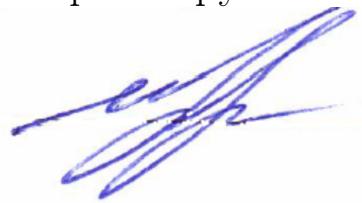


На правах рукописи



Горбунова Иоанна Алексеевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ МОЛЕКУЛ NADH В РАСТВОРАХ
МЕТОДАМИ ФЕМТОСЕКУНДНОЙ
ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ ЛАЗЕРНОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ**

Специальность 1.3.6 —
«Оптика»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург — 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Научный руководитель:

Васютинский Олег Святославович, д.ф.-м.н., зав.лабораторией оптики биомолекул и кластеров, ФГБУН Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Иванов Вадим Константинович, д.ф.-м.н., профессор Физико-математического института, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Анкудинов Александр Витальевич, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических свойств полупроводников, ФГБУН Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита состоится 12 октября 2023 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 34.01.03 на базе Физико-технического института им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФТИ им. А. Ф. Иоффе и на сайте www.ioffe.ru.

Отзывы и замечания по автореферату в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, просьба выслать по вышеуказанному адресу на имя ученого секретаря диссертационного совета ФТИ 34.01.03.

Автореферат разослан " " июля 2023 г..

Ученый секретарь
диссертационного совета 34.01.03
к.ф-м.н



Е.В. Единач

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений биофизики, биомедицины и биотехнологий является разработка неинвазивных лазерных методов диагностики живых клеток, тканей, и микроорганизмов. Наиболее распространенным методом является мониторинг флуоресценции естественных или искусственных биологических молекулярных зондов при их облучении лазерными импульсами. [1; 2] При использовании фемтосекундных лазерных импульсов этот мониторинг может осуществляться в режиме реального времени. В частности, большой интерес представляют исследования естественного внутриклеточного кофермента никотинамид-аденин-динуклеотида (NAD), который является регулятором окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках живых организмов. В клетках NAD существует в двух формах: окисленной (NAD⁺) и восстановленной (NADH). Исследования поляризационно-зависимых фотофизических и фотохимических свойств кофермента NADH очень актуальны и имеют значительное распространение в мировом научном сообществе. [3; 4] Несмотря на то, что эти исследования проводятся уже несколько десятилетий и их возможные важные практические применения были установлены, одной из актуальных нерешенных проблем являлась количественная и качественная интерпретация получаемых фотофизических параметров и их связь с химико-биологическими процессами [5]. Например, до настоящего времени шли активные дискуссии о природе существования двух времен затухания флуоресценции NADH в растворах, а также существования только одного, но значительно более длинного времени затухания флуоресценции NADH, связанного с белками, причем интерпретации сильно отличались у разных авторов. Другой малоизученной проблемой являлись свойства и природа анизотропии флуоресценции и поглощения молекул NADH [6].

Таким образом, возникает потребность в проведении фундаментальных исследований динамики возбужденного состояния NADH методами время-разрешенной поляризационной лазерной спектроскопии. Использование этих методов обусловлено их высокой спектральной и молекулярной специфичностью, а также возможностью диагностики быстрых фотоиндуцированных процессов в режиме реального времени.

Динамика возбужденных состояний многоатомных биологических молекул характеризуется процессами изотропной и анизотропной релаксации, которые обусловлены как внутримолекулярными факторами (перенос энергии между молекулярным группами, молекулярными конформациями и тд.), так и взаимодействиями с окружающими молекулами растворителя (вращательная диффузия, электростатические взаимодействия и тд.). Характерные времена этих процессов можно определить, используя поляризационно-чувствительные методы исследования. Например, времена вращательной диффузии при определенных условиях могут служить индикатором внутреклеточной вязкости, а также процессов связывания коферментов с крупными молекулярными комплексами. Времена затухания флуоресценции, параметр анизотропии флуоресценции и времена деполяризации флуоресценции чувствительны к молекулярным конформациям. В диссертационной работе были проведены экспериментальные исследования динамики возбужденного состояния NADH в растворах различной вязкости и полярности, а также при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH). В исследованиях применялись два существенно различных взаимодополняющих экспериментальных метода: метод поляризационной спектроскопии флуоресценции и поляризационно-чувствительный метод накачка-зондирование.

Результаты диссертационной работы могут в дальнейшем быть использованы для исследований стереохимии окислительно-восстановительных реакций с участием NADH, генерации активных форм кислорода в процессе окислительно-восстановительных реакций, фотоизомеризации и фотофрагментации молекул NADH. Разработанные теоретические модели могут иметь важное значение для описания процессов структурного преобразования NADH в ходе окислительно-восстановительных реакций в живых клетках. Кроме того, на настоящий момент существует достаточно высокая потребность в разработке новых спектральных методов для неинвазивного исследования животных клеток, растительных клеток, а также бактерий и микроорганизмов без нарушения их жизненного цикла.

Целью данной работы является проведение комплексных исследований динамики возбужденных состояний NADH методами многофотонной поляризационной лазерной спектроскопии с пикосекундным и субпикосекундным временным разрешением.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести исследования поляризованной флуоресценции молекул NADH в водных-растворах метанола при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. Получить и обработать сигналы затухания поляризованной флуоресценции.
2. Проанализировать зависимости параметров затухания флуоресценции: времен затухания флуоресценции, весовых коэффициентов, времени вращательной диффузии, коэффициентов анизотропии от вязкости, полярности раствора и молекулярных конформаций NADH.
3. Провести эксперименты по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции NADH, связанного с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH). Проанализировать различия в параметрах затухания флуоресценции свободного NADH и комплекса NADH-ADH.
4. Разработать новый экспериментальный метод на основе схемы накачка-зондирование для исследования быстрых релаксационных процессов в возбужденных состояниях многоатомных молекул.
5. Применить разработанный метод для исследования анизотропной безызлучательной релаксации первого возбужденного состояния NADH в растворах различной вязкости и полярности.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Существование двух времен затухания флуоресценции молекул NADH в растворах обусловлено различными скоростями безызлучательной релаксации в *cis*- и *trans*-конформациях никотинамида вследствие различных распределений зарядов в этих конформациях.
2. Существование единственного времени затухания флуоресценции молекул NADH, связанных с ферментом алкоголь-дегидрогеназа, обусловлено их нахождением в сайтах связывания только в *trans*-конформации. Увеличение времени затухания флуоресценции молекул NADH, связанных с алкоголь-дегидрогеназой, более чем на порядок по сравнению с временем затухания флуоресценции свободных молекул NADH, обусловлено снижением эффективности

безызлучательных релаксационных процессов за счет значительно-го уменьшения полярности сайта связывания по сравнению с поляр-ностью водного раствора.

