

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. А.Ф. ИОФФЕ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Горбунова Иоанна Алексеевна

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

Специальность 1.3.6 —

«Оптика»

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук  
Васютинский Олег Святославович

Санкт-Петербург — 2023

## Оглавление

	Стр.
<b>Введение</b> . . . . .	5
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> . . . . .	16
1.1 Релаксационные процессы, происходящие в возбужденных состояниях многоатомных молекул . . . . .	16
1.2 Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия . . . . .	21
1.2.1 Затухание флуоресценции . . . . .	23
1.2.2 Метод счета фотонов с временной корреляцией . . . . .	26
1.3 Спектроскопия накачка-зондирование . . . . .	30
1.4 Анизотропия и анизотропные процессы релаксации в возбужденном состоянии многоатомных молекул . . . . .	36
1.4.1 Методика измерений затухания анизотропии флуоресценции . . . . .	42
1.4.2 Измерение анизотропии с субпикосекундным временным разрешением . . . . .	46
1.5 Исследование биомолекул NADH и NADPH методами время-разрешенной лазерной спектроскопии . . . . .	52
<b>Глава 2. Исследование время-разрешенной флуоресценции молекул NADH в водно-спиртовых растворах при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами</b>	<b>57</b>
2.1 Измерение сигналов затухания поляризованной флуоресценции и их анализ . . . . .	59
2.2 Полученные экспериментальные результаты . . . . .	64
2.3 Результаты <i>ab initio</i> расчетов структуры NADH в воде и в метаноле . . . . .	68
2.4 Гетерогенность затухания поляризованной флуоресценции NADH	72
2.5 Анизотропия флуоресценции NADH . . . . .	75
2.5.1 Определение компонент тензора двухфотонного перехода .	75

2.5.2	Анализ зависимости времени вращательной диффузии NADH от концентрации метанола в растворе . . . . .	78
2.6	Краткие итоги . . . . .	83
<b>Глава 3.</b>	<b>Квантовый выход флуоресценции NADH . . . . .</b>	<b>85</b>
3.1	Измерение квантового выхода флуоресценции NADH . . . . .	86
3.2	Полученные экспериментальные результаты . . . . .	88
3.3	Модель процессов релаксации NADH в возбужденном состоянии .	90
3.4	Влияние микроокружения на процессы релаксации NADH в возбужденном состоянии . . . . .	95
3.5	Краткие итоги . . . . .	99
<b>Глава 4.</b>	<b>Исследование время-разрешенной флуоресценции молекул NADH, связанных с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами . . . . .</b>	<b>100</b>
4.1	Кинетика флуоресценции комплекса NADH-ADH . . . . .	102
4.2	Объяснение природы наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH . . . . .	109
4.3	Анизотропная релаксация комплекса NADH-ADH . . . . .	112
4.4	Краткие итоги . . . . .	117
<b>Глава 5.</b>	<b>Фемтосекундная поляризационно-модуляционная спектроскопия "накачка-зондирование" и ее применение для исследования анизотропной колебательной релаксации в молекулах NADH . . . . .</b>	<b>119</b>
5.1	Метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование . . . . .	120
5.2	Сигналы линейного дихроизма NADH и их анализ . . . . .	126
5.3	Полученные экспериментальные результаты . . . . .	130
5.4	Анизотропные процессы релаксации в возбужденном состоянии NADH . . . . .	131
5.5	Краткие итоги . . . . .	135
	<b>Заключение . . . . .</b>	<b>137</b>

Список сокращений и условных обозначений . . . . .	140
Список литературы . . . . .	141
Приложение А. Вывод выражения, используемого для определения относительной концентрации сложенных конформаций NADH . . . . .	158
Приложение Б. Результаты расчетов <i>ab initio</i> структуры NADH в растворах . . . . .	160
Приложение В. Теоретические модели, используемые для анализа анизотропных процессов релаксации в возбужденном состоянии NADH . . . . .	163
В.1 Общие выражения для интенсивности флуоресценции при двухфотонном возбуждении . . . . .	163
В.2 Общие выражения для поглощения зондирующего излучения . .	165

## Введение

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 ( $\text{NAD}^+$ ) 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 молекулярными 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 внутриклеточной 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 значительного уменьшения полярности сайта связывания по сравнению с полярностью водного раствора.

3. Квантовый выход флуоресценции NADH в водных растворах метанола, этанола и пропиленгликоля растет при увеличении вязкости и уменьшении полярности растворителя за счет снижения эффективности процессов безызлучательной релаксации. Квантовый выход 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 дипольного момента перехода флуоресценции.
5. Разработанный метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование позволяет детектировать безызлучательную релаксацию в многоатомных биологических молекулах с временным разрешением менее 0.3 пс при возбуждении фемтосекундными импульсами лазера с энергией в импульсе менее 1 нДж.
6. Изменение во времени линейного дихроизма молекул NADH в водно-спиртовых растворах обусловлено поворотом дипольного момента перехода молекул в процессе колебательной релаксации и вращательной диффузией.

#### **Научная новизна:**

1. Показано, что наличие двух экспериментально наблюдаемых времен затухания флуоресценции молекул NADH в растворах может быть обусловлено различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях никотинамида.
2. На основе исследования квантового выхода и времен затухания флуоресценции NADH были разделены вклады наносекундных и пикосекундных каналов безызлучательной релаксации возбужденных состояний NADH.
3. Разработан и апробирован принципиально новый метод определения относительной концентрации сложенных и развернутых конформации 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 дипольного момента перехода молекулы.
6. 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.

Все вышеперечисленных результаты обладают приоритетом на международном уровне.

### **Научная и 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 протонов 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 раз-

личных 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 спектроскопии 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 публика-

ции 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 объем диссертации составляет 168 страниц с 50 рисунками и 16 таблицами. Список литературы содержит 170 наименований.

**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 процессы релаксации, происходящие в возбужденных состояниях многоатомных биологических молекул, приведены 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 обзор результатов, полученных в ранних исследованиях 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. В рамках этого раздела рассмотрены различные анизотропные процессы релаксации в возбужденном состоянии биологических молекул, приведены их характерные скорости, а также обсуждаются методы исследования этих процессов с пикосекундным и субпикосекундным временным разрешением. В 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. В разделе **2.2** представлены полученные экспериментальные параметры: времена затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и вклад длинного времени затухания в сигнал  $a_2$ , время вращательной диффузии  $\tau_r$  и параметры анизотропии флуоресценции при возбуждении циркулярно- и линейно-поляризованным лазерным излучением  $r_c$  и  $r_l$ , соответственно. Эти параметры были проанализированы в зависимости от концентрации метанола в растворе. Анализ экспериментальных результатов проводится 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. На основе результатов расчетов была разработана модель, объясняющая природу двух времен затухания флуоресценции NADH внутренними фотопроцессами, происходящими в никотинамиде (NA). Модель подробно описана в разделе **2.4** и в работе [A4]. В основе модели лежит предположение, что неоднородность измеренных времен затухания флуоресценции NADH связана с различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях никотинамида, что приводит к различным скоростям релаксации из возбужденного состояния для этих двух молекулярных конформаций. 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  $\Omega$  были определены компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $S$  и проведен анализа симметрии перехода при двухфотонном возбуждении. В результате было обнаружено два канала двухфотонного возбуждения, для которых значения компонент тензора двухфотонного перехода значительно отличаются. Поведение времени вращательной диффузии  $\tau_r$  NADH было проанализировано в зависимости от вязкости раствора и распределения сложенных и развернутых конформаций NADH.

В третьей главе обсуждаются результаты измерений квантового выхода флуоресценции NADH в водных растворах этанола, 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**. Для анализа экспериментальных результатов была разработана модель, которая позволила разделить быстрые (пикосекундные) и относительно медленные (наносекундные) каналы безызлучательной релаксации. Краткое обсуждение этой модели представлено в разделе **3.3**. В результате использования этой модели было получено выражение для квантового выхода флуоресценции, в котором были разделены вклады квантовых выходов двух различных каналов релаксации, приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния NADH. В результате было показано, что увеличение квантового выхода флуоресценции NADH в растворах вода-метанол и вода-этанол с увеличением концентрации спиртов происходило за счет изменения скорости относительно медленных процессов наносекундной безызлучательной релаксации  $\Phi_B$ . Изменение скорости этих процессов обусловлено взаимодействиями молекул NADH с молекулами растворителя, а также изменением конформационного состава этих NADH при увеличении концентрации спирта. При этом для растворов вода-пропиленгликоль было обнаружено снижение эффективности пикосекундного тушения флуоресценции NADH  $\Phi_D$  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 методом наблюдения затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции, который подробно описан в Главе 2 в разделе **2.1**. Анализ сигналов затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции раствора NADH-ADH проводился в несколько этапов. Сначала был проанализирован изотропный, независимый от поляризации, сигнал затухания флуоресценции  $I_{iso}(t)$ , результаты этого анализа приведены в разделе **4.1**. Было выделено две группы времен затухания: два

времени затухания  $\tau_1$  и  $\tau_4$ , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH-ADH, и времена  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , 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. 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, 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. Это позволило смоделировать изменения электростатического окружения в сайте связывания ферментов. В результате было показано, что увеличение времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH происходит за счет изменения разделение зарядов в никотинамиде в условиях аполярного сайта связывания 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 работе [A5]. Важной особенностью теоретической модели является разделение вкладов в затухание анизотропии флуоресценции  $r_i^{(b)}(t)$  связанного с ферментом NADH двух различных механизмов: анизотропной колебательной релаксации с характерным временем  $\tau_{bv}$  и вращательной диффузии с характерным временем  $\tau_{br}$ . Наиболее важным результатом, полученным при анализе экспериментальных сигналов, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс.

В **пятой главе** представлены результаты разработки метода поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование. Обсуждаются результаты апробации этого метода для исследования процессов анизотропной релаксации возбужденного состояния NADH в растворах. В разделе **5.1** подробно обсуждается методика эксперимента и основные функциональные узлы экспериментальной установки. Применение этого метода впервые позволило зарегистри-

стрировать сигналы линейного дихроизма NADH. Экспериментальные сигналы и выражения, которые были использованы для их анализа, обсуждаются в разделе 5.2. Для интерпретации наблюдавшихся экспериментальных сигналов была использована квантово-механическая теория, развитая соавторами работы [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. Была исследована зависимость времени анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  и времени вращательной диффузии  $\tau_r$  от концентрации этанола в растворе. В разделе 5.4 приводится обсуждение полученных экспериментальных результатов.

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 [7; 8]. Полученные результаты открывают принципиально новую возможность применения разработанной методики для мониторинга сверхбыстрых процессов релаксации непосредственно в живых клетках, что необходимо для исследования происходящих в них окислительно-восстановительных реакций.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1 Релаксационные процессы, происходящие в возбужденных состояниях многоатомных молекул

Различные фотофизические процессы, которые могут происходить при взаимодействии света с многоатомными молекулами, представлены на диаграмме Яблонского на Рис. 1.1 [2]. Как показано на Рис. 1.1, поглощение света приводит к переходу молекулы из основного состояния  $S_0$ , которое для большинства многоатомных молекул является синглетным, в более высокое по энергии электронное состояние  $S_n$ .

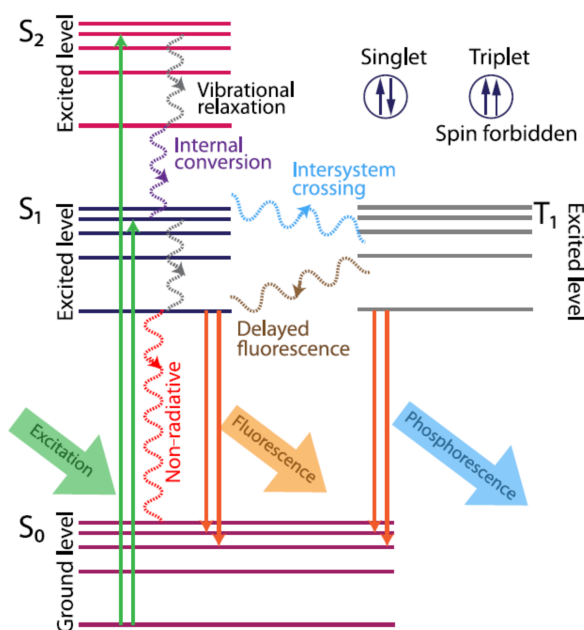


Рисунок 1.1 — Диаграмма Яблонского [2].

В возбужденном состоянии в начальный момент времени после возбуждения происходят быстрые процессы безызлучательной релаксации, которые сопровождаются переходами между колебательными состояниями внутри одного электронного возбужденного состояния (колебательная релаксация) [2; 9; 10]. В процессе колебательной релаксации избыточная энергия перераспределяется между внутримолекулярными (смещение ядер молекулы в процессе релаксации) и межмолекулярными (взаимодействие с молекулами растворителя) процессами. Внутримолекулярное колебательное перераспределение энергии пред-



ставляет собой процесс, при котором первоначально локализованная энергия возбуждения перераспределяется между всеми колебательными и вращательными модами, в то время как молекула остается в том же электронном состоянии. Помимо этого в процессе колебательной релаксации избыточная энергия передается окружающим молекулам растворителя за счет столкновительных процессов. Характерное время колебательной релаксации составляет от десятков фс до нескольких пс. Другим быстрым процессом релаксации является внутренняя конверсия (Internal conversion на Рис. 1.1), которая сопровождается безызлучательным переходом молекулы из более высокого по энергии ( $S_2$ ) в низкоэнергетическое возбужденное состояние с одинаковой мультиплетностью ( $S_1$ ). В результате процессов колебательной релаксации и внутренней конверсии часть молекул оказывается на самом нижнем колебательном уровне возбужденного состояния  $S_1$ . Затем из электронного состояния  $S_1$  происходит спонтанный переход молекулы в основное состояние  $S_0$ , сопровождающийся излучением фотона (флуоресценция). Энергия испускаемого фотона флуоресценции ниже, чем энергия фотона возбуждающего излучения, вследствие потерь энергии в процессе колебательной релаксации и внутренней конверсии. Характерное время излучательных переходов лежит в диапазоне от 1 до 50 нс. В принципе, процессы излучательной релаксации могут протекать одновременно и из более высокого возбужденного состояния  $S_2$ . Однако, поскольку скорость флуоресценции намного медленнее (несколько порядков), чем скорость внутренней конверсии  $S_2 \rightarrow S_1$ , то только очень небольшая часть возбужденных молекул будет релаксировать из состояния  $S_2$  с излучением фотона. Наряду с излучательным процессом релаксации в основное состояние, может происходить безызлучательный переход: внутренняя конверсия из состояния  $S_1$  в состояние  $S_0$ , при этом характерное время этого процесса на порядок больше чем время внутренней конверсии между состояниями  $S_2$  и  $S_1$  и достигает от сотен пс до нескольких нс [2; 11].

Наряду с внутренней конверсией между возбужденными состояниями с одинаковой мультиплетностью может происходить безызлучательный переход между состояниями с разной мультиплетностью  $S_i \rightarrow T_i$ , который сопровождается поворотом спина электрона, участвующего в переходе. Такой процесс называется интеркомбинационной конверсией (Intersystem Crossing (ISC) на Рис. 1.1). Обычно триплетные состояния  $T_i$  имеют меньшую энергию, чем синглет-

ные состояния  $S_i$ . Как показано на рис. 1.1, интеркомбинационный переход может происходить между состояниями  $S_1$  и  $T_1$ . Характерное время этого процесса может варьироваться от фемтосекунд до микросекунд в зависимости от расстояния между уровнями, плотностью состояний возбужденных состояний, присутствия тяжелых атомов и изменения ядерной конфигурации молекулы во время колебательной релаксации в возбужденном состоянии. Из триплетного состояния  $T_1$  может происходить запрещенный по спину излучательный переход в основное состояние  $S_0$ , процесс излучения фотона при переходе между уровнями с разной мультиплетностью называется фосфоресценцией. Время жизни триплетного состояния достаточно велико и составляет от сотен микросекунд до нескольких минут. Переход из триплетного состояния в основное синглетное может происходить при столкновении возбужденной молекулы с окружающими молекулами за счет безызлучательных процессов, вероятность которых при комнатной температуре очень велика. Спектр фосфоресценции сдвинут в длинноволновую область спектра, относительно спектра флуоресценции [12].

Исследование процессов релаксации, схематически представленных на Рис. 1.1, является интересной задачей, поскольку определение скорости и эффективности этих процессов непосредственно из эксперимента может дать богатую информацию о свойствах самой молекулы и о ее взаимодействии с микроокружением. Основными параметрами, которые можно определить непосредственно из эксперимента, являются квантовый выход излучательных процессов, а именно квантовый выход флуоресценции  $\Phi_{fl}$  и квантовый выход фосфоресценции  $\Phi_{phos}$ , квантовый выход безызлучательных процессов  $\Phi_{nr}$ , и времена релаксации излучательных  $\tau_{rad}$  и безызлучательных процессов  $\tau_{nrad}$ . [9]

Квантовый выход флуоресценции  $\Phi^{fluo}$  характеризует относительное количество возбужденных молекул, которые возвращаются в основное состояние с излучением фотона флуоресценции. Квантовый выход определяется как отношение числа испущенных фотонов  $N_{fluo}^{photon}$  к числу поглощенных фотонов  $N_{abs}^{photon}$  [9; 13; 14]:

$$\Phi_{fl} = \frac{N_{fluo}^{photon}}{N_{abs}^{photon}} \quad (1.1)$$

Квантовый выход флуоресценции можно измерить двумя методами: абсолютным и относительным [15]. В методе измерения абсолютного квантового

выхода используется интегрирующая сфера, для регистрации всего излучения флуоресценции от молекулярного образца. В методе относительного измерения квантовый выход флуоресценции  $\Phi_{fl}$  рассчитывается путем сравнения интенсивности флуоресценции исследуемого образца с интенсивностью флуоресценции эталонного образца с известным квантовым выходом. В отличие от измерений абсолютного квантового выхода, для которых требуется интегрирующая сфера, в относительном методе используются обычные флуоресцентные спектрометры. [14; 16]

Квантовый выход флуоресценции биологических молекул зачастую намного меньше единицы и не превышает 0.1. В первую очередь это связано с тушением флуоресценции при столкновении с молекулами  $O_2$ , что приводит к быстрому безызлучательному распаду возбужденного состояния. Тушение флуоресценции может быть обусловлено переносом электрона в возбужденном состоянии или интеркомбинационным переходом из синглетного в триплетное состояние. Как уже было отмечено выше, динамика возбужденного состояния в многоатомных биологических молекулах характеризуется не только излучательными переходами из возбужденного состояния в основное, а также различными безызлучательными процессами. Если в процессе релаксации возбужденного состояния происходят такие безызлучательные процессы, которые приводят к уменьшению населенности возбужденного состояния, то каждый из таких процессов характеризуется собственным значением квантового выхода  $\Phi_{nr_i}$  [13], а наблюдаемый квантовый выход флуоресценции представляет собой произведение квантовых выходов всех этих процессов, включая излучательные переходы.

Время жизни флуоресценции  $\tau$  описывает характерное среднее время, необходимое возбужденному флуорофору для перехода из возбужденного состояния в основное с излучением фотона флуоресценции. Можно сказать, что постоянная времени  $\tau$  представляет собой среднюю продолжительность времени, в течение которого флуорофор остается в возбужденном состоянии: за время жизни флуоресценции  $\tau$  населенность возбужденного состояния уменьшается в  $1/e$  раз.

Скорость изменения населенности возбужденного состояния для ансамбля из  $N$  молекул определяется исходя из следующего выражения [9; 14; 17]:

$$\frac{dN}{dt} = -kN(t), \quad (1.2)$$

где  $k$  - средняя скорость процессов релаксации, представляющая собой сумму скоростей излучательных  $k_{rad}$  и всех безызлучательных процессов  $k_{nrad}$ :  $k = k_{rad} + k_{nrad}$ . В результате решения уравнения 1.2 получаем, что населенность флуорофоров в возбужденном состоянии затухает экспоненциально [17]:

$$N(t) = N_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1.3)$$

где время затухания флуоресценции  $\tau$ , наблюдаемое в эксперименте определяется как

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{rad}} + \frac{1}{\tau_{nrad}}. \quad (1.4)$$

Измеряемая в эксперименте интенсивность флуоресценции  $I(t)$  прямо пропорциональна изменению населенности возбужденного состояния  $N(t)$  с учетом коэффициента пропорциональности. Интегрируя выражение 1.3 и используя выражение для квантового выхода 1.1 получаем, что квантовый выход флуоресценции представляет собой отношение времени затухания флуоресценции  $\tau$ , которое наблюдается в эксперименте, к времени жизни излучательных процессов:

$$\Phi_{fl} = \frac{\tau}{\tau_{rad}} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nrad}} \quad (1.5)$$

Константу скорости излучения  $k_{rad}$  можно оценить используя соотношение Стриклера-Берга [18], которая определяется как сумма констант скоростей отдельных переходов между электронно-колебательными состояниями:

$$k_{rad} = \int k_{fl}(\nu) d\nu = 2.88 \cdot 10^{-9} n^2 \langle \nu_{fl}^3 \rangle^{-1} \int_0^\infty \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu, \quad (1.6)$$

где  $n$  - показатель преломления раствора,  $\epsilon(\nu)$  - коэффициент поглощения для данной частоты  $\nu$ ,  $\langle \nu_{fl}^3 \rangle$  - усреднение по всем частотам в полосе флуоресценции. Интегралы в выражении 1.6 рассчитываются по всем частотам в пределах полос поглощения и флуоресценции исследуемого флуорофора.

В общем случае скорость излучательных переходов намного меньше скорости безызлучательных переходов  $k_{rad} \ll k_{nrad}$ , таким образом наблюдаемое время жизни флуоресценции и соответственно значение квантового выхода в основном определяются скоростью безызлучательной релаксации. Существует ряд процессов, которые могут влиять на значения констант скорости безызлуча-

тельной релаксации и, соответственно, на время жизни флуоресценции флуорофора. Наиболее распространенными из них являются: взаимодействия с растворителем, столкновительное тушение другими молекулами или ионами, перенос электрона или безызлучательная передача энергии акцептору.

На настоящий момент существует достаточно большое количество методов для исследования динамики процессов релаксации в возбужденных состояниях многоатомных биологических молекул. Наиболее распространенными методами являются: время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия, метод "накачка-зондирование метод ап-конверсионного преобразования, время-разрешенная колебательная спектроскопия и время-разрешенная Рамановская спектроскопия [19].

## 1.2 Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия

Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия является одним из наиболее распространенных методов исследования динамики возбужденных состояний биологических молекул [10; 20; 21]. Исследование таких субнаносекундных процессов становится возможным только с помощью спектроскопических лазерных методов исследования. Среди флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением различают прямой метод наблюдения сигналов затухания флуоресценции, так называемая время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия во временной области [22–24], и косвенный метод определения времен затухания флуоресценции, или время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия в частотной области [25; 26].

Одним из первых методов изучения динамики флуоресценции с временным разрешением порядка  $10^{-8} - 10^{-9}$  с был косвенный метод измерения: метод фазового сдвига или метод гармонических сигналов [2; 9; 26]. В основе данного метода лежит возможность определения времени жизни флуоресценции  $\tau$  из фазового сдвига  $\phi$  между промодулированным по амплитуде возбуждающим излучением и излучением флуоресценции. В методе фазового сдвига образец возбуждается светом, интенсивность которого модулируется по амплитуде на высокой частоте, сравнимой с обратной величиной времени жизни  $\omega_{mod} \sim \frac{2\pi}{\tau}$ .

Как правило, в этом подходе используются источники возбуждения с синусоидальной модуляцией, при возбуждении образца таким источником сигнал флуоресценции также модулируется синусоидально, но с другой глубиной модуляции  $m_\omega$  и с фазовой задержкой  $\phi_\omega$  по отношению к сигналу возбуждения. До 1983 г. наблюдения затухания флуоресценции в частотной области позволяли определять среднее время жизни, но не могли разрешать более сложные многоэкспоненциальные сигналы затухания. Это ограничение было связано с приборной базой, поскольку фазовые модуляторы могли работать только на одной, двух или трех фиксированных частотах модуляции. Разрешение более сложного многоэкспоненциального затухания требует измерений на нескольких частотах модуляции, которые охватывают частотную характеристику образца [27]. В настоящее время метод фазового сдвига широко используется для наблюдения сигналов затухания флуоресценции, например для изучения многоэкспоненциального затухания интенсивности и неэкспоненциального затухания, возникающего в результате резонансного переноса энергии [2]. Однако у этого метода есть ряд существенных недостатков. Во-первых, данный метод не позволяет исследовать слабые флуоресцентные сигналы, а во-вторых, временное разрешение системы ограничено частотой модуляции.

Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением является одним из наиболее широко используемых методов изучения многоатомных биологических молекул и свойств их микроокружения [5; 28; 29]. Параметры кинетики флуоресценции, а именно времена затухания флуоресценции, времена деполяризации флуоресценции и относительные вклады этих времен, зачастую довольно чувствительны к небольшим изменениям микроокружения флуоресцирующих молекул [14]. Характерные времена затухания флуоресценции большинства биологических молекул лежат во временном диапазоне от 100 фс до наносекунд, поэтому для измерений с высоким временным разрешением необходимы источники света, позволяющие генерировать короткие световые импульсы, и детекторы с высоким временным разрешением [30]. В методе флуоресцентной спектроскопии в временной области регистрируемый сигнал представляет собой изменение интенсивности флуоресценции во времени  $I(t)$ , и анализ такого сигнала позволяет напрямую определить времена жизни флуоресценции. В этом случае для детектирования сигналов затухания флуоресценции используют систему детектирования, состоящую из быстрого фотодиода (ФД) или фото-

электронного умножителя (ФЭУ) и счетчика единичных фотонов. В качестве источника возбуждения используются лазерные импульсы с длительностью от десятков фемтосекунд до сотен пикосекунд. Временное разрешение данного метода определяется величиной отклика детектора и может составлять порядка 50-100 пс. В следующем разделе подробно будут рассмотрены теоретические и практические основы метода время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии во временной области. Стоит отметить, что на сегодняшний день самый быстрый метод прямого обнаружения флуоресценции основан на использовании электронно-оптической камеры (streak camera), с помощью которой можно получить временное разрешение до нескольких пикосекунд. [25]

Для детектирования сигналов затухания флуоресценции с субпикосекундным временным разрешением существует метод, основанный на явлении генерации суммы или разности частот излучения (нелинейный эффект второго порядка) в нелинейном кристалле. Поскольку сигналы генерируются на сумме или разности частот излучения и референсного фемтосекундного импульса (более высокие или низкие энергии фотонов), этот метод называется флуоресцентным «преобразованием с повышением частоты» - ап-конверсионное преобразование или «преобразованием с понижением частоты» для генерации суммарной или разностной частоты соответственно [28; 29; 31].

### 1.2.1 Затухание флуоресценции

Прежде чем переходить к обсуждению выражений, описывающих кинетику процесса флуоресценции, необходимо сказать пару слов про типы возбуждения. Переход молекулы из основного состояния в возбужденное может происходить как при поглощении одного фотона, так и при поглощении двух фотонов и более. Схемы переходов в электронно-возбужденное состояние при одно- и двухфотонном поглощении представлены на Рис. 1.2 [32].

Как показано на Рис. 1.2 слева в случае наблюдения флуоресценции при однофотонном возбуждении в одном акте поглощения-испускания участвует только два фотона: один фотон возбуждающего излучения и один фотон флу-

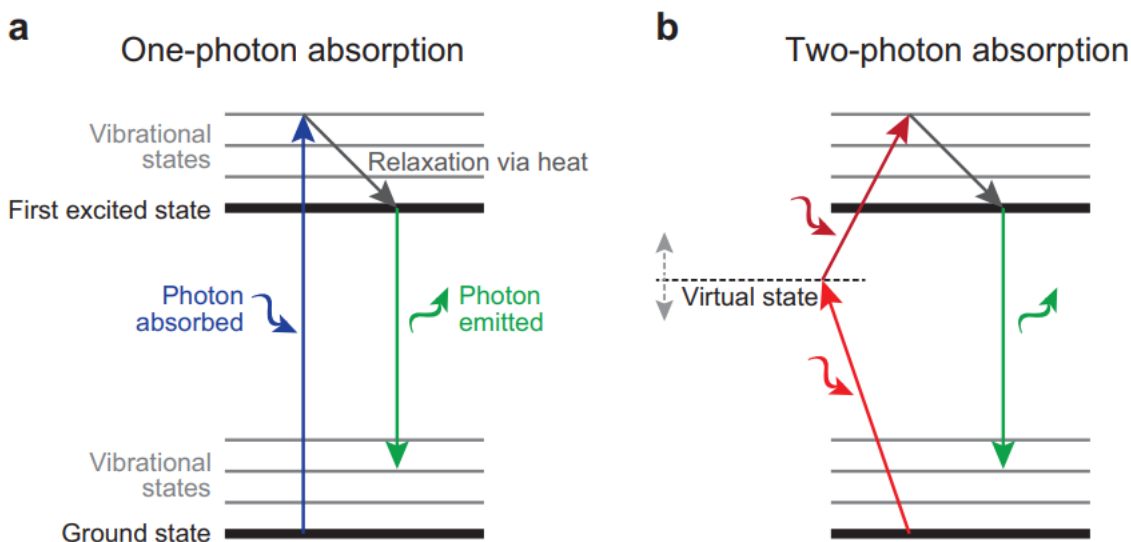


Рисунок 1.2 — Упрощенная схема переходов в молекуле при однофотонном (слева) и при двухфотонном (справа) возбуждении. [32]

оресценции. В этом случае интенсивность флуоресценции будет прямо пропорциональна интенсивности возбуждения  $I_{ex}$ :

$$I^{OPE} = \sigma I_{ex}, \quad (1.7)$$

где  $\sigma_2$  - сечение поглощения.

Впервые, двухфотонные переходы были теоретически предсказаны в 1931 году Марией Гопперт-Майер, которая показала, что атом или молекула могут одновременно поглощать два фотона в одном и том же квантовом событии. Двухфотонное возбуждение представляет собой нелинейный процесс третьего порядка [14; 33], который можно рассматривать как взаимодействие трех фотонов: поглощение двух фотонов, в результате которого происходит переход молекулы в электронно-возбужденное состояние, и последующее спонтанное испускание третьего фотона (обычно с более высокой энергией). Переход в возбужденное состояние происходит через набор промежуточных "виртуальных" состояний, а именно первый фотон приводит к нерезонансному переходу в "виртуальные состояния" время жизни таких состояний меньше периода колебаний световой волны ( $10^{-16}$ - $10^{-15}$  с), а второй фотон переводит молекулы в реальное электронное возбужденное состояние. При двухфотонном возбуждении интенсивность флуоресценции пропорциональна квадрату интенсивности возбуждающего излучения  $I_{ex}$  [9; 33]:



$$I^{TPE} = \sigma_2 I_{ex}^2, \quad (1.8)$$

где  $\sigma_2$  - сечение двухфотонного поглощения [33], которое можно представить как произведение сечения однофотонного поглощения для первого и второго фотона и времени жизни виртуального промежуточного состояния  $\sigma_2 = \sigma_{gj}\sigma_{je}\tau_j$

Двухфотонное возбуждение стало важной альтернативой традиционному однофотонному возбуждению в флуоресцентной микроскопии и спектроскопии [1; 34]. Основными преимуществами двухфотонного процесса поглощения по сравнению с однофотонным прежде всего являются локализация области возбуждения, что позволяет исключить попадания фоновой засветки за пределы фокального объема, а также довольно низкое сечение поглощения, что практически не разрушает чувствительные биологические образцы [34; 35].

Интенсивность флуоресценции, излучаемая молекулами в момент времени  $t$  после возбуждения, может быть представлена исходя из следующего выражения [14]:

$$I(t)_{fl} = \langle N(t) |d_{fl}(t) \cdot e_{fl}|^2 \rangle, \quad (1.9)$$

где  $N(t)$  – изменение населенности возбужденного состояния,  $e_{fl}$  – вектор поляризации флуоресценции и  $d_{fl}(t)$  – дипольный момент перехода флуоресценции. Из выражения 1.9 видно, что кинетика флуоресценции определяется не только изменением населенности возбужденного состояния с течением времени, а также зависит от поляризационных эффектов, подробное обсуждение которых будет представлено в секции 1.4.

Изменение населенности возбужденного состояния  $N(t)$  не зависит от поляризации излучения флуоресценции и поляризации возбуждающего излучения. Наблюдаемое изменение интенсивности флуоресценции с течением времени, связанное только с изменением населенности возбужденного состояния, называется изотропным затуханием флуоресценции  $I(t) \approx N(t)$  Изотропное (не зависящее от поляризации) затухание интенсивности флуоресценции определяется кинетическим уравнением первого порядка 1.2, с учетом суммирования всех каналов флуоресценции с различными временами затухания  $\tau_i$  [2]:

$$I(t) = I_0 \sum_i a_i \exp(-t/\tau_i), \quad (1.10)$$

где  $a_i$  - вклады различных каналов в общий сигнал затухания флуоресценции.

### 1.2.2 Метод счета фотонов с временной корреляцией

В настоящее время наиболее популярным методом для регистрации сигналов затухания флуоресценции  $I(t)$  является метод счета единичных фотонов с временной корреляцией (TCSPC). Счет единичных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) является универсальным и чрезвычайно чувствительным методом. По замыслу и определению в данном методе регистрируются отдельные кванты излучения флуоресценции. TCSPC используется для регистрации излучения с достаточно низкой интенсивностью с временным разрешением порядка 50-100 пс. Измерение затухания флуоресценции методом счета фотонов предполагает возбуждения образца коротким лазерным импульсом, короче времени жизни возбужденного состояния, и измерения флуоресценции с помощью лавинного фотодиода или фотоэлектронного умножителя, работающих в режиме счета фотонов. Затем сигналы с фотодетектора обрабатываются системой счета фотонов с временной корреляцией (TCSPC) [9; 30]. Упрощенная схема метода TCSPC представлена на Рис. 1.3.

Технику счета единичных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) можно сравнить с быстрым секундомером с двумя входами. Часы запускаются лазерным импульсом и останавливаются приходом фотона флуоресценции. Время, измеренное для одной пары импульсов, приведет к увеличению на единицу значения соответствующего этому времени столбца в гистограмме, в которой по оси  $x$  отложено время задержки, а по оси  $y$  – количество фотонов за соответствующий временной интервал. С помощью источника света с высокой частотой повторения могут быть измерены задержки между миллионами пар импульсов за короткое время экспозиции. Полученная гистограмма представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от времени. Однако

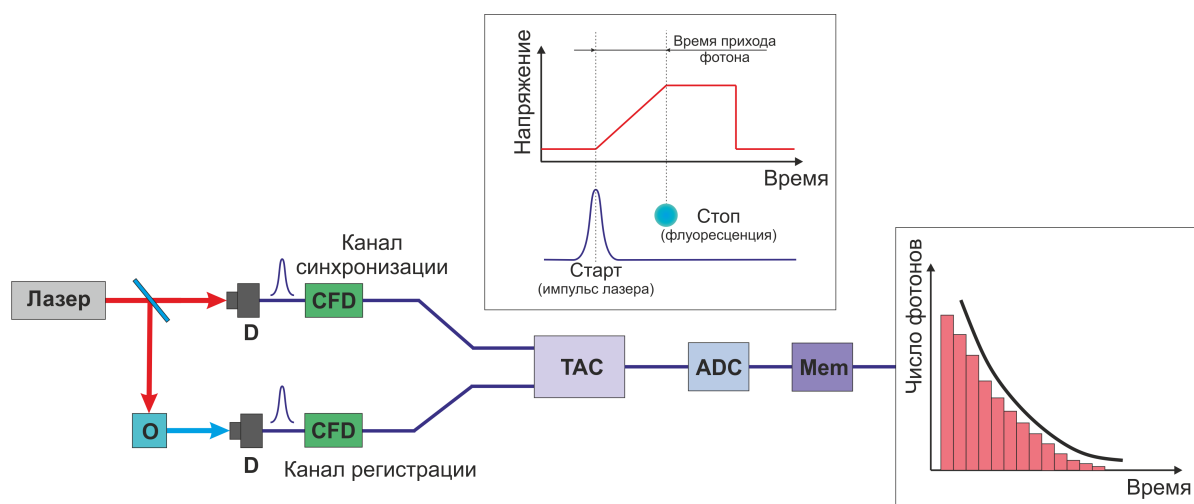


Рисунок 1.3 — Упрощенная схема устройства счета единичных фотонов с временной корреляцией. О-исследуемый образец, D-фотодетекторы, CFD-дискриминатор импульсов, ТАС-амплитудно-временной преобразователь, ADC-аналого-цифровой преобразователь, Mem-устройство формирования гистограммы.

