

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



На правах рукописи

Ширшин Евгений Александрович

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

Специальность:

1.3.6. Оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора физико-математических наук

МОСКВА – 2023

Работа выполнена на кафедре квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный консультант: **Фадеев Виктор Владимирович**,
доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Тучин Валерий Викторович**,
доктор физико-математических наук, профессор,
член-корреспондент РАН,
заведующий кафедрой оптики и биофотоники Института физики Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского

Шкуринов Александр Павлович,
доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН,
профессор кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Дунаев Андрей Валерьевич,
доктор технических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник Научно-технологического центра биомедицинской фотоники, профессор кафедры приборостроения, метрологии и сертификации Института приборостроения, автоматизации и информационных технологий Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева

Защита диссертации состоится «19» октября 2023 года в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.013.6 на физическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, физическая аудитория имени Р.В. Хохлова.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27) и в сети Интернет: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/013.6/2596>

Автореферат разослан «___» июля 2023 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.013.6,
доктор физико-математических наук, доцент
kosareva@physics.msu.ru



О.Г. Косарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 фс÷100 пс (метод ап-конверсии флуоресценции) и 100 пс÷50 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 нс 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 ~ 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 РНФ (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.

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.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, поставлена цель и сформулированы задачи работы, определен объект и предмет исследования, описана методология диссертационного исследования, указана его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту, оценена степень достоверности результатов и личный вклад автора.

Первая глава посвящена обзору литературы по теме диссертационной работы. Рассмотрены методы оптической диагностики, основанные на использовании сигнала эндогенных молекул. На примере конкретных эндогенных хромофоров продемонстрированы возможности применения методов биофотоники для неинвазивной диагностики физиологических параметров организма человека и интраоперационной диагностики [A1]. Рассмотрены основные эндогенные флуорофоры, механизмы формирования их спектральных свойств и кинетики релаксации возбужденного состояния [A2]. Проанализировано влияние микроокружения и изменения структуры эндогенных флуорофоров на их фотофизические параметры. Рассмотрены некоторые дискуссионные вопросы, в частности вопрос о формировании эндогенной флуоресценции (ЭФ) клеток и тканей в ближней ИК области спектры и вопрос о роли гетерогенных систем флуорофоров в формировании ЭФ.

В Главе 2 «Эндогенная УФ флуоресценция белковых макромолекул» рассмотрены три вопроса. Во-первых, предложен оригинальный алгоритм определения параметров межмолекулярного взаимодействия в системе с использованием флуоресценции триптофановых остатков (Trp) белков. Во-вторых, продемонстрированы возможности использования параметров тирозиновой (Tyr) флуоресценции белков для отслеживания их конформационных изменений.

Одной из областей применения собственной флуоресценции белков и пептидов является определение параметров межмолекулярного взаимодействия. При этом используется подход, основанный на анализе тушения флуоресценции белков лигандом, позволяющий получить оценку константы комплексообразования K_A в системе. Для определения числа сайтов связывания n используется модифицированное уравнение Штерна-Фольмера:

$$\log \log \frac{F_0 - F([L]_T)}{F([L]_T)} = \log K_A + n \log \log [L]_T, \quad (1)$$

где $[L]_T$ – полная концентрация лиганда, F_0 , $F([L]_T)$ – интенсивность флуоресценции белка в отсутствие лиганда и при концентрации лиганда $[L]_T$. С использованием моделирования комплексообразования в системах с различными наборами параметров (n , K_A), а также экспериментально на примере взаимодействия белков с ионами тяжелых металлов было показано, что использование уравнения (1) часто дает некорректную оценку числа сайтов связывания [A3]. В связи с этим был изучен вопрос о том, какие параметры межмолекулярного взаимодействия могут быть определены путем анализа зависимости флуоресценции белков от концентрации лиганда [A4]. Предложен алгоритм, позволяющий классифицировать системы на три группы: (1) $n = 1$, квантовый выход флуоресценции белка при связывании лиганда равен $\eta = 0$, (2) $n = 1$, $\eta > 0$, (3) $n > 1$. Показано, что для систем с высоким значением K_A ($>10^6 \text{ M}^{-1}$), представляющих интерес для биохимии и

фармакологии, алгоритм успешно (с точностью >95%) классифицировал все три случая, тогда как для систем с низким K_A ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}$) точность классификации составляла >85%.

Второй решавшейся в Главе 2 задачей являлось расширение возможностей использования собственной флуоресценции белков в исследовании их конформационных изменений путем анализа параметров тирозиновой (Tyr) флуоресценции [A5–A6]. Квантовый выход флуоресценции Tyr 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 Tyr и Trp) и 295 нм (возбуждается только флуоресценция Trp). Проведен сравнительный анализ возможностей исследования конформационных изменений белков с помощью флуоресцентной спектроскопии Tyr и Trp на примере альбуминов. В качестве модели рассматривались сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА), в структуре которых присутствуют 1 и 2 остатка Trp и 18 и 20 остатков Tyr, соответственно. Путем воздействия на альбумин денатурирующими агентами подтверждена гипотеза о том, что за счет более равномерного распределения тирозиновых остатков по структуре белка интенсивность и время жизни флуоресценции Tyr могут служить индикаторами конформационных изменений, не затрагивающих окружение Trp.

В Главе 3 рассматривается эффект возникновения эндогенной флуоресценции в видимой области спектра у белков и пептидов (видимая ЭФ белков, ВЭФБ), механизм формирования которой является дискуссионным. ВЭФБ представляет интерес в связи с возможностью ее использования для диагностических целей – визуализации белков и их агрегатов, исследования кинетики агрегации белков.

В первой части Главы 3 показано, что использование экзогенных флуоресцентных меток для анализа взаимодействия белков и пептидов может

влиять на кинетику процесса агрегации и свойства образующихся структур [A7-A8]. Для этого было изучено влияние флуоресцентного красителя тиофлавина Т (ThT), широко используемого для изучения процесса агрегации белков, на самосборку дипептида Fmoc-FF (флуоренилметоксикарбонил дифенилаланина).

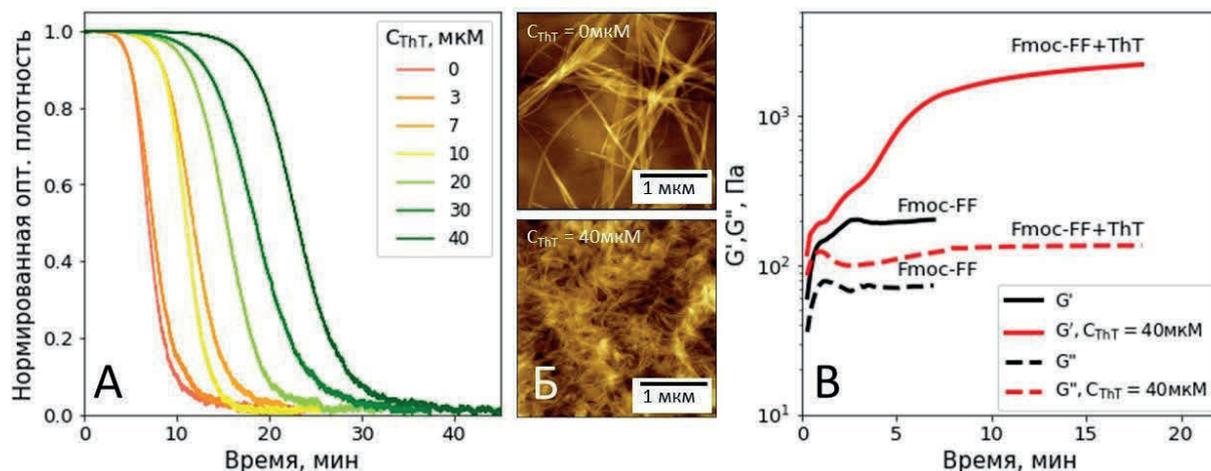


Рисунок 1. А) Нормированная кинетика изменения оптической плотности на длине волны 500 нм для суспензии пептида Fmoc-FF, измеренная при различных концентрациях ThT (0÷40 мкМ), $C_{\text{Fmoc-FF}} = 1.87 \text{ мМ}$ (1 мг/мл). Б) АСМ-изображения гидрогеля Fmoc-FF, образованного в отсутствие ThT (сверху) в присутствии 40 мкМ ThT (снизу). В) Кинетика изменения модуля упругости (G' , сплошная кривая) и модуля потерь (G'' , пунктирная кривая) для гидрогеля Fmoc-FF в отсутствие (черный) и в присутствии (40 мкМ, красный) ThT.

