

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ровнягина Наталия Романовна

**Флуоресцентная спектроскопия фибриллярных наноструктур:
взаимодействие с флуоресцентным зондом тиофлавином Т
и возможности в исследовании кинетики агрегации**

Специальность

1.3.6. Оптика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2026

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

**Научный
руководитель:** **Ширшин Евгений Александрович,**
доктор физико-математических наук

**Официальные
оппоненты:** **Уточникова Валентина Владимировна,**
доктор химических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах,
кафедра наноматериалов, профессор

Ширманова Марина Вадимовна,
доктор биологических наук,
Приволжский исследовательский медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Научно-исследовательский институт экспериментальной
онкологии и биомедицинских технологий,
заместитель директора по науке

Ященок Алексей Михайлович,
доктор физико-математических наук,
Сколковский институт науки и технологий,
Центр фотоники и фотонных технологий, доцент

Защита диссертации состоится «17» февраля 2026 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, аудитория 4-28.

E-mail: kosareva@physics.msu.ru

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/3748>

Автореферат разослан «____» января 2026 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.013.6
доктор физико-математических наук, доцент



О.Г. Косарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности темы

Методы флуоресцентной спектроскопии и микроскопии представляют собой мощный инструмент в химии, биологии и медицине, позволяя исследовать свойства и поведение различных молекул. Одним из основных подходов в задачах детектирования и визуализации молекул является применение экзогенных меток, в частности, флуоресцентных красителей. Применение флуоресцентных зондов позволяет селективно визуализировать определенные типы молекул и органеллы клеток, а также измерять параметры их микроокружения, такие как pH, температура, вязкость, концентрация ионов.

Так, флуоресцентный зонд тиофлавин T (thioflavin T, ThT) широко применяется для детектирования фибриллярных наноструктур – нерастворимых нитевидных агрегатов, образующихся в результате неправильного сворачивания белков и вовлеченных в патогенез нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера, Паркинсона, прионной болезни) [1–3]. Они имеют характерную упорядоченную фибриллярную структуру. В последующем тексте термин "фибриллы" будет использоваться для обозначения амилоидных фибрилл. Популярность ThT для детектирования фибриллярных структур основана на двух фактах: (1) ThT специфично (с высокой константой комплексообразования, $K > 10^7 \text{ M}^{-1}$) связывается с фибриллами [4] и (2) квантовый выход флуоресценции ThT на несколько порядков увеличивается при образовании им комплекса с фибриллами в сравнении со свободным ThT в воде [5]. Под константой комплексообразования понимается термодинамическая величина, характеризующая силу взаимодействия между молекулами:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (1)$$

где ΔG — изменение свободной энергии Гиббса при связывании (энергия взаимодействия), R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Второй факт связан с тем, что ThT является молекулярным ротором: в возбужденном состоянии фрагменты молекулы ThT поворачиваются друг

относительно друга, в результате чего появляется канал релаксации возбуждения со скоростью 10^{12} с^{-1} [6]. При этом изменение микровязкости окружения ThT определяет вращательную подвижность его фрагментов и влечет за собой изменение скорости релаксации возбужденного состояния в диапазоне $10^9 \div 10^{12} \text{ с}^{-1}$ (рис. 1). При специфичном связывании ThT с фибриллами происходит жесткая фиксация фрагментов молекулы, что влечет за собой тысячекратное усиление интенсивности флуоресценции и рост среднего времени жизни флуоресценции (рис.1 Г). Сайт связывания представляет собой специфический участок макромолекулы, участвующий в селективном взаимодействии с ThT посредством нековалентных связей (водородных, ионных, вандерваальсовых и гидрофобных). Данный сайт характеризуется определенной структурной организацией и термодинамическими параметрами (энергией связывания). Равновесные равновероятные наборы состояний молекул ThT, связанные с такими участками и обладающие схожими фотофизическими характеристиками, мы далее будем называть модами связывания. В результате ThT можно использовать либо для селективной флуоресцентной визуализации фибрилл, либо для исследования кинетики их образования: по мере увеличения концентрации фибрилл растет доля связанного ими ThT с повышенной микровязкостью окружения, и, следовательно, интегральная интенсивность его флуоресценции.

Одним из факторов, осложняющих интерпретацию экспериментальных данных, является то, что ThT способен встраиваться не только в фибриллы, но и в мономеры белковых макромолекул и низкомолекулярные агрегаты белков. Это промежуточные структуры различного размера, образующиеся в процессе неправильного сворачивания и агрегации белков и предшествующие образованию фибрилл. Хотя ThT неспецифично связывается с такими структурами (константа связывания значительно ниже, чем с фибриллами, $\sim 10^3 \div 10^4 \text{ М}^{-1}$ [9,10]), при их избытке вклад флуоресценции от их комплексов с ThT может превосходить сигнал от молекул ThT, связанных фибриллами. Этот факт затрудняет детектирование фибрилл в реальных системах, например, биожидкостях, где концентрации мономеров белков и фибрилл могут различаться на 9 порядков [11]. Кроме того, известно, что амилоидные

фибриллы обладают как высоко-, так и низкоспецифичными сайтами связывания ThT (рис. 1) [12,13], поэтому интерес представляет количественная оценка параметров связывания с различными белками и белковыми агрегатами, а также оценка оптических свойств ThT при образовании им комплексов со структурами с высокими и низкими константами комплексообразования.

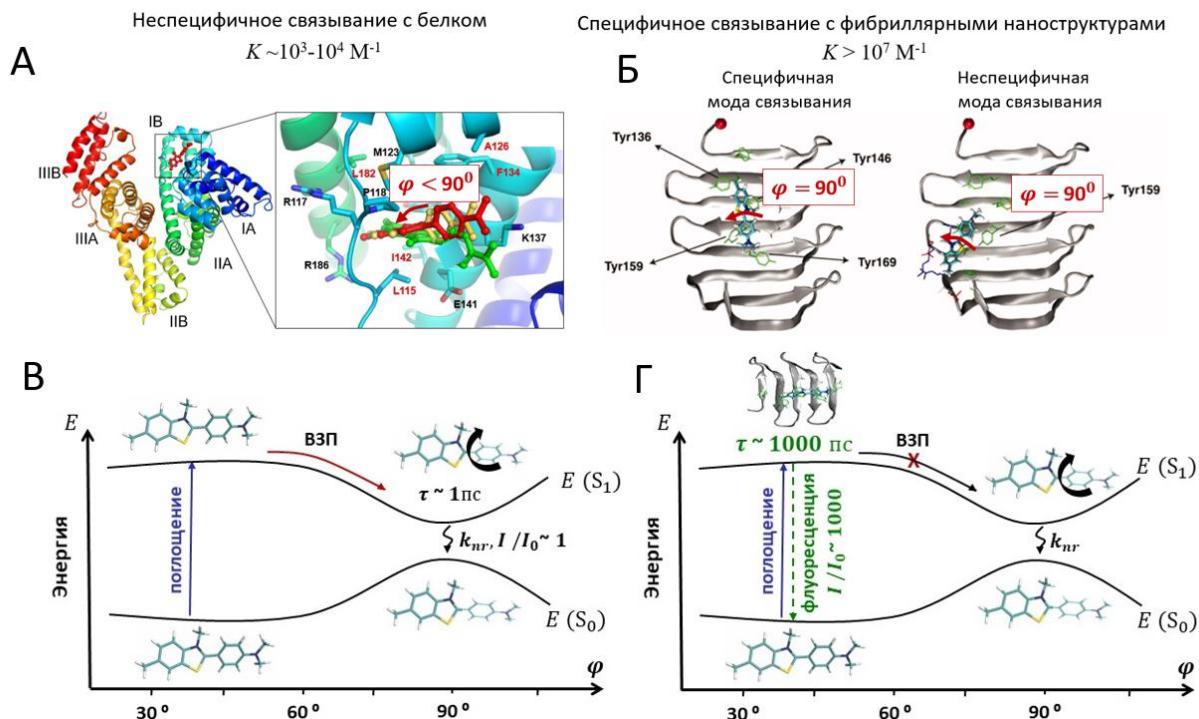


Рисунок 1. А,Б – Схематическое изображение сайтов связывания ThT с альбумином (угол поворота фрагментов ThT относительно С-С связи составляет 36° [7]) и с фибриллярными nanoструктурами (угол поворота 90° [8]). В, Г – Схема, иллюстрирующая механизм формирования фотофизических свойств ThT в зависимости от его структуры. Молекула ThT представлена в основном (угол поворота 36°) и возбужденном состоянии (угол поворота 90°). Время жизни флуоресценции τ определяется скоростью нерадиационного перехода k_{nr} , которое зависит от вязкости микроокружения η . При низкой вязкости микроокружения время релаксации возбужденного состояния ThT определяется скоростью внутреннего вращения фрагментов молекулы относительно друг друга и составляет $\sim 1 \text{ ps}$ (В). При высоких значениях вязкости в специфичных сайтах связывания, наличие которых характерно при образовании комплексов с фибриллами, вращение фрагментов молекулы затруднено, и время жизни возбуждения возрастает до $\sim 1 \text{ ns}$ за счет уменьшения скорости k_{nr} (Г).