3. Квантовый выход флуоресценции NADH в водных растворах мета-нола, этанола и пропиленгликоля растет при увеличении вязкости и уменьшении полярности растворителя за счет снижения эфек-тивности процессов безызлучательной релаксации. Квантовый вы-ход содержит вклады от относительно медленных наносекундных и быстрых пикосекундных процессов релаксации.
4. Затухание поляризации флуоресценции комплекса NADH-алкоголь-дегидрогеназа, экспериментально обнаруженное в наносекундном диапазоне, обусловлено анизотропной колебательной релаксацией в возбужденном состоянии NADH, приводящей в повороту дипольно-го момента перехода флуоресценции.
5. Разработанный метод поляризационно-модуляционной спектроско-пии накачка-зондирование позволяет детектировать безызлучатель-ную релаксацию в многоатомных биологических молекулах с вре-менным разрешением менее 0.3 пс при возбуждении фемтосекунд-ными импульсами лазера с энергией в импульсе менее 1 нДж.
6. Изменение во времени линейного дихроизма молекул NADH в водно-спиртовых растворах обусловлено поворотом дипольного мо-мента перехода молекул в процессе колебательной релаксации и вра-щательной диффузии.

Научная новизна:

1. Показано, что наличие двух экспериментально наблюдаемых вре-мен затухания флуоресценции молекул NADH в растворах мо-жет быть обусловлено различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях никотинамида.
2. На основе исследования квантового выхода и времен затухания флу-оресценции NADH были разделены вклады наносекундных и пи-косекундных каналов безызлучательной релаксации возбужденных состояний NADH.
3. Разработан и апробирован принципиально новый метод определе-ния относительной концентрации сложенных и развернутых кон-

формации NADH, основанный на измерении времен вращательной диффузии в водно-спиртовых растворах.

4. Установлено, что существование единственного времени затухания флуоресценции $\tau_4 \approx 4$ нс в комплексе NADH-ADH обусловлено низкой полярностью сайта связывания фермента и тем, что NADH находится в этом сайте в единственной *trans*-конфигурации.
5. Обнаружен процесс деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH с временем $\tau_{rb} = 1$ нс. Показано, что этот процесс обусловлен быстрой перестройкой конфигурации ядер в возбужденном состоянии NADH, сопровождающейся изменением направления dipольного момента перехода молекулы.
6. Разработан новый метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование, позволяющий исследовать динамику возбужденного состояния биологических молекул с субпикосекундным времененным разрешением при возбуждении лазерными импульсами с энергией порядка 1 нДж. Метод апробирован для исследования динамики анизотропных процессов релаксации в возбужденном состоянии молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности.

Все вышеперечисленных результаты обладают приоритетом на международном уровне.

Практическая значимость

Актуальность проведенных исследований поляризационно-зависимых фотофизических и фотохимических процессов, происходящих при возбуждении кофермента NADH в растворах обусловлена тем, что они позволили решить ряд проблем в этой области. А именно, объяснение природы двух времен затухания флуоресценции NADH в растворах, а также существования только одного, но значительно более длинного времени затухания флуоресценции NADH, связанного с белками. До настоящего времени интерпретации этих времен сильно отличались у разных авторов. Кроме того были детально изучены свойства и природа анизотропии флуоресценции и поглощения молекул NADH. Результаты исследований могут быть использованы для получения детальной информации таких важных процессов с участием NADH, как стереохимия окислительно-восстановительных реакций, перенос прото-

нов и электронов, генерация активных форм кислорода, фотоизомеризация, фотофрагментация и многих других.

Практическая значимость проведенных исследований обусловлена тем, что результаты, полученные в настоящей работе, могут быть применены в различных сферах: мониторинг клеточного метаболизма, мониторинг реакций фотосинтеза в растительных клетках, анализ эффективности новых антибактериальных препаратов при мониторинге их воздействия на бактериальные линии. Более того, в рамках настоящей работы был разработан новый перспективный метод фемтосекундной поляризационной лазерной спектропсии накачка-зондирование, который позволит в режиме реального времени отслеживать фотофизические и фотохимические процессы в много атомных биологических молекулах в живых клетках и тканях.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на 12 всероссийских и международных конференциях в качестве 9 устных и 3 стендовых докладов: VI Съезд биофизиков России (16-21 сентября 2019 г., Сочи, Россия); Saratov Fall Meeting 2020, Conferences And Workshops Of VIII Symposium On Optics and Biophotonics (28 сентября – 3 октября 2020, Саратов, Россия); 7th International School and Conference "Saint-Petersburg OPEN 2020"on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (27 апреля 2020, Санкт-Петербург, Россия); 6 th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, SPIE Optical Engineering + Applications (октябрь, 2020, on-line); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists “MENDELEEV 2021“ (сентябрь 2021, Санкт-Петербург, Россия); Четвертая международная конференция «Физика — наукам о жизни» (11-14 октября 2021, Санкт-Петербург, Россия); Современные проблемы фотобиологии (12–19 сентября 2021, Шепси, Россия); The International Conference Laser Optics (20-24 июня 2022, Санкт-Петербург, Россия); XXXIV Симпозиум «Современная химическая физика» (16-25 сентября, 2022, г. Туапсе, Россия), Международный симпозиум Saratov Fall Meeting 2022 (26-30 сентября, 2022, Саратов, Россия) и др.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке грантов:

1. РФФИ № 18-53-34001 Куба_т
2. РФФИ № 18-03-00038 А
3. «Базис» № 19-1-1-13-6

Личный вклад. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии автора в постановке эксперимента, разработке алгоритмов анализа полученных экспериментальных сигналов, а также анализе, обобщении и публикации результатов работы. Обсуждение и интерпретация полученных результатов проводилась совместно с научным руководителем и соавторами публикаций.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 9 печатных изданиях, опубликованных в российских и международных научных изданиях. Список публикаций по теме диссертационной работы приведен в Заключении.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и трех приложений. Полный объём диссертации составляет 168 страниц с 50 рисунками и 16 таблицами. Список литературы содержит 170 наименований.

Содержание работы

Во **введении** обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы, приводятся основные положения, выносимые на защиту, сформулированы научная новизна и практическая значимость представляющей работы.

Первая глава диссертационной работы представляет собой обзор литературы по методам время-разрешенной лазерной спектроскопии и их применению для исследования многоатомных биологических молекул. В разделе **1.1** рассмотрены основные процессы, происходящие в возбужденных состояниях многоатомных биологических молекул, приведены основные параметры, которые характеризуют эти процессы и могут быть получены непосредственно из эксперимента. В разделе **1.2** обсуждаются теоретические и практические основы метода флуоресцентной время-разрешенной спектроскопии. Отдельное внимание уделено методу время-корреляционного счета фотонов (TCSPC). В разделе **1.3** рассмотрены теоретические и практические основы метода спектроскопии накачка-зондирование, обсуждаются процессы, происходящие при воздействии импульсов накачки и зондирующих импульсов на экспериментальный образец. Также приводится краткий обзор результатов

исследований динамики фотохимических реакций переноса заряда и фотоизомеризации в многоатомных биологических молекулах с помощью метода накачка-зондирование. В разделе 1.4 обсуждаются поляризационно-зависимые явления, возникающие при взаимодействии поляризованного лазерного излучения с многоатомными биологическими молекулами, а именно рассмотрен механизм оптического выстраивания и механизм возникновения анизотропии флуоресценции. Также рассмотрены различные анизотропные механизмы релаксации, приведены их характерные скорости для различных молекул и обсуждаются методы исследования этих процессов с пикосекундным и субпикосекундным временным разрешением. В последнем разделе 1.5 приводится обзор полученных ранее результатов исследования флуоресценции кофермента NADH методами время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии.

Вторая глава посвящена исследованию фотофизических свойств молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами. В качестве растворителей использовались водные–растворы метанола различной концентрации.