всегда может присутствовать так называемая ошибка "накопления импульсов". То есть важно обеспечить регистрацию только одного фотона за цикл. Если за цикл постоянно будет приходиться больше одного фотона, то система будет детектировать только ранние фотоны. Это происходит из-за того, что после обнаружения одного фотона система некоторый промежуток времени, называемый интервалом простоя, не регистрирует сигнал. По истечении этого промежутка времени система видит первый фотон из последовательности и пропускает остальные. Следовательно, необходимо учитывать скорость счета и время интервала простоя, чтобы избежать эффекта накопления, который приводит к неправильному определению времени жизни. [30]

Согласно Рис. 1.3., часть излучения лазера отводится в канал синхронизации. Излучение флуоресценции попадает в канал регистрации сигнала. После приемников излучения сигнал попадает на дискриминатор импульсов (CFD), основной задачей которого является выделение полезного сигнала от шума. На входе CFD поступающие импульсы оцениваются по высоте импульса. Только импульсы выше заданного порога будут приниматься для дальнейшей обработки сигнала. Таким образом, импульсы шума малой амплитуды устраняются. После CFD сигнал подается на амплитудно-временной преобразователь (ТАС). ТАС по существу является генератором линейного напряжения, который за-

пускается одним сигналом и останавливается другим. Результатом является напряжение, пропорциональное разнице во времени между двумя сигналами. Напряжение, полученное от ТАС, затем подается на аналого-цифровой преобразователь (ADC). ADC должен быть очень быстрым, чтобы сократить время простоя системы. Далее сигнал поступает в канал памяти (Mem), который формирует гистограмму.

Как правило, измерения затухания интенсивности флуоресценции проводят в условиях магического угла, чтобы влияния поляризационно-зависимых анизотропных процессов на затухание интенсивности флуоресценции. При возбуждении образца линейно поляризованным лазерным излучением, измерения флуоресценции обычно осуществляют с помощью поляризатора, который ставится в канале регистрации сигналов под углом  $54.7^\circ$  по отношению к направлению плоскости поляризации возбуждающего излучения. [9] Упрощенная схема измерения сигналов затухания флуоресценции представлена на рисунке 1.4.

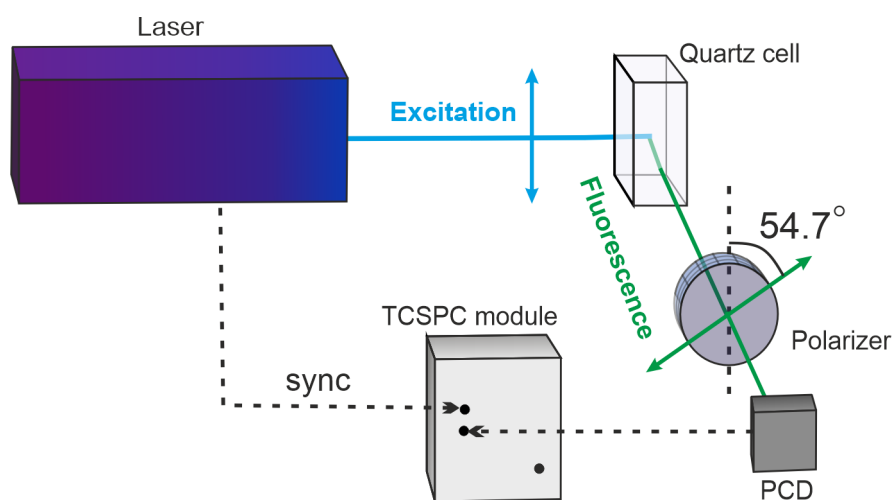


Рисунок 1.4 — Упрощенная схема измерений время-разрешенных сигналов флуоресценции: sync - синхронизация, PCD - детектор, работающий в режиме счета фотонов, polarizer - поляризатор, TCSPC module - модуль время-корреляционной системы счета фотонов.

Характеристикой системы счета фотонов, которая определяет временное разрешение системы, является функция отклика детектора (IRF). Ширина функции отклика детектора зависит от неопределенности синхронизации, которую детектор вносит при преобразовании фотона в электрический импульс, от времени лазерного импульса и джиттера электронных приборов. Для анализа сигналов затухания флуоресценции обычно используют выражение, учи-

тывающие свертку экспоненциальной модели 1.10 затухания флуоресценции с функцией отклика детектора: [5; 36]:

$$I(t) = I_0 \int_0^t IRF(t') \sum_i a_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt', \quad (1.11)$$

где  $IRF(t')$ — функция отклика детектора,  $t'$ — момент времени возбуждения,  $\tau_i$ — времена затухания флуоресценции,  $a_i$ —предэкспоненциальные множители.

В качестве примера на Рис. 1.5 приведены сигналы затухания флуоресценции триптофана и его производной 7-флуоротриптофана в различных растворителях и функция отклика детектора  $IRF(t)$  [37].

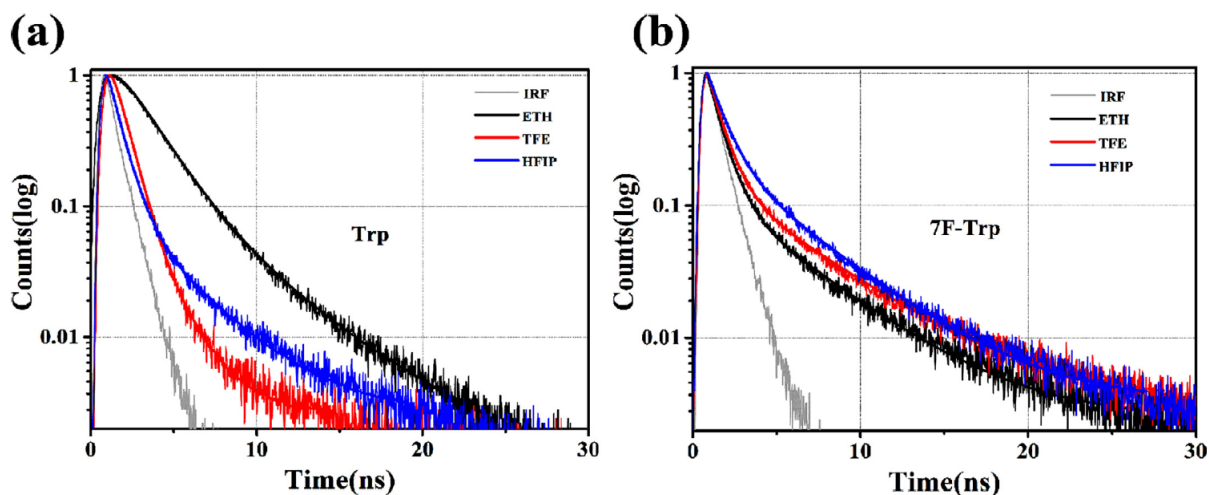


Рисунок 1.5 — Сигналы затухания флуоресценции триптофана (Trp) и 7-флуоротриптофана (7F-Trp) в растворах этанола (ETH), трифторэтанола (TFE) и гексафторпропан-2-ола (HFIP). Серая линия - функция отклика детектора (IRF). [37]

Используя монохроматор в канале регистрации сигналов, можно получить многомерные спектры, в которых помимо спектрального разрешения появляется зависимость интенсивности флуоресценции от времени. В результате можно провести комплексный анализ времен жизни флуоресценции для каждой длины волны излучения в пределах полосы флуоресценции исследуемого вещества. [11] Например, Марку и др. используя полосовой сканирующий монохроматор, оснащенный ФЭУ, регистрировали сигналы затухания флуоресценции коллагена, эластина и холестерина со спектральным разрешением. [38]

### 1.3 Спектроскопия накачка-зондирование

Зачастую информация, которую можно получить из измерений время-разрешенной флуоресценции, является недостаточной для более детального понимания процессов, происходящих в возбужденном состоянии биологических молекул. Как было отмечено в 1.1 помимо флуоресценции и относительно длинных безызлучательных переходов из возбужденного состояния в основное, в молекуле после возбуждения происходит ряд быстрых процессов с характерным временем от нескольких фс до десятков пс [10; 14; 39]. Задача получения информации об этих процессах, а именно о количестве этих процессов, их временах и какой вклад они вносят в динамику возбужденного состояния молекулы непосредственно из эксперимента, является не тривиальной и представляет большой интерес. Метод наблюдения сигналов затухания флуоресценции не подходит для данной задачи, поскольку его временное разрешение ограничено скоростью отклика детекторов и составляет порядка 50-100 пс [9]. Фемтосекундная лазерная спектроскопия «накачка-зондирование» является наиболее перспективным методом для мониторинга сверхбыстрых фотоиндуцированных процессов в многоатомных молекулах [10; 19; 40–42].

В методе «накачка-зондирование» короткий лазерный импульс (импульс накачки) осуществляет возбуждение молекул исследуемого образца, затем второй (зондирующий) импульс осуществляет мониторинг изменения свойств образца во времени [43]. Упрощенная схема метода представлена на Рис. 1.6.

Для того, чтобы получить сигнал изменения интенсивности прошедшего через образец зондирующего излучения во времени  $\Delta A(\Delta t, \lambda)$ , используется оптическая линия задержки, с помощью которой реализуется изменение временного интервала  $\Delta t$  между приходом импульса накачки и зондирующего импульса. Временное разрешение метода «накачка-зондирование» определяется длительностью импульсов накачки и зондирующих импульсов и может достигать десятков и даже единиц фемтосекунд [19].

В общем случае излучение накачки и зондирующее излучение фокусируются в кювету неколлинеарно, а направление поляризации излучения накачки поддерживается под магическим углом ( $54.7^\circ$ ) по отношению к направлению поляризации зондирующего излучения, чтобы свести к минимуму поляризации-

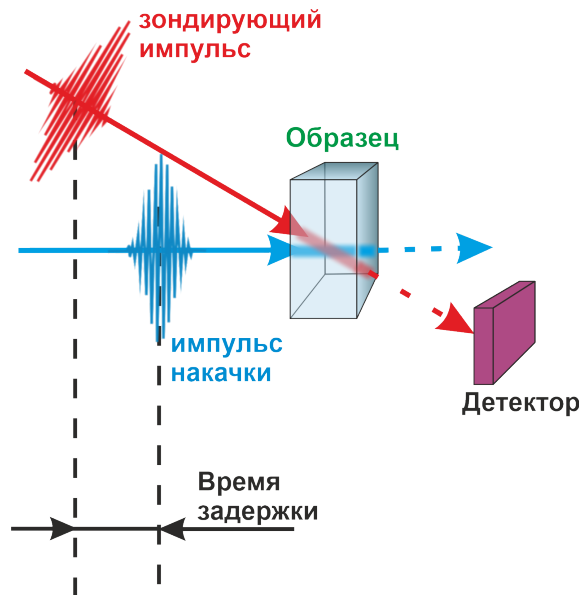


Рисунок 1.6 — Упрощенная схема метода накачка-зондирование

онные эффекты. Сигнал изменения интенсивности прошедшего через образец зондирующего излучения во времени  $\Delta A(t)$  называется сигналом разностного поглощения [44] и определяется исходя из следующего выражения:

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = \lg \frac{I_0(\lambda)}{I(\Delta t, \lambda)}, \quad (1.12)$$

где интенсивность  $I_0(\lambda)$  — интенсивность зондирующего излучения, измеренная при отсутствии импульса накачки, и  $I(\Delta t, \lambda)$  — интенсивность прошедшего через образец зондирующего излучения при возбуждении образца импульсами накачки.

Сигнал разностного поглощения  $\Delta A$  очень слабый по отношению к интенсивности зондирующего излучения: амплитуда этого сигнала обычно на 5 и более порядков меньше амплитуды зондирующего излучения. Для измерения таких сигналов используется балансная система регистрации, а сигнал анализируется с помощью синхронного усилителя. Для этого осуществляют высокочастотную амплитудную модуляцию излучения накачки с частотой более 1 МГц акустическим или электрооптическим модулятором, в то время как зондирующий пучок до фокусировки на образец остается немодулированным. Схема высокочастотной модуляции является важнейшим техническим элементом для достижения желаемой чувствительности метода накачка-зондирование. [45] При прохождении зондирующего излучения через возбужденный образец изменение его интенсивности будет также промодулировано на частоте модуляции излу-

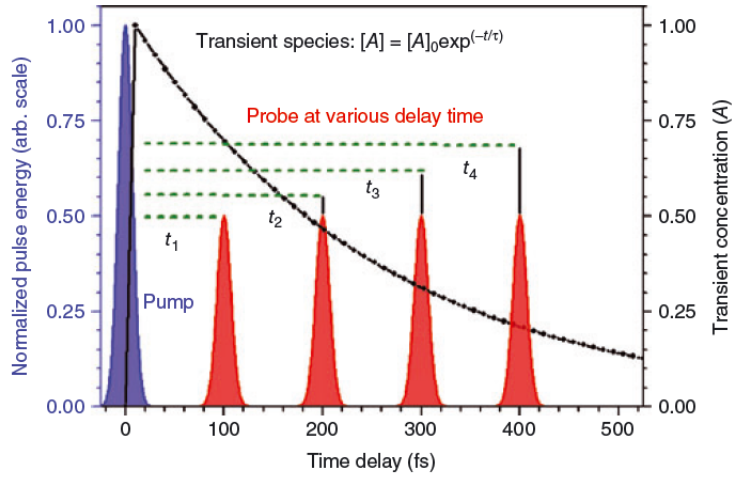


Рисунок 1.7 — Формирование сигнала разностного поглощения  $\Delta A(t)$  [10]: в момент времени  $\Delta t = 0$ , импульс накачки (Pump) и зондирующий импульс (Probe) перекрываются,  $t_i$  - различные моменты времени прихода зондирующего импульса.

ния накачки. Таким образом полезный сигнал выделяется только на определенной частоте, что позволяет достоверно зарегистрировать слабый сигнал  $\Delta A(t)$  и значительно повысить соотношение сигнал шум. Кроме того, в данной схеме обычно используют лазеры, с высокой частотой повторения импульсов (порядка 80 МГц), чтобы усреднить большее количество лазерных импульсов в единицу времени. В результате может быть достигнута чувствительность обнаружения порядка  $10^6$  единиц оптической плотности [46]. Используя высокочастотную модуляцию, Хартланд и его коллеги обнаружили сигналы от изолированных однослойных углеродных нанотрубок с чувствительностью порядка  $5 \cdot 10^{-6}$  [47].

Величина сигнала разностного поглощения зависит от эффективности поглощения на конкретной длине волны зондирующего импульса, а также от заселенности энергетического уровня, в котором оказались молекулы после воздействия импульса накачки [44]:

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = \sum_j \Delta A_j(\Delta t, \lambda) = \sum_j n V P_j(\Delta t, \lambda), \quad (1.13)$$

где  $n$  — плотность частиц в объеме  $V$  в области воздействия излучения накачки и зондирующего излучения,  $P_j(\Delta t, \lambda)$  — общая вероятность поглощения фотона накачки и фотона зондирующего излучения. Выражение 1.13 справедливо при условии, если молекулы взаимодействуют только с падающими лазерными импульсами, а не с сигналом, испускаемым другими частицами после



возбуждения, и что молекулы не образуют комплексов в возбужденном состоянии (при условии достаточно низкой концентрации).

В зависимости от длин волн импульса накачки и зондирующего импульса и схемы эксперимента можно наблюдать переходное поглощение, вынужденное излучение, истощение основного состояния или комбинацию этих процессов с временным разрешением [10; 48]. Некоторые процессы, которые могут происходить при воздействии зондирующего импульса схематически изображены на Рис. 1.8.

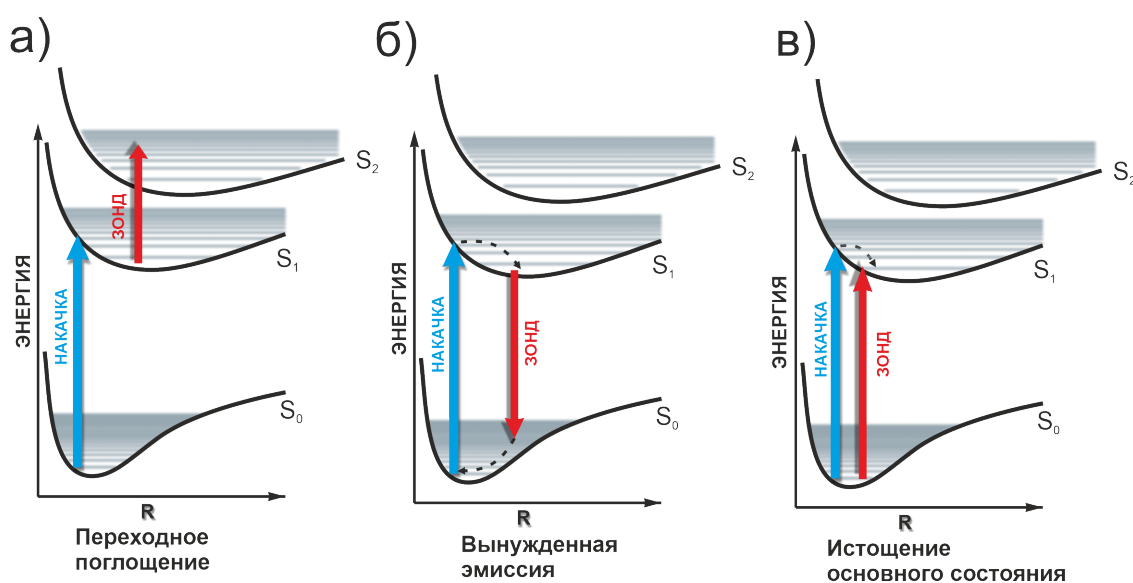


Рисунок 1.8 — Схематическая иллюстрация переходов между электронными состояниями молекулы при воздействии импульса накачки и зондирующего импульса: а) поглощение из возбужденного состояния (переходное поглощение), б) вынужденный переход в основное состояние (стимулированная эмиссия), в) истощение основного состояния

Как показано на Рис. 1.8 а) при поглощении зондирующего излучения система может перейти в более высоко лежащее возбужденное состояние. Такой процесс называется поглощением из возбужденного состояния, или переходное поглощение. В этом случае сигнал разностного поглощения  $\Delta A$  будет положительным. По сравнению с двухфотонным поглощением, которое проходит через виртуальные промежуточные состояния, поглощение в возбужденном состоянии является резонансным процессом, то есть переход происходит между реальными электронными состояниями.

Если энергия фотонов зондирующего излучения близка к резонансу между первым возбужденным состоянием и основным состоянием, то воздействие

зондирующего излучения будет приводить к вынужденному испусканию фотона. В этом случае сигнал разностного поглощения  $\Delta A$  будет отрицательным [49]. Схематически процесс вынужденной эмиссии представлен на Рис. 1.8 б).

Для наблюдения сигналов истощения основного состояния длина волны зондирующего излучения выбирается близко к длине волны, на которой наблюдается пик поглощения. Стоит отметить, что для наблюдения сигналов вынужденной эмиссии длина волны зондирующего излучения выбирается вдали от пика поглощения. [50]. Схематически процесс истощения основного состояния представлен на Рис. 1.8 в).

Если в качестве зондирующего импульса используется суперконтинуум, то есть зондирующий импульс включает довольно большой набор частот, а для регистрации сигналов разностного поглощения используется монохроматор, то появляется возможность детектировать изменения интенсивности зондирующего импульса как во времени, так и со спектральным разрешением [19]. На Рис. 1.9 сверху приведена зависимость величины сигнала разностного поглощения  $\Delta A$  от длины волны.

С помощью метода накачка-зондирование стало возможно исследовать процессы в многоатомных биологических молекулах с субпикосекундным временным разрешением [34; 51–54]. Спектроскопия накачка-зондирование позволяет достичь ранее недоступного уровня понимания динамики внутри- и межмолекулярных взаимодействий, таких как процессы переноса заряда, изомеризации в возбужденном состоянии, резонансный перенос энергии между молекулярными группами и др [50; 55]. Работы по исследованию фотохимических реакций с сверхвысоким временным разрешением начались с Ахмед Хассан Зевайла [40; 56; 57], который впервые исследовал динамику химических реакций с помощью метода сверхбыстрого фемтосекундного поглощения из возбужденного состояния. Также с помощью метода накачка-зондирование, была исследована динамика фотохимической реакции переноса электрона или протона [34]. Также большой интерес представляют исследования реакции фотоиндуцированной изомеризации (например, цис-транс изомеризация), которые реализуются за счет механизмов релаксации в возбужденном состоянии, опосредованные внутренней конверсией (IC, Рис. 1.1), с образованием либо исходного изомера, либо его аналога фотоизомера [34; 58]. Реакции фотоизомеризации играют жизненно важную роль в функционировании естественных фотосистем,

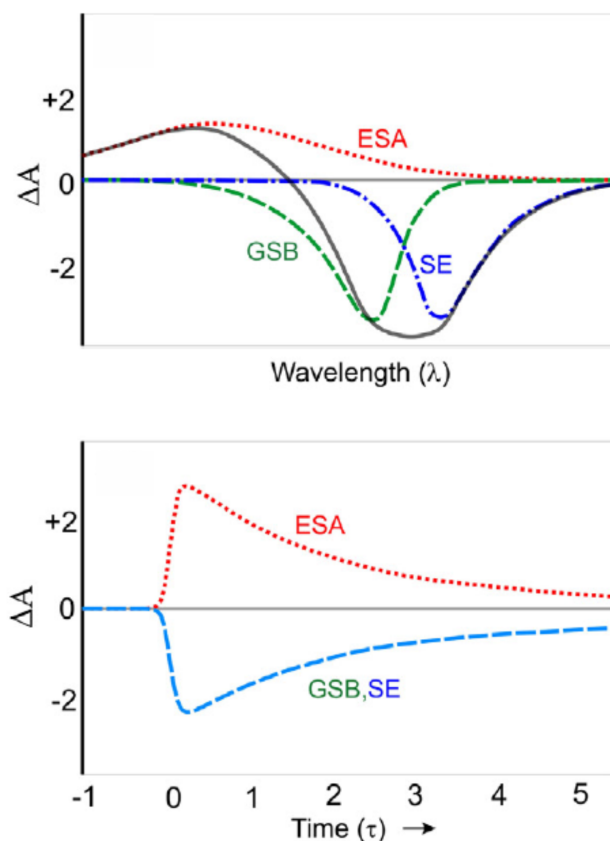


Рисунок 1.9 — Зависимость  $\Delta A$  от длины волны излучения накачки (сверху) и примеры сигналов разностного поглощения  $\Delta A$  зондирующего излучения (снизу), обусловленные поглощением из возбужденного состояния (TA), вынужденным излучением (SE) и истощением основного состояния (GSB) [19].

включая фотопереключателы, фоторецепторы, молекулярные моторы и тд. [51] Например, было показано, что процесс фотоизомеризации ретиналя в фоторецепторном белке родопсин протекает в течение 200 фс после фотовозбуждения [10; 52]. Другим примером является азобензол, у которого длительность процесса фотоизомеризации составила порядка 16 пс [53; 54].

Одним из наиболее значимых преимуществ метода накачка-зондирование, по сравнению с флуоресцентными методами исследования, является то, что с помощью данного метода появляется возможность исследования молекул, не проявляющих флуоресценцию. Довольно большое число исследований с помощью метода накачка-зондирование было сосредоточено на нефлуоресцентных молекулах, таких как гемоглобин и цитохромы, которые поглощают свет, но не флуоресцируют [45]. Например, Фу и др разработали метод измерения степени оксигенации, основанный на измерений сигналов разностного поглощения дезоксигемоглобина и оксигемоглобина по схеме накачка-зондирование [59]. На

основе наблюдения сигналов разностного поглощения в схеме с вынужденной эмиссией Мин и его коллеги достигли наномолярной чувствительности обнаружения нефлуоресцентных молекул [49].

В настоящее время схема-накачка зондирование активно применяется в области время-разрешенной микроскопии [45; 49; 60; 61]. Например, с помощью схемы накачка-зондирование был разработан один из методов детектирования отдельных молекул (STED). Чонг и его коллеги разработали метод микроскопии накачка-зондирование на основе наблюдения сигналов истощения в основном состоянии и достигли пространственного разрешения 15 нм [62]. Разработанная методика сканирующей лазерной микроскопии «накачка-зондирование» также была применена для диагностики меланомы, в результате чего впервые удалось различить эумеланин и феомеланин [59].

#### 1.4 Анизотропия и анизотропные процессы релаксации в возбужденном состоянии многоатомных молекул

При возбуждении образца линейно или циркулярно поляризованным лазерным излучением преимущественно возбуждаются те молекулы, оси которых направлены преимущественно вдоль направления поляризации возбуждающего излучения [63]. Таким образом в возбужденном состоянии возникает анизотропный молекулярный ансамбль  $n(\theta, \phi, t)$ , как показано на Рис. 1.10. Функция  $n(\theta, \phi, t)$  представляет собой плотность возбужденных флуорофоров с определенным угловым распределением дипольных моментов перехода, ориентированных в пределах углового интервала 0 до  $\theta$ . В результате анизотропного распределения осей возбужденных молекул возникает частичная поляризация излучения флуоресценции [9; 64; 65]. При протекании процессов релаксации в возбужденном состоянии, дипольный момент перехода флуоресценции может менять свое направление за счет перестройки ядерной конфигурации (колебательная релаксация, фотоизомеризация, фотоиндуцированный перенос заряда) или за счет взаимодействий молекулы флуорофора с молекулами растворителя (перенос энергии, вращательная диффузия) [66]. Если функция  $n(\theta, \phi, t)$  извест-

на, то можно оценить интенсивность, анизотропию и/или степень поляризации излучения флуоресценции.

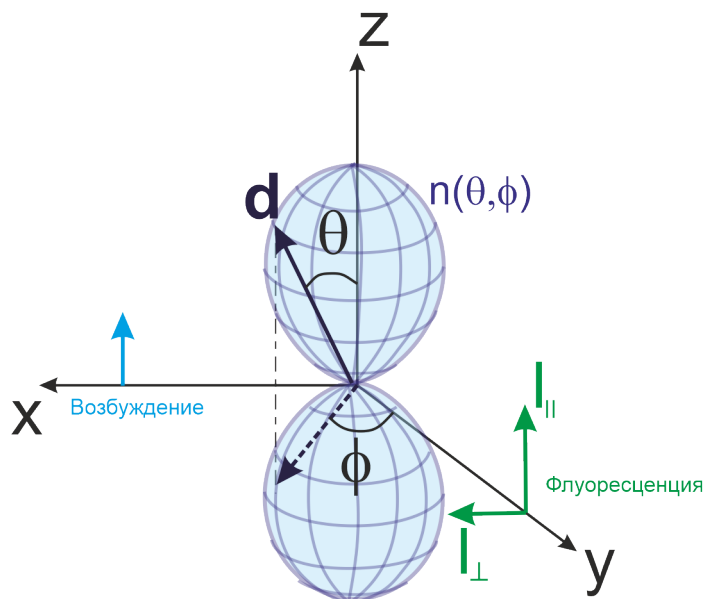


Рисунок 1.10 — Распределение осей возбужденных молекул  $n(\theta, \phi)$  в момент времени  $t=0$  после возбуждения.

Компоненту поляризации флуоресценции, параллельную поляризации возбуждающего излучения, называют параллельной составляющей и обозначают  $I_{\parallel}$ , а компоненту, перпендикулярную поляризации возбуждения, называют перпендикулярной составляющей и обозначают  $I_{\perp}$ . Измеряя затухание интенсивностей ортогональных компонент поляризации флуоресценции  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$  можно получить информацию об анизотропии флуоресценции в начальный момент времени и характерные скорости ее затухания во времени.

При однофотонном возбуждении интенсивность флуоресценции определяется следующим выражением [67]:

$$I_{fl}^{OPE}(t) = \langle \mu_{\alpha}(0) \mu_{\alpha}^{*}(0) \mu_{fl}(t) \mu_{fl}^{*}(t) \rangle N(t), \quad (1.14)$$

где  $\mu_{\alpha} = \alpha \langle f | \mathbf{d}_{ab} | o \rangle$  - матричный элемент оператора дипольного момента возбуждения,  $\alpha$ -поляризация возбуждающего излучения  $\mu_{fl}(t)$ -зависящий от времени матричный элемент оператора дипольного момента флуоресценции,  $N(t)$  - член, описывающий изменение населенности молекул в возбужденном состоянии с течением времени.

В случае двухфотонного возбуждения интенсивность флуоресценции определяется не проекцией одного вектора поля на вектор дипольного момента пе-

рехода, а двойной проекцией двух векторов поля на тензор двухфотонного перехода  $S$  [67]:

$$I_{fl}^{TPE}(t) = \langle S(0)S(0)\mu_{fl}(t)\mu^*_{fl}(t) \rangle N(t), \quad (1.15)$$

где  $S$  -компоненты тензора двухфотонного перехода [68]:

$$S = \sum_n \left( \frac{\alpha \langle f|\mathbf{d}_1|n \rangle \langle n|\mathbf{d}_2|o \rangle \beta}{\nu_n - \nu_\alpha + i\Gamma} + \frac{\beta \langle f|\mathbf{d}_1|n \rangle \langle n|\mathbf{d}_2|o \rangle \alpha}{\nu_n - \nu_\beta + i\Gamma} \right), \quad (1.16)$$

где  $\mathbf{d}_1$  и  $\mathbf{d}_2$  дипольные моменты переходов, инициированные воздействием первого и второго фотонов,  $\alpha$  - поляризация первого фотона и  $\beta$  - поляризация второго фотона.

Начальная анизотропия, которая определяется при вычислении матричного элемента в выражениях 1.14 и 1.15, зависит от симметрии исследуемой молекулы, от распределения электронной плотности молекулы в процессе перехода из основного в возбужденное состояние [64], и при переходе из возбужденного состояния в основное, что определяет направление дипольного момента переходов поглощения и флуоресценции, соответственно [67; 69], а также от вида поляризации возбуждающего излучения (линейная или циркулярная поляризация). [65; 70]

В случае однофотонного возбуждения молекулы типа симметричного волчка или плоской молекулы линейно-поляризованным лазерным излучением параметр анизотропии  $r_0^{OPE}$  можно представить в виде [9; 65]:

$$r_0^{OPE} = \frac{2}{5} P_2(\cos \theta), \quad (1.17)$$

где  $\theta$  — угол между дипольными моментами перехода  $\mathbf{d}_{ab}$  и  $\mathbf{d}_{fl}$  возбуждения и флуоресценции, соответственно, а  $P_2(\cos \theta)$  — полином Лежандра второго порядка. Согласно уравнению 1.17 параметр  $r_0^{(1)}$  принимает значения от  $r_0^{(1)} = 2/5$  до  $r_0^{(1)} = -1/5$ , когда угол  $\theta$  находится в диапазоне от  $\theta = 0$  до  $\theta = \pi/2$  и проходит через нулевое значение при "магическом" угле  $\theta$  приблизительно  $57.4^\circ$ .

Если оба фотона возбуждающего излучения имеют одинаковую поляризацию, то параметр анизотропии флуоресценции  $r_0^{TPE}$  в общем случае может быть представлен в виде [71]:

$$r_0^{(2)} = \frac{2}{7} \left[ \frac{3D}{T d_{fl}^2} - 1 \right], \quad (1.18)$$

где

$$D = 2\mathbf{d}_{fl} \cdot \mathbf{S}^2 \cdot \mathbf{d}_{fl} + (\mathbf{d}_{fl} \cdot \mathbf{S} \cdot \mathbf{d}_{fl}) Tr \mathbf{S}, \quad (1.19)$$

и

$$T = Tr^2 \mathbf{S} + 2Tr \mathbf{S}^2, \quad (1.20)$$

где  $\mathbf{S}$  — тензор двухфотонного поглощения с компонентами  $S_{XX}$ ,  $S_{YY}$ ,  $S_{ZZ}$  относительно главных осей молекулы.

В общем случае направление дипольного момента флуоресцентного перехода  $\mathbf{d}_{fl}$  в уравнении (1.19) описывается полярными углами  $\theta_{FS}$  и  $\phi_{FS}$  относительно главной оси двухфотонного тензора  $\mathbf{S}$ .

Если одна из диагональных компонент тензора двухфотонного поглощения  $\mathbf{S}$  много больше остальных,  $S_{ZZ} \gg S_{XX}, S_{YY}$  параметр анизотропии флуоресценции  $r_0^{(2)}$  в уравнении (1.18) можно упростить до вида [9; 71; 72]:

$$r_0^{TPE} = \frac{4}{7} P_2(\cos \theta_{FS}), \quad (1.21)$$

где  $\theta_{FS}$  приблизительно соответствует углу  $\theta$  между дипольными моментами перехода возбуждения и флуоресценции в случае однофотонного возбуждения. Параметр  $r_0^{(2)}$  в уравнении (1.21) может варьироваться от  $r_0^{(2)} = 4/7$  до  $r_0^{(2)} = -2/7$ , проходящий через ноль в точке  $\theta_{FS}$  приблизительно на  $57.4^\circ$ .

Начальная анизотропия флуоресценции при двухфотонном возбуждении зависит как от структуры тензора двухфотонного перехода, так и от ориентации дипольного момента перехода флуоресценции [71; 73]. На Рис. изображены формы тензоров двухфотонного перехода для различных возможных значений  $r_0$ .

Из экспериментальных измерений анизотропии флуоресценции в случае линейно- и циркулярно-поляризованного возбуждения можно определить компоненты тензора двухфотонного перехода [65; 69; 74]. Например, в работе [69] были проведены исследования затухания поляризованной флуоресценции п-тре-

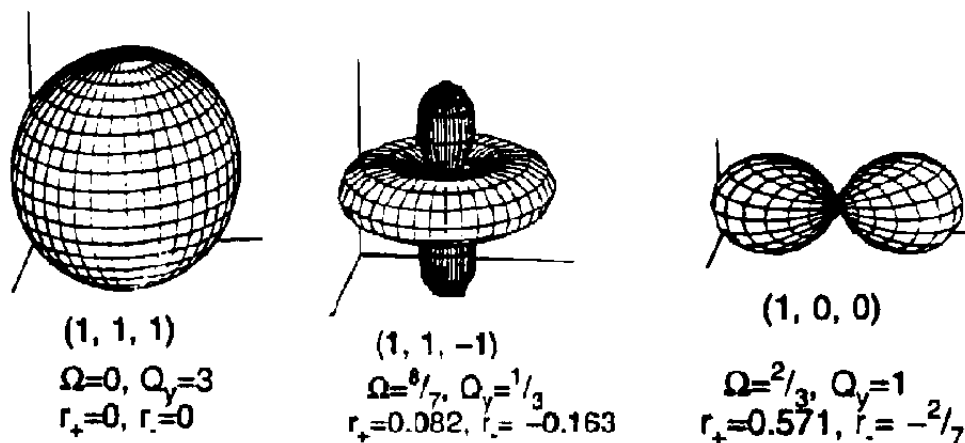


Рисунок 1.11 — Типы тензоров двухфотонного перехода, представленные в виде сферических поверхностей в полярной системе координат, где длина радиус-вектора, проведенного от начала координат к поверхности, дает амплитуду поглощения двух идентичных линейно поляризованных фотонов с электрическим полем, направленным в направлении этого вектора. [65]

финила при двухфотонном двухцветном возбуждении. В результате анализа анизотропии флуоресценции, полученной при двухфотонном возбуждении с различными поляризациями фотонов, совместно с квантово-химическими расчетами удалось определить всю структуру тензора двухфотонного поглощения и описать динамику исследуемого трехфотонного процесса в молекуле п-трефирила.