Показано, что кинетика самосборки Fmoc-FF замедляется с ростом концентрации ThT (рис. 1А). Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что присутствие ThT делает волокна в гидрогеле тоньше, короче и увеличивает их плотность (рис. 1Б). Также для оценки влияния ThT на механические свойства гидрогеля Fmoc-FF были проведены реологические измерения. Зависимость модуля упругости G' и модуля потерь G'' от времени гелеобразования представлена на рис. 1В. Обнаружено, что присутствие ThT приводит к десятикратному увеличению модуля упругости гидрогеля. Механизм влияния ThT на самосборку пептидов Fmoc-FF был интерпретирован в рамках двухэтапной модели нуклеации, предполагающей

существование метастабильных состояний на пути гелеобразования. Таким образом, использование экзогенных меток может влиять на сам процесс агрегации белков и пептидов, чем обусловлен интерес к исследованию ВЭФБ.

Возможность визуализации агрегатов с использованием ВЭФБ *in vitro* в живых клетках была продемонстрирована на метаболических амилоидах – фибриллярных агрегатах, образующихся при самосборке метаболитов, в частности аминокислоты фенилаланина (Phe) [A9-A10].

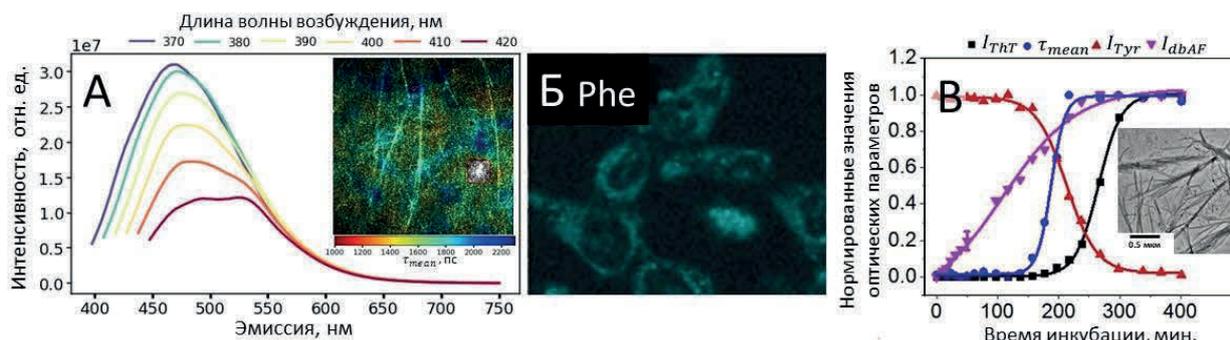


Рисунок 2. А) Спектры флуоресценции агрегатов Phe для длин волн возбуждения 370÷420 нм. На вставке – визуализация фибрилл, образованных в результате агрегации Phe, методом FLIM с использованием сигнала ЭФ ($\lambda_{\text{возб}} = 700$ нм, двухфотонное возбуждение). Б) Конфокальная микроскопия живых клеток при взаимодействии их с фибриллярными агрегатами Phe ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм). В) Изменение оптических свойств раствора инсулина в процессе его агрегации. Черные квадраты – интенсивность флуоресценции ThT; пурпурные треугольники – ВЭФБ ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 420$ нм). На вставке – изображение агрегатов инсулина, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии.

Визуализация агрегатов Phe с использованием сигнала ВЭФБ и метода FLIM представлена на рис. 2А. Сигнал ВЭФБ был далее использован в работе [A11] для визуализации метаболических амилоидов клетках нейробластомы (SH-SY5Y), в течение 5 часов инкубировавшихся с агрегатами Phe. Предложенный метод визуализации может быть использован для исследования самосборки амилоидов и ее ингибирования *in vitro*.

Далее в рамках работы продемонстрирована возможность использования ВЭФБ для изучения кинетики агрегации белков *in vitro* (рис. 2В) [A12]. С

помощью метода масс-спектрометрии показано, что сигнал ВЭФБ может быть связан с возникновением химических модификаций белков, например, в результате процессов окисления, что было дополнительно проверено на других модельных системах *in vitro* [A13-A14].

После экспериментов на модельных системах (растворах пептидов, аминокислот, белков и ДНК), демонстрирующих возникновение флуоресценции с возбуждением в диапазоне 350-650 нм в результате процессов окисления, были проведены эксперименты по исследованию ЭФ клеток (клеточная линия HaCaT), в которых индуцировался окислительный стресс путем УФ-облучения и воздействия перекисью водорода [A14]. При этом методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии было продемонстрировано увеличение сигнала ЭФ клеток в широком диапазоне длин волн возбуждения (405 нм, 488 нм, 640 нм). В результате была сформулирована гипотеза о роли процессов окисления биомолекул в формировании оптических свойств живых систем в видимой и ближней ИК областях спектра.

Развитию полученных результатов посвящена **Глава 4**, в которой исследуется формирование оптических свойств гетерогенных систем флуорофоров (ГСФ), образующихся в результате окисления и других химических модификаций биомолекул на примере двух принципиально разных моделей. Первая модель реализует подход «снизу вверх» (bottom-up) [A15], когда путем воздействия на молекулы одного типа, в данном случае, растворы триптофана (Trp) и дигидроксibenзойной кислоты (ДГБ), генерируется ГСФ. Вторая модель 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 [A16-17].

В результате УФ-облучения (длина волны 254 нм, интенсивность 10 мВт/см²)

и озонирования растворов Трп и ДГБ имело место значительное изменение их оптических свойств. Во-первых, наблюдалось появление поглощения в видимой области спектра (рис. 3А), которое можно параметризовать функцией вида

$$A = A_0 \exp(-S\lambda). \quad (2)$$

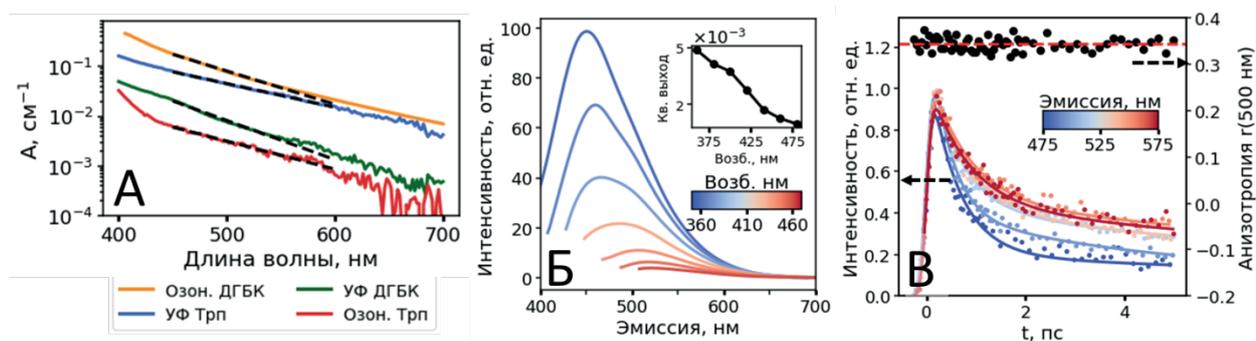


Рисунок 3. А) Спектры поглощения растворов Трп и ДГБ после воздействия (УФ-облучения и озонирования). Б) Спектры флуоресценции раствора УФ-облученного Трп на длинах волн возбуждения в диапазоне 350-470 нм. На вставке – зависимость квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения В) Кривые затухания флуоресценции, полученные с временным разрешением 200 фс в диапазоне длин волн эмиссии 480–580 нм при возбуждении на длине волны $\lambda_{\text{возб}} = 390$ нм для УФ-облученного раствора Трп. Чёрными точками показана кинетика анизотропии флуоресценции на длине волны эмиссии 500 нм.

Появлению поглощения в видимой области спектра сопутствовало возникновение сигнала флуоресценции (рис. 3Б), положение максимума которого сдвигалось в длинноволновую область, а квантовый выход флуоресценции уменьшался с ростом длины волны возбуждения. При этом проведенный масс-спектрометрический анализ показывал рост числа уникальных соединений в системе до нескольких сотен с длительностью времени воздействия.