Далее, высокая чувствительность оптических свойств ThT к изменениям вязкости [14] и полярности [15] его микроокружения делает их удобными индикаторами для изучения взаимодействия ThT с белками и другими системами. Согласно принятой модели формирования флуоресцентного отклика ThT, рост интенсивности I и времени жизни τ связан с уменьшением скорости нерадиационной релаксации k_{nr} при неизменной скорости радиационной релаксации k_r , за счет увеличения жесткости микроокружения, и эти параметры должны меняться синхронно при образовании им комплексов с белками и их агрегатами ($I \sim \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau$) [6,14]. Однако при измерении комплексообразования ThT с белками было показано [16], что выход на плато зависимости времени жизни флуоресценции ThT τ от концентрации белка опережает выход на плато зависимости интенсивности флуоресценции I . Более того, для молекул ThT, образующих комплекс с мономерами белков, было получено, что интенсивность флуоресценции ThT возрастает в десятки раз, тогда как время жизни флуоресценции ThT достигает единиц наносекунд, то есть, возрастает в 1000 раз. Также при исследовании кинетики образования фибриллярных структур было выявлено, что время жизни флуоресценции начинает увеличиваться раньше, чем интенсивность флуоресценции, тогда как в модели молекулярного ротора они должны изменяться синхронно. Таким образом, второй задачей из области фотофизики ThT являлось исследование несинхронного изменения интенсивности и времени жизни его флуоресценции при образовании комплексов с белками и их агрегатами.

Вариабельность параметров флуоресценции ThT при образовании им комплексов с белками позволяет не только визуализировать фибриллярные наноструктуры [7], но и регистрировать изменение вязкости микроокружения с субмикрометровым разрешением в режиме реального времени с использованием метода конфокальной флуоресцентной микроскопии [14,17]. Картирование фотофизических параметров зонда, отличных от интенсивности флуоресценции, позволяет повысить чувствительность и специфичность оптического молекулярного имиджинга. Так, в данной работе была предложена методика микроскопии насыщения флуоресценции с использованием стандартного конфокального

микроскопа [18–21]. Отклонение зависимости интенсивности излучения флуорофора от интенсивности возбуждения при больших мощностях накачки от линейного закона происходит вследствие обеднения основного состояния (т.е. когда скорость возбуждения флуорофора из основного состояния в возбужденное превышает скорость деактивации возбужденного состояния), интеркомбинационной конверсии или других эффектов, и может быть описано набором уравнений, в которых в качестве параметров фигурируют фотофизические характеристики флуорофора (сечение поглощения σ , время жизни флуоресценции τ , скорости релаксации). Таким образом, анализируя насыщение флуоресценции в разных пикселях, можно составить карту молекулярно-специфического параметра $\sigma\tau$ по всему изображению. Для этого достаточно получить флуоресцентные изображения при различных интенсивностях возбуждения в соответствующем диапазоне интенсивности возбуждения. Эффект насыщения флуоресценции в конфокальной микроскопии ранее анализировался с точки зрения его влияния на пространственное разрешение [22–24], однако возможность использования этого эффекта для молекулярно-специфического контрастирования изображений не рассматривалась.

Таким образом, применение методов стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии с использованием зонда ThT позволяет проанализировать динамику внутримолекулярных процессов и изменений свойств белковых молекул при формировании фибриллярных наноструктур, а изучение фотофизических процессов, происходящих при связывании ThT с фибриллярными наноструктурами и другими биологическими объектами, является актуальным направлением исследований, имеющим фундаментальное и прикладное значение.

Цель и задачи работы

Целью работы является исследование фотофизических процессов в комплексах, образующихся при взаимодействии флуоресцентного зонда тиофлавина Т с фибриллярными наноструктурами, мономерами белков и их низкомолекулярными агрегатами. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. С использованием методов флуоресцентной спектроскопии исследовать фотофизические механизмы, ответственные за усиление флуоресценции и изменение среднего времени жизни флуоресценции ThT при неспецифичном связывании с глобулярными белками с низкой константой комплексообразования.
2. Исследовать механизмы, лежащие в основе различной чувствительности фотофизических параметров ThT (времени жизни и интенсивности флуоресценции) при специфичном связывании с фибриллярными наноструктурами на различных этапах процесса агрегации.
3. Разработать метод картирования фотофизических параметров ThT на изображениях, полученных методом конфокальной микроскопии, на основе эффекта насыщения флуоресценции.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования является флуоресцентный зонд ThT, а также его фотофизические свойства при взаимодействии с белками и фибриллярными наноструктурами.

Предметом исследования является использование ThT в качестве флуоресцентного зонда для мониторинга кинетики формирования фибриллярных наноструктур с использованием методов флуоресцентной спектроскопии и микроскопии.

Методология исследования

Фотофизические свойства комплексов ThT с белками и фибриллами были исследованы методами стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии (с субпико- и субнаносекундным разрешением). Для анализа мод связывания и роли олигомеров белков была применена гель-фильтрационная хроматография с детектированием поглощения в УФ и видимой областях. Было реализовано численное моделирование кривых затухания флуоресценции ThT при образовании комплекса с белком в двухкомпонентной системе с двумя различными временами затухания флуоресценции с использованием языка программирования

Python. Структурные свойства фибриллярных наноструктур охарактеризованы методами динамического светорассеяния и микроскопии анализа траекторий наночастиц. Разработка метода картирования безразмерного параметра $F_{max}\sigma\tau$ для флуоресцентного зонда ThT при непрерывном возбуждении, была реализована с помощью конфокальной микроскопии.

Научная новизна

1. Впервые было продемонстрировано, что асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции связано с наличием фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием флуоресценции (~ 1 пс) и является общей чертой неспецифического взаимодействия ThT с белками и олигомерами белка.
2. Впервые выявлено две моды связывания ThT с альбумином (800 и 1300 пс), обусловленные наличием в растворах альбумина димерной фракции, для которой константа связывания ThT в ~ 6 раз выше, чем для мономера.
3. Впервые было объяснено асинхронное изменение среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT при формировании фибрилл наличием свободного и связанного ThT со сверхбыстрым затуханием флуоресценции ~ 1 пс. Было продемонстрировано, что присутствие даже небольшой доли ($< 10\%$) компоненты с временем затухания флуоресценции ~ 1 нс эффективно маскирует вклад сверхбыстрой компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на установке с шириной аппаратной функции ~ 100 пс.
4. Метод насыщения флуоресценции впервые был применен для молекулярной визуализации в экспериментах по конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного зонда ThT и позволило в 2 раза повысить контраст визуализации в гетерогенной системе фибриллярных нитевидных структур по сравнению со стандартным подходом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Научная и практическая значимость

Работа вносит вклад в понимание формирования оптических свойств ThT при взаимодействии с белками и их агрегатами, устанавливая причины асинхронного

изменения интенсивности и времени жизни флуоресценции. Выявлен эффект маскировки вклада моды связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией ~ 1 пс в кривую затухания флуоресценции, что обосновывает её обязательный учёт при анализе связывания ThT с белками и фибриллярными наноструктурами. Обнаружены как минимум две моды связывания ThT в растворе альбумина, соответствующие мономерной и димерной фракциям, что указывает на необходимость учёта димеризации при оценке параметров связывания альбумина с лигандами.