Как уже было сказано выше начальная анизотропия флуоресценции может затухать за время нахождения молекулы в возбужденном состоянии, что обусловлено переориентацией дипольных моментов перехода ансамбля молекул за счет взаимодействия с окружением, внутримолекулярных взаимодействий, а также процессов переноса энергии в возбужденном состоянии. Затухание анизотропии флуоресценции описывается с помощью следующего выражения:

$$r(t) = r_0^{OPE, TPE} e^{-k_{ani}t}, \quad (1.22)$$

Деполаризация излучения флуоресценции может происходить в результате ряда процессов, таких как вращательная диффузия молекул, фотореакции в возбужденном состоянии, энергообмен, поворот дипольного момента перехода в процессе колебательной релаксации [9; 11]. Все эти процессы процессы могут протекать одновременно, таким образом скорость затухания анизотропии  $k_{ani}$



представляет собой некоторую эффективную скорость всех процессов деполаризации флуоресценции  $k_{ani} = k_{ani}^r + k_{ani}^v + k_{ani}^{et}$ . Скорости этих процессов  $k_{ani}^i$  могут отличаться на несколько порядков [75].

Одной из распространенных причин деполаризации флуоресценции является вращательная диффузия, которая характеризуется скоростью  $k_{ani}^r$  и возникает в результате переориентации молекулярных осей при взаимодействии возбужденных молекул с микроокружением. Угловое смещение при данном механизме деполаризации зависит от скорости вращения молекулы за время жизни возбужденного состояния [76]. Поведение ориентационной релаксации исследуемого флуорофора может дать значительный объем информации о взаимодействиях между флуорофором и его окружением. Скорость вращательной диффузии зависит от вязкости растворителя, структуры и свойств окружающих молекул, а также от размера и формы вращающейся молекулы. Затухание анизотропии флуоресценции в случае вращательной диффузии описывается следующим выражением [9; 14]:

$$r(t) = \sum_j r_{0j} \exp(-t/\tau_{r_j}), \quad (1.23)$$

где  $r_0$  — параметр анизотропии и  $\tau_{r_j}$  — время вращательной диффузии.

Измеряя время вращательной диффузии можно получить информацию о локальной вязкости раствора, о процессах связывания флуорофора с другими крупными молекулярными комплексами. Согласно соотношению Эйнштейна-Стокса время вращательной диффузии пропорционально вязкости раствора [77]:

$$\tau_r = fC \frac{\eta V}{kT}, \quad (1.24)$$

Если форма молекулы ( $V = const, f = const$ ) и коэффициент смачиваемости ( $C = const$ ) не меняются при изменении условий микроокружения, то при измерении времени вращательной диффузии появляется возможность оценить локальную вязкость [6; 78]. Например, было показано [75], что для некоторых зеленых флуоресцентных белков (GFP), затухание анизотропии флуоресценции характеризуется двумя временами порядка 1 нс и 13 нс. Согласно интерпретации авторов [75] более короткое время связано с локальным вращением флуорофора GFP, тогда как время 13 нс характеризовало враще-

ние молекулы как целого. Однако для более детального понимания динамики переориентации многоатомных биологических молекул необходимо учитывать изменение формы вращающейся молекулы, а также силы фрикционных взаимодействий между растворителем и растворенным веществом.

Также на скорость переориентации молекул в растворе может влиять диэлектрическая проницаемость, например, когда диполь-дипольные взаимодействия молекул растворителя и исследуемых молекул обуславливают возникновение крутящего момента. Этот механизм «диэлектрического трения» наблюдается только для полярных систем, где диполь-дипольные взаимодействия преобладают над межмолекулярными взаимодействиями. Характерное время переориентации молекул в этом случае описывается с помощью следующего выражения [65]:

$$\tau_{re} = \frac{\mu^2}{a^3 k_b T} \left[ \frac{\epsilon - 1}{(2\epsilon + 1)^2} \right] \tau_D, \quad (1.25)$$

где  $\mu$  – постоянный дипольный момент растворенного вещества,  $a^3$  – объем, занимаемый растворенным веществом,  $\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость растворителя,  $\tau_D$  – время диэлектрической релаксации растворителя, величина, связанная со временем переориентации отдельных молекул растворителя.

#### 1.4.1 Методика измерений затухания анизотропии флуоресценции

Измерение кривых затухания поляризационных компонент флуоресценции обычно осуществляется следующим образом: образец возбуждается линейно или циркулярно поляризованным лазерным излучением, далее отдельно измеряется затухание параллельной и перпендикулярной составляющих поляризации флуоресценции. Затухание поляризованной флуоресценции для двух компонент поляризации  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  измеряется либо с помощью одноканальной схемы, в которой каждая компонента измеряется за счет вращения поляризатора на одном приемном канале, либо с помощью двухканальной схемы, в которой интенсивности параллельной и перпендикулярной составляющих измеряются одновременно с использованием двух отдельных приемных каналов [9; 79]. Упро-

щенные схемы одно канальной и двухканальной установки представлены на Рис. 1.12.

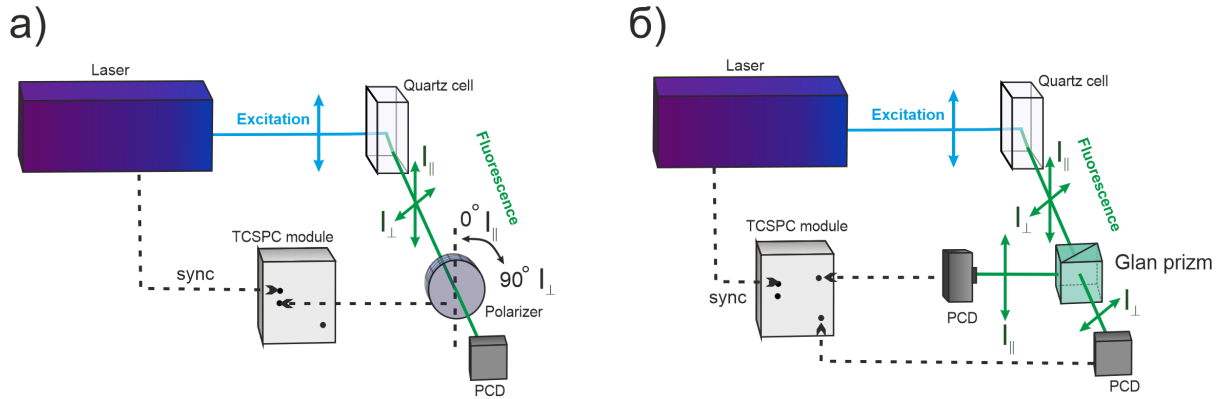


Рисунок 1.12 — Упрощенная схема измерений время-разрешенных сигналов ортогональных компонент поляризованной флуоресценции  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$ : а) Одноканальная схема, где  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$  измеряются последовательно, селекция компонент поляризации флуоресценции осуществляется с помощью поляризатора. б) Двухканальная схема, где  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$  измеряются одновременно, разделение компонент поляризации флуоресценции осуществляется с помощью призмы Глана (Glan prism). sync - синхронизация, PCD - детектор, работающий в режиме счета фотонов, polarizer - поляризатор, TCSPC module - модуль время-корреляционной системы счета фотонов.

Затухание параллельной ( $\parallel$ ) и перпендикулярной ( $\perp$ ) поляризационных компонент поляризованной флуоресценции при возбуждении линейно-поляризованным излучением определяются из следующих соотношений [9; 79–82]:

$$I_{\parallel}(t) = I(t) [1 + 2r(t)] \quad (1.26)$$

$$I_{\perp}(t) = I(t) [1 - r(t)], \quad (1.27)$$

где  $I(t)$  — изотропная, не зависящая от поляризации, составляющая флуоресценции,  $r(t)$  — анизотропия. При возбуждении циркулярно поляризованным излучением знаки перед  $r(t)$  в выражениях 1.26 и 1.27 меняются местами.

Основной характеристикой поляризованной флуоресценции является анизотропия, которая определяется из интенсивностей ортогональных поляризационных компонент флуоресценции [9; 68; 80]:

$$r_{fluo}(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (1.28)$$

где знаменатель в уравнении (1.28) представляет собой полную интенсивность флуоресценции  $I_x + I_y + I_z$ , где  $I_x$ ,  $I_y$  и  $I_z$  — интенсивности для каждой из компонент поляризации флуоресценции. Анизотропия является безразмерной величиной, не зависящей от полной интенсивности флуоресценции и от концентрации флуоресцирующих молекул в растворе. В качестве примера на Рис. 1.13 представлены сигналы затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции и посчитанная из выражения 1.28 анизотропия. [83]

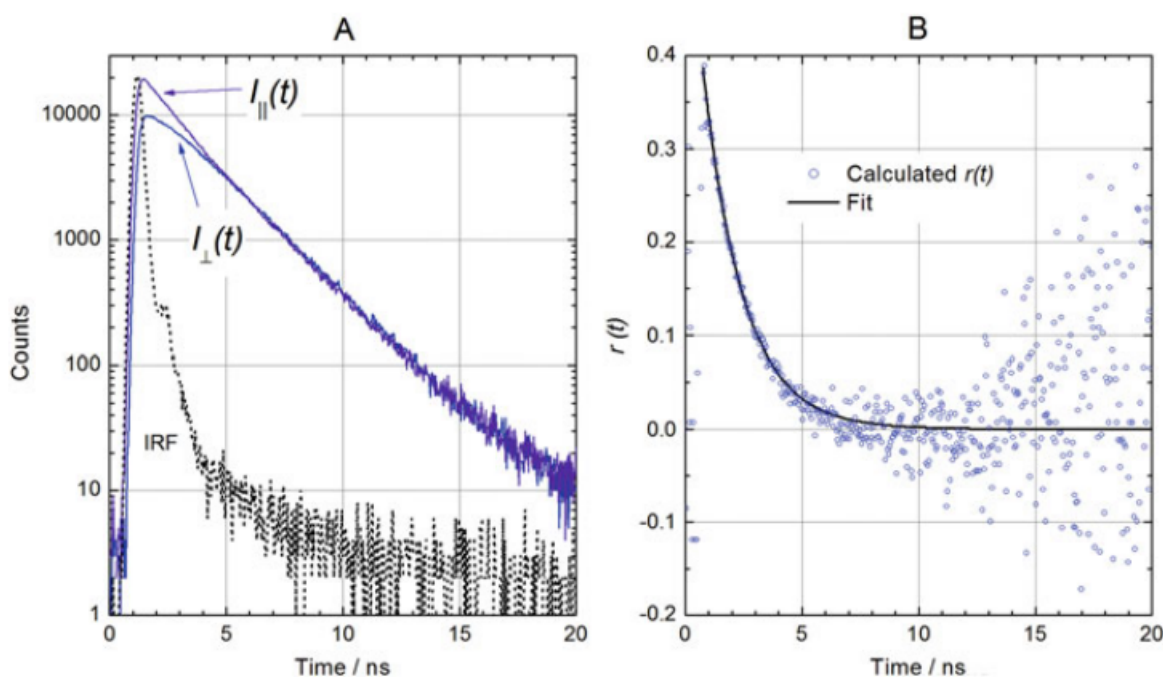


Рисунок 1.13 — Сигналы двух ортогональных компонент поляризованной флуоресценции (справа) и посчитанный из выражения 1.28 сигнал затухания анизотропии флуоресценции (слева). IRF - функция отклика детектора. [83]

Анизотропия флуоресценции при однофотонном и двухфотонном возбуждении экзогенных и эндогенных флуорофоров в растворах и клетках интенсивно изучалась на протяжении десятилетий [72]. Как продемонстрировали Лакочич и др. [72], некоторые флуорофоры (2,5-дифенилоксазол, дифенилгексатриен, NADH, кумарин) проявляли значения анизотропии при ТРЕ, связанные с анизотропией при ОРЕ простым коэффициентом  $10/7$ , другие имели аналогичные значения анизотропии. В то же время триптофан и тирозин показали более низкую анизотропию при ТРЕ, чем при ОРЕ, в частности, анизотропия ТРЕ тирозина была около нуля. Также было показано, что анизотропия флуорофоров, встроенных в белки, зависит от окружения белка и чувствительна к резонанс-

ному переносу энергии и изменениям конформации белка [72]. Двухфотонная угловая фото-селекция была успешно использована в нескольких исследованиях, связанных с обнаружением анизотропии флуоресценции как в растворах [72], так и в живых клетках [84–86]. Известно, что анизотропия некоторых флуоресцентных молекул меняет свое значение в пределах спектральной полосы возбуждения [71; 87; 88]. Лакович и др объясняли такое поведение анизотропии заселением нескольких возбужденных состояний молекулы [9]. В то же время у многих флуорофоров анизотропия флуоресценции остается практически одинаковой по всему спектру флуоресценции, поскольку излучательные переходы в основное состояние происходят из низшего возбужденного состояния [9; 89]. В работе [90] были проведены исследования анизотропии флуоресценции флуорина в вязких растворах при однофотонном и двухфотонном возбуждении в первое и второе возбужденные состояния, в результате было показано, что дипольные моменты перехода флуорина в первое и второе возбужденные состояния практически параллельны.

Эксперименты по поляризованной фото-селекции и анизотропии флуоресценции оказались ценными инструментами в изучении как структурных изменений в белках, так и природы упорядоченных сред, таких как мембраны и везикулы [9]. Начальная анизотропия для зеленого флуоресцентного белка (GFP) при однофотонном возбуждении на длине волны 400 нм составляла порядка 0.35, тогда как при двухфотонном возбуждении на длине волны 800 нм параметр анизотропии был порядка 0.51 [75]. Для молекул фенола параметр анизотропии флуоресценции при двухфотонном возбуждении ниже, чем при однофотонном, тогда как для 2,5 - Дифенилоксазола наоборот параметр анизотропии флуоресценции при двухфотонном возбуждении был выше, чем при однофотонном [5]. Согласно работе [5] такой эффект наблюдается за счет особенности распределения электронной плотности бензольного кольца. В некоторых случаях начальная анизотропия зависит от длины волны возбуждения. Для молекул индола также наблюдалась зависимость начальной анизотропии от длины волны возбуждения [88], при этом зависимости начальной анизотропии в случае линейно- и циркулярно-поляризованного возбуждения были противоположны.

Измерения анизотропии флуоресценции все более активно используются и для исследования живых клеток [78; 80; 91; 92]. В работе [80] были построены распределения анизотропии флуоресценции GFP в нескольких клеточных

линиях, и было показано, что начальная анизотропия флуоресценции GFP отличается для мономеров и димеров белка. В другой работе [91] было продемонстрировано, что с помощью измерений анизотропии с высоким разрешением, можно исследовать Ферстеровский резонанс между разными типами белков GFP. Стоит отметить, что измерение затухания анизотропии флуоресценции в живых клетках позволяют исследовать систему как на клеточном уровне путем построения распределения начальной анизотропии в клетке, так и на молекулярном уровне, путем обнаружения и разделения различных времен деполяризации флуоресценции в интересующей области клетки.

#### 1.4.2 Измерение анизотропии с субпикосекундным временным разрешением

Как было отмечено в предыдущем разделе, переориентация дипольных моментов различных переходов между электронными состояниями молекул может происходить в результате ряда процессов, скорость которых может отличаться на несколько порядков. С помощью описанного выше метода наблюдения затухания поляризованной флуоресценции невозможно разделить все эти процессы. Детальные исследования динамики переориентации дипольных моментов переходов были реализованы с помощью метода "накачка-зондирование"[44] с поляризационной чувствительностью. Используя сверхвысокое временное разрешение, анизотропное распределение дипольных моментов перехода, генерируемое импульсом накачки, эволюционирует из-за изменения населенности и ориентации молекул в возбужденном состоянии. При воздействии линейно-поляризованного зондирующего импульса можно исследовать эволюцию распределения дипольных моментов перехода в режиме реального времени [93]. Таким образом, измерения анизотропии с субпикосекундным временным разрешением могут быть использованы для определения взаимной ориентации дипольных моментов перехода относительно молекулярной структуры [94], а также для выявления постоянных времени и путей реакций, например, переноса энергии в реакционных центрах [95], экситонной делокализации в дендримерах [96], присоединения лигандов [97] или переносе электронов в белках [98].

В общем случае при прохождении линейно-поляризованного зондирующего излучения через образец, возбужденный поляризованным лазерным излучением накачки, может наблюдаться разница в поглощении ортогональных компонент его поляризации. Если молекулы в образце имеют фиксированную ориентацию, интенсивность поглощения может сильно зависеть от угла между осью ориентации (усредненной по всему молекулярному ансамблю) и направлением поляризации излучения. Такая зависимость оптической плотности от направления поляризации называется линейным дихроизмом (LD). Экспериментально это явление проявляется в том, что при прохождении линейно-поляризованного излучения через образец, ортогональные компоненты его поляризации будут поглощаться по разному [8]:

$$LD = \frac{\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}}{2} \ln 10 \quad (1.29)$$

Линейный дихроизм не проявляется, если образец изотропен, то есть если молекулы ориентированы случайным образом. В методе накачка-зондирование линейный дихроизм зондирующего излучения возникает за счет того, что воздействие линейно-поляризованного излучения накачки приводит к выстраиванию молекулярных осей, таким образом зондирующий пучок взаимодействует с возбужденным анизотропным молекулярным ансамблем. [8; 44] Различие между сигналами разностного поглощения  $\Delta A_{\parallel}$  и  $\Delta A_{\perp}$  связано с существованием угла между дипольным моментом перехода при воздействии накачки и дипольным моментом перехода при воздействии зондирующего импульса. В качестве примера на Рис. 1.14 представлены распределения дипольных моментов перехода при воздействии импульса накачки и зондирующего импульса.

Стоит отметить, что линейный дихроизм и анизотропия по существу являются двумя метриками одной и той же величины. Однако анизотропия, в случае наблюдения сигналов разностного поглощения, представляет собой разность в сигналах поглощения для двух ортогональных поляризационных компонент зондирующего излучения  $\Delta A_{\parallel}(\Delta t, \lambda)$  и  $\Delta A_{\perp}(\Delta t, \lambda)$ , нормированную на их сумму по трем направлениям [44; 48; 99]:

$$r_{abs}(\Delta t, \lambda) = \frac{\Delta A_{\parallel}(\Delta t, \lambda) - \Delta A_{\perp}(\Delta t, \lambda)}{\Delta A_{\parallel}(\Delta t, \lambda) + 2\Delta A_{\perp}(\Delta t, \lambda)}, \quad (1.30)$$

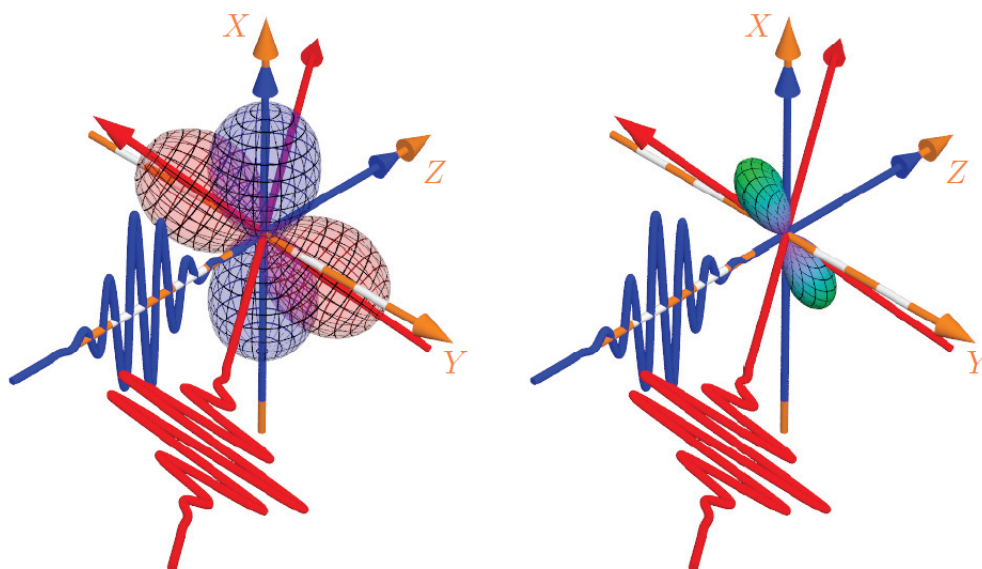


Рисунок 1.14 — Слева: Распределение дипольных моментов перехода при воздействии импульса накачки (синяя фигура) и при воздействии зондирующего импульса (красная фигура). Плоскость поляризации зондирующего излучения направлена под углом  $54.7^\circ$  по отношению к поляризации излучения накачки. Справа: финальное распределение дипольных моментов перехода после воздействия накачки и зондирующего излучения. [44]

Анизотропию можно отделить от изотропной релаксации путем измерения поворота поляризации зондирующего луча, прошедшего через образец, относительно его начальной поляризации [8; 100–104]. В ранних работах было реализовано несколько различных экспериментальных схем для измерения сигналов линейного дихроизма зондирующего излучения и сигналов анизотропии поглощения с пикосекундным и суб-пикосекундным временным разрешением [100; 105]. В этих схемах на пути распространения зондирующего излучения устанавливалась система из двух скрещенных поляризаторов: один поляризатор располагался до прохождения кюветы с образцом, а второй после прохождения зондирующего излучения через кювету с образцом. Поляризация зондирующего излучения устанавливалась под углом  $45^\circ$  по отношению к поляризации излучения накачки. Сигнал, регистрируемый фотоумножителем и фазо-чувствительной системой детектирования, соответствовал повороту поляризации зондирующего луча, возникающего за счет выстраивания молекулярных осей при воздействии излучения накачки. В качестве примера на Рис. 1.15 приведе-



на упрощенная схема эксперимента [100] для наблюдения линейного дихроизма зондирующего излучения в УФ диапазоне.

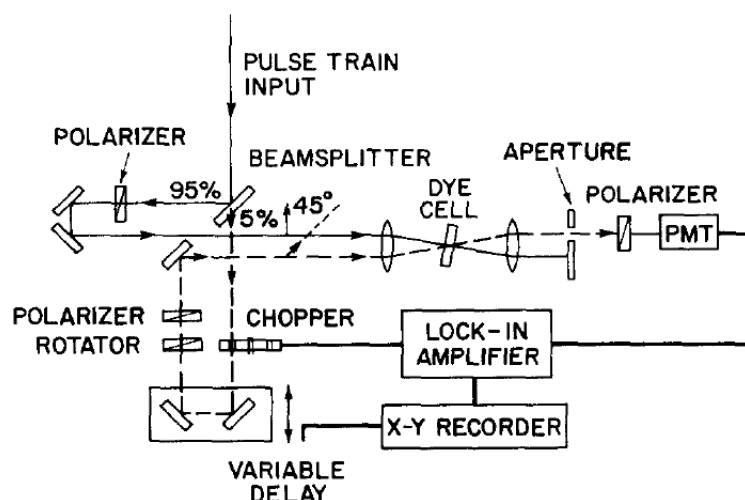


Рисунок 1.15 — Упрощенная схема экспериментальной установки для наблюдения сигналов линейного дихроизма в растворах красителей [100].

При такой геометрии эксперимента пропускание зондирующего излучения является прямой мерой времени ориентационной релаксации (анизотропной релаксации), при условии, что анизотропная релаксация происходит намного быстрее, чем время жизни возбужденного состояния. Измеренный сигнал представлял собой отношение разности и суммы интенсивностей для положительного и отрицательного вращения первого поляризатора. Данный метод был апробирован для исследования молекул красителя DODCI в растворе метанола, в результате чего было определено время ориентационной релаксации DODCI с величиной порядка 44 пс [100]. Позднее Вейнер и др. [105] применили экспериментальную схему с двумя скрещенными поляризаторами для исследования лазерных красителей и обнаружили суб-пс анизотропные времена релаксации.

Поскольку линейный дихроизм зондирующего излучения составлял очень малую долю от общего поглощения, возникла потребность в разработке методики, позволяющей повысить соотношение сигнал/шум. Че и др. [102] был предложен более чувствительный метод измерения сигналов линейного дихроизма с высоким временным разрешением, основанный на схеме с двумя скрещенными поляризаторами. В методе, предложенном в работе [102], зондирующее излучение распространялось перпендикулярно направлению распространения излучения накачки, а его поляризация фиксировалась под углом  $45^\circ$  относительно плоскости поляризации излучения накачки. Для измерения линейного дихро-

изма первый поляризатор вращался в отрицательном направлении, а затем в положительном направлении на небольшой угол относительно  $45^\circ$ . Измеренный сигнал представлял собой отношение разности и суммы интенсивностей для сигналов положительного и отрицательного вращения первого поляризатора. Че и др. применили разработанный метод для исследования ре-ориентационной динамики бактериородопсина [102]. Йонас и др. [104] исследовали перенос энергии в возбужденном состоянии синтетического реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides*R26 с помощью регистрации сигналов анизотропии поглощения методом накачка-зондирование. Для наблюдения сигналов анизотропии поглощения авторы работы [104] осуществляли попеременное переключение плоскости поляризации зондирующего пучка параллельно или перпендикулярно относительно поляризации пучка накачки. В результате они обнаружили анизотропное время релаксации бактериохлорофила с величиной порядка 80 фс, которое обусловлено переориентацией дипольного момента перехода в процессе переноса энергии между хромофорами в реакционном центре *Rhodobacter sphaeroides*R26 [104]. В работе Тан и др. [103] используя формализм матриц Джонса проанализировали эффективность различных геометрий эксперимента для разделения сигналов линейного дихроизма и изотропного (не зависящего от поляризации) разностного поглощения, а также рассмотрели влияние других поляризационно-селективных оптических элементов на наблюдаемые сигналы линейного дихроизма и разностного поглощения.

В более поздней работе [8] были предложены альтернативные экспериментальные схемы для регистрации сигналов линейного дихроизма в ИК диапазоне, в которых осуществлялась высокочастотная модуляция поляризации излучения накачки или зондирующего излучения с помощью фотоупругого модулятора [8]. Упрощенные схемы геометрии эксперимента для наблюдения сигналов линейного дихроизма в ИК диапазоне приведены на Рис. [8].

Этот метод был применен для исследования фотопереключатей семейства N-алкилированных оснований Шиффа, в результате авторы работы [8] показали значительное повышение чувствительности и отношения сигнал/шум (на порядок) при наблюдении сигналов линейного дихроизма и анизотропии поглощения. Позднее Трос и др. [106] разработали схему установки для измерения сигналов  $\Delta A_{\parallel}(\Delta t, \lambda)$  и  $\Delta A_{\perp}(\Delta t, \lambda)$  в ИК области спектра, в которой осуществлялась быстрая модуляция поляризации зондирующего излучения на частоте

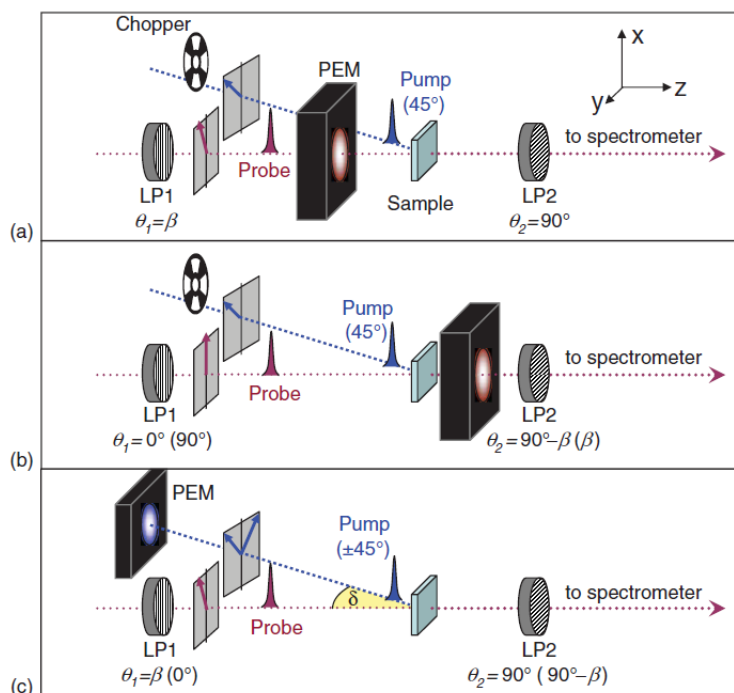


Рисунок 1.16 — Три схемы эквивалентных экспериментальных установок для наблюдения сигналов линейного дихроизма зондирующего излучения в ИК диапазоне: (а) модуляция поляризации зондирующего луча перед образцом, (б) модуляция поляризации зондирующего луча за образцом, (в) модуляция поляризации пучка накачки. Угол  $\theta$  обозначает ориентацию поляризаторов LP1 и LP2 относительно оси  $x$ . PEM-фотоупругий модулятор.

100 кГц. В результате удалось поднять отношение сигнал/шум для сигналов  $\Delta A_{\parallel}(\Delta t, \lambda)$  и  $\Delta A_{\perp}(\Delta t, \lambda)$  в 4 раза, по сравнению с предыдущими схемами. Метод [106] был применен для исследования колебательных степеней свободы молекул полутяжелой воды.

В последние десятилетия разрабатываются экспериментальные установки для наблюдения сигналов линейного дихроизма и анизотропии методом накачка-зондирование в живых клетках и тканях [60; 107]. Например, в работе [107] было продемонстрировано, что модуляция поляризации пучка накачки позволяет подавить паразитные сигналы от эффектов вынужденной эмиссии и тепловых эффектов, возникающих при воздействии зондирующего импульса на живой образец. Жанг и др показали [107], что метод накачка-зондирование с модуляцией поляризации позволяет селективно визуализировать молекулярные процессы, например, на основе их поляризации, предоставляя мощный инструмент для повышения химической специфичности флуоресцентных микроскопов.

Однако, сигналы линейного дихроизма в биологических образцах, получаемые методом «накачка-зондирование», регистрировались только при возбуждении образца мощными лазерными импульсами с энергией в импульсе порядка сотен нДж - нескольких мкДж, что приводило к фотообесцвечиванию и фотопоразрушению биологических образцов.

### **1.5 Исследование биомолекул NADH и NADPH методами время-разрешенной лазерной спектроскопии**

На сегодняшний день одним из приоритетных направлений биофизики, биомедицины и биотехнологий является разработка неинвазивных методов диагностики живых клеток, тканей, растительных клеток и микроорганизмов. Время-разрешенная флуоресценция естественных флуорофоров при двухфотонном возбуждении, впервые предложенная Лаковичем и др. [76], интенсивно изучалась в последние несколько лет [48; 108]. Это связано с тем, что данный метод позволяет определять фотофизические характеристики, которые не зависят от интенсивности возбуждения и концентрации исследуемых молекул, и может использоваться для разделения различных флуорофоров. Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (FLIM) в настоящее время широко используется для мониторинга метаболических путей в нормальных и патологических клетках [108–110]. В настоящее время все большее внимание привлекают поляризационно-чувствительные методы исследования, в которых независимым образом контролируются поляризации всех фотонов, участвующих в фотопроцессе и которые позволяют получать богатую информацию об анизотропии происходящих физико-химических процессов [4; 43; 111]. Параметры затухания поляризованной флуоресценции, такие как времена затухания флуоресценции и времена вращательной диффузии, которые могут быть определены в этих экспериментах, имеют большое значение в понимании сложных биохимических процессов, происходящих в живых клетках и тканях. В этих исследованиях в основном осуществляют наблюдения флуоресценции внутриклеточных коферментов восстановленного никотинамид аденин динуклеотида NADH и его фосфатной формы NADPH, при их возбуждении лазерными импульсами. NADH

и NADPH участвуют в основных окислительно-восстановительных реакциях в клетках живых организмов [1; 3]. Несмотря на то, что актуальность этих исследований и их возможные важные практические применения были установлены уже много десятилетий назад [76], одной из важнейших возникающих проблем, являлась интерпретация получаемых сигналов затухания флуоресценции и конкретная связь этих сигналов с физико-химическими процессами.

В первую очередь интерпретация наблюдаемых фотофизических параметров NADH при исследовании живых клеток обусловлена тем, что NADH имеет сложную динамику возбужденного состояния, обладая двумя хромофорными группами: никотинамидом и аденином, которые могут взаимодействовать друг с другом в процессе возбуждения [3]. Кроме того, NADH в растворах и клетках может находиться в различных геометрических конфигурациях, а также связываться с макромолекулами (ферментами, ферментативными комплексами) в процессе протекания реакций. Структура NADH и спектры возбуждения и флуоресценции представлены на Рис. 1.17.

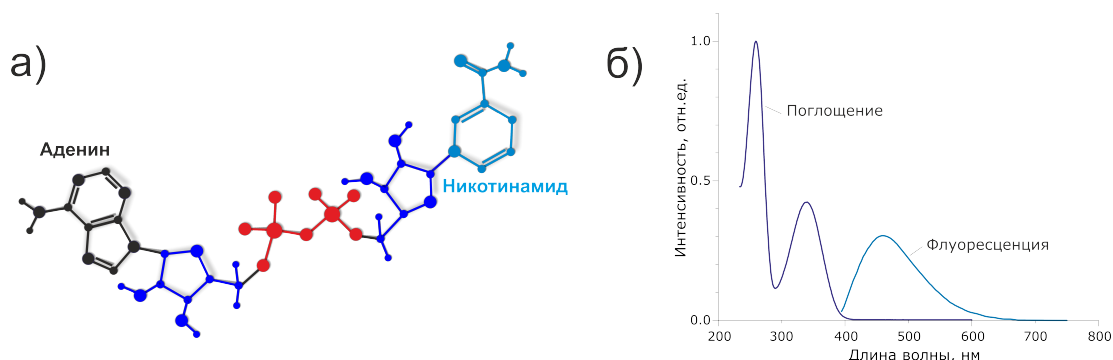


Рисунок 1.17 — а) Структура NADH и б) Спектры поглощения и флуоресценции NADH

До самого недавнего времени наблюдавшиеся экспериментальные сигналы затухания флуоресценции молекул NADH и NADPH как при однофотонном, так и при двухфотонном возбуждении в большинстве случаев представлялись в виде сумм затухающих экспонент с соответствующими весовыми коэффициентами, а затем каждой из этих экспонент приписывалась та или иная физическая интерпретация, причем эти интерпретации были разными у разных авторов и являлись предметом активных дискуссий. Например, в последние несколько десятилетий активно исследовалась роль молекулярных конформаций NADH и NADPH, а также влияние факторов микроокружения на динамику их возбужденных состояний [6; 112–114].