Для того, чтобы исследовать электронное взаимодействие в ГСФ, были проведены эксперименты с использованием время-разрешенной флуориметрии в диапазоне времен 200 фс÷100 пс (метод ап-конверсии

флуоресценции) и $100 \text{ ps} \div 50 \text{ ns}$ (метод время-коррелированного счета единичных фотонов). Зависимость среднего времени жизни флуоресценции ГСФ, определенного из кривых, измеренных с субнаносекундным временным разрешением, от длины волны эмиссии являлась немонотонной, время жизни флуоресценции уменьшалось с длиной волны эмиссии в диапазоне 450-600 нм.

Измерения параметров затухания флуоресценции ГСФ, выполненные с субпикосекундным временным разрешением, показали принципиально другую картину кинетики релаксации возбуждения (рис. 3В). В кинетике затухания флуоресценции исследованных ГСФ на всех длинах волн эмиссии присутствовала сверхбыстрая компонента с характерным временем $\sim 1 \text{ ps}$, амплитуда которой уменьшалась с длиной волны эмиссии. В литературе имеют место две основных гипотезы о механизмах формирования оптических свойств ГСФ: гипотеза «суперпозиции», которая предполагает, что наблюдаемые спектры являются наложением спектров от различных компонент системы, и гипотеза «взаимодействия», в рамках которой единообразие спектральных свойств ГСФ считается следствием электронного взаимодействия молекул в их составе, в частности, переноса энергии между флуорофорами.

Для проверки гипотезы о том, что сверхбыстрая компонента в кинетике затухания флуоресценции ГСФ соответствует переносу энергии между флуорофорами в ее составе, были проведены следующие эксперименты. Во-первых, было исследовано влияние фракционирования ГСФ по размеру на их оптические свойства. Удаление частиц-агрегатов молекул, в которых возможно взаимодействие между близко ($< 1 \text{ nm}$) расположенными флуорофорами, должно приводить к исчезновению сверхбыстрой компоненты в кинетике затухания флуоресценции в случае, если она определяется переносом энергии. При этом после выделения молекулярной фракции массой $< 1 \text{ kDa}$ в кинетике релаксации возбуждения ГСФ также наблюдается сверхбыстрая компонента, то есть, наличие агрегатов в ГСФ не является

необходимым для формирования их оптических свойств.

Во-вторых, было показано, что параметры кинетики затухания флуоресценции на пикосекундном временном масштабе зависят от свойств растворителя: при уменьшении полярности уменьшается амплитуда и растет время релаксации сверхбыстрой компоненты, что свидетельствует о существенной роли влияния релаксации растворителя на наблюдаемые оптические свойства ГСФ.

В-третьих, анизотропия флуоресценции ГСФ оставалась неизменной на временном диапазоне 0–100 пс, соответственно, пикосекундная компонента, наблюдаемая в кинетике релаксации флуоресценции ГСФ, не связана с некогерентным переносом возбуждения в них (рис. 3В).

Следующим шагом являлось исследование оптических свойств ГСФ, полученных в рамках подхода «сверху вниз» на примере природного органического вещества (ПОВ) [A16-17]. К ПОВ относят гетерогенные молекулярные системы, образующиеся в результате процесса биodeградации биомассы. Для анализа оптических свойств ПОВ была подобрана выборка образцов природных органических веществ, значительно отличающихся своим источником (природные воды, торф, почва, уголь) и молекулярным составом.

Все исследованные ПОВ демонстрировали характерное экспоненциально убывающее с ростом длины волны поглощение с различающейся величиной спектрального наклона S ((2), рис. 4А).

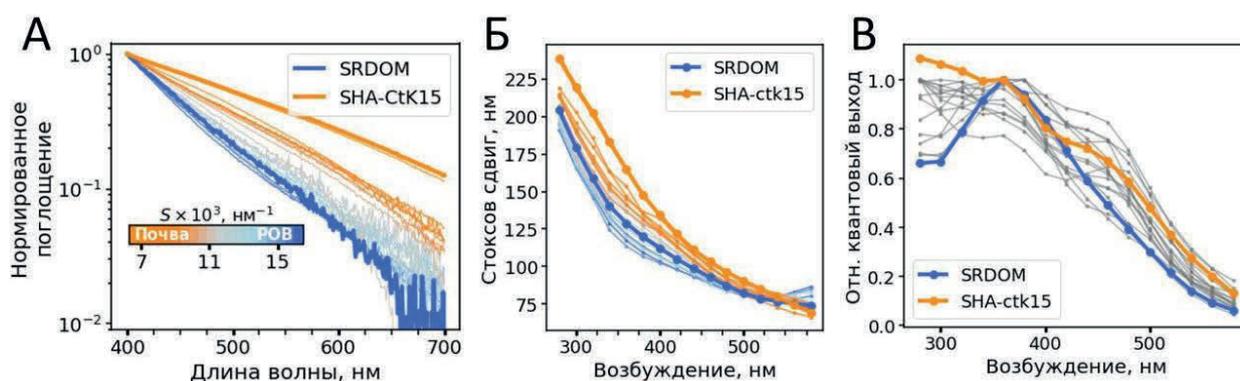


Рисунок 4. (А) Нормированные спектры оптической плотности для выборки

ПОВ. Зависимости Б) Стоксова сдвига и В) квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения для исследованных образцов ПОВ. Синяя и оранжевая кривые соответствуют образцам, для которых наблюдалось минимальное и максимальное значение спектрального наклона S , соответственно.

В спектрах флуоресценции ПОВ также наблюдались закономерности, характерные для ГСФ (рис. 4Б-В): вложенность спектров флуоресценции и монотонная зависимость Стоксова сдвига, полуширины и квантового выхода флуоресценции от длины волны возбуждения.

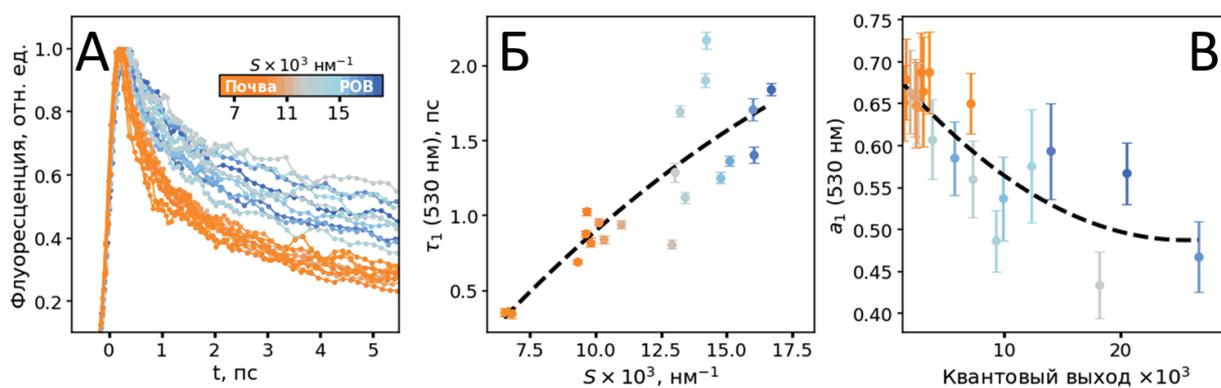


Рисунок 5. А) Кинетики затухания флуоресценции выборки исследуемых ПОВ ($\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{рег}} = 530 \text{ nm}$). Б) Корреляция между временем релаксации пикосекундной компоненты в затухании флуоресценции (τ_1) и спектральным наклоном поглощения S . В) Корреляция между нормированной амплитудой сверхбыстрой компоненты затухания флуоресценции (a_1) и квантовым выходом флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 380 \text{ nm}$). Цветом кодирована величина спектрального наклона поглощения S .

В кривых затухания флуоресценции ПОВ на временном масштабе 0-100 пс присутствовала компонента со временем ~ 1 пс (рис. 5А), амплитуда которой монотонно уменьшалась с длиной волны эмиссии. Параметры сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции скоррелированы со спектральными характеристиками ПОВ: наблюдалась положительная корреляция между временем жизни сверхбыстрой компоненты τ_1 и S (рис. 5Б) и обратная корреляция между амплитудой сверхбыстрой компоненты a_1 и квантовым выходом флуоресценции (рис. 5В).

Корреляционный анализ между оптическими и структурными характеристиками исследованных образцов, измеренными методом ЯМР, показал, что между временем сверхбыстрой компоненты в затухании флуоресценции $\tau_{1,}$ и долей ароматических соединений в составе ПОВ наблюдается обратная корреляция (рис. 6А). Соответственно, скорость релаксации энергии возбуждения выше в системах с меньшим содержанием неароматических соединений в их составе.