В разделе 2.1 подробно описан метод наблюдения сигналов затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции молекул NADH, представлена схема экспериментальной установки, а также подробно обсуждается процедура анализа полученных экспериментальных сигналов. Для наблюдения сигналов затухания поляризованной флуоресценции молекул NADH был использован метод TCSPC. Возбуждение исследуемых молекул осуществлялось посредством двухфотонного поглощения при облучении линейно- или циркулярно-поляризованным лазерным излучением на длине волны 720 нм. Ортогональные поляризационные компоненты флуоресценции NADH I_{\parallel} и I_{\perp} разделялись с помощью призмы Глана, а затем регистрировались одновременно и независимо двумя быстрыми лавинными фотодиодами, работавшими в режиме счета фотонов. Для анализа сигналов затухания $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ была написана программа на языке Python3. Для определения параметров изотропной и анизотропной составляющих сигналов затухания флуоресценции использовалась процедура глобальной аппроксимации сигна-

лов с учетом свертки теоретической модели с функцией отклика детекторов $IRF(t)$:

$$I_{\parallel}(t) = IRF(t) * I_0[a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)][1 + 2r_i \exp(-t/\tau_r)] \quad (1)$$

$$I_{\perp}(t) = G \cdot IRF(t) * I_0[a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)][1 - r_i \exp(-t/\tau_r)], \quad (2)$$

где времена затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 , весовые коэффициенты a_1 и a_2 , время вращательной диффузии τ_r и параметры анизотропии r_i , где $i=1$ соответствует линейно-поляризованному возбуждению, а $i=c$ - циркулярно-поляризованному возбуждению, использовались в качестве подгоночных параметров

Для построения целевой функции использовался метод максимального правдоподобия (Maximum likelihood estimation), в котором при большом числе фотонов (более 5000 счетов) использовалось распределение Гаусса, а при малом числе фотонов использовалось распределение Пуассона. Минимизация целевой функции осуществлялась с помощью алгоритма дифференциальной эволюции из библиотеки SciPy. Аппроксимация сигналов затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции NADH для случаев линейной и циркулярной поляризации возбуждающего излучения проводилась отдельно.

В разделе **2.2** представлены полученные экспериментальные параметры. На Рис. 1 а)-в) приведены зависимости времен затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 и вклада длинного времени затухания в сигнал a_2 , времени вращательной диффузии τ_r от концентрации метанола в растворе. На Рис. 1 г) приведена зависимость времени вращательной диффузии от вязкости водных растворов метанола с концентрацией от 0 до 40 %.

Как показано на Рис. 1 а), время τ_1 практически не менялось при увеличении концентрации метанола в растворе, а время τ_2 монотонно возрастало. Как показано на Рис. 1 б) вклад длинного времени затухания τ_2 монотонно увеличивался при увеличении концентрации метанола в растворе. Значения времен затухания флуоресценции NADH в водном растворе $\tau_1 = 260$ пс и $\tau_2 = 610$ пс и их вклады в сигнал хорошо согласуются с результатами, полученными ранее другими исследователями [6–8]. Время вращательной диффузии

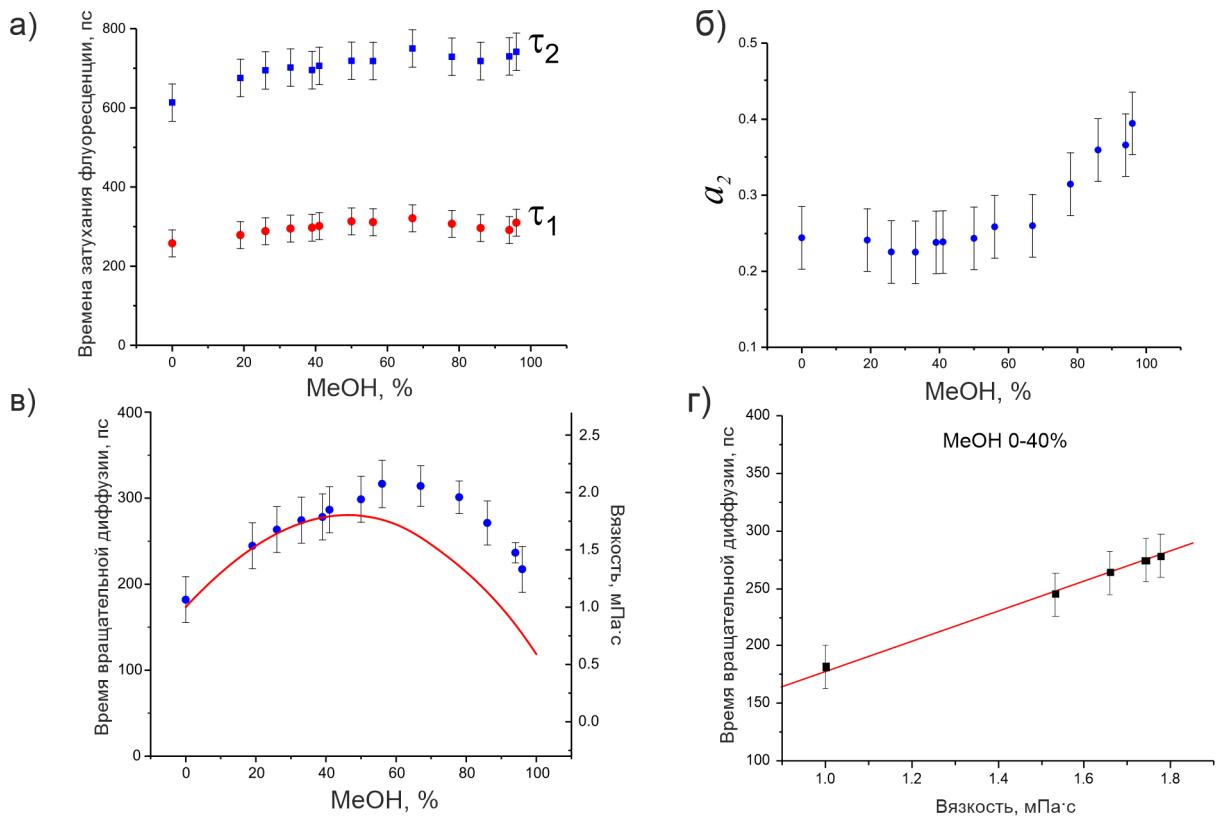


Рис. 1 — Параметры затухания флуоресценции NADH в зависимости от концентрации метанола (MeOH) в растворе: а) времена затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 , б) вклад длинного времени затухания в сигнал a_2 , в) время вращательной диффузии τ_r и вязкость водных растворов метанола (красная линия.) г) Зависимость времени вращательной диффузии от вязкости водных растворов метанола с концентрацией от 0 до 40 %.

τ_r , приведенное на 1 в), нелинейным образом зависело от концентрации метанола в растворе, достигая максимального значения при концентрации метанола около 60 %. Время вращательной диффузии NADH в водном растворе было равно $\tau_r = 180$ пс, что хорошо согласуется с результатами, полученным ранее Купри и др. [9]. Коэффициенты анизотропии были равны $r_l = 0.47$ и $r_c = -0.22$ и практически не зависели от концентрации метанола. Обсуждения полученных экспериментальных результатов представлены в разделах 2.4 и 2.5.