Как известно из ранних исследований время-разрешенной флуоресценции, NADH в водных растворах обладает двумя временами затухания флуоресценции со значениями  $\tau_1 = 0.26$  нс и  $\tau_2 = 0.70$  нс [6; 115]. При этом, было обнаружено, что эти времена затухания флуоресценции и соответствующие весовые коэффициенты меняются при изменении свойств растворителя и температуры. [6; 115–117]. В ранних работах предполагали [117; 118], что два времени затухания флуоресценции NADH относятся к двум молекулярным конформациям folded (сложенная) и unfolded (развернутая). Виссер и др. [117] предполагали, что в свернутой молекулярной конформации NADH аденин и никотинамид образуют эксиплекс с временем жизни примерно в два раза больше, чем у развернутой конформации. Гафни и др. [119], а также Ладохин и др. [116] предложили модель, согласно которой биэкспоненциальная кинетика затухания флуоресценции NADH обусловлена существованием обратимой химической реакции в возбужденном состоянии. Однако эти модели противоречили важным экспериментальным наблюдениям, а именно наблюдение относительно стабильных значений весовых коэффициентов в растворах разной полярности и наличие двух времен затухания флуоресценции у  $\beta$ -НА мононуклеотида (NAMN), где отсутствует аденин. [115; 120; 121] Несколькими исследовательскими группами была предложена альтернативная модель, объясняющая природу двух времен жизни флуоресценции NADH [115]. Кришнамурти и др. [120] и Кирдашук и др. [121] предположили, что неоднородность измеренных времен жизни возникает из-за внутренних свойств никотинамида, а не за счет внутримолекулярных взаимодействий с аденином. Этот подход был недавно более подробно раскрыт Блэкером и др. [115], где было выдвинуто предположение, что два времени затухания флуоресценции NADH могут быть связаны различными геометрическими конфигурациям никотинамида. Блэкер и др. [115] утверждали, что два времени жизни флуоресценции, наблюдаемые в NADH, главным образом определяются процессами безызлучательной релаксации, которые обусловлены конформациями никотинамида и могут быть описаны в рамках гидродинамической модели Крамерса [6]. Согласно гидродинамической модели Крамерса, время затухания флуоресценции пропорционально вязкости раствора:  $\tau \approx \sin k_{nr}^{-1} \sin \eta$ , где  $k_{nr}$  - скорость безызлучательной релаксации.[77] Влияние внешнего электрического поля на затухание флуоресценции NADH было недавно исследовано в работе Накабаяши и др. [122], где было показано, что приложение внешнего

электрического поля увеличивает вероятность безызлучательных переходов в возбужденном состоянии NADH и, следовательно, приводит к уменьшению времени затухания флуоресценции. Кроме того, в своих исследованиях Накабаяши и др. [122] показали, что при уменьшении полярности раствора увеличивается среднее время затухания флуоресценции NADH. Важная роль конформаций NADH в динамике возбужденного состояния проявилась в исследованиях прямого внутримолекулярного переноса энергии между фрагментами аденина и никотинамида при возбуждении на 260 нм [114; 123]. Было показано, что эффективность переноса энергии между хромофорными группами высока в водном растворе, но быстро снижается в растворах метанол-вода из-за эффекта денатурации. Хайнер и др. недавно применили метод измерения сигналов разностного поглощения для исследования переноса энергии в NADH, в результате этих исследований было показано, что процесс переноса энергии между хромофорными группами протекает за время порядка 70 фс. [123] Но, несмотря на обширные дискуссии, которые велись на протяжении последних 30 лет, природа наблюдения двух времен затухания флуоресценции NADH до сих пор не была установлена.

Фотофизические параметры NADH также чувствительны и к образованию комплексов NADH с естественными ферментами. В ранних исследованиях [101; 119; 124] затухания поляризованной флуоресценции связанного с белком NADH было получено, что время затухания флуоресценции связанного с ферментом NADH значительно больше по сравнению со свободной формой кофермента. Известно, что затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH описывается одной экспонентой с характерным временем затухания порядка 4-5 нс [101; 119; 124]. Например, в исследованиях флуоресценции NADH в растворах с алкоголь-дегидрогеназой (ADH) [124], малат-дегидрогеназой (MDH) и лактат-дегидрогеназой (LDH) [78] было показано, что затухание флуоресценции описывается двумя экспонентами, одна из которых имеет время затухания порядка 1-5 нс в зависимости от типа фермента, а другая около 0.4 нс. Эти два времени затухания обычно приписывают связанному с белком и свободному NADH соответственно. При этом весовые коэффициенты  $a_1$  и  $a_2$  могут быть использованы для оценки относительной концентрации связанного с белком и свободного NADH, этот подход в настоящий момент активно применяется для исследования клеток методом FLIM [3; 78; 119; 124; 125]. В некоторых иссле-

дованиях [78; 126], в которых для разделения свободного и связанного с ферментами NADH был использован метод регистрации затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции, было впервые показано существенное различие в временах вращательной диффузии связанного с ферментами и свободного NADH.



## Глава 2. Исследование время-разрешенной флуоресценции молекул NADH в водно-спиртовых растворах при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами

В ранних работах было обнаружено, что NADH в водных растворах обладает двумя временами затухания флуоресценции  $\tau_1 \approx 0.3$  нс и  $\tau_2 \approx 0.7$  нс. [6; 115]. Как было отмечено В разделе 1.5, до настоящего времени шли активные дискуссии о природе этих двух времен. Некоторые исследователи предполагали [117; 118], что два времени затухания флуоресценции NADH обусловлены существованием двух молекулярных конформаций, сложенной и развернутой. В частности были построены модели, в рамках которых предполагалось, что в свернутой конформации NADH происходит взаимодействие между аденином и никотинамидом в возбужденном состоянии, что приводит к образованию эксиплекса [117]. В рамках этой модели более длинное время затухания флуоресценции  $\tau_2$  сопоставляли сложенной конформации NADH, где происходит взаимодействие между аденином и никотинамидом, а время  $\tau_1$  – развернутой. Гафни и др. [119], а также Ладохин и др. [116] предложили другую модель, согласно которой второе время затухания флуоресценции  $\tau_2$  возникает за счет обратимой химической реакции между аденином и никотинамидом в возбужденном состоянии NADH. Однако эти модели противоречили важным экспериментальным наблюдениям, а именно наблюдение двух времен затухания флуоресценции  $\beta$ -НА мононуклеотида (NAMN), производного NADH без аденина. Кроме того, при наблюдении флуоресценции NADH в растворах, которые способствуют разворачиванию молекулы, доля длинного времени  $\tau_2$  в сигнале увеличивалась. [115; 120; 121] Несколькими исследовательскими группами была предложена альтернативная модель, объясняющая природу двух времен затухания флуоресценции NADH [115]. Кришнамурти и др. [120] и Кирдашук и др. [121] предположили, что неоднородность измеренных времен жизни возникает из-за внутренних свойств никотинамида, а не за счет внутримолекулярных взаимодействий между двумя хромофорами. Этот подход был недавно более подробно раскрыт Блэкером и др. [115], где было выдвинуто предположение, что два времени затухания флуоресценции NADH могут быть связаны различными геометрическими конфигурациям никотинамида.

Исследование, результаты которого представлены в настоящей главе, было направлено на решение вопроса о роли молекулярных конформаций и свойств микроокружения в динамике возбужденного состояния NADH. В частности, были рассмотрены несколько конформационных состояний NADH: свернутая и разложенная конформации NADH и *cis*- и *trans*-конформаций никотинамида. В главе подробно обсуждаются результаты исследований 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. Были получены зависимости экспериментальных параметров: времен затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и вклада длинного времени затухания в сигнал  $a_2$ , времени вращательной диффузии  $\tau_r$  и параметров анизотропии  $r_c$  и  $r_l$ , от концентрации метанола в растворе. Для анализа полученных параметров были проведены *ab initio* расчеты нескольких геометрических конфигураций NADH в воде и в метаноле. На основе результатов расчетов была разработана модель, объясняющая природу двух времен затухания флуоресценции NADH внутренними фотопроцессами, происходящими в никотинамиде (NA). В основе модели лежит предположение, что неоднородность измеренных времен затухания связана с различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях NA, что приводит к различному распределению электростатического поля в этих двух конфигурациях. В результате анализа коэффициентов анизотропии флуоресценции  $r_c$  и  $r_l$  были определены компоненты тензора двухфотонного перехода. Было показано, что существуют два канала двухфотонного возбуждения, которые обуславливают ненулевые значения диагонального компонента тензора  $S_{zz}$  и недиагональных компонент тензора  $S_{zy}$  и  $S_{xy}$ . Анализ зависимости времени вращательной диффузии NADH от концентрации метанола в растворе был проведен на основе модифицированного соотношения Эйнштейна-Стокса, в котором учитывалось различие в временах вращательной диффузии для сложенных и развернутых конформаций NADH. Был разработан метод определения относительных концентраций сложенной и развернутой конформаций NADH.

## 2.1 Измерение сигналов затухания поляризованной флуоресценции и их анализ

Методика измерений затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции была основана на следующих принципах. Геометрия эксперимента представлена на Рис. 2.1.

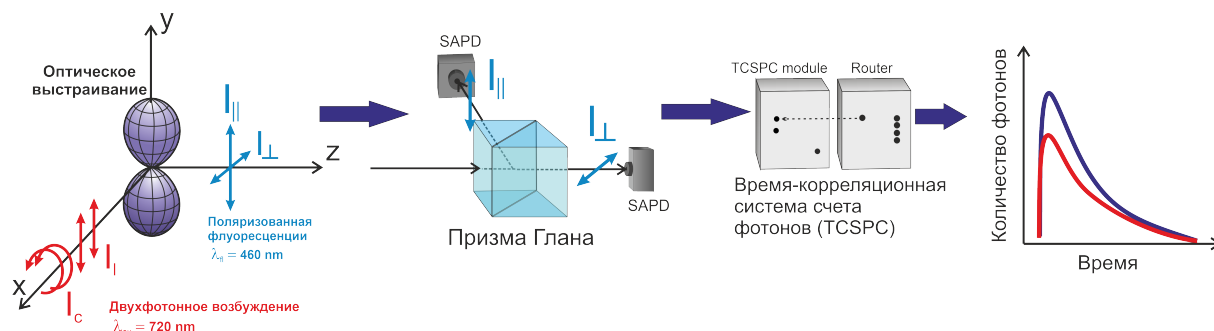


Рисунок 2.1 — Схема геометрии эксперимента по наблюдению сигналов затухания поляризованной флуоресценции

Линейно- или циркулярно-поляризованное лазерное излучение распространялось вдоль оси X. При взаимодействии линейно поляризованного возбуждающего излучения с молекулами образца происходило выстраивание осей возбужденных молекул, в результате чего излучение флуоресценции было частично поляризованным. Степень поляризации излучения флуоресценции и ее затухание во времени несет в себе важную информацию об анизотропных процессах релаксации возбужденных состояний исследуемых молекул. Поляризованная флуоресценция собиралась перпендикулярно направлению распространения возбуждающего пучка и отправлялась в канал регистрации сигнала. В канале регистрации две ортогональные поляризационные компоненты флуоресценции, параллельная  $I_{\parallel}$  и перпендикулярная  $I_{\perp}$  плоскости поляризации возбуждающего излучения, разделялись с помощью призмы Глана и затем одновременно и независимо детектировались двумя быстродействующими фотодетекторами, работавшими в режиме счета фотонов. Сигналы с фотодиодов обрабатывались с помощью время-корреляционной системы счета фотонов (TCSPC). На Рис. 2.2 представлена упрощенная схема экспериментальной установки.

В качестве источника излучения использовался фемтосекундный Ti:Sa лазер (Mai Tai HP, Spectra Physics), перестраиваемый в диапазоне длин волн 690 – 1064 нм, с длительностью импульса 100 фс и частотой повторения 80 МГц.

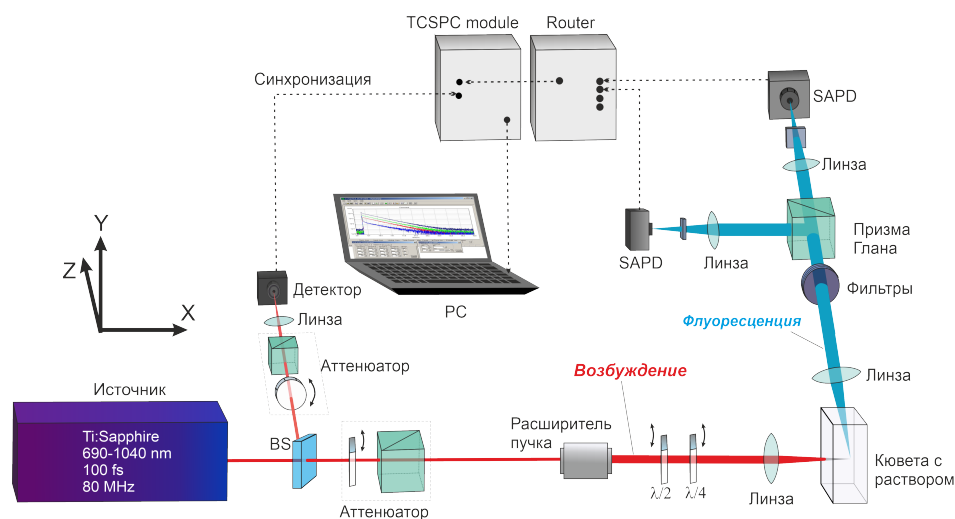


Рисунок 2.2 — Упрощенная схема экспериментальной установки по наблюдению сигналов затухания поляризованной флуоресценции

Около 2% выходного лазерного излучения отправлялось в канал синхронизации модуля TCSPC. Мощность выходного лазерного пучка ослаблялась с помощью аттенюатора, а затем пучок расширялся до 4 мм телескопической системой. Поляризация лазерного пучка контролировалась с помощью полуволновой и четверть волновой пластин для случая линейной и циркулярной поляризации, соответственно. Степень поляризации лазерного излучения после прохождения фазовых пластин составляла порядка 0.995. Линейно- или циркулярно-поляризованный лазерный луч фокусировался в центр кварцевой кюветы, содержащей раствор NADH. Средняя мощность лазерного излучения, сфокусированного на кювете, составляла 250 мВт.

Излучение флуоресценции собиралась перпендикулярно направлению распространения лазерного луча и формировалось линзой в квазипараллельный пучок. На вход в канал регистрации была установлена система интерференционных фильтров с полосой пропускания 460 - 490 нм. Далее происходило разделение ортогональных поляризационных компонент флуоресценции с помощью призмы Глана. Ортогональные компоненты флуоресценции одновременно и независимо регистрировались двумя сверхбыстрыми лавинными фотодиодами (SAPD-050-СТС, MPD). Ширина аппаратной функции лавинных фотодиодов  $IRF(t)$  составляла 56 пс. Аппаратная функция  $IRF(t)$  была определена экспериментально путем регистрации рассеянного лазерного излучения на длине волны 480 нм. Сигналы с фотодетекторов обрабатывались с помощью модуля TCSPC (PicoHarp 300, Picoquant) с частотой дискретизации 4 пс.

## Приготовление растворов

В экспериментах использовали восстановленный  $\beta$  – *NADH* (Sigma-Aldrich). В качестве растворителей использовались дистиллированная вода (pH = 5.5), метанол (Merck, особо чистый 99.9%), и их смеси различной концентрации. Концентрация *NADH* во всех экспериментах была одинаковой и составляла 1 мМ. Такая же концентрация *NADH* использовалась в более ранних исследованиях [6; 115; 127], что позволяет провести прямое сравнение наших экспериментальных результатов с результатами других исследований. Кроме того концентрация *NADH* была значительно меньше предела растворимости, поэтому взаимодействиями между растворенными молекулами *NADH* можно было пренебречь. Все растворы были приготовлены непосредственно перед экспериментом при температуре 20 ° С.

## Анализ сигналов затухания поляризованной флуоресценции

Примеры экспериментальных сигналов затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  *NADH* в водном растворе, полученных при двухфотонном возбуждении линейно и циркулярно поляризованным лазерным излучением, представлены на Рис. 2.3. Также на вставке к Рис. 2.3 представлена функция отклика детекторов  $IRF(t)$ .

Для обработки экспериментальных сигналов, представленных на Рис. 2.3, с целью определения параметров затухания поляризованной флуоресценции *NADH* были использованы следующие выражения:

$$I_{\parallel}(t) = IRF(t) * I_{iso}(t - t_0)[1 + 2r(t - t_0)] + y_{01} \quad (2.1)$$

$$I_{\perp}(t) = G \cdot IRF(t) * I_{iso}(t - t_0)[1 - r(t - t_0)] + y_{02}. \quad (2.2)$$

Выражения 2.1 и 2.2 справедливы для случая линейной поляризации возбуждающего излучения, тогда как в случае циркулярной поляризации знак перед  $r(t - t_0)$  меняется на обратный. В выражениях 2.1 и 2.2:  $I_{iso}(t - t_0)$  – изотропное, независящее от поляризации, затухание флуоресценции,  $r(t - t_0)$  – анизотропия,  $G$  – фактор, учитывающий различия в чувствительности двух каналов детектирования к ортогональным компонентам поляризации,  $IRF(t)$  – функция отклика фотодетекторов,  $y_{01}$  и  $y_{02}$  – темновой ток фотодетекторов.

Изотропное затухание флуоресценции  $I_{iso}(t)$  определяется исходя из следующего выражения [9]:

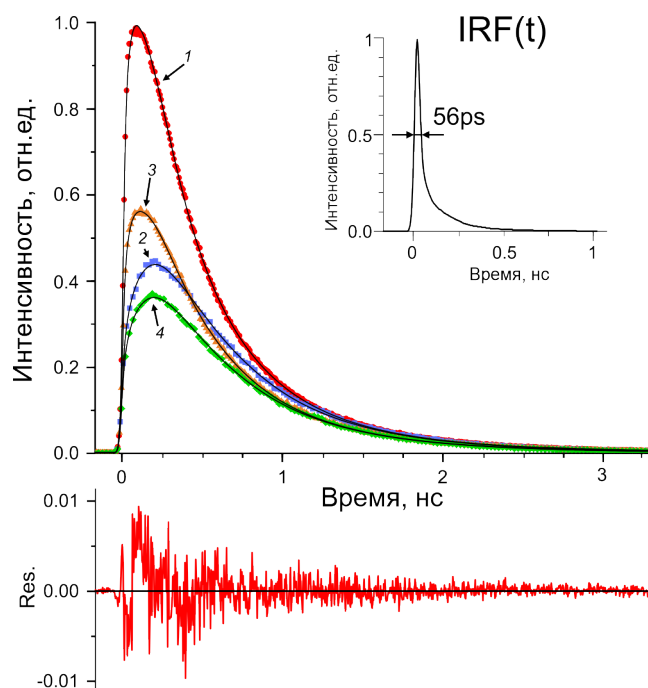


Рисунок 2.3 — Сигналы затухания ортогональных компонент поляризованной флуоресценции: 1 и 2 — сигналы затухания ортогональных компонент поляризации флуоресценции  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  при возбуждении линейно-поляризованным лазерным излучением, 3 и 4 — сигналы затухания ортогональных компонент поляризации флуоресценции  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  при возбуждении циркулярно-поляризованным лазерным излучением. IRF (t) — функция отклика фотодетекторов.

$$I_{iso}(t) = \frac{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)}{3} \quad (2.3)$$

Как уже было отмечено в разделе 1.5 в Главе 1, изотропное затухание флуоресценции NADH описывается суммой двух экспонент с характерными временами затухания  $\tau_1$  и  $\tau_2$ :

$$I_{iso}(t) = I_0[a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)]. \quad (2.4)$$

В свою очередь затухание анизотропии флуоресценции NADH является одно-экспоненциальным и характеризуется временем вращательной диффузии  $\tau_r$  [78; 128]:

$$r(t) = r_i \exp(-t/\tau_r), \quad (2.5)$$

где  $r_i$  – коэффициент анизотропии,  $i = 1$  соответствует линейно-поляризованному излучению возбуждения, а  $i = 2$  соответствует циркулярно-поляризованному излучению возбуждения. Определение параметров затухания поляризованной флуоресценции NADH осуществлялось с помощью метода глобальной аппроксимации с использованием алгоритма дифференциальной эволюции. Алгоритм глобальной аппроксимации сигналов затухания флуоресценции был реализован на языке Python3. Для построения целевой функции использовался метод максимального правдоподобия (Maximum likelihood estimation), в котором при большом числе фотонов (более 5000 счетов) использовалось нормальное распределение, а при малом числе фотонов (менее 5000 счетов) использовалось распределение Пуассона. Выражения для целевой функции в случае большого числа фотонов выглядели следующим образом:

$$cost = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_y(t_i)} (I_{\parallel}(t_i) - I_{\parallel}^{Fit}(t_i))^2 + \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_x(t_i)} (I_{\perp}(t_i) - I_{\perp}^{Fit}(t_i))^2, \quad (2.6)$$

В случае малого числа фотонов целевая функция принимала вид:

$$cost = 2 \sum_{i=1}^n (I_{\parallel}^{Fit}(t_i) - I_{\parallel}(t_i)) - 2 \sum_{i=1}^n I_{\parallel}(t_i) \ln \left( \frac{I_{\parallel}^{Fit}(t_i)}{I_{\parallel}(t_i)} \right) + 2 \sum_{i=1}^n (I_{\perp}^{Fit}(t_i) - I_{\perp}(t_i)) - 2 \sum_{i=1}^n I_{\perp}(t_i) \ln \left( \frac{I_{\perp}^{Fit}(t_i)}{I_{\perp}(t_i)} \right), \quad (2.7)$$

Минимизация целевой функции осуществлялась с помощью алгоритма дифференциальной эволюции из библиотеки SciPy. Времена затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , весовые коэффициенты  $a_1$  и  $a_2$ , начальная анизотропия  $r_l$  и  $r_c$  и время вращательной диффузии  $\tau_r$  выступали в качестве глобальных подгоночных параметров. Аппроксимация сигналов затухания флуоресценции для случаев линейной и циркулярной поляризации возбуждающего излучения проводилась отдельно.

## 2.2 Полученные экспериментальные результаты

В результате анализа сигналов затухания поляризованной флуоресценции NADH в водных растворах метанола различной концентрации были получены параметры затухания флуоресценции и их зависимость от концентрации метанола в растворе. Времена затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в зависимости от концентрации метанола в растворе представлены на Рис 2.4.

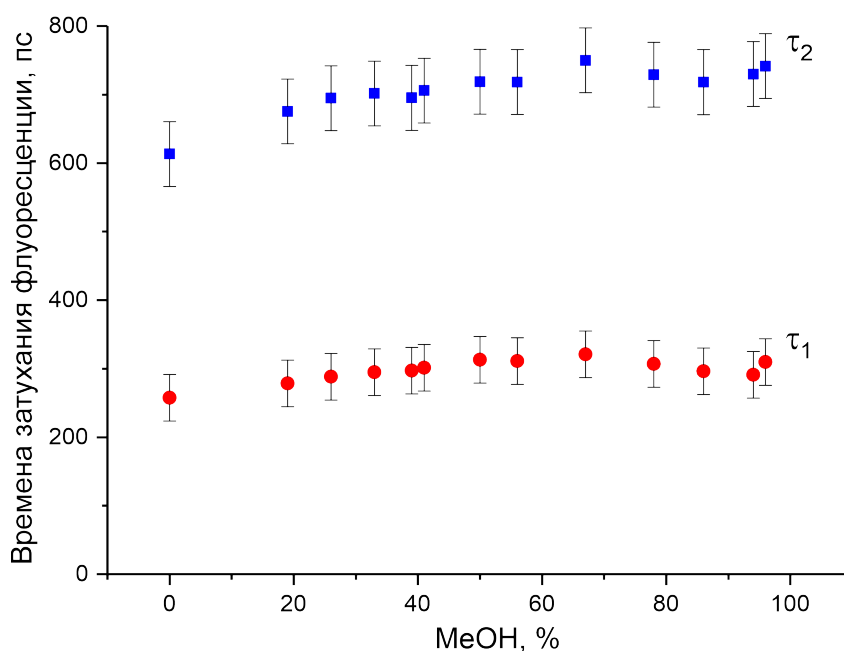


Рисунок 2.4 — Времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в зависимости от концентрации метанола в растворе.

Как видно из Рис. 2.4, оба времени затухания монотонно увеличиваются с увеличением концентрации метанола. Значения времен затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в чистой воде на Рис. 2.4 согласуются с ранее полученными результатами в пределах экспериментальных погрешностей [4; 6]. Кроме того, оба времени затухания флуоресценции NADH в чистом метаноле, полученные в настоящей работе, совпадают с результатами, представленными в работе Кришнамурти и др. [120].

Весовой коэффициент  $a_2$ , который характеризует вклад длинного времени затухания в сигнал флуоресценции, в зависимости от концентрации метанола в растворе представлен на Рис. 2.5.

Как видно из Рис. 2.5, при концентрации метанола ниже 70 % вклад времени  $\tau_2$  практически не меняется и равен примерно 0.24, однако при более высоких



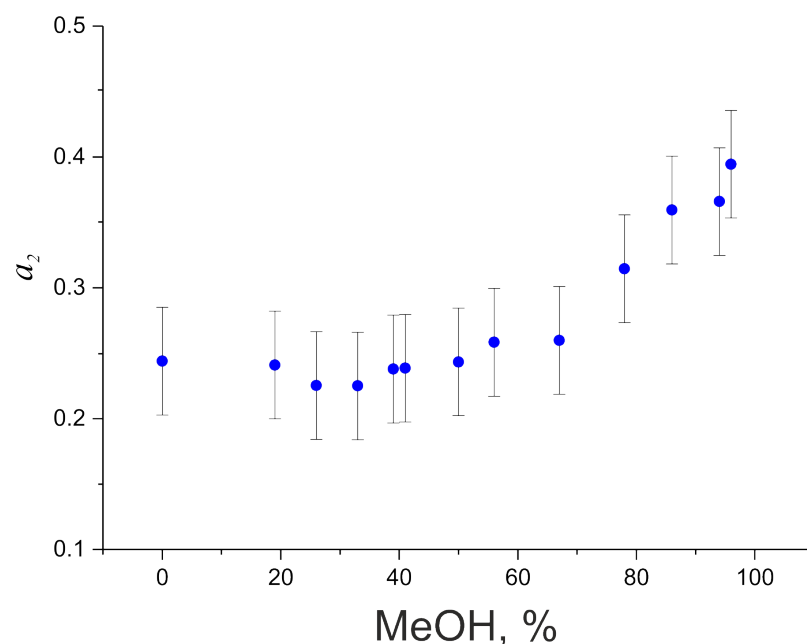


Рисунок 2.5 — Весовой коэффициент  $a_2$  в зависимости от концентрации метанола в растворе.

концентрациях метанола коэффициент  $a_2$  увеличивается практически в два раза. Значения весового коэффициента  $a_2$  в чистой воде согласуются с данными, полученными Блэкером и др. [6] и с более ранними результатами Кришнамурти и др. [120] в пределах погрешности эксперимента. Увеличение вклада длинного времени затухания флуоресценции NADH  $\tau_2$  в чистом метаноле также наблюдали ранее Кришнамурти и др. [120] Ладохин и др. [116], которые использовали двух-, трех- и четырех-экспоненциальные модели для анализа сигналов затухания флуоресценции NADH. Однако количественно результаты Ладохина и др. [116] отличаются как от наших результатов, показанных на Рис. 2.5, так и от результатов, представленных Кришнамоурти и др. [120]

Время вращательной диффузии  $\tau_r$  и начальная анизотропия флуоресценции для случаев линейно- ( $r_l$ ) и циркулярно- поляризованного ( $r_c$ ) возбуждения представлены на Рис. 2.6 и 2.7

Как видно из Рис. 2.6 наблюдается немонотонная зависимость времени вращательной диффузии от концентрации метанола в растворе. Максимальное значение времени вращательной диффузии достигается при концентрации метанола около 60 %. Как показано на Рис. 2.6, время вращательной диффузии NADH в водном растворе было равно  $\tau_r = 180 \pm 30$  пс с учетом погрешности эксперимента, что хорошо согласуется с результатами, полученным ранее Купри и др. [118]. Однако время вращательной диффузии NADH в воде, полу-

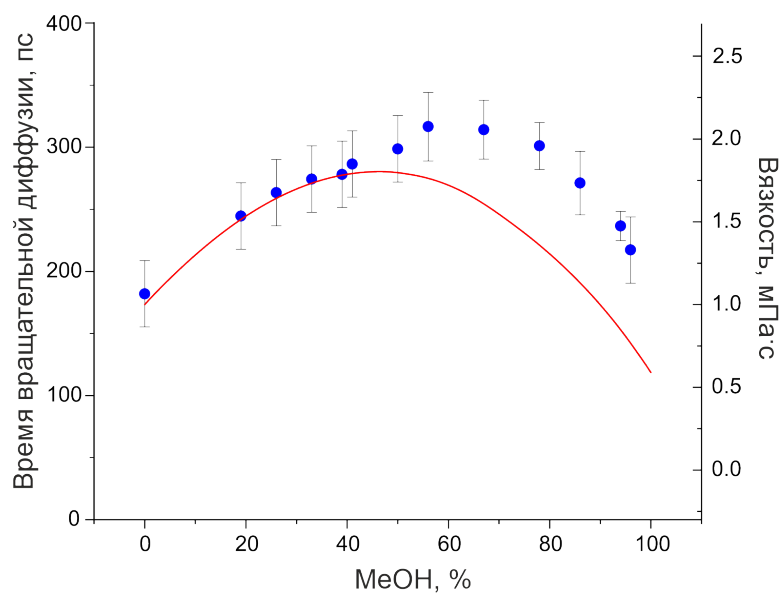


Рисунок 2.6 — Время вращательной диффузии NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе. Красная кривая - вязкость водных растворов метанола.

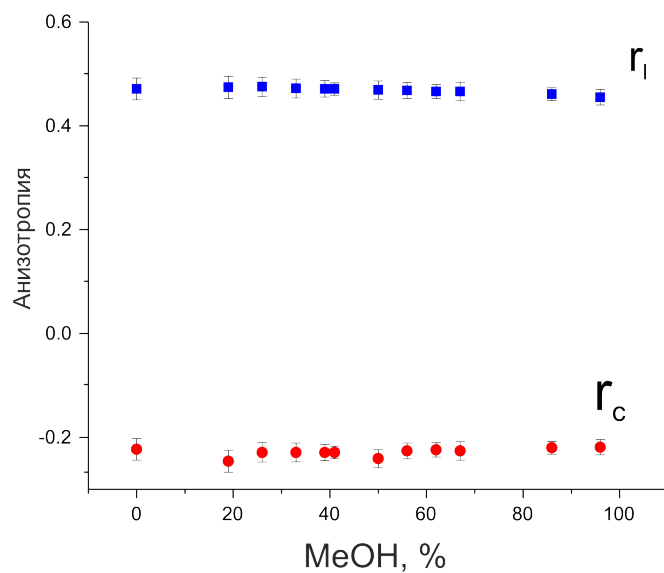


Рисунок 2.7 — Анизотропия флуоресценции NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе

ченное в настоящей работе, было в 1.6 раза меньше, чем время вращательной диффузии, недавно полученные Блэкером и др. [115]. Вероятно, это несоответствие обусловлено различием в процедурах аппроксимации, используемых в настоящей работе и в работе Блэкера и др. В частности, в настоящей работе в процедуре аппроксимации учитывалась функция отклика детекторов  $IRF(t)$  и время вращательной диффузии вычислялось методом глобальной подгонки, тогда как в работе [115] использовался более простой анализ сигналов затухания анизотропии  $r(t)$ , что могло привести к потере точности определения параметров. Кроме того отличия могут быть обусловлены растворителем: Блэкер и др. использовали буферный раствор (pH = 7.2) [115], тогда как в наших экспериментах использовалась дистиллированная вода (pH = 5.5).

Также из экспериментальных данных был определен параметр  $\Omega$ , который представляет собой отношение интенсивностей флуоресценции в случае линейной и циркулярной поляризации возбуждающего излучения  $I_{ll}/I_{cc}$ . Как видно из Рис. 2.7 и 2.8 оба параметра анизотропии и параметр  $\Omega$  не зависели от концентрации метанола в растворе. Параметр  $\Omega$  в зависимости от концентрации метанола в растворе представлен на Рис. 2.8.

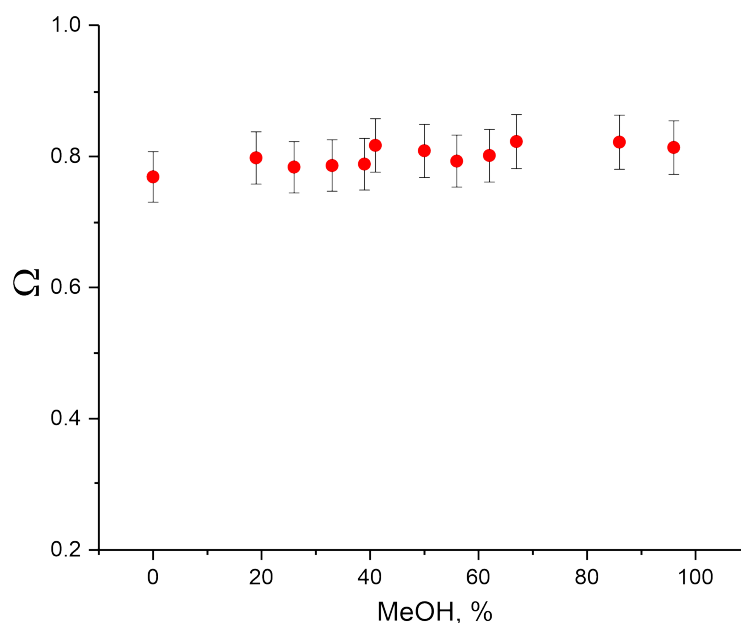


Рисунок 2.8 — Параметр  $\Omega = I_{ll}/I_{cc}$  в зависимости от концентрации метанола в растворе.

Все полученные параметры сведены в Таблицу 1.

Таблица 1 — Значения экспериментальных параметров затухания поляризованной флуоресценции NADH в водных растворах метанола различной концентрации: времена затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , весовой коэффициент  $a_2$ , начальная анизотропия  $r_l$  и  $r_c$ , время вращательной диффузии  $\tau_r$  и параметр  $\Omega = \frac{I_{ll}}{I_{cc}}$

MeOH	$a_2 = (1 - a_1)$	$\tau_1$ , пс	$\tau_2$ , пс	$r_l$	$r_c$	$\tau_r$ , пс	$\Omega$
0 %	0.24	260	610	0.47	-0.22	180	0.77
19 %	0.24	280	680	0.47	-0.25	240	0.80
26 %	0.22	290	690	0.46	-0.23	260	0.78
33 %	0.22	280	700	0.47	-0.23	270	0.79
39 %	0.24	300	700	0.47	-0.23	280	0.79
41 %	0.24	300	710	0.47	-0.23	290	0.82
50 %	0.25	310	720	0.47	-0.24	300	0.81
56 %	0.26	310	720	0.47	-0.23	320	0.79
67 %	0.26	320	750	0.47	-0.22	310	0.80
78 %	0.32	310	730	0.47	-0.23	300	0.82
86 %	0.36	300	720	0.46	-0.22	270	0.82
94 %	0.37	290	730	0.46	-0.22	240	0.81
96 %	0.39	310	740	0.45	-0.22	217	0.82
errors	$\pm 0.05$	$\pm 30$	$\pm 30$	$\pm 0.02$	$\pm 0.02$	$\pm 30$	$\pm 0.04$

### 2.3 Результаты *ab initio* расчетов структуры NADH в воде и в метаноле

Для интерпретации наблюдаемых двух времен затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и соответствующих весовых коэффициентов  $a_1$  и  $a_2$  были проведены *ab initio* расчеты структуры NADH. *Ab initio* расчеты структур NADH были выполнены в газовой фазе, в воде и в метаноле с помощью программного пакета Gaussian09. Расчеты проводились для основного и первых четырех возбужденных состояний молекул NADH для получения равновесной геометрии, энергий электронных энергетических уровней, вертикальных энергий возбуждения, сил осцилляторов и дисперсионных энергий.