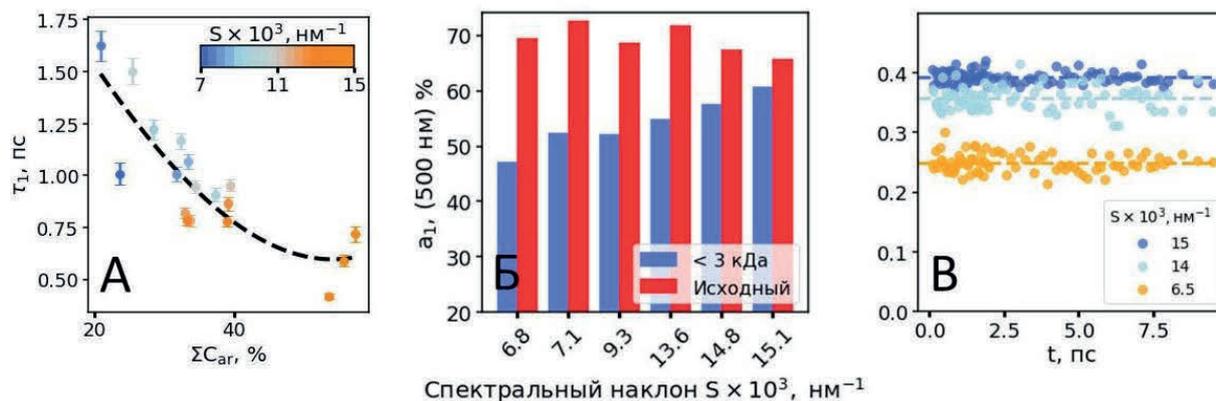


Рисунок 6. А) Корреляция между временем жизни пикосекундной компоненты в затухании флуоресценции и соотношением количества ароматических и алифатических соединений в составе ПОВ. Б) Нормированные значения времени пикосекундной компоненты для фракции ПОВ с размером менее 3 кДа (синий) и нефильтрованных образцов (оранжевый). В) Репрезентативные кинетики затухания анизотропии флуоресценции образцов ПОВ.

Аналогично случаю ГСФ, сгенерированных в рамках подхода снизу вверх, для оценки влияния переноса энергии возбуждения на формирование оптических свойств ПОВ были проведены измерения кинетики анизотропии флуоресценции, кинетики затухания флуоресценции фракций ПОВ с разной молекулярной массой, а также в разных растворителях. Было установлено, что фракция с молекулярной массой ниже 3 кДа обладает меньшей амплитудой и большим временем релаксации сверхбыстрой компоненты по сравнению с нефильтрованными образцами (Рис. 6Б). 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. 6В). Данный

факт говорит в пользу гипотезы о том, что пикосекундная компонента не является следствием сверхбыстрого переноса энергии в ПОВ, и формирование их оптических свойств может быть объяснено в рамках модели усреднения вкладов от входящих в их состав флуорофоров.

В **Главе 5** было проведено систематическое исследование механизмов формирования флуоресценции плазмы крови и variability фотофизических свойств ее основных флуорофоров, а также предложены новые методы диагностики биожидкостей [A18-19]. Для анализа variability эндогенной флуоресценции плазмы крови использовался открытый массив данных, представляющий собой набор матриц возбуждения/эмиссии флуоресценции (МВЭФ) плазмы крови 289 пациентов, у которых был заподозрен колоректальный рак [7]. Серия экспериментов была также выполнена на образцах плазмы крови пациентов.

Первым шагом являлось исследование УФ флуоресценции плазмы крови. Для интерпретации наблюдаемых закономерностей были проведены модельные эксперименты с белковыми фракциями, выделенными из плазмы крови методом гель-проникающей хроматографии. На открытом наборе данных показано, что интенсивность флуоресценции Trp статистически значимо повышена в плазме крови онкобольных ($n = 71$) в сравнении с контрольной группой ($n = 213$, $p < 5 \cdot 10^{-3}$), а спектры флуоресценции плазмы крови онкологических пациентов статистически значимо сдвинуты в синюю область спектра. Было установлено, что соотношение сигналов флуоресценции Tug, выделенной с помощью описанной в Главе 2 процедуры, и Trp статистически значимо понижено у пациентов с онкозаболеваниями. Модельные эксперименты с белковыми фракциями образцов плазмы крови показали, что коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции Trp и уменьшение флуоресценции Tug плазмы крови онкопациентов связано с изменением соотношения концентраций белковых фракций (иммуноглобулинов и САЧ).

В полном спектре флуоресценции плазмы крови помимо полосы, связанной с

УФ флуоресценцией белков, имеется полоса эмиссии в видимой области спектра (рис. 7), при этом механизм ее формирования остается дискуссионным. Для того, чтобы объяснить природу данной полосы флуоресценции, были измерены МВЭФ всех фракций плазмы крови, отобранных при помощи хроматографии (рис. 7). Было показано, что белки плазмы крови помимо УФ флуоресценции обладают и эмиссией в видимой области спектра, при этом >70% от общей флуоресценции плазмы крови в видимом диапазоне приходится на фракцию САЧ.

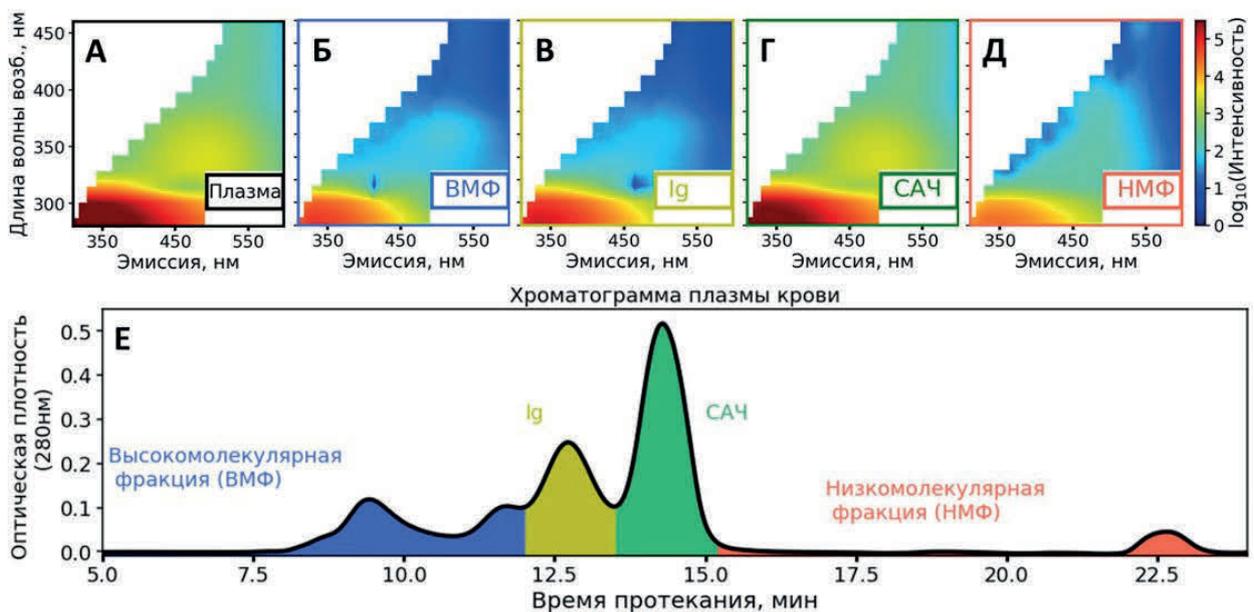


Рисунок 7. МВЭФ-матрицы флуоресценции цельной плазмы крови А) и фракций плазмы: Б) высокомолекулярной фракции; В) фракции иммуноглобулинов (ИГ); Г) фракции сывороточного альбумина человека (САЧ); Д) низкомолекулярной фракции. Е) Хроматограмма цельной плазмы крови человека, измеренная при детектировании поглощения на длине волны 280 нм.

Далее были рассмотрены две основные гипотезы, согласно которым сигнал флуоресценции связан: (1) с лигандами, образующими комплекс с белками (НАДН, билирубином), (2) с флуорофорами, образующимися при химических модификациях (окислении и гликировании) белков. Для оценки возможного вклада во флуоресценцию фракции САЧ плазмы крови связанных им молекул НАДН были проведены спектроскопические исследования отобранных фракций белка до и после равновесного диализа. Показано, что вклад НАДН в

флуоресценцию САЧ в плазме крови составляет 40% при возбуждении на длине волны 340 нм, тогда как при возбуждении на длинах волн >400 нм сигнал определяется билирубином и продуктами модификаций белков.