Также в работе была предложен и протестирован метод молекулярно-специфичной визуализации в конфокальной микроскопии на основе эффекта насыщения флуоресценции. Разработанная методика картирования параметра $F_{max}\sigma\tau$ позволяет повысить чувствительность и специфичность молекулярного имиджинга, не требуя модификации стандартных конфокальных систем, и может быть использована в биоимиджинге как дополнительная модальность.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При неспецифичном (константа комплексообразования $K \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) связывании молекулы тиофлавина Т (ThT) с белками и олигомерами белков в кинетике затухания флуоресценции ThT присутствует сверхбыстрая компонента со временем ~ 1 пс, наблюдаемая у $>50\%$ молекул ThT в растворе. Вклад данной временной компоненты в кривую затухания флуоресценции, измеренную на установке с шириной аппаратной функции ~ 100 пс, полностью маскируется фракцией ThT со временем жизни ~ 1 нс.
2. Наличие временных компонент в кинетике затухания флуоресценции ThT в растворе белка альбумина, характеризующихся временами жизни флуоресценции 800 и 2100 пс, связано с образованием комплексов ThT с мономерами и димерами белка. Димеры альбумина обеспечивают связывание ThT в сайт с более жестким микроокружением и с константой комплексообразования в 6 раз большей, чем при связывании ThT с мономерами альбумина.
3. Асинхронное изменение времени жизни и интенсивности флуоресценции ThT в процессе формирования фибриллярных наноструктур связано с наличием в

системе фракций свободного и связанного ThT со сверхбыстрой релаксацией возбужденного состояния (~ 1 пс).

4. Метод микроскопии насыщения флуоресценции позволяет картировать величину безразмерного параметра $F_{max}\sigma\tau$ для флуоресцентного зонда ThT в экспериментах с использованием конфокальной микроскопии с непрерывным источником возбуждения, где $F = I/\hbar\omega$ – плотность потока фотонов, σ – сечение возбуждения, а τ – время жизни флуорофора.

Достоверность и обоснованность результатов

Результаты, представленные в диссертации, получены на основе многократно повторенных экспериментов, проведенных на современном лабораторном оборудовании с использованием актуальных методов обработки экспериментальных данных. Высокая повторяемость и хорошая воспроизводимость измеряемых величин обеспечивает обоснованность и достоверность результатов работы. Изложенные результаты не противоречат данным других научных групп и были многократно представлены на всероссийских и международных конференциях, кафедральных и лабораторных семинарах. Большая часть материалов диссертации опубликована в ведущих международных научных журналах. Это позволяет считать представленные результаты обоснованными и достоверными, а также полностью отвечающими современному мировому уровню исследований.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены в 9 докладах на российских и международных конференциях: The 23th Annual International Conference on Advanced Laser Technologies ALT'15 (Фаро, Португалия), Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS) (Саратов, Россия), Fourth International Symposium on Optics and Biophotonics (Саратов, Россия), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия), ADFLIM (Дагомыс, Россия), 1-я Школа ADFLIM (Москва, Россия), Ломоносовские чтения – 2019 (Москва, Россия),

International Conference on Ultrafast Optical Science “UltrafastLight-2019” (Москва, Россия), Ломоносовские чтения – 2020 (Москва, Россия).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 печатных работах, в том числе 5 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова. Список работ автора приведён в конце автореферата перед списком литературы.

Личный вклад

Все результаты, представленные в работе, получены либо автором лично, либо при его определяющем участии. Личный вклад автора состоял в разработке методик приготовления и характеристики образцов, в проведении всего объёма экспериментальных исследований, обработке и анализе полученных данных, в представлении результатов в виде научных докладов. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Публикации по теме научно-квалификационной работы были написаны при определяющем участии автора.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и списка цитированной литературы. Общий объем работы составляет 172 страницы, включая 44 рисунка и 10 таблиц. Библиография содержит 152 наименования на 13 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обосновывается актуальность настоящей диссертационной работы, ее научная новизна, практическая значимость, формулируются цели и задачи работы. Приводятся положения, выносимые на защиту, и сведения об апробации результатов работы, а также о структуре диссертации.

В **первой главе** представлен обзор экспериментальных и теоретических работ, посвященных тематике диссертации.

Вторая глава посвящена исследованию изменения фотофизических характеристик зонда в результате низкоспецифичного связывания в белковые молекулы. В ходе исследования были изучены спектры и кинетики затухания флуоресценции ThT при встраивании в модельный белок, альбумин (рис.2 А). В то время как для связанного ThT наблюдалось ~1000-кратное увеличение среднего времени жизни флуоресценции (от 1 пс в водном растворе до 840 пс при встраивании в альбумин), усиление интенсивности флуоресценции *Fluo* составляло всего несколько десятков при связывании с белком (фактор усиления 35), тогда как, согласно модели молекулярного ротора, они должны меняться одинаковым образом (рис. 2 Б, рис. 4А). Далее, при исследовании процесса связывания ThT с мономерами белков, в частности, с альбумином, наблюдается асинхронность поведения фотофизических характеристик зонда *Fluo* и τ с увеличением концентрации белка C_p (рис. 2 Б), являющаяся общей характеристикой, наблюдаемой при анализе связывания ThT с глобулярными белками.

Для анализа мод встраивания ThT в альбумин кинетика затухания флуоресценции зонда аппроксимировалась экспоненциальным распадом с тремя компонентами:

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (1)$$

где a_i - предэкспоненциальный коэффициент, определяющий относительный вклад в кривую затухания компоненты с временем затухания τ_i . Среднее время жизни флуоресценции при этом определялось, как:

$$\langle \tau \rangle = \sum_i a_i \tau_i / \sum_i a_i \quad (2)$$

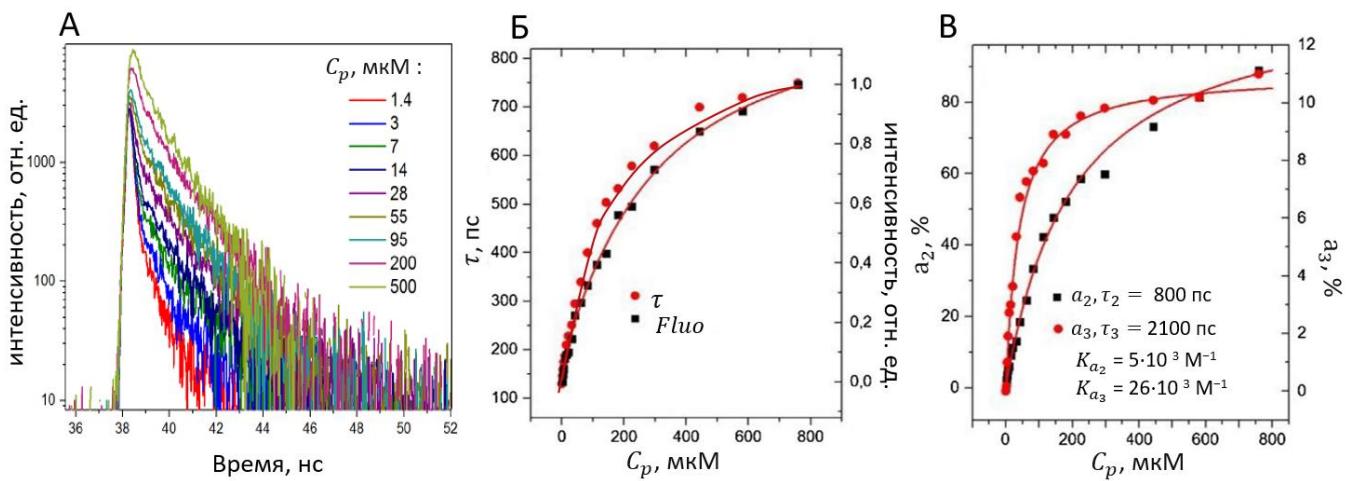


Рисунок 2 – А) Кинетики затухания флуоресценции ThT от концентрации альбумина C_p . **Б)** Зависимость интенсивности флуоресценции (черные символы), нормированной на интервал (0,1) и среднего времени жизни флуоресценции ThT (красные символы) от C_p . Линиями на **Б, В** указаны аппроксимации зависимостей уравнением (3). **В)** Зависимость амплитуд a_2 и a_3 , определяющих относительный вклад в кинетику затухания флуоресценции ThT, компонент с временем затухания с временемами затухания флуоресценции $\tau_2 = 800 \text{ ps}$ и $\tau_3 = 2100 \text{ ps}$ от C_p . Константы комплексообразования $(0.50 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, соответственно. $C_{\text{ThT}} = 2 \mu\text{M}$.