Структура NADH с указанием основных углов и расстояний между функциональными группами представлена на Рис 2.9. Расчеты электронной структуры были выполнены для нескольких конформеров NADH: сложенные (конформации 1 и 2 в Приложении Б) и развернутые конформации NADH (конформации 3 и 4 в Приложении Б). Свернутая конформация характеризуется расстоянием между аденином (AD) и никотинамидом (NA)  $R_{C6A-C2N}$  8 Å. При боль-

ших расстояниях между молекулярными группами НА и АД, когда  $R_{C6A-C2N}$  88 Å, молекулы NADH относятся к развернутой конформации. Для каждой такой геометрической конфигурации были рассмотрены *cis*- и *trans*-конформации никотинамида. *Cis*- и *trans*-конформации определяются положением амидной группы относительно пиридинового кольца и характеризуются углом  $\phi_{C2N-Nn}$ , который изображен на Рис. 2.9. Оптимизацию геометрии и полной энергии осуществляли методом функционала плотности ВЗLYP, базис D3BJ/6-31G\*; растворы моделировали с использованием модели поляризуемого континуума (PCM) с соответствующей диэлектрической проницаемостью для воды и метанола. Для расчетов были использованы расширенные функционалы Гримме с D3 коррекцией дисперсии.

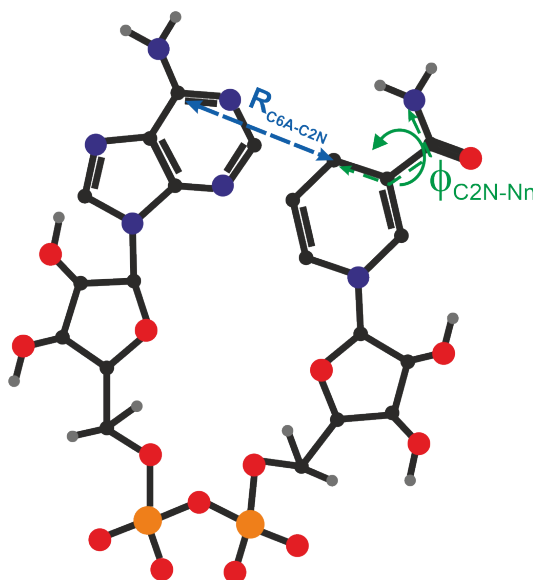


Рисунок 2.9 — Структура NADH с указанием расстояния между аденином и никотинамидом  $R_{C6A-C2N}$  и торсионного угла  $\phi_{C2N-Nn}$ , который описывает ориентацию амидной группы относительно пиридинового кольца никотинамида.

В Таблицах 12-16 в Приложении Б приведены наиболее важные результаты расчетов *ab initio* для основного ( $S_0$ ) и нескольких электронных возбужденных состояний ( $S_1 - S_4$ ) состояний NADH для четырех наиболее стабильных конформеров NADH: оптимизированные межатомные расстояния и торсионные углы, вертикальные энергии возбуждения, соответствующие силы осцилляторов (для однофотонного возбуждения), компоненты дипольного момента перехода (TDM). Стоит отметить, что при двухфотонном возбуждении на 720 нм осуществляется переход молекул NADH в первое возбужденное состояние. Та-

ким образом, для дальнейших рассуждений будут использоваться результаты расчета только для состояния  $S_1$ .

Как видно из Таблицы 12 для водного раствора и Таблицы 13 для раствора метанола в Приложении Б вертикальные энергии возбуждения и силы осцилляторов для первого возбужденного состояния незначительно отличаются для различных геометрических конфигураций NADH. При этом, прямой корреляции этих параметров с расстоянием между AD и NA установить не удалось.

Помимо свернутых и развернутых конформаций NADH, также было рассмотрено влияние различных геометрических конфигураций NA на энергетическую структуру и внутримолекулярное распределение зарядов, а именно влияние положения амидной группы относительно пиридинового кольца. Как уже было отмечено выше эти конформации характеризуются углом  $\phi_{C2N-Nn}$ , и при  $\phi_{C2N-Nn} = 180 \pm 15^\circ$  относятся к *cis*-конформациям, а именно когда атом O амидной группы находится около атома N пиридинового кольца, и при  $\phi_{C2N-Nn} = 0 \pm 30^\circ$  относятся к *trans*-конформациям, когда атом O амидной группы находится около CH<sub>2</sub> группы пиридинового кольца. Как видно из Таблиц 12 и 13 в Приложении Б вертикальные энергии возбуждения практически одинаковы для *cis*- и *trans*-конформаций, однако силы осциллятора отличаются примерно в 1.3 — 1.5 раза, при чем сила осциллятора для *cis*-конформаций больше, чем для *trans*-конформаций.

Для разложенной конформации были посчитаны точечные заряды на никотинамиде для *cis*- и *trans*-конфигураций NADH в основном состоянии и в первом возбужденном состоянии в равновесной конфигурации. Распределения зарядов представлены на Рис. 2.10.

В результате *ab initio* расчетов структуры различных конформеров NADH были определены компоненты дипольного момента перехода из основного в первое возбужденное состояние и компоненты дипольного момента перехода флуоресценции из равновесной конфигурации первого возбужденного состояния в основное. Результаты расчетов представлены в Таблицах 14- 16 в Приложении Б. Было получено, что Z-компонента дипольного момента перехода в первое возбужденное состояние NADH на порядок больше, чем компоненты X и Y. То же самое справедливо и для компонент дипольного момента перехода из равновесной конфигурации возбужденного состояния в основное. Исходя из предположения, что молекулярная система координат и система координат дипольных

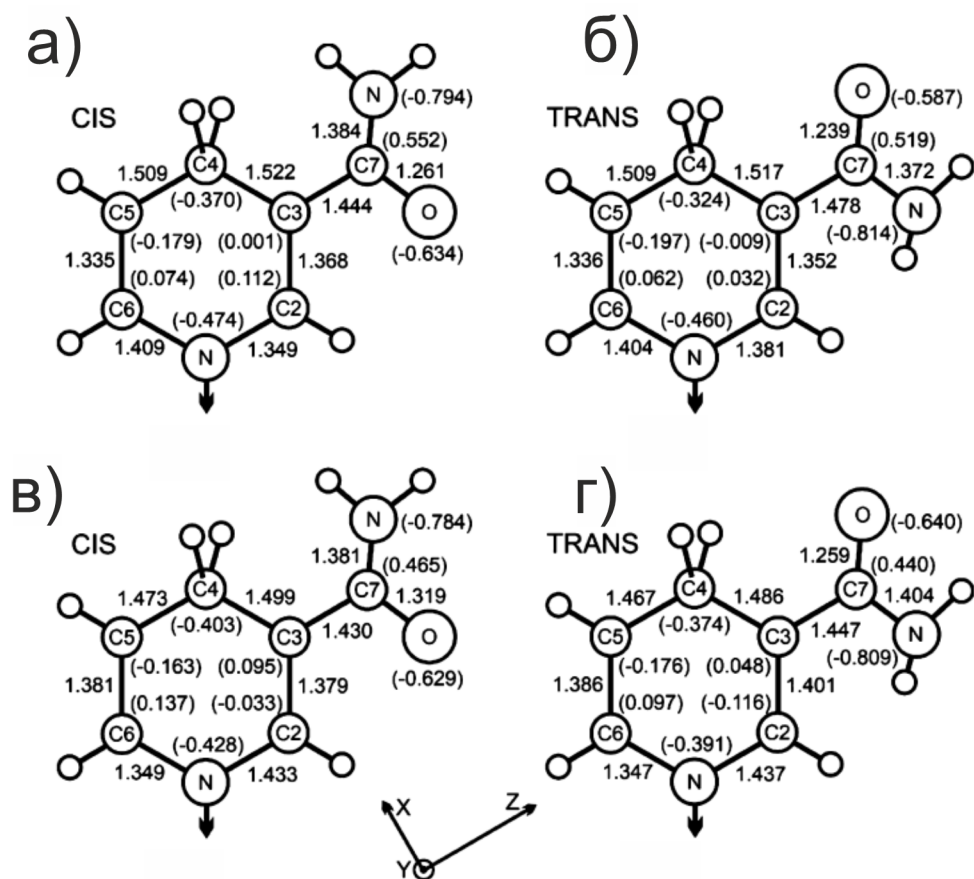


Рисунок 2.10 — Точечные заряды в *cis*- и *trans*- конфигурации никотинамида для развернутой конформации NADH в воде, рассчитанные по Малликену. а) *cis*- и б) *trans*- конфигурации никотинамида в основном состоянии. в) *cis*- и г) *trans*- конфигурации никотинамида в первом возбужденном состоянии.

моментов одинаковы, можно сделать вывод что дипольные моменты перехода из основного в первое возбужденное состояние и из равновесной конфигурации первого возбужденного состояния лежат в плоскости пиридинового кольца и направлены вдоль амидной группы. Было получено, что направление дипольных моментов перехода относительно плоскости пиридинового кольца отличаются для *cis*- и *trans*-конфигураций примерно на  $10^\circ$ . Направление дипольного момента перехода для *cis*-конфигурации изображено на Рис. 2.11

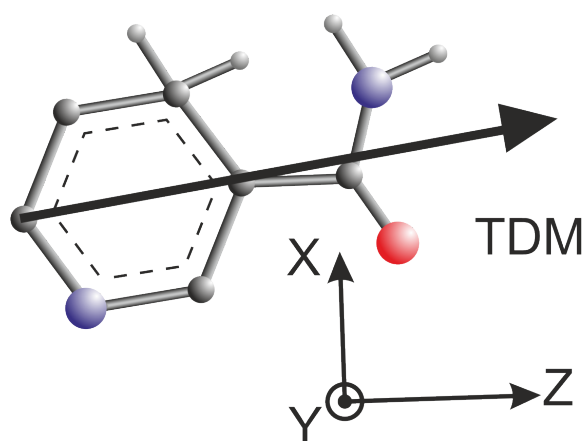


Рисунок 2.11 — Направление дипольного момента флуоресценции *cis*-конформации NADH

## 2.4 Гетерогенность затухания поляризованной флуоресценции NADH

На протяжении нескольких десятков лет шла дискуссия о природе двух времен затухания флуоресценции NADH. Некоторые исследователи полагали, что наличие двух времен затухания флуоресценции обусловлено свернутой и развернутой конформациями NADH. А именно более длительное время затухания флуоресценции  $\tau_2$  относили к сложенной конформации NADH, тогда как более короткое время характеризовало затухание флуоресценции развернутой конформации. [116–118] Как было отмечено в Главе 1, эта гипотеза столкнулась с несколькими противоречиями: одна из них это существование двух времен затухания флуоресценции у восстановленного никотинамид мононуклеотида (NMNH). Другие исследователи предполагали, что эти времена обусловлены внутренними свойствами никотинамида [4; 120]. Несмотря на большое число исследований конкретная физическая модель, объясняющая существование двух времен затухания флуоресценции NADH, до сих пор не была предложена.

Экспериментальные результаты исследований, представленные в настоящей работе, также показывают противоречивость гипотезы о связи двух времен затухания флуоресценции NADH и сложенной и развернутой геометрических конформаций молекулы. Как показано на Рис. 2.4, предэкспоненциальный множитель  $a_2$ , который характеризует вклад более длинного времени затухания флуоресценции, практически постоянен и равен  $a_2 = 0.24$  при концентрации метанола ниже 70% и возрастает до 0.4 при более высоких концентрациях. В то



же время из экспериментов по ЯМР спектроскопии NADH в воде и метаноле известно [129; 130], что относительная концентрация свернутой конформации резко уменьшается при увеличении концентрации метанола и приближается к нулевому значению примерно при 70-80% метанола. Такой же результат был получен при исследовании переноса энергии между аденином и никотинамидом, где было показано, что эффективность переноса энергии между хромофорными группами значительно уменьшается при увеличении концентрации метанола в растворе [123; 131].

В настоящей работе предложена модель интерпретации неоднородности затухания флуоресценции NADH, основанная на результатах расчетов *ab initio*. Результаты настоящей работы подтверждают, что гетерогенность затухания флуоресценции NADH связана с фотопроцессами, происходящими в никотинамиде. В основе модели лежит предположение, что неоднородность измеренных времен затухания связана с различным распределением заряда в *cis*- и *trans*-конфигурациях NA, что приводит к различному распределению электростатического поля в этих двух конфигурациях. Влияние внешних электрических полей на времена затухания флуоресценции NADH было недавно исследовано в работе Накабаяши и др. [122], где было продемонстрировано, что приложение внешнего электрического поля увеличивает вероятность безызлучательных переходов в возбужденном состоянии NADH и, следовательно, приводит к уменьшению времени затухания флуоресценции, которое наблюдается в эксперименте. Увеличение скорости безызлучательных процессов релаксации из возбужденного состояния NADH авторы работы [122] связывают с  $\pi - \pi^*$ -характером электронного перехода в NA.

Как видно на Рис. 2.10, распределения зарядов значительно отличаются для *cis*- и *trans*-конфигураций NADH, что приводит к различным внутримолекулярным электрическим полям для *cis*- и *trans*-конформаций. Это различие обуславливает разницу скоростей процессов безызлучательной релаксации из возбужденного состояния NADH. Согласно выражению 1.4, наблюдаемое в эксперименте время затухания флуоресценции представляет собой некоторое эффективное время, характеризующее как излучательные так и безызлучательные процессы релаксации. Скорость безызлучательных процессов релаксации молекул NADH  $1/\tau_{nrad}$  на несколько порядков больше скорости излучательных процессов  $1/\tau_{rad}$  [18]. Исходя из этого, наблюдаемые времена затухания

флуоресценции NADH в основном обусловлены безызлучательными процессами релаксации. Таким образом, два времени затухания флуоресценции NADH обусловлены *cis*- и *trans*-конформациями молекулы.

Также из расчетов *ab initio* было показано, что направление дипольного момента перехода флуоресценции отличается для *cis*- и *trans*-конфигурации никотинамида. Было получено, что угол между направлением дипольного момента перехода флуоресценции и плоскостью пиридинового кольца отличается более чем на  $10^\circ$  для двух конформаций.

Исходя из выше представленных соображений весовые коэффициенты  $a_2$  и  $a_1 = 1 - a_2$  описывают относительную заселенность *cis*- и *trans*-энергетических состояний на ландшафте потенциальной энергии всей системы в электронном возбужденном состоянии NADH. В начальный момент времени  $t = 0$  возбуждающий лазерный импульс переводит молекулу из основного состояния в высоко возбужденные колебательные уровни энергии электронного возбужденного состояния. На энергетической диаграмме эти состояния находятся выше энергии потенциального барьера, соответствующего переходу из *cis*- в *trans*-конформацию. Величина барьера была рассчитана в работе Ву и Хук [132] и составил около 7 ккал/моль, что на порядок выше энергии колебаний в основном состоянии молекул при комнатной температуре. Последующая колебательная релаксация в возбужденном состоянии NADH, происходящая в пикосекундной временной области, приводит к заполнению обеих потенциальных ям для *cis*- и *trans*-состояний. При этом вероятность заполнения этих ям может зависеть как от структуры молекулы, так и от взаимодействий с молекулами растворителя. Таким образом весовые коэффициенты  $a_2$  и  $a_1 = 1 - a_2$  характеризуют относительное количество *cis*- и *trans*-конформации в возбужденном состоянии. Как видно из Рис. 2.5, при концентрациях метанола менее 70 % коэффициент  $a_2 = 2$  был постоянным в пределах экспериментальных погрешностей, а при более высоких концентрациях метанола он возрастал до 0.4.

В настоящей работе проведен только качественный анализ весовых коэффициентов и их зависимости от концентрации метанола в растворе. Количественная интерпретация зависимости весовых коэффициентов на Рис. 2.5 является комплексной задачей, решение которой выходит за рамки настоящей работы. Решение этой задачи требует расчета распределения населенности *cis*- и *trans*-конформаций NADH в основном состоянии в различных растворах, опре-

деления вероятностей двухфотонного возбуждения для каждой из этих конформаций, и расчета заселенности потенциальных ям для *cis*- и *trans*-конформаций в возбужденном состоянии, что является предметом исследования молекулярной динамики и квантовой химии. Блэкер и др. [4] в своей недавней работе также указывали на важную роль *cis*- и *trans*-конфигураций никотинамида в гетерогенности затухания флуоресценции NADH. Однако, для интерпретации результатов Блэкер и др. использовали модель Крамерса-Кронекера и рассматривали систему в рамках классической термодинамики [4]. В настоящей работе предложена принципиально новая модель для качественного понимания природы наблюдаемых в эксперименте времен затухания флуоресценции NADH, основанная на квантово-химических расчетах молекулы NADH в основном и в первом возбужденном электронном состоянии.

## 2.5 Анизотропия флуоресценции NADH

### 2.5.1 Определение компонент тензора двухфотонного перехода

В рамках настоящей работы на основании экспериментальных значений анизотропии флуоресценции  $r_l$  и  $r_c$  и параметра  $\Omega$  были определены компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $\mathbf{S}$  и проведен анализа симметрии перехода при двухфотонном возбуждении. Для определения компонент тензора двухфотонного перехода был использован формализм неприводимых сферических тензоров, подробно описанный в работе. Анализ был основан на общем выражении для интенсивности флуоресценции  $I(t)$ , приведенном в Приложении В.1. Это выражение аналогично приведенному ранее в работе Макклейна [133], и Ван и Йонсана [134] однако оно представлено в несколько более компактной форме с использованием сферических тензоров. Такой подход позволяет полностью отделить часть поляризации света, контролируруемую экспериментатором, от части молекулярной динамики, описываемой молекулярными параметрами  $M_{Ke}(R, R', t)$ . (M-параметры).

М-параметры могут быть определены из эксперимента и содержат всю информацию о симметрии и структуре молекулярных электронных переходов. Набор М-параметров в момент возбуждения  $t = 0$  эквивалентен набору параметров Макклейна  $Q_i$  [135]. В случае одноцветного двухфотонного возбуждения, которое используется в эксперименте, ранг М-параметра  $Ke$  ограничен  $Ke = 0, 2$ , а общее число М-параметров равно четырем.

В случае одноцветного двухфотонного возбуждения используются два М-параметра нулевого ранга ( $Ke = 0$ ):  $M_0(0,0)$  и  $M_0(2,2)$ , которые могут иметь только неотрицательные значения и вносить вклад в изотропную часть интенсивности флуоресценции, и 2 М-параметра s-ранга ( $Ke = 2$ ):  $M_2(0,2,t)$  и  $M_2(2,2,t)$ , которые определяют анизотропную, зависящую от поляризации часть интенсивности флуоресценции. М-параметры с  $Ke = 2$  зависят от времени и описывают различные процессы деполяризации, в то время как параметры нулевого ранга не зависят от времени.

Все четыре параметра могут быть непосредственно определены из эксперимента путем комбинирования различных поляризаций лазера и поляризации флуоресценции. Выражения для анизотропии флуоресценции и параметра  $\Omega$  через М-параметры имеют следующий вид:

$$r_l(t) = \frac{2}{\sqrt{35}} \frac{\sqrt{7}M_2(0,2,t) + M_2(2,2,t)}{\sqrt{5}M_0(0,0) + 2M_0(2,2)}, \quad (2.8)$$

$$r_c(t) = -\frac{1}{\sqrt{35}} \frac{M_2(2,2,t)}{M_0(2,2)}, \quad (2.9)$$

$$\Omega = \frac{I_{LL}}{I_{YY}} = \frac{3M_0(2,2)}{\sqrt{5}M_0(0,0) + 2M_0(2,2)}. \quad (2.10)$$

Как видно на Рис. 2.7 и в Таблице 1, параметры анизотропии  $r_l$ ,  $r_c$  и параметр  $\Omega$  не зависели от концентрации метанола в растворе. Таким образом для расчета компонент тензора  $\mathbf{S}$  использовались усредненные значения этих параметров:  $r_l = 0.47$ ,  $r_c = -0.23$  и  $\Omega = 0.8$ . Средние значения параметров флуоресценции  $r_l$ ,  $r_c$ ,  $\Omega$  определенные в результате эксперимента, и нормали-

зованные молекулярные параметры  $M_K(R, R')$ , рассчитанные в соответствии с уравнениями 2.8–2.10 представлены в Таблице 2.

Таблица 2 — Усредненные значения  $\bar{r}_l$ ,  $\bar{r}_c$  и  $\bar{\Omega}$  и М-параметры, определенные из выражений 2.9– 2.10

$\bar{r}_l$	$\bar{r}_c$	$\bar{\Omega}$	$\frac{M_0(22)}{M_0(00)}$	$\frac{M_2(02)}{M_0(00)}$	$\frac{M_2(22)}{M_0(00)}$
0.47	-0.23	0.8	$1.28 \pm 0.06$	$1.86 \pm 0.08$	$1.72 \pm 0.09$

М-параметры, определенные непосредственно из экспериментальных данных, были использованы для расчета компонент тензора двухфотонного перехода  $S$ . Выражения, связывающие М-параметры и компоненты тензора двухфотонного перехода, представлены в работе [69]. Стоит отметить, что соотношение между параметрами анизотропии для линейной и циркулярной поляризации почти идеально соответствует теоретически предсказанному соотношению  $r_l = -2r_c$ . Известно, что различие знака и значений анизотропии флуоресценции при линейной и циркулярной поляризации возбуждающего излучения обусловлены типами выстраивания осей возбужденных молекул при воздействии света различной поляризации. В случае однофотонного возбуждения соотношение  $r_l = -2r_c$  справедливо для любых молекул, тогда как в случае двухфотонного возбуждения это соотношение может и не выполняться и зависит от компонент тензора двухфотонного перехода.

Как видно из Приложения В.1, молекулярные параметры  $M_K(R, R')$  зависят не только от компонент сферического тензора двухфотонного возбуждения  $S_{2\gamma}$ , но также от компонент дипольного момента флуоресценции  $F_{1qfl}$ . Однако, при выборе системы координат перехода флуоресценции, где ось  $Z_{fl}$  параллельна направлению дипольного момента перехода флуоресценции, две из трех составляющих дипольного момента флуоресценции  $F_{1\pm 1}$  были равны 0, и только одна составляющая  $F_{10} = F_z$  имела ненулевое значение. В этом случае все М-параметры были пропорциональны члену  $|F_z|^2$ , который можно было вычесть из суммы, и конкретные выражения для М-параметров можно было записать в терминах компонент тензора двухфотонного возбуждения.

Декартовы компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $S$ , вычисленные по значениям М-параметров из Таблицы 2 путем решения систем уравнений, представленных в работе [69], приведены в Таблице 3.

Таблица 3 — Компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $S$

$\frac{S_{zz}}{Tr\mathbf{S}}$	$\frac{S_{xx}+S_{yy}}{Tr\mathbf{S}}$	$\frac{S_{xx}-S_{yy}}{Tr\mathbf{S}}$	$\frac{ S_{xz}^2+S_{yz}^2 ^{1/2}}{Tr\mathbf{S}}$
$0.95\pm 0.05$	$0.05\pm 0.05$	$-0.0\pm 0.04$	$0.44\pm 0.11$

Компоненты тензора двухфотонного перехода, представленные в Таблице 3, описывают возбуждение молекул ультракоротким лазерным импульсом в момент времени  $t = 0$ . Коэффициент нормировки  $TrS$  в Таблице 3 равен  $TrS = S_{xx} + S_{yy} + S_{zz}$ . Как видно из Таблицы 3, продольно-диагональная декартова составляющая  $S_{zz}$  тензора двухфотонного возбуждения доминирует над поперечно-диагональными составляющими  $S_{xx} + S_{yy}$ , указывая на то, что двухфотонное возбуждение параллельно главной оси никотинамида, которая направлена вдоль амидной группы. Как показано в работе [69], эта компонента описывается только нормированным значением молекулярного параметра  $M_2(0, 2)$  в соответствии с выражением:

$$\frac{S_{zz}}{Tr\mathbf{S}} = \frac{1}{3} \left[ 1 + \frac{M_2(0,2)}{M_0(00)} \right]. \quad (2.11)$$

Как также видно из Таблицы 3, был обнаружен другой канал возбуждения, которой характеризуется недиагональными компонентам тензора двухфотонного возбуждения  $S_{xz}$  и  $S_{yz}$ . Этот канал также вносит свой вклад в экспериментальные сигналы наряду с упомянутым выше диагональным двухфотонным каналом возбуждения. Эти недиагональные компоненты тензора имеют, как правило, комплексные значения и в условиях нашего эксперимента представляется возможным только определение их комбинации  $|S_{xz}^2 + S_{yz}^2|$ .

### 2.5.2 Анализ зависимости времени вращательной диффузии NADH от концентрации метанола в растворе

Поведение времени вращательной диффузии NADH  $\tau_r$  было проанализировано с точки зрения влияния вязкости раствора и молекулярных конформа-

ций NADH. На Рис. 2.12 приведена зависимость времени вращательной диффузии от вязкости раствора.

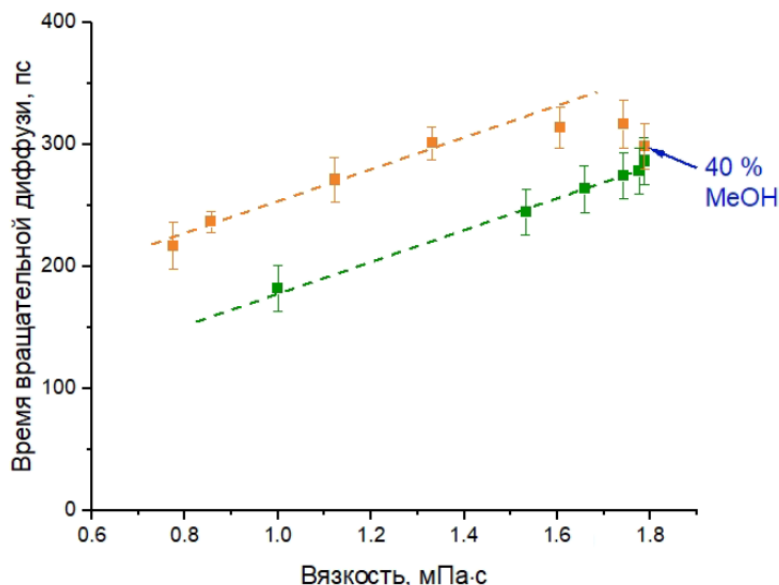


Рисунок 2.12 — Зависимость времени вращательной диффузии от вязкости раствора: зеленые точки - концентрация метанола от 0 до 40 %, оранжевые точки - концентрация метанола от 40 % до 100 %.

Как видно из Рис. 2.12, при концентрации метанола от 0 до 40% время вращательной диффузии NADH  $\tau_r$  увеличивается линейно с ростом вязкости раствора. При концентрациях метанола более 60 % также наблюдается пропорциональность между  $\tau_r$  и вязкостью. Однако время вращательной диффузии NADH при концентрациях метанола более 60 % было увеличено, по сравнению с  $\tau_r$  при концентрации метанола от нуля до 40%. При концентрациях метанола от 40 % до 60 % прямая пропорциональность времени вращательной диффузии NADH и вязкости нарушается.

Время вращательной диффузии  $\tau_r$  на Рис. 2.6 может быть описано обобщенным выражением Стокса-Эйнштейна-Дебая [136; 137]:

$$\tau_r = fC \frac{\eta V_M}{kT}, \quad (2.12)$$

где  $k$  и  $T$  – постоянная Больцмана и абсолютная температура, соответственно,  $V_M$  – ван-дер-Ваальсов объем молекулы,  $\eta$  – макроскопическая вязкость растворителя,  $f$  – форм фактор, введенный для учета формы молекул

растворенного вещества, и  $C$  – коэффициент смачиваемости, который характеризует степень взаимодействия между растворенным веществом и растворителем.

На коэффициент  $C$  накладываются следующие граничные условия:  $C = 1$  для полного “прилипания” (stick) и  $C = 0$  для граничного условия “скольжения” (slip). В целом, коэффициенты  $f$  и  $C$  в уравнении 2.12 сильно взаимосвязаны друг с другом. Форм фактор  $f$  обычно вычисляется при условии полного смачивания  $f = f_{stick}$ , то есть для условий сильного взаимодействия растворенного вещества и растворителя, в этом случае формфактор зависит только от формы вращающейся молекулы и может быть вычислен аналитически для любой молекулы типа симметричного волчка [136]. Коэффициент смачиваемости  $C$  зависит от относительного размера растворенного вещества по сравнению с растворителем и учитывает различные эффекты взаимодействия растворитель–растворенное вещество: гидродинамическое трение, форма молекулы растворенного вещества, образование комплексов и свободный объем растворителя. [136; 137] Если молекулы растворенного вещества намного больше, чем молекулы растворителя, параметр  $C$  может быть представлен как  $C = f_{slip}/f_{stick}$  [137], где  $f_{slip}$  – гидродинамический коэффициент трения для условий “скольжения”. Когда размеры молекул растворенного вещества намного больше, чем молекул растворителя, параметр  $C$  стремится к единице, что соответствует граничным условиям полного “прилипания”. [136; 137] Значения  $f_{slip}$ , относящиеся к предельному случаю в условиях полного “скольжения” были сведены в таблицу Ху и Цванцигом [138] для любой молекулы типа вытянутого и сплюсненного симметричного волчка.

Известно, что уравнение 2.12 справедливо при относительно низкой вязкости растворителя  $\eta$  0.1 Па·с. Как видно из уравнения 2.12, время вращательной диффузии  $\tau_r$  зависит от ван-дер-Ваальсова молекулярного объема  $V_M$  растворенного вещества. Объем NADH был рассчитан с использованием метода инкрементов Эдварда [139] и составил 0.488 нм<sup>3</sup>. Для учета эффектов гидратации к этому объему может быть добавлен дополнительный объем гидратации  $V_{hyd}$ . Форм фактор при условии полного “прилипания”  $f_{stick}$  был рассчитан для сложной и развернутой конформаций NADH с помощью выражения, представленного в работе [137]. Расчет форм фактора проводился исходя из предположения, что NADH можно представить в виде вытянутого эллипсоида с



соотношением большой и малой осей  $R_{max}/R_{min}$ . Значения форм фактора представлены и соотношение  $R_{max}/R_{min}$  в Таблице 4 для сложенной и разложенных конформаций NADH. Конформация 1 в первой строке таблицы 4 является сложенной конформацией, а конформация 3 в третьей строке является наиболее вытянутой.

Таблица 4 — Соотношение осей молекулы  $R_{max}/R_{min}$  и форм фактор  $f_{stick}$  для трех конформаций NADH: 1 – сложенная конформация, 2 и 3 – разложенные конформации

Conf. No	$R_{max}/R_{min}$	$f_{stick}$
1	1.19	1.06
2	2.18	1.63
3	2.96	2.30

Интерпретация зависимости времени вращательной диффузии  $\tau_r$  от концентрации метанола на Рис. 2.6 была выполнена путем рассмотрения упрощенной модели, в которой время вращательной диффузии  $\tau_r$  было представлено в виде суммы вкладов от свернутой и развернутой конформаций (подробности приведены в Приложении А):

$$\frac{1}{\tau_r} \approx \frac{1 - (1 - N_{fol})\chi(\eta)}{\tau_{fol}} + \frac{N_{un}\chi(\eta)}{\tau_{un}}, \quad (2.13)$$

где  $\tau_{fol}$  и  $\tau_{un}$  – времена вращательной диффузии, которые относятся к свернутым и развернутым конформациям NADH, соответственно,  $N_{fol} = N_{fol}(\eta)$  и  $N_{un} = N_{un}(\eta) = 1 - N_{fol}$  – относительные концентрации свернутой и развернутой конформаций NADH в основном состоянии в растворе. Член  $\chi(\eta)$  в уравнении 2.13 представляет собой относительную интенсивность флуоресценции и может быть выражен как:

$$\chi(\eta) = \frac{I_{fl}(M)}{I_{fl}(\eta)}, \quad (2.14)$$

где  $I_f(\eta)$  – интенсивность флуоресценции в зависимости от вязкости  $\eta$  и  $I_{fl}(M)$  – интенсивность флуоресценции NADH в чистом метаноле.

В ранних работах было продемонстрировано, [123; 140] что  $\chi(\eta)$  монотонно увеличивается от 1 до 1.6 при увеличении концентрации метанола в растворе. Времена вращательной диффузии сложенной  $\tau_{fol}$  и развернутой  $\tau_{un}$  конформаций NADH были рассчитаны по формуле Стокса-Эйнштейна-Дебая (см. выражение 2.12), где значения форм факторов  $f_{stick}(fol)$  и  $f_{stick}(un)$  были взяты Таблицы 4, а значения коэффициентов смачивания  $C_{fol}$ ,  $C_{un}$  и молекулярные объемы использовались в качестве параметров аппроксимации  $V_{fol}$  и  $V_{un}$ . Для расчета относительной концентрации сложенных конформаций  $N_{fol}$  были использованы экспериментальные значения времени вращательной диффузии  $\tau_r$  (см. Рис. 2.6), вязкость водных-растворов метанола  $\eta$  и значения относительной интенсивности флуоресценции  $\chi(\eta)$  NADH из работы [140]. Относительная концентрация сложенных конформация была посчитана для нескольких различных условий, характеризующихся параметрами  $C_{fol}$ ,  $C_{un}$ ,  $V_{fol}$  и  $V_{un}$ . Результаты расчета представлены на Рис. 2.13.

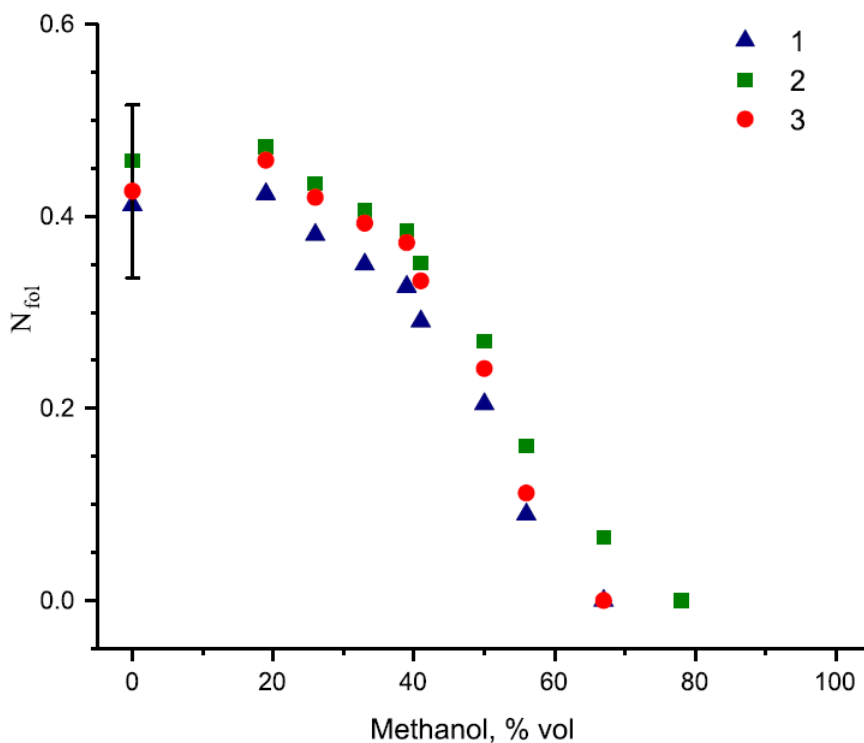


Рисунок 2.13 — Относительная концентрация сложенных конформаций  $N_{fol}$  NADH в зависимости от концентрации метанола в растворе:

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.  $C_{un} = 0.70$ ,  $C_{fol} = 0.85$ ,  $V_{un} = 0.488 \text{ нм}^3$ ,  $V_{fol} = 0.488 \text{ нм}^3$

Как видно на Рис. 2.13, относительная концентрация сложенных конформаций  $N_{fol}$  NADH в чистой воде составляла около 0.4, а затем снижалась до нуля с увеличением концентрации метанола в растворе. Значение  $N_{fol}$  в чистой воде при температуре 20°, показанное на рисунке 2.13 составило около  $0.4 \pm 0.1$ , что согласуется с результатами, полученными в работах (0.36) [129] и  $(0.26 \pm 0.06)$  [123]. Однако значение  $N_{fol}$ , полученное в этой работе для водного раствора, отличалось от результатов в работах Макдональда и др. (0.24) [130] и Халл и др. (0.55) [131].