Для исследования вклада билирубина в оптические свойства плазмы крови была проведена серия измерений образцов плазмы крови, концентрация билирубина в которых определялась независимым методом. Было показано, что наличие билирубина дает вклад в поглощение плазмы крови в видимой области спектра, который может достигать 50%, а также проведена количественная оценка его вклада в спектры флуоресценции. Далее были измерены кривые затухания флуоресценции плазмы крови ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм) на разных длинах волн эмиссии, и полученный набор кинетик был аппроксимирован суммой трех компонент $S_i(\lambda_{\text{эм}}, t)$ (рис. 8). Показано, что компонента со временем затухания 500 пс определяется билирубином, тогда как двум другим более медленным компонентам соответствуют флуорофоры с максимумом эмиссии в области 470 нм, природа которых также была установлена в работе.

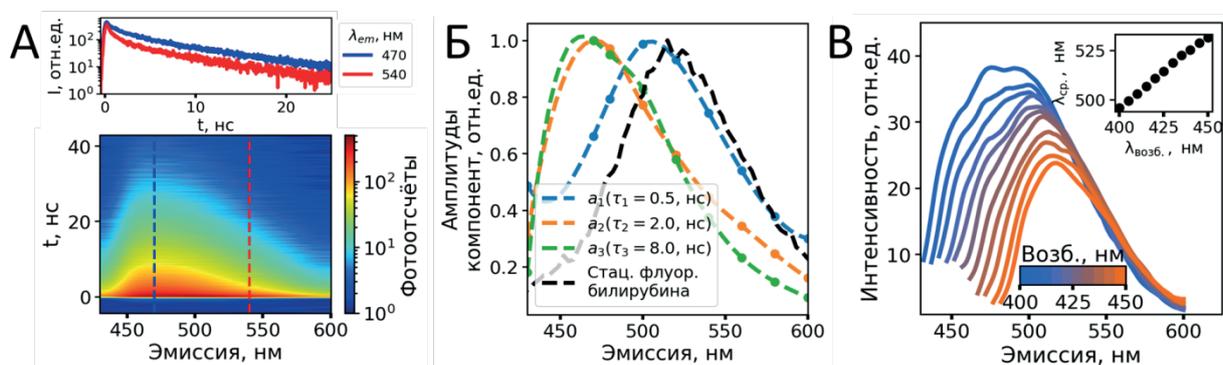


Рисунок 8. А) Кинетики затухания флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 405 нм для разных длин волн эмиссии ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм). Б) Двумерная карта зависимости интенсивности флуоресценции плазмы крови при возбуждении на 405 нм от времени и длины волны эмиссии. В) Спектры флуоресценции, соответствующие компонентам с временами 0.5, 2 и 8 нс в кинетике затухания флуоресценции плазмы крови.

Так, в спектрах флуоресценции плазмы крови для длин волн возбуждения >400 нм (т.е. когда флуоресценция НАДН не возбуждается, а вклад

билирубина не превышает 20% при концентрациях <20 мкМ) наблюдаются монотонное уменьшение квантового выхода флуоресценции, а также длинноволновый сдвиг флуоресценции с ростом длины волны возбуждения (рис. 8В), характерные 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, что было верифицировано в дополнительных экспериментах по исследованию анизотропии флуоресценции с возбуждением на 405 и 635 нм.

Для демонстрации диагностической значимости параметров флуоресценции белков плазмы крови был построен классификатор, определяющий наличие злокачественной опухоли. После подбора оптимальных параметров на тренировочных данных методом поиска на регулярной сетке были подобраны параметры модели случайного леса, при которых на тестовой выборке были достигнуты чувствительность и специфичность обнаружения онкологического заболевания равные 82% и 81%, соответственно.

Глава 6 посвящена решению задачи визуализации и анализа структур в коже с использованием эндогенного контраста и метода двухфотонной томографии (ДФТ), совмещенной с визуализацией времени жизни флуоресценции (fluorescence lifetime imaging, FLIM). 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. 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 (<100 пс) затуханием флуоресценции [A20]. Далее был исследован механизм формирования данного сигнала, показано, что он является следствием образования флуоресцентных фотопродуктов гемоглобина [A21-22]. С использованием разработанного подхода исследован вопрос о свойствах области в коже вокруг капилляров –

периваскулярной зоны [A23-24].

Двухфотонная визуализация кожи методом ДФТ-FLIM *in vivo* была выполнена с помощью системы DermaInspect (JenLab GmbH, Германия), в котором в качестве накачки использовался титан-сапфировый лазер 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 ЭФ и <400 нм для сигнала генерации второй гармоники (ГВГ).

Репрезентативное изображение, полученное методом ДФТ-FLIM в области ногтевого ложа приведено на рис. 9. Тогда как на изображениях, полученных картированием сигналов ГВГ и АФ структур, соответствующих капиллярам, в явном виде не наблюдается (рис. 9А-Б), микрососуды видны на изображениях, полученных методом FLIM (рис. 9В). Установлено, что области капилляров характеризуются коротким временем затухания $\tau_1 < 200$ пс (рис. 9В-Г) и доминирующим вкладом быстрой компоненты кинетики релаксации флуоресценции ($a_1/a_2 > 9$).

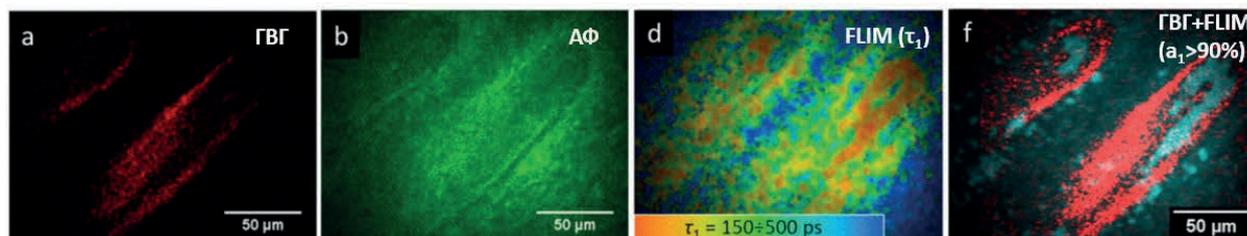


Рисунок 9. Изображение области ногтевого ложа, полученное на глубине 100 мкм методом ДФТ-FLIM, на которых картированы А) интенсивность ГВГ, Б) интенсивность двухфотонной ЭФ, В) время релаксации флуоресценции τ_1 . Г) Совмещенное изображение интенсивности ГВГ (красный цвет) и распределения амплитуды быстрой компоненты a_1 (бирюзовый цвет соответствует отсечке $a_1/a_2 > 9$).

Далее был изучен механизм возникновения сигнала с быстрым ($\tau_1 < 100$ пс) затуханием флуоресценции, наблюдаемым из области капилляра, для чего была исследована кинетика затухания флуоресценция основных компонентов

крови – эритроцитов, лейкоцитов и плазмы крови. Было показано, что кинетика затухания флуоресценции эритроцитов характеризуется параметрами затухания, аналогичными измеренным для области капилляра *in vivo* (рис. 10А-Б). При однофотонном возбуждении (402 нм) у эритроцитов также наблюдалась флуоресценция, характеризующаяся сверхбыстрым затуханием и низкой интенсивностью в сравнении с другими компонентами крови (рис. 10А).

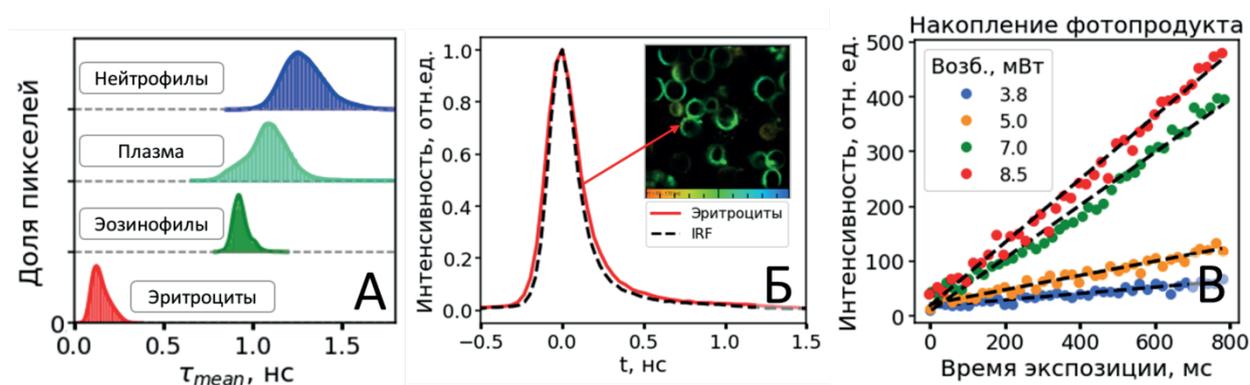


Рисунок 10. А) Распределение среднего времени жизни флуоресценции для эритроцитов, плазмы крови, нейтрофилов и эозинофилов. Б) FLIM-изображение суспензии эритроцитов, полученное при двухфотонном возбуждении на длине волны 760 нм, цветом картировано среднее время затухания флуоресценции. В) Зависимость интенсивности двухфотонной флуоресценции эритроцитов от времени облучения при разных мощностях накачки (длина волны возбуждения 760 нм).