В разделе 2.3 представлены результаты *ab initio* расчетов нескольких геометрических конфигураций NADH в воде и в метаноле. В расчетах были рассмотрены конформации NADH, характеризующиеся расстоянием между аденином и никотинамидом R_{NA-AD} , которые можно поделить на две группы: сложенные $R_{NA-AD} < 6$ Å и развернутые $R_{NA-AD} > 10$ Å. Для каждой

такой геометрической конфигурации NADH были рассмотрены *cis*- и *trans*-конформации, которые определяются положением амидной группы относительно пиридинового кольца и характеризуются углом ϕ_{C2N-Nn} . В результате расчетов было показано, что вертикальные энергии переходов, силы осциллятора и распределения зарядов не зависят от расстояния между никотинамидом и аденином. Для разложенной конформации были определены точечные заряды на всех ядрах никотинамида для *cis*- и *trans*-конформаций в воде в основном состоянии и в первом возбужденном состоянии. Было получено, что распределение зарядов различаются для *cis*- и *trans*-конформаций никотинамида (NA). На основе полученных результатов была разработана модель, объясняющая природу двух времен затухания флуоресценции NADH. Подробное описание модели представлено в разделе 2.4. В основе модели лежит предположение, что неоднородность измеренных времен затухания связана с различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конформациях NA, что приводит к различному распределению электростатического поля в этих двух конформациях. Это в свою очередь обуславливает различие скоростей безызлучательной релаксации в *cis*- и *trans*-конформациях. [10] Также из расчетов *ab initio* было показано, что направление дипольного момента перехода флуоресценции отличается для *cis*- и *trans*-конформаций более чем на 10°.

В разделе 2.5 осуждаются результаты измерений анизотропии флуоресценции NADH и времени вращательной диффузии NADH. При этом на основании экспериментальных значений анизотропии флуоресценции r_l и r_c и параметра Ω были определены компоненты тензора двухфотонного возбуждения S и проведен анализа симметрии перехода при двухфотонном возбуждении. Для определения компонент тензора двухфотонного перехода был использован формализм неприводимых сферических тензоров [A4]. В результате было обнаружено два канала двухфотонного возбуждения, для которых значения компонент тензора двухфотонного перехода значительно отличаются. В одном из каналов продольно-диагональная компонента тензора двухфотонного возбуждения $S_{zz}/TrS = 0.95$ доминировала над поперечно-диагональными компонентами $(S_{xx} + S_{yy})/TrS = 0.05$, указывая на то, что двухфотонное возбуждение параллельно направлению главной оси никотинамида.

Второй канал двухфотонного возбуждения, характеризуется недиагональными компонентами тензора двухфотонного перехода S_{xz} и S_{yz} .

Поведение времени вращательной диффузии τ_r было проанализировано в зависимости от вязкости раствора и молекулярных конформаций NADH. Было показано, что при концентрациях метанола в растворе менее 40 % время вращательной диффузии линейно увеличивалось при увеличении вязкости раствора (см. Рис. 1 г)). При концентрациях метанола более 40% время вращательной диффузии содержало добавку, которая в рамках развитой нами модели была обусловлена изменением распределения конформаций NADH. Количественная интерпретация этих эффектов была выполнена на основе модифицированного соотношения Эйнштейна-Стокса [A4], в котором время вращательной диффузии τ_r было представлено в виде суммы вкладов от свернутой и развернутой конформаций. На основании этой модели была определена относительная концентрация сложенных конформаций NADH для различных условий смачиваемости C_{un} и C_{fol} и молекулярного объема V_{un} и V_{fol} (Рис. 2). Величина $V_{fol} = 0.488 \text{ нм}^3$ представляет собой минимально возможный молекулярный объем NADH, посчитанный методом инкрементов. Коэффициенты смачиваемости для сложенной конформации $0 \leq C_{fol} \leq 1$ и развернутой конформации $0 \leq C_{un} \leq 1$ выступали в качестве подгоночных параметров.

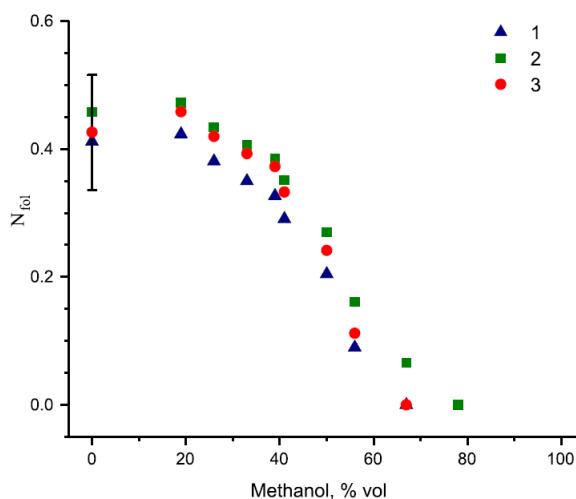


Рис. 2 – Относительная концентрация сложенных конформаций N_{fol} NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе.

1. $C_{un} = 0.64$, $C_{fol} = 0.70$, $V_{un} = 0.528 \text{ нм}^3$, $V_{fol} = 0.548 \text{ нм}^3$
2. $C_{un} = 0.75$, $C_{fol} = 0.80$, $V_{un} = 0.488 \text{ нм}^3$, $V_{fol} = 0.488 \text{ нм}^3$
3. $C_{un} = 0.70$, $C_{fol} = 0.85$, $V_{un} = 0.488 \text{ нм}^3$, $V_{fol} = 0.488 \text{ нм}^3$

В результате проведенных исследований было показано, что времена затухания флуоресценции NADH τ_1 и τ_2 обусловлены различием эффективности процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии *cis*- и *trans*- конформаций NADH, а предэкспоненциальные коэффициенты a_1 и a_2 характеризуют долю этих конформаций в возбужденном состоянии. В свою очередь сложенные и развернутые конформации NADH оказывают влияние на наблюдаемое время вращательной диффузии τ_r .

В третьей главе обсуждаются результаты измерений квантового выхода флуоресценции NADH в водных растворах этианола, метанола и пропиленгликоля. В разделе **3.1** приведено описание экспериментальной установки, которая использовалась для измерения квантового выхода флуоресценции. Полученные экспериментальные зависимости квантового выхода флуоресценции от концентрации спиртов в растворе подробно обсуждаются в разделе **3.2**. Эти зависимости представлены на Рис. 3. Квантовый выход флуоресценции в NADH воде был равен $\Phi = 2.1 \pm 0.2 \%$, что хорошо согласуется с полученным ранее результатами [11; 12].

