1185±170	417±134	2305±194	2.3±0.5	500±100
	M1-макрофаги, выделенные из кожи	34	461±175	225±84	1289±278	4.8±3.4	3000±500
	M2-макрофаги, выделенные из кожи	28	1281±155	807±250	2352±229	2.2±1.1	800±200
<i>ex</i>	M1-макрофаги						

	(CD68)	8	458±50	190±38	1504±133	4.1±0.7	3000±500
	M2-макрофаги (CD163)	12	1369±201	498±129	2267±155	1.1±0.4	700±300
<i>in vivo</i>	M1-макрофаги	35	477±105	196±40	1698±172	5.0±2.8	686±165
	Фагоцитирующ ие M1-макрофаги	2	195±44	105±10	1272±89	14.7±4. 5	1100±150
	M2-макрофаги	25	1407±60	442±54	2458±90	1.2±0.2	360±155
<i>In vitro</i>	Моноциты	15	989±111	491±130	2025±301	1.8±0.5	700±130
	Покоящиеся тучные клетки	43	1248±287	533±266	2289±317	1.5±0.5	1300±400
	Активированны е тучные клетки	13	862±268	288±130	1920±287	2.5±2.0	900±200
	Дендритные клетки	14	1265±180	434±188	2578±328	1.6±0.2	538±258
	Фибробласты	6	921±81	429±51	1983±137	0.5±0.1	469±137
	Нейтрофилы	21	1074±109	714±250	1795±600	1.5±0.5	500±115

Далее были проведены измерения других дермальных клеток *in vitro*, таких как тучные клетки (подробнее данные измерения описаны в следующем разделе), дендритные клетки, фибробласты, моноциты и нейтрофилы. Параметры затухания их флуоресценции

приведены в таблице 7.2. Было выявлено, что помимо размера и морфологии клеток, макрофаги могут быть дифференцированы от других клеток с помощью различий в параметрах FLIM, что является предпосылкой для визуализации макрофагов в коже человека *ex vivo* и *in vivo*.

#### 7.4.4 Визуализация M1 и M2 макрофагов в коже человека *ex vivo*

Чтобы проверить, можно ли с использованием параметров FLIM, полученных *in vitro*, идентифицировать M1 и M2 макрофаги в коже человека, было проведено сопоставление с количественной гистоморфометрией кожной биопсии и традиционной иммуногистохимией. Измерения выполнялись на биоптатах кожи человека, при этом сначала на изображениях дермы, полученных методом ДФТ-FLIM, выделялись области, потенциально соответствующие клеткам, определялись параметры затухания их флуоресценции и соотносились с данными, полученными для макрофагов *in vitro*. Далее рядом с областями, в которых, предположительно, были обнаружены макрофаги, наносилась метка путем облучения области образца размером 28x28 мкм<sup>2</sup> при мощности на образце 50 мВт, в результате чего в образце выжигался квадрат, по которому можно было найти искомую клетку после гистохимической окраски образца (Рис. 7.12).

Был выполнен анализ тринадцати криосрезов биопсии кожи человека, в которых идентифицировались две субпопуляции клеток, близких по параметрам FLIM к M1 и M2 макрофагам, измеренным *in vitro* (Таблица 7.2, Рис. 7.12). Далее, чтобы подтвердить корректность сопоставления выделенных структур M1 и M2 макрофагам, было проведено окрашивание тех же срезов с использованием антител CD68 (специфичных к M1) и CD163 (специфичных к M2). Проведенное сопоставление выявило, что, действительно, идентифицированные клетки с меньшим значением  $\tau_m$  и большей интенсивностью флуоресценции колокализуются с окрашенными CD68 макрофагами M1 (Рис. 7.12Б), а клетки с большими значениями  $\tau_m$  и более низкой интенсивностью флуоресценции – с M2 макрофагами (Таблица 7.2). Из 9 клеток, изначально идентифицированных как макрофаги фенотипа M1 по данным FLIM (путем сравнения с параметрами *in vitro*), 8 клеток оказались положительно окрашены на CD68, и все CD68-положительные клетки имели параметры затухания флуоресценции, соответствующие M1 макрофагам. Для M2 макрофагов, все клетки с соответствующими измерениям *in vitro* параметрами FLIM (12 из 14) были CD163-положительными, и все CD163-положительные клетки характеризовались параметрами затухания флуоресценции, соответствующими макрофагам фенотипа M2.



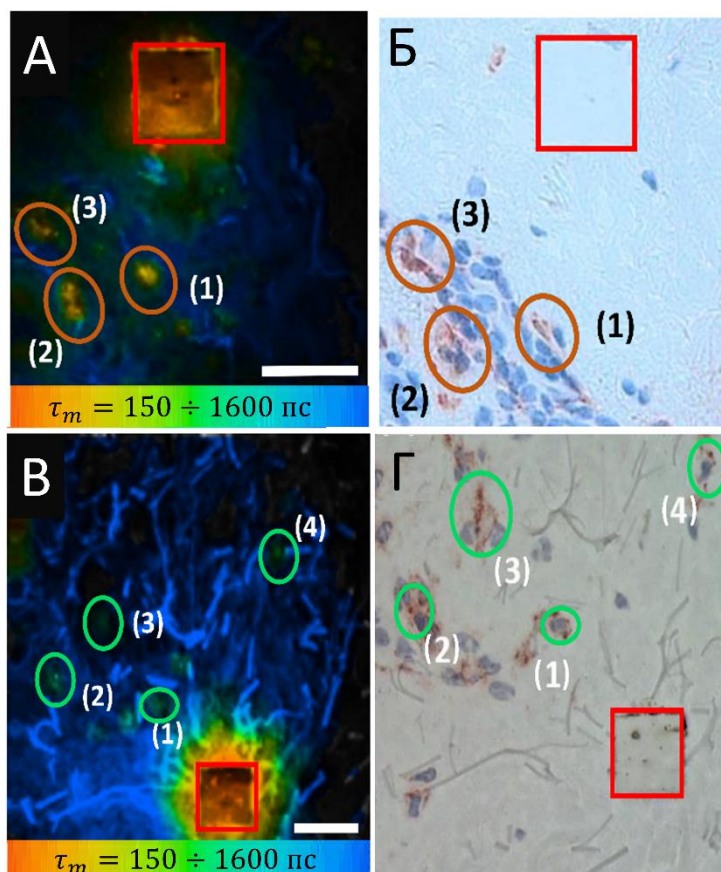


Рисунок 7.12 — А) Репрезентативное ДФТ-FLIM изображение криосреза биоптата кожи человека (дермального слоя). Оранжевыми эллипсами отмечены области, по параметрам затухания флуоресценции, совпадающие с макрофагами фенотипа M1. Б) Изображение того же образца, что и на панели А, полученное после гистохимической окраски CD68-антителом, специфичным к макрофагам фенотипа M1. Видно, что области, выделенные по ДФТ-FLIM, совпадают с областями локализации M1 макрофагов. В) Репрезентативное ДФТ-FLIM изображение криосреза биоптата кожи человека (дермального слоя). Оранжевыми эллипсами отмечены области, по параметрам затухания флуоресценции, совпадающие с макрофагами фенотипа M12. Б) Изображение того же образца, что и на панели А, полученное после гистохимической окраски CD163-антителом, специфичным к макрофагам фенотипа M2. Видно, что области, выделенные по ДФТ-FLIM, совпадают с областями локализации M2 макрофагов. Длина волны возбуждения составляла 760 нм, а мощность лазера – 4 мВт (панель А) и 2 мВт (панель В). Красным квадратом на всех изображениях показана область (28x28 мкм<sup>2</sup>), выжигаемая лазерным облучением в качестве метки для сопоставления изображений ДФТ-FLIM и микроскопических изображений, полученных при гистохимической окраске. Размер шкалы составляет 30 мкм.

Таким образом, сопоставление одних и тех же областей кожи при измерениях ДФТ-FLIM и последующей окраске антителами, специфичными к определенному фенотипу макрофагов, позволило верифицировать гипотезу о потенциальной возможности детектирования и анализа их в тканях с использованием параметров затухания эндогенной флуоресценции. После проведенной верификации была осуществлена серия измерений на коже здоровых добровольцев *in vivo*.

#### 7.4.5 Визуализация M1 и M2 макрофагов в коже человека *in vivo*

Согласно литературным данным, макрофаги являются одними из наиболее распространенных клеток в дерме – их число составляет около 30% всех клеток [546]. При измерениях методом ДФТ-FLIM характерный размер измеряемого за один скан поля составляет  $200 \times 200$  мкм<sup>2</sup>. Из данных гистологического исследования (Рис. 7.9) можно оценить, что концентрация макрофагов в папиллярной дерме составляет  $>100$  клеток / мм<sup>2</sup>, то есть, в поле  $200 \times 200$  мкм<sup>2</sup> должна в среднем находиться одна клетка. Таким образом, если выбрать определенный участок на коже и далее проводить сканирование по глубине, имеет место высокая вероятность того, что в одном из кадров окажется клетка-макрофаг. Исходя из этой оценки, был предложен следующий алгоритм.

Объектив располагался на внутренней стороне предплечья на удалении 5-10 см от запястья, после чего производилась фокусировка по глубине в область папиллярной дермы (переход эпидермис-дерма легко контрастируется по появлению сигнала с быстрым затуханием флуоресценции, связанного с меланином в области базальной мембраны, а также по появлению сигнала ГВГ от коллагена типа I в дерме). Сосуды в дерме при этом визуализировались по наличию у них характерной сверхбыстрой флуоресценции (подробнее см. Главу 6). Далее проводилось сканирование по глубине, при этом осуществлялся поиск областей, по размерам и параметрам затухания флуоресценции соответствующим клеткам (Рис. 7.13). Анализ был проведен на 25 добровольцах, для которых было идентифицировано 35 и 25 клеток с параметрами затухания флуоресценции, соответствующими M1 и M2 макрофагам, соответственно.

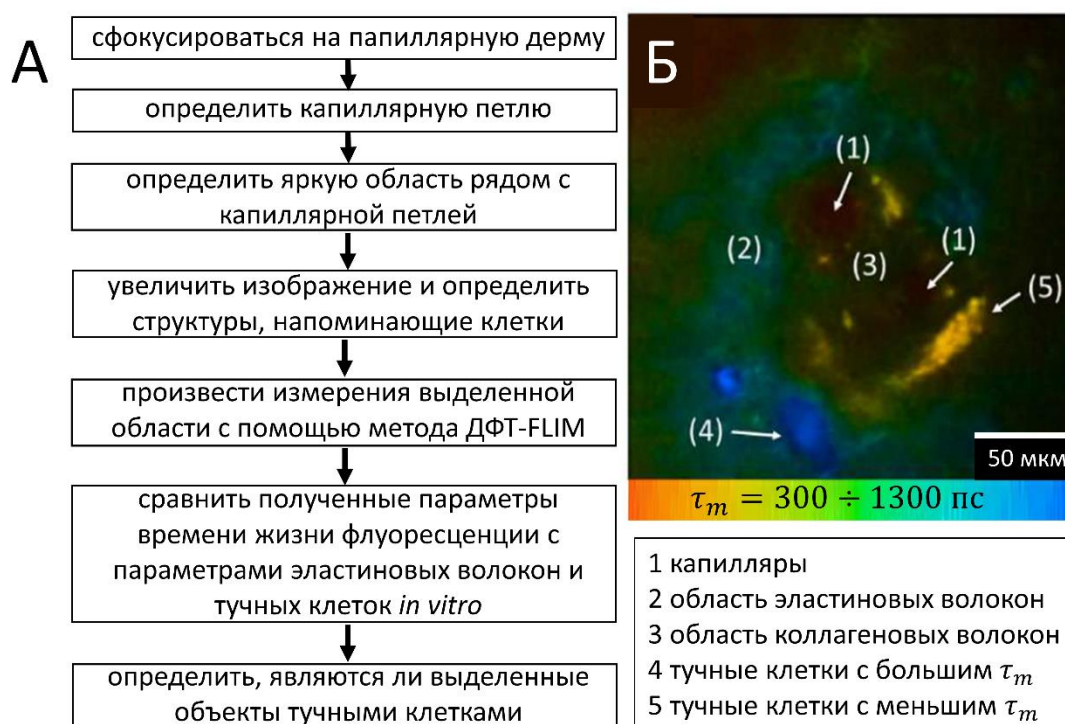


Рисунок 7.13 — А) Алгоритм поиска клеток в дерме. Б) Репрезентативное изображение дермы, полученное *in vivo* методом ДФТ-FLIM. Цифрами отмечены капилляр (1), область эластиновых волокон (2), область коллагеновых волокон (3), клетки (4,5).

Примеры областей, идентифицированных как макрофаги, приведены на рисунке 7.14А-Г.

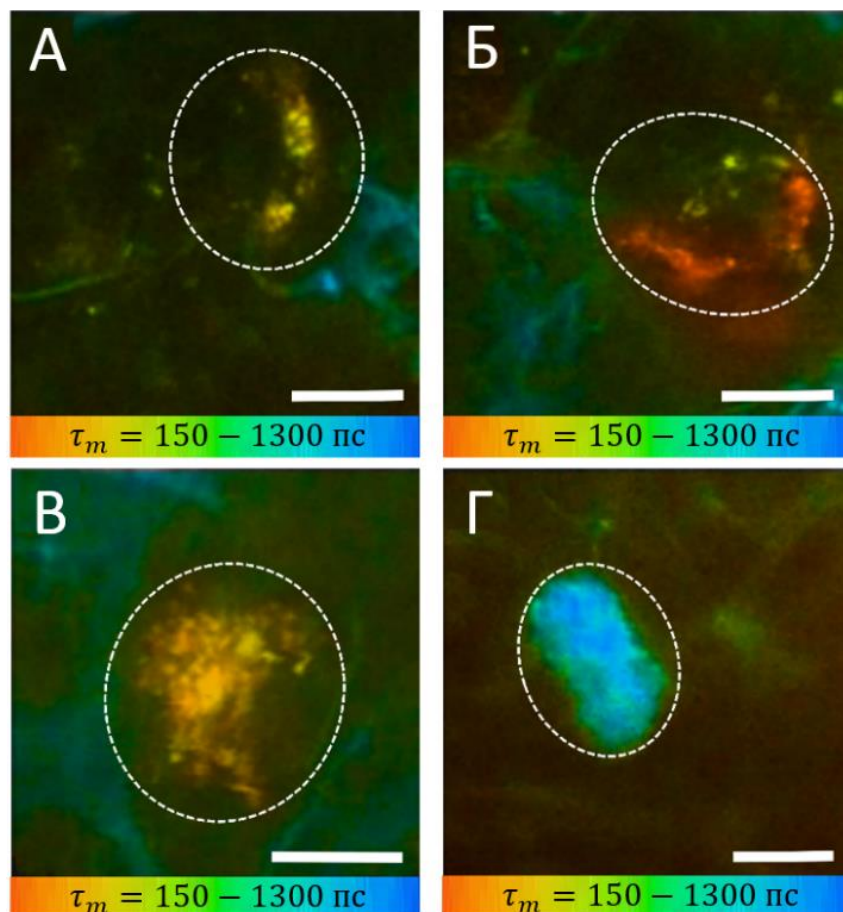


Рисунок 7.14 — Визуализация и классификация макрофагов по данным ДФТ-FLIM *in vivo*. Изображения ДФТ-FLIM *in vivo* областей, идентифицированных как М1 (А-Б) и М2 (В-Г) макрофаги. Размер шкалы: 10 мкм. Д) Распределение параметров затухания флуоресценции клеток, идентифицированных как М1 (оранжевый) и М2 (синий) макрофаги *in vivo*. Изображения *in vivo* (А-Г) были получены при длине волны возбуждения 760 нм, мощности лазера 50 мВт и времени накопления 6.8 с на FLIM изображение на глубине 80–100 мкм на ладонной области кожи предплечья 25 здоровых людей.

Далее был разработан алгоритм идентификации М1 и М2 макрофагов, позволяющий отличить их от других клеток в дерме. Входными данными для алгоритма, основанного на использовании метода решающих деревьев, являлись морфология и параметры затухания флуоресценции клеток. Чтобы обеспечить оптимальное качество разделения в узле дерева решений, должны были быть выполнены следующие требования: минимальное количество выборок для разделения – 2, максимальная глубина дерева – 9; выборки имели равный вес для модели, классифицирующей М1 и М2 макрофаги. Чувствительность отделения макрофагов от других клеток дермы составила 81%, а специфичность – 80%. Алгоритм

также отличал макрофаги фенотипа M1 от фенотипа M2 с чувствительностью 88% и специфичностью 89%.

### 7.5. Детектирование тучных клеток в коже человека *in vivo* методом ДФТ

Вторым типом дермальных клеток, исследованных в данной работе, являлись тучные клетки (ТК). ТК являются многофункциональными клетками иммунной системы. Они участвуют в этиологии нескольких заболеваний, таких как крапивница, псориаз, атопический дерматит и мастоцитоз, при которых их концентрация увеличивается в местах поражения. Рутинным методом для оценки числа ТК и их состояния (наличия активации) служит гистоморфометрическое исследование биопсийных образцов, в то время как неинвазивных методов для исследования ТК *in vivo* у пациентов не существует.

Количество ТК повышено в папиллярном слое дермы, где они в основном локализируются в непосредственной близости от нервных волокон [547], кровеносных и лимфатических сосудов и волосяных фолликулов [534], что позволяет им передавать сигналы к отдаленным клеткам-мишеням и тканям [548]. ТК метаболически гетерогенны, на протяжении всего жизненного цикла в них происходит накопление цитоплазматических гранул. “Незрелые” ТК содержат несколько крупных цитоплазматических гранул с несколькими везикулами и более низким содержанием гистамина а в процессе созревания они накапливают в гранулах биологически активные вещества, в том числе гепарин, гистамин и различные протеазы, в том числе триптазу и химазу [549].

Активация ТК помощью IgE-зависимых и независимых стимулов вызывает процесс быстрого высвобождения их гранул во внеклеточное пространство. Данный процесс, называемый дегрануляцией, приводит, в частности, к увеличению проницаемости сосудов и инициации воспалительных реакций [550]. ТК неравномерно распределены в коже, а их концентрация повышена в очагах воспаления при различных патологических состояниях. Исследование активации и дегрануляции ТК представляет интерес для фундаментальной биохимии, иммунологии и дерматологии, однако инструментов для неинвазивного анализа этих процессов у людей *in vivo* на данный момент нет. Разработка такого инструмента на основе ДФТ-FLIM являлась одной из решаемых в данном разделе задач.

Общая схема экспериментов по визуализации и анализу состояния ТК в дерме методом ДФТ-FLIM была аналогична использованной в случае анализа макрофагов (см. раздел 7.4) и состояла в следующем:

1. Измерялись параметры затухания флуоресценции ТК *in vitro* на культурах клеток, при этом в случае ТК исследовались активированные (дегранулированные) и неактивированные клетки. Для всех типов клеток определялись распределения



- параметров кинетики затухания флуоресценции (амплитуд и времен), а также интенсивности.
- Далее, аналогично тому, как это было сделано для макрофагов, проводился анализ тучных клеток в биоптатах кожи человека. При этом по данным ДФТ-FLIM идентифицировались клетки, распределение параметров затухания флуоресценции для которых совпадает с распределением для ТК *in vitro*, после чего проводилось гистохимическое исследование тех же образцов. Данная процедура позволяла верифицировать предложенный алгоритм и транслировать его на измерения *in vivo*.
  - Наконец, проводилась серия экспериментов на здоровых добровольцах *in vivo*, при этом на изображениях дермы выделялись клетки, соответствующие по параметрам затухания флуоресценции ТК, после чего проводился анализ наличия в них субпопуляций и метаболической гетерогенности.

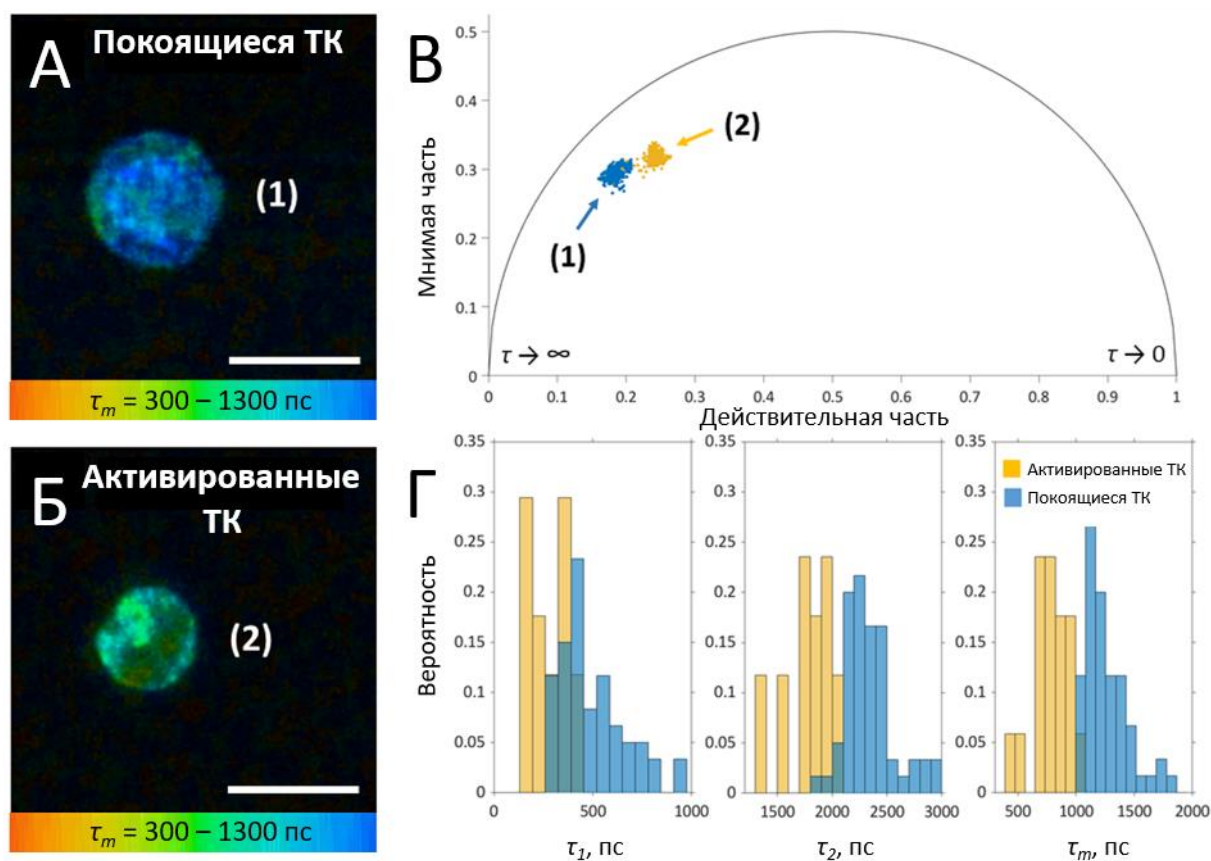


Рисунок 7.16 — Репрезентативные ДФТ-FLIM изображения тучных клеток *in vitro*. Клетки были выделены из образцов биопсии и культивированы в течение пяти дней согласно описанному протоколу [500]. А) Изображение клетки из первичной культуры ТК. Б) Изображение ТК, полученное после добавления иономицина в концентрации 1 мкМ и 15 минут инкубации. Масштабная линейка соответствует 10 мкм. В) Распределение параметров затухания флуоресценции покоящихся (синий) и активированных (оранжевый) ТК на фазовой плоскости. Г) Распределение параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_m$  для покоящихся (синий,  $n = 43$ ) и активированных (оранжевый,  $n = 13$ ) ТК.

Измерения на культуре ТК (протокол выделения ТК из биопсийных образцов кожи описан в [500]) проводились до и после их активации путем добавления раствора иономицина, приводившего к дегрануляции клеток. Репрезентативные FLIM изображения ТК до и после активации приведены на рисунке 7.16А-Б. Как видно, активация ТК приводит к заметному увеличению скорости затухания их флуоресценции. Данный факт хорошо виден, как при анализе распределений параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_m$ , так и при визуализации параметров затухания флуоресценции на фазовой плоскости (Рис. 7.16). Параметры затухания флуоресценции для покоящихся и активированных ТК *in vitro* приведены в Таблице 7.2.

Важно отметить, что дегрануляция ТК приводит к значимому уменьшению интенсивности их автофлуоресценции при двухфотонном возбуждении (Рис. 7.17), что может быть связано как с изменением метаболизма клеток (согласно стандартной интерпретации, сигнал автофлуоресценции клеток при двухфотонном возбуждении на 760 нм связан, прежде всего с эмиссией НАД(Ф)Н), так и со вкладом гранул в сигнал флуоресценции, поскольку продукты окисления белков и липидов могут давать вклад в автофлуоресценцию клеток, как это было показано в Главе 4 и ряде работ [345,551]. Тем не менее, падение сигнала флуоресценции при дегрануляции ТК составляет около 50% и не является критическим для возможности их детектирования методом ДФТ.

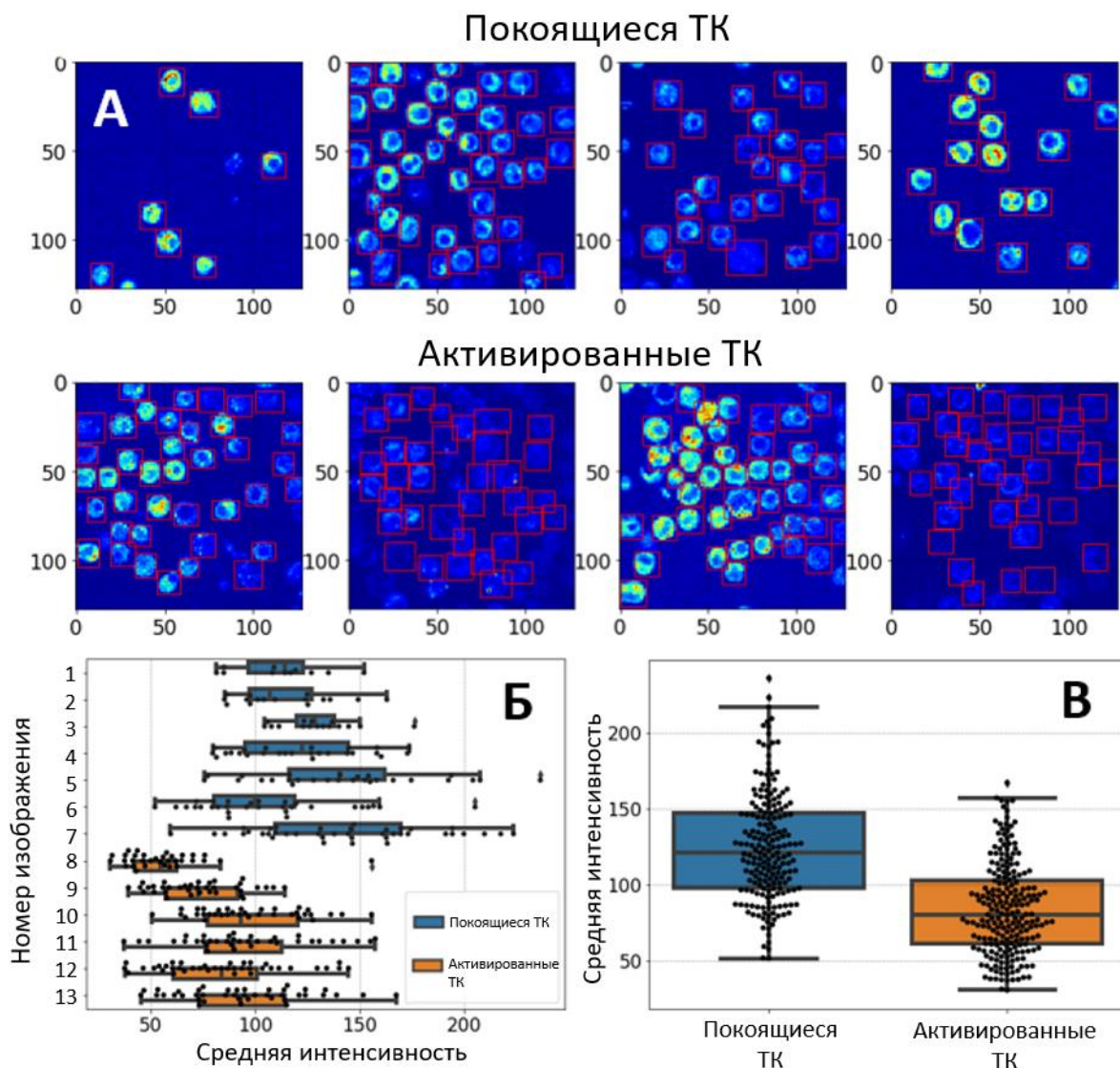


Рисунок 7.17 — А) Репрезентативные изображения покоящихся и активированных (дегранулированных) с помощью добавления иономицина тучных клеток. Возбуждение осуществлялось на длине волны 760 нм, цветом кодирована интенсивность флуоресценции. Б) Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции покоящихся (синий) и активированных (дегранулированных, оранжевый) тучных клеток, полученные для различных изображений. В) Сравнение интенсивности флуоресценции покоящихся (синий) и активированных (дегранулированных, оранжевый) тучных клеток.

Следующим шагом в разработке алгоритма визуализации ТК была верификация возможности их идентификации по параметрам FLIM, измеренным *in vitro*. Для этого, как и в случае макрофагов, выполнялась процедура анализа биопсийных образцов кожи, в которых выделялись объекты, похожие по размеру и морфологии на клетки и обладающие параметрами затухания флуоресценции как ТК *in vitro*, после чего проводилось гистологическое исследование тех же образцов. Далее, путем сопоставления данных FLIM и иммуногистохимической окраски, специфичной к ТК, определялась точность предложенного подхода.

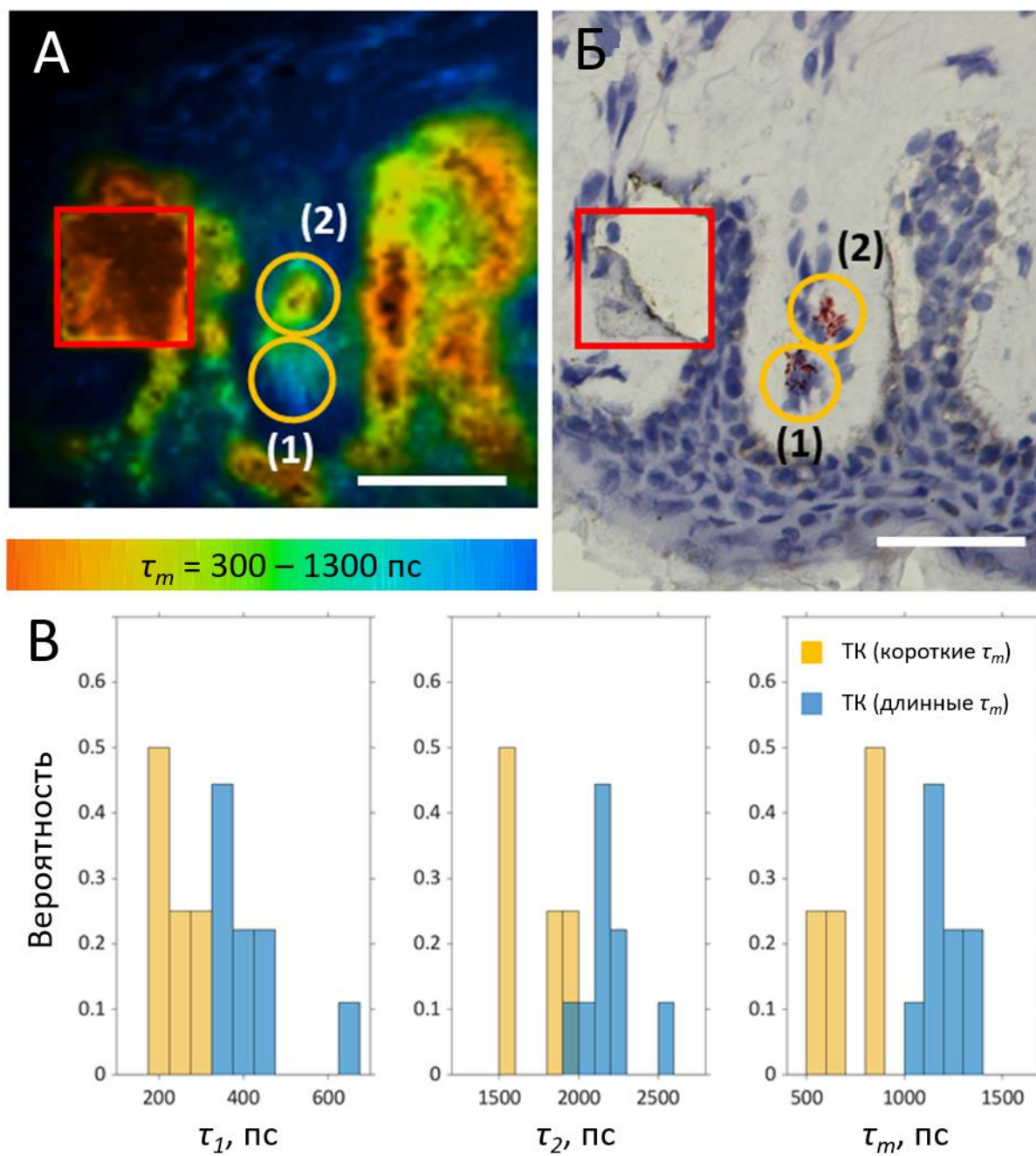


Рисунок 7.18 — А) Изображение ДФТ-FLIM криосреза кожи, на которых желтым отмечены области, потенциально соответствующие тучным клеткам, а красный квадрат соответствует области 28x28 мкм<sup>2</sup>, облученной высокоинтенсивным лазерным излучением для того, чтобы установить метку для сравнения ДФТ-FLIM изображений и данных гистохимии. Б) Изображение той же области кожи, что и на панели А, окрашенной с использованием специфичных к тучным клеткам (триптазе) антител (красно-коричневый цвет, отмеченные желтым области). Масштабная метка на рис. Т4А-Б соответствует 30 мкм. В) Распределения параметров затухания флуоресценции для 17 клеток, обнаруженных методом ДФТ-FLIM в биоптатах кожи, соответствие которых тучным клеткам было доказано гистологически. Видно наличие двух субпопуляций клеток.



На рисунке 7.18А оранжевым эллипсом указаны области, приписанные ТК по результатам анализа данных FLIM, а на рисунке 7.18Б приведено микроскопическое изображение той же области, где ТК окрашены специфично. Как видно, наблюдается колокализация областей, приписанных ТК по ДФТ-FLIM и соответствующих ТК по данным прямой визуализации. Аналогичные измерения, проведенные для 10 биопсийных образцов, показали, что специфичность детектирования ТК в дерме методом ДФТ-FLIM составляет 85%. Более того, было предположено, что можно не только детектировать сами ТК, но и определять, дегранулированы они или нет. Об этом свидетельствует наличие двух субпопуляций в клетках ТК согласно данным FLIM, одна из которых ближе по параметрам затухания флуоресценции к покоящимся клеткам, а вторая – к дегранулированным (Рис. 7.18В). Полученные результаты были далее применены для исследования возможности детектирования ТК в дерме *in vivo*.