Незначительное расхождение результатов может быть обусловлено спецификой конкретного метода, а также выбранной теоретической моделью, которая использовалась для анализа данных. Несмотря на то, что результаты расчетов *ab initio* показали, что рассмотрения только свернутых и развернутых конформаций NADH недостаточно для описания динамики возбужденного состояния, эта модель вполне может быть использована для интерпретации времен вращательной диффузии NADH.

## 2.6 Краткие итоги

1. Были зарегистрированы сигналы затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции NADH в водных растворах метанола при двухфотонном возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами с длиной волны 720 нм. Был проведен анализ экспериментальных сигналов методом глобальной аппроксимации, в результате которого были определены: два времени затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и их вклады в сигнал  $a_1$  и  $a_2$ , параметры анизотропии при возбуждении линейно- и циркулярно- поляризованным лазерным излучением  $r_c$  и  $r_l$  и время вращательной диффузии  $\tau_r$ .
2. Было показано, что оба времени затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  значительно увеличиваются с ростом концентрации метанола в растворе, при этом наблюдается рост вклада времени  $\tau_2$  в сигнал.
3. Интерпретация полученных экспериментальных результатов была проведена на основе *ab initio* расчетов структуры NADH. Были рассмотре-

- ны несколько конформеров NADH: сложенные и развернутые конформации NADH и *cis*- и *trans*- конформации никотинамида. Свернутая конформация характеризуется расстоянием между группами аденина (AD) и никотинамида (NA)  $R_{C6A-C2N} < 8 \text{ \AA}$ , где доминирует взаимодействие между AD и NA. При больших расстояниях между NA и AD, когда  $R_{C6A-C2N} > 8 \text{ \AA}$ , молекулы NADH относятся к развернутой конформации. Для каждой такой геометрической конфигурации были рассмотрены *cis*- и *trans*- конформации никотинамида. *Cis*- и *trans*-конформации характеризуются положением амидной группы относительно пиридинового кольца.
4. На основе расчетов *ab initio* была разработана модель, которая позволила объяснить неоднородность измеренных времен затухания флуоресценции NADH. Объяснение основано на предположении, что различное распределение заряда в *cis*- и *trans*-конформациях никотинамида приводит к различному распределению электростатического поля, что обуславливает два различных времени затухания флуоресценции.
  5. Было обнаружено, что время вращательной диффузии NADH нелинейно зависло от концентрации метанола в растворе. Поведение времени вращательной диффузии было проанализировано на основе соотношения Эйнштейна-Стокса. Было показано, что время вращательной диффузии NADH было пропорционально вязкости раствора при концентрациях метанола до 40 %. При более высоких концентрациях также наблюдалась пропорциональность времени вращательной диффузии и вязкости, однако время вращательной диффузии было увеличено. Это увеличение было объяснено изменением относительной концентрации сложенной и развернутой конформаций NADH. Был разработан новый метод определения относительных концентраций сложенной и развернутой конформаций NADH.
  6. На основе параметров анизотропии флуоресценции  $r_c$  и  $r_l$  были определены компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $S$ . В результате было обнаружено существование двух каналов двухфотонного возбуждения со сравнимыми интенсивностями.

### Глава 3. Квантовый выход флуоресценции NADH

Квантовый выход флуоресценции  $\Phi$  является важным параметром, который зависит от эффективности процессов излучательной и безызлучательной релаксации в возбужденных состояниях многоатомных молекул. Известно, что квантовый выход флуоресценции чувствителен как изменению внутримолекулярных свойств, так и к изменению свойств микроокружения [6; 18; 117]. Скотт и др. [18] в результате измерений времен жизни флуоресценции и квантового выхода флуоресценции NADH и его производных в воде и пропиленгликоле (PG) показали, что динамика возбужденного состояния NADH в основном характеризуется безызлучательными процессами релаксации. Гафни и др. [119], Фишер и др. [141] и Виссер и др. [117] продемонстрировали увеличение квантового выхода флуоресценции NADH на порядок при связывании с ферментами, это увеличение авторы интерпретировали как уменьшение эффективности процессов безызлучательной релаксации за счет влияния окружения сайтов связывания ферментов. Накабаяши и соавт. [122] изучили влияние локального электростатического поля на флуоресценцию NADH в растворах и продемонстрировали увеличение среднего времени затухания флуоресценции в растворах с низкой полярностью, что было объяснено уменьшением скорости процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии NADH. Блэкер и др. [6; 115] показали, что два времени жизни флуоресценции, наблюдаемые в NADH, главным образом определяются процессами безызлучательной релаксации, которые обусловлены конформациями никотинамида и могут быть описаны в рамках гидродинамической модели Крамерса [6]. Несмотря на наличие достаточного большого числа исследований, природа безызлучательных процессов релаксации NADH до сих пор не была установлена. В недавней работе Као и др. [142] обнаружили существование нескольких каналов безызлучательной релаксации NADH с характерными временами, лежащими в субнаносекундном и субпикосекундном временных диапазонах. При этом в более ранних работах влияние субпикосекундных процессов релаксации NADH не было учтено при анализе квантового выхода флуоресценции  $\Phi$  [6; 18; 119; 141].

Целью настоящего исследования является экспериментальное разделение вкладов различных процессов релаксации в возбужденном состоянии NADH. В

Главе 3 представлены результаты комплексных исследований квантового выхода и времен затухания флуоресценции NADH в растворах вода-метанол, вода-этанол и вода-пропиленгликоль. Для анализа экспериментальных результатов была разработана модель, которая позволила разделить вклад нескольких механизмов релаксации возбужденного состояния NADH: относительно медленные наносекундные процессы безызлучательной релаксации и гораздо более быстрые пикосекундные. Анализ показал, что увеличение квантового выхода флуоресценции NADH при увеличении концентрации спиртов в растворе происходило за счет относительно медленных наносекундных процессов безызлучательной релаксации. Изменение скоростей этих процессов связано с влиянием полярности растворителя и перераспределением конформаций NADH. При этом вклад пикосекундных процессов безызлучательной релаксации практически не менялся при изменении типа растворителя. Значительный рост квантового выхода флуоресценции NADH в водных растворах пропиленгликоля высокой концентрации был связан с замедлением скорости быстрых пикосекундных процессов в условиях высокой вязкости.

### 3.1 Измерение квантового выхода флуоресценции NADH

Для определения относительного квантового выхода флуоресценции молекул NADH в водно-спиртовых растворах был использован стандартный метод измерения, подробно описанный в работах [18; 112; 141]. Упрощенная схема эксперимента для измерения относительного квантового выхода флуоресценции NADH представлена на Рис.3.1.

Возбуждающий лазерный луч распространялся через кварцевую кювету ( $10 \times 10$  мм), содержащую исследуемый раствор. Все эксперименты проводились в условиях низкого поглощения, а именно когда поглощение в экспериментальном образце составляло менее 15%, чтобы избежать эффектов насыщения и фотообесцвечивания. Интенсивность лазерного луча, проходящего через кювету с молекулярным раствором  $\langle I_{tr}^{mol} \rangle$  и с чистым растворителем  $\langle I_{tr}^{sol} \rangle$ , регистрировалась с помощью фотодиода для определения поглощения в молекулярном образце. Флуоресценцию NADH регистрировали под прямым углом к направ-

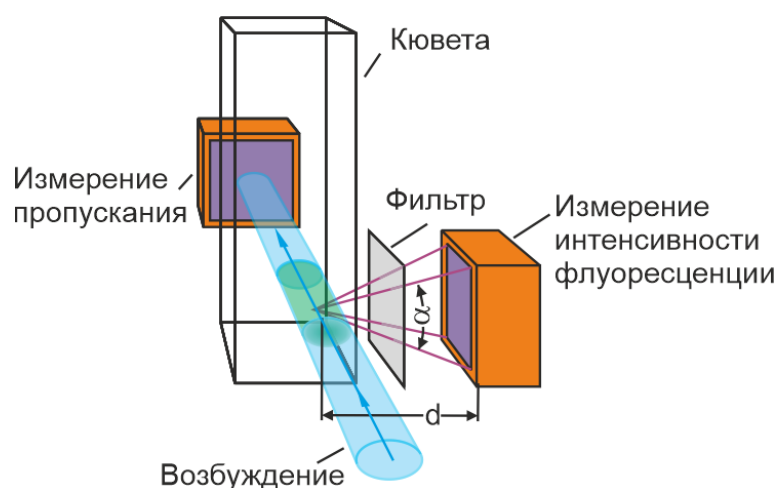


Рисунок 3.1 — Упрощенная схема экспериментальной установки для измерения квантового выхода флуоресценции NADH

лению распространения лазерного луча. Излучение флуоресценции проходило через оптический фильтр, который использовался для гашения рассеянного лазерного излучения, и затем фокусировалось на фотоприемнике. Квантовый выход флуоресценции NADH определялся исходя из следующего выражения:

$$\Phi = NG \frac{\langle I_{fl} \rangle}{\langle I_{tr}^{sol} \rangle - \langle I_{tr}^{mol} \rangle}, \quad (3.1)$$

где  $\langle I_{fl} \rangle$  – интенсивность флуоресценции, в угловых скобках – усреднение по времени,  $N$  – коэффициент, учитывающий разницу в энергию фотонов возбуждающего излучения и флуоресценции, а  $G$  – геометрический коэффициент, рассчитанный как отношение телесного угла в пределах зоны обнаружения флуоресценции к полному телесному углу излучения флуоресценции.

Как известно NADH имеет полосу поглощения с максимумом в районе 340 нм. Импульсный Nd:YAG-лазер (SNV-40P, Teem Photonics) с длиной волны 355 нм, длительностью импульса 400 пс и частотой следования импульсов 2 кГц использовался для возбуждения флуоресценции NADH. Интенсивность лазерного излучения, сфокусированного на кювете, составляла около 40 мВт. Для увеличения отношения сигнал/шум лазерный луч модулировался по амплитуде на частоте 114 Гц с помощью оптического модулятора, установленного перед кюветой. В результате воздействия промодулированного по амплитуде лазерного излучения, излучение флуоресценции также было промодулировано по интенсивности. Флуоресценция NADH регистрировалась в диапазоне длин волн 400–550 нм. Интенсивность флуоресценции и интенсивность прошедшего

лазерного излучения регистрировалась с помощью фотоприемника ФД24К со спектральным диапазоном чувствительности 350–1100 нм. Амплитудно-модулированный электрический сигнал с фотоприемника регистрировался с помощью синхронного усилителя. Для определения относительного квантового выхода NADH использовался краситель Родамин 6G.

Принимая во внимание, что усредненная по времени поляризация флуоресценции была относительно низкой во всех наших экспериментах (менее 14%), никаких специальных поправок для учета поляризации флуоресценции не вводилось, поскольку эти поправки были меньше, чем погрешность экспериментальной установки.

### 3.2 Полученные экспериментальные результаты

Квантовый выход флуоресценции NADH в растворах вода-пропиленгликоль (PG), б) вода-метанол (MeOH) и в) вода-этанол (EtOH) в зависимости от концентрации спирта в растворе, представлен на Рис. 3.2 а)-в).

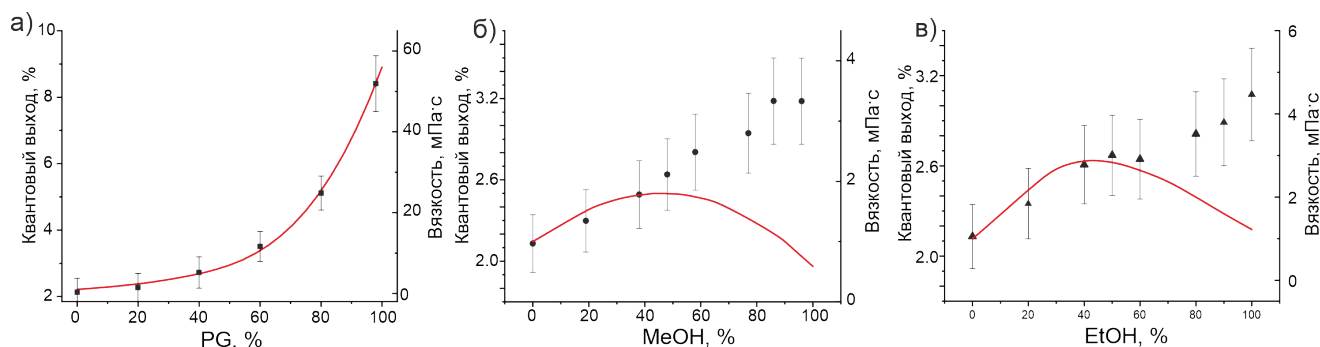


Рисунок 3.2 — Квантовый выход флуоресценции NADH растворах вода–пропиленгликоль (PG), б) вода–метанол (MeOH) и в) вода–этанол (EtOH)

Согласно данным на Рис. 3.2 а)-в) квантовый выход флуоресценции NADH в воде был равен  $\Phi = 2.1 \pm 0.2 \%$ , что полностью согласуется со значениями, полученными ранее в работах Скотта и др. [18] и Гафни и др. [119]. Как видно на Рис. 3.2 а) в растворах вода–PG квантовый выход флуоресценции NADH увеличивался нелинейно при увеличении концентрации пропиленгликоля в растворе и достигал максимального значения  $\Phi = 8\%$  в чистом пропиленгликоле. Квантовый выход флуоресценции NADH в пропиленгликоле согласуется с ре-



результатом, полученным ранее в работе Скоттоа и др. [18]. Как видно на Рис. 3.2 б) и в) в растворах вода-МеОН и вода-ЕтОН квантовый выход флуоресценции NADH увеличивался линейно при увеличении концентрации метанола и этанола в растворе и достигал максимального значения  $\Phi = 3.2\%$  в чистых спиртах. Ранее уже сообщалось, что интенсивность флуоресценции NADH при возбуждении на длине волны 360 нм увеличивалась в 1.5–1.6 раз в чистом метаноле по сравнению с водой [140]. Увеличение интенсивности и квантового выхода флуоресценции дигидроникотинамида, производного NADH без аденозинмонофосфата, в 1.5 раз в этаноле и метаноле наблюдали Фишер и др. [141]. Однако полные количественные данные зависимости квантового выхода флуоресценции NADH от концентрации спиртов в растворе получены впервые в настоящей работе.

Было проведено сравнение зависимости квантового выхода флуоресценции NADH от концентрации спиртов в растворе и вязкости водно-спиртовых растворов. На Рис. 3.2 а)-в) вязкость водно-спиртовых растворов изображена красной линией. Как видно из Рис. 3.2 а) изменение квантового выхода флуоресценции NADH при увеличении концентрации пропиленгликоля почти идеально соответствует поведению вязкости раствора вода-РГ. Однако количественно прямой корреляции не наблюдается, поскольку квантовый выход флуоресценции NADH увеличивается в 4 раза, а вязкость раствора пропиленгликоля и воды отличается в 56 раз. В случае растворов вода-МеОН и вода-ЕтОН прямой корреляции квантового выхода флуоресценции NADH и вязкости растворов установить не удалось.

Для более детального анализа квантового выхода флуоресценции NADH в водно-спиртовых растворах были проведены измерения времен затухания флуоресценции NADH. Методика измерений времен затухания флуоресценции подробно описана в Главе 2. В Таблице 5 представлены значения времен затухания флуоресценции в водном растворе и в растворах спиртов.

Как видно из Таблицы 5 времена затухания флуоресценции NADH в растворах спиртов были больше по сравнению с временами затухания флуоресценции NADH в воде. Более подробная зависимость времен затухания флуоресценции NADH и весовых коэффициентов от концентрации метанола в растворе представлена в Главе 2. Зависимость времен затухания флуоресценции NADH

Таблица 5 — Времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_i$  в водном растворе и в растворах спиртов

Раствор	$\tau_1$ , ns ( $a_1$ )	$\tau_2$ , ns ( $a_2$ )
H <sub>2</sub> O	0.26 (0.74)	0.62 (0.26)
MeOH 98%	0.30 (0.41)	0.72 (0.59)
EtOH 98%	0.38 (0.33)	0.93 (0.67)
PG 98%	0.56 (0.44)	1.23 (0.56)

от концентрации этанола и пропиленгликоля в растворе представлена на Рис. 3.3

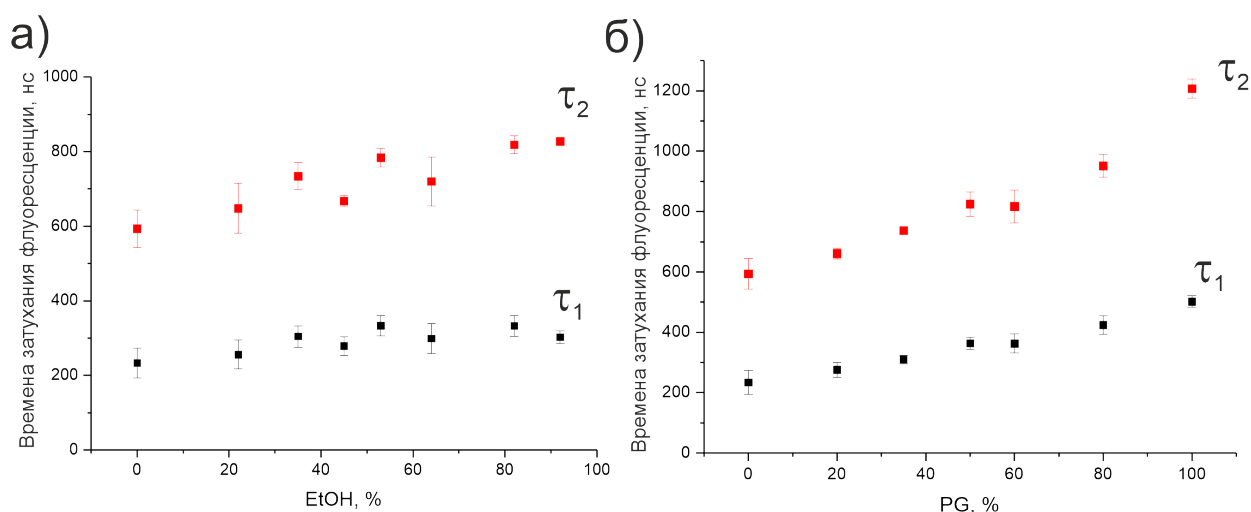


Рисунок 3.3 — Времена затухания флуоресценции NADH в растворах а) вода–этанол (EtOH) и б) вода–пропиленгликоль (PG).

Как видно из Рис. 3.3 как в случае водных растворов этанола, так и в случае водных растворов пропиленгликоля наблюдалось линейное увеличение обоих времен затухания флуоресценции. При этом доля более длинного времени становилась больше при увеличении концентрации спиртов в растворе, что проявлялось в виде увеличения весового коэффициента  $a_2$ .

### 3.3 Модель процессов релаксации NADH в возбужденном состоянии

Для анализа экспериментальных результатов, представленных на Рис. 3.2 а)–в) и в Таблице 5 была разработана модель, которая описывает возбуждение

молекулярной флуоресценции лазерными импульсами и учитывает несколько быстрых (пикосекундных) и относительно медленных (наносекундных) каналов безызлучательных процессов релаксации. Более подробно описание модели и теоретические выражения приведены в работе [А5]. Упрощенная схема оптического возбуждения NADH и последующие пути релаксации изображены на Рис. 3.4, где  $R$  - координата реакции, а  $S_0$  и  $S_1$  – сечения поверхностей потенциальной энергии основного и первого возбужденных электронных состояний, соответственно.

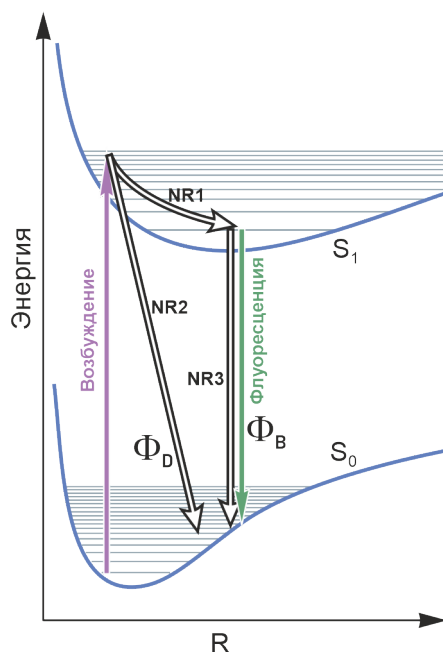


Рисунок 3.4 — Упрощенная схема возбуждения и каналов релаксации из возбужденного состояния NADH

Как показано на Рис. 3.4, воздействие ультракороткого лазерного импульса приводит к переходу молекул из основного состояния в высоко возбужденные колебательные уровни возбужденного электронного состояния  $S_1$ , а затем происходят два быстрых пикосекундных процесса безызлучательной релаксации, обозначенных  $NR1$  и  $NR2$ , которые изображены черными двойными линиями со стрелками. Символы  $\Phi_D$  и  $\Phi_B$  на Рис. 3.4 обозначают частичные квантовые выходы.

Двойная линия  $NR1$  обозначает сверхбыструю колебательную релаксацию в состоянии  $S_1$ , которая приводит к заселению самых низких колебательных уровней этого состояния. Эта релаксация может обуславливать наблюдение короткого временем затухания около 1 пс, которое наблюдали несколько научных групп при исследовании NADH методом ап-конверсионной спектроскопии

[123; 142]. Скорость процессов релаксации  $NR1$  зависит как от внутримолекулярных взаимодействий, так и от взаимодействий с молекулами растворителя. Вклад этого процесса в затухание флуоресценции можно представить в виде:

$$R_0^{fl}(t) \approx A_1^{iso} + (A_0^{iso} - A_1^{iso})e^{-t/\tau_v}, \quad (3.2)$$

где  $A_0^{iso}$  и  $A_1^{iso}$  независимые от времени коэффициенты, которые характеризуют интенсивность флуоресценции  $R_0^{fl}(t)$  в начальный момент времени  $t = 0$   $A_0^{iso} = R_0^{pr}(t)|_{S_0}$  и при достижении равновесной ядерной конфигурации в возбужденном состоянии  $A_1^{iso} = R_0^{pr}(t)|_{S_1}$ , и  $\tau_v$  – характерное время колебательной релаксации. Другой процесс пикосекундной безызлучательной релаксации, который обуславливает переход между возбужденным  $S_1$  и основным  $S_0$  электронными состояниями и приводит к быстрому гашению флуоресценции NADH, представлен черной двойной линией со стрелкой, обозначенной  $NR2$  на Рис. 3.4. Этот процесс безызлучательной релаксации может обуславливать время затухания NADH около 26 пс, которое было получено ранее методом ап-конверсионной спектроскопии [142; 143]. Конкретный механизм тушения флуоресценции NADH через этот канал до сих пор не известен.

Независимо от механизма тушения флуоресценции, изменение населенности возбужденного состояния  $N(t)$  в процессе релаксации  $NR2$  может быть представлено с помощью следующего выражения:

$$N(t) \approx N_1 + N_2e^{-t/\tau_q}, \quad (3.3)$$

где концентрации  $N_1$  и  $N_2$  характеризуют населенность молекулярных конформаций NADH в возбужденном состоянии, на которые влияет и не влияет процесс тушения флуоресценции  $NR2$ , соответственно, а  $\tau_q$  – характерное время тушения флуоресценции. Оба времени  $\tau_v$  и  $\tau_q$  не могли напрямую быть определены в настоящей работе при наблюдении затухания флуоресценции NADH методом TCSPC. Однако процесс тушения флуоресценции, описанный в выражении 3.3, при усреднении по времени вносит значительный вклад в квантовый выход флуоресценции NADH, который был экспериментально определен в настоящей работе.

В соответствии с моделью, схематически изображенной на Рис. 3.4, после колебательной релаксации  $NR1$  и  $NR2$  все оставшиеся конформации возбужденных молекул заполняют самые низкие колебательные уровни электронного состояния  $S_1$ , далее происходят более медленные процессы излучательной (флуоресценция на Рис. 3.4) и безызлучательной релаксации  $NR3$  в наносекундном и субнаносекундном временных диапазонах.

Как уже было отмечено в Главе 1 и в Главе 2, изотропная часть сигнала флуоресценции  $I_{fl}^{tot}(t)$  обычно представляется в виде суммы экспонент (см. выражение 1.10). С учетом выражений 3.2 и 3.3 можно получить более общее выражение, описывающее затухание флуоресценции в многоатомных молекулах, возбуждаемых коротким лазерным импульсом:

$$I_{tot}^{fl}(t) \approx I_0 R_0^{fl}(t) N(t) \sum_l a_l e^{-t/\tau_l}, \quad (3.4)$$

где  $N(0) = N_1 + N_2$ , а  $\tau_l$  – времена затухания, которые наблюдаются в эксперименте методом TCSPC.

Уравнение 3.4 в целом эквивалентно выражению 1.10, однако оно написано в более общей форме и позволяет получить более глубокое представление о конкретных механизмах релаксации.

Три члена в уравнении 3.4 учитывают три различных пути релаксации, которые происходят в возбужденных состояниях многоатомных биологических молекул и вносят вклад в наблюдаемые сигналы затухания флуоресценции. Член  $R_0^{fl}(t)$ , приведенный в уравнении 3.2, описывает вклад быстрой пикосекундной колебательной релаксации, член  $N(t)$ , приведенный в уравнении 3.3, описывает вклад процессов тушения флуоресценции в пикосекундной временной области, а третий член при суммировании по  $l$  описывает затухание флуоресценции с относительно медленным наносекундным временем  $\tau_l$ . В случае NADH затухание флуоресценции описывается двумя временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$ .

Как уже обсуждалось в Главе 2, времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  являются некоторыми эффективными временами, которые характеризуют скорости процессов излучательной и безызлучательной релаксации. Медленные безызлучательный процессы релаксации из  $S_0$  в  $S_1$  обозначены стрелкой NR3 на Рис. 3.4. Конкретные пути наносекундной безызлучательной релакса-

ции в NADH до сих пор детально не изучены. Это могут быть либо ро-вибронные взаимодействия в возбужденных молекулах и взаимодействия с окружающими молекулами растворителя, либо быстрые конформационные флуктуации с внутримолекулярным внутренним преобразованием в основное электронное состояние. Как уже было показано в Главе 2, каждое из измеренных времен затухания NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  может быть представлено как комбинация излучательных  $\tau_{rad}$  и безызлучательных  $\tau_{nrad}$  времен затухания:

$$\frac{1}{\tau_l} = \frac{1}{\tau^{rad}} + \frac{1}{\tau^{nrad}}. \quad (3.5)$$

Путем усреднения выражения  $I_{fl}^{tot}(t)$  3.4 с учетом выражений 3.2 и 3.3 было получено выражение для квантового выхода флуоресценции, в котором были выделены частичные квантовые выходы  $\Phi_D$  и  $\Phi_B$  двух процессов релаксации (NR2 и NR3 на Рис.3.4), приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния:

$$\Phi = \Phi_D \Phi_B, \quad (3.6)$$

где

$$\Phi_D = \frac{N_2}{N(0)} \quad (3.7)$$

и

$$\Phi_B = \frac{\sum_l a_l \tau_l}{\tau^{rad}}. \quad (3.8)$$

Выражение для общего квантового выхода флуоресценции  $\Phi$  в уравнении 3.6 состоит из двух членов, которые отвечают за два различных процесса релаксации, приводящих к уменьшению населенности возбужденного состояния.

Член  $\Phi_D$  в уравнении 3.7 представляет собой обратную эффективность процессов быстрого тушения флуоресценции NR2. В работе Као и др. [142] также встречалось упоминание об канале пикосекундного тушения флуоресценции NADH, где они назвали этот механизм квази-статическое гашение (QSSQ). Квантовый выход процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции  $0 \leq \Phi_D \leq 1$  в выражении 3.7 представляет собой отношение между числом моле-

кул, оставшихся после завершения пикосекундной колебательной релаксации, и числом молекул, возбужденных лазерным импульсом  $N(0) = N_1 + N_2$ .

Член  $\Phi_D$  в уравнении 3.6 представляет собой квантовый выход медленных безызлучательных  $NR2$  и излучательных процессов релаксации (флуоресценция) из первого возбужденного состояния NADH, которые описываются временами затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Как видно из уравнения 3.6, субпикосекундная колебательная релаксация  $NR1$  не вносит вклада в общий квантовый выход флуоресценции NADH. Это происходит потому, что процессы релаксации  $NR1$  не приводят к уменьшению населенности возбужденного состояния.

Преимущество представления общего квантового выхода в виде уравнения 3.6 заключается в том, что это позволяет отделить вклады от процессов пикосекундной и наносекундной релаксации непосредственно из эксперимента. Кроме того представляется возможным оценить влияние микроокружения и молекулярных конформаций на эффективность этих процессов.

### 3.4 Влияние микроокружения на процессы релаксации NADH в возбужденном состоянии

В ранних работах уже были предприняты попытки установить механизмы влияния микроокружения на динамику возбужденного состояния NADH на основе измерений квантового выхода и времен затухания флуоресценции [6; 117–119; 122; 141]. Скотт и др. [18] в результате измерений времени затухания и квантового выхода флуоресценции NADH и его производных в воде и пропиленгликоле (PG) показали, что динамика возбужденного состояния в NADH в основном характеризуется безызлучательными процессами. Это предположение было поддержано результатами, сообщенными в других источниках [6; 117–119; 141]. Гафни и др. [119], Фишер и др. [141] и Виссер и др. [117] показали, что квантовый выход флуоресценции NADH при связывании с ферментами увеличивается в 10 раз по сравнению со свободным NADH. Накабаяши и др. [122] изучили влияние локального электрического поля на флуоресценцию NADH в растворах и продемонстрировали увеличение среднего времени затухания флуоресценции из-за уменьшения полярности растворителя. Блэкер и др. [6] иссле-

довали флуоресценцию NADH с временным разрешением в водных растворах глицерина, в их исследовании [6] была определена скорость безызлучательных процессов релаксации с помощью выражения Крамерса-Хаббарда.

Для анализа зависимости квантового выхода флуоресценции NADH от концентрации метанола, этанола и пропиленгликоля в растворе были использованы выражения 3.6 — 3.8. При вычислении частичных квантовых выходов  $\Phi_D$  и  $\Phi_B$  было сделано несколько предположений. Во-первых, время излучательных процессов релаксации NADH  $\tau_{rad}$  в уравнении 3.8 принималось постоянным. Кроме того, были введены граничные условия  $\Phi_D = 1$  для NADH в 100% растворе пропиленгликоля. Излучательное время затухания NADH, определенное при граничном условии  $\Phi_D = 1$  при 100% пропиленгликоля, составило 10.6 нс, что примерно в два раза меньше времени затухания излучения NADH  $\tau_{rad} = 20.6$  нс, рассчитанного Скоттом и др. [18] с помощью уравнения Стриклер-Берг. Было получено, что излучательное время затухания  $\tau_{rad}$  было намного больше, чем измеренные времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в Таблице 5 и на Рис. 3.3. Этот результат подтверждает вывод о том, что скорости безызлучательного затухания в возбужденном состоянии NADH выше, чем скорость излучательного перехода  $(\tau_{nrad})^{-1} \geq (\tau_{rad})^{-1}$ . Следовательно, измеренные времена затухания флуоресценции NADH в основном характеризуются безызлучательными процессами релаксации.

В настоящей работе на основе экспериментальных данных, представленных на Рис.3.2 и в Таблице 5, были определены частичные квантовые выходы  $\Phi_D$  и  $\Phi_B$ . Зависимость квантового выхода процессов быстрого пикосекундного тушения  $\Phi_D$  и медленных процессов излучательной и безызлучательной релаксации  $\Phi_B$  от концентрации спиртов в растворе представлены на Рис. 3.5 и 3.6, соответственно.

Соотношение  $(\tau_{nrad})^{-1} \geq (\tau_{rad})^{-1}$  и данные на Рис. 3.5 и 3.5 ясно указывают на то, что изменение квантового выхода флуоресценции NADH при увеличении концентрации спиртов в растворе в основном обусловлено изменением эффективности процессов, описываемых членом  $\Phi_B$ . Как видно из Рис. 3.5 квантовый выход процессов тушения флуоресценции NADH  $\Phi_D$  не зависит от концентраций метанола и этанола в растворе. При низких концентрациях частичный квантовый выход NADH  $\Phi_D$  не зависел от концентрации пропиленгликоля, тогда как при концентрации пропиленгликоля более 70% частичный



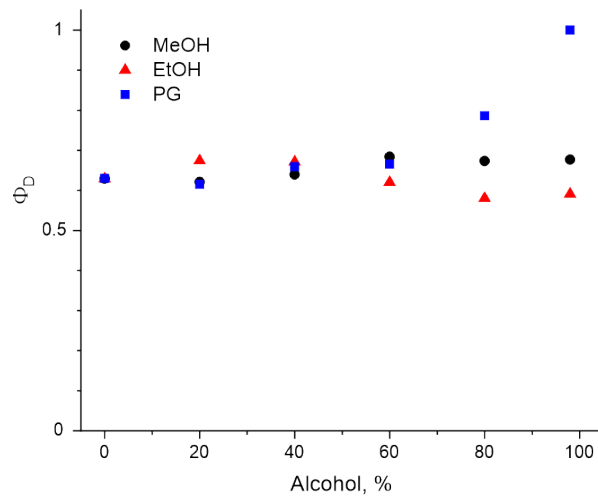


Рисунок 3.5 — Зависимость квантового выхода процессов быстрого пикосекундного тушения  $\Phi_D$  от концентрации метанола (черные кружки), этанола (красные треугольники) и пропиленгликоля (синие квадраты) в растворе. Значения  $\Phi_D$  являются относительными с учетом граничного условия  $\Phi_D = 1$  для 100 % раствора пропиленгликоля

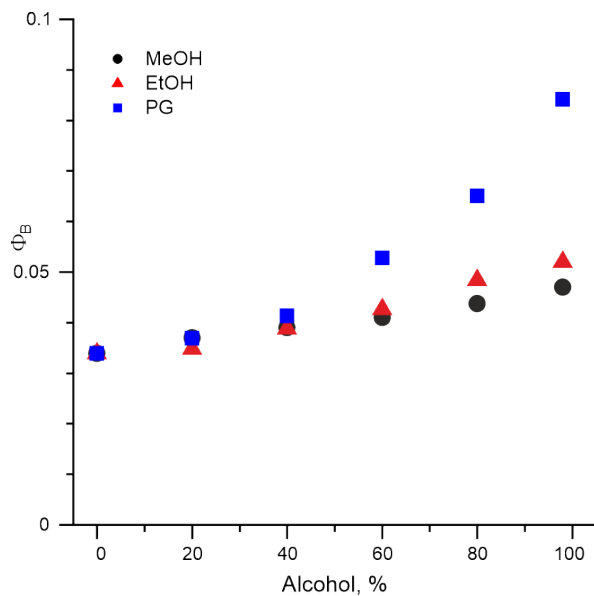


Рисунок 3.6 — Зависимость квантового выхода медленных процессов излучательной и безизлучательной релаксации  $\Phi_B$  от концентрации метанола (черные кружки), этанола (красные треугольники) и пропиленгликоля (синие квадраты).

квантовый выход  $\Phi_D$  увеличивается примерно в 1.6 раза. Мы предполагаем, что этот результат показывает, что скорость быстрого пикосекундного тушения возбужденного состояния NADH практически не зависела от распределения конформации самой молекулы и свойств микроокружения, по крайней мере, в растворах вода–MeOH и вода–EtOH. Этот результат важен для выяснения природы пикосекундного тушения флуоресценции NADH, поскольку тушение может происходить как в свернутой, так и в развернутой конформациях со сравнимой интенсивностью. В случае растворов пропиленгликоля с концентрацией более 70% увеличение частичного квантового выхода  $\Phi_B$  вероятно обусловлено замедлением процессов быстрого пикосекундного тушения в условиях высокой вязкости.