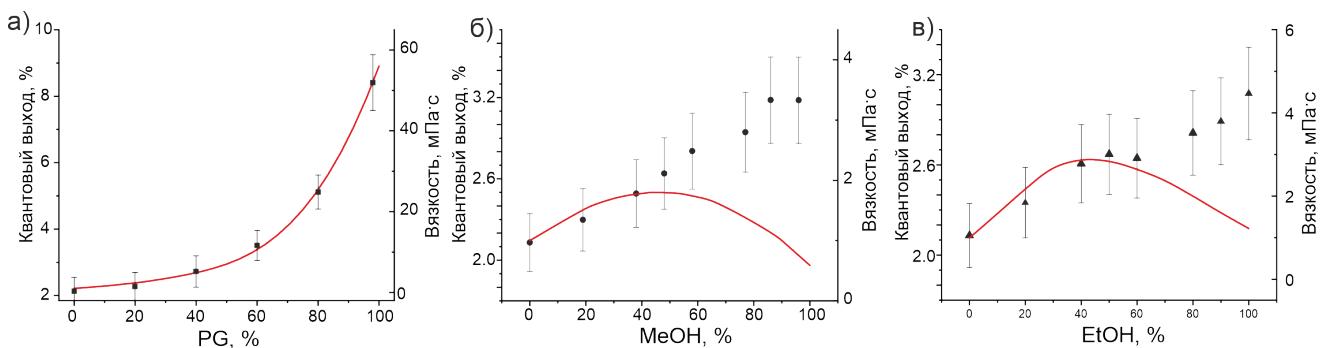


Рис. 3 — Зависимость квантового выхода флуоресценции NADH от концентрации а)пропиленгликоля (PG), б) метанола (МеOH) и в)этанола (EtOH) в растворе.

Для анализа экспериментальных результатов, приведенных на Рис 3. была разработана модель, которая описывает возбуждение молекулярной флуоресценции лазерными импульсами и позволяет разделить быстрые (пикосекундные) и относительно медленные (наносекундные) каналы безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии. Краткое обсуждение этой модели представлено в разделе **3.3**, а более подробно описание модели и теоретические выражения приведены в работе [A6]. В результате использования этой модели было получено выражение для квантового выхода флуоресценции,

в котором были разделены два различных канала релаксации, приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния NADH: $\Phi = \Phi_D \Phi_B$. Член Φ_D представляет собой квантовый выход процессов быстрого тушения флуоресценции. Член Φ_B представляет собой квантовый выход медленных безызлучательных и излучательных процессов релаксации, которые характеризуются временами затухания флуоресценции τ_1 и τ_2 . Анализ зависимости квантового выхода флуоресценции и времен затухания флуоресценции NADH от концентрации спиртов в растворе на основе , проведенный на основе разработанной модели, представлен в разделе **3.4**. В результате было показано, что увеличение квантового выхода флуоресценции NADH в растворах вода-метанол и вода-этанол с увеличением концентрации спиртов происходило за счет относительно медленных механизмов наносекундной безызлучательной релаксации Φ_B , обусловленных взаимодействием молекул NADH с молекулами растворителя, а также изменением относительной концентрации *cis*- и *trans*-конформаций NADH при увеличении концентрации спирта. При этом для растворов вода-пропиленгликоль было обнаружено снижение эффективности пикосекундного тушения флуоресценции NADH Φ_D при высоких концентрациях пропиленгликоля, что объясняется замедлением скорости быстрых внутримолекулярных процессов синглет-триплетной конверсии и неадиабатических электронных переходов в растворах высокой вязкости.

В четвертой главе приведены результаты исследования фотофизических свойств NADH при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) в растворах. Исследования проводились путем наблюдения затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции. Использованная экспериментальная методика подробно описана в Главе 2 в разделе **2.1**. Во введение Главы **4** представлены полученные экспериментальные сигналы, анализ этих сигналов проводился в несколько этапов. Сначала была проанализирована изотропная часть сигналов $I_{iso}(t)$, результаты этого анализа приведены в разделе **4.1**. Изотропный сигнал затухания флуоресценции $I_{iso}(t)$ был проанализирован с использованием функции суммы двух, трех и четырех экспонент. Показано, что модель с четырьмя экспонентами является наиболее предпочтительной для анализа сигналов затухания флуоресценции в случае совместного наблюдения свободного и связанного с ферментом NADH. Было выделено две группы времен затухания: два времени затухания

τ_1 и τ_4 , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH–ADH, и времена τ_2 и τ_3 , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе. Было установлено, что комплекс NADH-ADH характеризуется временем затухания флуоресценции $\tau_4 = 4.5$ нс, что в несколько раз превышает времена затухания свободного NADH в растворе. Помимо наносекундного времени затухания τ_4 , наблюдалось короткое время затухания τ_1 порядка 0.10–0.12 нс. Предполагается, что это время возникает либо за счет взаимодействия NADH с аминокислотами в сайте связывания ADH в возбужденном состоянии, либо за счет переноса энергии между двумя молекулами NADH. Теоретическое описание природы этих явлений выходит за рамки настоящей работы.

Раздел 4.2 посвящен объяснению природы наносекундного времени затухания флуоресценции ($\tau_4 = 4.5$ нс) комплекса NADH–ADH. Был сделан вывод, что наблюдение единственного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH можно объяснить на основе модели *cis*- и *trans*-конформаций NADH (см. раздел 2.3 в Главе 2), поскольку NADH в сайте связывания ADH всегда находится в *trans* конформации. Для объяснения значительного увеличения этого времени, по сравнению со свободным NADH, были проведены *ab initio* расчеты электронной структуры NADH в условиях различной диэлектрической проницаемости, для того, чтобы смоделировать изменения электростатического окружения в сайте связывания ферментов. На Рис. 4 приведено значение электрического заряда на атоме кислорода амидной группы в зависимости от диэлектрической проницаемости ϵ . При $\epsilon < 10$ отрицательный заряд на атоме кислорода резко уменьшается примерно на 5%. Принимая во внимание, что внутримолекулярные электростатические поля обычно очень сильны, небольшие изменения заряда при малых ϵ могут значительно влиять на изменение внутримолекулярного поля, что проводит к изменению скоростей безызлучательной релаксации NADH при связывании с ферментом ADH.

Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH–ADH была разработана модель, в которой предполагается, что экспериментальный сигнал может быть представлен как сумма вкладов связанного с ферментом и свободного NADH. Подробное описание модели представлено в разделе 4.3 и в работе [A5]. Важной особен-

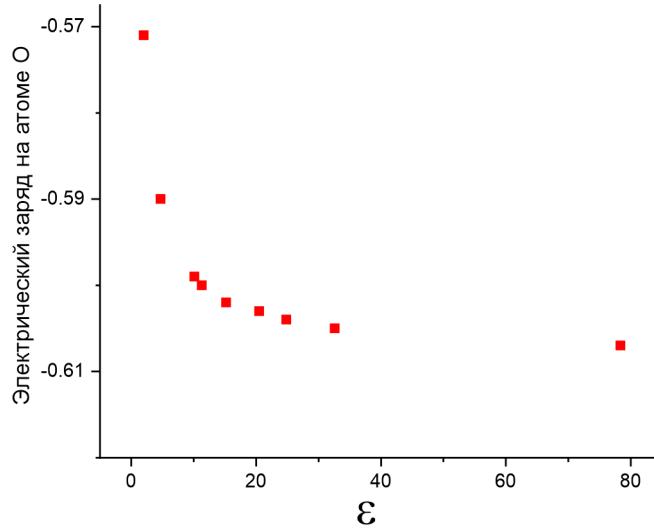


Рис. 4 — Электрический заряд (по Малликену) на атоме О амидной группы молекулы NADH в зависимости от диэлектрической проницаемости.