В результате измерений, проведенных на 28 здоровых добровольцах с использованием разработанного алгоритма (аналогично тому, как анализировались макрофаги), было выявлено 119 клеток, соответствующих по параметрам затухания ТК измеренным *in vitro*. Измерения проводились в области папиллярного слоя дермы, при этом для первичного поиска выявлялись области, по размеру соответствующие клеткам и обладающие при этом повышенной в сравнении с компонентами внеклеточного матрикса флуоресценцией и отличающимися параметрами флуоресценции (Рис. 7.19А, Г). Принимая во внимание плотность ТК в папиллярной дерме, которую можно оценить как  $\approx 100$  клеток/мм<sup>2</sup> согласно данным для гистологического анализа с использованием специфического для ТК окрашивания криосрезов (Рис. 7.15), можно ожидать, что при размере сканируемой области 150x150 мкм<sup>2</sup> и глубине сканирования до 120 мкм с шагом  $\sim 10$  мкм в данном объеме должна содержаться по крайней мере одна ТК. Таким образом, для каждого добровольца проводилось 3D сканирование нескольких близлежащих областей в нижней части предплечья и поиск объектов, соответствующих по параметрам ТК, измеренным *in vitro*, в исследуемом объеме. Далее области, предварительно идентифицированные как ТК, измерялись с большим увеличением – при скрининге размер сканируемой области составлял около 200x200 мкм<sup>2</sup>, тогда как при более подробном анализе – около 30x30 мкм<sup>2</sup>. Клетки, обнаруженные в дерме *in vivo* и похожие по параметрам затухания флуоресценции на ТК, можно было поделить на два кластера (субпопуляции), которым соответствуют большее ( $>1000$  пс) и меньшее ( $<800$  пс) значения среднего времени жизни флуоресценции. Параметры затухания флуоресценции этих двух субпопуляций находятся в соответствии с измеренными для ТК *in vitro* до и после активации иономицином (рис. таблица 7.1), что, по аналогии с экспериментами *ex vivo*, позволяет предположить, что зарегистрированные

дермальные клетки соответствуют ТК. Приблизительно 67% дермальных ТК соответствует популяции ТК с более длинным  $\tau_m$ , то есть, покоящимся ТК в экспериментах *in vitro*.

## **Выводы**

По результатам 7 главы можно сделать следующие основные выводы. Был разработан подход для визуализации новых структур при наблюдении отклика дермы методом ДФТ-FLIM *in vivo*. В частности, был выделен новый флуорофор, отличающийся от эластина и коллагена типа I. Данный флуорофор характеризуется средним временем затухания флуоресценции  $\tau_m = 700 \pm 100$  пс при двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм и низкими значениями интенсивности второй гармоники. Предположительно он соответствует коллагену типа III, локализованному в области внутри сосочков папиллярной дермы. С использованием метода компьютерного моделирования был изучен вопрос выбора оптимального алгоритма при обработке данных FLIM-изображений для выявления отличий в субпопуляциях клеток. Было показано, что методы анализа, основанные на алгоритмах с сегментацией клеток, существенно превосходят чувствительность алгоритмов, основанных на анализе изображений в целом, без сегментации. Рассмотрен ряд методов параметрической и непараметрической обработки кинетик затухания флуоресценции, выявлены оптимальный подход для различных соотношений времен и количества клеток в субпопуляциях. Наиболее точным оказался алгоритм, основанный на кластеризации кинетик методом K-средних, метод биэкспоненциальной аппроксимации продемонстрировал близкие значения чувствительности. Было показано, что в случае равного соотношения субпопуляций клеток при типичных условиях эксперимента оказывается возможным надежно детектировать различия между кластерами при отличиях в среднем времени затухания флуоресценции на уровне 200 пс. В случае если одна из субпопуляций представлена на порядок меньшим числом клеток, чем другая, для надежного обнаружения требуются различие средних времен затухания на уровне 250-300 пс. Такие различия сопоставимы с наблюдаемыми в ряде гетерогенных клеточных систем, представляющих существенный практический интерес. Результаты анализа методов обработки FLIM-изображений были использованы для обработки экспериментальных данных при визуализации и анализа макрофагов *in vitro* и в коже *in vivo* методом FLIM. Было показано, что средние значения времен затухания флуоресценции для макрофагов фенотипов M1 и M2 при измерениях *in vitro* составили  $\tau_m = 479 \pm 106$  пс и  $\tau_m = 1185 \pm 170$  пс соответственно. Данные характерные значения позволили осуществить визуализацию и идентификацию макрофагов обоих фенотипов *in vivo*. Также данный подход позволил выделить субпопуляции активированных и покоящихся тучных клеток, что было подтверждено данными гистологии. Характерные значения среднего времени затухания

флуоресценции для покоящихся и активированных тучных клеток составили  $1250 \pm 290$  пс и  $870 \pm 270$  пс соответственно. Таким образом, на основе работ, представленных в данной главе, были выработаны подходы для визуализации и идентификации ряда структур с использованием метода флуоресцентной визуализации с временным разрешением с эндогенным контрастированием, при этом развитые подходы применимы для задач диагностики *in vivo*.

## **Глава 8. Меланин как гетерогенная система флуорофоров: фотофизические процессы в ИК диапазоне, молекулярные свойства и *in vivo* визуализация**

*В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [А30-А33].*

### **8.1 Введение и постановка задачи**

Как было показано в Главе I, ряд объектов в организме человека обладают АФ в ближнем ИК диапазоне спектра. К таким объектам относятся в частности, парацитовидная железа [223,552], атеросклеротические бляшки [219,553,554], ткани мозга [555], печени [556,557] и т.д. Механизм формирования ИК АФ является в настоящий момент дискуссионным [345,558], в то же время, данный сигнал неоднократно предлагался в качестве дескриптора патологических процессов [559–561] и даже используется в некоторых клинических диагностических задачах [234,575]. В Главах 3, 4, 5 была подробно рассмотрена гипотеза о том, что за ИК АФ сигнал живых систем по крайней мере частично ответственны процессы окисления макромолекул, что было проиллюстрировано на примере аминокислот, пептидов, белков, ДНК, клеток и тканей [81,343,345,551]. Так, было показано, что одним из отличительных свойств ГСФ является наличие у них бесструктурного (экспоненциально спадающего с длиной волны) поглощения в видимой и БИК областях спектра, и именно наличие края поглощения позволяет возбуждать АФ ГСФ в красной и ИК спектральных областях.

Отдельно от других ИК эндогенных флуорофоров стоит меланин, пигмент, ответственный в организме за фотозащиту, цвет кожи, волос, глаз и т.д. Роль меланина в организме, особенно, в развитии меланомы, стимулировала многочисленные исследования его фотофизических и структурных свойств. Так, хорошо известно, что меланин представляет собой смесь различных соединений, образующихся в организме в результате окисления молекул-прекурсоров [564], а его спектральные характеристики похожи на оптические свойства ГСФ и значительно отличаются от других эндогенных хромофоров: он имеет широкий «экспоненциальный» спектр поглощения, его флуоресценцию можно возбудить в широком диапазоне длин волн, в том числе, в ИК области спектра [565]. Для объяснения формирования его оптических свойств используются две модели – «химического беспорядка» [210,211,213,566] и «взаимодействия» [209,567–571]. Так, в работе [209] была предложена модель, описывающая формирование спектра поглощения меланина с помощью экситонного взаимодействия в неупорядоченных агрегатах молекулярных структур. А именно, в результате синтеза меланина могут образовываться различные структурные единицы (олигомеры), которые затем взаимодействуют между собой.

Электронное взаимодействие приводит к сдвигам и уширению спектров, а величина этого взаимодействия зависит от расстояния между олигомерами и взаимной ориентации их дипольных моментов.

Естественным образом заметное отличие спектральных свойств меланина от других хромофоров кожи привело к тому, что задачу количественного анализа меланина пытались решить всеми доступными спектральными методами. В первую очередь, интерес к меланину связан с диагностикой меланомы, наиболее опасного рака кожи [572].

В рамках данной Главы на основе результатов, полученных ранее при исследовании ГСФ, было продолжено исследование возможностей визуализации и анализа структурных особенностей меланина оптическими методами, а именно, решались следующие задачи:

1. Исследовать возможности спектроскопии КР для детектирования меланина как ГСФ в коже, осуществить анализ вариабельности спектров КР и взаимосвязи их свойств (формы и интенсивности) с параметрами ИК флуоресценции меланина.
2. Исследовать возможности микроспектроскопии КР в определении локализации меланина в коже.
3. Проверить гипотезу о возможности эффективного двухквантового возбуждения флуоресценции меланина.

Известно, что меланин в норме сосредоточен в основном в области базальной мембраны, тогда как интересным является вопрос о его деградации и накоплении в других слоях кожи. Соответственно, в данной Главе (задачи 1 и 2) показано, как с помощью конфокальной микроспектроскопии путем одновременного измерения спектров КР и ИК флуоресценции можно проанализировать распределение меланина в пространственно-неоднородной среде (в частности, в коже *in vivo*). Также был исследован вопрос о проявлении структурных свойств меланина в его спектральных свойствах (форме спектра КР и ИК флуоресценции). Выделение вклада меланина с использованием разработанной методики позволило показать наличие отличных от него эндогенных флуорофоров, также обладающих ИК флуоресценцией, и установить их распределение.

В задаче 3 проверяется гипотеза о возможности селективного двухквантового возбуждения меланина, которая обсуждается в литературе [573–575]. Для решения данной задачи были проведены эксперименты на модельных системах и коже, в том числе, с использованием метода нелинейной флуориметрии.

На основе полученных результатов была предложена реализация метода нелинейной флуориметрии в варианте микроскопии, то есть, было показана возможность использования параметра насыщения (сечения двухфотонного возбуждения флуоресценции) в качестве дополнительного дескриптора и проанализирована

возможность совмещения микроскопии насыщения флуоресценции с FLIM для биомедицинской диагностики.

## **8.2 Микроспектроскопия КР меланина *in vivo*: локализация и связь КР с ИК флуоресценцией**

Одной из задач, решаемых в данной Главе, являлся анализ спектров комбинационного рассеяния и ИК флуоресценции меланина в различных слоях кожи *in vivo* с помощью конфокальной микроскопии. При этом ставилось две цели: (1) исследовать взаимосвязь параметров спектров КР и ИК флуоресценции меланина как ГСФ и (2) разработать метод идентификации и анализа меланина *in vivo* с пространственным разрешением ~1 мкм. Спектры КР меланина, измеренные *in vitro* [205], имеют вид, характерный для ГСФ: «неупорядоченного углерода» (disordered carbon [576]) – оксида графена, углеродных квантовых точек, природного органического вещества. Соответственно, задача состояла в анализе возможности выделения вклада КР меланина на фоне других молекулярных компонент кожи, исследование варибельности спектра КР меланина и взаимосвязи его параметров с другими характерными оптическими свойствами меланина, в первую очередь, с интенсивностью и формой его ИК флуоресценции. Отметим, что, несмотря на важность меланина для биомедицинской диагностики и вовлеченность его в ряд ключевых физиологических процессов, до сих пор имеются вопросы о его распределении, передаче и накоплении в коже в динамике – соответственно, создание метода высокочувствительного и высокоточного анализа меланина *in vivo* является актуальным вопросом в дерматологии. Рассмотрим кратко основные вопросы о локализации меланина в коже. Меланин синтезируется в меланоцитах — клетках, которые в норме локализуются в базальном слое эпидермиса. Меланин упакован в меланосомы, частицы диаметром в несколько десятков нм, которые переносятся от меланоцитов к близлежащим кератиноцитам [577]. Цвет кожи при этом определяется типом меланина (соотношением эумеланина и феомеланина), его количеством, степенью упаковки и размером меланосом. На настоящий момент в литературе отсутствует полное понимание механизмов переноса меланина между клетками, эволюции его распределения в коже и путей его деградации [591-593].

Стандартным методом исследования распределения меланина в коже является гистохимическое окрашивание, которое, как было показано [579], может приводить к ложноположительным результатам. Например, при решении задачи о накоплении меланина в разных слоях кожи данным методом было показано наличие «меланиновой пыли» (расщепленных фрагментов меланина) в роговом слое, оказавшееся артефактом, связанным с неспецифическим восстановлением серебра под действием соединений в коже, отличных от меланина [579,580]. Альтернативным методом является использование красителей,

позволяющих специфически маркировать белки, вовлеченные в процесс меланогенеза, однако и этот подход не лишен артефактов [383]. Более того, общим недостатком всех гистологических исследований является их инвазивность. Указанные ограничения явились стимулом для разработки оптических методов анализа меланина в коже и связанных с ним процессов.

Одной из особенностей оптических свойств меланина является характерный вид его спектров КР, нетипичный для большинства органических молекул. А именно, в спектр КР меланина в области волновых чисел 1000–1800  $\text{см}^{-1}$  дают вклад множество линий: линия на 1220  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая С-ОН колебаниям в фенолах и С-О колебаниям в карбоновых кислотах, линия на 1340 нм, соответствующая С-N колебаниям в индолах, полоса с максимумом на 1390  $\text{см}^{-1}$ , соответствующая колебаниям С=C связей в ароматических кольцах (аналогично D-полосе в неупорядоченном графите), полосы на 1562 и 1598  $\text{см}^{-1}$ , соответствующие С=C колебаниям в  $\text{sp}^2$  гибридизованном углероде и E2g моде С-С колебаний в ароматическом кольце [581]. Наложение указанных линий приводит к тому, что сами по себе они не разрешаются в спектрах КР меланина, а их суперпозиция проявляется в виде двух полос с максимумами на  $\approx 1380 \text{ см}^{-1}$  и  $\approx 1570 \text{ см}^{-1}$  и полуширинами  $\approx 200 \text{ см}^{-1}$  и  $\approx 150 \text{ см}^{-1}$ . Форма и соотношение интенсивностей указанных полос определяется структурной организацией меланина и составом входящих в него компонент (который может варьироваться, т.к. меланин, как было описано выше, является гетерогенной системой флуорофоров) [205,581–583]. Соответственно, встает вопрос о возможности селективного выделения вклада меланина в спектры КР кожи *in vivo*, о вариабельности формы спектров меланина *in vivo* (то есть, по сути, о вариабельности его структурных свойств) и возможности использования формы и интенсивности полос КР меланина для его локализации, визуализации и диагностики.

Для исследования данного вопроса были проведены *in vivo* измерения спектров КР кожи с помощью системы для микроспектроскопии КР 3510 SCA, RiverD (Нидерланды). Были измерены глубинные профили сигнала КР с возбуждением на 785 нм (диапазон детектирования 400–2200  $\text{см}^{-1}$ , область «отпечатков пальцев», «fingerprint region») и возбуждением на 671 нм (диапазон детектирования 2500 – 4000  $\text{см}^{-1}$ , высокочастотная область, «high wavenumber region») для глубин от 0 до 60 мкм с шагом по глубине 2 мкм [584]. Измерения проводились для внутренних участков кожи предплечья 12 волонтеров (фототипы кожи II, III), для каждого волонтера было измерено от 4 до 8 глубинных профилей. Мощность излучения накачки при этом составляла 20 мВт для 785 нм и 17 мВт для 671 нм, время накопления спектров – 5 и 1 с, соответственно, что соответствует дозам 3 Дж/см<sup>2</sup> и 0.5 Дж/см<sup>2</sup>. Прежде чем перейти к анализу спектров КР меланина, необходимо

рассмотреть несколько технических аспектов: определение положения поверхности в наборе спектров при сканировании по глубине, процедуру вычитания флуоресцентного фона из спектров и влияние процесса фотодеградации на измеряемые спектры.

Положение поверхности кожи определялось как точка, в которой интенсивности полосы амид I (рассчитываемой как средняя интенсивность в диапазоне волновых чисел 1550-1720  $\text{см}^{-1}$  после вычитания из спектров флуоресцентного фона) достигает половины от своего максимального значения – данная процедура была предложена и валидирована в работе [585]. Далее, для количественной оценки интенсивности и спектральных свойств флуоресцентного излучения (фона) при измерении КР и для выделения сигнала КР фон флуоресценции оценивали следующим образом. Интерполяцию фона флуоресценции в высокочастотном диапазоне проводили с помощью кусочно-взвешенного метода наименьших квадратов в диапазонах 2600–2810  $\text{см}^{-1}$  и 3800–3900  $\text{см}^{-1}$ . Для диапазона отпечатков пальцев (400–2200  $\text{см}^{-1}$ ), при этом интерполяция производилась полиномом второго порядка по диапазонам 620–700  $\text{см}^{-1}$  и 1900–2200  $\text{см}^{-1}$ , где интенсивных полос КР нет (рис. 8.1). Аналогичный подход применялся ранее для оценки и вычитания фона флуоресценции в спектрах с высоким содержанием меланина [205]. Выбор полиномиальной функции 2-го порядка в качестве оценки фона флуоресценции обусловлен тем, что, с одной стороны, она обеспечивает приемлемое качество аппроксимации, а с другой — простую оценку спектральных характеристик флуоресценции. На рис. 8.1 представлена зависимость соотношения линий на 1380  $\text{см}^{-1}$  и 1570  $\text{см}^{-1}$  в спектрах КР после вычета флуоресцентного фона и положения максимума спектра флуоресценции для разных диапазонов аппроксимации фона полиномом второго порядка, как видно, влияние диапазона аппроксимации на указанные параметры незначительно. Отметим, что нами также были рассмотрены другие алгоритмы для аппроксимации флуоресцентного фона – адаптивный метод наименьших квадратов с итеративным повторным взвешиванием (airPLS) [586], модифицированная фильтрация с вращающимся кругом [587] и алгоритм итеративного полиномиального сглаживания [588]. Было установлено, что для этих трех алгоритмов сложно найти оптимальные параметры для вычитания флуоресцентного фона как для спектров КР с низким и высоким вкладом меланина. Данный факт связан с тем, что все указанные процедуры работают как фильтры верхних частот, за счет чего отсекают плавно меняющиеся сигналы (флуоресценцию), однако поскольку полосы КР меланина также являются широкими и гладкими по сравнению с другими полосами КР, они также могут деформироваться при вычитании фона.



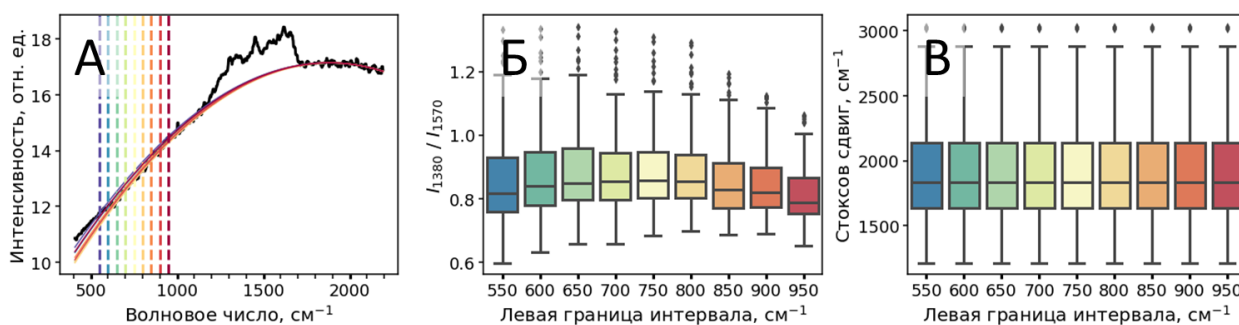


Рисунок 8.1 – Анализ устойчивости процедуры аппроксимации флуоресцентного фона в измеряемых спектрах. А) Примеры аппроксимации флуоресцентного фона полиномом второго порядка при варьировании диапазона аппроксимации. Вертикальными линиями отмечен левый край диапазона аппроксимации. Б) Зависимость отношения линий на 1380  $\text{см}^{-1}$  и 1570  $\text{см}^{-1}$  в спектрах КР после вычета флуоресцентного фона для разных диапазонов аппроксимации. В) Положение максимума спектра флуоресценции (максимума полинома второго порядка, используемого для аппроксимации фона) для разных диапазонов аппроксимации.

Далее, для поправки на то, что интенсивность как сигнала КР, так и сигнала флуоресценции ослабевает за счет рассеяния и поглощения оптического сигнала тканями с увеличением глубины сканирования, производилась дополнительная нормировка спектров КР, полученных после вычитания фона, на усредненную интенсивность линий, связанных с белками (в области 1550–1720  $\text{см}^{-1}$  и 2800–3000  $\text{см}^{-1}$  для диапазона отпечатков пальцев и высокочастотного диапазона, соответственно). Данная процедура нормировки была предложена ранее для количественного анализа спектров КР основных компонентов кожи [589].

Наконец, был проанализирован тот факт, что интенсивность флуоресценции в процессе измерения может уменьшаться за счет фотодеградации, что важно учесть при исследовании ИК флуоресценции меланина. Было показано, что при глубине сканирования кожи 20–50 мкм среднее время фотодеградации флуоресценции составляет порядка 30 с при возбуждении на длине волны 785 нм и мощности лазера 22 мВт, то есть, при использовавшихся временах экспозиции (1 и 5 с) фотодеградация не оказывает существенного влияния на измеряемую интенсивность ИК флуоресценции. Таким образом, далее нами анализировались интенсивность и положение максимума спектра ИК флуоресценции, который аппроксимировался полиномом второго порядка согласно описанной выше процедуре.

На рисунке 8.2А–Б приведены репрезентативные спектры КР кожи человека *in vivo* для добровольца (тип кожи II) на глубине от 0 до 60 мкм с шагом 2 мкм в области отпечатков пальцев (рис. 8.2А) и высокочастотной области (рис. 8.2Б). Как видно, во всех спектрах присутствуют как линии КР, так и флуоресцентный фон. Отметим еще раз, что наличие флуоресцентного фона при измерении спектров КР с ИК возбуждением является общим

свойством живых систем, и механизм формирования фона является неизвестным [79] – в Главах 3-5 и в данной Главе рассматривается гипотеза о роли ГСФ в формировании широкополосного ИК фона.

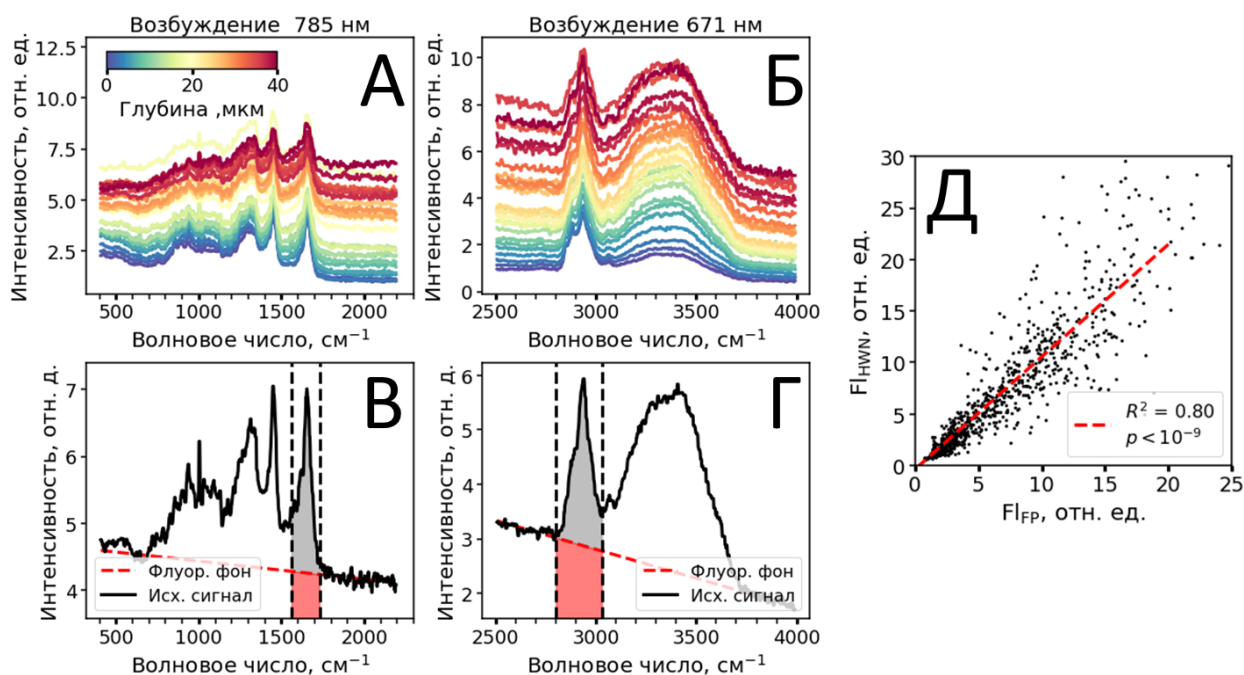


Рисунок 8.2 – Характерные спектры комбинационного рассеяния света кожи *in vivo* с разрешением по глубине и примеры вычитания фона флуоресценции. А, Б) Спектры КР кожи человека с разрешением по глубине в диапазонах 400–2200 см<sup>-1</sup> (А) и 2500–4000 см<sup>-1</sup> (Б). Цвет спектра соответствует глубине измерения в диапазоне от 0 до 60 мкм с шагом 2 мкм. В-Г). Примеры вычитания фона флуоресценции (красная пунктирная линия) для репрезентативных спектров КР (синяя линия) в диапазонах 400–2200 см<sup>-1</sup> (В) и 2500–4000 см<sup>-1</sup> (Г). Красные и синие области, закрашенные на рис. 1В,Г соответствуют интенсивностям флуоресценции и сигнала комбинационного рассеяния, используемым для оценки нормированной интенсивности флуоресценции (F1-FP и F1-HWN). Д) Корреляция между нормированными интенсивностями флуоресценции F1-FP и F1-HWN при возбуждении при 785 и 671 нм, соответственно.

На рисунке 8.2В–Г показаны примеры вычитания фона флуоресценции в областях FP (рис. 8.2 В) и HWN (рис. 8.2Г). Сигнал флуоресценции, усредненный по диапазонам 1550–1720 см<sup>-1</sup> (область FP, красная область на рис. 8.2В) и 2800–3000 см<sup>-1</sup> (область HWN, красная область на рис. 8.2Г), нормировался на усредненный сигнал КР в тех же спектральных областях (синие области на рис. 8.2В, Г). Усредненные таким образом значения интенсивности флуоресценции в FP и HWN областях, нормированные на сигнал КР, далее будут обозначаться как F1-FP и F1-HWN. Рассчитанные таким образом значения флуоресценции F1-FP и F1-HWN, измеренные на разных длинах волн возбуждения (785 нм и 671 нм), являются сильно скоррелированными (рис. 8.2 Д, линейная аппроксимация  $R^2 =$

0.80,  $p < 10^{-9}$ ), что позволяет предположить, за него ответственны одни и те же эндогенные флуорофоры.

Из спектров флуоресценции, показанных на рисунке 8.2А–Б, видно, что сигнал ИК флуоресценции существенно увеличивается на глубине  $\approx 40$  мкм. Данный факт находится в соответствии с предположением о том, что основным источником наблюдаемой флуоресценции является меланин, который обычно локализуется в базальном слое (на глубине около 40 мкм для кожи предплечья [577]).

Было обнаружено, что действительно, в разрешенных по глубине спектрах комбинационного рассеяния от кожи можно выделить вклад меланина по характерным линиям меланина на  $1380\text{ см}^{-1}$  и  $1570\text{ см}^{-1}$  (Рис. 8.3), частично перекрывающиеся с узкими линиями липидов и белков на  $1298$ ,  $1450$  и  $1655\text{ см}^{-1}$ . Было также показано, что спектрам КР с преобладающим вкладом линий меланина соответствует высокий флуоресцентный отклик (FI-FP). На рисунке 8.3А, Б представлены репрезентативные спектры КР кожи без вычитания флуоресцентного фона (Рис. 8.3А) и с вычитанием флуоресцентного фона (8.3Б) с различным вкладом меланина в сигнал комбинационного рассеяния.

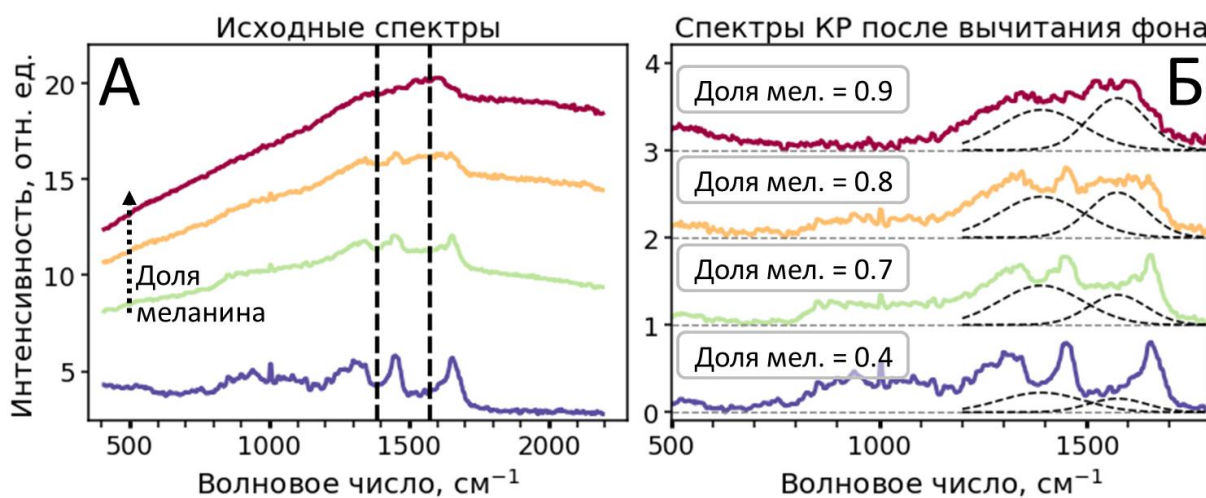


Рисунок 8.3. – А) Типичный вид спектра КР кожи (глубина детектирования 40 мкм) с различными уровнями сигнала ИК-флуоресценции до применения процедуры вычитания флуоресцентного фона. Б) Сигнал комбинационного рассеяния для спектров с панели А, выделенный с помощью процедуры вычитания фона. Чёрным пунктиром обозначены линии КР меланина с положениями максимумов на  $1380$  и  $1570\text{ см}^{-1}$ .

Для количественной оценки вклада меланина в спектр КР использовалась процедура декомпозиции спектра КР на несколько компонент: трех компонент, связанных с липидами и белками ( $1298$ ,  $1450$  и  $1655\text{ см}^{-1}$ ) и двух компонент, связанных с меланином ( $1380$  и  $1570\text{ см}^{-1}$ ). Аппроксимация выполнялась с использованием нескольких функций Гаусса с фиксированными центральными положениями и полуширинами, поэтому варьировались только амплитуды. Значения FWHM для полос КР белков и липидов при  $1298$ ,  $1450$  и  $1655$

$\text{cm}^{-1}$  были зафиксированы на уровне 80, 45 и  $50 \text{ cm}^{-1}$ , соответственно. Значения FWHM для полос с центрами  $1380$  и  $1570 \text{ cm}^{-1}$  были зафиксированы на уровне 235 и  $165 \text{ cm}^{-1}$  в соответствии с литературными данными [205,581,582,590] и спектральными измерениями *in vitro*. Использование большего количества пиков, которые учитывали бы другие молекулярные компоненты кожи, делает аппроксимацию неустойчивой. Более того, увеличение числа компонент не приводит к существенному увеличению точности аппроксимации, так как предложенная процедура описывает спектры с  $R^2=0.960\pm 0.018$  в диапазоне  $1200\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$ , т. е. всего 4% дисперсии в спектрах КР не описываются в рамках используемого алгоритма. Отметим, что нами также были рассмотрены другие процедуры выделения вклада меланина в спектры КР кожи (см. раздел 8.4), однако для решения задачи его локализации и исследования взаимосвязи с параметрами ИК флуоресценции процедура разложения на пять гауссовых компонент является адекватной.

Было показано, что сигнал ИК флуоресценции скоррелирован с долей меланина, оцененной как отношение суммы амплитуд линий меланина на  $1380$  и  $1570 \text{ cm}^{-1}$  к сумме амплитуд всех линий (линий меланина на  $1380$  и  $1570$  и линий белков на  $1298$ ,  $1450$  и  $1655 \text{ cm}^{-1}$ ). При этом доля меланина, оцененная из разложения сигнала КР в диапазоне  $1000\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$  имеет локальный максимум вблизи глубины  $35\text{--}40 \text{ мкм}$ , что соответствует представлениям о том, что основная часть меланина локализована вблизи базальной мембраны (по крайней мере, для добровольцев с типом кожи II и III). Схематическое представление строения кожи по глубине и определенные профили распределения меланина по сигналу КР и ИК-флуоресценции представлены на рисунке 8.4.

В то же время оказалось, что сигнал ИК флуоресценции не затухает на глубинах более  $35\text{--}40 \text{ мкм}$ , то есть, в дерме, где меланина нет (в норме) (Рис. 8.4В). Данный факт свидетельствует о том, что во флуоресцентный отклик на глубинах, соответствующих папиллярной дерме, вносят вклад другие флуорофоры, в частности, флуорофоры, локализованные на белках внеклеточного матрикса (коллагене, эластине). Так, на рисунке 8.5 представлены спектры КР кожи с вычтенным флуоресцентным фоном, полученные для областей с высоким значением FI-FP для глубины  $35$  и  $55 \text{ мкм}$ . В случае глубины  $35 \text{ мкм}$  в спектре КР наблюдается доминирующий вклад линий меланина, что связано с его локализацией в области базальной мембраны. В случае глубины  $55 \text{ мкм}$  (ниже базальной мембраны) в спектрах с высоким флуоресцентным фоном доминирующим является вклад коллагена.

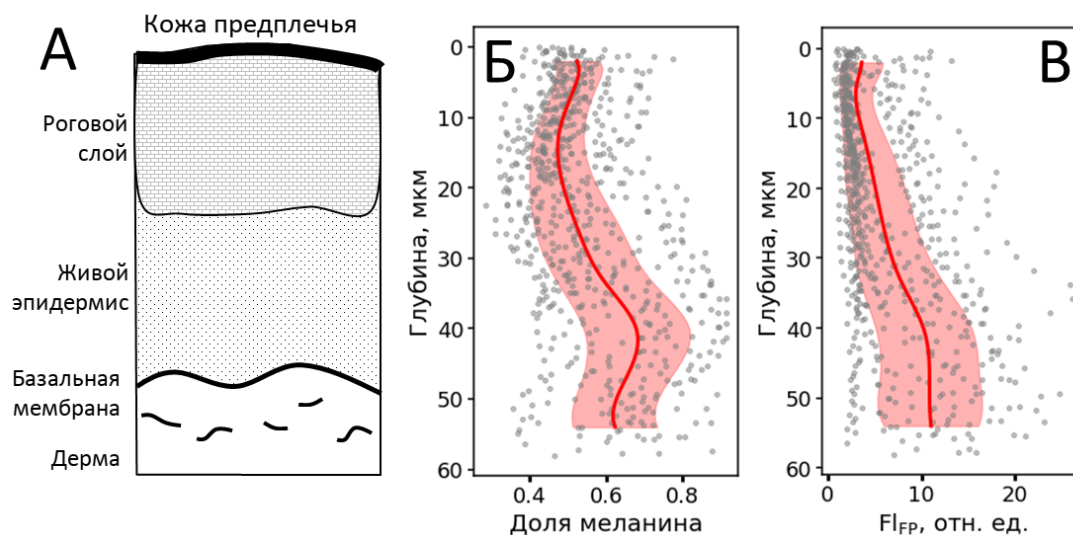


Рисунок 8.4 – А) Схематическое строение верхних слоёв кожи предплечья человека. Б,В) Распределение меланина, определенное из данных микроспектроскопии КР по интенсивности линий КР меланина на  $1380$  и  $1570$   $\text{см}^{-1}$  (Б) и по данным ИК-флуоресценции (В).

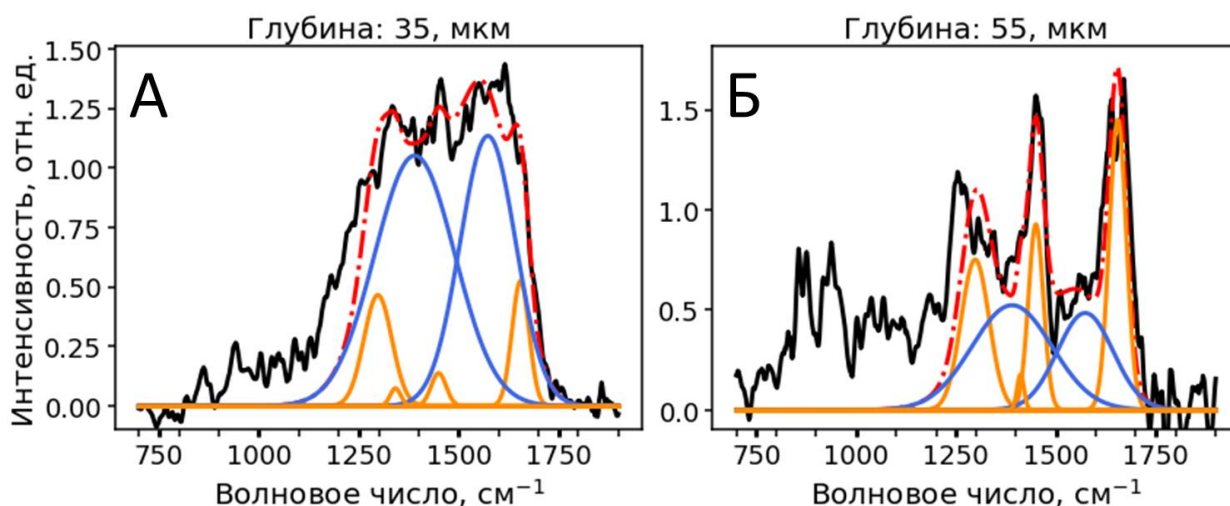


Рисунок 8.5 – Репрезентативные спектры КР кожи с вычтенным флуоресцентным фоном, характеризующиеся высокими значениями FI- $FP$ , измеренные для глубины А)  $35$  мкм, Б)  $55$  мкм.