Как видно на Рис. 3.6 частичный квантовый выход NADH  $\Phi_B$  в растворах вода–MeOH и вода–EtOH увеличивался в 1.5 раза при увеличении концентрации спирта в растворе. Как видно из Рис. 3.2 полный квантовый выход флуоресценции NADH также увеличивался в 1.5 раз. На основании этого результата было сделано предположение, что на изменение полного квантового выхода флуоресценции NADH  $\Phi$  в основном влияет изменение скорости медленных процессов безызлучательной релаксации  $NR3$ , характеризующихся временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Было получено, при увеличении концентрации метанола и этанола увеличиваются оба времени затухания флуоресценции, а также увеличивается вклад длинного времени затухания  $a_2$ . В Главе 2 было показано, что эти времена обусловлены *cis*- и *trans*- конформациями NADH. Таким образом на эффективность процессов релаксации  $NR3$  влияет как изменение свойств растворителя, так и перераспределение *cis*- и *trans*- конформаций NADH в возбужденном состоянии.

Исследование природы процессов релаксации  $NR3$  не входило в задачи настоящей работы. Они могут происходить либо при взаимодействии возбужденных молекул NADH с окружающими молекулами растворителя, либо за счет внутримолекулярной конверсии, либо за счет интеркомбинационного перехода в триплетные состояния. Выяснение природы этих релаксационных процессов требует более интенсивных квантово–химических расчетов и классических молекулярных траекторий.

### 3.5 Краткие итоги

1. Были проведены комплексные исследования квантового выхода и времен затухания флуоресценции NADH в водных растворах метанола, этанола и пропиленгликоля. Было получено, что квантовый выход флуоресценции NADH в воде составил порядка 2%. При увеличении концентрации метанола, этанола и пропиленгликоля в растворе наблюдалось увеличение квантового выхода и обоих времен затухания флуоресценции NADH.
2. Для анализа полученных экспериментальных данных была разработана модель, которая позволила разделить вклад в наблюдаемый квантовый выход флуоресценции NADH двух частичных квантовых выходов, которые характеризуют эффективность различных процессов релаксации из первого возбужденного состояния NADH: относительно медленные наносекундные процессы релаксации и быстрые пикосекундные процессы тушения флуоресценции. Эти процессы в основном являются безызлучательными, что обуславливает наблюдение относительно маленького квантового выхода флуоресценции NADH (порядка 2 %).
3. Было продемонстрировано, что увеличение квантового выхода флуоресценции NADH при увеличении концентрации метанола и этанола в растворе обусловлено уменьшением скорости медленных наносекундных процессов безызлучательной релаксации, которая определяется временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Было показано, что на скорость этих процессов влияет изменение полярности водно-спиртовых растворов и перераспределение *cis*- и *trans*- конформаций NADH в возбужденном состоянии.
4. Было показано, что рост квантового выхода флуоресценции NADH при высоких концентрациях пропиленгликоля в растворе связан с замедлением эффективности процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции в условиях высокой вязкости.

## Глава 4. Исследование время-разрешенной флуоресценции молекул NADH, связанных с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) при возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами

Как было продемонстрировано в ранних исследованиях, наблюдение флуоресценции NADH методом время-разрешенной флуоресцентной лазерной микроскопии (FLIM) может быть использовано для мониторинга клеточного метаболизма. [3; 4] Однако основной проблемой при измерении время-разрешенной флуоресценции NADH в живых клетках является интерпретация наблюдаемых времен затухания флуоресценции. Кроме того, анизотропия флуоресценции и соответствующее время анизотропного затухания в настоящее время в основном используются в качестве феноменологических параметров.

В большинстве проведенных ранее экспериментов по наблюдению затухания флуоресценции NADH при связывании с ферментами сигналы затухания флуоресценции представлялись в виде суммы нескольких экспонент с соответствующими весовыми коэффициентами. В основном разделяли два времени затухания:  $\tau_f = 0.4$  нс, которое соответствовало свободному NADH, и  $\tau_b = 1-5$  нс, которое соответствовало связанному состоянию NADH. [78; 124; 126; 144–146] Однако, поскольку NADH в клетке связывается со множеством разных ферментов и времена затухания NADH зависят от условий микроокружения, в рамках этого подхода зачастую нельзя четко разделить связанное и свободное состояние. Эту проблему можно решить при помощи наблюдения затухания анизотропии флуоресценции [78; 144]. Вишвасрао и др. [78], а также Ю и Хейкал [144] использовали FLIM для анализа анизотропии флуоресценции NADH в живых клетках. Эти исследования были направлены на определение соотношения свободного и связанного с ферментами NADH и изучение метаболического сдвига от нормальных кислородных условий к гипоксии. Шарик и др. [147] использовали FLIM для определения относительных концентраций нескольких NADH зависимых метаболических ферментов в растворах и клетках и продемонстрировали, что измеренное время затухания флуоресценции NADH может быть использовано для разделения NADH, связанного с различными ферментами в растворах.

В рамках настоящей работы была исследована динамика поляризованной флуоресценции NADH при связывании с ферментом алкоголь-дегидрогеназа (ADH) в буферном растворе. Фермент ADH представляет собой димер, в каждой субъединице которого находится молекула NADH. В процессе реакции окисления этанола до альдегида уксусной кислоты (ацетальдегида) NAD<sup>+</sup> восстанавливается до NADH.

Был проведен анализ изотропной части сигналов  $I_{iso}(t)$ , в результате которого было выделено две группы времен затухания: два времени затухания  $\tau_1$  и  $\tau_4$ , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH-ADH, и времена  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе. Было сделано предположение, что наблюдение единственного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH можно объяснить на основе модели *cis*- и *trans*-конформаций NADH, 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. Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH-ADH была разработана модель, в рамках которой предполагалось, что экспериментальный сигнал может быть представлен как сумма вкладов связанного с ферментом и свободного NADH. Важной особенностью теоретической модели, которая была использована для анализа сигналов затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH-ADH, является разделение вкладов в затухание анизотропии флуоресценции  $r_l^{(b)}(t)$  связанного с ферментом NADH двух различных механизмов: анизотропной колебательной релаксации с характерным временем  $\tau_{bv}$  и вращательной диффузии с характерным временем  $\tau_{br}$ . Наиболее важным результатом, полученным при анализе экспериментальных сигналов, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс.

## 4.1 Кинетика флуоресценции комплекса NADH-ADH

В настоящей работе сигналы затухания поляризованной флуоресценции комплекса NADH-ADH в растворе были получены с помощью метода, подробно описанного в Главе 2. Кратко, двухфотонное возбуждение исследуемого образца осуществлялось на длине волны 720 нм линейно-поляризованным лазерным излучением. Флуоресценция собиралась перпендикулярно направлению распространения возбуждающего излучения и проходила через систему интерференционных фильтров для выделения спектрального диапазона  $436 \pm 10$  нм, что соответствовало максимуму флуоресценции связанного с ферментом NADH. Ортогональные поляризационные компоненты флуоресценции разделялись при помощи призмы Глана, а затем одновременно и независимо регистрировались двумя лавинными фотодиодами, работавшими в режиме счета фотонов. Сигналы с фотодиодов обрабатывались системой TCSPC.

Сигналы затухания поляризованной флуоресценции были получены для раствора  $50 \mu\text{M}$  ADH и  $25 \mu\text{M}$  NADH в буфере PBS. Сигналы двух ортогональных поляризационных компонент флуоресценции  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  раствора NADH-ADH представлены на Рис. 4.1

Анализ полученных экспериментальных сигналов осуществлялся в несколько этапов. Сначала из экспериментальных сигналов  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  было определено изотропное затухание флуоресценции  $I_{tot}(t)$  с помощью выражения 2.3. Изотропное затухание флуоресценции  $I_{tot}(t)$  было проанализировано исходя из предположения, что в растворе присутствует как связанный с ферментом, так и свободный NADH. При этом для анализа использовалось несколько моделей с различным количеством времен затухания  $\tau_i$ . Затем с учетом результатов, полученных при анализе изотропного затухания флуоресценции  $I_{tot}(t)$ , была проведена глобальная аппроксимация сигналов, представленных на Рис. 4.1.

Для определения характерных времен затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH была проанализирована изотропная (нечувствительная к поляризации) часть сигнала затухания флуоресценции  $I_{tot}(t)$ , которая была получена согласно выражению 2.3 из двух ортогональных поляризационных компонент флуоресценции  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$ , представленных на Рис. 4.1. Изотропный

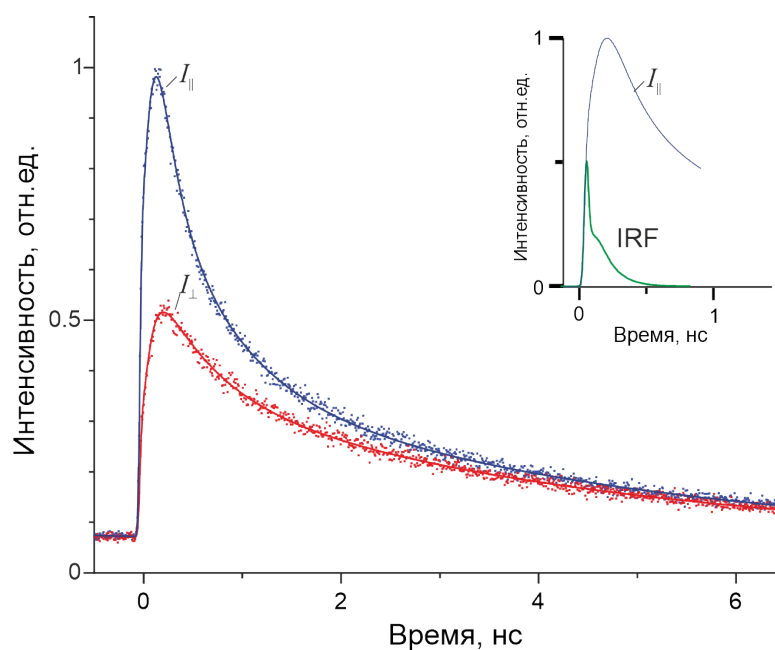


Рисунок 4.1 — Сигналы затухания двух ортогональных поляризационных компонент флуоресценции раствора  $50 \mu\text{M}$  ADH и  $25 \mu\text{M}$  NADH:  $I_{\parallel}$  — компонента параллельная поляризации возбуждающего излучения (синие точки) и  $I_{\perp}$  — компонента перпендикулярная поляризации возбуждающего излучения. На вставке к рисунку функция отклика детекторов  $IRF(t)$  изображена сплошной зеленой линией.

сигнал затухания флуоресценции раствора  $50 \mu\text{M}$  ADH и  $25 \mu\text{M}$  NADH, а также результаты аппроксимации представлены на Рис. 4.2.

Изотропный сигнал затухания флуоресценции  $I_{tot}(t)$  был проанализирован с использованием функции суммы двух, трех и четырех экспонент (см. выражение 1.10). Полученные в результате процедуры аппроксимации времена затухания флуоресценции  $\tau_i$  и соответствующие весовые коэффициенты  $a_i$  представлены в Таблице 6. Результаты, приведенные в четвертой строке Таблицы 6, соответствуют модельной функции суммы четырех экспонент с фиксированными временами затухания для свободного NADH  $\tau_2 = 0.24$  нс и  $\tau_3 = 0.66$  нс, которые были получены при анализе сигналов затухания для свободного NADH в буферном растворе PBS. Погрешность определения всех параметров затухания флуоресценции, представленных в Таблице 6, составила менее 10 %.

Было получено, что для всех четырех моделей в Таблице 6 наблюдается наносекундное время затухания флуоресценции  $\tau_4$  со значением, лежащим в диапазоне 3.65–4.85 нс, что в несколько раз превышает времена затухания флуоресценции свободного NADH в растворе (см. Главу 2). Относительно длинное

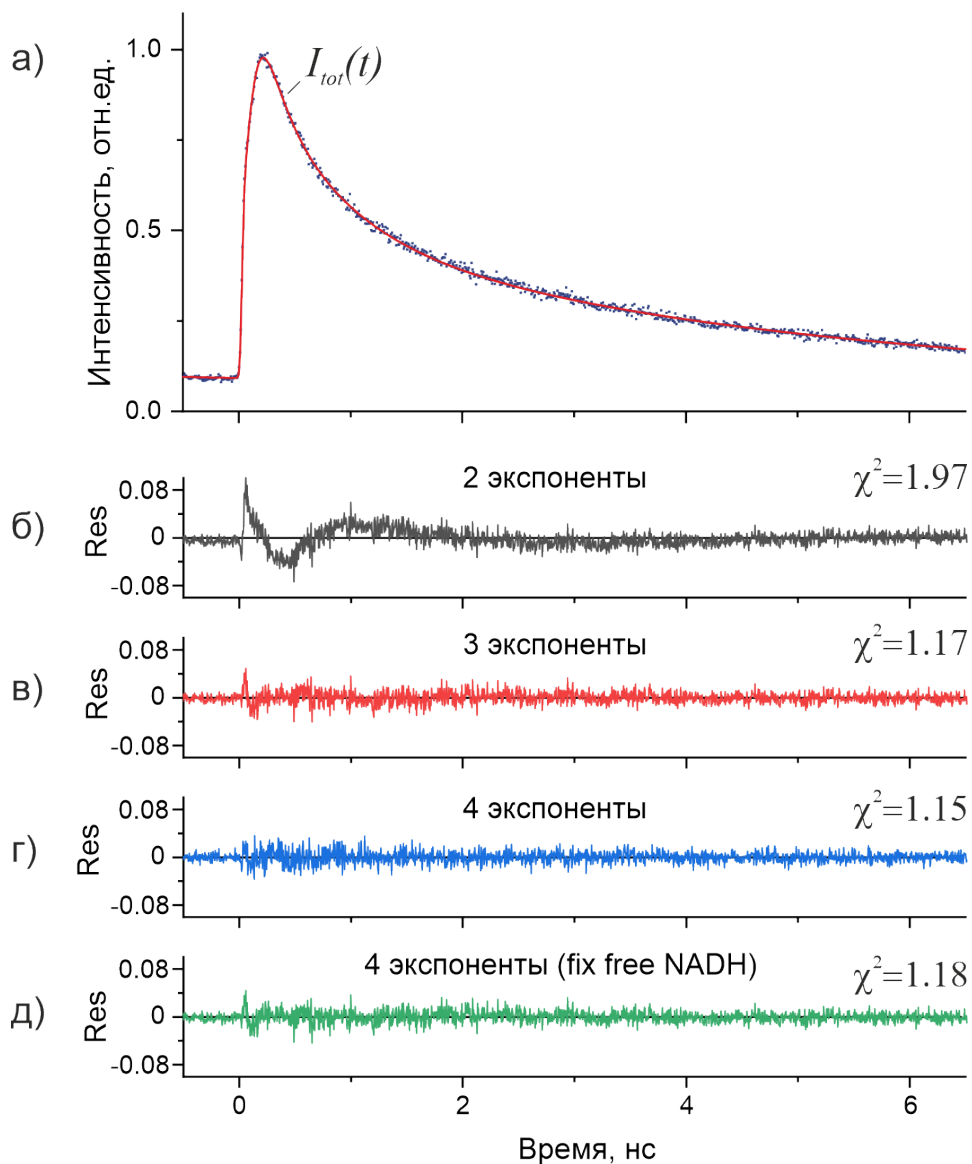


Рисунок 4.2 — Изотропное затухание флуоресценции  $I_{tot}(t)$  раствора  $50 \mu\text{M}$  ADH и  $25 \mu\text{M}$  NADH.

Таблица 6 — Времена затухания флуоресценции  $\tau_i$  раствора NADH-ADH и NADH, весовые коэффициенты  $a_i$  и отношение концентраций свободного и связанного с белком NADH в растворе  $N_f/N_b$ .

	$\tau_1$ , нс ( $a_1$ )	$\tau_2$ , нс ( $a_2$ )	$\tau_3$ , нс ( $a_3$ )	$\tau_4$ , нс ( $a_4$ )	$\chi^2$	$N_f/N_b$
2 exp	-	-	0.30 (0.63)	3.65 (0.37)	1.97	1.72
3 exp	-	0.12 (0.50)	0.77 (0.25)	4.69 (0.25)	1.17	0.96
4 exp	0.10 (0.38)	0.30 (0.24)	0.90 (0.17)	4.85 (0.21)	1.15	0.90
4 exp (fix)	0.10 (0.45)	0.24 (0.05)	0.66 (0.25)	4.50 (0.25)	1.18	0.80



время затухания флуоресценции порядка 3-5 нс в растворах, содержащих фермент АДН, наблюдалось ранее несколькими исследовательскими группами [116; 124; 126] и согласно интерпретации авторов было обусловлено флуоресценцией комплекса NADH-АДН.

Как видно из первой строки Таблицы 6 и Рис. 4.2 б) двойная экспоненциальная модель, в которой предполагается наличие только одного времени затухания флуоресценции свободного NADH и одного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-АДН, показывает неудовлетворительное качество аппроксимации. Это указывает на то, что простой одноэкспоненциальной модели для свободного и связанного состояния NADH является недостаточно для понимания динамики процессов, происходящих в возбужденном состоянии NADH. Как было показано в Главе 2 свободный NADH в растворе обладает двумя временами затухания флуоресценции 0.26 нс и 0.61 нс. Время  $\tau_3 = 0.3$  нс в первой строке Таблицы 6 было незначительно меньше, чем усредненное время затухания флуоресценции свободного NADH  $\tau_f = 0.43$  нс, определенное из экспериментальных данных, представленных в Таблице 1 Главы 2.

При использовании модели с тремя и четырьмя экспонентами, помимо наносекундного времени затухания флуоресценции  $\tau_4$ , появлялось короткое короткое время порядка 0.10-0.12 нс, которое было сильно меньше, чем времена затухания, наблюдаемые для свободного NADH в растворе. Короткое время затухания флуоресценции не наблюдалось для свободного NADH как при исследовании кофермента в настоящей работе (см. Главу 2), так и в исследованиях, проводимых ранее другими научными группами [6; 115; 117]. Однако при исследовании динамики возбужденного состояния NADH методом ап-конверсионной спектроскопии было определено время затухания порядка 26 пс [142]. В некоторых работах сообщалось о наличии времени затухания флуоресценции порядка 0.08-0.12 нс при исследовании связанного с ферментом NADH [78; 116; 126]. В настоящей работе предполагается, что это время возникает либо за счет взаимодействия NADH в возбужденном состоянии с аминокислотами в сайте связывания АДН, либо за счет переноса энергии между двумя молекулами NADH. Теоретическое описание природы этого времени выходит за рамки настоящей работы.

Согласно результатам, представленным в Таблице 6, и невязкам на Рис. 4.2 модель с четырьмя экспонентами является наиболее предпочтительной для

анализа сигналов затухания флуоресценции в случае совместного наблюдения свободного и связанного с ферментом NADH. На основании результатов из третьей и четвертой строк Таблицы 6 было выделено две группы времен затухания: два времени затухания  $\tau_1$  и  $\tau_4$ , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH-ADH, и времена  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе. Времена затухания  $\tau_2 = 0.30$  нс и  $\tau_3 = 0.90$  нс в третьей строке Таблицы 6 были незначительно больше, чем времена затухания свободного NADH в растворе PBS  $\tau_2 = 0.24$  нс и  $\tau_3 = 0.66$  нс. При фиксации этих времен для аппроксимации сигнала затухания флуоресценции на Рис. 4.2 качество аппроксимации становилось незначительно хуже, что проявляется в виде увеличения критерия согласия  $\chi_2$ . Несмотря на это, при использовании модели суммы четырех экспонент с фиксированными временами затухания флуоресценции для свободного NADH в растворе возникает возможность сильно упростить процедуру анализа данных, а также избежать появления артефактов. За счет использования четырех-экспоненциальной модели возможно получить наиболее точное различие параметров затухания флуоресценции свободного и связанного с ферментом NADH в растворах, необходимых для детального понимания происходящих в возбужденном состоянии NADH релаксационных процессов.

Основываясь на полученных временах затухания и соответствующих весовых коэффициентов была определена относительная концентрация свободного NADH и комплекса NADH-ADH в растворе  $N_f/N_b$ . Особенностью определения относительной концентрации двух форм кофермента является учет различия квантового выхода для комплекса NADH-ADH и свободного NADH. Как было показано в Главе 3 изменение квантового выхода NADH в основном обусловлено изменением скорости медленных наносекундных процессов безызлучательной релаксации  $\tau_{nrad}$  в возбужденном состоянии кофермента. Обычно для определения относительной концентрации различных флуоресцирующих компонент в растворе, в частности связанного и свободного NADH, на основе времен затухания флуоресценции и их весовых коэффициентов, используют следующее выражение [3]:

$$f = \frac{a_i \tau_i}{\sum_j a_j \tau_j}. \quad (4.1)$$

Это выражение получено из предположения, что скорость процессов излучения  $\gamma_{rad} = \tau_{rad}^{-1}$  одинакова для всех флуоресцирующих молекул в растворе (см. выражение 3.5), а весовые коэффициенты  $a_i$  в уравнении (1.10) представляют собой вклады в сигнал флуоресценции от каждого типа молекул. Однако, как было отмечено в работе Ниснер и др. [148], в общем случае, помимо концентрации, на значения  $a_i$  и, соответственно,  $f$  влияют сечение поглощения  $\sigma$  и квантовый выход флуоресценции  $\Phi$  каждого компонента. Например, известно, что квантовый выход флуоресценции комплекса NADH-ADH в несколько раз выше, чем квантовый выход флуоресценции свободного NADH [112]. Следовательно, при определении относительной концентрации различных компонент в растворе с использованием выражения 4.1 необходимо учитывать фотофизические свойства флуоресцирующих частиц.

В настоящей работе для определения относительной концентрации NADH-ADH и свободного NADH из экспериментальных данных, представленных в Таблице 6, было проведено интегрирование выражения 1.10 по времени: [5]

$$I_{av} = \sum_i a_i \tau_i, \quad (4.2)$$

где  $a_i \tau_i$  – вклад в интенсивность флуоресценции от различных флуоресцирующих компонент в растворе. Этот вклад можно выразить через концентрацию флуоресцирующих компонент в основном состоянии  $N_i$  следующим образом:

$$a_i \tau_i = E_{pu} l N_i \sigma_i \Phi_i, \quad (4.3)$$

где  $N_i$  и  $\Phi_i$  – концентрация флуоресцирующих компонент в основном состоянии и их квантовый выход флуоресценции, соответственно,  $\sigma_i$  – сечение поглощения,  $l$  – длина оптического пути через образец,  $E_{pu}$  – энергия в импульсе возбуждающего излучения.

Как было отмечено выше, времена затухания флуоресценции  $\tau_2$  и  $\tau_3$  в третьей и четвертой строках Таблицы 6 обусловлены флуоресценцией свободного NADH, а времена  $\tau_1$  и  $\tau_4$  ассоциируются с флуоресценцией комплекса NADH-ADH. Подставляя общее выражение для квантового выхода флуоресценции  $\Phi$  (см. выражение 1.5) и выражение для  $a_i \tau_i$  (4.3) в выражение для

интенсивности флуоресценции  $I_{av}$  (4.2) были получены выражения для концентраций свободного NADH  $N_f$  и комплекса NADH–ADH  $N_b$ :

$$N_f = C_f \frac{(a_2\tau_2 + a_3\tau_3)}{(\tau_2 + \tau_3)}, \quad (4.4)$$

$$N_b = C_b \frac{(a_1\tau_1 + a_4\tau_4)}{(\tau_1 + \tau_4)}, \quad (4.5)$$

где постоянные  $C_f = \tau_{rad}/E_{pul}\sigma_f$  и  $C_b = \tau_{rad}/E_{pul}\sigma_b$ .

Относительная концентрация свободного и связанного NADH  $N_f/N_b$ , определенная из 4.4 и 4.5 с учетом предположения, что времена излучательных процессов  $\tau_{rad}$  свободного NADH и комплекса NADH–ADH совпадают, представлена в последнем столбце Таблицы 6. Стоит отметить, что отношение концентраций определено с точностью до множителя  $C = \tau_{rad}^f\sigma_b/\tau_{rad}^b\sigma_f$ . Как видно из Таблицы 6, относительная концентрация  $N_f/N_b$  совпадает в пределах погрешности эксперимента для моделей с тремя и четырьмя экспонентами, тогда как при использовании модели с двумя экспонентами соотношение  $N_f/N_b$  получается в два раза выше.

Двух-экспоненциальная модель на настоящий момент широко используется для анализа сигналов NADH, полученных методом FLIM в живых клетках [3; 78; 125; 147; 149]. В настоящей работе показано, что анализ сигналов затухания флуоресценции растворов, в которых присутствует свободный и связанный NADH, с помощью модели суммы двух экспонент приводит к существенным погрешностям в определении относительной концентрации свободного и связанного с ферментами NADH. Как видно из Таблицы 6, относительная концентрация  $N_f/N_b$ , посчитанная на основе выражений 4.4 и 4.5, отличается практически в два раза для модели с двумя экспонентами и модели с тремя экспонентами. Стоит отметить, что для определения только относительных концентраций связанных с ферментом и свободных форм NADH в клетках, которые представляют основной интерес для биохимических приложений, модель с тремя экспонентами является наиболее предпочтительной, поскольку можно значительно уменьшить число параметров аппроксимации без потерь в качестве анализа.

## 4.2 Объяснение природы наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH

Анализ наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_4$  был проведен на основе модели *cis*- и *trans*-конформаций никотинамида в молекуле NADH, которая подробно описана в разделе 2.4. Как было показано в разделе 2.4 неоднородность измеренных времен затухания флуоресценции свободного NADH в водных растворах метанола была объяснена с помощью расчетов *ab initio*, которые показали различное распределение заряда в *cis*- и *trans*-конформациях никотинамида. В этой модели предполагается, что существование *cis*- и *trans*-конформаций NADH приводит к неоднородности измеренных времен затухания флуоресценции, поскольку разные распределения заряда в этих конформациях обуславливают различия распределения внутримолекулярного электростатического поля. В свою очередь это приводит к тому, что скорость процессов безызлучательной релаксации отличается для *cis*- и *trans*-конформаций.

Как известно из рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии [150], в сайтах связывания ферментов NADH находится в единственной конформации: развернутая конформация с *trans*-конфигурацией никотинамида. На основании этого, было сделано предположение, что наблюдение единственного наносекундного времени затухания флуоресценции комплекса NADH-ADH обусловлено единственной *trans*-конформацией NADH в сайте связывания ADH.

В ранних исследованиях значительное увеличение времени затухания флуоресценции связанного с ферментами NADH объясняли низкой полярностью сайта связывания [126]. Однако до настоящего времени конкретного механизма влияния полярности на наблюдаемые времена затухания флуоресценции не было предложено. В настоящей работе для качественного объяснения увеличения времен затухания флуоресценции свободного NADH в различных растворах и комплекса NADH-ADH была разработана модель на основе *ab initio* расчетов. Для этого были проведены *ab initio* расчеты электронной структуры NADH (PDB ID: 4XD2) в условиях различной диэлектрической проницаемости  $\epsilon$ . Это позволило смоделировать изменения электростатического окружения в сайте связывания ферментов. Полученные распределения зарядов (по Малликену) в

никотинамиде при различных значениях диэлектрической проницаемости  $\epsilon = 2, 4.7, 10$  и  $78.4$  приведены на Рис. 4.3.

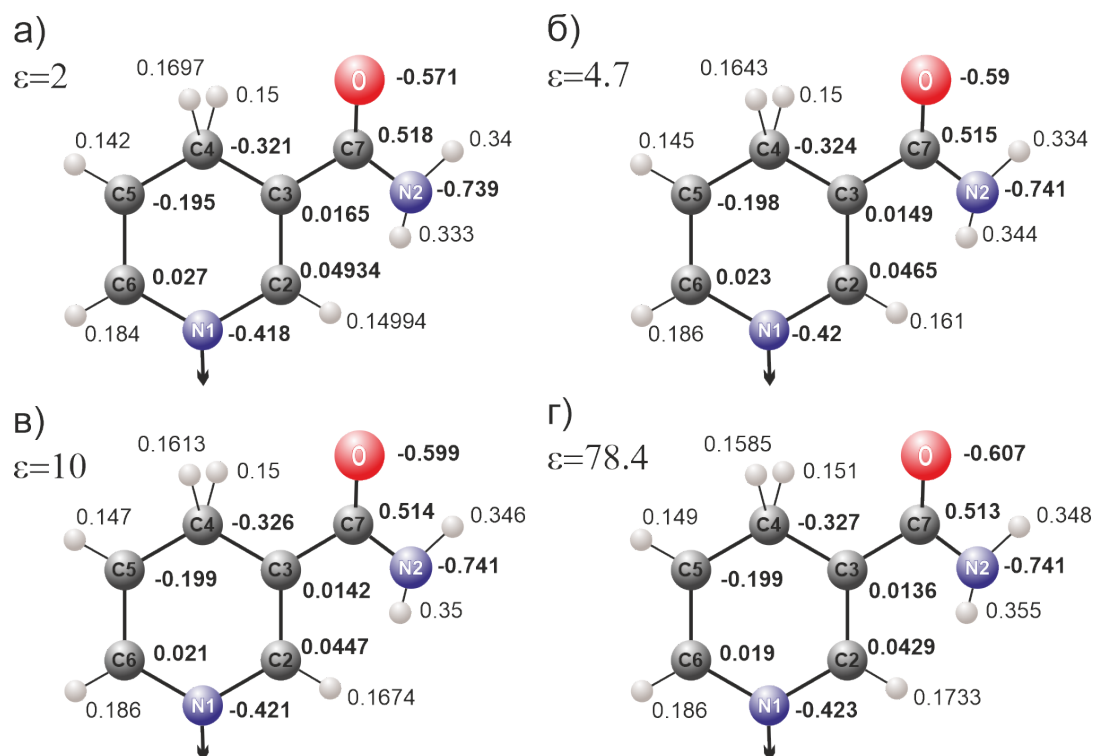


Рисунок 4.3 — Структура никотинамида с указанием распределения зарядов в условиях различной диэлектрической проницаемости  $\epsilon =$  а) 2, б) 4.7, в) 10 и г) 78.4

Как видно из Рис. 4.3, при изменении диэлектрической проницаемости  $\epsilon$  наблюдалось изменение распределения зарядов в никотинамиде. При этом наиболее заметные изменения заряда наблюдалось на атоме кислорода амидной группы (CONH<sub>2</sub>) для значений  $\epsilon < 10$ . На Рис. 4.4 приведен точечный заряд на атоме кислорода амидной группы в зависимости от диэлектрической проницаемости  $\epsilon$ , где  $\epsilon = 78$  характерно для водного раствора и  $\epsilon = 2$  характерно для неполярных растворителей.

Как видно на Рис.4.4, при  $\epsilon < 10$  отрицательный заряд на атоме кислорода резко уменьшается примерно на 5%. Принимая во внимание, что внутримолекулярные электростатические поля обычно очень сильны [122], небольшие изменения заряда при малых  $\epsilon$  на Рис. 4.4 могут значительно влиять на изменение внутримолекулярного электростатического поля, что приводит к изменению скоростей безызлучательной релаксации возбужденного состояния NADH. Таким образом измеренные времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$ , которые обусловлены по большей части процессами безызлучательной релак-

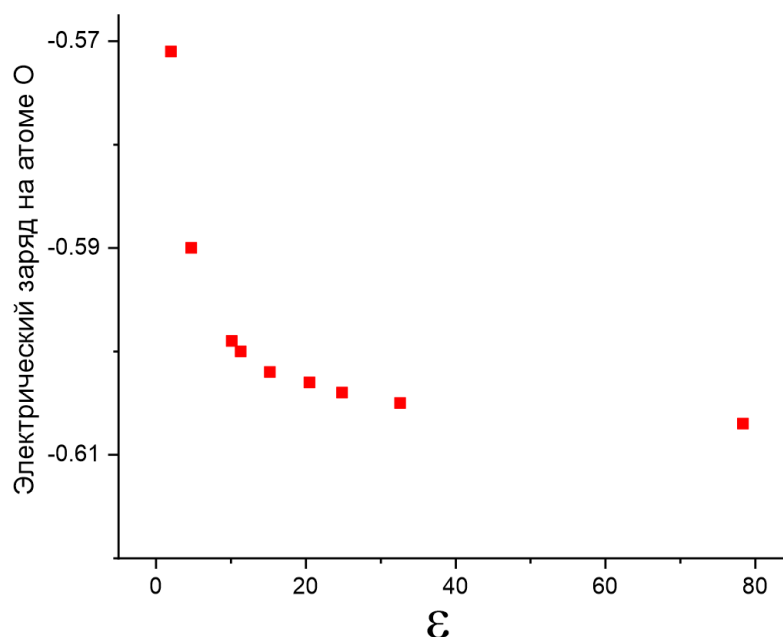


Рисунок 4.4 — Частичный заряд (по Малликену) на атоме кислорода амидной группы молекулы NADH в зависимости от диэлектрической проницаемости.

саци, зависят главным образом от распределения зарядов в никотинамиде и от соответствующего распределения электростатического поля. Следовательно, наблюдаемое увеличение времени затухания флуоресценции NADH, связанного с ферментом АДН, можно объяснить значительным изменением распределения зарядов в никотинамиде в условиях аполярного окружения сайта связывания АДН. [78; 125]

Разработанная модель была применена для объяснения увеличения времен затухания флуоресценции свободного NADH в водно-спиртовых растворах, которые были представлены на Рис.2.4 и 3.3 и обсуждались в Главах 2 и 3. На Рис. 4.5 приведен график зависимости двух времен затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  от диэлектрической проницаемости растворов.

Как видно из Рис. 4.5 при уменьшении диэлектрической проницаемости окружения наблюдается рост обоих времен затухания флуоресценции, при этом характер зависимости схож с увеличением заряда на атоме O (см. Рис. 4.4), рассчитанным методом *ab initio*. Однако, в растворе пропиленгликоля (PG) оба времени затухания флуоресценции были в два раза больше, чем в растворе метанола (MeOH), при равной диэлектрической проницаемости растворителей. Как уже обсуждалось в Главе 3 это связано с уменьшением скорости процессов безызлучательной релаксации в сильно вязких растворителях.

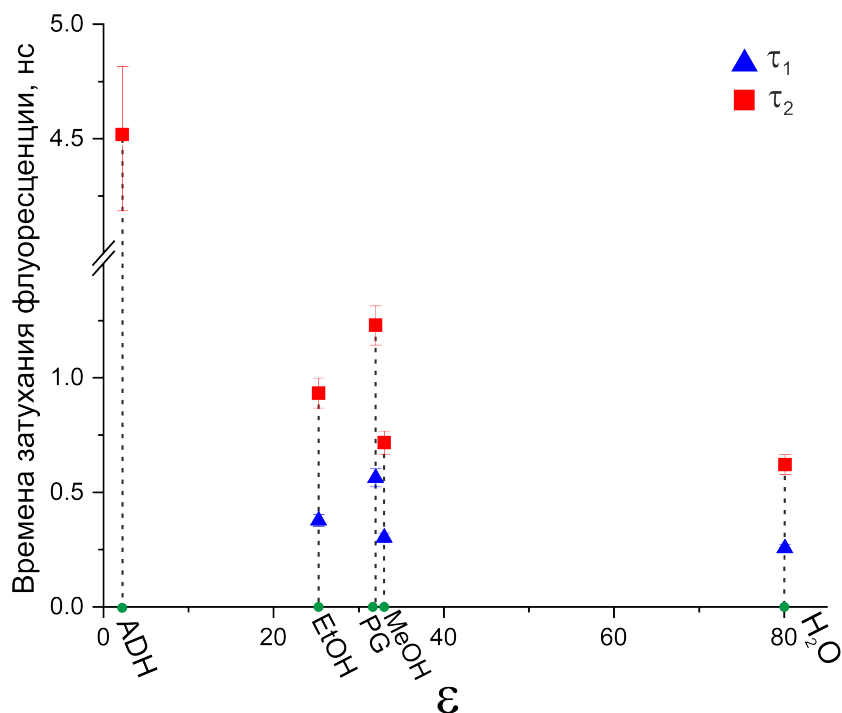


Рисунок 4.5 — Времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в зависимости от диэлектрической проницаемости растворов.