ностью теоретической модели, которая была использована для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент комплекса NADH–ADH, является разделение вкладов в затухание анизотропии флуоресценции $r_l^{(b)}(t)$ связанного с ферментом NADH двух различных механизмов:

$$r_l^{(b)}(t) = \left(r_{b1} + r_{b2} e^{-t/\tau_{bv}} \right) e^{-t/\tau_{br}}, \quad (3)$$

а именно учитывался вклад процессов анизотропной колебательной релаксации с характерным временем τ_{bv} и вращательной диффузии с характерным временем τ_{br} . Параметры флуоресценции, полученные в результате обработки сигналов представлены в Таблице 1

Таблица 1 — Параметры затухания флуоресценции раствора NADH-ADH и NADH. Времена затухания флуоресценции $\tau_{f1} = 0.24$ нс и $\tau_{f2} = 0.66$ нс и анизотропия $r_f = 0.49$ свободного NADH были зафиксированы.

τ_{f1} , нс μM	τ_{f2} , нс (a_{f1})	τ_{b1} , нс (a_{f2})	τ_{b2} , нс (a_{b1})	τ_{fr} , нс (a_{b2})	r_{b1}	r_{b2}	τ_{bv} , нс	χ^2
0.24 (0.05)	0.66 (0.25)	0.09 (0.43)	4.43 (0.27)	0.17	0.05	0.26	0.89	1.08

Наиболее важным результатом, полученным при анализе экспериментальных сигналов, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH $\tau_{bv} = 0.89$ нс. Соответствующее суб-наносекундное анизотропное время затухания связанного с ферментом NADH наблюдалось в настоящей

работе впервые [8; 13; 14]. Согласно разработанной теоретической модели время τ_{bv} обусловлено анизотропной колебательной релаксацией в возбужденном состоянии после воздействия лазерного импульса, в процессе которой происходит поворот дипольного момента перехода NADH из-за перестройки конфигурации ядер. В свою очередь r_{b1} характеризует изменение угла θ_{t0} между дипольным моментом возбуждения и дипольным моментом флуоресценции за время колебательной релаксации, а r_{b2} характеризует конечный угол θ_{trel} между дипольным моментом возбуждения и дипольным моментом флуоресценции, когда процессы колебательной релаксации завершились.

В пятой главе приводится подробное описание разработанного метода поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование. Обсуждаются результаты апробации этого метода для исследования процессов анизотропной релаксации возбужденного состояния NADH в растворах. В разделе подробно **5.1** обсуждается методика эксперимента и основные функциональные узлы экспериментальной установки. Кратко, методика эксперимента поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование основана на высокочастотной модуляции поляризации цуга импульсов накачки на частоте 100 кГц с помощью фотоупругого модулятора и последующего детектирования разницы поглощения ортогональных поляризационных компонент прошедшего через образец зондирующего излучения. Схематически принцип метода представлен на Рис 5 а). Для исследования использовалась двухцветная схема накачка-зондирование, в которой лазерный импульс накачки возбуждал электронные переходы в молекулах NADH на длине волны 360 нм, лежащей в полосе поглощения хромофорной группы никотинамида, а зондирующий лазерный пучок имел длину волны 720 нм. Схема энергетических переходов, возникающих при воздействии импульсов накачки и зондирующих импульсов, представлена на Рис 5 б).

Метод был апробирован для исследования динамики возбужденного состояния NADH, в результате были впервые зарегистрированы сигналы линейного дихроизма зондирующего излучения. Экспериментальные сигналы и выражения, которые были использованы для их анализа, обсуждаются в разделе **5.2**. Полученный экспериментальный сигнал линейного дихроизма в водном растворе NADH представлен на Рис. 6.

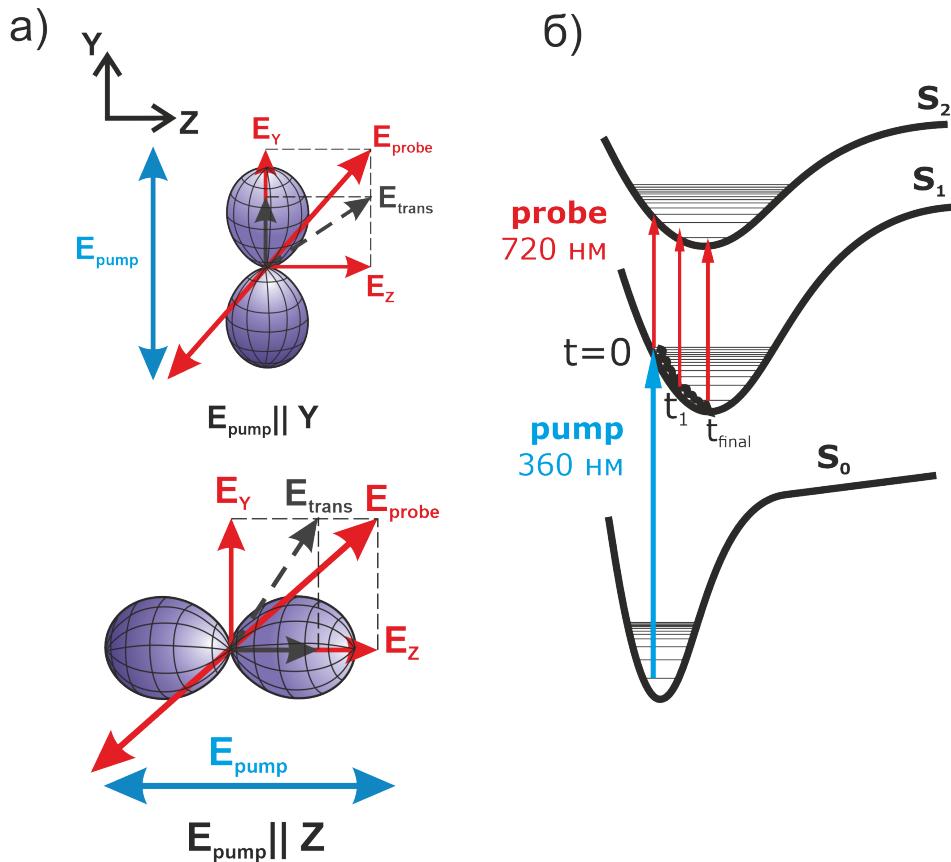


Рис. 5 – а) Геометрия эксперимента: E_{pump} – поляризация импульсов накачки, E_{probe} – поляризация зондирующих импульсов; б) Схема переходов при возбуждении NADH импульсами накачки и зондирующими импульсами: S_0 - основное состояние, S_1 и S_2 - первое и второе возбужденные состояния, соответственно.