Указанное наблюдение является еще одним свидетельством в пользу гипотезы о роли ГСФ в формировании флуоресцентного фона в живых системах при возбуждении в красной и ИК спектральных областях.

### 8.3 Спектроскопия КР как метод анализа структурной организации меланина

В результате анализа спектров кожи *in vivo* было получено, что параметры однофотонно-возбуждаемой ИК флуоресценции меланина коррелируют с относительной



интенсивностью линий меланина на  $1380$  и  $1570$   $\text{см}^{-1}$ . А именно, положение максимума флуоресценции, оцененного как положение максимума полинома второй степени, который был использован для оценки флуоресцентного фона, коррелирует с соотношением  $I(1380 \text{ см}^{-1})/I(1570 \text{ см}^{-1})$  спектров КР меланина. Характерные примеры спектров оптического отклика с различным положением максимума эмиссии и соответствующие им спектры КР с выделенными линиями меланина представлены на рисунке 8.6.

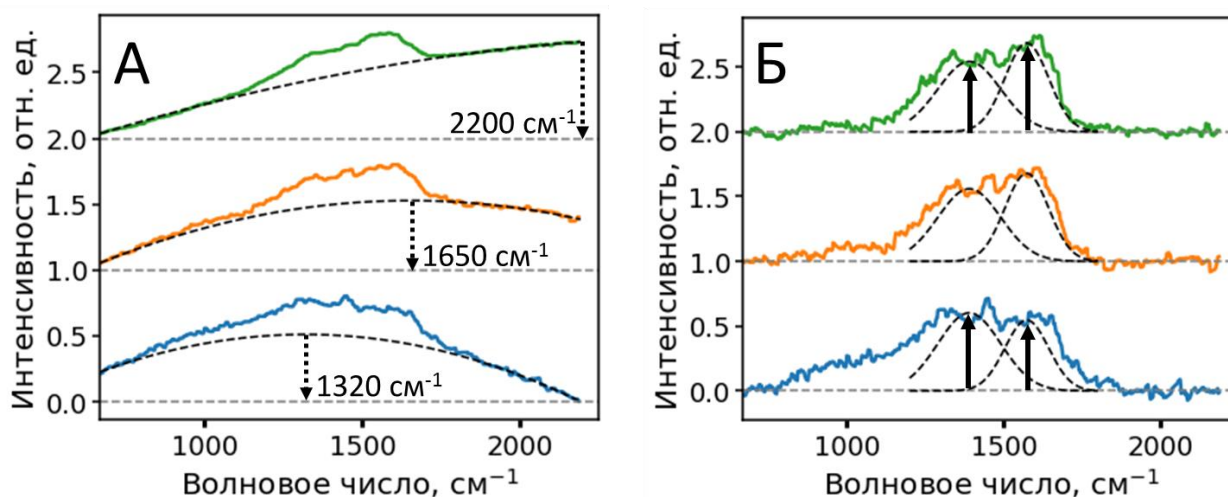


Рисунок 8.6 – А) Репрезентативные спектры оптического отклика с высоким уровнем сигнала флуоресценции. Пунктирными дугами отмечены результаты интерполяции флуоресцентного фона, стрелками – положения максимума спектра флуоресценции. Б) Спектры КР, определенные после вычитания флуоресцентного фона. Пунктирами обозначены полосы КР меланина на  $1380$  и  $1570$   $\text{см}^{-1}$ .

Как уже было отмечено, соотношение  $I(1380 \text{ см}^{-1})/I(1570 \text{ см}^{-1})$  может изменяться за счёт молекулярной организации меланина [582]. Данный факт может быть использован для разделения подтипов меланина *in vivo* и характеристики меланомы.

Рассмотрим также факторы, которые потенциально могут влиять на восстанавливаемое из спектров соотношение  $I(1380 \text{ см}^{-1})/I(1570 \text{ см}^{-1})$ . Во-первых, к изменению соотношения интенсивностей линий может привести вычитание флуоресцентного фона, однако, как показано на рисунке 8.1 на примере варьирования диапазона аппроксимации, процедура аппроксимации полиномом второго порядка является достаточно устойчивой. Во-вторых, на форму спектра может влиять поглощение сигнала кожей (по аналогии с эффектом внутреннего фильтра). Для учета этого фактора было проведено сравнение глубинных зависимостей интенсивностей флуоресценции, зарегистрированных в диапазоне  $2800\text{--}3000$   $\text{см}^{-1}$  при возбуждении на длине волны  $671$  нм и в диапазоне  $800\text{--}850$   $\text{см}^{-1}$  при возбуждении на длине волны  $785$  нм. Эти области волновых чисел, выбранные для возбуждения на  $671$  и  $785$  нм, соответствуют длинам волн излучения  $833$  и  $839$  нм соответственно; таким образом,

различия в ослаблении сигналов в этих областях должны определяться оптическими свойствами кожи, т. е. различиями в рассеянии и поглощении, связанными с возбуждением, а не с излучением. Анализ показал, что существенных различий между профилями сигнала флуоресценции, полученными при этих двух длинах волн возбуждения, не наблюдается (Рис. 8.7). Следовательно, можно утверждать, что поглощение не вызывает существенных изменений формы полосы флуоресценции *in vivo* в условиях, использованных в данной работе.

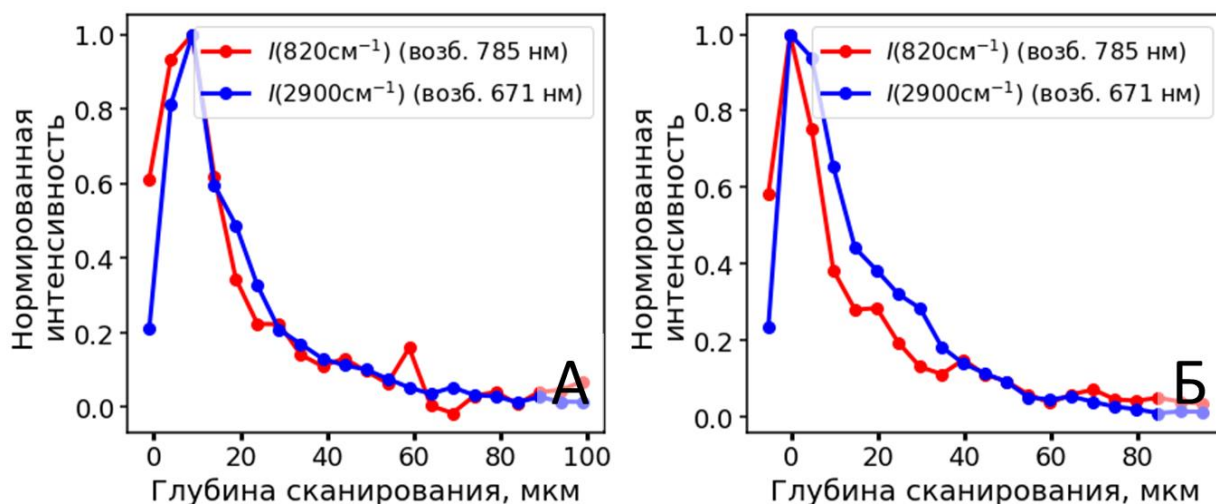


Рисунок 8.7 – Нормированные на максимум зависимости интенсивности флуоресценции при возбуждении на 785 нм (красный) и 671 нм (синий) и регистрации в области 833 нм для А) волонтера с типом кожи II и Б) волонтера с типом кожи III.

#### 8.4 Некоторые процедуры анализа данных микроспектроскопии КР кожи и выделения вклада меланина

В данном разделе будут рассмотрены два вопроса: (1) использование метода неотрицательной матричной факторизации данных микроспектроскопии для выделения спектров молекулярных компонент, в том числе, неизвестных, и определения их относительных концентраций и (2) способы выделения вклада меланина отличные от процедуры разложения спектров КР на компоненты.

В разделах 8.2-3 анализ спектров КР кожи рассматривался исключительно с точки зрения выделения вклада меланина, тогда как детальное рассмотрение вкладов других молекулярных компонент было опущено. В то же время методика микроспектроскопии КР является широко распространенной для анализа профиля распределения молекул в коже, патологических процессов в ней, проникновения внешних агентов и т.д. [591–594]. Стандартным подходом к определению молекулярных профилей отдельных веществ является аппроксимация экспериментально получаемых спектров КР кожи взвешенной суммой спектров отдельных компонент. Так, например, в случае анализа состава рогового

слоя, считается, что спектры КР с хорошей точностью описываются композицией спектров кератина, аминокислот, составляющих естественный увлажняющий фактор (natural moisturizing factor, NMF), холестерина, церамидов, мочевины, урокановой кислоты, лактата [238,595]. Необходимость такого разложения обусловлена тем, что спектры КР подавляющего числа компонент значительным образом перекрываются в диапазоне отпечатков пальцев (500-2000 см<sup>-1</sup>). Лишь в отдельных случаях, например, в случае определения концентрации каротиноидов, имеющих характерную узкую линию на 1525 см<sup>-1</sup>, в коже возможно определить глубинный профиль вещества непосредственно по амплитуде линии [596]. В связи с этим в ряде случаев прибегают к разложению спектра КР в узком диапазоне по отдельным гауссовым линиям. Например, с помощью разложения на сумму гауссов полосы амид-1 возможно выделить преобладающую конформацию кератина в роговом слое [85,597], гидратированность коллагена в дерме [598]. Такой подход позволяет получить качественное представление об изменениях в спектре и не может быть эффективно использован без привязки к спектрам отдельных молекулярных компонент.

Аппроксимация спектров с использованием разложения по спектрам фиксированных компонент обладает рядом существенных недостатков. Во-первых, необходимо тщательно подходить к выбору набора компонент, описывающих спектр – небольшое число компонент не сможет описать наблюдаемые спектры КР с низким значением невязки, а использование большого числа компонент обычно приводит к нестабильному разложению. Во-вторых, используемые “библиотечные” спектры могут не до конца описывать изменения в оптическом отклике молекулярных компонент, наблюдаемом *in vivo*, из-за чувствительности КР спектра к физико-химическим параметрам микроокружения – часто именно небольшие изменения в относительных интенсивностях линий позволяют выделять патологические случаи [235].

Альтернативным подходом к анализу спектров КР биообъектов является использование методов статистического обучения (машинного обучения). В данных подходах классификация патологических и здоровых тканей, извлечение дополнительной информации из спектров КР делается на основе большого массива данных с использованием различных алгоритмов машинного обучения. Так методы кластеризации, методы главных компонент, дискриминантный анализ, генетические алгоритмы применялись для анализа здоровой и патологической кожи [235,599,600]. Основным недостатком указанных алгоритмов является то, что результаты работы этих алгоритмов сложно интерпретируемы. Например, независимые компоненты, выделяемые с помощью метода главных компонент, имеют как положительные, так и отрицательные значения – их вид сложно сопоставить со спектрами молекулярных компонент, присутствующих в



системе. При этом выделение отдельных молекулярных компонент необходимо для того, чтобы не только уметь строить эмпирические классификаторы, но и устанавливать молекулярные механизмы, приводящие, например, к разделению патологической и здоровой кожи по отклику КР.

Некоторые методы статистического обучения позволяют эффективно выделять информацию из исходных спектров комбинационного рассеяния, определяя при этом вид отдельных молекулярных компонент и изменений в спектрах отдельных компонент, без какой-либо априорной информации об их спектрах. Однако, применение данных методов к анализу спектров кожи недостаточным образом исследовано, в литературе представлено лишь несколько работ, анализирующих спектры кожи с помощью таких методик. Например, в работе [601] с помощью метода чередующихся наименьших квадратов (multivariate curve resolution alternative least-squares) из глубинно-разрешенных спектров КР в диапазоне высоких волновых чисел ( $2500-4000\text{ см}^{-1}$ ) были определены профили воды, липидов и белков в коже. Также в решении похожих задач хорошо себя зарекомендовал метод неотрицательного матричного разложения (НМР). Метод НМР для входной матрицы, составленной, например, из спектров КР, пытается найти упрощенное представление в виде произведения матриц меньшего ранга, отражающих амплитуды и спектры индивидуальных компонент, т.е. каждый спектр представляет собой взвешенную сумму спектров индивидуальных компонент. Особенностью НМР является то, что и амплитуды и спектры независимых компонент являются строго неотрицательными, что часто приводит к лучшей интерпретируемости отдельных компонент.

Чтобы убедиться, что метод НМР разлагает спектры КР кожи на физически значимые компоненты, был проведен тест на смоделированных данных. Для создания набора данных, имитирующего экспериментальные спектры КР кожи, была выполнена следующая процедура. Экспериментально полученные спектры КР с вычтенным по описанной в разделе 8.2 процедуре фоном были разложены на взвешенную сумму отдельных молекулярных компонент. Модельные спектры были рассчитаны как сумма основных базовых компонент кожи (кератин, натуральный увлажняющий фактор, урокановая кислота при рН 4 и рН 8, холестерин, мочевины, лактат, церамид 3 – всего 8 компонент по работе [595]) с весами, полученными в результате аппроксимации экспериментальных данных.

Одним из варьируемых гиперпараметров алгоритма НМР является ожидаемое количество выходных независимых компонент. В качестве первого приближения число компонент при анализе спектров КР кожи было задано равным восьми, согласно процедуре, используемой в литературе [595]. Было показано, что спектры выходных независимых

компонентов, полученных с помощью НМР, визуально схожи с компонентами, использованными при моделировании (Рис. 8.8А). Косинусная мера сходства, рассчитанная для выходных спектров, полученных с помощью НМФ, и входных базовых спектров представлена на рисунке 8.8А. Результатом теста явился вывод о том, что, когда число компонент известно априори, процедура НМР позволяет восстановить все основные компоненты и, соответственно, их глубинные профили (Рис. 8.8 Б, В). Как видно из рис. 1В, погрешность описания тестовых спектров набором компонент, восстановленных методом НМР, постепенно уменьшается с увеличением количества компонент  $n$  до  $\approx 0.4\%$  при  $n = 8$ . Это свидетельствует о том, что алгоритм правильно определяет необходимое количество компонент и объясняет  $\approx 99,6\%$  дисперсии смоделированных спектров КР. Следует отметить, что метод НМР с хорошей точностью восстанавливает положения (средняя абсолютная ошибка  $2,3 \pm 5.6 \text{ см}^{-1}$ ) и полуширины (средняя абсолютная ошибка  $4.6 \pm 6.2 \text{ см}^{-1}$ ) полос в спектрах КР, однако относительные интенсивности определяются со средней относительной ошибкой  $21 \pm 24\%$ . Данный факт может привести к некоторому несоответствию профилей распределения компонент по глубине (Рис. 8.8Б), которое, однако, не является существенным. На рисунке 8.8Г показана корреляционная матрица для амплитуд восстановленных методом НМР компонент и весов соответствующих базовых спектров, использованных при моделировании. Высокие значения корреляции наблюдаются для диагональных элементов, что означает, что амплитуды факторизации НМР могут быть использованы для определения профилей глубины молекулярных компонент кожи. Кроме того, значимая корреляция наблюдается также для нескольких недиагональных элементов, что связано со скоррелированным изменением нескольких молекулярных компонент с глубиной.

Далее к смоделированным спектрам был добавлен нормально распределенный шум с нулевым средним значением и дисперсией 5%. Для зашумленных данных ошибка восстановления была больше 5% даже при числе компонент, превышающем  $n = 8$ , однако входные базовые компоненты стабильно предсказывались процедурой НМР, а 9-й, 10-й и последующие компоненты не несли спектральной информации и могли быть классифицированы как шум. Таким образом, было показано, что метод НМР позволяет с хорошей точностью восстановить форму, число и концентрации компонент кожи на модельных данных.

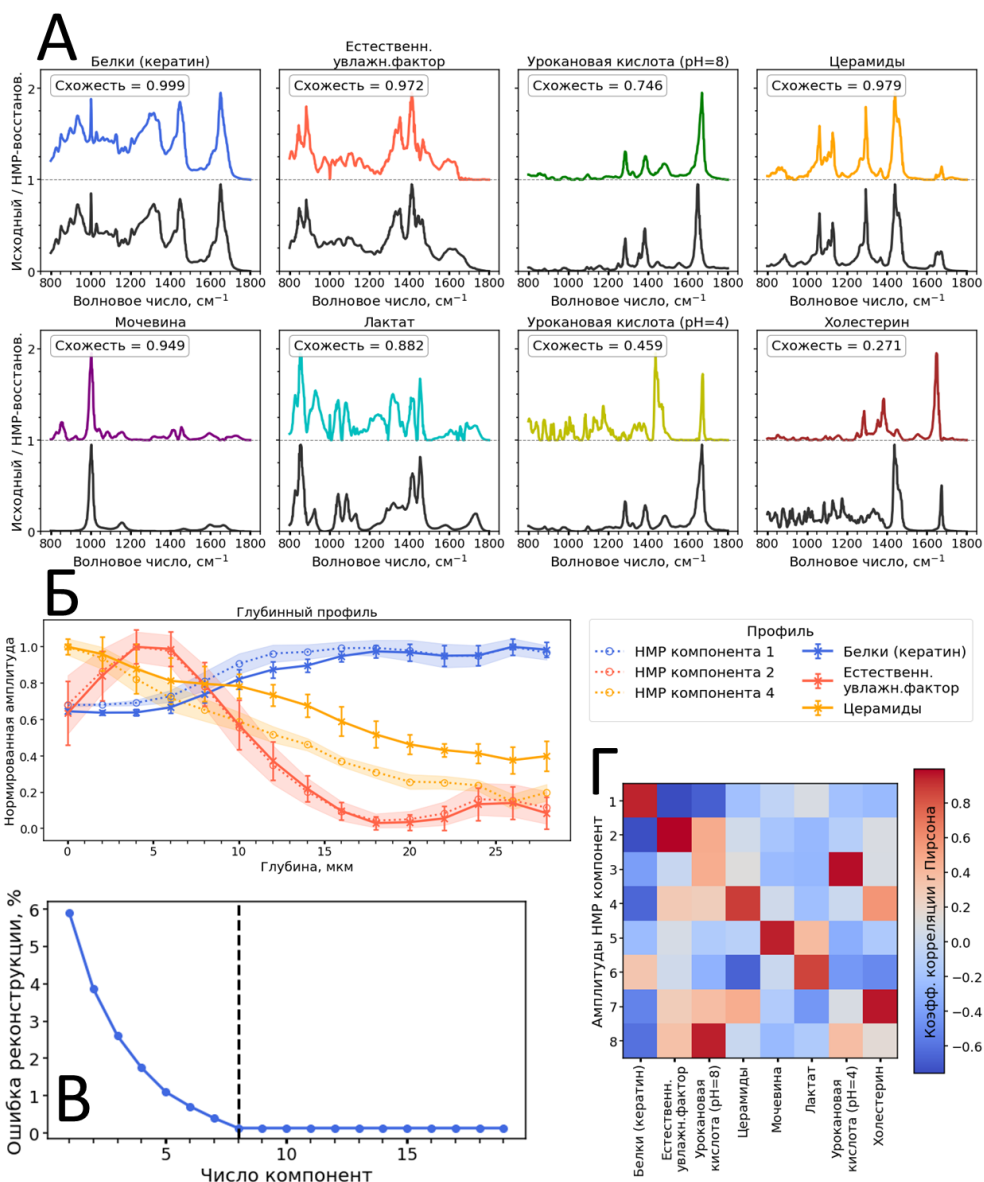


Рисунок 8.8 – Результаты применения метода НМР к данным микроспектроскопии кожи. А) Спектры молекулярных компонентов кожи, использованные при моделировании (черный) и спектры независимых компонент, восстановленных методом НМР. Косинусная мера сходства для указанных спектров приведена в поле рисунка. Б) Сравнение профилей распределения по глубине трех компонент – кератина, натурального увлажняющего фактора и керамида 3 – для данных, использованных при моделировании (пунктир) и полученных методом НМР (сплошные кривые). В) Зависимость ошибки аппроксимации спектров КР компонентами, полученными методом НМР, от задаваемого числа независимых компонент. Пунктирной вертикальной линией указано число компонент, использованное при моделировании ( $n = 8$ ). Г) Матрица корреляции между амплитудами компонент, заданными при моделировании, и амплитудами компонент, восстановленных методом НМР.

Анализ применимости метода НМР к экспериментальным данным проводился на наборе предварительно обработанных спектров КР кожи (всего  $\approx 2200$  КР-спектров), измеренных в диапазоне  $800\text{--}1800\text{ см}^{-1}$  на глубинах от 0 до 30 мкм. Поскольку в данном случае количество компонент заранее не было известно, их число варьировалось вплоть до значений  $n = 16$ ,

при котором количество «шумоподобных» компонентов было небольшим. На рисунке 8.9 показаны компоненты, восстановленные с помощью НМР, и репрезентативные профили для соответствующих компонент в эпидермисе, усредненные по нескольким измерениям для одного добровольца.

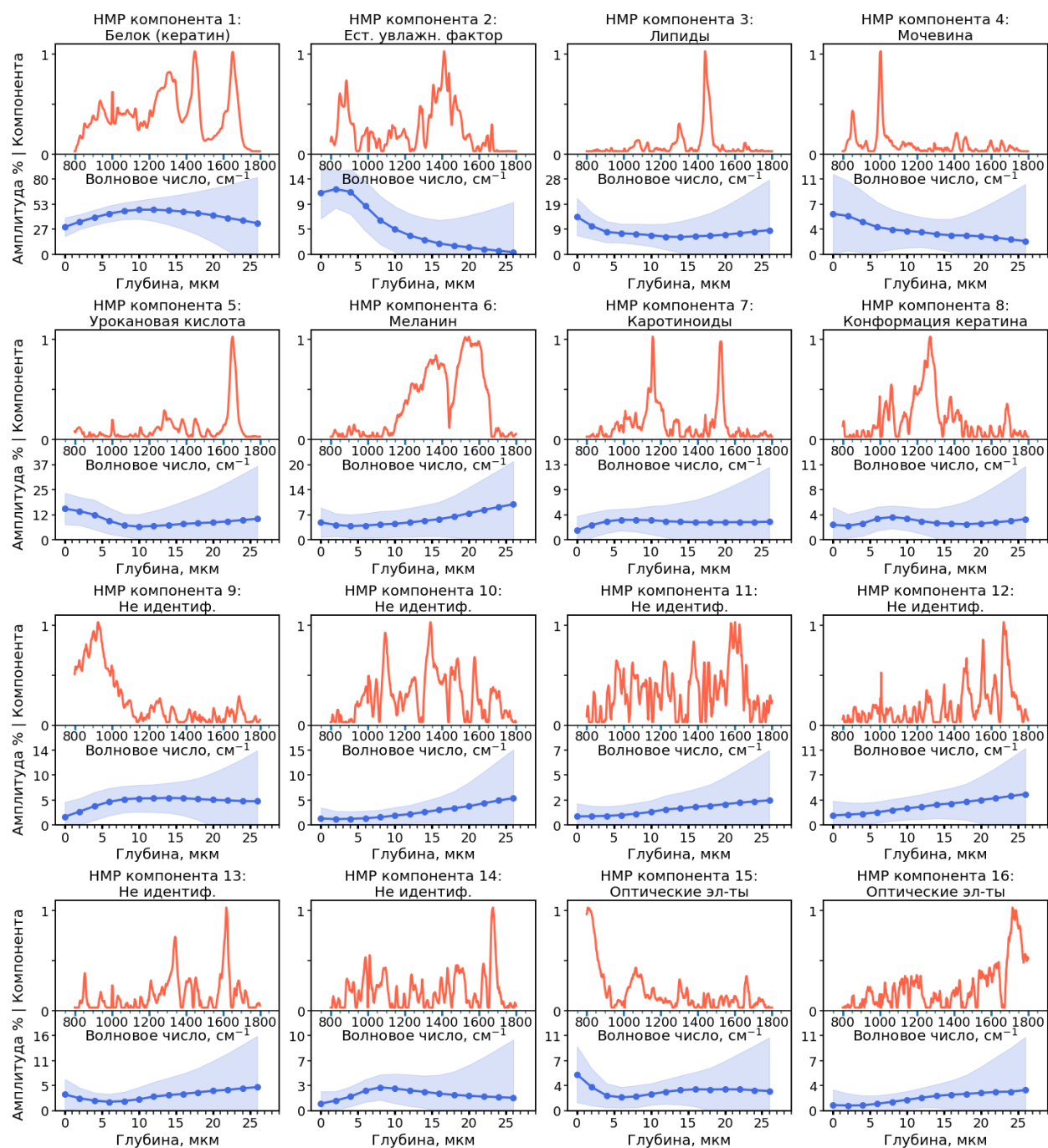


Рисунок 8.9 – Спектры КР (сверху, красный) и глубинные профили (снизу, синий) компонентов кожи, восстановленные методом НМР на наборе экспериментальных данных ( $\approx 2200$  КР-спектров).

Наряду с компонентами, используемыми в литературе (и в моделировании, проведенном выше) при анализе спектров кожи, такими как кератин, натуральный увлажняющий фактор, мочевина и др., метод НМР восстановил также и обычно не учитываемые компоненты, такие как меланин (компонента 6), каротиноиды (компонента 7) и конформационные

изменения кератина (компонента 8), которые будут рассмотрены ниже. При использовании косинусной оценки сходства несколько компонентов были отнесены к кератину, естественному увлажняющему фактору, урокановой кислоте, церамиду 3. В среднем относительное отклонение интенсивности основных линий компонент составило  $36 \pm 27\%$ , что превышает отклонения, наблюдаемые при факторизации модельных спектров. Поскольку алгоритм НМР не гарантирует полного отделения сигнала от отдельных молекулярных веществ, полосы спектров веществ могут быть отнесены к нескольким компонентам НМР, что приводит к изменению относительных интенсивностей полос. Изменения, наблюдаемые в компонентах, также могут быть связаны с изменением спектров веществ вследствие физико-химических процессов, происходящих *in vivo*.

Глубинные профили для идентифицированных компонентов вели себя аналогично профилям соответствующих молекулярных составляющих кожи, полученным в результате спектрального разложения с использованием базовых спектров (рис. 8.10А). Низкий относительный вклад компоненты НМР, связанной с кератином, на малой глубине объясняется высоким вкладом других компонентов, таких как естественный увлажняющий фактор, липиды, мочевины и т. д., в то время как его уменьшение на больших глубинах (20-25 мкм) может быть вызвано увеличением содержания воды в нижней части рогового слоя, что снижает концентрацию кератина в [602]. Амплитуда компоненты, связанной с естественным увлажняющим фактором, имеет локальный максимум на глубине 5-10 мкм и уменьшается с увеличением глубины [603]. Уменьшение амплитуды липидоподобного компонента с глубиной также находится в соответствии с литературой [603].

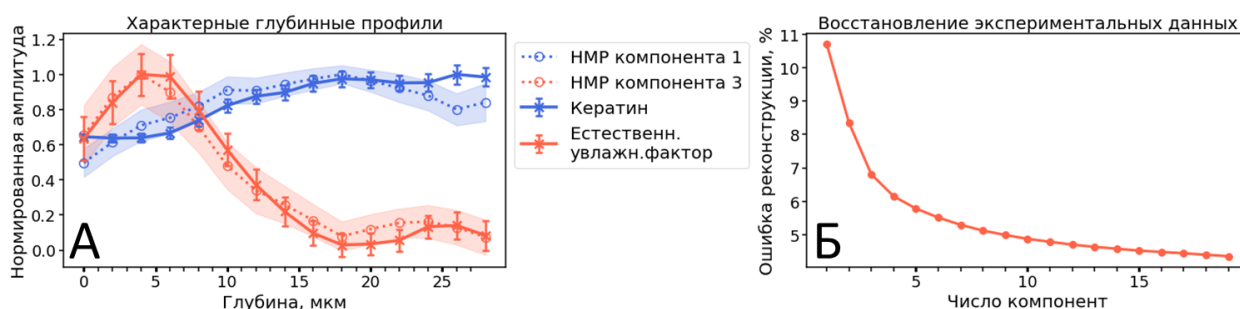


Рисунок 8.10 – А) Профили распределения кератина и увлажняющего фактора по глубине, полученные путем анализа спектров в программе SkinTools 2.0 (RiverD International B.V., сплошные кривые) и восстановленные методом НМР (пунктирные кривые). Б) Зависимость ошибки описания спектров компонентами НМР от числа используемых компонент. Уменьшение ошибки реконструкции спектров с увеличением количества компонент, используемых для НМР (рис. 8.10Б) свидетельствует о наличии более восьми уникальных независимых компонент. Действительно, было показано, что алгоритм НМР также предсказывает несколько компонент (рис. 8.9), которые имеют физический смысл. Так,

компоненты, показанные на рисунке 8.9 компоненты 6 и 7 соответствуют меланину и каротиноидам. Компонента, связанная с меланином, характеризуется широкими полосами комбинационного рассеяния в диапазоне 1200-1700  $\text{см}^{-1}$  с двумя локальными максимумами при  $\approx 1370$  и  $1580 \text{ см}^{-1}$ . Концентрация меланина и вклад соответствующего компонента в экспериментально наблюдаемые спектры комбинационного рассеяния могут быть значительными в эпидермисе, включая роговой слой, как было показано в разделе 8.2. Компонента 7 имеет узкие полосы с максимумами при 1156 и  $1523 \text{ см}^{-1}$ , характерные для каротиноидов [604]. Каротиноиды являются природными антиоксидантами, присутствующими в коже человека в различных концентрациях [605,606]. Компонента 8, изображенный на рис. 8.9 отвечает за вариабельность в спектрах КР, связанную с изменением конформации белка в верхних слоях эпидермиса. А именно, компонент 8, имеющий широкую полосу в диапазоне 1200–1250  $\text{см}^{-1}$  и небольшой максимум при  $1670 \text{ см}^{-1}$ , может описывать изменения в спектре КР кератина при переходе от  $\alpha$ -спирали к  $\beta$ -листам. Действительно, изменения в диапазоне 1200-1250  $\text{см}^{-1}$  соответствуют изменениям в полосе амида III кератина [607–609]. Такие конформационные изменения также приводят к небольшому смещению положения полосы амид I.

Таким образом, неотрицательная матричная факторизация спектров КР с разрешением по глубине является удобным и мощным инструментом для оценки профилей концентрации молекулярных компонентов кожи. На смоделированных спектрах комбинационного рассеяния кожи с разрешением по глубине НМР точно реконструирует как спектры, так и зависимости от глубины основных компонентов, таких как кератин, естественный увлажняющий фактор, липиды и т. д. Неотрицательная факторизация экспериментально полученных спектров КР также позволяет выявить наличие меланина, каротиноидов и обнаружить малозаметные изменения в спектрах КР, связанные с изменением вторичной структуры кератина. При стандартном подходе спектры КР разлагаются на набор предопределенных компонентов, и выбор этих «библиотечных» компонентов является решающим шагом, который существенно влияет на результаты разложения. Напротив, НМР не требует предварительного выбора основных компонентов и предоставляет информацию о значимых компонентах, вносящих вклад в спектры КР. Таким образом, НМР может служить дополнительным методом анализа спектров комбинационного рассеяния кожи и может быть успешно использован для получения новых сведений о профилях концентрации молекул кожи *ex vivo* и *in vivo*, в том числе, меланина.

Вклад меланина в спектр КР в диапазоне 1200–1800  $\text{см}^{-1}$  также можно оценить без использования процедур разложения и НМР. Как видно на рисунке 8.5, связанная с меланином полоса на  $1570 \text{ см}^{-1}$  лишь частично накладывается на полосу при  $1655 \text{ см}^{-1}$ .

Таким образом, долю меланина в спектре КР можно оценить как усредненную интенсивность полосы КР в районе 1570, нормированную на интенсивность полосы 1655  $\text{см}^{-1}$  белков. На рисунке 8.11 представлена оценка доли меланина как отношение интенсивностей, усредненных в областях 1500–1590  $\text{см}^{-1}$  и 1590–1710  $\text{см}^{-1}$ , и показано, что она положительно коррелирует ( $R^2 \approx 0,96$ ) со значением, полученным из описанной выше процедуры разложения спектра.

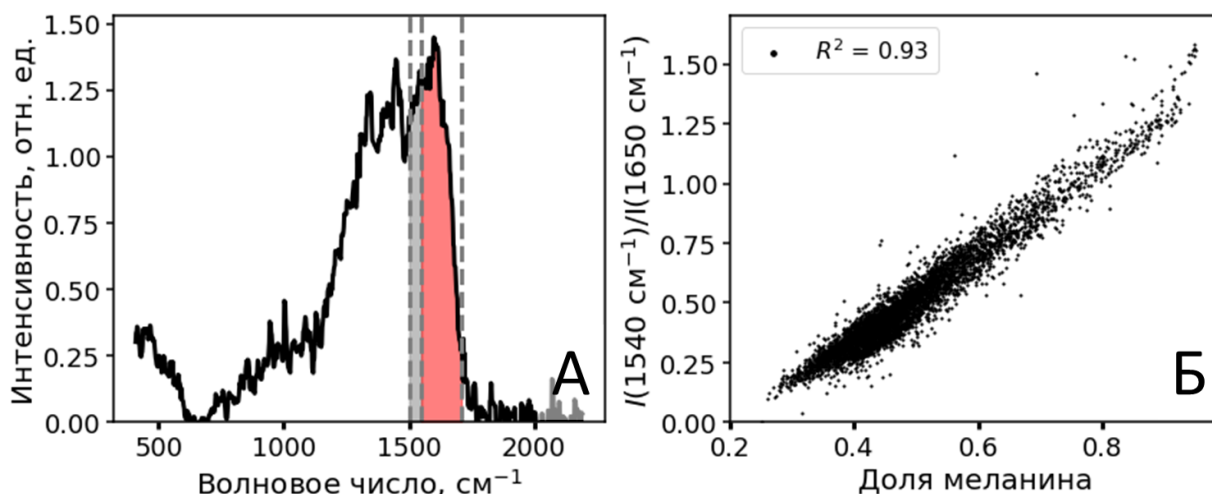


Рисунок 8.11 – А) Пример спектра КР кожи (глубина 28  $\mu\text{м}$ ), на котором проиллюстрированы области, использованные для оценки вклада меланина в спектр (1500–1590  $\text{см}^{-1}$ ,  $I_{1540}$ , синяя область, меланин, и 1590–1710  $\text{см}^{-1}$ ,  $I_{1655}$ , красная область, белки). Б) Корреляция между долей меланина, оцененной с помощью разложения спектров КР с использованием пяти гауссовых линий в диапазоне 1200–1800  $\text{см}^{-1}$ , и отношением усредненных интенсивностей  $I_{1540}/I_{1655}$ .

Успешное применение простого радиометрического подхода для меланина стимулировало поиск аналогичных соотношений для других молекулярных компонент, в частности, коллагена. Для этого были рассчитаны отношения интенсивностей спектров КР для всех пар волновых чисел в диапазоне 800–1800  $\text{см}^{-1}$ , а затем оценены значения  $R^2$  линейных корреляций между рассчитанными отношениями и амплитудами компонент, полученными методом неотрицательной матричной факторизации для экспериментально измеренных спектров КР кожи. На рисунке 8.12 показана карта распределения коэффициента корреляции  $R^2$  для всех пар значений  $I(\nu_i)/I(\nu_j)$ . Самая высокая линейная корреляция ( $R^2=0.59$ ) наблюдалась для отношения  $I_{1244}/I_{1298}$ , где интенсивности при указанных волновых числах усреднялись по области  $\pm 5 \text{ см}^{-1}$  вблизи центральной линии. Источником таких изменений в спектрах КР является коллаген, так как он является основным компонентом внеклеточного матрикса и имеет интенсивную полосу C-N колебаний на 1244  $\text{см}^{-1}$  [610,611], в то время как липиды, расположенные в эпидермисе, являются источником полосы КР на 1298  $\text{см}^{-1}$  [85]. Следовательно, отношение  $I_{1244}/I_{1298}$  может быть полезным



инструментом для детектирования дермально-эпидермального соединения по профилям спектров КР.