Было установлено, что интенсивность двухфотонной флуоресценции эритроцитов имеет практически линейную зависимость от времени облучения (рис. 10В). Скорость роста интенсивности ЭФ, рассчитанная путем линейной аппроксимации зависимости двухфотонной флуоресценции от времени, квадратично зависела от интенсивности накачки. Обнаруженное поведение двухфотонной флуоресценции эритроцитов можно объяснить накоплением флуоресцирующего фотопродукта, возникающего в результате процесса двухфотонного поглощения. Также был доказан необратимый характер образования фотопродуктов путем последовательного измерения флуоресцентных изображений облученной области суспензии эритроцитов.

Эксперименты, выполненные с раствором гемоглобина, основного хромофора в эритроцитах, показали, что для него также наблюдается необратимое образование фотопродукта. Несмотря на то, что гемоглобин не флуоресцирует из-за сверхбыстрого переноса электрона между порфирином и ионом железа, в результате его одно- и двухфотонного возбуждения образуется флуоресцирующий фотопродукт, который можно использовать в качестве эндогенного контраста при визуализации сосудов методом ДФТ-FLIM.

Метод ДФТ-FLIM далее был применен для интерпретации результатов оптической капилляроскопии. На рис. 11А показано типичное изображение капилляров ногтевого ложа здорового человека, полученное с помощью цифрового капилляроскопа с увеличением 400×, при этом наблюдается характерная область вокруг капилляров, получившая название периваскулярной зоны (ПЗ, отмечена на рис. 11А красной стрелкой). Было проведено исследование, которое показало, что размер ПЗ может быть использован в качестве диагностического параметра при оценке тяжести хронической сердечной недостаточности (ХСН), определенной согласно классификации Ньюйоркской Кардиологической Ассоциации, – данный параметр увеличивается с возрастанием класса ХСН (рис. 11В) [A23].

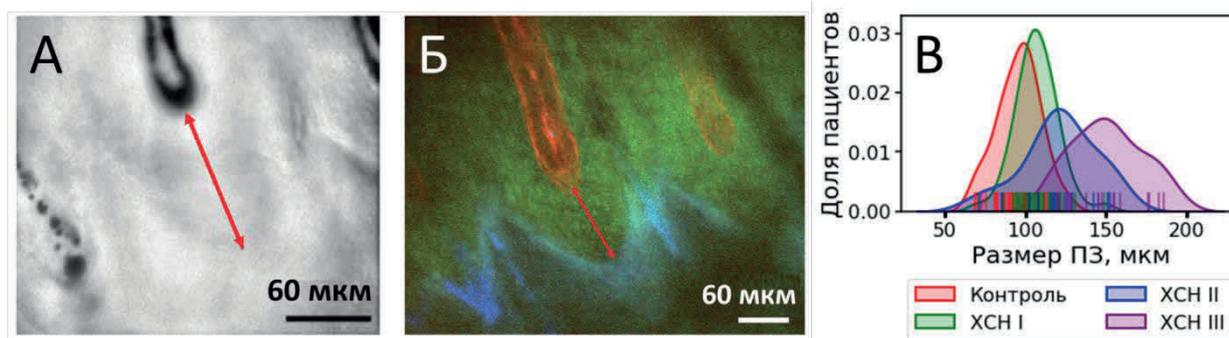


Рисунок 11. А) Изображение капилляра, полученное методом широкопольной микроскопии (капилляроскопии) в белом свете на отражение. Б) Изображение того же капилляра, что и на панели А, полученное методом ДФТ-FLIM. Красный цвет соответствует сигналу ГВГ, зеленый и синий – двухфотонной эндогенной флуоресценции. В) Распределение испытуемых в контрольной и ХСН-группах по размеру ПЗ.

Репрезентативное изображение ПЗ, полученное методом ДФТ-FLIM с использованием сигнала ГВГ (красный цвет) и двухфотонной флуоресценции (зеленый цвет), представлено на рис. 11Б. Было показано, что область от границы капилляра, который можно визуализировать либо по быстрому затуханию флуоресценции методом FLIM, либо как темную «петлеобразную» область на изображениях ГВГ, до границы ПЗ, соответствует живому эпидермису – то есть, области до рогового слоя кожи. Прямые измерения, выполненные методами оптической капилляроскопии и ДФТ-FLIM на одних и тех же капиллярах (рис. 11А-Б), подтвердили вышеуказанную гипотезу.

Глава 7 посвящена созданию и верификации метода, основанного на ДФТ-FLIM с эндогенным контрастом, для визуализации и анализа структур в биологических тканях *in vivo*, которые другими методами в аналогичных условиях исследовать затруднительно или невозможно.

Технически, одной из основных задач метода FLIM с эндогенным контрастом является поиск субпопуляций клеток с различным метаболическим статусом, который проявляется в значениях параметров флуоресцентного отклика НАДН. Различия в параметрах затухания ЭФ при воздействиях на клетку могут быть достаточно малыми, на уровне 100-200 пс для значений среднего времени жизни флуоресценции. В связи с этим был изучен 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 [A25]. Для этого с помощью компьютерного моделирования генерировались данные FLIM для большого числа объектов (клеток), в которые закладывалось наличие субпопуляций, отличающихся распределением параметров флуоресценции.

Для оценки чувствительности различных методов анализа данных FLIM применялся следующий подход. Моделировалась гетерогенная популяция клеток, имеющая две субпопуляции с различными параметрами затухания

флуоресценции. Управляющими параметрами моделирования служили доля клеток в одной из субпопуляций и $\Delta\tau_m$, разница между средними значениями распределений среднего времени жизни τ_m в двух субпопуляциях. В качестве оценочной метрики был выбран индекс бимодальности (BI, bimodality index), характеризующий среднее расстояние между центрами кластеров, выделенных в результате аппроксимации распределения смесью двух гауссовых распределений, к геометрическому среднему значений стандартного отклонения параметра в каждой из субпопуляций (рис. 12).

Индекс бимодальности был рассчитан для распределений параметров, получаемых в результате работы трех методов анализа FLIM: (1) для среднего времени затухания флуоресценции, получаемого в результате нелинейной аппроксимации затухания флуоресценции с учётом свёртки с функцией отклика, (2) для C- и S- параметров, получаемых в результате анализа с помощью метода фазовых диаграмм, (3) для кривых затухания флуоресценции, получаемых в результате кластеризации методом K-средних (рис. 12А-В, соответственно).