Для интерпретации наблюдавшихся экспериментальных сигналов, в настоящей работе была использована квантово-механическая теория, развитая соавторами в работе [A3] и основанная на применении техники неприводимых тензорных операторов. В рамках этой модели экспериментальный сигнал описывается выражениями, которые позволяют разделить вклады в сигнал процессов анизотропной колебательной релаксации в возбужденном состоянии молекул NADH и вращательной диффузии, а также исследовать поворот дипольного момента перехода молекулы вследствие колебательной релаксации:

$$\Delta I_{ab}(t) = [A_1 + (A_0 - A_1) e^{-t/\tau_v}] e^{-t/\tau_r} w(t), \quad (4)$$

где τ_v – время анизотропной колебательной релаксации, τ_r – время вращательной диффузии, A_0 и A_1 – предэкспоненциальные множители и $w(t)$ –

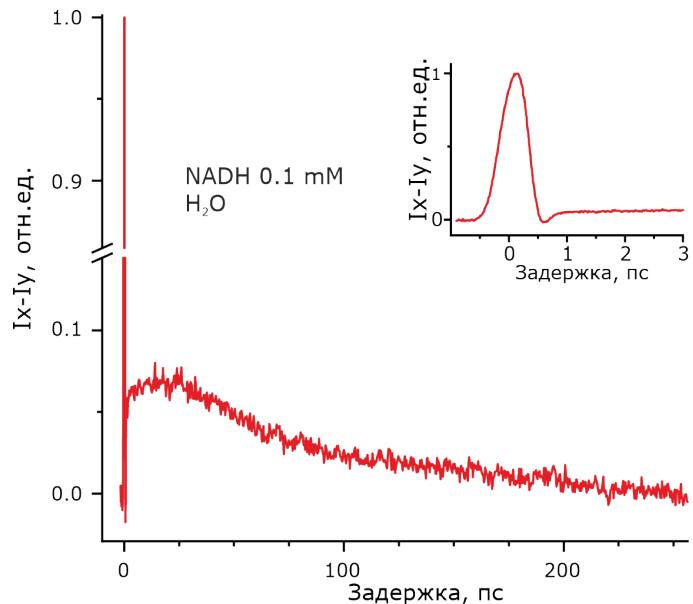


Рис. 6 — Сигнал линейного дихроизма NADH в водном растворе

функция, описывающая изменение населенности первого возбужденного состояния NADH. Полученные в результате обработки экспериментальные параметры представлены в разделе 5.3. Проведенный на основе этой теории анализ позволил определить время анизотропной колебательной релаксации NADH τ_v , которое находилось в диапазоне от 2 до 10 пс, и время вращательной диффузии NADH τ_r , лежавшее в диапазоне от 150 до 500 пс. Была исследована зависимость времени анизотропной колебательной релаксации τ_v и времени вращательной диффузии τ_v от концентрации этанола в растворе (Рис. 7).

В разделе 5.4 приводится обсуждение полученных экспериментальных результатов. Было показано, что коэффициенты A_0 и A_1 имеют ясный физический смысл и характеризуют предельные значения угла между дипольным моментом перехода из основного состояния S_0 в первое возбужденное состояние S_1 и дипольным моментом перехода из первого возбужденного состояния S_1 во второе возбужденное состояние S_2 в начальный момент времени (в момент перекрытия импульсов) и в конце процесса колебательной релаксации, соответственно. Полученное время анизотропной колебательной релаксации τ_v характеризует скорость поворота дипольного момента перехода из первого во второе возбужденное состояние, что происходит за счет перестройки ядерной конфигурации в процессе колебательной релаксации первого возбужденного состояния NADH.

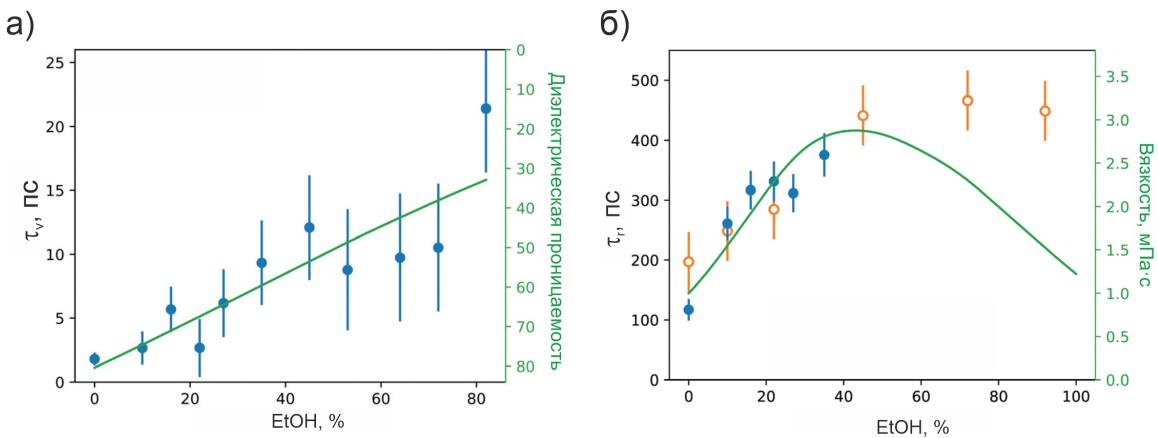


Рис. 7 — а)Время анизотропной колебательной релаксации τ_v (синие точки) и полярность растворов этанола (зеленая линия); б)Время вращательной диффузии τ_r (синие точки), полученное методом накачка-зондирования, время вращательной диффузии τ_r (оранжевые точки), полученное методом TCSPC, и вязкость растворов этанола (зеленая линия).

Разработанный метод позволил исследовать быстрые релаксационные процессы в возбужденных состояниях многоатомных молекул. За счет использования балансной системы детектирования были эффективно подавлены высокочастотные шумы лазерного излучения и эффекты тепловой линзы, что привело к существенному (на порядки) увеличению соотношения сигнал/шум по сравнению с известными методами [15; 16]. Полученные результаты открывают принципиально новую возможность применения разработанной методики для исследования сверхбыстрых процессов релаксации непосредственно в живых клетках для исследования происходящих в них окислительно-восстановительных реакций.

В заключении приведены основные результаты работы:

1. Были определены времена затухания флуоресценции NADH τ_1 и τ_2 в водных растворах этанола, метанола и пропиленгликоля различной концентрации. Обнаружено, что эти времена увеличиваются, при увеличении концентрации спиртов в растворе. При этом вклад времени τ_2 в сигнал флуоресценции в растворах спиртов был в два раза выше, чем в водном растворе.
2. Впервые показано, что наличие двух времен затухания флуоресценции NADH обусловлено различным распределением заряда в *cis*- и *trans*- конфигурациях никотинамида. Это различие влияет на скопление заряда в молекуле никотинамида.

рость процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии NADH.

3. На основе модели Эйнштейна-Стокса был проведен анализ зависимости времени вращательной диффузии NADH τ_r от концентрации метанола в растворе. Разработан принципиально новый метод определения относительного количества сложенных и развернутых конформаций NADH, который основан на измерении времен вращательной диффузии NADH. Показано, что изменение конформационного состава NADH при изменении свойств растворителя обуславливает увеличение τ_r при концентрациях метанола в растворе более 60 %.
4. Определен квантовый выход флуоресценции NADH в водных растворах этанола, метанола и пропиленгликоля различной концентрации. Наблюдался рост квантового выхода флуоресценции NADH при увеличении концентрации спиртов в растворе. Для объяснения этого увеличения была разработана модель, в результате применения которой были разделены вклады наносекундных и пикосекундных каналов релаксации возбужденных состояний NADH.
5. Впервые показано, что единственное время затухания флуоресценции $\tau_4 \approx 4$ нс в комплексе NADH-ADH обусловлено низкой полярностью сайта связывания фермента и тем, что NADH находится в этом сайте в единственной *trans*-конфигурации.
6. Обнаружено существование анизотропного механизма релаксации в возбужденном состоянии комплекса NADH-ADH с временем $\tau_{vb} = 1$ нс, обусловленного поворотом дипольного момента перехода флуоресценции.
7. Разработан новый метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование, позволяющий исследовать динамику возбужденного состояния биологических молекул с субпикосекундным временным разрешением при возбуждении лазерными импульсами с энергией порядка 1 нДж. Метод апробирован для исследования динамики анизотропных процессов релаксации в возбужденном состоянии молекул NADH в растворах различной вязкости и полярности.