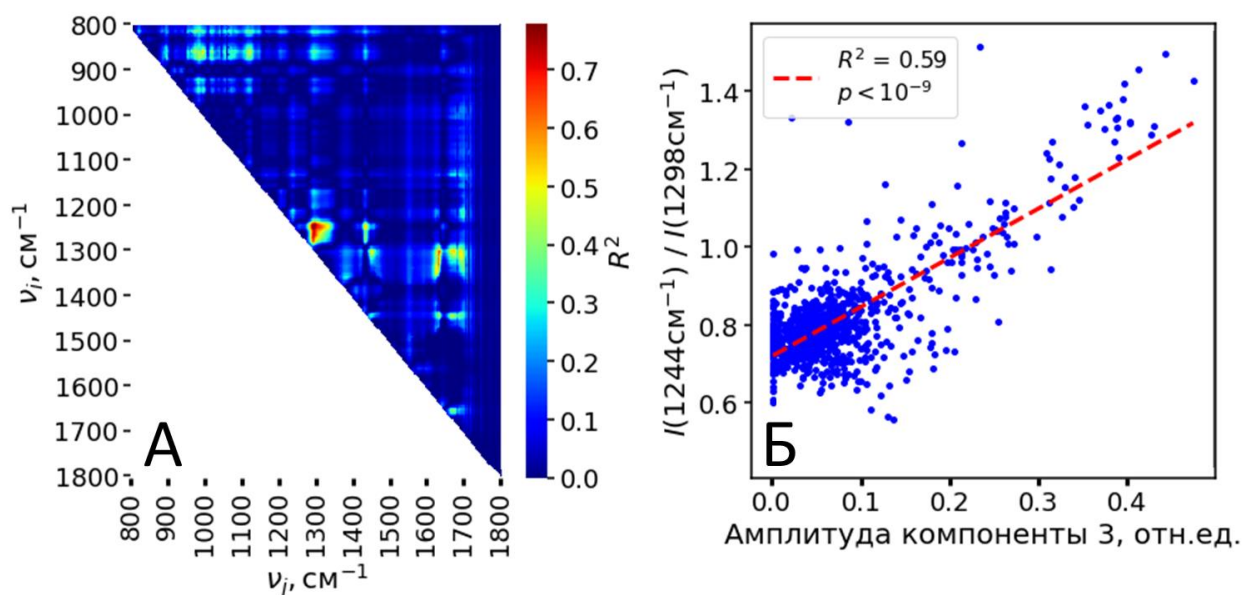


Рисунок 8.12 – А) Карта коэффициента линейной корреляции  $R^2$  между отношением интенсивностей  $I(v_i)/I(v_j)$  в спектре КР и амплитудой компоненты неотрицательной матричной факторизации, соответствующей коллагену, для спектров, полученных на глубине менее 20 мкм. Б) Зависимость амплитуды компоненты неотрицательной матричной факторизации, соответствующей коллагену, и отношения  $I_{1412}/I_{1620}$ .

Таким образом, в данном разделе был предложен универсальный подход для поиска и определения концентрации молекулярных компонент в коже, который может быть также использован для любой биоткани. С помощью предложенного метода было также показано наличие меланина в роговом слое, что имеет значение для анализа его деградации и распространения *in vivo*.

### 8.5 Механизм двухфотонного возбуждения флуоресценции меланина

Как было указано во Введении к данной Главе, одним из используемых методов визуализации меланина является двухфотонная микроскопия, при реализации которой меланин контрастируется по повышенной интенсивности флуоресценции при возбуждении в области 760 нм и возможности его селективного возбуждения в области 800 нм. Указанные возможности являются следствием особенностей оптических свойств меланина, в том числе, наличия у него края поглощения в БИК области спектра.

Характерные сечения «истинного» (через виртуальный уровень) двухфотонного поглощения ИК-излучения молекул составляют по порядку  $10^{-48}$ - $10^{-50}$   $\text{см}^4\text{с}^{-1}$ . В то же время, когда у системы имеется поглощение в области ИК накачки, возбуждение может происходить с участием реального уровня и являться не двухфотонным, а двухстадийным (или двухквантовым). Наличие двухквантового поглощения было предположено для



меланина в ряде работ [573–575]. При двухквантовом поглощении эффективное сечение поглощения и, соответственно, возбуждения флуоресценции, возрастает на порядки в сравнении с типичным сечением двухфотонного поглощения.

На рисунке 8.13А приведены изображения кожи предплечья *in vivo*, полученные методом двухфотонной томографии (ДФТ). Так, на рисунке 8.13 А,Б приведено флуоресцентное изображение базального слоя кожи, яркие области при этом соответствуют меланину, что подтверждается параметрами затухания их флуоресценции (рисунок 8.13В) – области с меланином характеризуются сверхбыстрым затуханием флуоресценции [472].

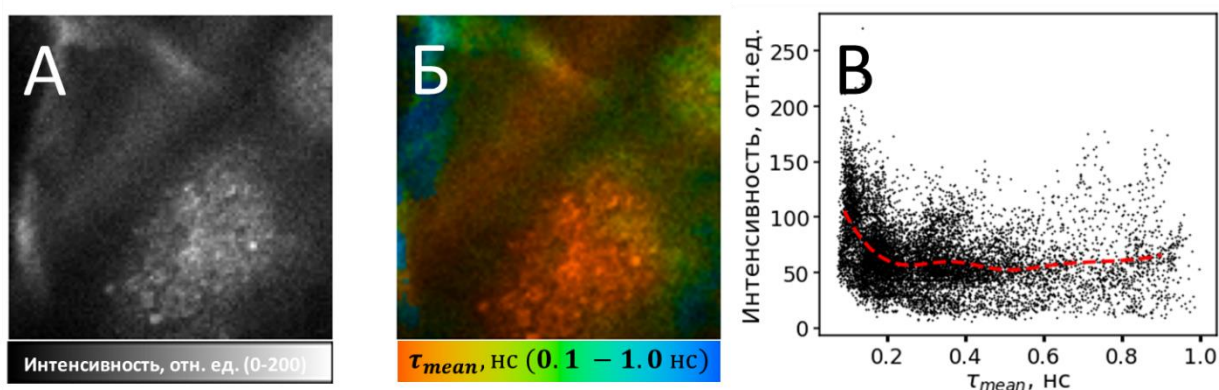


Рисунок 8.13 – А) Флуоресцентное изображение кожи человека *in vivo*, полученное методом ДФТ. Яркие области соответствуют наличию меланина. Б) Изображение FLIM той же области, что и на панели А. В) Корреляция между временем жизни и интенсивностью флуоресценции в области базальной мембраны.

Далее была проведена оценка того, насколько сигнал флуоресценции меланина превышает сигнал от других эндогенных флуорофоров кожи. При двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм флуоресценция клеток, в том числе, клеток эпидермиса, объясняется наличием в них НАД(Ф)Н (см. Главу 7). На рис. А2В показана корреляция между интенсивностью флуоресценции в каждом пикселе (биннинг = 5) и средним временем жизни флуоресценции в нем. Видно, что сигнал флуоресценции в областях с быстрым затуханием (~100 пс, что соответствует ширине аппаратной функции установки) составляет около 2000 отн. ед., тогда как сигнал от НАД(Ф)Н (среднее время в районе 600-800 пс, НАД(Ф)Н в кератиноцитах [119]) составляет при тех же настройках около 200 отн.ед., то есть, меланин характеризуется интенсивностью в 10 большей, чем НАД(Ф)Н. Повышенная интенсивность флуоресценции меланина может являться как следствием его высокой концентрации, так и определяться повышенными значениями сечения возбуждения флуоресценции в связи с наличием у него поглощения в области накачки. Проверка гипотезы о резонансном возбуждении меланина за счет двухквантового поглощения была реализована в данной работе методом флуориметрии насыщения.

В случае двухуровневой системы кинетические уравнения для населенности основного ( $n_g$ ) и возбужденного ( $n_e$ ) состояний выглядят следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dn_e}{dt} = \left(\frac{I}{\hbar\omega}\right)^2 \sigma^{(2)} n_g - \frac{n_e}{\tau} \\ n_e(t=0) = 0 \\ n_e + n_g = 1 \end{cases} \quad (8.1)$$

где  $I$  – интенсивность накачки,  $\sigma^{(2)}$  – сечение двухфотонного поглощения,  $\tau$  – время жизни возбужденного состояния. Для простоты далее будет рассмотрен возбуждающий импульс прямоугольной формы.

Поскольку в типичных экспериментах с использованием двухфотонной микроскопии длительность импульсов  $\tau_p$  возбуждающего излучения ( $\sim 100$  фс) значительно меньше характерных времен жизни возбужденного состояния органических флуорофоров ( $\sim 0.1 \div 1$  нс),  $\tau_p/\tau < 10^{-3}$ , членом « $n_e/\tau$ » в формуле 8.1 при расчете заселения возбужденного состояния можно пренебречь, и в момент окончания импульса населенность возбужденного состояния описывается выражением (формула 8.2):

$$n(t = \tau_p) = 1 - \exp\left(-\left(\frac{I}{\hbar\omega}\right)^2 \sigma^{(2)} \tau_p\right). \quad (8.2)$$

Интегральная интенсивность флуоресценции тогда определяется формулой (8.3):

$$F(I) \propto \eta N n_e = \eta N \left[1 - \exp\left(-\left(\frac{I}{\hbar\omega}\right)^2 \sigma^{(2)} \tau_p\right)\right], \quad (8.3)$$

где  $\eta$  – квантовый выход флуоресценции,  $N$  – концентрация флуорофоров. Отметим, что в случае учета процесса вынужденного излучения в модели (формула 8.1) можно показать, что в показателе экспоненты в выражении (8.3) появится фактор 2, однако подробное рассмотрение вклада вынужденного излучения при двухфотонном возбуждении выходит за рамки рассматриваемой модели и не влияет существенно на изложенные ниже выводы.

Для качественного описания эффекта насыщения флуоресценции удобно рассмотреть безразмерный параметр  $\varphi = \left(\frac{I}{\hbar\omega}\right)^2 \sigma^{(2)} \tau_p$ . В случае  $\varphi \ll 1$  зависимость интенсивности флуоресценции от интенсивности накачки является квадратичной:

$$F(I) \sim \eta N \left(1 - \left(1 - \left(\frac{I}{\hbar\omega}\right)^2 \sigma^{(2)} \tau_p\right)\right) \sim \eta N I^2 \sigma^{(2)}, \quad (8.4)$$

то есть, интенсивность флуоресценции определяется сечением возбуждения, равным произведению квантового выхода флуоресценции и сечения двухфотонного поглощения. В случае же  $\varphi \sim 1$  интенсивность флуоресценции определяется выражением (8.3) и, аппроксимируя ее зависимость от интенсивности накачки, становится возможным

разделить вклады сечения двухфотонного поглощения (стоит в показателе экспоненты) и квантового выхода флуоресценции (предэкспоненциальный фактор). Таким образом, в данном разделе ставились задачи

- (1) измерения кривых насыщения двухфотонной флуоресценции меланина, обладающего поглощением в области длины волны накачки, и модельных соединений – красителей, у которых на длине волны накачки однофотонное поглощение отсутствует. В случае двухквантового характера возбуждения флуоресценции меланина сечение поглощения, определенное для него из кривых насыщения флуоресценции, должно было быть значительно выше, чем у красителей.
- (2) исследования факторов, которые потенциально могут влиять на ход кривых насыщения двухфотонной флуоресценции и отклонения их от модели (8.3), а именно, вклада фотодеградации, зависимости времени релаксации возбужденного состояния от интенсивности накачки и эффекта термодиффузии.

Гипотеза о возможности наблюдения эффекта насыщения сигнала двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции была верифицирована с использованием растворов модельных красителей, обладающих различными фотофизическими характеристиками. Кривые зависимости интенсивности флуоресцентного отклика от мощности падающего излучения (из одной пространственной точки) были измерены для водного раствора тиофлавина Т ( $10^{-4}$  М), раствора 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислоты в диметилсульфоксиде (1,8-АНС, в концентрации  $10^{-4}$  М), спиртового раствора флуоресцеина, и водного раствора меланина (0.1 мг/мл), выделенного по протоколу [612]. Для возбуждения двухфотонной флуоресценции было использовано излучение параметрического генератора света TOPOL-1050С (Авеста, Россия), обладающего перестройкой длины волны возбуждения в диапазоне 680-1000 нм, имеющего характерную длительность импульса 150 фс, частоту следования импульсов 80 МГц. Измерения проводились с помощью планопохроматического воздушного 20х объектива с числовой апертурой NA=0.75. Детектирование сигнала флуоресценции производилось с помощью системы для время-коррелированного счёта единичных фотонов с гибридным GaAsP детектором и платой счёта фотонов, обеспечивающей временное разрешение  $\sim 50$  пс. Возбуждение сигнала флуоресценции для водного раствора тиофлавина Т, 1,8-АНС и меланина производилось при двухфотонном возбуждении на 800 нм, возбуждение флуоресценции флуоресцеина производилось на 900 нм (т.е. близко к удвоенному значению положения максимума полосы однофотонного поглощения в случае тиофлавина, 1,8-АНС и флуоресцеина).

Было получено, что при средних мощностях падающего излучения порядка 10-20 мВт после объектива, наблюдается отклонение зависимости интенсивности двухфотонной флуоресценции от квадрата мощности падающего излучения (Рис. 8.14). При этом зависимость интенсивности флуоресценции хорошо описывалась моделью с учётом насыщения (формула 8.3). Было установлено, что в случае использования модели насыщения величина сечения двухфотонного поглощения варьируется в диапазоне 100–300 ГМ (Гоерперт-Майер, 1 ГМ =  $10^{-50}$  см<sup>4</sup>с), что находится в соответствии с сечениями двухфотонного поглощения для данных красителей [613].

Сечение двухфотонного поглощения меланина, для которого в ряде работ предполагается аномально высокое значение сечения за счёт наличия края поглощения в красной и ближней инфракрасной области спектра, по данным работы [574], составляло 300 ГМ. Данное значение лишь незначительно превышает значения, полученные для красителей, что говорит об отсутствии резонансного возбуждения флуоресценции меланина при используемых условиях возбуждения, которые соответствуют типичным параметрам излучения, используемым в экспериментах по двухфотонной микроскопии.

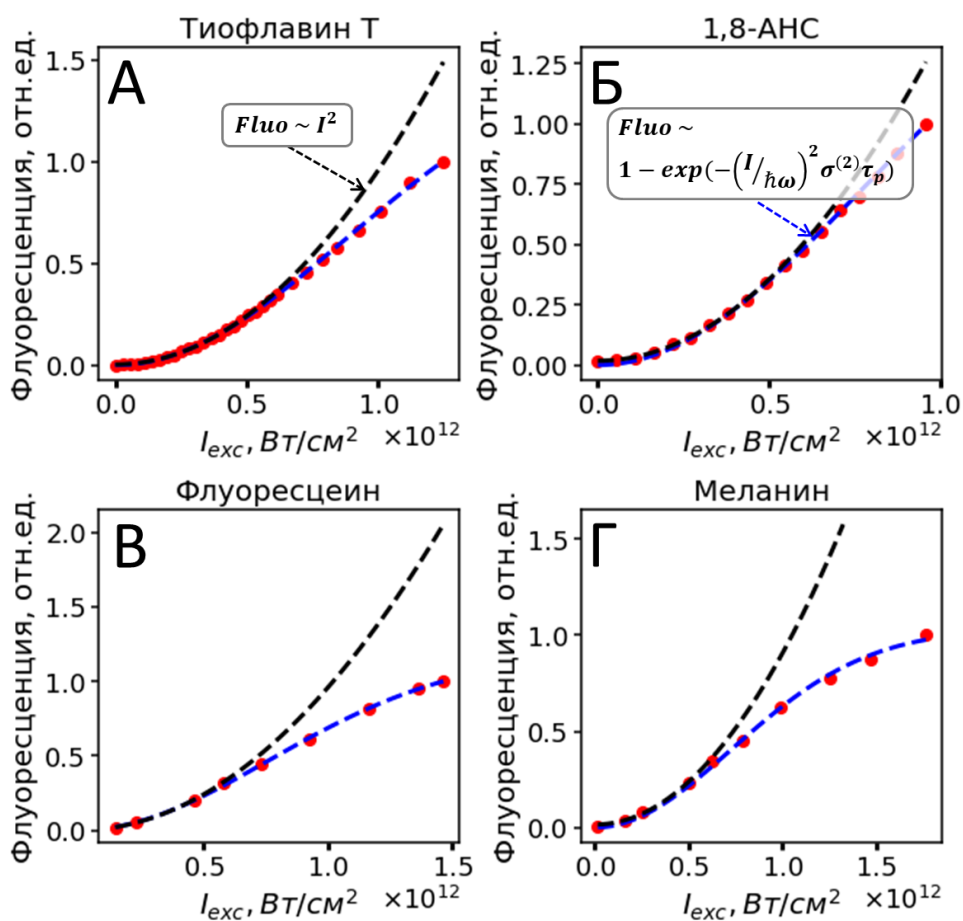


Рисунок 8.14 – Зависимость интенсивности флуоресценции от интенсивности накачки для растворов А) тиофлавина Т, Б) 1,8-ANS, В) флуоресцеина натрия, Г) меланина. Черная пунктирная

кривая соответствует квадратичной зависимости (которая должна наблюдаться в отсутствие эффекта насыщения), синяя пунктирная кривая соответствует аппроксимации экспериментальных данных моделью (формула 8.3).

Далее были рассмотрены факторы, которые потенциально могут влиять на выводы об эффекте насыщения флуоресценции в рассмотренных системах. Так, одним из ключевых вопросов при работе с живыми системами и биомолекулами является влияние интенсивного излучения на их свойства. Отклонение зависимости интенсивности двухфотонной флуоресценции от квадрата мощности накачки, продемонстрированное на рисунке 8.14, может быть следствием не только эффекта насыщения за счёт обеднения основного состояния флуорофоров, но и других эффектов: фотовыцветания, аннигиляции возбужденных состояний флуорофоров [614], термодиффузии – локального уменьшения концентрации флуорофора в области сканирования при нагреве области детектирования лазерным излучением. Влияние данных факторов также было проверено экспериментально на растворах ранее перечисленных модельных систем.

Исследование влияния фотовыцветания было проверено путём измерения зависимости интенсивности двухфотонной флуоресценции от мощности накачки для растворов красителей при последовательном увеличении мощности накачки от минимальной (средняя мощность после объектива 0.1 мВт) до максимальной (средняя мощность после объектива 20 мВт), а затем при последовательном уменьшении мощности накачки для этой же пространственной точки образца. В случае если бы для образцов наблюдалось фотовыцветание красителя, зависимости интенсивности флуоресценции от мощности накачки, измеренные при увеличении и уменьшении мощности не должны были бы совпадать (за счёт уменьшения интенсивности флуоресценции из-за эффекта фотовыцветания). Экспериментально для исследуемых модельных образцов наблюдалось совпадение кривых насыщения измеренных как при последовательном увеличении мощности накачки, так и последовательном уменьшении мощности накачки (Рис. 8.15А).

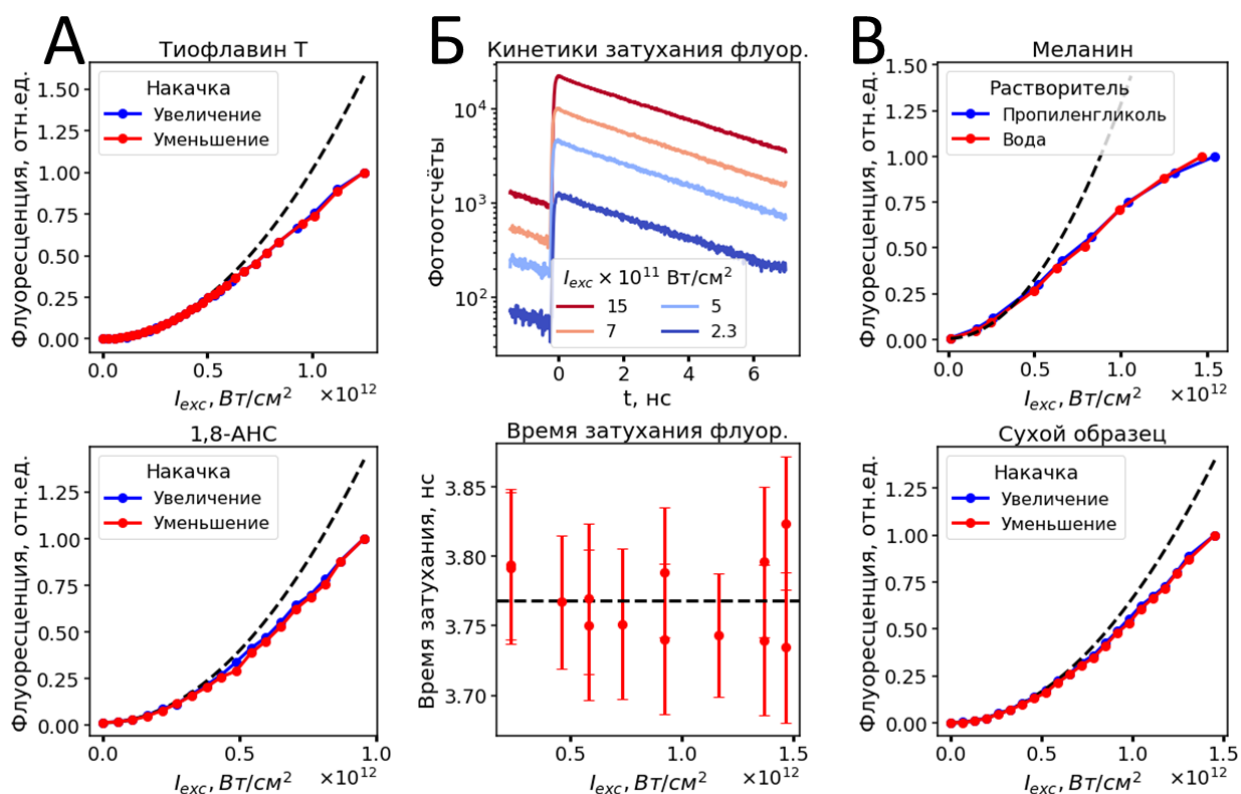


Рисунок 8.15 – А) Зависимости интенсивности флуоресценции растворов тиофлафина Т (сверху) и 1,8-ANS (снизу), полученные при последовательном увеличении (синий) и уменьшении (красный) интенсивности накачки. Отсутствие различий синей и красной кривых свидетельствует о малости эффекта фотодеградации в системе. Б) Сверху – кривые насыщения флуоресценции меланина в воде (красный) и пропиленгликоле (синий). Снизу – кривые насыщения флуоресценции, измеренные для сухого меланина при последовательном увеличении (синий) и уменьшении (красный) интенсивности накачки. В) Кривые затухания флуоресценции раствора флуоресцеина, измеренные при различной интенсивности накачки (сверху), и зависимость среднего времени жизни флуоресценции флуоресцеина от интенсивности накачки (снизу).

Далее было проверено, что уменьшение интенсивности флуоресцентного отклика при высоких мощностях накачки не связано с эффектом аннигиляции возбужденных состояний флуорофоров. В случае высокой концентрации флуорофоров в возбужденном состоянии возможен дополнительный безызлучательный канал дезактивации возбуждения, связанный с взаимодействием флуорофоров, например, за счет переноса энергии между ними [615]. Наличие аннигиляции возбужденного состояния должно проявляться в уменьшении времени затухания флуоресценции флуорофора при увеличении интенсивности накачки. Было установлено, что в действительности, данный эффект так же не наблюдается для исследуемых систем. На рисунке 8.15Б представлены кинетики затухания двухфотонной флуоресценции и времена затухания флуоресценции флуоресцеина при различных мощностях накачки. Было установлено, что форма кинетики затухания флуоресценции и время затухания флуоресценции не изменяются (в пределах погрешности) при изменении средней мощности накачки в диапазоне от 0.1 до 30 мВт.

Наконец, было проверено, что отклонение зависимости двухфотонной флуоресценции от квадрата мощности накачки не связано с эффектами термодиффузии в растворе. Для этого кривые насыщения флуоресценции были измерены для образца меланина в водном растворе и в 90% смеси пропиленгликоля и воды при комнатной температуре. Вязкость данных растворов отличается в ~20 раз (1 мПа·с у воды и 20 мПа·с у 90% смеси пропиленгликоль-вода [616]). В случае существенного влияния диффузионных эффектов на зависимость интенсивности флуоресценции от мощности накачки, для данных образцов должны были бы наблюдаться существенные отличия. Экспериментально было обнаружено, что данных отличий не наблюдается (Рис. 8.15В). Аналогично, кривые насыщения двухфотонной флуоресценции наблюдались и для образца меланина, высушенного на стеклянной подложке (в приготовленном таким образом образце можно избежать диффузионные эффекты, (Рис. 8.15В, нижняя панель).

Таким образом, было показано, что использование метода флуориметрии насыщения позволяет определять сечение двухфотонного поглощения флуорофоров, при этом эффекты фотодеградации, аннигиляции возбужденных состояний и термодиффузии не оказывают критического влияния на данную методику. Путем анализа кривых насыщения модельных красителей и меланина было показано отсутствие у него эффекта резонансного возбуждения в БИК области. Таким образом, можно заключить, что повышенный на порядок (в сравнении с другими эндогенными флуорофорами кожи) сигнал флуоресценции меланина, наблюдаемый *in vivo* при методом двухфотонной микроскопии (Рис. 8.13) связан, прежде всего, с высокой локальной концентрацией флуорофоров в частицах меланина. Вторым следствием из экспериментов по насыщению флуоресценции явился о вопрос о возможности реализации данной методики в виде метода микроскопии, в котором картируется сечение двухфотонного поглощения образца. Анализ этого вопроса посвящен следующий раздел данной Главы.

## **8.6 Метод микроскопии насыщения флуоресценции**

Возможность определения значения сечения двухфотонного поглощения из кривых насыщения флуоресценции и незначительный эффект фотодеградации флуорофоров, наблюдаемый при необходимых для насыщения интенсивностях (Рис. 8.14), стимулировали проверку возможности реализации данной методики в варианте микроскопии. Так, в методе FLIM картируются параметры затухания флуоресценции, которые затем служат в качестве эндогенного контраста для визуализации различных структур – например, органелл клетки (Рис. 8.16). Картирование сечения двухфотонного

возбуждения флуоресценции потенциально может позволить получить дополнительный (или даже самостоятельный) контраст для молекулярного имиджинга живых систем.

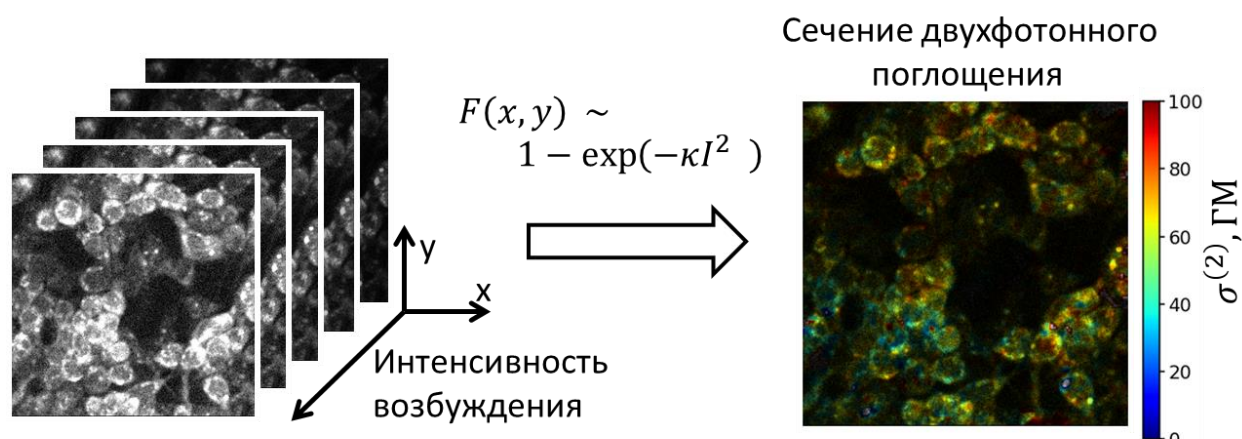


Рисунок 8.16 – Схематическое изображение методики микроскопии насыщения флуоресценции: одна и та же область образца измеряется при нескольких интенсивностях накачки, после чего для каждого пикселя строится кривая зависимости интенсивности флуоресценции от интенсивности накачки (кривая насыщения флуоресценции), из которой определяется сечение двухфотонного поглощения.

В случае работы с живыми клетками не менее остро, чем в случае работы с модельными системами, стоит вопрос о вкладе эффекта фотодеградации в измеряемый сигнал. Для оценки влияния лазерного излучения на параметры клеток (использовалась культура клеток-гепатоцитов Нер G2) было проведено два типа измерений. Во-первых, анализировался эффект фотодеградации при последовательном измерении одной и той же области изображения при максимальной интенсивности, использовавшейся в экспериментах ( $1.5 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup> при накачке на 760 нм). Во-вторых, для каждого изображения анализировалось распределение времени жизни флуоресценции, которое определяется метаболическими процессами в клетке [521]. Соответственно, если бы распределение параметров флуоресценции НАД(Ф)Н менялось со временем экспозиции (номером изображения), можно было бы говорить о влиянии излучения на биохимические процессы в клетке.

При измерениях сканирование области 512x512 пикселей осуществлялось за 6 с, то есть, время экспозиции в расчете на каждый пиксель составляло 24 мкс, при этом для регистрации одного изображения FLIM использовалось интегрирование по 10 кадрам, а время накопления составляло 60 с. Примеры измеренных изображений клеток, на которых картирована интенсивность и среднее время жизни флуоресценции, приведены на рисунках 8.17А и Б, соответственно.



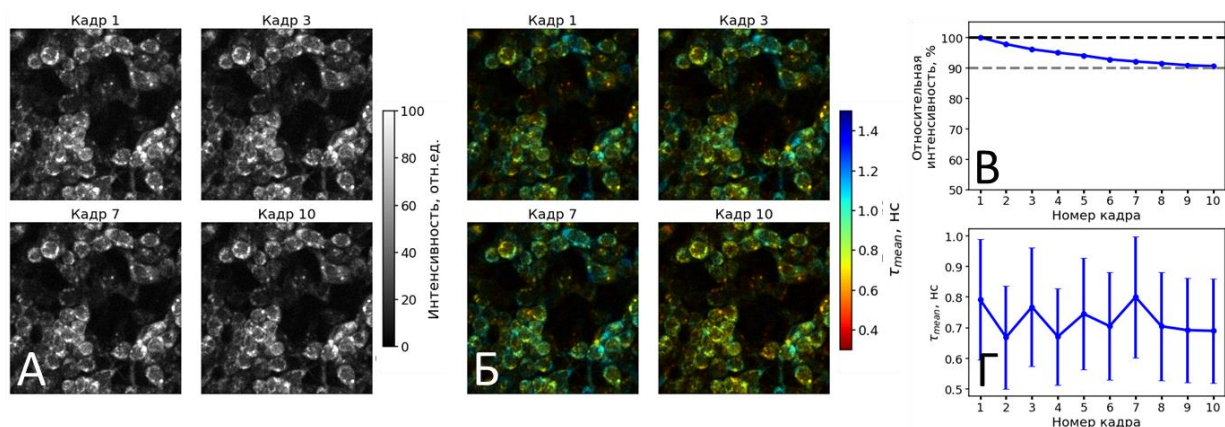


Рисунок 8.17 – Последовательно измеренные изображения культуры клеток Нер G2, на которых показано распределение А) интенсивности флуоресценции и Б) среднего времени жизни флуоресценции. В) Зависимость интегральной по изображению интенсивности и Г) среднего времени жизни флуоресценции от номера кадра. Длина волны накачки 760 нм, интенсивность накачки  $1.5 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup>, время регистрации одного изображения 60 с, время экспозиции на один пиксель изображения – 240 мкс.

Было показано, что при последовательной регистрации 10 FLIM-изображений (что соответствует 600 с экспозиции на весь кадр и 2.4 мс экспозиции на один пиксель изображения) наблюдается 10% падение интенсивности (рис. Ф1В), в то время как среднее время жизни флуоресценции остается неизменным (рис. Ф1Г). Данный факт свидетельствует в пользу незначительности влияния облучения на оптические параметры и, предположительно, метаболические процессы в клетках при указанных временах экспозиции и интенсивности накачки  $1.5 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup>. Отметим, что данная интенсивность соответствует максимальному значению, использовавшемуся при исследовании насыщения флуоресценции в клетках.

Зависимость интенсивности флуоресценции  $F$  от времени экспозиции  $\tau$  и интенсивности накачки  $I$  в первом приближении определяется выражением (формула 8.5):

$$F = F_0 \exp(-\alpha I \tau), \quad (8.5)$$

где  $F_0$  – начальный уровень флуоресценции,  $\alpha$  – коэффициент, характеризующий эффективность фотодеградации флуорофора. Тогда при последовательном измерении образца при наборе интенсивностей накачки  $I_i$  его флуоресценция может быть рассчитана как (формула 8.6):

$$F = \prod F_0 \exp(-\alpha I_i \tau) = F_0 \exp(-\alpha \tau \sum I_i), \quad (8.6)$$

Исходя из приведенной выше оценки, величина  $\alpha$  составляет  $\sim 10^{-16}$  Дж<sup>-1</sup>см<sup>2</sup>, тогда для измерения всей кривой насыщения при времени накопления одной точки 60 с (в режиме FLIM в сторону увеличения и уменьшения интенсивности) полная величина фотодеградации составит 5%.

Далее были измерены зависимости кривых насыщения двухфотонной флуоресценции для изображений клеток Нер G2 и карты среднего времени затухания флуоресценции с использованием время-коррелированного счёта фотонов – пример изображений, полученных при различной интенсивности накачки, приведен на рисунке 8.18.

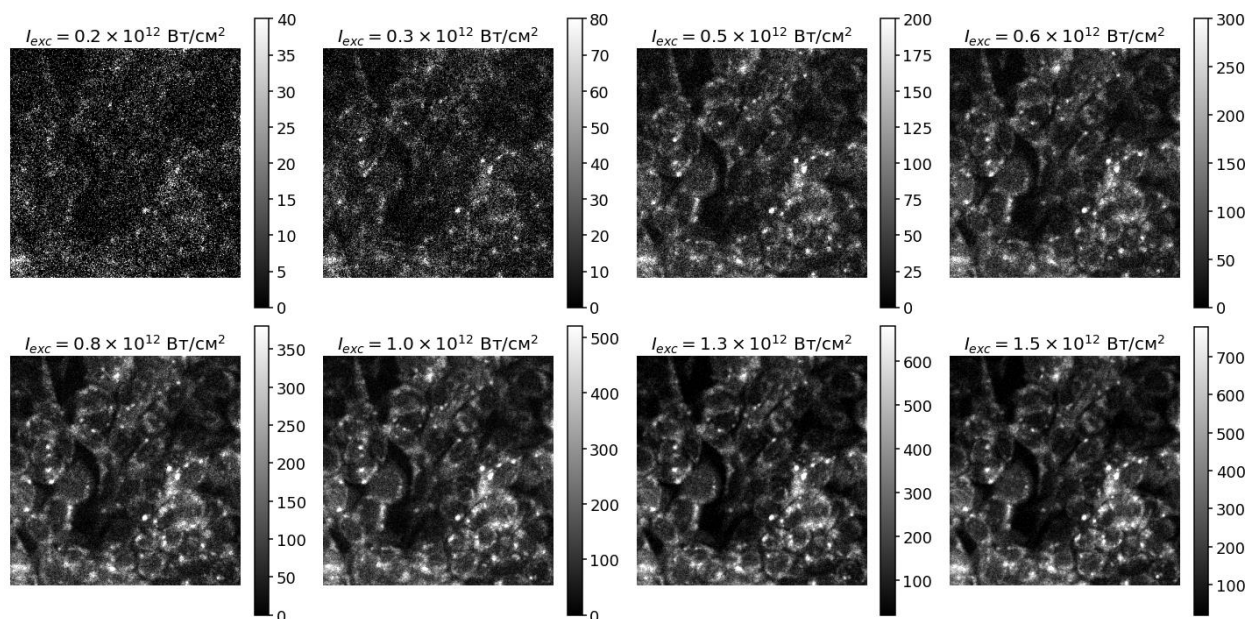


Рисунок 8.18 – Изображения культуры клеток Нер G2, полученные методом флуоресцентной микроскопии при различных интенсивностях накачки. Длина волны накачки 760 нм, интенсивность накачки указана сверху каждой из панелей, время регистрации одного изображения 60 с, время экспозиции на один пиксель изображения – 240 мкс.