Компонента с $\tau_1 = 200 \text{ ps}$ в кинетике затухания флуоресценции ThT в присутствие альбумина была отнесена к свободному ThT в растворе (a_1), а две другие компоненты с $\tau_2 = 800 \text{ ps}$ и $\tau_3 = 2100 \text{ ps}$ были отнесены к субпопуляциям ThT (a_2 и a_3), встроенного в различные сайты связывания. Из зависимостей a_2 и a_3 от концентрации белка в растворе (рис. 2В) были рассчитаны константы комплексообразования путем аппроксимации зависимости следующим уравнением:

$$y(C_p) = y_{\max} \cdot \left(\frac{C_{\text{ThT}} + C_p + 1/K}{2} - \sqrt{\left(\frac{C_{\text{ThT}} + C_p + 1/K}{2} \right)^2 - C_p \cdot C_{\text{ThT}}} \right) \quad (3)$$

где K – константа комплексообразования, C_{ThT} и C_p полные концентрации белка и ThT в растворе, y – измеряемый в эксперименте параметр (интенсивность флуоресценции, время жизни или амплитуда компоненты в кинетике затухания флуоресценции), а y_{\max} – его максимальное значение, соответствующее выходу параметра на плато. Константы комплексообразования составили $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(0.50 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ для a_3 и a_2 , соответственно.

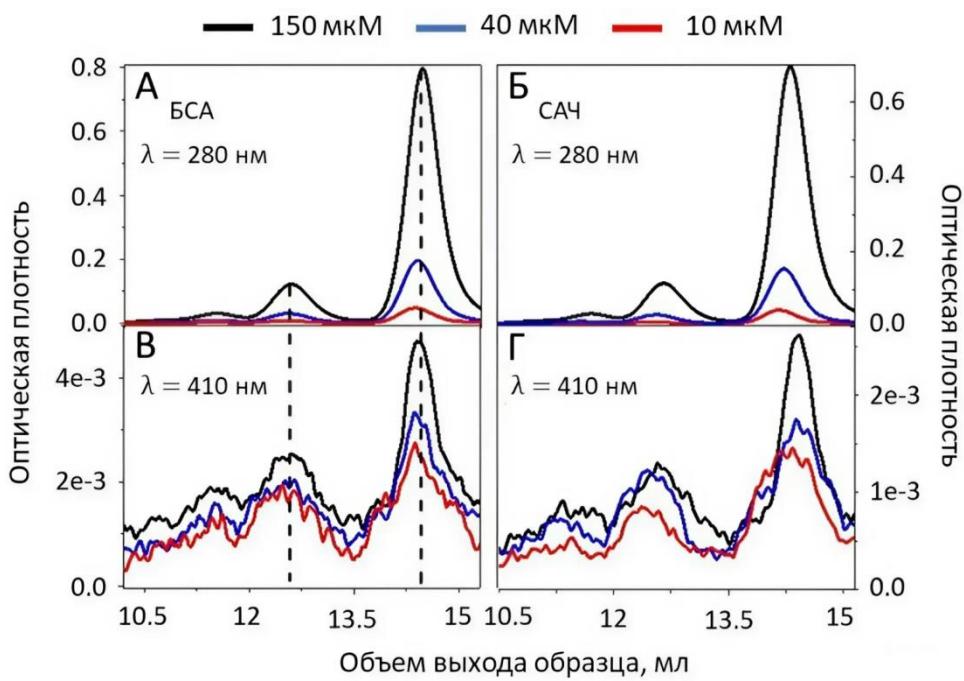


Рисунок 3 – А, Б) Поглощение олигомерных фракций альбумина (бычьего и человеческого сывороточного альбуминов, БСА и САЧ) на 280 нм, и В, Г) ThT на 410 нм в данных фракциях, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии. Коэффициент молярной экстинкции на 280 нм для БСА и САЧ составляют $43\ 824\ M^{-1}\ cm^{-1}$ и $35\ 700\ M^{-1}\ cm^{-1}$, что объясняет разницу в амплитудах пиков на панелях А и Б. $C_{ThT} = 80\ \mu M$; черные, синие и красные кривые соответствуют 150, 40 и 10 μM белка.

Локализация сайтов связывания ThT с альбумином была далее исследована путем анализа собственного поглощения олигомерных фракций белка на 280 нм и поглощения ThT в белковых фракциях на 410 нм, разделенных с помощью метода гель-фильтрационной хроматографии (рис. 3). Так, были определены концентрации мономерной, димерной и тримерной фракций в растворе альбумина, а также концентрации связанного с ними ThT, откуда далее по формуле (3) были получены константы связывания ThT с каждой из фракций. С помощью использованного подхода было установлено, что константа связывания ThT с димерной фракцией в ~ 6 раз превосходит K для мономерной фракции. Данной моде связывания была приписана компонента a_3 в кинетике затухания флуоресценции ThT, а связыванию с мономером альбумина – компонента a_2 . Путем повторного пропускания димерной фракции через фильтрующую колонку было продемонстрировано, что отношение концентраций димеров (Д) и мономеров (М) постоянно в широком диапазоне

концентраций альбумина. При этом в системе не наблюдается быстро устанавливающегося обратимого $D \leftrightarrow M$ равновесия. Таким образом, димеры в растворе альбумина являются стабильными и образованы в результате ковалентного взаимодействия мономеров, и их учет необходим для корректной оценки эффективности комплексообразования альбумина с любыми молекулами, что было доказано в данной работе на примере ThT.

В процессе образования комплекса между ThT и белком альфа-лактальбумином (α -lactalbumin, α -LA) наблюдалось схожее с альбумином поведение зонда. Тогда как параметр τ достигал плато при 50 мкМ α -LA и составлял 990 ± 40 пс, то выход на плато зависимости $Fluo$ от C_p наступал при концентрациях, ~ 1 мМ, а фактор усиления флуоресценции составлял 32.5 (рис. 3А). Значения константы комплексообразования, полученные из указанных зависимостей с помощью формулы (3), составляли $K = (8.3 \pm 1.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(1.9 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, соответственно, то есть, отличались в ~ 40 раз.

Для анализа этого несоответствия было проведено численное моделирование кривых затухания флуоресценции в двухкомпонентной системе: $\tau_1 \ll \tau_{IRF}, \tau_2 \gg \tau_{IRF}$, где τ_{IRF} – аппаратная функция установки, типичная ширина которой для систем с времязадерживающим счетом фотонов составляет $\tau_{IRF} \sim 200$ пс. Такое соотношение характерных времен справедливо для системы ThT-белок, где $\tau_1 = 1$ пс – время жизни флуоресценции свободного ThT, $\tau_2 = 990$ пс – время жизни флуоресценции связанного ThT. Изменение концентрации молекул в возбужденном состоянии n_i в такой системе можно описать следующим уравнением:

$$\frac{dn_i}{dt} = I(t) \cdot \sigma \cdot (1 - n_i) - n_i / \tau_i, \quad (4)$$

где σ_i и τ_i соответствуют сечению поглощения и времени жизни флуоресценции i -й компоненты соответственно, а $I(t)$ – временной профиль лазерного импульса. Затухание флуоресценции при этом можно представить, как:

$$Fluo(t) = C_1 \cdot n_1(t) \cdot k_{r1} + C_2 \cdot n_2(t) \cdot k_{r2}, \quad (5)$$

где C_i и k_{ri} – концентрация и скорость радиационного распада i -й компоненты. Используя уравнение (3), $K = 2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и полную концентрацию ThT 2 μM , были рассчитаны концентрации свободного (C_1) и связанного (C_2) ThT от C_p . Далее с использованием значений C_1 и C_2 и уравнений (4-5) были рассчитаны кривые

затухания флуоресценции, и с использованием уравнений (1-2) были определены значения среднего времени жизни и интенсивности флуоресценции, рассчитанной как интеграл под кинетикой релаксации возбужденного состояния.