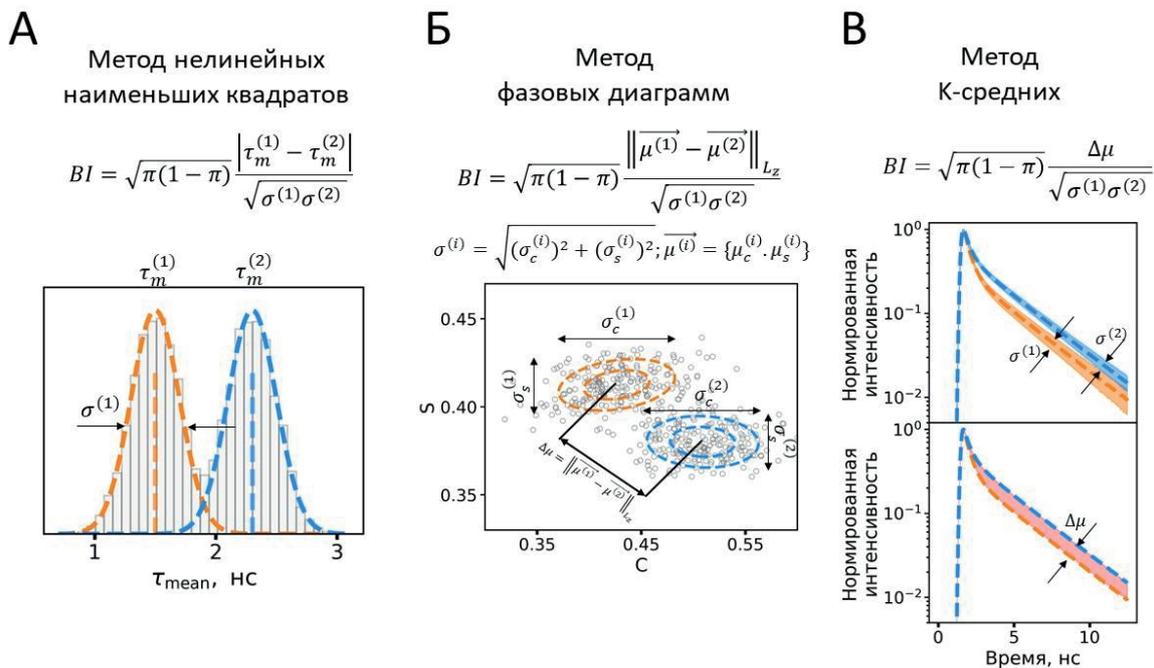


Рисунок 12. Схематическое изображение бимодальных распределений А) времени жизни флуоресценции τ_m , получаемого в результате аппроксимации

кривых методом нелинейных наименьших квадратов с учётом свертки с функцией отклика детектора, Б) значений параметров C-, S-, получаемых при анализе методом фазовых диаграмм, В) кинетик затухания флуоресценции, кластеризуемых с помощью метода К-средних.

Указанные методы анализа применялись к кинетикам затухания флуоресценции, получаемым для моделируемых FLIM-изображений. 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 малых отличиях $\Delta\tau_m$ точность методов значительно отличается. Так, при преобладании клеток в одном из кластеров ($\pi = 90\%$) 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.

Возможность классификации клеток с использованием ДФТ-FLIM была далее использована для анализа клеток в коже *in vivo*. А именно, анализировались клетки двух типов: макрофаги [A26] и тучные клетки [A27], а также их субпопуляции.

Были исследованы отличия макрофагов *in vitro*, дифференцированных в различные фенотипы (M1, провоспалительный, и M2, противовоспалительный) из моноцитов, а также макрофагов, изолированных из кожи человека. Установлено, что среднее время затухания флуоресценции у макрофагов фенотипа M1 короче, чем у M2 (рис. 13А). Далее на изображениях, полученных методом ДФТ-FLIM для биоптатов кожи человека, выделялись области, соответствующие по морфологии и параметрам затухания флуоресценции макрофагов *in vitro*, которые затем идентифицировались с помощью иммуногистохимической окраски с использованием антител CD68 и CD163, специфичных к M1 и M2 макрофагам,

соответственно (рис. 13Б-В).

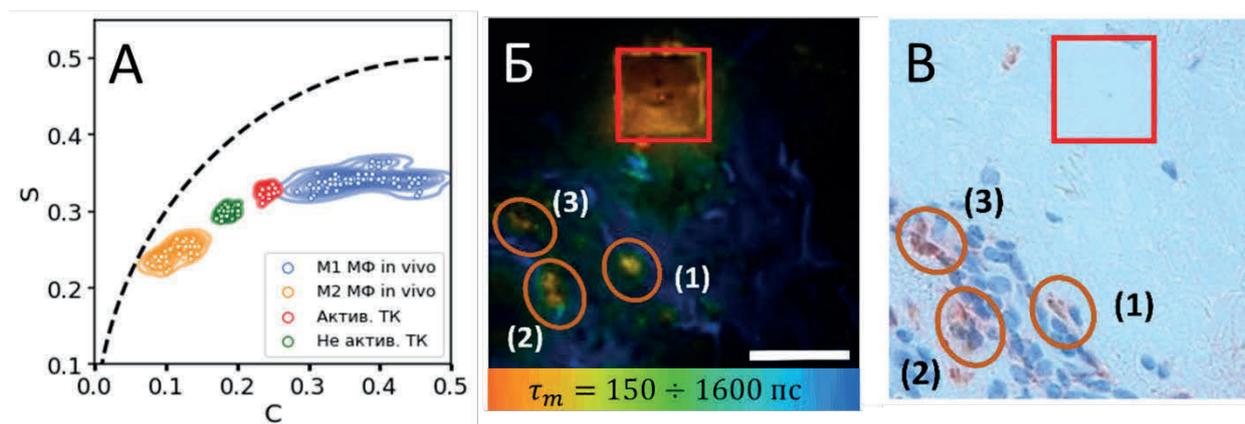


Рисунок 13. А) Визуализация параметров затухания флуоресценции клеток на фазовой плоскости. Б) Репрезентативное ДФТ-FLIM изображение криосреза биоптата кожи человека. Оранжевыми эллипсами отмечены области, по параметрам затухания флуоресценции, совпадающие с макрофагами фенотипа М1. В) Изображение того же образца, что и на панели А, полученное после гистохимической окраски CD68-антителом, специфичным к макрофагам фенотипа М1. Красным квадратом (28×28 мкм²) показана область, выжигаемая лазерным излучением, используемая для сопоставления изображений ДФТ-FLIM и с гистохимической окраской.

Далее метод ДФТ-FLIM был применен для детектирования макрофагов в коже здоровых добровольцев *in vivo*. Из данных гистологического исследования было оценено, что концентрация макрофагов в коже составляет >100 клеток / мм², то есть, в поле сканирования ДФТ-FLIM ($\sim 200 \times 200$ мкм²) должна в среднем находиться одна клетка. Исследования на 25 добровольцах, позволили идентифицировать 35 и 25 клеток с параметрами затухания флуоресценции, соответствующими М1 и М2 макрофагам, соответственно. Разработанный алгоритм идентификации М1 и М2 макрофагов позволил отличить их от других клеток в дерме с чувствительностью 81% и специфичностью 80%.

Вторым типом исследованных клеток являлись тучные клетки (ТК). ТК являются многофункциональными клетками иммунной системы. Общая схема экспериментов по визуализации и анализу состояния ТК в дерме методом

ДФТ-FLIM была аналогична использованной в случае анализа макрофагов. Измерения, проведенные для 10 биопсийных образцов, показали, что специфичность детектирования ТК в коже методом ДФТ-FLIM составляет 85%.

В **Главе 8** обсуждаются возможности диагностики меланина как гетерогенной системы флуорофоров. Меланин в коже сосредоточен, в основном, в области базальной мембраны, тогда как интересным является вопрос о его деградации и накоплении в других слоях кожи.

На основе конфокальной микроспектроскопии путем одновременного измерения спектров КР и ИК флуоресценции был предложен метод анализа распределения меланина в пространственно-неоднородной среде (в частности, в коже *in vivo*) [A28-30]. Было обнаружено, что в разрешенных по глубине спектрах комбинационного рассеяния от кожи можно выделить вклад меланина по характерным линиям на 1380 см^{-1} и 1570 см^{-1} . Было также показано, что спектрам КР с преобладающим вкладом линий меланина соответствует высокий флуоресцентный отклик, а сигнал ИК флуоресценции скоррелирован с долей меланина, оцененной как отношение суммы амплитуд линий меланина на 1380 и 1570 см^{-1} к сумме амплитуд всех линий (линий меланина на 1380 и 1570 и линий белков на 1298 , 1450 и 1655 см^{-1}). При этом доля меланина, имеет локальный максимум вблизи глубины $35\text{--}40\text{ мкм}$, что соответствует представлениям о том, что основная часть меланина локализована вблизи базальной мембраны. В то же время было получено, что сигнал ИК флуоресценции не затухает в дерме, где меланина нет, а в ИК флуоресцентный отклик вносят вклад флуорофоры, локализованные на белках внеклеточного матрикса. Указанное наблюдение является свидетельством в пользу гипотезы о роли ГСФ в формировании флуоресцентного фона в живых системах при возбуждении в красной и ИК спектральных областях.