Репрезентативные кривые насыщения флуоресценции, полученные для разных областей образца, представлены на рисунке 8.19. Кривые насыщения, как в случае тестирования эффекта фотодеградации на модельных растворах, измерялись при последовательном повышении и понижении интенсивности накачки, чтобы по величине гистерезиса можно было охарактеризовать вклад фотовыцветания в уменьшение интенсивности флуоресценции с накачкой. Как видно на рисунке 8.19 Б, эффект фотодеградации не превышал 5%, что хорошо совпадает с приведенной выше оценкой.

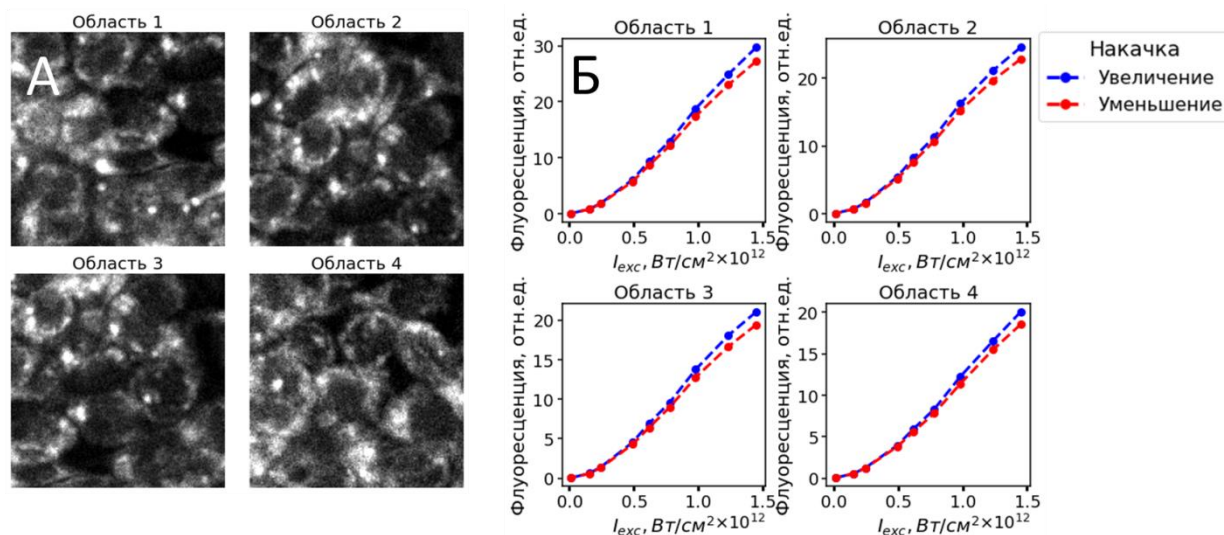


Рисунок 8.19 – А) Примеры изображений клеток Нер G2, измеренных при двухфотонном возбуждении флуоресценции на 760 нм. В) Зависимости средней интенсивности двухфотонной флуоресценции в зависимости от средней мощности накачки при последовательном увеличении (синие точки) и уменьшении (красные точки) мощности накачки для приведенных на панели А изображений клеток.

На рисунке 8.20А,Б представлены карты среднего времени затухания флуоресценции и сечения двухфотонного поглощения: каждый пиксель изображения окрашен в значение среднего времени затухания флуоресценции или сечения поглощения, определенного из кривой насыщения флуоресценции для данного пикселя.

Как видно из рисунка 8.20 В, имеются области образца, для которых кривые насыщения флуоресценции и, следовательно, сечение двухфотонного поглощения, отличаются заметным образом, тогда как кривые затухания флуоресценции не отличаются. Данный факт говорит о том, что анализ распределения сечения двухфотонного поглощения по образцу позволяет различать области, которые методом FLIM не разделяются. Дополнительным подтверждением является отсутствие корреляции между значениями сечения двухфотонного поглощения и средним временем флуоресценции, которое продемонстрировано путем попиксельного анализа изображений на рисунке 8.20 В. Также было показано отсутствие корреляции между значениями времени жизни флуоресценции и интенсивностью накачки (отсутствие эффекта аннигиляции возбужденных состояний), сечения двухфотонного поглощения и интенсивности (что находится в соответствии с моделью (формула 8.3)) (рис. 8.21).

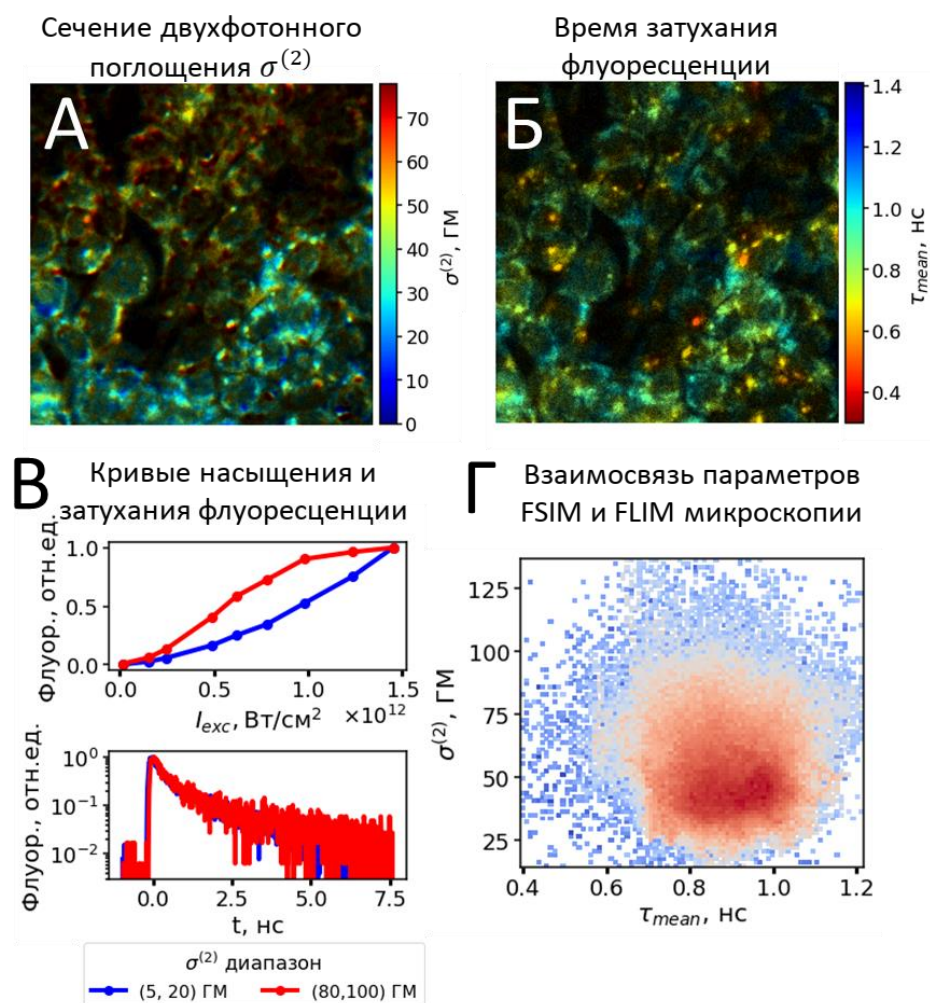


Рисунок 8.20 – Изображения культуры клеток Нер G2, полученные методом двухфотонной микроскопии, на которых цветом кодировано А) сечение двухфотонного поглощения и Б) среднее время жизни флуоресценции. В) Пример кривых насыщения флуоресценции (сверху) для двух областей образца, для которых кинетика затухания флуоресценции не различается (снизу). Г) Зависимость сечения двухфотонного поглощения от среднего времени жизни флуоресценции, построенная при попиксельном анализе изображений – видно отсутствие корреляции между указанными параметрами.

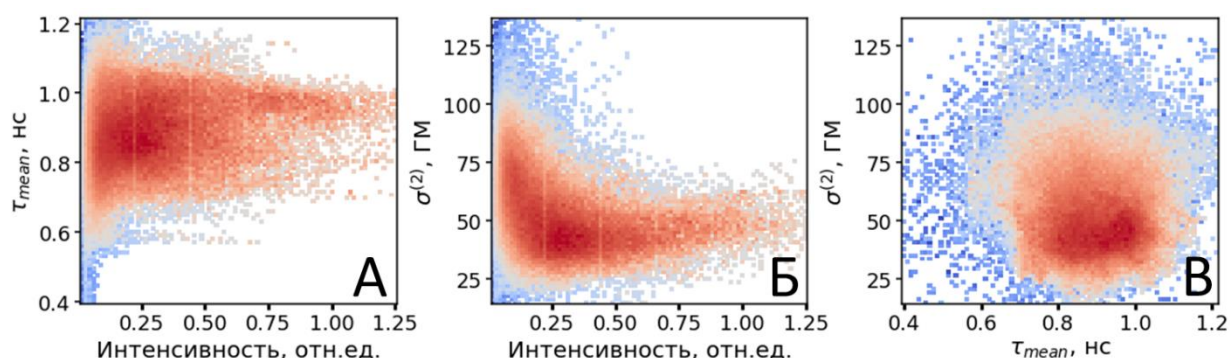


Рисунок 8.21 – Анализ попарных корреляций между параметрами, определяемыми методом FLIM (среднее время жизни флуоресценции  $\tau_{\text{mean}}$ ), методом флуориметрии насыщения (сечение двухфотонного возбуждения флуоресценции  $\sigma^{(2)}$ ), и интенсивностью флуоресценции. Каждая точка соответствует пикселю изображения (размер бина 5), в выборку входят 20 изображений, полученных для культуры клеток Нер G2 при различной интенсивности накачки, варьирующейся в диапазоне от  $0.1 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup> до  $1.5 \times 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup>.



Отметим, что в клетках Нер G2 происходит активное накопление гетерогенных продуктов окисления липидов, белков и аминокислот в липидных каплях [617]. Было проверено, возможно ли селективное детектирование этих капель по свойствам их флуоресцентного отклика – среднего времени затухания флуоресценции и двухфотонного сечения поглощения. Липидные капли на изображениях были сегментированы по высокому значению интенсивности флуоресцентного отклика. С использованием масок сегментации по интенсивности были рассчитаны распределения среднего времени затухания флуоресценции и значения величины двухфотонного поглощения. Было обнаружено, что среднее время и сечение двухфотонного поглощения для липидных капель в клетках Нер G2, сегментированных по значениям интенсивностей статистически значимо различаются как по среднему времени затухания флуоресценции от областей цитоплазмы ( $775 \pm 170$  пс для липидных капель против  $882 \pm 166$  пс для цитоплазмы, T-test,  $p < 10^{-4}$ ), так и по сечению двухфотонного поглощения ( $160 \pm 40$  ГМ для липидных капель против  $147 \pm 35$  ГМ для цитоплазмы,  $p < 10^{-4}$ ). Потенциально, сечение двухфотонного поглощения может быть использовано как дополнительный контраст для селекции вкладов различных флуорофоров.

Значения сечений двухфотонного поглощения для различных молекул и красителей могут варьироваться в широком диапазоне от 0,01 до 1000 Гм. Так, сечения двухфотонного поглощения для эндогенных флуорофоров клеток и тканей человека находятся в диапазоне от 0,01 до 1 ГМ [336]. Значение сечения двухфотонного поглощения для НАДН, основного эндогенного флуорофора клеток, изменяется в два раза при связывании с белком [618], поэтому метод микроскопии насыщения флуоресценции потенциально может различать случай связанного с белком и свободного НАДН. Известно также, что для ряда стандартных красителей и флуоресцентных белков (например, GFP) сечение двухфотонного поглощения при разных длинах волн возбуждения в ближнем инфракрасном диапазоне может варьироваться от единиц до сотен ГМ [619]. Другим интересным применением является визуализация так называемых двухфотонных красителей, которые специально синтезированы для получения высокого двухфотонного сечения поглощения ( $10^3$ - $10^4$  ГМ) [620]. Наночастицы, наностержни и нанокластеры из различных материалов также могут иметь большое сечение двухфотонного поглощения ( $\sim 10^3$ - $10^6$  Гм) [621,622]. Таким образом, ряд флуорофоров, интересных для задач биомедицинской диагностики, может быть селективно визуализирован с помощью метода микроскопии насыщения флуоресценции.

## **Выводы**

В рамках данной главы была продемонстрирована возможность локализации меланина в различных подслоях кожи *in vivo* использованием особенностей его оптического отклика.

Была показана возможность восстановления распределения меланина на различной глубине в коже по отличительному отклику спектров его комбинационного рассеяния – широким полосам на 1380 и 1570 см<sup>-1</sup>. При этом было установлено, что отношение амплитуд линий комбинационного рассеяния, как и в других системах “неупорядоченного углерода”, связаны с другими оптическими свойствами меланина – в частности, определяют спектральные свойства ИК флуоресценции. ИК флуоресценция меланина также может быть использована для его локализации по глубине, однако на глубинах более 40 мкм в ИК флуоресцентный отклик могут вносить ГСФ, отличные от меланина.

Далее была продемонстрирована возможность локализации меланина с помощью метода неотрицательного матричного разложения спектров комбинационного рассеяния, при этом продемонстрирована так же возможность локализации других молекулярных компонент на различной глубине в коже.

В последней части работы проверена гипотеза о двухквантовом возбуждении меланина через экспоненциальный “край” поглощения. Для этого в рамках работы разработана новая методика – микроскопия двухфотонного насыщения флуоресценции – позволяющая картировать величину сечения двухфотонного поглощения в абсолютных единицах, путём анализа карт интенсивностей двухфотонной флуоресценции при разных мощностях накачки. С помощью микроскопии двухфотонного насыщения показано отсутствие эффекта двухквантового насыщения меланина, что, в том числе, подтверждает механизм формирования оптических свойств меланина как ГСФ по модели “невзаимодействующих” флуорофоров.

В свою очередь, эксперименты по микроскопии двухфотонного насыщения флуоресценции показывают, что данный вид микроскопии может быть новым диагностическим инструментом, предоставляющим новые возможности картирования молекулярно-специфического параметра, в том числе и в биологических объектах.

## Заключение

В диссертационной работе получены следующие основные результаты:

1. Продемонстрирована некорректность подхода на основе модифицированного уравнения Штерна-Фольмера для определения параметров и числа сайтов связывания в системе и предложен оригинальный алгоритм для решения этой задачи.
2. Предложен метод анализа фотофизических параметров флуоресценции Туг в триптофан-содержащих белках и на примере альбумина, подвергнутого воздействию денатурирующих агентов, доказано, что флуоресценция Туг может служить индикатором конформационных изменений, не проявляющихся в сигнале Trp.
3. Показано, что использование экзогенных флуоресцентных меток для анализа агрегации белков может влиять на кинетику образования, морфологию и механические свойства образующихся структур, что обуславливает важность эффекта ВЭФБ. Продемонстрирована возможность использования ВЭФБ для визуализации метаболических амилоидов в живых клетках и для анализа кинетики агрегации белков *in vitro*. На модельных системах, в том числе, живых клетках, показано, что эффект ВЭФБ связан с образованием ГСФ при химических модификациях биомолекул за счет процессов окисления и ответственен за флуоресценцию в красной и ближней ИК области спектра.
4. На ГСФ, полученных с помощью подходов “снизу-вверх” и “сверху-вниз”, показано, что формирование длинноволнового поглощения связано с возникновением новых молекулярных соединений в составе образца и не связано с процессами переноса энергии между отдельными молекулярными компонентами в системе. При этом оптические свойства ГСФ, в том числе на масштабе времени 0-10 пс, связаны с молекулярными свойствами, в том числе со средней “ароматичностью”, молекул, входящих в состав гетерогенной системы.
5. Проведен детальный анализ аналитических возможностей, вариабельности и формирования флуоресценции белков плазмы крови. Впервые показана доминирующая роль альбумина в формировании флуоресценции плазмы крови в видимом диапазоне спектра, связанная с формированием ГСФ при его химических модификациях. Предложена классификационная модель, основанная на использовании параметров ЭФ белков плазмы крови, позволяющая диагностировать онкозаболевание с точностью >80%.
6. Продемонстрирована возможность визуализации стенок капилляров и окружающих их тканей с помощью ДФТ-FLIM. Доказано, что сигнал двухфотонной ЭФ, локализованный внутри капилляров, связан с необратимым накоплением в эритроцитах флуоресцентного фотопродукта гемоглобина, обладающего сверхбыстрым (менее 100 пс) затуханием флуоресценции. С помощью ДФТ-FLIM установлена природа формирования ПЗ, показано,

что ширина ПЗ является диагностически значимым параметром, чувствительным к степени ХСН у пациентов за счет увеличения размера живого эпидермиса, связанного с отечным синдромом и накоплением межклеточной жидкости.

7. Показано, что регистрация методом ДФТ сигнала от эндогенных флуорофоров и анализ параметров его релаксации позволяет при измерении *in vivo* у людей визуализировать макрофаги и тучные клетки, которые другими методами в аналогичных условиях исследовать затруднительно или невозможно.

8. Показана возможность восстановления распределения меланина на различной глубине в коже по отличительному отклику спектров его КР и ИК флуоресценции. С помощью микроскопии насыщения двухфотонной ЭФ показано отсутствие эффекта резонансного возбуждения меланина в ИК области. Предложен и экспериментально реализован метод микроскопии насыщения флуоресценции для картирования по образцу сечения двухфотонного поглощения в абсолютных единицах.



## Список публикаций по теме диссертационной работы

*Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:*

- A1. **Ширшин Е.А., Якимов Б.П., Будылин Г.С., Злобина Н.В., Давыдов Д.А., Армаганов А.Г., Фадеев В.В., Сысоев Н.Н., Камалов А.А.** Биомедицинская фотоника в задачах интраоперационной диагностики: обзор возможностей и клинических применений // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика, астрономия. – 2022. – № 6. – С. 1–16. **IF = 0,536 (WoS)**
- A2. **Ширшин Е.А., Якимов Б.П., Дарвин М.Е., Омеляненко Н.П., Родионов С.А., Гурфинкель Ю.И., Ладеманн Ю., Фадеев В.В., Приезжев А.В.** Многофотонная микроскопия с эндогенным контрастом: природа флуорофоров и возможности в исследовании биохимических процессов // Успехи биологической химии. – 2019. – Т. 59. – С. 139–180 (специальный выпуск журнала «Биохимия»). **IF = 2,824 (РИНЦ)**
- A3. **Tikhonova T.N., Shirshin E.A., Budylin G.S., Fadeev V.V., Petrova G.P.** Assessment of the europium (III) binding sites on albumin using fluorescence spectroscopy // The Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – V. 118. – No. 24. – P. 6626-6633. **IF = 3,466 (WoS)**
- A4. **Gayer A.V., Yakimov B.P., Budylin G.S., Shirshin E.A.** Evaluating the number of ligand binding sites on protein from tryptophan fluorescence quenching under typical experimental conditions // Journal of Biomedical Photonics and Engineering. – 2020. – V. 6. – No. 2. – P. 020303. **IF = 0,758 (РИНЦ)**
- A5. **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 and Photobiological Sciences. – 2015. – V. 14. – No. 5. – P. 897-908. **IF = 4,328 (WoS)**
- A6. **Zhdanova N.G., Maksimov E.G., Arutyunyan A.M., Fadeev V.V., Shirshin E.A.** Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2017. – V. 174 – P. 223-229. **IF = 4,831 (WoS)**
- A7. **Tikhonova T.N., Rovnyagina N.N., Arnon Z.A., Yakimov B.P., Efremov Y.M., Cohen-Gerassi D., Halperin-Sternfeld M., Kosheleva N.V., Drachev V.P., Svistunov A.A., Timashev P.S., Adler-Abramovich L., Shirshin E.A.** Mechanical enhancement and kinetics regulation of Fmoc-Diphenylalanine hydrogels by thioflavin T // Angewandte Chemie International Edition. – 2021. – V. 60. – No. 48. – P. 25339-25345. **IF = 16,823 (WoS)**
- A8. **Tikhonova T.N., Cohen-Gerassi D., Arnon Z.A., Efremov Y.M., Timashev P.S., Adler-Abramovich L., Shirshin E.A.** Tunable Self-Assembled Peptide Hydrogel Sensor for Pharma

Cold Supply Chain // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2022. – V.14. – №50. – P. 55392-55401 **IF = 10,383 (WoS)**

- A9. Arnon Z.A., Kreiser T., Yakimov B., Brown N., Aizen R., Shaham-Niv S., Makam P., Nawaz Qaisrani M., Poli E., Ruggiero A., Slutsky I., Hassanali A., **Shirshin E.**, Levy D., Gazit E. On-off transition and ultrafast decay of amino acid luminescence driven by modulation of supramolecular packing // *iScience*. – 2021. – V. 24 – No. 7. – P. 102695. **IF = 6,107 (WoS)**
- A10. Aizen R., Arnon Z.A., Berger O., Ruggiero A., Zaguri D., Brown N., **Shirshin E.**, Slutsky I., Gazit E. Intrinsic fluorescence of nucleobase crystals // *Nanoscale Advances*. – 2023. – V. 5, – No. 2. – P. 344-348. **IF = 5,598 (WoS)**
- A11. Shaham-Niv S., Arnon Z.A., Sade D., Lichtenstein A., **Shirshin E.A.**, Kolusheva S., Gazit E. Intrinsic fluorescence of metabolite amyloids allows label-free monitoring of their formation and dynamics in live cells // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2018. – V. 57. – No. 38. – P. 12444-12447. **IF=16,823 (WoS)**
- A12. 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. – V. 651. – P. 13-20. **IF = 4,114 (WoS)**
- A13. Semenov A.N., Yakimov B.P., Rubekina A.A., Gorin D.A., Drachev V.P., Zarubin M.P., Velikanov A.N., Lademann J., Fadeev V.V., Priezzhev A.V., Darvin M.E., **Shirshin E.A.** The oxidation-induced autofluorescence hypothesis: red edge excitation and implications for metabolic imaging // *Molecules*. – 2020. – V. 25 – No. 8. – P. 1863. **IF = 4,927 (WoS)**
- A14. Voloshina O.V., **Shirshin E.A.**, Lademann J., Fadeev V.V., Darvin M.E. Fluorescence detection of protein content in house dust: the possible role of keratin // *Indoor Air*. – 2017. – V. 27 – No. 2. – P. 377-385. **IF = 6,554 (WoS)**
- A15. Yakimov B.P., Rubekina A.A., Zhrebker A.Y., Budylin, G.S., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Vainer Y.G., Hasan A.A., Nikolaev E.N., Fadeev V.V., Perminova I.V., **Shirshin E.A.** Oxidation of individual aromatic species gives rise to humic-like optical properties // *Environmental Science and Technology Letters*. – 2022. – V.9. – No. 5. – P. 452-458. **IF = 7,678 (WoS)**
- A16. Yakimov B.P., Rubekina A.A., Budylin G.S., Zhrebker A.Y., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Vainer Y.G., Fadeev V.V., Gorbunov M.Y., Perminova I.V., **Shirshin E.A.** Ultrafast energy transfer determines the formation of fluorescence in DOM and humic substances // *Environmental Science and Technology*. – 2021. – V. 55 – No. 15. – P.10365-10377. **IF = 11,357 (WoS)**
- A17. Perminova, I.V., **Shirshin E.A.**, Konstantinov, A.I., Zhrebker, A.Ya., Lebedev V.A.,

- Dubinenkov I.V., Kulikova N.A., Nikolaev E.N., Bulygina E., Holmes R.M.* The structural arrangement and relative abundance of aliphatic units may effect long-wave absorbance of natural organic matter as revealed by 1H NMR spectroscopy // *Environmental Science and Technology*. – 2018. – V. 52. – No. 21. – P.12526-12537. **IF = 11,357 (WoS)**
- A18. *Shirshin E., Cherkasova O., Tikhonova T, Berlovskaya E., Priezzhev A., Fadeev V.* Native fluorescence spectroscopy of blood plasma of rats with experimental diabetes: identifying fingerprints of glucose-related metabolic pathways // *Journal of Biomedical Optics*. – 2015. – V. 20 – No. 5. – P. 051033. **IF = 3,758 (WoS)**
- A19. *Gayer A.V., Yakimov B.P., Sluchanko N.N., Shirshin E.A.* Multifarious analytical capabilities of the UV/Vis protein fluorescence in blood plasma // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2022. – V. 286. – P. 122028. **IF = 4,831 (WoS)**
- A20. *Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Priezzhev 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. – V. 7. – No. 1. – P. 1171. **IF = 4,996 (WoS)**
- A21. *Yakimov B.P., Gogoleva, M.A., Semenov A.N., Rodionov S.A., Novoselova M.V., Gayer A.V., Kovalev A.V., Bernakevich A.I., Fadeev V.V., Armaganov A.G., Drachev V.P., Gorin D.A., Darvin M.E., Shcheslavskiy V.I., Budylin G.S., Priezzhev A.V., Shirshin E.A.* Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – V. 10. – No. 8. – P. 4220-4236. **IF = 3,562 (WoS)**
- A22. *Shirshin E.A., Yakimov B.P., Rodionov S.A., Omelyanenko N.P., Priezzhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin, M.E.* Formation of hemoglobin photoproduct is responsible for two-photon and single photon-excited fluorescence of red blood cells // *Laser Physics Letters*. – 2018. – V. 15. – No. 7. – P. 075604. **IF = 1,704 (WoS)**
- A23. *Shirshin E.A., Gurfinkel Y.I., Matskeplishvili S.T., Sasonko M.L., Omelyanenko N.P., Yakimov B.P., Landemann J., Darvin M.E.* In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans // *Journal of Biophotonics*. – 2018. – V. 11. – No. 9. – P. e201800066. **IF = 3,390 (WoS)**
- A24. *Yakimov B.P., Gurfinkel Y.I., Davydov D.A., Allenova A.S., Budylin G.S., Vasiliev V.Y., Soldatova V.Y., Kamalov A.A., Matskeplishvili S.T., Priezzhev A.V., Shirshin E.A.* Pericapillary edema assessment by means of the nailfold capillaroscopy and laser scanning microscopy // *Diagnostics*. – 2020. – V. 10. – No. 12. – P. 1107. **IF = 3,992 (WoS)**
- A25. *Shirshin E.A., Shirmanova M.V., Gayer A.V., Lukina M.M., Nikonova E.E., Yakimov B.P.,*

- Budylin G.S., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Komarov D.V., Yakovlev V.V., Becker W., Zagaynova E.V., Shcheslavskiy V.I., Scully M.O.* Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: The quest for metabolic heterogeneity // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – V. 119. – No. 9. – P. e2118241119. **IF = 12,777 (WoS)**
- A26. *Kröger M., Scheffel J., Shirshin E.A., Schleusener J., Meinke M.C., Lademann J., Maurer M., Darvin M.E.* Label-free imaging of M1 and M2 macrophage phenotypes in the human dermis in vivo using two-photon excited FLIM // eLife. – 2022. – V.11. – P. e72819. **IF = 8,713 (WoS)**
- A27. *Kröger M., Scheffel J., Nikolaev V.V., Shirshin E.A., Siebenhaar F., Schleusener J., Lademann J., Maurer M., Darvin M.E.* In vivo non-invasive staining-free visualization of dermal mast cells in healthy, allergy and mastocytosis humans using two-photon fluorescence lifetime imaging // Scientific reports. – 2020. – V. 10. – No. 1. – P. 14930. **IF = 4,996 (WoS)**
- A28. *Ширшин Е.А., Якимов Б.П., Будылин Г.С., Буюнкин К.Е., Армаганов А.Г., Фадеев В.В., Камалов А.А.* Методы нелинейной оптики для диагностики меланина: мини-обзор // Квантовая электроника. – 2022. – Т. 52. – № 1. – С. 28-35. **IF = 1,194 (WoS)**
- A29. *Yakimov B.P., Shirshin E.A., Schleusener J., Allenova A.S., Fadeev V.V., Darvin M.E.* Melanin distribution from the dermal–epidermal junction to the stratum corneum: non-invasive in vivo assessment by fluorescence and Raman microspectroscopy // Scientific reports. – 2020. – V. 10. – No. 1. – P. 14374. **IF = 4,996 (WoS)**
- A30. *Yakimov B.P., Venets A.V., Schleusener J., Fadeev V.V., Lademann J., Shirshin E.A., Darvin M.E.* Blind source separation of molecular components of the human skin in vivo: non-negative matrix factorization of Raman microspectroscopy data // Analyst. – 2021. – V. 146. – No. 10. – P. 3185-3196. **IF = 5,227 (WoS)**
- A31. *Ширшин Е.А., Банишев А.А., Фадеев В.В.* Локализованные донорно-акцепторные пары флуорофоров: определение скорости переноса энергии методом нелинейной флуориметрии // Письма в ЖЭТФ. – 2009. – Т. 89. – № 10. – С. 567-570. **IF = 1,412 (РИНЦ)**
- A32. *Банишев А.А., Ширшин Е.А., Фадеев В.В.* Определение фотофизических параметров молекул триптофана методами лазерной флуориметрии // Квантовая электроника. – 2008. – Т. 38. – № 1. – С. 77-81. **IF = 1,194 (WoS)**
- A33. *Yakimov B., Gayer A., Maksimov E., Mamonov E., Maydykovsky A., Murzina T., Fadeev V., Shirshin E.* Fluorescence saturation imaging microscopy: molecular fingerprinting in living cells using two-photon absorption cross section as a contrast mechanism // Optics Letters. –

2022. – V. 47. – No. 17. – P. 4455-4458. **IF = 3,560 (WoS)**

*Глава в монографии:*

A34. *Fadeev V.V., Shirshin E.A.* Nonlinear laser fluorescence spectroscopy of natural organic compounds // Handbook of Coherent-Domain Optical Methods. – 2013. – P. 1255-1288

## Список литературы

1. Tuchin V. V. Tissue optics. Bellingham, WA, USA: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE), 2015.
2. Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins // Nat. Methods. 2005. Vol. 2, № 12. P. 905–909.
3. Becker W. Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications // J. Microsc. Wiley Online Library, 2012. Vol. 247, № 2. P. 119–136.
4. You S. et al. Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 2125.
5. Pansieri J. et al. Ultraviolet–visible–near-infrared optical properties of amyloid fibrils shed light on amyloidogenesis // Nat. Photonics. 2019. Vol. 13, № 7. P. 473–479.
6. Grisanti L. et al. Toward Understanding Optical Properties of Amyloids: A Reaction Path and Nonadiabatic Dynamics Study // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2020. Vol. 142, № 42. P. 18042–18049.
7. Ash C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods // Lasers Med. Sci. 2017. Vol. 32, № 8. P. 1909–1918.
8. Boas D.A. et al. Imaging the body with diffuse optical tomography // IEEE Signal Process. Mag. 2001. Vol. 18, № 6. P. 57–75.
9. Chudakov D.M. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues // Physiol. Rev. American Physiological Society, 2010. Vol. 90, № 3. P. 1103–1163.
10. Guze K. et al. Comparison of molecular images as defined by Raman spectra between normal mucosa and squamous cell carcinoma in the oral cavity // J. Raman Spectrosc. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 42, № 6. P. 1232–1239.
11. Lauwerends L.J. et al. The complementary value of intraoperative fluorescence imaging and Raman spectroscopy for cancer surgery: combining the incompatibles // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2022. Vol. 49, № 7. P. 2364–2376.
12. Lopera D.O.G. et al. Image-guided Raman spectroscopy navigation system to improve transperineal prostate cancer detection. Part 2: In-vivo tumor-targeting using a classification model combining spectral and MRI-radiomics features // J. Biomed. Opt. SPIE, 2022. Vol. 27, № 9. P. 95004.
13. Xu K. et al. Toward Flexible Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Sensors for Point-of-Care Diagnostics // Adv. Sci. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 6, № 16. P. 1900925.

14. Scholtes-Timmerman M.J. et al. Raman Spectroscopy as a Promising Tool for Noninvasive Point-of-Care Glucose Monitoring // *J. Diabetes Sci. Technol.* SAGE Publications Inc, 2014. Vol. 8, № 5. P. 974–979.
15. Li B., Yang S., Akkus O. A customized Raman system for point-of-care detection of arthropathic crystals in the synovial fluid // *Analyst.* Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 139, № 4. P. 823–830.
16. Soliman C. et al. Portable, multi-modal Raman and fluorescence spectroscopic platform for point-of-care applications // *J. Biomed. Opt. SPIE*, 2022. Vol. 27, № 9. P. 95006.
17. Santos I.P. et al. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics // *Analyst.* Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 142, № 17. P. 3025–3047.
18. Jiang C. et al. Delineating the tumor margin with intraoperative surface-enhanced Raman spectroscopy // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. Vol. 411, № 18. P. 3993–4006.
19. Mélot M. et al. Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy // *J. Control. Release.* 2009. Vol. 138, № 1. P. 32–39.
20. Nargis H.F. et al. Raman spectroscopy of blood plasma samples from breast cancer patients at different stages // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. Vol. 222. P. 117210.
21. Verma T. et al. Profiling antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains displaying differential antibiotic susceptibilities using Raman spectroscopy // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 14, № 1. P. e202000231.
22. <https://www.invenio-imaging.com/> [Electronic resource].
23. Orringer D.A. et al. Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy // *Nat. Biomed. Eng.* 2017. Vol. 1, № 2. P. 27.
24. Du Z. et al. Recent advances in applications of nanoparticles in SERS in vivo imaging // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* Wiley Online Library, 2021. Vol. 13, № 2. P. e1672.
25. Pardehkhorrām R. et al. Functionalized Gold Nanorod Probes: A Sophisticated Design of SERS Immunoassay for Biodetection in Complex Media // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2021. Vol. 93, № 38. P. 12954–12965.
26. Kneipp J., Kneipp H., Kneipp K. SERS—a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics // *Chem. Soc. Rev.* Royal Society of Chemistry, 2008. Vol. 37, № 5. P. 1052–1060.

27. Bruzas I. et al. Advances in surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrates for lipid and protein characterization: sensing and beyond // *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 143, № 17. P. 3990–4008.
28. Ozaki Y. et al. *Near-infrared spectroscopy: theory, spectral analysis, instrumentation, and applications*. Springer, 2021.
29. Pasquini C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review // *Anal. Chim. Acta*. 2018. Vol. 1026. P. 8–36.
30. Fried N.M. Recent advances in infrared laser lithotripsy [Invited] // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 9. P. 4552–4568.
31. <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/> [Electronic resource].
32. <https://www.infraredx.com/> [Electronic resource].
33. Wilson R.H. et al. Review of short-wave infrared spectroscopy and imaging methods for biological tissue characterization // *J. Biomed. Opt.* 2015. Vol. 20, № 3. P. 30901.
34. <https://miracleproject.eu/> [Electronic resource].
35. Selvaraj R. et al. Advances in Mid-Infrared Spectroscopy-Based Sensing Techniques for Exhaled Breath Diagnostics // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 9.
36. Mürtz M., Hering P. *Online Monitoring of Exhaled Breath Using Mid-Infrared Laser Spectroscopy BT - Mid-Infrared Coherent Sources and Applications* / ed. Ebrahim-Zadeh M., Sorokina I.T. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. P. 535–555.
37. Zhou T. et al. Real-time measurement of CO<sub>2</sub> isotopologue ratios in exhaled breath by a hollow waveguide based mid-infrared gas sensor // *Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2020. Vol. 28, № 8. P. 10970–10980.
38. Diessel E. et al. Nanoliter Serum Sample Analysis by Mid-infrared Spectroscopy for Minimally Invasive Blood-Glucose Monitoring // *Appl. Spectrosc.* Optica Publishing Group, 2005. Vol. 59, № 4. P. 442–451.
39. Yu S. et al. Continuous glucose determination using fiber-based tunable mid-infrared laser spectroscopy // *Opt. Lasers Eng.* 2014. Vol. 55. P. 78–83.
40. Heise H.M., Bittner A. Blood glucose assays based on infrared spectroscopy: alternatives for medical diagnostics // *Proc.SPIE*. 1998. Vol. 3257. P. 2–12.
41. Heise H.M., Marbach R. Human oral mucosa studies with varying blood glucose concentration by non-invasive ATR-FT-IR-spectroscopy // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie, Dortmund, Germany., 1998. Vol. 44, № 6. P. 899–912.
42. Haas J. et al. Infrared spectroscopy based on broadly tunable quantum cascade lasers and polycrystalline diamond waveguides // *Analyst*. Royal Society of Chemistry, 2018. Vol.