С использованием данного моделирования было показано, что уже при $C_2 / C_1 \sim 5\%$ быстрая компонента практически не видна, и аппроксимация соответствующей кривой биэкспоненциального затухания флуоресценции приводит к значениям τ , аналогичным значениям в приближении одной (медленной) составляющей. То есть, амплитуды компонент затухания флуоресценции a_i в уравнениях (1-2) при конечном τ_{IRF} определяются не только их концентрациями, но и временем жизни флуоресценции: при равных концентрациях $a_2 / a_1 \approx \tau_{IRF} / \tau_1$.

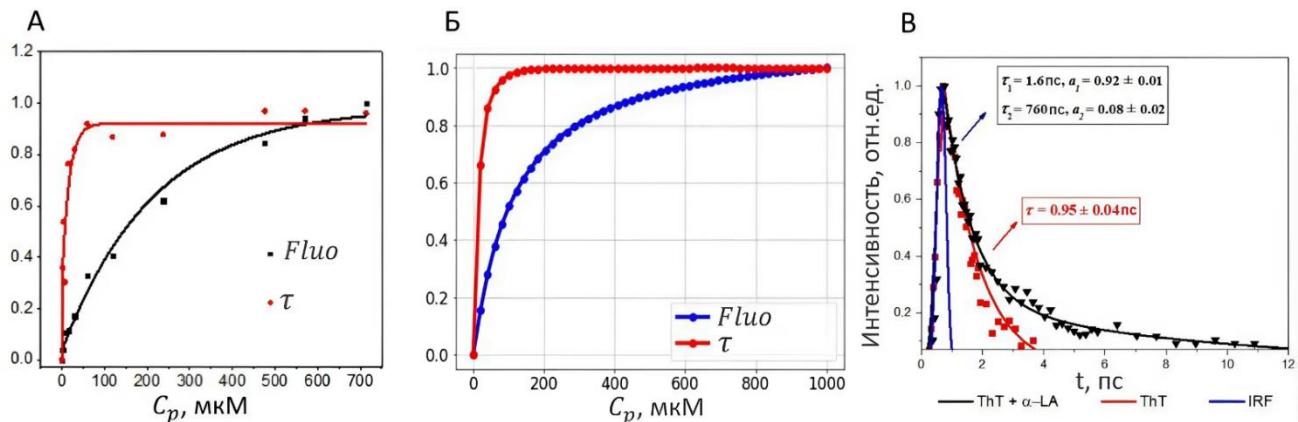


Рисунок 4 – А) Зависимость интенсивности (красные символы) и среднего времени жизни флуоресценции ThT (черные символы) от концентрации α -LA. Кривые нормированы на интервал (0,1). Линией указаны аппроксимации зависимостей уравнением (3), константы комплексообразования составили $K = (8.3 \pm 1.4) \times 10^4 M^{-1}$ и $(1.9 \pm 0.4) \times 10^3 M^{-1}$, соответственно. $C_{ThT} = 2 \mu M$. **Б)** Зависимость интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT от концентрации белка, рассчитанные из кинетик релаксации возбужденного состояния ThT , полученных с использованием уравнений (4) и (5) для различных соотношений C_2/C_1 . Кривые нормированы на интервал (0,1). **В)** Кинетики затухания флуоресценции водного раствора ThT и системы ThT - α -LA ($C_p = 714 \text{ мкM}$), полученные с помощью метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение $\sim 200 \text{ фс}$). Красной и черной линией показана аппроксимация кинетик моно- и биэкспоненциальным законом распада, соответственно (уравнение (1)). Во вставках представлены параметры, полученные в результате аппроксимации. IRF соответствует временному профилю сигнала комбинационного рассеяния воды.

Данная гипотеза также была подтверждена путем измерения кинетики затухания флуоресценции с фемтосекундным временным разрешением с помощью метода ап-конверсии флуоресценции (рис. 4В). Время затухания флуоресценции свободного ThT составило ~ 1 пс, в то время как ширина аппаратной функции установки, измеренная по сигналу комбинационного рассеяния воды, составила 200 фс. В системе ThT-белок преобладала быстрая компонента с временем жизни 1.6 пс (92 %), в то время как амплитуда медленной компоненты в кинетике затухания флуоресценции была значительно меньше (всего 8 %), что находится в согласии с данными моделирования и служит дополнительным доказательством того, что асинхронное изменение *Fluo* и τ при увеличении C_p связано с невозможностью определить быструю компоненту при измерении кинетики затухания флуоресценции с помощью техники время-коррелированного счета единичных фотонов ($\tau_{IRF} \sim 200$ пс), широко применяемой для кинетической флуориметрии.

Третья Глава посвящена исследованию специфичного связывания ThT с фибриллярными наноструктурами и изучению кинетики данного процесса с использованием фотофизических характеристик зонда. Также был проведен дополнительный анализ кинетики агрегации белков путем определения параметров рассеяния раствора, определения размеров образующихся олигомеров и гетерогенности их размера.

Как и в случае неспецифичного связывания зонда, было показано, что изменение интенсивности *Fluo* и среднего времени жизни флуоресценции ThT τ при встраивании в белковые фибриллярные агрегаты на всех этапах процесса агрегации происходит асинхронно (рис. 5А), а именно: τ начинает увеличиваться раньше и достигает плато при значении ~ 1 нс, когда *Fluo* ~ 10 , по сравнению с ~ 400 для раствора полностью сформированных агрегатов. Данный факт не согласуется с механизмом формирования фотофизических свойств ThT по принципу молекулярного ротора [14,27].

Механизмы, ответственные за асинхронное поведение фотофизических характеристик ThT при специфическом взаимодействии с фибриллярными белковыми агрегатами, были исследованы посредством анализа кинетики затухания

флуоресценции с фемтосекундным разрешением с помощью метода ап-конверсии флуоресценции. Так были измерены кинетики релаксации возбужденного состояния системы ThT-фибриллы на двух разных этапах формирования агрегатов: на этапе выхода на плато τ (1) и *Fluo* (2). Показано, что в то время как при анализе затухания флуоресценции ThT в системе (2) наблюдалась только компонента с длительным временем затухания ~ 300 пс, в системе (1) была обнаружена компонента со сверхбыстрым затуханием флуоресценции и амплитудой $>50\%$ (таблица 1). Существование молекул ThT с временем жизни флуоресценции ~ 1 пс и низким квантовым выходом флуоресценции, которые находятся в растворе как в свободной,

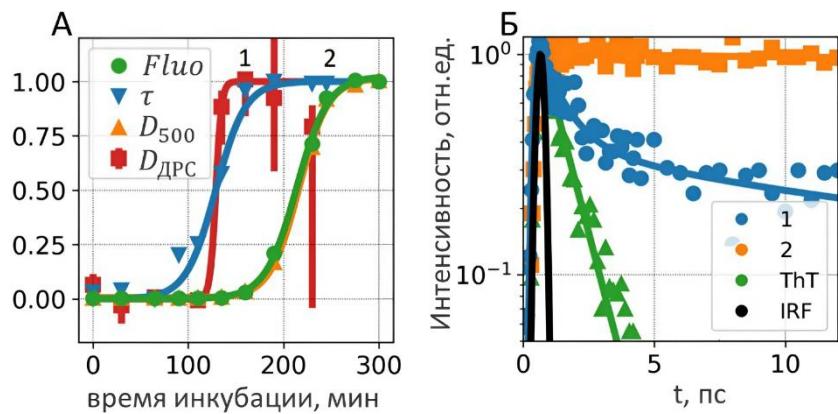


Рисунок 5 – А) Зависимость интенсивности (зеленые символы) и времени жизни флуоресценции ThT (синие символы) в процессе формирования фибриллярных наноструктур. $C_{ThT} = 2 \mu M$. Время жизни флуоресценции было рассчитано из кинетики релаксации возбужденного состояния, полученной с помощью метода время - коррелированного счета единичных фотонов (временное разрешение 200 пс). Оранжевые символы соответствуют оптической плотности раствора фибриллы-*ThT* на 500 нм (D_{500}). Красные символы соответствуют значениям логарифма средних размеров частиц, полученных с помощью ДРС. Красными линиями отмечены 25-й и 75-й перцентили распределения частиц по размерам, полученного с помощью ДРС. Все зависимости нормированы на интервал (0,1). **В)** Кинетики затухания флуоресценции водного раствора ThT (зеленые символы) и образца фибриллы-*ThT* на этапах формирования 1 и 2, полученные с помощью метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение ~ 200 фс). Значения параметров, полученных в результате аппроксимации кривых моно- и биэкспоненциальным законом распада (уравнение (1)) представлены в таблице 1. IRF соответствует временному профилю сигнала комбинационного рассеяния воды.