Дополнительно, визуализация меланина осуществлялась с помощью ДФТ-FLIM по сверхбыстрому затуханию флуоресценции и высокой интенсивности сигнала флуоресценции. В рамках проведенной работы было установлено, что

интенсивность сигнала от меланина (времена затухания менее 100 пс) в тканях типично на порядок выше, чем от других эндогенных флуорофоров (среднее время жизни >400 пс, рис. 14А-Б). Данный факт может быть объяснен двумя причинами: высокой концентрацией флуорофоров в меланине и наличием у меланина электронного поглощения в ИК диапазоне, за счет которого двухфотонная флуоресценция возбуждается резонансно. В связи с указанными гипотезами, была разработана методика оценки абсолютных значений двухфотонного поглощения по кривым насыщения двухфотонной флуоресценции [А31-А34].

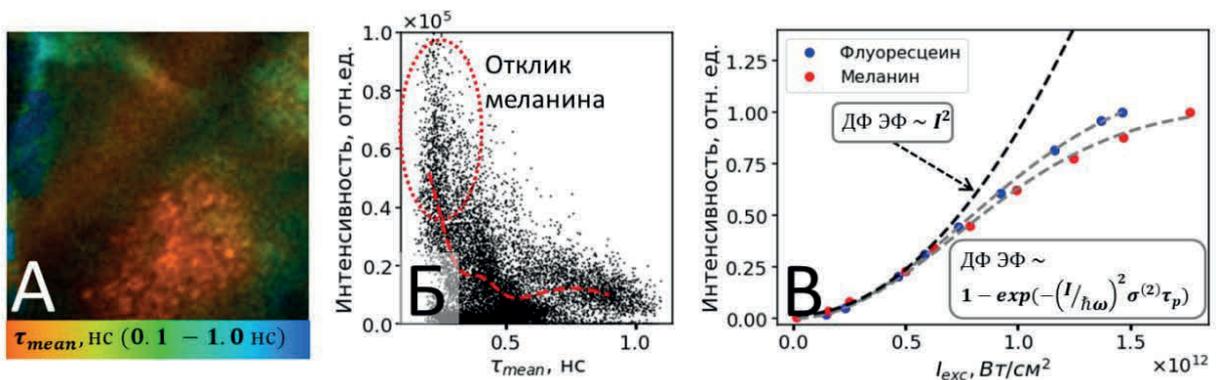


Рисунок 14. А) Карта среднего времени затухания и (Б) корреляция интенсивности флуоресцентного отклика и среднего времени затухания флуоресценции (Б) для участков кожи, соответствующих максимальной концентрации меланина при двухфотонном возбуждении на 760 нм. В) Зависимость интенсивности флуоресцентного отклика от мгновенной интенсивности накачки на 800 нм для меланина и флуоресцеина.

Принципиально, методика основывается на том, что в случае, когда длительность импульсов τ_p возбуждающего излучения (~ 100 фс) значительно меньше характерных времен жизни возбужденного состояния органических флуорофоров ($\sim 0.1 \div 1$ нс), зависимость интенсивности флуоресценции F от интенсивности накачки I определяется формулой, учитывающей обеднение основного состояния, приводящего к насыщению флуоресценции:

$$F(I) \propto \eta N n_e = \eta N \left[1 - \exp \left(- \left(\frac{I}{\hbar \omega} \right)^2 \sigma^{(2)} \tau_p \right) \right], \quad (3)$$

где η – квантовый выход флуоресценции, $\sigma^{(2)}$ – сечение двухфотонного

поглощения, N – концентрация флуорофоров.

Было проведено измерение 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. При интенсивностях падающего на образец излучения порядка 10^{12} Вт/см² наблюдается отклонение зависимости интенсивности двухфотонной флуоресценции от квадрата мощности падающего излучения (рис. 14В). При этом зависимость интенсивности флуоресценции хорошо описывалась моделью с учётом насыщения. В работе в дополнительных экспериментах были исключены факторы, которые потенциально могут влиять на выводы об эффекте насыщения флуоресценции в рассмотренных системах: фотодеградация, аннигиляции возбужденных состояний флуорофоров и термодиффузия.

В результате работ было установлено, что величина сечения двухфотонного поглощения исследованных систем варьируется в диапазоне 100–300 ГМ (1 ГМ = 10^{-50} см⁴с), тогда как сечение двухфотонного поглощения меланина составляло 300 ГМ, что говорит об отсутствии резонансного возбуждения флуоресценции меланина при используемых условиях возбуждения. Таким образом, повышенный на порядок (в сравнении с другими эндогенными флуорофорами кожи) сигнал флуоресценции меланина, наблюдаемый *in vivo* методом двухфотонной микроскопии, связан, прежде всего, с высокой локальной концентрацией флуорофоров в частицах меланина.

Другим следствием из экспериментов по насыщению флуоресценции явился о вопрос о возможности реализации данной методики в виде метода микроскопии, в котором картируется сечение двухфотонного поглощения [А33]. Для демонстрации возможностей методики микроскопии двухфотонного насыщения были проведены измерения клеток рака печени (клеточная линия HepG2).

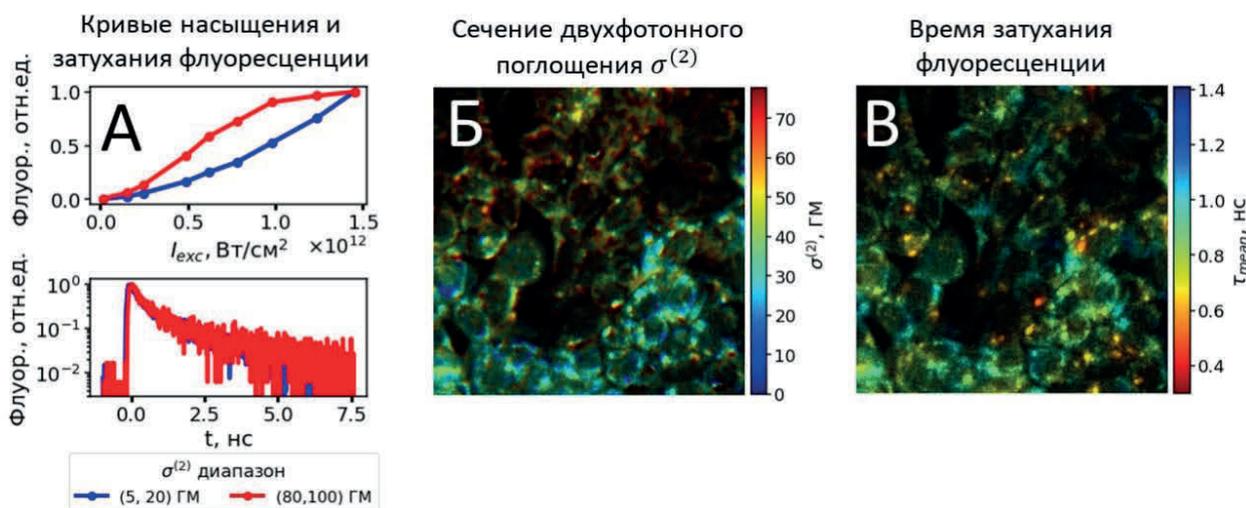


Рисунок 15. А) Пример кривых насыщения флуоресценции (сверху) для двух областей образца, для которых кинетика затухания флуоресценции не различается (снизу). Изображения культуры клеток Нер G2, полученные методом двухфотонной микроскопии, на которых цветом кодировано Б) сечение двухфотонного поглощения и В) среднее время жизни флуоресценции.

Как видно из рис. 15, 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.

В **Заключении** сформулированы следующие основные результаты, полученные в диссертационной работе:

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 Trp 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.

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., Darwin 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., Darwin 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., Priezhev 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., Priezhev A.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darwin 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., Darwin 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., Darwin, 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., Darwin 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., Darwin 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., Буянкин 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 // *Nature methods*. – 2005. – V. 2. – No. 12. – P. 905-909.
3. Becker W. Fluorescence lifetime imaging–techniques and applications // *Journal of microscopy*. – 2012. – V. 247. – No. 2. – P. 119-136.
4. You S. et al. Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy // *Nature communications*. – 2018. – V. 9. – No. 1. – P. 1-9.
5. Pansieri J. et al. Ultraviolet–visible–near-infrared optical properties of amyloid fibrils shed light on amyloidogenesis // *Nature Photonics*. – 2019. – V. 13. – No. 7. – P. 473-479.
6. Grisanti L. et al. Toward understanding optical properties of amyloids: a reaction path and nonadiabatic dynamics study // *Journal of the American Chemical Society*. – 2020. – V. 142. – No. 42. – P. 18042-18049.
7. Lawaetz A. J. et al. Fluorescence spectroscopy as a potential metabonomic tool for early detection of colorectal cancer // *Metabolomics*. – 2012. – V. 8. – No. 1. – P. 111-121.