- 143, № 21. P. 5112–5119.
43. Seddon A.B. et al. Mid-infrared Spectroscopy/Bioimaging: Moving toward MIR optical biopsy // *Laser Focus World*. PennWell Corporation, 2016. Vol. 52, № 2. P. 50–53.
  44. Seddon A.B. Biomedical applications in probing deep tissue using mid-infrared supercontinuum optical biopsy // *Deep Imaging in Tissue and Biomedical Materials*. Jenny Stanford Publishing, 2017. P. 231–293.
  45. Reid C.B. et al. Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Human Blood // *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.* 2013. Vol. 3, № 4. P. 363–367.
  46. Jeong K. et al. Characterization of blood using terahertz waves // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 10. P. 107008.
  47. Cherkasova O., Nazarov M., Shkurinov A. Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range // *Opt. Quantum Electron.* 2016. Vol. 48, № 3. P. 217.
  48. Gavidush A.A. et al. Terahertz spectroscopy of gelatin-embedded human brain gliomas of different grades: a road toward intraoperative THz diagnosis // *J. Biomed. Opt.* 2019. Vol. 24, № 2. P. 27001.
  49. Cherkasova O. et al. Diagnosis of Glioma Molecular Markers by Terahertz Technologies // *Photonics*. 2021. Vol. 8, № 1.
  50. Vrazhnov D. et al. Discovering Glioma Tissue through Its Biomarkers; Detection in Blood by Raman Spectroscopy and Machine Learning // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 1.
  51. Smolyanskaya O.A. et al. Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids // *Prog. Quantum Electron.* 2018. Vol. 62. P. 1–77.
  52. Cherkasova O.P. et al. Analysis of blood plasma at terahertz frequencies // *Opt. Spectrosc.* 2016. Vol. 120, № 1. P. 50–57.
  53. Lykina A.A. et al. Terahertz spectroscopy of diabetic and non-diabetic human blood plasma pellets // *J. Biomed. Opt.* 2021. Vol. 26, № 4. P. 43006.
  54. Vrazhnov D. et al. Analysis of Mouse Blood Serum in the Dynamics of U87 Glioblastoma by Terahertz Spectroscopy and Machine Learning // *Applied Sciences*. 2022. Vol. 12, № 20.
  55. Naumann D. FT-INFRARED AND FT-RAMAN SPECTROSCOPY IN BIOMEDICAL RESEARCH // *Appl. Spectrosc. Rev.* Taylor & Francis, 2001. Vol. 36, № 2–3. P. 239–298.
  56. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer, 2006.
  57. Baba M. et al. Decay time shortening of fluorescence from donor–acceptor pair proteins using ultrafast time-resolved fluorescence resonance energy transfer spectroscopy // *J.*

- Lumin. 2007. Vol. 127, № 2. P. 355–361.
58. Clark T.B. et al. Two-Photon and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy as Probes for Structural Determination in Amyloid- $\beta$  Peptides and Aggregates // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2014. Vol. 118, № 9. P. 2351–2359.
  59. Li H. et al. Ultrafast fluorescence dynamics of NADH in aprotic solvents: Quasi-static self-quenching unmasked // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2023. Vol. 436. P. 114384.
  60. Coutrot M. et al. Perfusion index: Physical principles, physiological meanings and clinical implications in anaesthesia and critical care // *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* 2021. Vol. 40, № 6. P. 100964.
  61. Xie J. et al. Evaluating the validity of current mainstream wearable devices in fitness tracking under various physical activities: comparative study // *JMIR mHealth uHealth. JMIR Publications Inc., Toronto, Canada*, 2018. Vol. 6, № 4. P. e9754.
  62. Jin J. et al. Photoplethysmographic imaging and analysis of pulsatile pressure wave in palmar artery at 10 wavelengths // *J. Biomed. Opt.* 2022. Vol. 27, № 11. P. 116004.
  63. Holmer A. et al. Oxygenation and perfusion monitoring with a hyperspectral camera system for chemical based tissue analysis of skin and organs // *Physiol. Meas. IOP Publishing*, 2016. Vol. 37, № 11. P. 2064.
  64. Herr H.W., Donat S.M. A comparison of white-light cystoscopy and narrow-band imaging cystoscopy to detect bladder tumour recurrences // *BJU Int. John Wiley & Sons, Ltd*, 2008. Vol. 102, № 9. P. 1111–1114.
  65. Quaresima V., Bisconti S., Ferrari M. A brief review on the use of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) for language imaging studies in human newborns and adults // *Brain Lang.* 2012. Vol. 121, № 2. P. 79–89.
  66. Chiarelli A.M. et al. Simultaneous functional near-infrared spectroscopy and electroencephalography for monitoring of human brain activity and oxygenation: a review // *Neurophotonic.* 2017. Vol. 4, № 4. P. 41411.
  67. Yang M. et al. A Systemic Review of Functional Near-Infrared Spectroscopy for Stroke: Current Application and Future Directions // *Frontiers in Neurology* . 2019. Vol. 10.
  68. Scarapicchia V. et al. Functional magnetic resonance imaging and functional near-infrared spectroscopy: insights from combined recording studies // *Front. Hum. Neurosci. Frontiers Media SA*, 2017. Vol. 11. P. 419.
  69. Dunaev A. V et al. Investigating tissue respiration and skin microhaemocirculation under adaptive changes and the synchronization of blood flow and oxygen saturation rhythms // *Physiol. Meas. IOP Publishing*, 2014. Vol. 35, № 4. P. 607.
  70. Potapova E. V et al. Evaluation of microcirculatory disturbances in patients with rheumatic

- diseases by the method of diffuse reflectance spectroscopy // *Hum. Physiol.* 2017. Vol. 43, № 2. P. 222–228.
71. Dunaev A. V et al. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow // *Med. Eng. Phys.* 2015. Vol. 37, № 6. P. 574–583.
  72. Attia A.B.E. et al. A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends // *Photoacoustics*. 2019. Vol. 16. P. 100144.
  73. de Assis S. et al. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 1053.
  74. Lengenfelder B. et al. Remote photoacoustic sensing using speckle-analysis // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 1057.
  75. Lin L. et al. High-speed three-dimensional photoacoustic computed tomography for preclinical research and clinical translation // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 882.
  76. <https://senomedical.com/> [Electronic resource].
  77. Croce A.C., Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis // *Eur. J. Histochem. EJH. PAGEPress*, 2014. Vol. 58, № 4.
  78. Monici M.B.T.-B.A.R. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications // *Biotechnology annual review. Elsevier*, 2005. Vol. 11. P. 227–256.
  79. Shirshin E.A. et al. Label-Free Multiphoton Microscopy: The Origin of Fluorophores and Capabilities for Analyzing Biochemical Processes // *Biochem.* 2019. Vol. 84, № 1. P. 69–88.
  80. Yakimov B.P. et al. Melanin distribution from the dermal–epidermal junction to the stratum corneum: non-invasive in vivo assessment by fluorescence and Raman microspectroscopy // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 14374.
  81. Tikhonova T.N. et al. Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. Vol. 651. P. 13–20.
  82. Meerwaldt R. et al. Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005. Vol. 16, № 12. P. 3687 LP – 3693.
  83. Haralampus-Grynaviski N.M. et al. Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. Vol. 100, № 6. P. 3179–3184.
  84. Lukina M.M. et al. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2018. Vol. 1862, № 8. P. 1693–1700.

85. Choe C. et al. Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 15900.
86. Barroso E.M. et al. Characterization and subtraction of luminescence background signals in high-wavenumber Raman spectra of human tissue // *J. Raman Spectrosc.* Wiley Online Library, 2018. Vol. 49, № 4. P. 699–709.
87. Shao X., Zheng W., Huang Z. Polarized near-infrared autofluorescence imaging combined with near-infrared diffuse reflectance imaging for improving colonic cancer detection // *Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2010. Vol. 18, № 23. P. 24293–24300.
88. Bergholt M.S. et al. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier, 2011. Vol. 26, № 10. P. 4104–4110.
89. Kuipers B.J.H., Gruppen H. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society, 2007. Vol. 55, № 14. P. 5445–5451.
90. Vivian J.T., Callis P.R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins // *Biophys. J.* 2001. Vol. 80, № 5. P. 2093–2109.
91. Teale F.W.J. The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution // *Biochem. J.* Portland Press Ltd, 1960. Vol. 76, № 2. P. 381.
92. Callis P.R., Burgess B.K. Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins from Hybrid Simulations: An Electrostatic Approach // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 1997. Vol. 101, № 46. P. 9429–9432.
93. Eftink M.R. Fluorescence Techniques for Studying Protein Structure // *Methods of Biochemical Analysis.* 1991. P. 127–205.
94. Winkler J.R., Gray H.B. Could tyrosine and tryptophan serve multiple roles in biological redox processes? // *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* Royal Society, 2015. Vol. 373, № 2037. P. 20140178.
95. Callis P.R., Tusell J.R. MD + QM Correlations with Tryptophan Fluorescence Spectral Shifts and Lifetimes BT - *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols* // *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols* / ed. Engelborghs Y., Visser A.J.W.G. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. P. 171–214.
96. Gustavsson T., Markovitsi D. Fundamentals of the Intrinsic DNA Fluorescence // *Acc. Chem. Res.* American Chemical Society, 2021. Vol. 54, № 5. P. 1226–1235.
97. Kwok W.-M., Ma C., Phillips D.L. Femtosecond Time- and Wavelength-Resolved

- Fluorescence and Absorption Spectroscopic Study of the Excited States of Adenosine and an Adenine Oligomer // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2006. Vol. 128, № 36. P. 11894–11905.
98. Ma C. et al. Real-time Monitoring Excitation Dynamics of Human Telomeric Guanine Quadruplexes: Effect of Folding Topology, Metal Cation, and Confinement by Nanocavity Water Pool // *J. Phys. Chem. Lett.* American Chemical Society, 2019. Vol. 10, № 24. P. 7577–7585.
  99. Chen J., Zhang Y., Kohler B. Excited States in DNA Strands Investigated by Ultrafast Laser Spectroscopy BT // *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II: DNA Fragments and Phenomenological Aspects* / ed. Barbatti M., Borin A.C., Ullrich S. Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 39–87.
  100. Keane P.M. et al. Long-lived excited states in i-motif DNA studied by picosecond time-resolved IR spectroscopy // *Chem. Commun.* The Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 50, № 23. P. 2990–2992.
  101. Voloshina O. V et al. Fluorescence detection of protein content in house dust: the possible role of keratin // *Indoor Air.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 27, № 2. P. 377–385.
  102. Sinichkin Y.P. et al. In vivo fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models // *J. Biomed. Opt.* 1998. Vol. 3, № 2. P. 201–211.
  103. Robins S.P. Analysis of the Crosslinking Components in Collagen and Elastin // *Methods of Biochemical Analysis.* 1982. P. 329–379.
  104. Gakamsky A. et al. Tryptophan and Non-Tryptophan Fluorescence of the Eye Lens Proteins Provides Diagnostics of Cataract at the Molecular Level // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 40375.
  105. Deyl Z. et al. Studies on the chemical nature of elastin fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* 1980. Vol. 625, № 2. P. 248–254.
  106. Stamatias G.N. et al. Facial skin fluorescence as a marker of the skin's response to chronic environmental insults and its dependence on age // *Br. J. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 154, № 1. P. 125–132.
  107. Malencik D.A., Anderson S.R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe // *Amino Acids.* 2003. Vol. 25, № 3. P. 233–247.
  108. Korol R.M. et al. Fluorescence spectroscopy and birefringence of molecular changes in maturing rat tail tendon // *J. Biomed. Opt.* 2007. Vol. 12, № 2. P. 24011.
  109. Gillies R. et al. Fluorescence Excitation Spectroscopy Provides Information About Human Skin In Vivo // *J. Invest. Dermatol.* 2000. Vol. 115, № 4. P. 704–707.
  110. Reiser K., McCormick R.J., Rucker R.B. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of

- collagen and elastin // FASEB J. John Wiley & Sons, Ltd, 1992. Vol. 6, № 7. P. 2439–2449.
111. Sterenborg H.J.C.M. et al. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours // *Lasers Med. Sci.* 1994. Vol. 9, № 3. P. 191–201.
  112. Wang X., Ali M.S., Lacerda C.M.R. A Three-Dimensional Collagen-Elastin Scaffold for Heart Valve Tissue Engineering // *Bioengineering.* 2018. Vol. 5, № 3.
  113. [https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Scientific\\_JP/Fluorescence/Application\\_notes/21.FL-12.pdf](https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Products/Scientific/Scientific_JP/Fluorescence/Application_notes/21.FL-12.pdf) [Electronic resource].
  114. Dyer D.G. et al. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 18. P. 11654–11660.
  115. Monnier V.M., Kohn R.R., Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984. Vol. 81, № 2. P. 583–587.
  116. Mulder D.J. et al. Skin Autofluorescence, a Novel Marker for Glycemic and Oxidative Stress-Derived Advanced Glycation Endproducts: An Overview of Current Clinical Studies, Evidence, and Limitations // *Diabetes Technol. Ther.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2006. Vol. 8, № 5. P. 523–535.
  117. Gkogkolou P., Böhm M. Advanced glycation end products // *Dermatoendocrinol.* Taylor & Francis, 2012. Vol. 4, № 3. P. 259–270.
  118. Cao S. et al. Femtosecond Fluorescence Spectra of NADH in Solution: Ultrafast Solvation Dynamics // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2020. Vol. 124, № 5. P. 771–776.
  119. Yu Q., Heikal A.A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2009. Vol. 95, № 1. P. 46–57.
  120. Lakowicz J.R. et al. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. Vol. 89, № 4. P. 1271–1275.
  121. Blacker T.S. et al. Activated barrier crossing dynamics in the non-radiative decay of NADH and NADPH // *Chem. Phys.* 2013. Vol. 422. P. 184–194.
  122. Vishwasrao H.D. et al. Conformational Dependence of Intracellular NADH on Metabolic State Revealed by Associated Fluorescence Anisotropy // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 2005. Vol. 280, № 26. P. 25119–25126.
  123. Visser A.J.W.G., Hoek A. van. THE FLUORESCENCE DECAY OF REDUCED

- NICOTINAMIDES IN AQUEOUS SOLUTION AFTER EXCITATION WITH A UV-MODE LOCKED Ar ION LASER // *Photochem. Photobiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1981. Vol. 33, № 1. P. 35–40.
124. Gorbunova I.A. et al. Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in Enzyme-Bound NADH: the Heterogeneity of Fluorescence Decay Times and Anisotropic Relaxation // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2021. Vol. 125, № 34. P. 9692–9707.
  125. Piersma S.R. et al. Optical Spectroscopy of Nicotinoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica*: A Comparison with Horse Liver Alcohol Dehydrogenase and UDP-Galactose Epimerase // *Biochemistry.* American Chemical Society, 1998. Vol. 37, № 9. P. 3068–3077.
  126. Sharick J.T. et al. Protein-bound NAD(P)H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 5456.
  127. Kunz W.S., Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1985. Vol. 841, № 3. P. 237–246.
  128. Voltti H., Hassinen I.E. Oxidation-reduction midpoint potentials of mitochondrial flavoproteins and their intramitochondrial localization // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1978. Vol. 10, № 1. P. 45–58.
  129. Mataga N. et al. Dynamics and Mechanisms of Ultrafast Fluorescence Quenching Reactions of Flavin Chromophores in Protein Nanospace // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2000. Vol. 104, № 45. P. 10667–10677.
  130. Kao Y.-T. et al. Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2008. Vol. 130, № 39. P. 13132–13139.
  131. van den Berg P.A.W. et al. Dynamic Conformations of Flavin Adenine Dinucleotide: Simulated Molecular Dynamics of the Flavin Cofactor Related to the Time-Resolved Fluorescence Characteristics // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2002. Vol. 106, № 34. P. 8858–8869.
  132. Tanaka F. et al. Donor–Acceptor Distance-Dependence of Photoinduced Electron-Transfer Rate in Flavoproteins // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2007. Vol. 111, № 20. P. 5694–5699.
  133. Islam M.S. et al. pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells // *International Journal of Molecular Sciences.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 1952–1963.
  134. Sengupta A. et al. Urea Induced Unfolding Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide (FAD): Spectroscopic and Molecular Dynamics Simulation Studies from Femto-Second to Nanosecond Regime // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2014. Vol. 118, №

7. P. 1881–1890.
135. Nakabayashi T., Islam M.S., Ohta N. Fluorescence Decay Dynamics of Flavin Adenine Dinucleotide in a Mixture of Alcohol and Water in the Femtosecond and Nanosecond Time Range // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2010. Vol. 114, № 46. P. 15254–15260.
  136. Krasnopevtseva M.K. et al. Decay Times and Anisotropy in Polarized Fluorescence of Flavin Adenine Dinucleotide Determined with Subnanosecond Resolution // *Tech. Phys. Lett.* 2020. Vol. 46, № 6. P. 614–616.
  137. Cao S. et al. A fraction of NADH in solution is “dark”: Implications for metabolic sensing via fluorescence lifetime // *Chem. Phys. Lett.* 2019. Vol. 726. P. 18–21.
  138. Cadena-Caicedo A. et al. Ultrafast Fluorescence Signals from  $\beta$ -Dihyronicotinamide Adenine Dinucleotide: Resonant Energy Transfer in the Folded and Unfolded Forms // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2020. Vol. 124, № 3. P. 519–530.
  139. Chosrowjan H. et al. The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale // *Chem. Phys. Lett.* 2003. Vol. 378, № 3. P. 354–358.
  140. Radoszkowicz L. et al. Time-resolved emission of flavin adenine dinucleotide in water and water–methanol mixtures // *Phys. Chem. Chem. Phys. The Royal Society of Chemistry*, 2011. Vol. 13, № 25. P. 12058–12066.
  141. Kondo M. et al. Ultrafast Vibrational Spectroscopy of the Flavin Chromophore // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2006. Vol. 110, № 41. P. 20107–20110.
  142. Xu J., Knutson J.R.B.T.-M. in E. Chapter 8 Ultrafast Fluorescence Spectroscopy via Upconversion: Applications to Biophysics // *Fluorescence Spectroscopy. Academic Press*, 2008. Vol. 450. P. 159–183.
  143. Kerfeld C.A., Alexandre M., Kirilovsky D. The orange carotenoid protein of cyanobacteria. CRC press, 2009.
  144. Kulczyński B. et al. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge // *J. Funct. Foods.* 2017. Vol. 38. P. 45–65.
  145. Manochkumar J. et al. The neuroprotective potential of carotenoids in vitro and in vivo // *Phytomedicine.* 2021. Vol. 91. P. 153676.
  146. Darvin M.E. et al. Noninvasive detection of beta-carotene and lycopene in human skin using Raman spectroscopy // *LASER PHYSICS-LAWRENCE-. Interperiodica*, 2004. Vol. 14, № 2. P. 231–233.
  147. Darvin M.E. et al. Carotenoids in Human Skin In Vivo: Antioxidant and Photo-Protectant Role against External and Internal Stressors // *Antioxidants.* 2022. Vol. 11, № 8.



148. Landrum J.T. et al. Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas // *Oxidants and Antioxidants Part A*. Academic Press, 1999. Vol. 299. P. 457–467.
149. Reboul E. Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do We Stand? // *Nutrients*. 2019. Vol. 11, № 4.
150. During A. et al. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells:  $\beta$ -carotene isomer selectivity and carotenoid interactions<sup>1</sup> // *J. Lipid Res.* Elsevier, 2002. Vol. 43, № 7. P. 1086–1095.
151. REBOUL E. et al. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI) // *Biochem. J.* 2005. Vol. 387, № 2. P. 455–461.
152. Yang C. et al. Anti-Inflammatory Effects of Different Astaxanthin Isomers and the Roles of Lipid Transporters in the Cellular Transport of Astaxanthin Isomers in Caco-2 Cell Monolayers // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society, 2019. Vol. 67, № 22. P. 6222–6231.
153. Bandara S. et al. Aster proteins mediate carotenoid transport in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. Vol. 119, № 15. P. e2200068119.
154. Li X. et al.  $\beta$ -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins // *Food Chem.* 2015. Vol. 179. P. 213–221.
155. Reszczynska E. et al. Carotenoid binding to proteins: Modeling pigment transport to lipid membranes // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 584. P. 125–133.
156. Semenov A.N. et al. Modulation of Membrane Microviscosity by Protein-Mediated Carotenoid Delivery as Revealed by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy // *Membranes*. 2022. Vol. 12, № 10.
157. [https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-conjugation-length-N-represented-in-the-structures-of-the-various\\_fig6\\_269171591](https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-conjugation-length-N-represented-in-the-structures-of-the-various_fig6_269171591) [Electronic resource].
158. Meléndez-Martínez A.J., Stinco C.M., Mapelli-Brahm P. Skin Carotenoids in Public Health and Nutricosmetics: The Emerging Roles and Applications of the UV Radiation-Absorbing Colourless Carotenoids Phytoene and Phytofluene // *Nutrients*. 2019. Vol. 11, № 5.
159. Polívka T., Sundström V. Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States—From Solution to Natural and Artificial Systems // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2004. Vol. 104, № 4. P. 2021–2072.
160. Kosumi D. et al. Ultrafast S1 and ICT state dynamics of a marine carotenoid probed by femtosecond one- and two-photon pump-probe spectroscopy // *J. Lumin.* 2011. Vol. 131, № 3. P. 515–518.

161. Mayne S.T. et al. Resonance Raman spectroscopic evaluation of skin carotenoids as a biomarker of carotenoid status for human studies // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. Vol. 539, № 2. P. 163–170.
162. Andree S., Reble C., Helfmann J. Spectral in vivo signature of carotenoids in visible light diffuse reflectance from skin in comparison to ex vivo absorption spectra // *Spektral aufgelöste In-vivo-Signale von Karotinoiden der Diffus. Reflektion von Haut im Vergleich zu Ex-vivo-Absorptionsspektren.* 2013. Vol. 2, № 4. P. 323–335.
163. LEE B.N.A. et al. Influence of Chemotherapy on the Antioxidant Status of Human Skin // *Anticancer Res.* 2016. Vol. 36, № 8. P. 4089 LP – 4093.
164. Kustov D.M. et al. Laser-induced fluorescent visualization and photodynamic therapy in surgical treatment of glial brain tumors // *Biomed. Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2021. Vol. 12, № 3. P. 1761–1773.
165. Figge F.H.J., Weiland G.S., Manganiello L.O.J. Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic, Embryonic, and Traumatized Tissues for Porphyrins and Metalloporphyrins. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* SAGE Publications, 1948. Vol. 68, № 3. P. 640–641.
166. Harris D.M., Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 1987. Vol. 7, № 6. P. 467–472.
167. Inaguma M., Hashimoto K. Porphyrin-like fluorescence in oral cancer // *Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd, 1999. Vol. 86, № 11. P. 2201–2211.
168. Luaidi M. et al. Natural Fluorescence Spectroscopy of Human Blood Plasma in the Diagnosis of Colorectal Cancer: Feasibility Study and Preliminary Results // *Tumori J.* SAGE Publications Ltd STM, 2007. Vol. 93, № 6. P. 567–571.
169. Courrol L.C. et al. Study of Blood Porphyrin Spectral Profile for Diagnosis of Tumor Progression // *J. Fluoresc.* 2007. Vol. 17, № 3. P. 289–292.
170. Dobrev H. Fluorescence diagnostic imaging in patients with acne // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 26, № 6. P. 285–289.
171. Koenig K. et al. In-vivo fluorescence detection and imaging of porphyrin-producing bacteria in the human skin and in the oral cavity for diagnosis of acne vulgaris, caries, and squamous cell carcinoma // *Proc.SPIE.* 1994. Vol. 2135. P. 129–138.
172. Lussi A., Hibst R., Paulus R. DIAGNOdent: An Optical Method for Caries Detection // *J. Dent. Res.* SAGE Publications Inc, 2004. Vol. 83, № 1\_suppl. P. 80–83.
173. Pinotsi D. et al. Proton Transfer and Structure-Specific Fluorescence in Hydrogen Bond-Rich Protein Structures // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2016. Vol. 138, № 9. P. 3046–3057.
174. Yabushita A., Kobayashi T. Ultrafast Spectroscopy of Oxyhemoglobin during

- Photodissociation // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2010. Vol. 114, № 35. P. 11654–11658.
175. Franzen S. et al. Heme Photolysis Occurs by Ultrafast Excited State Metal-to-Ring Charge Transfer // *Biophys. J.* 2001. Vol. 80, № 5. P. 2372–2385.
  176. Tomoda A., Yoneyama Y. On the relationship of hemoglobin oxidation with the conformation of hemoglobin // *Experientia*. 1979. Vol. 35, № 1. P. 15–16.
  177. Shirshin E.A. et al. Formation of hemoglobin photoproduct is responsible for two-photon and single photon-excited fluorescence of red blood cells // *Laser Phys. Lett.* IOP Publishing, 2018. Vol. 15, № 7. P. 75604.
  178. Yan D. et al. Fiber enhanced Raman spectroscopic analysis as a novel method for diagnosis and monitoring of diseases related to hyperbilirubinemia and hyperbiliverdinemia // *Analyst*. The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 141, № 21. P. 6104–6115.
  179. Zhang L. et al. Label-free imaging of hemoglobin degradation and hemosiderin formation in brain tissues with femtosecond pump-probe microscopy // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2018. Vol. 8, № 15. P. 4129.
  180. Reed R.G. Kinetics of bilirubin binding to bovine serum albumin and the effects of palmitate. // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, № 21. P. 7483–7487.
  181. Brodersen R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254, № 7. P. 2364–2369.
  182. Koren R., Nissani E., Perlmutter-Hayman B. The kinetics of the reaction between bovine serum albumin and bilirubin a second look // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1982. Vol. 703, № 1. P. 42–48.
  183. Jacobsen J., Brodersen R. Albumin-bilirubin binding mechanism. // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, № 10. P. 6319–6326.
  184. Agati G., Fusi F. New trends in photobiology recent advances in bilirubin photophysics // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1990. Vol. 7, № 1. P. 1–14.
  185. Ostrow J.D., Mukerjee P., Tiribelli C. Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function // *J. Lipid Res.* 1994. Vol. 35, № 10. P. 1715–1737.
  186. M Mazzone et al. Analysis of wavelength-dependent photoisomerization quantum yields in bilirubins by fitting two exciton absorption bands // *J. Opt. A Pure Appl. Opt.* 2003. Vol. 5, № 5. P. S374.
  187. Calligaris S.D. et al. Cytotoxicity Is Predicted by Unbound and Not Total Bilirubin Concentration // *Pediatr. Res.* 2007. Vol. 62, № 5. P. 576–580.
  188. Shapiro S.M. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome // *Semin. Fetal*

- Neonatal Med. 2010. Vol. 15, № 3. P. 157–163.
189. Kurtin W.E. et al. Absorption and emission spectral studies of bilirubin IX $\alpha$  complexes with sodium taurocholate in aqueous buffer, pH 8.0 // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. The Royal Society of Chemistry*, 1993. № 12. P. 2393–2397.
  190. Croce A.C. et al. Bilirubin: an autofluorescence bile biomarker for liver functionality monitoring // *J. Biophotonics. John Wiley & Sons, Ltd*, 2014. Vol. 7, № 10. P. 810–817.
  191. Blauer G., Sund H. Optical properties and structure of tetrapyrroles. de Gruyter, 1985.
  192. Плавский В.Ю. et al. Спектрально-флуоресцентные и поляризационные характеристики Z, Z-билирубина IX $\alpha$  // *Журнал прикладной спектроскопии. Государственное научное учреждение Институт физики им. БИ Степанова ...*, 2007. Vol. 74, № 1. P. 108–119.
  193. Zietz B., Gillbro T. Initial Photochemistry of Bilirubin Probed by Femtosecond Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2007. Vol. 111, № 41. P. 11997–12003.
  194. Carreira-Blanco C. et al. Ultrafast deactivation of bilirubin: dark intermediates and two-photon isomerization // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 18, № 10. P. 7148–7155.
  195. Tayyab S. et al. Behavior of various mammalian albumins towards bilirubin binding and photochemical properties of different bilirubin–albumin complexes // *Int. J. Biol. Macromol.* 2003. Vol. 31, № 4. P. 187–193.
  196. Person R. V, Peterson B.R., Lightner D.A. Bilirubin conformational analysis and circular dichroism // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 1994. Vol. 116, № 1. P. 42–59.
  197. Granucci G. et al. A computational study of the excited states of bilirubin IX // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2005. Vol. 7, № 13. P. 2594–2598.
  198. Zsila F. Circular Dichroism Spectroscopy Is a Sensitive Tool for Investigation of Bilirubin–Enzyme Interactions // *Biomacromolecules. American Chemical Society*, 2011. Vol. 12, № 1. P. 221–227.
  199. Greene B.I., Lamola A.A., Shank C. V. Picosecond primary photoprocesses of bilirubin bound to human serum albumin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981. Vol. 78, № 4. P. 2008–2012.
  200. Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R., Plavski V.Y. Spectral and photochemical parameters which define the higher efficacy of laser phototherapy in hyperbilirubinemia in newborns // *Proc.SPIE.* 1995. Vol. 2370. P. 558–561.
  201. Плавский В.Ю. et al. Сенсибилизирующее действие Z, Z-билирубина IX $\alpha$  и его

- фотопродуктов на ферменты в модельных растворах // Журнал прикладной спектроскопии. Государственное научное учреждение Институт физики им. БИ Степанова ..., 2008. Vol. 75, № 3. P. 383–394.
202. Polin R.A. Management of Neonatal Hyperbilirubinemia: Rational Use of Phototherapy // Neonatology. 1990. Vol. 58(suppl 1, № Suppl. 1. P. 32–43.
203. Vreman H.J., Wong R.J., Stevenson D.K. Phototherapy: Current methods and future directions // Semin. Perinatol. 2004. Vol. 28, № 5. P. 326–333.
204. Solano C.A.P., Donno D., Chauris H. A Waveform Inversion Strategy for Surface Wave Analysis in the Presence of High Velocity Contrasts // 76th EAGE Conference and Exhibition 2014. European Association of Geoscientists & Engineers, 2014. Vol. 2014, № 1. P. 1–5.
205. Huang Z. et al. Raman spectroscopy of *in vivo* cutaneous melanin // J. Biomed. Opt. 2004. Vol. 9, № 6. P. 1198–1205.
206. Huang Z. et al. Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation // J. Biomed. Opt. 2006. Vol. 11, № 3. P. 34010.
207. Hamzavi I. et al. Spectroscopic assessment of dermal melanin using blue vitiligo as an *in vivo* model // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 22, № 1. P. 46–51.
208. Shirshin E.A. et al. Melanin diagnostics with nonlinear optics: a mini-review // Quantum Electron. Kvantovaya Elektronika, Turpion Ltd and IOP Publishing, 2022. Vol. 52, № 1. P. 28.
209. Chen C.-T. et al. Excitonic effects from geometric order and disorder explain broadband optical absorption in eumelanin // Nat. Commun. 2014. Vol. 5, № 1. P. 3859.
210. Tran M.L., Powell B.J., Meredith P. Chemical and Structural Disorder in Eumelanins: A Possible Explanation for Broadband Absorbance // Biophys. J. 2006. Vol. 90, № 3. P. 743–752.
211. Meredith P., Riesz J. Radiative Relaxation Quantum Yields for Synthetic Eumelanin // Photochem. Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. Vol. 79, № 2. P. 211–216.
212. Liu Y., Simon J.D. Isolation and Biophysical Studies of Natural Eumelanins: Applications of Imaging Technologies and Ultrafast Spectroscopy // Pigment Cell Res. John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Vol. 16, № 6. P. 606–618.
213. Watt A.A.R., Bothma J.P., Meredith P. The supramolecular structure of melanin // Soft Matter. The Royal Society of Chemistry, 2009. Vol. 5, № 19. P. 3754–3760.
214. Stark K.B. et al. Effect of Stacking and Redox State on Optical Absorption Spectra of Melanins—Comparison of Theoretical and Experimental Results // J. Phys. Chem. B.

- American Chemical Society, 2005. Vol. 109, № 5. P. 1970–1977.
215. Kaxiras E. et al. Structural Model of Eumelanin // *Phys. Rev. Lett.* American Physical Society, 2006. Vol. 97, № 21. P. 218102.
  216. Meng S., Kaxiras E. Theoretical Models of Eumelanin Protomolecules and their Optical Properties // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, № 6. P. 2095–2105.
  217. Köhler A., Bässler H. *Electronic processes in organic semiconductors: An introduction.* John Wiley & Sons, 2015.
  218. BASHKATOV A.N., GENINA E.A., TUCHIN V. V. OPTICAL PROPERTIES OF SKIN, SUBCUTANEOUS, AND MUSCLE TISSUES: A REVIEW // *J. Innov. Opt. Health Sci.* World Scientific Publishing Co., 2011. Vol. 04, № 01. P. 9–38.
  219. Htun N.M. et al. Near-infrared autofluorescence induced by intraplaque hemorrhage and heme degradation as marker for high-risk atherosclerotic plaques // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 75.
  220. J. U.G. et al. Clinical Characterization of Coronary Atherosclerosis With Dual-Modality OCT and Near-Infrared Autofluorescence Imaging // *JACC Cardiovasc. Imaging.* American College of Cardiology Foundation, 2016. Vol. 9, № 11. P. 1304–1314.
  221. Albaghdadi M.S. et al. Near-Infrared Autofluorescence in Atherosclerosis Associates With Ceroid and Is Generated by Oxidized Lipid-Induced Oxidative Stress // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* American Heart Association, 2021. Vol. 41, № 7. P. e385–e398.
  222. Asari R. et al. Hypoparathyroidism After Total Thyroidectomy: A Prospective Study // *Arch. Surg.* 2008. Vol. 143, № 2. P. 132–137.
  223. Paras C. et al. Near-infrared autofluorescence for the detection of parathyroid glands // *J. Biomed. Opt.* 2011. Vol. 16, № 6. P. 67012.
  224. Kose E. et al. Autofluorescence imaging of parathyroid glands: An assessment of potential indications // *Surgery.* 2020. Vol. 167, № 1. P. 173–179.
  225. McWade M.A. et al. A novel optical approach to intraoperative detection of parathyroid glands // *Surgery.* 2013. Vol. 154, № 6. P. 1371–1377.
  226. McWade M.A. et al. Label-free Intraoperative Parathyroid Localization With Near-Infrared Autofluorescence Imaging // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 99, № 12. P. 4574–4580.
  227. Thomas G. et al. Innovative surgical guidance for label-free real-time parathyroid identification // *Surgery.* 2019. Vol. 165, № 1. P. 114–123.
  228. Baechle J.J. et al. Cumulative GRAS Score as a Predictor of Survival After Resection for Adrenocortical Carcinoma: Analysis From the U.S. Adrenocortical Carcinoma Database // *Ann. Surg. Oncol.* 2021. Vol. 28, № 11. P. 6551–6561.