Таблица 1. Значения параметров, полученных в результате аппроксимации кинетик релаксации возбужденного состояния систем моно- и биэкспоненциальным законом распада (уравнение (1)), измеренных с использованием метода ап-конверсии флуоресценции (временное разрешение ~ 200 фс).

Система	Fluo	τ , нс	ап-конверсия флуоресценции		
			t_1 , пс	t_2 , пс	a_1 / a_2
Водный раствор ThT	-	0.200 ± 0.05	0.95	--	--
Точка (1) на рис.5А	9.4	1.42 ± 0.07	0.95	10.6 ± 2.4	2.8 ± 0.8
Точка (2) на рис. 5А	415	1.66 ± 0.08	315 ± 15	--	--

так и в связанной форме, объясняет низкое усиление флуоресценции, наблюдаемое на стадии (1), когда время жизни флуоресценции ThT, измеренное с субнаносекундным разрешением методом время-коррелированного счета единичных фотонов, достигает плато.

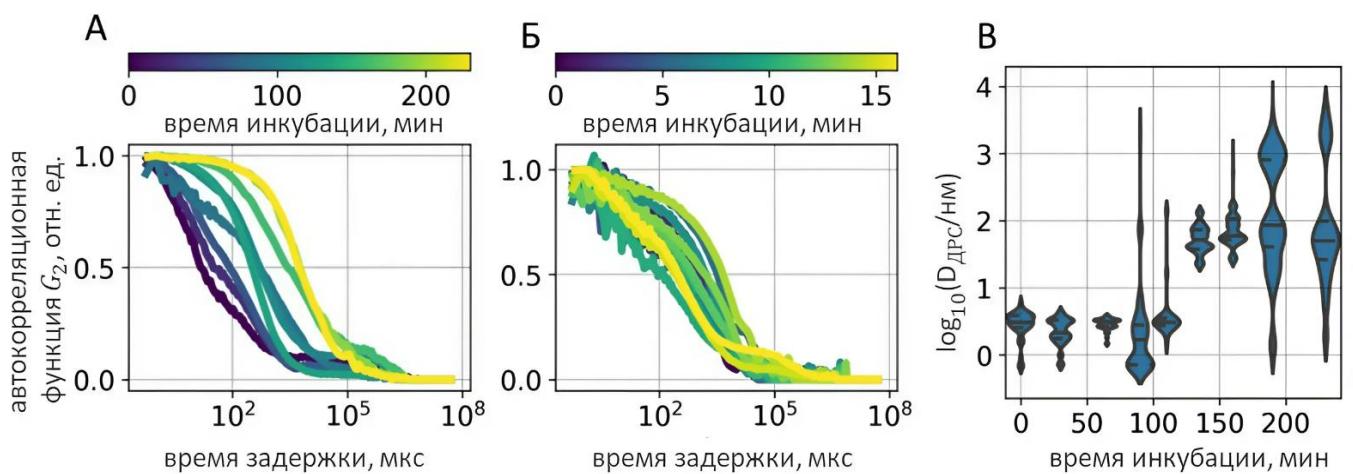


Рисунок 6 – А) Усредненные по 100 измерениям корреляционные функции, измеренные в течение 1 секунды с использованием метода ДРС в каждой точке кинетики формирования фибриллярных наноструктур. **Б)** Семнадцать репрезентативных корреляционных функций одного образца, измеренных в течение 1 секунды. **В)** Распределения логарифма размеров частиц при фибриллообразовании, полученных при анализе корреляционных функций.

Для изучения взаимосвязи между фотофизическими параметрами ThT и размерами, а также гетерогенностью по размеру белковых агрегатов при фибриллообразовании были использованы два взаимодополняющих метода, динамическое рассеяние света (ДРС) и анализ траекторий наночастиц (АТН). Анализ данных ДРС позволил выявить постепенный сдвиг корреляционных функций флуктуаций рассеяния, усредненных по 100 измерениям в каждой точке кинетики формирования фибриллярных агрегатов, каждое из которых проводилось в течение 1 секунды (рис. 6А), что свидетельствует об увеличении среднего размера частиц в системе. Усреднение по большому времени накопления может значительно маскировать информацию о размерах агрегатов в силу высокой степени неоднородности системы: так, на рис. 6Б показаны 17 корреляционных функций для одного и того же образца, каждая из которых измерялась в течение 1 секунды – наблюдается заметный разброс формы кривых. Распределение эффективных размеров частиц (размер может отличаться от реального размера частиц в силу несферичности белковых агрегатов) варьируется в диапазоне до ~3 нм на начальном этапе формирования агрегатов (точка (1) на рис. 5А). На более поздних стадиях значительно возрастает гетерогенность системы, появляются частицы размером ~100 нм и ~1 мкм, что было также подтверждено данными АТН. Наблюдаемый рост размеров агрегатов коррелирует с ростом τ (рис.5 А, точка 1); рис.6 А), при этом оптическая плотность раствора на длине волны 500 нм D_{500} и $Fluo$ начинают увеличиваться на более поздних станциях (рис.5 А, точка 2). На основе полученных данных была сформулирована модель, описывающая изменение оптических свойств ThT при образовании фибрилл: образование некоторого количества крупных (~100 нм) агрегатов приводит к связыванию ~1% молекул ThT в участки с жестким микроокружением, что приводит к увеличению τ (точка 1); дальнейшее образование более крупных агрегатов приводит к увеличению $Fluo$ до тех пор, пока все молекулы ThT не будут встроены в сайты с жестким микроокружением (точка 2).

Четвертая глава посвящена разработке метода картирования фотофизических параметров флуорофоров, в частности, ThT, с помощью конфокальной микроскопии на основе эффекта насыщения флуоресценции.

Величина безразмерного параметра $F\sigma\tau$, где $F = I/\hbar\omega$ - плотность потока фотонов, σ - сечение возбуждения, а τ - время жизни флуорофора, определяет, находится ли система в линейном режиме или в режиме насыщения флуоресценции (рис.7). При $F\sigma\tau \ll 1$ интенсивность флуоресценции линейно зависит от F , а при $F\sigma\tau \gtrsim 1$ наблюдается насыщение флуоресценции (рис.7).

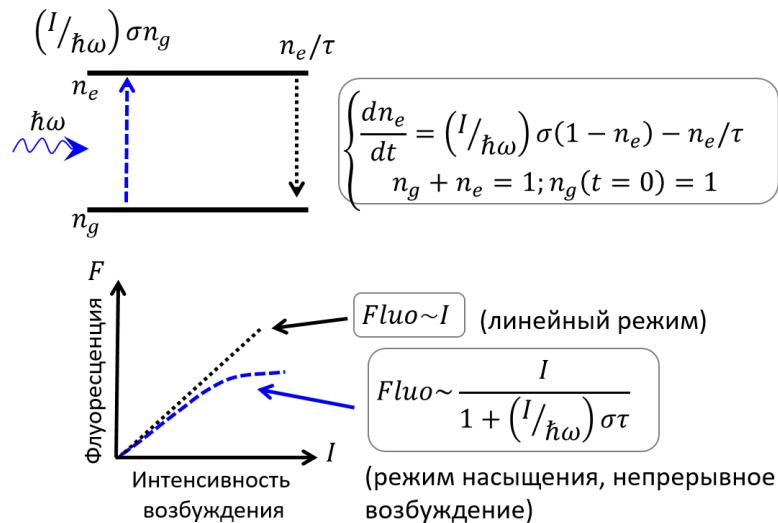


Рисунок 7. Схематическое описание эффекта насыщения флуоресценции при однофотонном возбуждении флуоресценции для двухуровневой системы. На рисунке приводится дифференциальное уравнение, описывающее долю флуорофоров в возбужденном состоянии n_e , где I - интенсивность возбуждения, $\hbar\omega$ - энергия фотона возбуждения, τ - время затухания флуорофора.