8. Впервые определено время анизотропной колебательной релаксации τ_v в первом возбужденном состоянии NADH в водных растворах этанола различной концентрации. Был обнаружен линейный рост τ_v при увеличении концентрации этанола в растворе. Этот рост был интерпретирован уменьшением полярности растворов с ростом концентрации этанола.

Публикации автора по теме диссертации

- A1. Сасин М.Э., Горбунова И.А., Безверхний Н.О., Бельтюков Я.М., Rubayo-Soneira J., Васютинский О.С., Поляризованная флуоресценция молекул NADH при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 720-780 nm // ПЖТФ. – 2019. – Т. 45. № 13. – С. 37-39.
- A2. Горбунова И.А., Сасин М.Э., Васютинский О.С., Достижение субпикосекундного временного разрешения при исследовании процессов анизотропной релаксации биологических молекул // ПЖТФ – 2020. – Т. 46, № 4. – С. 7-10.
- A3. Gorbunova I.A., Sasin M.E., Beltukov Y.M., Semenov A.A., Vasyutinskii O.S., Anisotropic Relaxation in NADH Excited States Studied by PolarizationModulation Pump-Probe Transient Spectroscopy // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2020. – Vol. 22. – P. 18155-18168.
- A4. Gorbunova I.A., Sasin M.E., Smolin A.G., Vasyutinskii O.S., Rubayo-Soneira J., Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in NADH in Water-Methanol Solutions: the Role of Conformation States // J. Phys. Chem. B. – 2020. – Vol. 124, № 47. – P. 10682-10697
- A5. Gorbunova I.A., Sasin M.E., Golyshev D.P., Semenov A.A., Smolin A.G., Beltukov Y.M., Vasyutinskii O.S., Two-Photon Excited Fluorescence Dynamics in Enzyme-Bound NADH: the Heterogeneity of Fluorescence Decay Times and Anisotropic Relaxation // J. Phys. Chem. B. – 2021. – Vol. 125, № 35 – P. 9692—9707.
- A6. Gorbunova I.A., Danilova M.K., Sasin M.E., Belik V.P., Golyshev D.P., Vasyutinskii O.S., Determination of fluorescence quantum yields and decay times in NADH and FAD in water-alcohol mixtures: the analysis

- of radiative and nonradiative relaxation pathways//J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry – 2023. – Vol. 436, № 1. – P. 114388.
- A7. Gorbunova I.A., Bezverkhnii N.O., Zhikhoreva A.A., Beltukov Y.M., Sasin M.E., Vasyutinskii O.S., Rubayo-Soneira J., Two-photon excited polarized fluorescence in NADH in methanol-water solutions// Proc. SPIE 11076, Advances in Microscopic Imaging II – 2019.
- A8. Gorbunova I.A., Bezverkhnii N.O., Sasin M.E., Gadzhiev I.M., Gorbenko D.A., Vasyutinskii O.S., Ultrafast polarization modulation transient spectroscopy to study electronic excited state dynamics in biological molecules // Proc. SPIE 11497, Ultrafast Nonlinear Imaging and Spectroscopy VIII – 2020.
- A9. Gorbunova I.A., Sasin M.E., Golyshev D.P., Krasnopoletceva M.K., Smolin A.G., Beltukov Y.M., Vasyutinskii O.S., The role of microenvironment in the mechanisms of fluorescence decay in free and protein-bound NADH//Proceedings Volume 11900, Optics in Health Care and Biomedical Optics XI. – 2021.

Список литературы

1. Многофотонная микроскопия с эндогенным контрастом: природа флуоресфоров и возможности в исследовании биохимических процессов / Е. А. Ширшин [и др.] // Успехи биологической химии. — 2019. — т. 59. — с. 139—180.
2. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications / R. Datta [et al.] // Journal of Biomedical Optics. — 2020. — Vol. 25, no. 7. — P. 1.
3. NADH Autofluorescence—A Marker on its Way to Boost Bioenergetic Research / P. M. Schaefer [et al.] // Cytometry Part A. — 2019. — Vol. 95, no. 1. — P. 34—46.
4. Metabolic Profiling of Live Cancer Tnumbers Using NAD(P)H Fluorescence Lifetime Imaging / T. S. Blacker [et al.] // Cancer Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. — 2019. — Vol. 1928. — P. 365—387.
5. Two-Color Two-Photon Excitation of Fluorescence / J. R. Lakowicz [et al.] // Photochemistry and Photobiology. — 1996. — Vol. 64, no. 4. — P. 632—635.
6. Activated barrier crossing dynamics in the non-radiative decay of NADH and NADPH / T. S. Blacker [et al.] // Chemical Physics. — 2013. — Vol. 422. — P. 184—194.
7. Polarized Two-Photon Absorption and Heterogeneous Fluorescence Dynamics in NAD(P)H / T. S. Blacker [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2019. — Vol. 123, no. 22. — P. 4705—4717.
8. Conformational dependence of intracellular NADH on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy / H. D. Vishwasrao [et al.] // Journal of Biological Chemistry. — 2005. — Vol. 280, no. 26. — P. 25119—25126.
9. First use of the UV Super-ACO free-electron laser: Fluorescence decays and rotational dynamics of the NADH coenzyme / M. E. Couprie [et al.] // Review of Scientific Instruments. — 1994. — Vol. 65, no. 5. — P. 1485—1495.

10. Studies on external electric field effects on absorption and fluorescence spectra of NADH / T. Nakabayashi [et al.] // Chemical Physics Letters. — 2014. — Vol. 595/596. — P. 25–30.
11. Emission Properties of NADH. Studies of Fluorescence Lifetimes and Quantum Efficiencies of NADH, AcPyADH, and Simplified Synthetic Models / T. G. Scott [et al.] // Journal of the American Chemical Society. — 1970. — Vol. 92, no. 3. — P. 687–695.
12. *Gafni A., Brand L.* Fluorescence Decay Studies of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Solution and Bound to Liver Alcohol Dehydrogenase // Biochemistry. — 1976. — Vol. 1, no. 15. — P. 3165–3171.
13. Optical spectroscopy of nicotinoprotein alcohol dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica*: A comparison with horse liver alcohol dehydrogenase and UDP-galactose epimerase / S. R. Piersma [et al.] // Biochemistry. — 1998. — Vol. 37, no. 9. — P. 3068–3077.
14. *Yu Q., Heikal A. A.* Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 2009. — Vol. 95, no. 1. — P. 46–57.
15. Polarized pump–probe measurements of electronic motion via a conical intersection / D. A. Farrow [et al.] // J. Chem. Phys. — 2008. — Vol. 128. — P. 144510.
16. Linear dichroism amplification: Adapting a long-known technique for ultrasensitive femtosecond IR spectroscopy / J. Rohault [et al.] // Journal of Chemical Physics. — 2011. — Vol. 134, no. 12. — P. 124516.