229. Dip F. et al. Randomized Controlled Trial Comparing White Light with Near-Infrared Autofluorescence for Parathyroid Gland Identification During Total Thyroidectomy // *J. Am. Coll. Surg.* 2019. Vol. 228, № 5. P. 744–751.
230. Moore E.C. et al. Near-infrared imaging in re-operative parathyroid surgery: First description of autofluorescence from cryopreserved parathyroid glands // *Gland Surg. AME Publications*, 2019. Vol. 8, № 3. P. 283.
231. Thomas G. et al. Identifying the novel endogenous near-infrared fluorophore within parathyroid and other endocrine tissues // *Biomedical Optics 2016*. Fort Lauderdale, Florida: Optica Publishing Group, 2016. P. PTu3A.5.
232. Ladurner R. et al. Parathyroid Autofluorescence—How Does It Affect Parathyroid and Thyroid Surgery? A 5 Year Experience // *Molecules*. 2019. Vol. 24, № 14.
233. Jacobson M.C., White R.W. deVere, Demos S.G. *In vivo* testing of a prototype system providing simultaneous white light and near infrared autofluorescence image acquisition for detection of bladder cancer // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 3. P. 36011.
234. Kong Y. et al. Near-infrared fluorescent ribonuclease-A-encapsulated gold nanoclusters: preparation, characterization, cancer targeting and imaging // *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 5, № 3. P. 1009–1017.
235. Bratchenko I.A. et al. Combined Raman and autofluorescence *ex vivo* diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions // *J. Biomed. Opt.* 2017. Vol. 22, № 2. P. 27005.
236. Perna G. et al. Fluorescence spectroscopy of synthetic melanin in solution // *J. Lumin.* 2009. Vol. 129, № 1. P. 44–49.
237. Artyushenko V. et al. Spectral fiber sensors for cancer diagnostics in vitro // *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV* / ed. Brown V. J. and D. Munich: Optica Publishing Group, 2015. Vol. 9537. P. 953720.
238. Caspers P.J., Lucassen G.W., Puppels G.J. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin // *Biophys. J.* 2003. Vol. 85, № 1. P. 572–580.
239. Leavitt S., Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. Vol. 11, № 5. P. 560–566.
240. Bornhop D.J. et al. Free-Solution, Label-Free Molecular Interactions Studied by Back-Scattering Interferometry // *Science (80-. )*. American Association for the Advancement of Science, 2007. Vol. 317, № 5845. P. 1732–1736.
241. Herrera A.M., Scott D.O., Lunte C.E. Microdialysis Sampling for Determination of Plasma Protein Binding of Drugs // *Pharm. Res.* 1990. Vol. 7, № 10. P. 1077–1081.
242. Hage D.S. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum

- protein binding // *J. Chromatogr. B.* 2002. Vol. 768, № 1. P. 3–30.
243. López-Méndez B. et al. Reproducibility and accuracy of microscale thermophoresis in the NanoTemper Monolith: a multi laboratory benchmark study // *Eur. Biophys. J.* 2021. Vol. 50, № 3. P. 411–427.
244. Callis P.R. Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach // *J. Mol. Struct.* 2014. Vol. 1077. P. 14–21.
245. Hong Y., Lam J.W.Y., Tang B.Z. Aggregation-induced emission // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2011. Vol. 40, № 11. P. 5361–5388.
246. Eftink M.R.B.T.-M. in E. Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule–ligand interactions // *Flourescence Spectroscopy*. Academic Press, 1997. Vol. 278. P. 221–257.
247. Ward L.D.B.T.-M. in E. Measurement of ligand binding to proteins by fluorescence spectroscopy // *Enzyme Structure Part J*. Academic Press, 1985. Vol. 117. P. 400–414.
248. Bujalowski W., Jezewska M.J., Bujalowski P.J. Signal and binding. I. Physico-chemical response to macromolecule–ligand interactions // *Biophys. Chem.* 2017. Vol. 222. P. 7–24.
249. Bujalowski W., Jezewska M.J., Bujalowski P.J. Signal and binding. II. Converting physico-chemical responses to macromolecule–ligand interactions into thermodynamic binding isotherms // *Biophys. Chem.* 2017. Vol. 222. P. 25–40.
250. Kairys V. et al. Binding affinity in drug design: experimental and computational techniques // *Expert Opin. Drug Discov.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 14, № 8. P. 755–768.
251. van de Weert M., Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology // *J. Mol. Struct.* 2011. Vol. 998, № 1. P. 144–150.
252. Leatherbarrow R.J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data // *Trends Biochem. Sci.* 1990. Vol. 15, № 12. P. 455–458.
253. Zhang Y.-Z. et al. Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2009. Vol. 72, № 4. P. 907–914.
254. Tikhonova T.N. et al. Assessment of the Europium(III) Binding Sites on Albumin Using Fluorescence Spectroscopy // *J. Phys. Chem. B*. American Chemical Society, 2014. Vol. 118, № 24. P. 6626–6633.
255. van de Weert M. Fluorescence Quenching to Study Protein-ligand Binding: Common Errors // *J. Fluoresc.* 2010. Vol. 20, № 2. P. 625–629.
256. Lissi E., Calderón C., Campos A. Evaluation of the Number of Binding Sites in Proteins from their Intrinsic Fluorescence: Limitations and Pitfalls // *Photochem. Photobiol. John*



- Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 89, № 6. P. 1413–1416.
257. van de Weert M., Stella L. The dangers of citing papers you did not read or understand // *J. Mol. Struct.* 2019. Vol. 1186. P. 102–103.
258. Сергеева И.А. et al. Влияние катионов свинца на флуоресцентные характеристики бычьего сывороточного альбумина в водном растворе // *Оптика и спектроскопия. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический ...*, 2013. Vol. 115, № 2. P. 201.
259. Masuoka J. et al. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of zinc(II) and copper(II) to the high affinity site of serum albumin. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 29. P. 21533–21537.
260. Ohyoshi E. et al. The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry // *J. Inorg. Biochem.* 1999. Vol. 75, № 3. P. 213–218.
261. Peng M., Shi S., Zhang Y. Influence of Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> on (+)-catechin binding to bovine serum albumin studied by fluorescence spectroscopic methods // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. Vol. 85, № 1. P. 190–197.
262. Liu Y. et al. Spectroscopic Identification of Interactions of Pb<sup>2+</sup> with Bovine Serum Albumin // *J. Fluoresc.* 2012. Vol. 22, № 1. P. 239–245.
263. Belatik A. et al. Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 5. P. e36723.
264. Lu X.-L. et al. Characterization of the interaction between cationic Erbium (III)–porphyrin complex with bovine serum albumin // *J. Mol. Struct.* 2009. Vol. 934, № 1. P. 1–8.
265. Scatchard G.D. The attractions of proteins for small molecules and ions // *Ann. NY Acad. Sci.* 1949. Vol. 51. P. 660–672.
266. Reuben J. Gadolinium(III) as a paramagnetic probe for proton relaxation studies of biological macromolecules. Binding to bovine serum albumin // *Biochemistry. American Chemical Society*, 1971. Vol. 10, № 15. P. 2834–2838.
267. Rezaei Behbehani G., Mirzaie M. A high performance method for thermodynamic study on the binding of copper ion and glycine with Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide // *J. Therm. Anal. Calorim.* Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó, co-published with Springer Science+Business Media B.V., Formerly Kluwer Academic Publishers B.V., 2009. Vol. 96, № 2. P. 631–635.
268. Li X. et al. Microcalorimetric studies on the interactions of lanthanide ions with bovine serum albumin // *J. Therm. Anal. Calorim.* Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó, co-published with Springer Science+Business Media B.V., Formerly Kluwer Academic

- Publishers B.V., 2007. Vol. 89, № 3. P. 899–905.
269. Hamilton J.A. et al. Interactions of myristic acid with bovine serum albumin: a <sup>13</sup>C NMR study. // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984. Vol. 81, № 12. P. 3718–3722.
  270. Gelamo E.L. et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 2002. Vol. 1594, № 1. P. 84–99.
  271. Kuznetsova I.M. et al. Reevaluation of ANS Binding to Human and Bovine Serum Albumins: Key Role of Equilibrium Microdialysis in Ligand – Receptor Binding Characterization // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 7. P. e40845.
  272. de Paula H.M.C. et al. Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017. Vol. 159. P. 737–742.
  273. Ahmed-Ouameur A. et al. The effects of drug complexation on the stability and conformation of human serum albumin // *Cell Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 45, № 2. P. 203–213.
  274. Sitar M.E., Aydin S., Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress // *Clin. Lab. Department of Medical Biochemistry, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Istanbul University, Fatih, 34098 Istanbul, Turkey.*, 2013. Vol. 59, № 9–10. P. 945–952.
  275. Kragh-Hansen U., Chuang V.T.G., Otagiri M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25, № 6. P. 695–704.
  276. Kazmierczak S.C. et al. Electron Spin Resonance Spectroscopy of Serum Albumin: A Novel New Test for Cancer Diagnosis and Monitoring // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52, № 11. P. 2129–2134.
  277. Madhuri S. et al. Native Fluorescence Spectroscopy of Blood Plasma in the Characterization of Oral Malignancy // *Photochem. Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd*, 2003. Vol. 78, № 2. P. 197–204.
  278. Gayer A. V et al. Multifarious analytical capabilities of the UV/Vis protein fluorescence in blood plasma // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2023. Vol. 286. P. 122028.
  279. Peters T. Serum Albumin // *Advances in protein chemistry* / ed. Anfinsen C.B., Edsall J.T., Richards F.M.B.T.-A. in P.C. Academic Press, 1985. Vol. 37. P. 161–245.
  280. Carter D.C. et al. Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin // *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science, 1989. Vol. 244, № 4909. P. 1195–1198.

281. Fasano M. et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin // *IUBMB Life*. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 57, № 12. P. 787–796.
282. Zhdanova N.G. et al. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. Vol. 14, № 5. P. 897–908.
283. Zunszain P.A. et al. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid // *BMC Struct. Biol.* 2003. Vol. 3, № 1. P. 6.
284. Curry S., Brick P., Franks N.P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1999. Vol. 1441, № 2. P. 131–140.
285. Ali M.S. et al. Unfolding of rabbit serum albumin by cationic surfactants: Surface tensiometry, small-angle neutron scattering, intrinsic fluorescence, resonance Rayleigh scattering and circular dichroism studies // *J. Colloid Interface Sci.* 2010. Vol. 352, № 2. P. 436–443.
286. Chakraborty T. et al. Physicochemical and Conformational Studies on BSA–Surfactant Interaction in Aqueous Medium // *Langmuir*. American Chemical Society, 2009. Vol. 25, № 5. P. 3062–3074.
287. Geng F. et al. Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension // *Process Biochem.* 2010. Vol. 45, № 3. P. 306–311.
288. Mir M.A. et al. Interaction of Bovine Serum Albumin with Cationic Single Chain+Nonionic and Cationic Gemini+Nonionic Binary Surfactant Mixtures // *J. Phys. Chem. B*. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 9. P. 3197–3204.
289. Santos S.F. et al. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 262, № 2. P. 400–408.
290. Otzen D. Protein–surfactant interactions: A tale of many states // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 2011. Vol. 1814, № 5. P. 562–591.
291. Takeda K., Miura M., Takagi T. Stepwise formation of complexes between sodium dodecyl sulfate and bovine serum albumin detected by measurements of electric conductivity, binding isotherm, and circular dichroism // *J. Colloid Interface Sci.* 1981. Vol. 82, № 1. P. 38–44.
292. Gelamo E.L., Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2000. Vol. 56, № 11. P. 2255–2271.

293. Anand U., Jash C., Mukherjee S. Spectroscopic Probing of the Microenvironment in a Protein–Surfactant Assembly // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2010. Vol. 114, № 48. P. 15839–15845.
294. Gelamo E.L. et al. Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 277, № 2. P. 471–482.
295. Anand U., Mukherjee S. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013. Vol. 1830, № 12. P. 5394–5404.
296. Borkman R.F., Phillips S.R. Tyrosine-to-tryptophan energy transfer and the structure of calt gamma-II crystallin // *Exp. Eye Res.* 1985. Vol. 40, № 6. P. 819–826.
297. Saito Y. et al. EXCITATION-ENERGY TRANSFER BETWEEN TYROSINE AND TRYPTOPHAN IN PROTEINS EVALUATED BY THE SIMULTANEOUS MEASUREMENT OF FLUORESCENCE AND ABSORBANCE // *Photochem. Photobiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1981. Vol. 33, № 3. P. 289–295.
298. Eisenhawer M. et al. Fluorescence Resonance Energy Transfer Shows a Close Helix–Helix Distance in the Transmembrane M13 Procoat Protein // *Biochemistry. American Chemical Society*, 2001. Vol. 40, № 41. P. 12321–12328.
299. Eisinger J., Feuer B., Lamola A.A. Intramolecular singlet excitation transfer. Applications to polypeptides // *Biochemistry. American Chemical Society*, 1969. Vol. 8, № 10. P. 3908–3915.
300. KRONMAN M.J., HOLMES L.G. THE FLUORESCENCE OF NATIVE, DENATURED AND REDUCED-DENATURED PROTEINS\* // *Photochem. Photobiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1971. Vol. 14, № 2. P. 113–134.
301. Steinhardt J., Krijn J., Leidy J.G. Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects // *Biochemistry. American Chemical Society*, 1971. Vol. 10, № 22. P. 4005–4015.
302. Li D. et al. Probing the influences of urea on the interaction of sinomenine with human serum albumin by steady-state fluorescence // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2012. Vol. 117. P. 126–131.
303. Gorinstein S. et al. Intrinsic Tryptophan Fluorescence of Human Serum Proteins and Related Conformational Changes // *J. Protein Chem.* 2000. Vol. 19, № 8. P. 637–642.
304. Weinberg R.B. Exposure and electronic interaction of tyrosine and tryptophan residues in human apolipoprotein A-IV // *Biochemistry. American Chemical Society*, 1988. Vol. 27, № 5. P. 1515–1521.

305. Alexander Ross J.B. et al. Tyrosine Fluorescence and Phosphorescence from Proteins and Polypeptides BT // Topics in fluorescence spectroscopy / ed. Lakowicz J.R. Boston, MA: Springer US, 2002. P. 1–64.
306. Cowgill R.W. Fluorescence and protein structure: XIV. Tyrosine fluorescence in helical muscle proteins // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. 1968. Vol. 168, № 3. P. 417–430.
307. Vekshin N., Vincent M., Gallay J. Tyrosine hypochromism and absence of tyrosine-tryptophan energy transfer in phospholipase A2 and ribonuclease T1 // Chem. Phys. 1993. Vol. 171, № 1. P. 231–236.
308. Li H. et al. Ultrafast Förster resonance energy transfer between tyrosine and tryptophan: potential contributions to protein–water dynamics measurements // Phys. Chem. Chem. Phys. The Royal Society of Chemistry, 2022. Vol. 24, № 30. P. 18055–18066.
309. Gurachevsky A. et al. Application of spin label electron paramagnetic resonance in the diagnosis and prognosis of cancer and sepsis // Clin. Chem. Lab. Med. 2008. Vol. 46, № 9. P. 1203–1210.
310. Gurachevsky A. et al. Cancer-Associated Alteration in Fatty Acid Binding to Albumin Studied by Spin-Label Electron Spin Resonance // Cancer Invest. Taylor & Francis, 2007. Vol. 25, № 6. P. 378–383.
311. Taboada P. et al. Effect of solvation on the structure conformation of human serum albumin in aqueous–alcohol mixed solvents // Chem. Phys. 2007. Vol. 340, № 1. P. 59–68.
312. Dwyer\* D.S., Bradley R.J. Chemical properties of alcohols and their protein binding sites // Cell. Mol. Life Sci. C. 2000. Vol. 57, № 2. P. 265–275.
313. Avdulov N.A. et al. Direct Binding of Ethanol to Bovine Serum Albumin: A Fluorescent and <sup>13</sup>C NMR Multiplet Relaxation Study // Biochemistry. American Chemical Society, 1996. Vol. 35, № 1. P. 340–347.
314. Callis P.R. Simulating electrostatic effects on electronic transitions in proteins // Mol. Simul. Taylor & Francis, 2015. Vol. 41, № 1–3. P. 190–204.
315. Becker W. The bh TCSPC handbook. Becker & Hickl GmbH, 2021.
316. Zhdanova N.G. et al. Tyrosine fluorescence probing of conformational changes in tryptophan-lacking domain of albumins // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 2017. Vol. 174. P. 223–229.
317. Kallman H., Krasnansky V.J., Person P. CARBONYL CONTRIBUTION TO THE EXCITATION OF VISIBLE FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE IN FIBROUS PROTEINS\* // Photochem. Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd, 1968. Vol. 8, № 1. P. 65–68.

318. Verzijl N. et al. 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 Biol.* 2001. Vol. 20, № 7. P. 409–417.
319. Aizen R. et al. Intrinsic fluorescence of nucleobase crystals // *Nanoscale Adv. RSC*, 2023. Vol. 5, № 2. P. 344–348.
320. Niyangoda C. et al. Carbonyl-based blue autofluorescence of proteins and amino acids // *PLoS One. Public Library of Science*, 2017. Vol. 12, № 5. P. e0176983.
321. Joseph S.K. et al. Proton-Transfer-Induced Fluorescence in Self-Assembled Short Peptides // *J. Phys. Chem. A. American Chemical Society*, 2019. Vol. 123, № 9. P. 1758–1765.
322. Prasad S. et al. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein // *Chem. Sci. The Royal Society of Chemistry*, 2017. Vol. 8, № 8. P. 5416–5433.
323. Jong K.H. et al. Low energy optical excitations as an indicator of structural changes initiated at the termini of amyloid proteins // *Phys. Chem. Chem. Phys. The Royal Society of Chemistry*, 2019. Vol. 21, № 43. P. 23931–23942.
324. Juszczak L.J., Eisenberg A.S. The Color of Cation- $\pi$  Interactions: Subtleties of Amine-Tryptophan Interaction Energetics Allow for Radical-like Visible Absorbance and Fluorescence // *J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society*, 2017. Vol. 139, № 24. P. 8302–8311.
325. Xiao X. et al. A Double Cation- $\pi$ -Driven Strategy Enabling Two-Dimensional Supramolecular Polymers as Efficient Catalyst Carriers // *Angew. Chemie Int. Ed. John Wiley & Sons, Ltd*, 2020. Vol. 59, № 24. P. 9534–9541.
326. BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A. Nonenzymatic Glycosylation and the Pathogenesis of Diabetic Complications // *Ann. Intern. Med. American College of Physicians*, 1984. Vol. 101, № 4. P. 527–537.
327. Thorpe S.R., Baynes J.W. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives // *Amino Acids*. 2003. Vol. 25, № 3. P. 275–281.
328. Dyer D.G. et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. // *J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation*, 1993. Vol. 91, № 6. P. 2463–2469.
329. Metreveli N.O. et al. UV-vis and FT-IR spectra of ultraviolet irradiated collagen in the presence of antioxidant ascorbic acid // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2010. Vol. 73, № 3. P. 448–455.
330. Aeschbach R., Amadò R., Neukom H. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues // *Biochim. Biophys. Acta*. 1976. Vol. 439, № 2. P. 292–301.

331. DOWSON J.H. A sensitive method for the demonstration of senile plaques in the dementing brain // *Histopathology*. John Wiley & Sons, Ltd, 1981. Vol. 5, № 3. P. 305–310.
332. Thal D.R. et al. UV light-induced autofluorescence of full-length Abeta-protein deposits in the human brain // *Clin. Neuropathol.* Department of Anatomy, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, Germany. dietmar.thal@uni-bonn.de, 2002. Vol. 21, № 1. P. 35–40.
333. Gao Y. et al. Imaging and Spectral Characteristics of Amyloid Plaque Autofluorescence in Brain Slices from the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer’s Disease // *Neurosci. Bull.* 2019. Vol. 35, № 6. P. 1126–1137.
334. Diez M. et al. Neuropeptides in hippocampus and cortex in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein — initial observations // *Neuroscience*. 2000. Vol. 100, № 2. P. 259–286.
335. Purushothuman S. et al. The Response of Cerebral Cortex to Haemorrhagic Damage: Experimental Evidence from a Penetrating Injury Model // *PLoS One*. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 3. P. e59740.
336. Zipfel W.R. et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. Vol. 100, № 12. P. 7075–7080.
337. Kwan A.C. et al. Optical visualization of Alzheimer’s pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation // *Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2009. Vol. 17, № 5. P. 3679–3689.
338. Lee J.H. et al. Label-free imaging and quantitative chemical analysis of Alzheimer’s disease brain samples with multimodal multiphoton nonlinear optical microspectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2015. Vol. 20, № 5. P. 56013.
339. Johansson P.K., Koelsch P. Label-free imaging of amyloids using their intrinsic linear and nonlinear optical properties // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2017. Vol. 8, № 2. P. 743–756.
340. Ziaunys M., Sneideris T., Smirnovas V. Exploring the potential of deep-blue autofluorescence for monitoring amyloid fibril formation and dissociation // *PeerJ* / ed. Uversky V. 2019. Vol. 7. P. e7554.
341. del Mercato L.L. et al. Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. Vol. 104, № 46. P. 18019–18024.
342. Tikhonova T.N. et al. Mechanical Enhancement and Kinetics Regulation of Fmoc-Diphenylalanine Hydrogels by Thioflavin T // *Angew. Chemie Int. Ed.* John Wiley & Sons,

- Ltd, 2021. Vol. 60, № 48. P. 25339–25345.
343. Arnon Z.A. et al. On-off transition and ultrafast decay of amino acid luminescence driven by modulation of supramolecular packing // *iScience*. 2021. Vol. 24, № 7. P. 102695.
  344. Shaham-Niv S. et al. Intrinsic Fluorescence of Metabolite Amyloids Allows Label-Free Monitoring of Their Formation and Dynamics in Live Cells // *Angew. Chemie Int. Ed. John Wiley & Sons, Ltd*, 2018. Vol. 57, № 38. P. 12444–12447.
  345. Semenov A.N. et al. The Oxidation-Induced Autofluorescence Hypothesis: Red Edge Excitation and Implications for Metabolic Imaging // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 8.
  346. Glabe C.G. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease // *Neurobiol. Aging*. 2006. Vol. 27, № 4. P. 570–575.
  347. Tcherkasskaya O. Photo-activity induced by amyloidogenesis // *Protein Sci. John Wiley & Sons, Ltd*, 2007. Vol. 16, № 4. P. 561–571.
  348. Pinotsi D. et al. A Label-Free, Quantitative Assay of Amyloid Fibril Growth Based on Intrinsic Fluorescence // *ChemBioChem. John Wiley & Sons, Ltd*, 2013. Vol. 14, № 7. P. 846–850.
  349. Chan F.T.S. et al. Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation // *Analyst. The Royal Society of Chemistry*, 2013. Vol. 138, № 7. P. 2156–2162.
  350. Shukla A. et al. A novel UV laser-induced visible blue radiation from protein crystals and aggregates: scattering artifacts or fluorescence transitions of peptide electrons delocalized through hydrogen bonding? // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. Vol. 428, № 2. P. 144–153.
  351. Amdursky N. et al. Blue Luminescence Based on Quantum Confinement at Peptide Nanotubes // *Nano Lett. American Chemical Society*, 2009. Vol. 9, № 9. P. 3111–3115.
  352. Hanczyc P., Samoc M., Norden B. Multiphoton absorption in amyloid protein fibres // *Nat. Photonics*. 2013. Vol. 7, № 12. P. 969–972.
  353. 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 // *Bull. Chem. Soc. Jpn. The Chemical Society of Japan*, 2004. Vol. 77, № 4. P. 765–769.
  354. Homchaudhuri L., Swaminathan R. Novel Absorption and Fluorescence Characteristics of L-Lysine // *Chem. Lett. The Chemical Society of Japan*, 2001. Vol. 30, № 8. P. 844–845.
  355. Kumar A. et al. Weak Intrinsic Luminescence in Monomeric Proteins Arising from Charge Recombination // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2020. Vol. 124, № 14. P. 2731–2746.
  356. Mandal I., Paul S., Venkatramani R. Optical backbone-sidechain charge transfer transitions



- in proteins sensitive to secondary structure and modifications // *Faraday Discuss. The Royal Society of Chemistry*, 2018. Vol. 207, № 0. P. 115–135.
357. Ansari M.Z. et al. Protein charge transfer absorption spectra: an intrinsic probe to monitor structural and oligomeric transitions in proteins // *Faraday Discuss. The Royal Society of Chemistry*, 2018. Vol. 207, № 0. P. 91–113.
358. Biancalana M., Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2010. Vol. 1804, № 7. P. 1405–1412.
359. Ban T. et al. Direct Observation of Amyloid Fibril Growth Monitored by Thioflavin T Fluorescence \* 210 // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2003. Vol. 278, № 19. P. 16462–16465.
360. Sulatskaya A.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils: Stoichiometry and Affinity of Dye Binding, Absorption Spectra of Bound Dye // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2011. Vol. 115, № 39. P. 11519–11524.
361. Rovnyagina N.R. et al. Free and bound Thioflavin T molecules with ultrafast relaxation: implications for assessment of protein binding and aggregation // *Laser Phys. Lett. IOP Publishing*, 2019. Vol. 16, № 7. P. 75601.
362. Alavez S. et al. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan // *Nature*. 2011. Vol. 472, № 7342. P. 226–229.
363. Sulatsky M.I. et al. Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils // *Prion. Taylor & Francis*, 2020. Vol. 14, № 1. P. 67–75.
364. Xue C. et al. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation // *R. Soc. Open Sci. Royal Society*, 2022. Vol. 4, № 1. P. 160696.
365. Wördehoff M.M., Hoyer W.  $\alpha$ -Synuclein Aggregation Monitored by Thioflavin T Fluorescence Assay // *Bio-protocol. Bio-protocol LLC.*, 2018. Vol. 8, № 14. P. e2941.
366. Cukalevski R. et al. The A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation // *Chem. Sci. The Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 6, № 7. P. 4215–4233.
367. Tikhonova T.N. et al. Tunable Self-Assembled Peptide Hydrogel Sensor for Pharma Cold Supply Chain // *ACS Appl. Mater. Interfaces. American Chemical Society*, 2022. Vol. 14, № 50. P. 55392–55401.
368. Hsieh M.-C., Lynn D.G., Grover M.A. Kinetic Model for Two-Step Nucleation of Peptide Assembly // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2017. Vol. 121, № 31. P. 7401–7411.
369. Knowles T.P.J., Vendruscolo M., Dobson C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15, № 6. P. 384–396.

370. Jameson L.P., Smith N.W., Dzyuba S. V. Dye-Binding Assays for Evaluation of the Effects of Small Molecule Inhibitors on Amyloid (A $\beta$ ) Self-Assembly // ACS Chem. Neurosci. American Chemical Society, 2012. Vol. 3, № 11. P. 807–819.
371. Buell A.K. et al. Interactions between Amyloidophilic Dyes and Their Relevance to Studies of Amyloid Inhibitors // Biophys. J. 2010. Vol. 99, № 10. P. 3492–3497.
372. Lendel C. et al. On the Mechanism of Nonspecific Inhibitors of Protein Aggregation: Dissecting the Interactions of  $\alpha$ -Synuclein with Congo Red and Lacmoid // Biochemistry. American Chemical Society, 2009. Vol. 48, № 35. P. 8322–8334.
373. D’Amico M. et al. Thioflavin T Promotes A $\beta$ (1–40) Amyloid Fibrils Formation // J. Phys. Chem. Lett. American Chemical Society, 2012. Vol. 3, № 12. P. 1596–1601.
374. Chattopadhyay A., Mukherjee S. Fluorophore environments in membrane-bound probes: A red edge excitation shift study // Biochemistry. American Chemical Society, 1993. Vol. 32, № 14. P. 3804–3811.
375. Shaham-Niv S. et al. Formation of Apoptosis-Inducing Amyloid Fibrils by Tryptophan // Isr. J. Chem. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 57, № 7–8. P. 729–737.
376. Shaham-Niv S. et al. Extension of the generic amyloid hypothesis to nonproteinaceous metabolite assemblies // Sci. Adv. American Association for the Advancement of Science, 2022. Vol. 1, № 7. P. e1500137.
377. Banik D. et al. Investigation of Fibril Forming Mechanisms of l-Phenylalanine and l-Tyrosine: Microscopic Insight toward Phenylketonuria and Tyrosinemia Type II // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2017. Vol. 121, № 7. P. 1533–1543.
378. Adler-Abramovich L. et al. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria // Nat. Chem. Biol. 2012. Vol. 8, № 8. P. 701–706.
379. Lesné S. et al. A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory // Nature. 2006. Vol. 440, № 7082. P. 352–357.
380. Stryer L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin: A fluorescent probe of non-polar binding sites // J. Mol. Biol. 1965. Vol. 13, № 2. P. 482–495.
381. Semisotnov G. V et al. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe // Biopolymers. John Wiley & Sons, Ltd, 1991. Vol. 31, № 1. P. 119–128.
382. Hawe A., Sutter M., Jiskoot W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization // Pharm. Res. 2008. Vol. 25, № 7. P. 1487–1499.
383. Mohanty J. et al. Early detection of insulin fibrillation: a fluorescence lifetime assay to probe the pre-fibrillar regime // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 48, № 18. P. 2403–2405.

384. Liu R. et al. Insulin amyloid fibrillation studied by terahertz spectroscopy and other biophysical methods // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 391, № 1. P. 862–867.
385. Bekard I.B., Dunstan D.E. Tyrosine Autofluorescence as a Measure of Bovine Insulin Fibrillation // *Biophys. J.* 2009. Vol. 97, № 9. P. 2521–2531.
386. Ghosh M. et al. Arginine-Presenting Peptide Hydrogels Decorated with Hydroxyapatite as Biomimetic Scaffolds for Bone Regeneration // *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 2017. Vol. 18, № 11. P. 3541–3550.
387. Rovnyagina N.R. et al. Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 108. P. 284–290.
388. Schonberg A., Moubacher R. The Strecker Degradation of  $\alpha$ -Amino Acids. // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 1952. Vol. 50, № 2. P. 261–277.
389. Kato S., Kurata T., Fujimaki M. Thermal Degradation of Aromatic Amino Acids // *Agric. Biol. Chem.* 1971. Vol. 35, № 13. P. 2106–2112.
390. SECK S., CROUZET J. Formation of Volatile Compounds in Sugar-Phenylalanine and Ascorbic Acid-Phenylalanine Model Systems during Heat Treatment // *J. Food Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 1981. Vol. 46, № 3. P. 790–793.
391. McKay G. Emerging investigator series: critical review of photophysical models for the optical and photochemical properties of dissolved organic matter // *Environ. Sci. Process. Impacts*. The Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 22, № 5. P. 1139–1165.
392. Del Vecchio R., Blough N. V. On the Origin of the Optical Properties of Humic Substances // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2004. Vol. 38, № 14. P. 3885–3891.
393. Sharpless C.M., Blough N. V. The importance of charge-transfer interactions in determining chromophoric dissolved organic matter (CDOM) optical and photochemical properties // *Environ. Sci. Process. Impacts*. The Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 16, № 4. P. 654–671.
394. McKay G., Korak J.A., Rosario-Ortiz F.L. Temperature Dependence of Dissolved Organic Matter Fluorescence // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 52, № 16. P. 9022–9032.
395. Kunenkov E. V et al. Total Mass Difference Statistics Algorithm: A New Approach to Identification of High-Mass Building Blocks in Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry Data of Natural Organic Matter // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2009. Vol. 81, № 24. P. 10106–10115.
396. Yakimov B.P. et al. Ultrafast Energy Transfer Determines the Formation of Fluorescence in DOM and Humic Substances // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society,

2021. Vol. 55, № 15. P. 10365–10377.
397. Perna G. et al. Fluorescence properties of natural eumelanin biopolymer // *J. Lumin.* 2011. Vol. 131, № 8. P. 1584–1588.
398. Capozzi V. et al. Optical and photoelectronic properties of melanin // *Thin Solid Films.* 2006. Vol. 511–512. P. 362–366.
399. Cushing S.K. et al. Origin of Strong Excitation Wavelength Dependent Fluorescence of Graphene Oxide // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2014. Vol. 8, № 1. P. 1002–1013.
400. Demchenko A.P. Excitons in Carbonic Nanostructures // *C.* 2019. Vol. 5, № 4.
401. Laquai F. et al. Excitation Energy Transfer in Organic Materials: From Fundamentals to Optoelectronic Devices // *Macromol. Rapid Commun.* John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 30, № 14. P. 1203–1231.
402. Hwang I., Scholes G.D. Electronic Energy Transfer and Quantum-Coherence in  $\pi$ -Conjugated Polymers // *Chem. Mater.* American Chemical Society, 2011. Vol. 23, № 3. P. 610–620.
403. Dykstra T.E. et al. Conformational Disorder and Ultrafast Exciton Relaxation in PPV-family Conjugated Polymers // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2009. Vol. 113, № 3. P. 656–667.
404. Fedunov R.G. et al. Theory of fluorescence spectrum dynamics and its application to determining the relaxation characteristics of the solvent and intramolecular vibrations // *J. Mol. Liq.* 2020. Vol. 298. P. 112016.
405. Welton T., Reichardt C. *Solvents and solvent effects in organic chemistry.* John Wiley & Sons, 2011.
406. Ruiz-Morales Y., Wu X., Mullins O.C. Electronic Absorption Edge of Crude Oils and Asphaltenes Analyzed by Molecular Orbital Calculations with Optical Spectroscopy // *Energy & Fuels.* American Chemical Society, 2007. Vol. 21, № 2. P. 944–952.
407. Xie X. et al. Light-absorbing and fluorescent properties of atmospheric brown carbon: A case study in Nanjing, China // *Chemosphere.* 2020. Vol. 251. P. 126350.
408. Olk D.C. et al. Environmental and Agricultural Relevance of Humic Fractions Extracted by Alkali from Soils and Natural Waters // *J. Environ. Qual.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 48, № 2. P. 217–232.
409. Hansen A.M. et al. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation // *Limnol. Oceanogr.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 61, № 3. P. 1015–1032.
410. Helms J.R. et al. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular

- weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter // *Limnol. Oceanogr.* John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 53, № 3. P. 955–969.
411. Piccolo A.B.T.-A. in A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. Academic Press, 2002. Vol. 75. P. 57–134.
  412. Englman R., Jortner J. The energy gap law for radiationless transitions in large molecules // *Mol. Phys.* Taylor & Francis, 1970. Vol. 18, № 2. P. 145–164.
  413. Schendorf T.M. et al. Combined Effects of pH and Borohydride Reduction on Optical Properties of Humic Substances (HS): A Comparison of Optical Models // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2019. Vol. 53, № 11. P. 6310–6319.
  414. Murphy K.R. et al. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC // *Anal. Methods.* Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 5, № 23. P. 6557–6566.
  415. Chen Y. et al. Time-Resolved Fluorescence Spectra of Untreated and Sodium Borohydride-Reduced Chromophoric Dissolved Organic Matter // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2020. Vol. 54, № 19. P. 12109–12118.
  416. Kubista M. et al. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra // *Analyst.* Royal Society of Chemistry, 1994. Vol. 119, № 3. P. 417–419.
  417. Pucher M. et al. staRdom: Versatile Software for Analyzing Spectroscopic Data of Dissolved Organic Matter in R // *Water.* 2019. Vol. 11, № 11.
  418. Murphy K.R. et al. OpenFluor—an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment // *Anal. Methods.* Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 6, № 3. P. 658–661.
  419. Bianca M.R. et al. Contribution of ketone/aldehyde-containing compounds to the composition and optical properties of Suwannee River fulvic acid revealed by ultrahigh resolution mass spectrometry and deuterium labeling // *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412, № 6. P. 1441–1451.
  420. Perminova I. V et al. The Structural Arrangement and Relative Abundance of Aliphatic Units May Effect Long-Wave Absorbance of Natural Organic Matter as Revealed by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 52, № 21. P. 12526–12537.
  421. Masilamani V. et al. Fluorescence spectra of blood and urine for cervical cancer detection // *J. Biomed. Opt.* 2012. Vol. 17, № 9. P. 98001.
  422. AlSalhi M. et al. Diagnosis of Liver Cancer and Cirrhosis by the Fluorescence Spectra of Blood and Urine // *Technol. Cancer Res. Treat.* SAGE Publications Inc, 2012. Vol. 11, № 4. P. 345–351.