Возможность наблюдения линейного режима и режима насыщения флуоресценции с помощью конфокального микроскопа с использованием непрерывного режима возбуждения была продемонстрирована для ThT в водном растворе, а также для ThT, связанного с фибриллярными белковыми агрегатами. Разница параметра $F_{\max}\sigma\tau$ для двух систем составляет три порядка, поскольку время жизни возбужденного состояния свободного и связанного ThT можно оценить как 1 и 1000 пс, тогда как сечение поглощения у них примерно одинаково. В растворах свободного ThT усредненный по всему полю детектирования сигнал флуоресценции линейно возрастает при увеличении плотности потока фотонов до $\sim 1.1 \times 10^{24} \text{ см}^{-2}\text{с}^{-1}$ (рис. 8А), тогда как при специфичном связывании зонда с фибриллами насыщение флуоресценции наблюдалось при плотностях потока фотонов, превышающих

$\sim 0.5 \times 10^{24} \text{ см}^{-2} \text{с}^{-1}$ (рис. 8Б). Данный факт говорит о принципиальной возможности реализации метода микроскопии насыщения с использованием стандартного конфокального микроскопа.

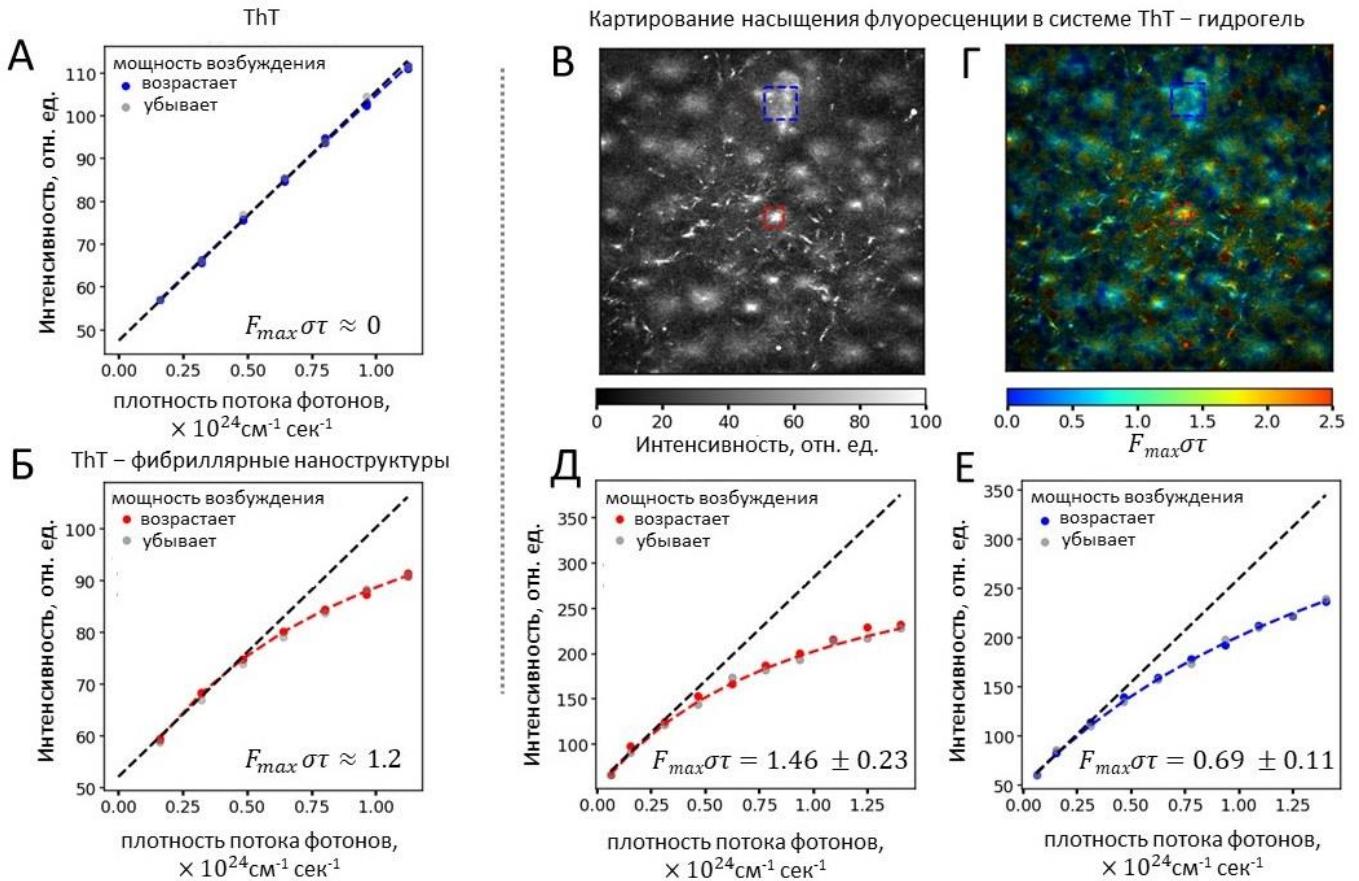


Рисунок 8. — А,Б) Зависимость интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов водного раствора ThT и системы ThT- фибриллярные наноструктуры. В,Г) Карты интенсивности флуоресценции и параметра насыщения $F_{max}\sigma t$ флуоресценции гетерогенной системы фибриллярного гидрогеля, окрашенной ThT. Д,Е) Зависимость интенсивности флуоресценции от плотности потока фотонов для областей карт, изображенных красными (Д) и синими (Е) прямоугольниками на панелях В,Г.

В работе была продемонстрирована возможность картирования параметра насыщения $F_{max}\sigma t$ для гетерогенной системы, окрашенной флуоресцентным красителем. В качестве исследуемой системы был выбран фибриллярный гидрогель, полученный в результате самосборки пептида Fmoc-FF, окрашенный ThT. При самосборке Fmoc-FF агрегирует в структуры, которые связывают ThT с высокой специфичностью, а время жизни флуоресценции ThT в гидрогеле составляет ~ 1 нс и

может быть гетерогенно распределено по различным структурам [29]. На рис. 8 представлены карты интенсивности флуоресценции ThT в параметра насыщения $F_{max}\sigma\tau$, полученные с помощью метода флуоресцентной конфокальной микроскопии. На рис. 8 также представлены кривые насыщения флуоресценции для областей, выделенных красными и синими прямоугольниками – как видно из данных кривых, в то время как выделенные области имеют практически одинаковую интенсивность флуоресценции ThT, параметр $F_{max}\sigma\tau$ отличается почти в два раза и позволяет выявить молекулы ThT с различным микроокружением, которое влияет на время жизни флуоресценции ThT. При этом напрямую в данном эксперименте время жизни не измеряется, а молекулярно-специфичное картирование фотофизических параметров возможно за счет эффекта насыщения флуоресценции. Разработанный метод может найти применение в биоимиджинге в качестве дополнительной модальности, поскольку не требует модернизации конфокальных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении диссертации сформулированы основные результаты и выводы, полученные в настоящей работе:

- 1) Установлено, что связывание ThT с альбумином характеризуется как минимум двумя модами с временами жизни флуоресценции ~ 800 и ~ 2100 пс и соответствующими константами комплексообразования $(0.50 \pm 0.02) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $(2.6 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.
- 2) Было продемонстрировано наличие в растворе альбумина димерной фракции, константа комплексообразования с ThT для которой в ~ 6 раз выше, чем для мономерной. Было показано, что димеры альбумина являются стабильными структурами, и в системе отсутствует обратимое равновесие мономер-димер.
- 3) Асинхронное изменение интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT при связывании с белком объясняется присутствием значительной доли ($>50\%$) фракции зонда со сверхбыстрой релаксацией (~ 1 пс). Данный вклад маскируется при измерении кинетики затухания флуоресценции с субнаносекундным разрешением при наличии $\sim 5\%$ компоненты ~ 1 нс, что было показано с помощью численного моделирования и с использованием метода ап-конверсии флуоресценции.
- 4) Исследование формирования фибрилл показало, что образование некоторого количества крупных (~ 100 нм) агрегатов приводит к связыванию $\sim 1\%$ молекул ThT в участки с жестким микроокружением, что приводит к увеличению τ ; дальнейшее образование более крупных агрегатов приводит к увеличению *Fluo* до тех пор, пока все молекулы ThT не будут встроены в сайты с жестким микроокружением.
- 5) При исследовании взаимодействия ThT с фибриллами было показано, что асинхронное поведение интенсивности и времени жизни флуоресценции ThT, измеренного на установке с шириной аппаратной функции ~ 200 пс, можно объяснить как следствие присутствия в растворе фракции молекул ThT со сверхбыстрым затуханием (~ 1 пс) и маленьким квантовым выходом

флуоресценции. Фотофизические свойства данной фракции были получены с помощью метода ап-конверсии флуоресценции с временным разрешением ~ 200 фс.