423. Cestaro B. et al. Fluorescence-determined kinetics of plasma high oxidability in diabetic patients // *Biochem. Mol. Biol. Int. Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Milano, Italy.*, 1994. Vol. 32, № 5. P. 983–994.
424. Olar L.E. et al. The fluorescence identification of advanced glycation end products in streptozotocin–induced diabetic rats’ plasma samples // *Bull. UASVM Vet. Med.* 2015. Vol. 72, № 1. P. 106–109.
425. Shirshin E.A. et al. Native fluorescence spectroscopy of blood plasma of rats with experimental diabetes: identifying fingerprints of glucose-related metabolic pathways // *J. Biomed. Opt.* 2015. Vol. 20, № 5. P. 51033.
426. dos Santos R.F. et al. Alzheimer’s disease diagnosis by blood plasma molecular fluorescence spectroscopy (EEM) // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 16199.
427. Shrirao A.B. et al. Autofluorescence of blood and its application in biomedical and clinical research // *Biotechnol. Bioeng. John Wiley & Sons, Ltd*, 2021. Vol. 118, № 12. P. 4550–4576.
428. Wang Y., Zhu J., Chen X. Autofluorescence spectroscopy of blood plasma with multivariate analysis methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis // *Optik (Stuttg)*. 2020. Vol. 224. P. 165446.
429. Lawaetz A.J. et al. Fluorescence spectroscopy as a potential metabonomic tool for early detection of colorectal cancer // *Metabolomics*. 2012. Vol. 8, № 1. P. 111–121.
430. Madhuri S. et al. Ultraviolet fluorescence spectroscopy of blood plasma in the discrimination of cancer from normal // *Proc.SPIE*. 1997. Vol. 2982. P. 41–45.
431. Zalesskaya G.A., Maslova T.O. Fluorescence spectra of blood plasma treated with ultraviolet irradiation in vivo // *J. Appl. Spectrosc.* 2010. Vol. 77, № 4. P. 574–581.
432. Surinova S. et al. Prediction of colorectal cancer diagnosis based on circulating plasma proteins // *EMBO Mol. Med. John Wiley & Sons, Ltd*, 2015. Vol. 7, № 9. P. 1166–1178.
433. McMillan D.E. Plasma protein changes, blood viscosity, and diabetic microangiopathy // *Diabetes*. 1976. Vol. 25, № 2 SUPPL. P. 858–864.
434. Leiner M.J. et al. Fluorescence topography in biology. III: Characteristic deviations of tryptophan fluorescence in sera of patients with gynecological tumors. // *Clin. Chem.* 1986. Vol. 32, № 10. P. 1974–1978.
435. Hubmann M.R., Leiner M.J., Schaur R.J. Ultraviolet fluorescence of human sera: I. Sources of characteristic differences in the ultraviolet fluorescence spectra of sera from normal and cancer-bearing humans // *Clin. Chem.* 1990. Vol. 36, № 11. P. 1880–1883.
436. Bro R. et al. Data fusion in metabolomic cancer diagnostics // *Metabolomics*. 2013. Vol. 9, № 1. P. 3–8.

437. Kang C. et al. Simultaneous determination of aromatic amino acids in different systems using three-way calibration based on the PARAFAC-ALS algorithm coupled with EEM fluorescence: exploration of second-order advantages // *Anal. Methods*. The Royal Society of Chemistry, 2014. Vol. 6, № 16. P. 6358–6368.
438. Trevisan M.G., Poppi R.J. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation–emission matrix fluorescence and multi-way analysis // *Anal. Chim. Acta*. 2003. Vol. 493, № 1. P. 69–81.
439. Soares F., Becker K., Anzanello M.J. A hierarchical classifier based on human blood plasma fluorescence for non-invasive colorectal cancer screening // *Artif. Intell. Med*. 2017. Vol. 82. P. 1–10.
440. Yin B. et al. An effective approach to the early diagnosis of colorectal cancer based on three-dimensional fluorescence spectra of human blood plasma // *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2021. Vol. 193. P. 113757.
441. Shahbazy M. et al. Oblique rotation of factors: a novel pattern recognition strategy to classify fluorescence excitation–emission matrices of human blood plasma for early diagnosis of colorectal cancer // *Mol. Biosyst.* Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 12, № 6. P. 1963–1975.
442. Münch G. et al. Determination of Advanced Glycation End Products in Serum by Fluorescence Spectroscopy and Competitive ELISA. 1997. Vol. 35, № 9. P. 669–678.
443. Doumas B.T., Wu T.-W. The Measurement of Bilirubin Fractions in Serum // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* Taylor & Francis, 1991. Vol. 28, № 5–6. P. 415–445.
444. Domenici V. et al. Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils // *J. Agric. Food Chem.* American Chemical Society, 2014. Vol. 62, № 38. P. 9317–9325.
445. De Ruyck J. et al. Towards the understanding of the absorption spectra of NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> as a common indicator of dehydrogenase enzymatic activity // *Chem. Phys. Lett.* 2007. Vol. 450, № 1. P. 119–122.
446. Plavskii V.Y., Tret'yakova A.I., Mostovnikova G.R. Phototherapeutic systems for the treatment of hyperbilirubinemia of newborns // *J. Opt. Technol.* Optica Publishing Group, 2014. Vol. 81, № 6. P. 341–348.
447. Amiri M., Jankeje K., Albani J.R. Origin of Fluorescence Lifetimes in Human Serum Albumin. Studies on Native and Denatured Protein // *J. Fluoresc.* 2010. Vol. 20, № 3. P. 651–656.
448. Pauca V.P., Piper J., Plemmons R.J. Nonnegative matrix factorization for spectral data analysis // *Linear Algebra Appl.* 2006. Vol. 416, № 1. P. 29–47.

449. Alberts J.J., Takács M., Egeberg P.K. Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC) // *Org. Geochem.* 2002. Vol. 33, № 7. P. 817–828.
450. Vinutha H.P., Poornima B., Sagar B.M. Detection of Outliers Using Interquartile Range Technique from Intrusion Dataset BT - *Information and Decision Sciences* / ed. Satapathy S.C. et al. Singapore: Springer Singapore, 2018. P. 511–518.
451. Breiman L. Random forests // *Mach. Learn.* Springer, 2001. Vol. 45, № 1. P. 5–32.
452. Schaffer C. Selecting a classification method by cross-validation // *Mach. Learn.* 1993. Vol. 13, № 1. P. 135–143.
453. Vergara J.R., Estévez P.A. A review of feature selection methods based on mutual information // *Neural Comput. Appl.* 2014. Vol. 24, № 1. P. 175–186.
454. Sdobnov A.Y. et al. Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 197. P. 216–229.
455. Helmchen F., Denk W. Deep tissue two-photon microscopy // *Nat. Methods.* 2005. Vol. 2, № 12. P. 932–940.
456. Oheim M. et al. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth // *J. Neurosci. Methods.* 2001. Vol. 111, № 1. P. 29–37.
457. So P.T.C. et al. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy // *Annu. Rev. Biomed. Eng. Annual Reviews*, 2000. Vol. 2, № 1. P. 399–429.
458. Oheim M. et al. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006. Vol. 58, № 7. P. 788–808.
459. Shen Y.-R. Principles of nonlinear optics. Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 1984.
460. Campagnola P.J., Loew L.M. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 11. P. 1356–1360.
461. Balu M. et al. Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 1. P. 10508.
462. Kobat D., Horton N.G., Xu C. *In vivo* two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex // *J. Biomed. Opt.* 2011. Vol. 16, № 10. P. 106014.
463. Theer P., Denk W. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy // *J. Opt. Soc. Am. A. Optica Publishing Group*, 2006. Vol. 23, № 12. P. 3139–3149.
464. Digman M.A. et al. The Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging Analysis // *Biophys. J.* 2008. Vol. 94, № 2. P. L14–L16.
465. Le Marois A. et al. Noise-Corrected Principal Component Analysis of fluorescence lifetime imaging data // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 10, № 9. P. 1124–



- 1133.
466. Leray A. et al. Spatio-Temporal Quantification of FRET in Living Cells by Fast Time-Domain FLIM: A Comparative Study of Non-Fitting Methods // PLoS One. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 7. P. e69335.
  467. Huck V. et al. From morphology to biochemical state – intravital multiphoton fluorescence lifetime imaging of inflamed human skin // Sci. Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 22789.
  468. Pouli D. et al. Imaging mitochondrial dynamics in human skin reveals depth-dependent hypoxia and malignant potential for diagnosis // Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 8, № 367. P. 367ra169-367ra169.
  469. Klemp M. et al. Comparison of morphologic criteria for actinic keratosis and squamous cell carcinoma using in vivo multiphoton tomography // Exp. Dermatol. John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 25, № 3. P. 218–222.
  470. Arginelli F. et al. High resolution diagnosis of common nevi by multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging // Ski. Res. Technol. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 19, № 2. P. 194–204.
  471. Newton V.L. et al. Novel approaches to characterize age-related remodelling of the dermal-epidermal junction in 2D, 3D and in vivo // Ski. Res. Technol. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 23, № 2. P. 131–148.
  472. Dimitrow E. et al. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis // Exp. Dermatol. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 18, № 6. P. 509–515.
  473. Yakimov B.P. et al. Pericapillary Edema Assessment by Means of the Nailfold Capillaroscopy and Laser Scanning Microscopy // Diagnostics. 2020. Vol. 10, № 12.
  474. Shirshin E.A. et al. In vivo optical imaging of the viable epidermis around the nailfold capillaries for the assessment of heart failure severity in humans // J. Biophotonics. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 11, № 9. P. e201800066.
  475. Yakimov B.P. et al. Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis [Invited] // Biomed. Opt. Express. Optica Publishing Group, 2019. Vol. 10, № 8. P. 4220–4236.
  476. Kantelhardt S.R. et al. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue // J. Neurooncol. 2016. Vol. 127, № 3. P. 473–482.
  477. Shirshin E.A. et al. Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization // Sci. Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 1171.

478. Cicchi R. et al. From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy // *J. Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 6, № 2. P. 129–142.
479. Sdobnov A. et al. A comparative study of ex vivo skin optical clearing using two-photon microscopy // *J. Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 10, № 9. P. 1115–1123.
480. Wu Y., Qu J.Y. Autofluorescence spectroscopy of epithelial tissues // *J. Biomed. Opt.* 2006. Vol. 11, № 5. P. 54023.
481. Zheng W. et al. Two-photon excited hemoglobin fluorescence // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2011. Vol. 2, № 1. P. 71–79.
482. Saytashev I. et al. Multiphoton excited hemoglobin fluorescence and third harmonic generation for non-invasive microscopy of stored blood // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2016. Vol. 7, № 9. P. 3449–3460.
483. Li D. et al. Two-photon excited hemoglobin fluorescence provides contrast mechanism for label-free imaging of microvasculature in vivo // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 2011. Vol. 36, № 6. P. 834–836.
484. Sun Q. et al. Mechanism of two-photon excited hemoglobin fluorescence emission // *J. Biomed. Opt.* 2015. Vol. 20, № 10. P. 105014.
485. Petrich J.W., Poyart C., Martin J.L. Photophysics and reactivity of heme proteins: a femtosecond absorption study of hemoglobin, myoglobin, and protoheme // *Biochemistry*. American Chemical Society, 1988. Vol. 27, № 11. P. 4049–4060.
486. Tripathy U., Steer R.P. The photophysics of metalloporphyrins excited in their Soret and higher energy UV absorption bands // *J. Porphyr. Phthalocyanines*. World Scientific Publishing Co., 2007. Vol. 11, № 04. P. 228–243.
487. Wu T. et al. In vivo label-free two-photon excitation autofluorescence microscopy of microvasculature using a 520 nm femtosecond fiber laser // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 2020. Vol. 45, № 10. P. 2704–2707.
488. Bukara K. et al. Mapping of hemoglobin in erythrocytes and erythrocyte ghosts using two photon excitation fluorescence microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2017. Vol. 22, № 2. P. 26003.
489. Gerovasili V. et al. Physical Exercise Improves the Peripheral Microcirculation of Patients With Chronic Heart Failure // *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* 2009. Vol. 29, № 6.
490. Struijker-Boudier H.A.J. et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease // *Eur. Heart J.* 2007. Vol. 28, № 23. P. 2834–2840.
491. Ponikowski P. et al. Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency† // *Eur. Heart J.* 2015. Vol. 36, № 11. P. 657–668.

492. von Bierbrauer A. et al. Electron microscopy and capillaroscopically guided nailfold biopsy in connective tissue diseases: detection of ultrastructural changes of the microcirculatory vessels. // *Rheumatology*. 1998. Vol. 37, № 12. P. 1272–1278.
493. Asogwa C.O., Lai D.T.H. A Review on Opportunities To Assess Hydration in Wireless Body Area Networks // *Electronics*. 2017. Vol. 6, № 4.
494. Kaznacheev V.P., Dzizinskii A.A. *Clinical Pathology of Transcapillary Exchange*. Moscow, 1975.
495. Stamatias G.N., Southall M., Kollias N. In Vivo Monitoring of Cutaneous Edema using Spectral Imaging in the Visible and Near Infrared // *J. Invest. Dermatol.* 2006. Vol. 126, № 8. P. 1753–1760.
496. Tuchin V. V. *Optical biomedical diagnostics* // Moscow Izd. Fiz. Lit. 2007. Vol. 1. P. 560.
497. Natalello G. et al. Nailfold capillaroscopy findings in patients with coronavirus disease 2019: Broadening the spectrum of COVID-19 microvascular involvement // *Microvasc. Res.* 2021. Vol. 133. P. 104071.
498. Monticone G. et al. Quantitative nailfold capillary microscopy findings in patients with acrocyanosis compared with patients having systemic sclerosis and control subjects // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000. Vol. 42, № 5, Part 1. P. 787–790.
499. Lambova S., Müller-Ladner U. Capillaroscopic findings in systemic sclerosis—are they associated with disease duration and presence of digital ulcers? // *Discov. Med.* 2011. Vol. 12, № 66. P. 413–418.
500. Kröger M. et al. In vivo non-invasive staining-free visualization of dermal mast cells in healthy, allergy and mastocytosis humans using two-photon fluorescence lifetime imaging // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 14930.
501. Kröger M. et al. Label-free imaging of M1 and M2 macrophage phenotypes in the human dermis in vivo using two-photon excited FLIM // *Elife* / ed. Dustin M.L., Walczak A.M., Dustin M.L. eLife Sciences Publications, Ltd, 2022. Vol. 11. P. e72819.
502. Ranjit S. et al. Imaging Fibrosis and Separating Collagens using Second Harmonic Generation and Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 13378.
503. Monnier V.M. et al. Relation between Complications of Type I Diabetes Mellitus and Collagen-Linked Fluorescence // *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society, 1986. Vol. 314, № 7. P. 403–408.
504. Ghazaryan A.A. et al. Spatial and temporal analysis of skin glycation by the use of multiphoton microscopy and spectroscopy // *J. Dermatol. Sci.* 2012. Vol. 65, № 3. P. 189–195.

505. Kim B.-M. et al. Collagen structure and nonlinear susceptibility: Effects of heat, glycation, and enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2000. Vol. 27, № 4. P. 329–335.
506. Hwang Y.-J., Granelli J., Lyubovitsky J.G. Multiphoton Optical Image Guided Spectroscopy Method for Characterization of Collagen-Based Materials Modified by Glycation // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2011. Vol. 83, № 1. P. 200–206.
507. Junqueira L.C.U., Bignolas G., Brentani R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections // *Histochem. J.* 1979. Vol. 11, № 4. P. 447–455.
508. Katsuda S. et al. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. // *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.* American Heart Association, 1992. Vol. 12, № 4. P. 494–502.
509. Bachmann B. et al. Stiffness Matters: Fine-Tuned Hydrogel Elasticity Alters Chondrogenic Redifferentiation // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* . 2020. Vol. 8.
510. Marcu L. et al. Characterization of type I, II, III, IV, and V collagens by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy // *Proc.SPIE.* 2000. Vol. 3917. P. 93–101.
511. Koehler M.J. et al. Non-invasive evaluation of dermal elastosis by in vivo multiphoton tomography with autofluorescence lifetime measurements // *Exp. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 21, № 1. P. 48–51.
512. Dowling K. et al. Fluorescence lifetime imaging with picosecond resolution for biomedical applications // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 1998. Vol. 23, № 10. P. 810–812.
513. Phipps J.E. et al. Fluorescence lifetime imaging for the characterization of the biochemical composition of atherosclerotic plaques // *J. Biomed. Opt.* 2011. Vol. 16, № 9. P. 96018.
514. Koehler M.J. et al. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 2006. Vol. 31, № 19. P. 2879–2881.
515. Lin S.-J. et al. Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 2005. Vol. 30, № 17. P. 2275–2277.
516. Omelyanenko N.P., Slutsky L.I., Mironov S.P. *Connective tissue: histophysiology, biochemistry, molecular biology.* CRC Press, 2016.
517. Ehrlich H.P. *The Role of the Connective Tissue Matrix in Wound Healing: Fibroblast and Collagen Interactions* BT - *Wound Healing and Skin Physiology* / ed. Altmeyer P. et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. P. 89–104.
518. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies // *Am. J. Physiol. Physiol.* American

- Physiological Society, 2007. Vol. 292, № 2. P. C615–C640.
519. Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD // *Antioxid. Redox Signal.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2017. Vol. 30, № 6. P. 875–889.
520. Blacker T.S., Duchen M.R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. Vol. 100. P. 53–65.
521. Ширшин Е.А. et al. Многофотонная микроскопия с эндогенным контрастом: природа флуорофоров и возможности в исследовании биохимических процессов // *Успехи биологической химии.* 2019.
522. Jabbour J.M. et al. Fluorescence lifetime imaging and reflectance confocal microscopy for multiscale imaging of oral precancer // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 4. P. 46012.
523. Bird D.K. et al. Metabolic Mapping of MCF10A Human Breast Cells via Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of the Coenzyme NADH // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, № 19. P. 8766–8773.
524. McGinty J. et al. Wide-field fluorescence lifetime imaging of cancer // *Biomed. Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2010. Vol. 1, № 2. P. 627–640.
525. Cong A. et al. Two-photon fluorescence lifetime imaging of intrinsic NADH in three-dimensional tumor models // *Cytom. Part A.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 95, № 1. P. 80–92.
526. Shirmanova M. V et al. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 8911.
527. Lukina M.M. et al. Interrogation of tumor metabolism in tissue samples ex vivo using fluorescence lifetime imaging of NAD(P)H // *Methods Appl. Fluoresc.* IOP Publishing, 2020. Vol. 8, № 1. P. 14002.
528. Sharick J.T. et al. Cellular Metabolic Heterogeneity In Vivo Is Recapitulated in Tumor Organoids // *Neoplasia.* 2019. Vol. 21, № 6. P. 615–626.
529. Heaster T.M., Landman B.A., Skala M.C. Quantitative Spatial Analysis of Metabolic Heterogeneity Across in vivo and in vitro Tumor Models // *Frontiers in Oncology* . 2019. Vol. 9.
530. Walsh A.J. et al. Quantitative Optical Imaging of Primary Tumor Organoid Metabolism Predicts Drug Response in Breast Cancer // *Cancer Res.* 2014. Vol. 74, № 18. P. 5184–5194.
531. Chacko J. V, Eliceiri K.W. Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity // *Cytom.*

- Part A. John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 95, № 1. P. 56–69.
532. Shirshin E.A. et al. Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: The quest for metabolic heterogeneity // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022. Vol. 119, № 9. P. e2118241119.
533. Wang J. et al. The Bimodality Index: A criterion for Discovering and Ranking Bimodal Signatures from Cancer Gene Expression Profiling Data // *Cancer Inform. SAGE Publications Ltd STM*, 2009. Vol. 7. P. CIN.S2846.
534. Obeidy P., Tong P.L., Weninger W. Research Techniques Made Simple: Two-Photon Intravital Imaging of the Skin // *J. Invest. Dermatol.* 2018. Vol. 138, № 4. P. 720–725.
535. Лукина М.М. et al. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор) // *Современные технологии в медицине. ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства ...*, 2016. Vol. 8, № 4. P. 113–128.
536. Elhelu M.A. The role of macrophages in immunology // *J. Natl. Med. Assoc. National Medical Association*, 1983. Vol. 75, № 3. P. 314.
537. Geissmann F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells // *Science (80-. )*. American Association for the Advancement of Science, 2010. Vol. 327, № 5966. P. 656–661.
538. Weber-Matthiesen K., Sterry W. Organization of the Monocyte/Macrophage System of Normal Human Skin // *J. Invest. Dermatol.* 1990. Vol. 95, № 1. P. 83–89.
539. Mendoza-Coronel E., Ortega E. Macrophage Polarization Modulates FcγR- and CD13-Mediated Phagocytosis and Reactive Oxygen Species Production, Independently of Receptor Membrane Expression // *Frontiers in Immunology* . 2017. Vol. 8.
540. Alfonso-García A. et al. Label-free identification of macrophage phenotype by fluorescence lifetime imaging microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2016. Vol. 21, № 4. P. 46005.
541. Smokelin I.S. et al. Optical changes in THP-1 macrophage metabolism in response to pro- and anti-inflammatory stimuli reported by label-free two-photon imaging // *J. Biomed. Opt.* 2020. Vol. 25, № 1. P. 14512.
542. Li Y. et al. Imaging of macrophage mitochondria dynamics in vivo reveals cellular activation phenotype for diagnosis // *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 2020. Vol. 10, № 7. P. 2897.
543. Szulczewski J.M. et al. In Vivo Visualization of Stromal Macrophages via label-free FLIM-based metabolite imaging // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 25086.
544. Heaster T.M. et al. Intravital Metabolic Autofluorescence Imaging Captures Macrophage Heterogeneity Across Normal and Cancerous Tissue // *Frontiers in Bioengineering and*

- Biotechnology . 2021. Vol. 9.
545. Lee D.-H. et al. Rapid and label-free identification of single leukemia cells from blood in a high-density microfluidic trapping array by fluorescence lifetime imaging microscopy // *Lab Chip*. The Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 18, № 9. P. 1349–1358.
  546. Dupasquier M. et al. Macrophages and Dendritic Cells Constitute a Major Subpopulation of Cells in the Mouse Dermis // *J. Invest. Dermatol.* 2004. Vol. 123, № 5. P. 876–879.
  547. Morellini N. et al. Dermal nerve fibre and mast cell density, and proximity of mast cells to nerve fibres in the skin of patients with complex regional pain syndrome // *Pain*. 2018. Vol. 159, № 10.
  548. Tikoo S. et al. Imaging of mast cells // *Immunol. Rev.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 282, № 1. P. 58–72.
  549. Combs J.W., Lagunoff D., Benditt E.P. DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION OF EMBRYONIC MAST CELLS OF THE RAT // *J. Cell Biol.* 1965. Vol. 25, № 3. P. 577–592.
  550. Nguyen M., Pace A.J., Koller B.H. Age-Induced Reprogramming of Mast Cell Degranulation1 // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175, № 9. P. 5701–5707.
  551. Yakimov B.P. et al. Oxidation of Individual Aromatic Species Gives Rise to Humic-like Optical Properties // *Environ. Sci. Technol. Lett.* American Chemical Society, 2022. Vol. 9, № 5. P. 452–458.
  552. Solórzano C.C. et al. Detecting the Near Infrared Autofluorescence of the Human Parathyroid: Hype or Opportunity? // *Ann. Surg.* 2020. Vol. 272, № 6.
  553. Abran M. et al. Validating a bimodal intravascular ultrasound (IVUS) and near-infrared fluorescence (NIRF) catheter for atherosclerotic plaque detection in rabbits // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2015. Vol. 6, № 10. P. 3989–3999.
  554. M.D. M.A.C. et al. Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15, № 1. P. 11107.
  555. Lifante J. et al. The near-infrared autofluorescence fingerprint of the brain // *J. Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 13, № 11. P. e202000154.
  556. Lifante J. et al. In vivo grading of lipids in fatty liver by near-infrared autofluorescence and reflectance // *J. Biophotonics*. John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. n/a, № n/a. P. e202200208.
  557. Saif M. et al. Non-invasive monitoring of chronic liver disease via near-infrared and shortwave-infrared imaging of endogenous lipofuscin // *Nat. Biomed. Eng.* 2020. Vol. 4, № 8. P. 801–813.

558. Lifante J. et al. The role of tissue fluorescence in in vivo optical bioimaging // *J. Appl. Phys.* American Institute of Physics, 2020. Vol. 128, № 17. P. 171101.
559. Huang Z. et al. Raman Spectroscopy in Combination with Background Near-infrared Autofluorescence Enhances the In Vivo Assessment of Malignant Tissues // *Photochem. Photobiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 81, № 5. P. 1219–1226.
560. Demos S.G. et al. Near-infrared autofluorescence imaging for detection of cancer // *J. Biomed. Opt.* 2004. Vol. 9, № 3. P. 587–592.
561. Ladurner R. et al. Near-infrared autofluorescence imaging to detect parathyroid glands in thyroid surgery // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* The Royal College of Surgeons of England, 2017. Vol. 100, № 1. P. 33–36.
562. Di Marco A.N., Palazzo F.F. Near-infrared autofluorescence in thyroid and parathyroid surgery // *Gland Surgery*; Vol 9, Suppl. 2 (February 2020) *Gland Surg.* (Novel Technol. Endocr. Surgery). 2020.
563. Vienola K. V et al. Microstructure of the retinal pigment epithelium near-infrared autofluorescence in healthy young eyes and in patients with AMD // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 9561.
564. Simon J.D. et al. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function // *Pigment Cell Melanoma Res.* John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 22, № 5. P. 563–579.
565. Zonios G. et al. Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 1. P. 14017.
566. Galvão D.S., Caldas M.J. Polymerization of 5,6-indolequinone: A view into the band structure of melanins // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics, 1988. Vol. 88, № 6. P. 4088–4091.
567. Ju K.-Y. et al. Unraveling the molecular nature of melanin changes in metastatic cancer // *J. Biomed. Opt.* 2019. Vol. 24, № 5. P. 51414.
568. Ju K.-Y., Fischer M.C., Warren W.S. Understanding the Role of Aggregation in the Broad Absorption Bands of Eumelanin // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2018. Vol. 12, № 12. P. 12050–12061.
569. Thompson A. et al. Dual-wavelength pump-probe microscopy analysis of melanin composition // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 36871.
570. Kostetskyi A.O. et al. Time-resolved photoluminescence study of excited states in nanostructured melanin // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 697, № 1. P. 31–48.
571. Grieco C. et al. Probing the heterogeneous structure of eumelanin using ultrafast vibrational



- fingerprinting // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 4569.
572. Schadendorf D. et al. Melanoma // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2015. Vol. 1, № 1. P. 15003.
573. Teuchner K. et al. Fluorescence Studies of Melanin by Stepwise Two-Photon Femtosecond Laser Excitation // *J. Fluoresc.* 2000. Vol. 10, № 3. P. 275.
574. Teuchner K. et al. Femtosecond Two-photon Excited Fluorescence of Melanin // *Photochem. Photobiol.* John Wiley & Sons, Ltd, 1999. Vol. 70, № 2. P. 146–151.
575. Leupold D. et al. The stepwise two-photon excited melanin fluorescence is a unique diagnostic tool for the detection of malignant transformation in melanocytes // *Pigment Cell Melanoma Res.* John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 24, № 3. P. 438–445.
576. Ferrari A.C., Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon // *Phys. Rev. B.* American Physical Society, 2000. Vol. 61, № 20. P. 14095–14107.
577. Slominski A. et al. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation // *Physiol. Rev.* American Physiological Society, 2004. Vol. 84, № 4. P. 1155–1228.
578. Murase D. et al. Autophagy Has a Significant Role in Determining Skin Color by Regulating Melanosome Degradation in Keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.* 2013. Vol. 133, № 10. P. 2416–2424.
579. Joly-Tonetti N. et al. Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically // *Exp. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 25, № 7. P. 501–504.
580. d’Ischia M. et al. Melanin ‘dust’ or ‘ghost’? // *Exp. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 25, № 7. P. 505–506.
581. Saha A. et al. Raman microspectroscopy of melanosomes: the effect of long term light irradiation // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 4, № 11–12. P. 805–813.
582. Kim Y.J. et al. Biologically derived melanin electrodes in aqueous sodium-ion energy storage devices // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. Vol. 110, № 52. P. 20912–20917.
583. Galván I. et al. Vibrational characterization of pheomelanin and trichochrome F by Raman spectroscopy // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. Vol. 110. P. 55–59.
584. M.D. M.E.D. et al. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 6. P. 61230.
585. Choe C. et al. Modified normalization method in in vivo stratum corneum analysis using confocal Raman microscopy to compensate nonhomogeneous distribution of keratin // *J. Raman Spectrosc.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 50, № 7. P. 945–957.
586. Zhang Z.-M., Chen S., Liang Y.-Z. Baseline correction using adaptive iteratively

- reweighted penalized least squares // *Analyst*. The Royal Society of Chemistry, 2010. Vol. 135, № 5. P. 1138–1146.
587. Brandt N.N. et al. Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Subtraction // *Appl. Spectrosc.* Optica Publishing Group, 2006. Vol. 60, № 3. P. 288–293.
588. Wang T., Dai L. Background Subtraction of Raman Spectra Based on Iterative Polynomial Smoothing // *Appl. Spectrosc.* Optica Publishing Group, 2017. Vol. 71, № 6. P. 1169–1179.
589. Sdobnov A.Y. et al. Methods for Optical Skin Clearing in Molecular Optical Imaging in Dermatology // *Biochem.* 2019. Vol. 84, № 1. P. 144–158.
590. Galván I., Jorge A. Dispersive Raman spectroscopy allows the identification and quantification of melanin types // *Ecol. Evol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 5, № 7. P. 1425–1431.
591. Zhao J. et al. Using Raman spectroscopy to detect and diagnose skin cancer in vivo // *Dermatol. Clin.* Elsevier, 2017. Vol. 35, № 4. P. 495–504.
592. Lui H. et al. Real-time Raman Spectroscopy for In Vivo Skin Cancer Diagnosis // *Cancer Res.* 2012. Vol. 72, № 10. P. 2491–2500.
593. Förster M. et al. Ingredients Tracking of Cosmetic Formulations in the Skin: A Confocal Raman Microscopy Investigation // *Pharm. Res.* 2011. Vol. 28, № 4. P. 858–872.
594. Stella A. et al. Raman mapping coupled to self-modelling MCR-ALS analysis to estimate active cosmetic ingredient penetration profile in skin // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 13, № 11. P. e202000136.
595. Caspers P.J. et al. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles // *J. Invest. Dermatol.* 2001. Vol. 116, № 3. P. 434–442.
596. Lademann J. et al. In vivo Raman spectroscopy detects increased epidermal antioxidative potential with topically applied carotenoids // *Laser Phys. Lett.* John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 6, № 1. P. 76–79.
597. Berjot M., Marx J., Alix A.J.P. Determination of the secondary structure of proteins from the Raman amide I band: The reference intensity profiles method // *J. Raman Spectrosc.* John Wiley & Sons, Ltd, 1987. Vol. 18, № 4. P. 289–300.
598. Nguyen T.T. et al. Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration // *J. Raman Spectrosc.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 44, № 9. P. 1230–1237.
599. Bakker Schut T.C. et al. Discriminating Basal Cell Carcinoma from its Surrounding Tissue by Raman Spectroscopy // *J. Invest. Dermatol.* 2002. Vol. 119, № 1. P. 64–69.
600. Bodanese B. et al. Discrimination of Basal Cell Carcinoma and Melanoma from Normal

- Skin Biopsies in Vitro Through Raman Spectroscopy and Principal Component Analysis // *Photomed. Laser Surg.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2012. Vol. 30, № 7. P. 381–387.
601. Zhang L. et al. MCR Approach Revealing Protein, Water, and Lipid Depth Profile in Atopic Dermatitis Patients' Stratum Corneum via in Vivo Confocal Raman Spectroscopy // *Anal. Chem.* American Chemical Society, 2019. Vol. 91, № 4. P. 2784–2790.
  602. Choe C., Lademann J., Darvin M.E. Analysis of Human and Porcine Skin in vivo/ex vivo for Penetration of Selected Oils by Confocal Raman Microscopy // *Skin Pharmacol. Physiol.* 2015. Vol. 28, № 6. P. 318–330.
  603. Darvin M.E. et al. Non-invasive depth profiling of the stratum corneum in vivo using confocal Raman microscopy considering the non-homogeneous distribution of keratin // *Biomed. Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2019. Vol. 10, № 6. P. 3092–3103.
  604. Hata T.R. et al. Non-Invasive Raman Spectroscopic Detection of Carotenoids in Human Skin // *J. Invest. Dermatol.* 2000. Vol. 115, № 3. P. 441–448.
  605. Darvin M.E. et al. In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods // *Exp. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 18, № 12. P. 1060–1063.
  606. Lademann J. et al. Carotenoids in human skin // *Exp. Dermatol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2011. Vol. 20, № 5. P. 377–382.
  607. Skieresz-Szewczyk K. et al. Localization of Alpha-Keratin and Beta-Keratin (Corneous Beta Protein) in the Epithelium on the Ventral Surface of the Lingual Apex and Its Lingual Nail in the Domestic Goose (*Anser Anser f. domestica*) by Using Immunohistochemistry and Raman Microspectros // *Anat. Rec.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 300, № 8. P. 1361–1368.
  608. Paquin R., Colomban P. Nanomechanics of single keratin fibres: A Raman study of the  $\alpha$ -helix  $\rightarrow$   $\beta$ -sheet transition and the effect of water // *J. Raman Spectrosc.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 38, № 5. P. 504–514.
  609. Colomban P. et al. Nanomechanics of single silkworm and spider fibres: a Raman and micro-mechanical in situ study of the conformation change with stress // *J. Raman Spectrosc.* John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 39, № 12. P. 1749–1764.
  610. Caspers P.J. et al. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin // *Biospectroscopy.* John Wiley & Sons, Ltd, 1998. Vol. 4, № S5. P. S31–S39.
  611. Janko M. et al. Anisotropic Raman scattering in collagen bundles // *Opt. Lett.* Optica Publishing Group, 2010. Vol. 35, № 16. P. 2765–2767.
  612. Guo X. et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity // *J. Food Sci. Technol.* 2014. Vol. 51, № 12. P.

- 3680–3690.
613. Donnelly J., Vesga Y., Hernandez F.E. Enhanced two-photon absorption and fluorescence upconversion in Thioflavin T micelle-type aggregates in glycerol/water solution // *Chem. Phys.* 2016. Vol. 477. P. 19–23.
  614. Nettels D. et al. Excited-state annihilation reduces power dependence of single-molecule FRET experiments // *Phys. Chem. Chem. Phys.* The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 17, № 48. P. 32304–32315.
  615. Budylin G. et al. Laser-induced fluorescence of uranyl complexes in aqueous solutions: the role of diffusion-controlled excited states annihilation // *Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2013. Vol. 21, № 18. P. 20517–20528.
  616. Khattab I.S. et al. Density, viscosity, surface tension, and molar volume of propylene glycol+water mixtures from 293 to 323K and correlations by the Jouyban–Acree model // *Arab. J. Chem.* 2017. Vol. 10. P. S71–S75.
  617. Hoang N.A. et al. Differential capability of metabolic substrates to promote hepatocellular lipid accumulation // *Eur. J. Nutr.* 2019. Vol. 58, № 8. P. 3023–3034.
  618. Xu C., Zipfel W.R. Multiphoton excitation of fluorescent probes // *Cold Spring Harb. Protoc.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Vol. 2015, № 3. P. pdb-top086116.
  619. Xu C., Webb W.W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm // *J. Opt. Soc. Am. B.* Optica Publishing Group, 1996. Vol. 13, № 3. P. 481–491.
  620. Pawlicki M. et al. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes // *Angew. Chemie Int. Ed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 48, № 18. P. 3244–3266.
  621. Olesiak-Banska J. et al. Two-photon absorption and photoluminescence of colloidal gold nanoparticles and nanoclusters // *Chem. Soc. Rev.* The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 48, № 15. P. 4087–4117.
  622. Li K. et al. Folic acid-functionalized two-photon absorbing nanoparticles for targeted MCF-7 cancer cell imaging // *Chem. Commun.* The Royal Society of Chemistry, 2011. Vol. 47, № 26. P. 7323–7325.