- 6) Разработан метод картирование параметра насыщения флуоресценции $F_{max}\sigma\tau$ с использованием конфокального микроскопа. Методология апробирована на примере гетерогенной системы ThT - фибриллярный гидрогель, сформированной из пептида Fmoc-FF. Было показано, что при схожих значениях интенсивности флуоресценции ThT, значение параметра $F_{max}\sigma\tau$ составило 1.46 ± 0.23 и 0.69 ± 0.11 и различалось более чем в два раза в различных структурах гидрогеля.

Публикации автора по теме диссертации

*Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих
Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:*

1. **Rovnyagina N.R.**, Sluchanko N.N., Tikhonova T.N., Fadeev V.V., Litskevich A.Yu., Maskevich A.A., Shirshin E.A. *Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity* // International Journal of Biological Macromolecules, 2018, Vol. 108, P. 284–290. Импакт-фактор 8,5 (JIF). EDN: LYUMDJ. Общий объём статьи = 0,44 п.л., личный вклад = 0,35 п.л.
2. Tikhonova T.N., **Rovnyagina N.R.**, Zhrebker A.Ya., Sluchanko N.N., Rubekina A.A., Orekhov A.S., Nikolaev E.N., Fadeev V.V., Uversky V.N., Shirshin E.A. *Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation* // Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, Vol. 651, P. 13–20. Импакт-фактор 3,0 (JIF). EDN: XXFFWX. Общий объём статьи = 0,5 п.л., личный вклад = 0,4 п.л.
3. **Rovnyagina N.R.**, Tikhonova T.N., Kompanets V.O., Sluchanko N.N., Tugaeva K.V., Chekalin S.V., Fadeev V.V., Lademann J., Darvin M.E., Shirshin E.A. *Free and bound Thioflavin T molecules with ultrafast relaxation: implications for assessment of protein binding and aggregation* // Laser Physics Letters, 2019, Vol. 16, No. 7, P. 075601. Импакт-фактор 1,4 (JIF). EDN: HUNFQT. Общий объём статьи = 0,25 п.л., личный вклад = 0,2 п.л.
4. **Rovnyagina N.R.**, Budylin G.S., Vainer Yu.G., Tikhonova T.N., Vasin S.L., Yakovlev A.A., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Priezzhev A.V., Shirshin E.A. *Fluorescence lifetime and intensity of Thioflavin T as reporters of different fibrillation stages: insights obtained from fluorescence up-conversion and particle size distribution measurements* // International Journal of Molecular Sciences, 2020, Vol. 21, No. 17, P. 6169. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: MPEIHS. Общий объём статьи = 0,5 п.л., личный вклад = 0,4 п.л.
5. Yakimov B., **Rovnyagina N.**, Hasan A., Zhang J., Wang H., Fadeev V., Urusova L., Khoroshilov E., Sharkov A., Mokrysheva N., Shirshin E. *Fluorescence saturation imaging microscopy: molecular fingerprinting with a standard confocal microscope* //

Список цитируемой литературы

1. Rekatsina M. et al. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review // *Adv. Ther.* 2020. Vol. 37, № 1. P. 113–139.
2. Zarkali A. et al. Neuroimaging and fluid biomarkers in Parkinson’s disease in an era of targeted interventions // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, № 1. P. 5661.
3. Zhang S. et al. Targeting amyloid proteins for clinical diagnosis of neurodegenerative diseases // *Fundam. Res.* 2023. Vol. 3, № 4. P. 505–519.
4. Sulatskaya A.I. et al. Investigation of α -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, № 9.
5. LeVine H. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T // *Methods Enzymol.* Academic Press Inc., 1999. Vol. 309. P. 274–284.
6. Amdursky N., Erez Y., Huppert D. Molecular rotors: What lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker // *Acc. Chem. Res.* American Chemical Society, 2012. Vol. 45, № 9. P. 1548–1557.
7. Rovnyagina N.R. et al. Binding of thioflavin T by albumins: An underestimated role of protein oligomeric heterogeneity // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 108. P. 284–290.
8. Malmos K. et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation // *Amyloid*. 2017. Vol. 24. P. 1–16.
9. Sen P. et al. Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2009. Vol. 74, № 1. P. 94–99.
10. Dasgupta M., Kishore N. Characterization and analysis of binding of Thioflavin T with partially folded and native states of α -lactalbumin protein by calorimetric and spectroscopic techniques // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 95. P. 376–384.

11. Manafikhi R. et al. Plasma amyloid β levels in Alzheimer's disease and cognitively normal controls in Syrian population // *Med. J. Islam. Repub. Iran.* Iran University of Medical Sciences, 2021. Vol. 35. P. 19.
12. Groenning M. et al. Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils // *J. Struct. Biol.* Academic Press, 2007. Vol. 159, № 3. P. 483–497.
13. 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.
14. Stsiapura V.I. et al. Thioflavin T as a molecular rotor: Fluorescent properties of thioflavin T in solvents with different viscosity // *J. Phys. Chem. B.* American Chemical Society, 2008. Vol. 112, № 49. P. 15893–15902.
15. Stsiapura V.I. et al. Solvent Polarity Effect on Nonradiative Decay Rate of Thioflavin T // *J. Phys. Chem. A.* American Chemical Society, 2016. Vol. 120, № 28. P. 5481–5496.
16. Bhasikuttan A.C., Mohanty J. Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors // *Chem. Commun. Royal Society of Chemistry*, 2017. Vol. 53, № 19. P. 2789–2809.
17. Stsiapura V.I. et al. Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of thioflavin T in low-viscosity solvents // *J. Phys. Chem. A.* American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 32. P. 8345–8350.
18. Fadeev V. V et al. Saturation spectroscopy as a method for determining the photophysical parameters of complicated organic compounds // *Opt. Commun.* 1999. Vol. 166, № 1. P. 25–33.
19. Fadeev V. V, Gorbunov M.Y., Gostev T.S. Studying photoprotective processes in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* using nonlinear laser fluorimetry // *J. Biophotonics.* Wiley Online Library, 2012. Vol. 5, № 7. P. 502–507.
20. Zhang Y. et al. Super-resolution fluorescence microscopy by stepwise optical saturation // *Biomed. Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 4. P. 1613–1629.

21. Visscher K., Brakenhoff G.J., Visser T.D. Fluorescence saturation in confocal microscopy // *J. Microsc.* Wiley Online Library, 1994. Vol. 175, № 2. P. 162–165.
22. Hell S.W. Toward fluorescence nanoscopy // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 11. P. 1347–1355.
23. Zhao G. et al. Resolution enhancement of saturated fluorescence emission difference microscopy // *Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2016. Vol. 24, № 20. P. 23596–23609.
24. Nawa Y. et al. Saturated excitation microscopy using differential excitation for efficient detection of nonlinear fluorescence signals // *APL Photonics.* 2018. Vol. 3, № 8. P. 80805.
25. Qing-xin Hua, Weiss M.A. Mechanism of insulin fibrillation. The structure of insulin under amyloidogenic conditions resembles a protein-folding intermediate // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 20, P. 21449–21460.
26. Mohanty J. et al. Early detection of insulin fibrillation: A fluorescence lifetime assay to probe the pre-fibrillar regime // *Chem. Commun.* Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 48, № 18. P. 2403–2405.
27. Stsiapura V.I. et al. Charge transfer process determines ultrafast excited state deactivation of thioflavin T in low-viscosity solvents // *J. Phys. Chem. A.* American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 32. P. 8345–8350.
28. Singh P.K., Mora A.K., Nath S. Ultrafast fluorescence spectroscopy reveals a dominant weakly-emissive population of fibril bound thioflavin-T // *Chem. Commun.* Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 51, № 74. P. 14042–14045.
29. 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.