### 4.3 Анизотропная релаксация комплекса NADH–ADH

. Для определения характерных времен затухания анизотропии флуоресценции комплекса NADH–ADH, был проведен анализ сигналов затухания двух ортогональных поляризационных компонент флуоресценции, представленных на Рис. 4.1. Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции была разработана модель, в которой экспериментальный сигнал был представлен как сумма вкладов связанного с ферментом и свободного NADH. Для упрощения вычислений времена затухания флуоресценции свободного NADH  $\tau_{f2} = 0.24$  нс и  $\tau_{f3} = 0.66$  нс и параметр анизотропии  $r_f = 0.49$  были зафиксированы. Для аппроксимации сигналов использовались следующие выражения:

$$I_{\parallel}(t) = GI_0 \left[ I_l^{(f)}(t)(1 + 2r_l^{(f)}(t)) + I_l^{(b)}(t)(1 + 2r_l^{(b)}(t)) \right] * \text{IRF}(t), \quad (4.6)$$

$$I_{\perp}(t) = I_0 \left[ I_l^{(f)}(t)(1 - r_l^{(f)}(t)) + I_l^{(b)}(t)(1 - r_l^{(b)}(t)) \right] * \text{IRF}(t), \quad (4.7)$$



где  $I_l^{(f)}(t)$  и  $I_l^{(b)}(t)$  – изотропное затухание интенсивности флуоресценции свободного NADH и комплекса NADH–ADH, соответственно,  $r_l^{(f)}(t)$  и  $r_l^{(b)}(t)$  – затухание анизотропии флуоресценции свободно NADH и комплекса NADH–ADH, соответственно, а \*–символ обозначает операцию свертки. Для случая свободного NADH в растворе, выражения для изотропного затухания  $I_l^{(f)}(t)$  (см. выражение 2.3) и затухания анизотропии  $r_l^{(f)}(t)$  представлены в Главе 2.

Изотропное затухание комплекса NADH–ADH  $I_l^{(b)}(t)$  в выражении (4.6) было представлено в виде суммы двух экспонент:

$$I_l^{(b)}(t) = a_{b1}e^{-t/\tau_{b1}} + a_{b2}e^{-t/\tau_{b2}} \quad (4.8)$$

Анализ анизотропной части сигналов затухания поляризованной флуоресценции комплекса NADH–ADH был проведен на основе теоретической модели, подробно описанной в работах [A3] и [A5]. В рамках этой модели в выражении для затухания анизотропии флуоресценции комплекса NADH–ADH  $r_l^{(b)}(t)$  учитывался вклад процессов анизотропной колебательной релаксации с характерным временем  $\tau_{bv}$  и вращательной диффузии с характерным временем  $\tau_{br}$ :

$$r_l^{(b)}(t) = \left( r_{b1} + r_{b2}e^{-t/\tau_{bv}} \right) e^{-t/\tau_{br}}, \quad (4.9)$$

В результате анализа экспериментальных сигналов (Рис. 4.1) с помощью выражений 4.6 был получен набор параметров, которые представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – 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.

$\tau_{f1}$ , ns	$\tau_{f2}$ , ns	$\tau_{b1}$ , ns	$\tau_{b2}$ , ns	$\tau_{fr}$ , ns	$r_{b1}$	$r_{b2}$	$\tau_{bv}$ , ns	$\chi^2$
$\mu M$	$(a_{f1})$	$(a_{f2})$	$(a_{b1})$	$(a_{b2})$				
0.24	0.66	0.09	4.43	0.17	0.05	0.26	0.89	1.08
(0.05)	(0.25)	(0.43)	(0.27)					

Как видно из Таблицы 7, все весовые коэффициенты  $a_{f1}$ ,  $a_{f2}$ ,  $a_{b1}$ ,  $a_{b2}$  и времена затухания  $\tau_{b1}$ ,  $\tau_{b2}$  находятся в идеальном согласии с соответствующими значениями, полученными в результате анализа изотропной части сигнала  $I_{tot}(t)$  (см. Таблицу 6).

В Таблице 7 представлены параметры, описывающие затухание анизотропии флуоресценции свободного NADH и комплекса NADH-ADH:  $\tau_{fr}$ ,  $\tau_{bv}$ ,  $r_{b1}$  и  $r_{b2}$ . Согласно соотношению Эйнштейна-Стокса 2.12 время вращательной диффузии комплекса NADH-ADH  $\tau_{br}$  должно составлять порядка 30-40 нс. Оценка сделана с учетом молекулярного объема комплекса NADH-ADH, который на три порядка больше, чем молекулярный объем свободного NADH. Поскольку величина этого времени намного больше, чем характерные времена затухания флуоресценции NADH-ADH и период следования лазерных импульсов (12 нс), то достоверно определить время вращательной диффузии комплекса NADH-ADH не представлялось возможным в условиях настоящего эксперимента. Таким образом, время вращательной диффузии комплекса NADH-ADH было зафиксировано при аппроксимации экспериментальных сигналов и было равно  $\tau_{br} = 30$  нс. Как видно из Таблицы 7, время вращательной диффузии свободного NADH  $\tau_{fr} = 0.17$  нс полностью согласуется с временем вращательной диффузии, полученным в Главе 2 при анализе сигналов затухания флуоресценции свободного NADH в водном растворе, и с результатами ранних исследований [115; 118]. Сигналы затухания анизотропии флуоресценции  $r(t)$  свободного NADH и раствора NADH-ADH, посчитанные из ортогональных поляризационных компонент флуоресценции с помощью выражения 1.28, представлены на Рис. 4.6.

Важной особенностью данных, приведенных в Таблице 7, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс. Время деполяризации флуоресценции  $\tau_{bv}$  было значительно меньше, чем время вращательной диффузии комплекса NADH-ADH  $\tau_{br} = 30$  нс. Исходя из анализа данных, опубликованных в ранних исследованиях [78; 126; 144], субнаносекундное анизотропное время затухания флуоресценции связанного с ферментом NADH наблюдалось впервые в настоящей работе. Затухание анизотропии флуоресценции связанного с ферментом NADH было исследовано ранее в работах Пирсма и др. [126], Вишвасрао и др. [78] и Ю и Хейкал.[144]. Пирсма и др. [126] провели исследования NADH в ферментативных комплексах пр-ADH и ADH, в результате которых было показано отсутствие локального движения NADH в сайте связывания ферментов. Этот результат был подтвержден Вишвасрао и др. [78], а также Ю и Хейкал [144], которые в результате исследований анизотропии флуоресценции NADH, связанного с m-малат-дегидрогеназой (mMDH)

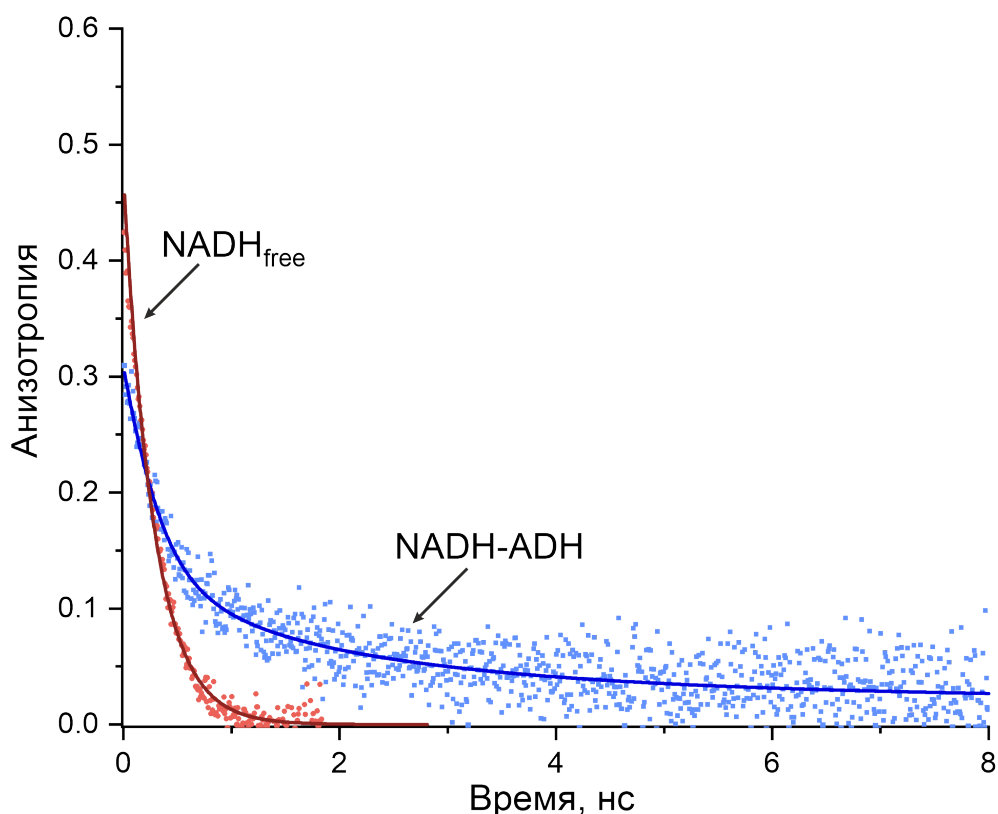


Рисунок 4.6 — Затухание анизотропии флуоресценции свободного NADH в растворе PBS (красные точки) и раствора NADH-ADH (синие точки).

и лактат-дегидрогеназой (LDH), также показали отсутствие локальной подвижности NADH в сайте связывания ферментов. Наблюдаемое время  $\tau_{bv} = 0.89$  нс вероятно никак не связано с локальным вращением молекулы NADH в сайте связывания ADH, а обусловлено анизотропными процессами колебательной релаксации возбужденного состояния NADH.

Согласно разработанной модели (см. Приложение В.2), относительно короткое время анизотропного затухания комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс, обусловлено поворотом дипольного момента перехода флуоресценции за счет перестройки конфигурации ядер молекулы, которая происходит в процессе колебательной релаксации в возбужденном состоянии NADH. Согласно теоретической модели в Приложении В.2 (см. выражения В.7)-(В.9), при наличии быстрой колебательной релаксации, анизотропия флуоресценции  $r(t)$  может быть представлена в виде выражения, в котором параметры  $r_{ij}^{(g)}$  и  $r_{ij}^{(e)}$  являются молекулярными анизотропиями:

$$\begin{aligned}
r_{ij}^{(g)} &= \langle P_2(\cos \theta) \rangle \Big|_{t=0}, \\
r_{ij}^{(e)} &= \langle P_2(\cos \theta) \rangle \Big|_{t=t_{rel}},
\end{aligned} \tag{4.10}$$

где  $\theta$  - угол между дипольными моментами переходов возбуждения и флуоресценции,  $P_2(\cos \theta)$  - полином Лежандра 2-го порядка при  $t = 0$  в момент возбуждения и  $t = t_{rel}$  в момент окончания процессов колебательной релаксации. С учетом выражений 4.10 параметры анизотропии комплекса NADH-ADH  $r_{b1}=0.05$  и  $r_{b2}=0.26$ , определенные из эксперимента, можно представить следующим образом:

$$\begin{aligned}
r_{b1} &= \langle P_2(\cos \theta) \rangle \Big|_{t=t_{rel}}, \\
r_{b2} &= \langle P_2(\cos \theta) \rangle \Big|_{t=0} - \langle P_2(\cos \theta) \rangle \Big|_{t=t_{rel}}.
\end{aligned} \tag{4.11}$$

Согласно выражениям 4.11 параметр  $r_{b2}$  характеризует изменение угла  $\theta_{t0}$  между дипольным моментом возбуждения и дипольным моментом флуоресценции за время колебательной релаксации, а параметр  $r_{b1}$  характеризует конечный угол  $\theta_{t_{rel}}$  между дипольными моментами возбуждения и флуоресценции, когда процессы колебательной релаксации завершились. Предполагается, что параметр анизотропии  $r_{b2}$  должен быть очень чувствителен к окружению сайта связывания фермента ADH. Это предположение может являться одной из причин, почему время релаксации  $\tau_{bv}$  не наблюдалось при исследовании затухания анизотропии флуоресценции комплексов NADH-фермент [78; 126; 144]. В Главе 5 будет показано, что время анизотропной колебательной релаксации NADH чувствительно к изменению полярности окружения. Вероятно, взаимодействие NADH с более полярными сайтами связывания ферментов могло привести к наблюдению более короткого времени анизотропной релаксации  $\tau_{bv}$ , которое невозможно было обнаружить флуоресцентными методами.

Экспериментальное обнаружение времени анизотропной колебательной релаксации комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv}$  является наиболее важным результатом, поскольку оно может быть использовано вместе с другими параметрами затухания флуоресценции для мониторинга процессов связывания NADH с фермен-

тами методом FLIM. Кроме того, наблюдение этого времени позволяет предположить, что интерпретация данных затухания анизотропии флуоресценции NADH в клетках, полученных с помощью метода FLIM, может быть более сложной, чем рассматривалось ранее [3; 78; 151].

#### 4.4 Краткие итоги

1. Были зарегистрированы сигналы затухания ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH-ADH в буферном растворе PBS. Анализ сигналов был проведен в несколько этапов. Сначала была проанализирована изотропная, нечувствительная к поляризации, часть сигналов  $I_{tot}(t)$ . В результате этого анализа было выделено две группы времен затухания: два времени затухания  $\tau_1$  и  $\tau_4$ , которые ассоциировались с флуоресценцией комплекса NADH-ADH, и времена  $\tau_2$  и  $\tau_3$ , которые ассоциировались с флуоресценцией свободного NADH в растворе.
2. 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.
3. Интерпретация времени  $\tau_4 = 4.5$  нс была основана на модели *cis*- и *trans*-конформаций, подробно описанной в Главе 2. Согласно этой модели единственное время затухания комплекса NADH-ADH обусловлено тем, что NADH в сайте связывания находится в единственной *trans*-конформации.
4. Значительное увеличение времени затухания комплекса NADH-ADH по сравнению со свободным NADH было объяснено уменьшением скорости процессов безызлучательной релаксации за счет изменения распределения зарядов в никотинамиде в условиях неполярного окружения сайта связывания ADH.
5. Для анализа сигналов ортогональных поляризационных компонент флуоресценции комплекса NADH-ADH была разработана модель, в которой экспериментальный сигнал был представлен как

- сумма вкладов флуоресценции связанного с ферментом и свободного NADH. Важной особенностью теоретической модели является разделение вкладов в затухание анизотропии флуоресценции комплекса NADH-ADH  $r_l^{(b)}(t)$  двух различных механизмов: процессов анизотропной колебательной релаксации с характерным временем  $\tau_{bv}$  и вращательной диффузии с характерным временем  $\tau_{br}$ .
6. Наиболее важным результатом, полученным при анализе экспериментальных сигналов, является время деполяризации флуоресценции комплекса NADH-ADH  $\tau_{bv} = 0.89$  нс. Время  $\tau_{bv}$  обусловлено поворотом дипольного момента перехода NADH за счет перестройки конфигурации ядер в процессе колебательной релаксации в первом возбужденном состоянии. Параметр анизотропии  $r_{b1}$  характеризует изменение угла  $\theta$  между дипольным моментом возбуждения и дипольным моментом флуоресценции за время колебательной релаксации, а  $r_{b2}$  характеризует конечный угол  $\theta_{trcl}$  между дипольным моментом возбуждения и дипольным моментом флуоресценции, когда процессы колебательной релаксации завершились.

## Глава 5. Фемтосекундная поляризационно-модуляционная спектроскопия "накачка-зондирование" и ее применение для исследования анизотропной колебательной релаксации в молекулах NADH

Сверхбыстрая спектроскопия поглощения из возбужденного состояния биологическими молекулами при их возбуждении фемтосекундными лазерными импульсами позволяет достичь ранее недоступного уровня понимания динамики внутри- и межмолекулярных взаимодействий. [45; 50; 54] Как уже было отмечено в Главе 1 особый интерес представляет исследование анизотропных процессов релаксации с субпикосекундным временным разрешением. Для регистрации этих процессов уже было разработано несколько экспериментальных схем, основанных на методе накачка-зондирование, в которых регистрировалась разница в поглощении ортогональных компонент поляризации зондирующего излучения [7; 44; 48].

Важной проблемой при регистрации сигналов линейного дихроизма методом накачка-зондирование  $\Delta I_{ab}(t) = I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$  является относительно малое отношение сигнал/шум, поскольку интенсивность зондирующего луча  $I_{pr}$ , проходящего через экспериментальный образец, обычно намного выше, чем изменение в поглощении ортогональных поляризационных компонент зондирующего излучения  $I_{\parallel}(t)$  и  $I_{\perp}(t)$ , а также чем их разность  $\Delta I_{ab}(t)$ . Из-за относительно высоких колебаний амплитуды излучения фемтосекундного лазера от импульса к импульсу, шумы в наблюдаемом сигнале поглощения из возбужденного состояния могут быть сравнимыми с интенсивностью этого сигнала. Поскольку сигнал поглощения из возбужденного состояния пропорционален концентрации поглощающих молекул и энергии лазерного импульса, в большинстве экспериментов по регистрации сигналов линейного дихроизма методом накачка-зондирование, либо использовались лазерные импульсы относительно высокой энергии в несколько десятков или сотен нДж и более (см., например, работы [152–155]), либо была реализована схема, в которой исследовались колебательные уровни основного состояния. [7; 104; 156–160]

В Главе 5 представлены результаты разработки и апробации нового метода поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование. Метод был разработан для регистрации сигналов линейного дихроизма много-

атомных молекул в растворах при очень низких энергиях импульсов накачки (несколько нДж) с субпикосекундным временным разрешением. Метод основан на высокочастотной модуляции поляризации последовательности импульсов накачки на частоте 100 кГц с помощью фотоупругого модулятора и последующим детектированием разницы в поглощении ортогональных компонент поляризации зондирующего излучения с использованием высокочувствительной балансной системы детектирования. 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 уже существующими методами наблюдения сигналов линейного дихроизма. Метод был апробирован для исследования быстрой анизотропной релаксации и вращательной диффузии в электронных возбужденных состояниях кофермента NADH в растворах различной вязкости и полярности.

Разработанный метод накачка-зондирование обладает временным разрешением на уровне десятых долей пикосекунды, что на порядок превышает временное разрешение широко-распространенного метода флуоресцентной время-разрешенной спектроскопии, а также обладает достаточно высокой спектральной и химической специфичностью. Таким образом открывается возможность его применения для дальнейшего развития неинвазивных методов молекулярно-прицельной диагностики биохимических процессов в режиме реального времени.

## **5.1 Метод поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование**

В разработанном методе поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование была реализована следующая схема возбуждения молекул. Для исследования использовалась двухцветная схема, в которой лазерный импульс накачки возбуждал электронные переходы в молекулах NADH на длине волны 360 нм, лежащей в полосе поглощения никотинамида, а зондирующие лазерные импульсы имели длину волны 720 нм и осуществляли пе-



переход молекул NADH в более высокоэнергетическое возбужденное состояние. Спектры поглощения (зеленая кривая) и флуоресценции (синяя кривая) NADH приведены на Рис. 5.1 а). На Рис. 5.1 а) также изображены импульс накачки (фиолетовый пик) и зондирующий импульс (красный пик). Схема возбуждения представлена на Рис. 5.1 б).

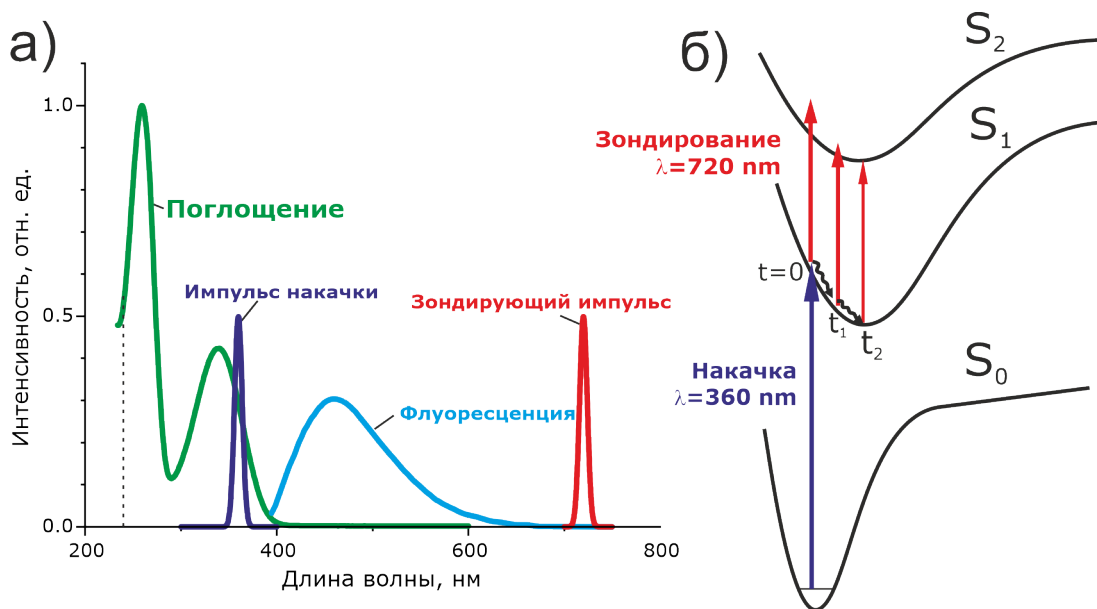


Рисунок 5.1 — а) Спектр поглощения (зеленая кривая) и спектр флуоресценции NADH (синяя кривая), импульс накачки (фиолетовый пик) и зондирующий импульс (красный пик); б) Схема электронных уровней молекулы NADH и переходы, возникающие при воздействии импульсов накачки и зондирующих импульсов:  $S_0$  - основное состояние,  $S_1$  и  $S_2$  - первое и второе возбужденные состояния, соответственно.

Полоса флуоресценции на Рис. 5.1 а) с максимумом в районе 460 нм обусловлена излучательными переходами в никотинамиде из первого возбужденного электронного состояния в основное электронное состояние. Узкие пики на Рис. 5.1 а) на длинах волн 360 и 720 нм представляют импульсы накачки и зондирования, соответственно, а вертикальная пунктирная линия указывает на максимальную доступную энергию, достигаемую при перекрытии импульсов накачки и зондирования во времени (при  $t=0$  на Рис. 5.1 б)). При временах задержки между импульсами  $t > 0$  возбужденная молекула стремится к равновесной ядерной конфигурации, то есть происходит колебательная релаксация в возбужденном состоянии  $S_1$ , как схематично показано на Рис. 5.1 б), и доступная энергия возбуждения из состояния  $S_1$  в состояние  $S_2$  смещается вниз. При воздействии зондирующих импульсов помимо перехода в более высокоэнер-

гетическое электронное состояние могут происходить и другие процессы [104]: вынужденная эмиссия или истощение основного состояния. В условиях настоящего эксперимента возможны только переходы в высокоэнергетическое электронное состояние, или так называемое поглощение из возбужденного состояния. Как видно на Рис. 5.1 а), энергии зондирующего импульса (длина волны 720 нм) недостаточно, чтобы осуществить переход из основного в первое возбужденное состояние, таким образом наблюдения истощения основного состояния невозможно. Кроме того, как видно на Рис. 5.1 а), зондирующий импульс располагается далеко за пределами полосы флуоресценции NADH, и поэтому вкладом стимулированного излучения можно пренебречь. Следовательно, в эксперименте реализуется только поглощение зондирующего пучка, что приводит к переходу из первого возбужденного состояния во второе возбужденное состояние NADH, как показано на Рис. 5.1 б).

Особенностью разработанного метода является то, что в нем была реализована модуляция поляризации излучения накачки и последующее детектирование разницы ортогональных поляризационных компонент прошедшего через возбужденный образец зондирующего излучения. Линейно поляризованный пучок накачки осуществлял резонансный переход молекул NADH из основного состояния в первое электронное возбужденное состояние. При воздействии линейно поляризованного излучения преимущественно возбуждались те молекулы, дипольные моменты перехода которых были ориентированы вдоль направления поляризации возбуждающего излучения. Таким образом импульс накачки приводил к выстраиванию молекулярных осей в возбужденном состоянии. Динамика релаксации этого анизотропного ансамбля молекул регистрировалась путем наблюдения линейного дихроизма зондирующего излучения, возникающего при переходе молекул из первого возбужденного состояния  $S_1$  во второе возбужденное состояние  $S_2$ . Геометрия эксперимента представлена на Рис. 5.2.

Импульсы накачки имели длительность около 100 фс и частоту повторения 80 МГц, зондирующие импульсы имели те же характеристики, но были задержаны относительно импульсов накачки на регулируемый интервал времени  $\Delta t$ . Лазерный луч накачки распространялся вдоль оси Z, при этом направление его поляризации периодически переключалось с вертикального (вдоль оси X) на горизонтальное (вдоль оси Y) с частотой  $\omega = 100$  кГц при помощи

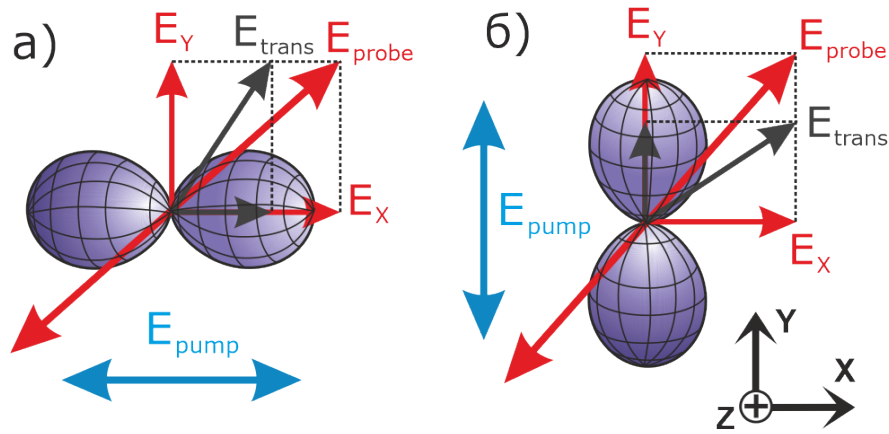


Рисунок 5.2 — Геометрия эксперимента: а) Поляризация излучения накачки ( $\mathbf{E}_{pump}$ ) направлена вдоль оси X б) Поляризация излучения накачки ( $\mathbf{E}_{pump}$ ) направлена вдоль оси Y. Поляризация зондирующего излучения ( $\mathbf{E}_{probe}$ ) была установлена под углом  $45^\circ$  к оси Y .

фотоупругого модулятора. Поляризацию излучения накачки при прохождении фотоупругого модулятора можно описать с помощью следующего выражения:

$$\mathbf{e}_{pu}(\tau) = \frac{1}{2} \left[ \mathbf{e}_X(1 + e^{i\varphi(\tau)}) + \mathbf{e}_Y(1 - e^{i\varphi(\tau)}) \right], \quad (5.1)$$

где  $\varphi(\tau) = \pi \sin\left(\frac{\omega}{2}\tau\right)$  – фазовый сдвиг, вносимый фотоупругим модулятором с частотой  $2\omega$ .

Зондирующий луч распространялся сонаправлено лучу накачки, а направление его поляризации было установлено под углом  $45^\circ$  к оси Y. Как показано на 5.2 а), при воздействии пучка накачки, поляризованного вдоль оси X, возбуждались преимущественно те молекулы, оси которых были выстроены вдоль направления поляризации пучка накачки (вдоль оси X) и X-компонента поляризации зондирующего луча поглощалась больше, чем Y-компонента. Аналогично, при возбуждении молекул светом, поляризованным вдоль оси Y (см. Рис. 5.2 б)), преимущественно поглощалась Y-компонента поляризации зондирующего луча. В результате этого интенсивности X и Y компонент поляризации зондирующего пучка, прошедшего через поглощающую кювету, осциллировали на частоте модуляции поляризации пучка накачки (100 кГц) с сдвигом по фазе  $\pi/2$  относительно друг друга. Другими словами, выстраивание молекулярных осей в возбужденном состоянии, создаваемое пучком накачки, приводило к различному поглощению компонент поляризации зондирующего пучка  $E_X$  и  $E_Y$ . Следовательно, поляризация зондирующего пучка, прошедшего через

экспериментальный образец, колебалась относительно своего исходного положения с частотой 100 кГц. Разностное поглощение ортогональных компонент поляризации зондирующего пучка  $\Delta I_{ab}(t)$  на частоте 100 кГц регистрировалось с помощью балансной схемы детектирования. Балансная схема детектирования была реализован следующим образом. Компоненты поляризации зондирующего пучка разделялись с помощью призмы Глана, а затем одновременно и независимо детектировались двумя кремниевыми фотодиодами. Далее электрические сигналы с фотодиода отправлялись на вход дифференциального интегратора с пропусканием 0–4 МГц, который осуществлял вычитание сигналов с двух фотодиодов и подавлял высокочастотные шумы, связанные с дрожанием интенсивности лазера от импульса к импульсу. С учетом геометрии эксперимента полученный разностный сигнал с выхода дифференциального интегратора  $\Delta I_{ab}(t)$  был пропорционален произведению разности коэффициентов поглощения ортогональных поляризационных компонент зондирующего пучка ( $k_{\parallel} - k_{\perp}$ ) и косинусу фазового сдвига фотоупругого модулятора:

$$\Delta I_{ab}(t, \tau) = -\frac{I_0 L}{2} (k_{\parallel}(t) - k_{\perp}(t)) \cos \varphi(\tau), \quad (5.2)$$

где  $t$  – время задержки между импульсами накачки и зондирования,  $I_0$  – интенсивность зондирующего излучения до прохождения через образец и  $L$  – длина кюветы.

Были предприняты значительные усилия для достижения максимально возможной чувствительности метода. Особенности реализации метода были: высокая частота модуляции поляризации последовательности импульсов накачки (100 кГц), разделение анизотропного вклада в сигнал поглощения зондирующего излучения с использованием высокочувствительной балансной системы детектирования, состоящей из дифференциального интегратора и синхронного усилителя, регистрирующего изменение поглощения  $I_{ab}(t)$  на частоте модуляции 100 кГц в диапазоне пропускания частот несколько Гц. На Рис. 5.3 представлена упрощенная схема экспериментальной установки.

В качестве источника излучения использовался фемтосекундный Ti:Sapphire лазер (Mai Tai HP, Spectra Physics), перестраиваемый в спектральном диапазоне 690-1000 нм. Длительность лазерного импульса составляла около 100 фс с частотой следования 80 МГц. Излучение накачки на длинах волн 360-400 нм было получено путем генерации второй гармоники (Inspire

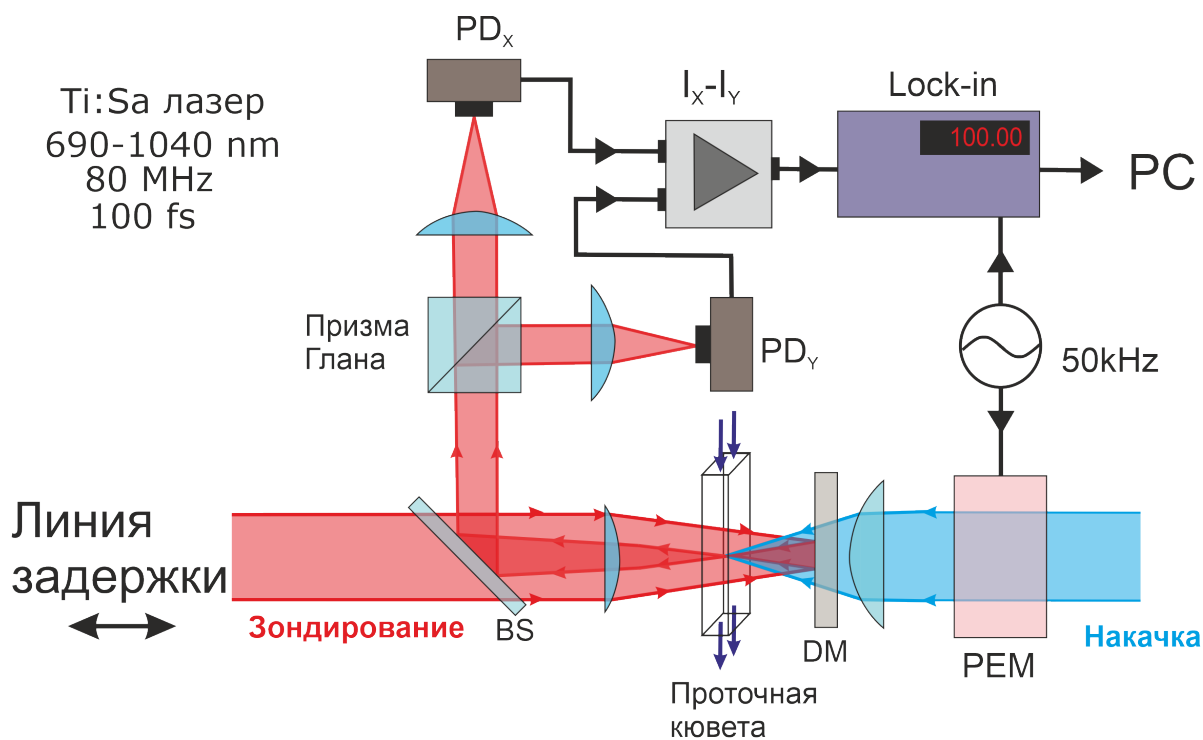


Рисунок 5.3 — Схема экспериментальной установки: BS - делитель пучка, PEM - фотоупругий модулятор, DM - дихроичное зеркало, PD - фотодиоды, Lock-in - синхронный усилитель, PC – компьютер.

Blue, Физика спектров). Далее луч накачки проходил через фотоупругий модулятор (PEM) (PEM-100, Hinds Instruments), работавший на частоте 50 кГц, который периодически переключал направление плоскости поляризации последовательности импульсов накачки с вертикального (Y) на горизонтальное (X) с частотой 100 кГц. После прохождения модулятора луч накачки, проходя через дихроичное зеркало (DM), фокусировался линзой в центр кварцевой кюветы с длиной 1 мм. Для предотвращения фотообесцвечивания молекул NADH осуществлялась циркуляция раствора с помощью перистальтического насоса со скоростью потока 0.2 м/с. Энергия импульсов накачки составила около 2 нДж.

Основное излучение лазера на длине волны 720-800 нм использовалось в качестве зондирующего луча. Плоскость поляризации зондирующего излучения была зафиксирована под углом  $45^\circ$  к оси Y с помощью полуволновой фазовой пластинки. Как показано на Рис. 5.3, зондирующий луч проходил через оптическую линию задержки, далее проходил через фокусирующую линзу и кювету с раствором, а затем отражался обратно от дихроичного зеркала (DM). Как видно из Рис. 5.3, зондирующий луч был сфокусирован в центре кюветы только

после отражения от дихроичного зеркала (DM), а фокальные области накачки и зондирующего излучения значительно перекрывались только тогда, когда зондирующий луч отражался обратно от дихроичного зеркала. Таким образом оба луча взаимодействовали с молекулами только при коллинеарном сонаправленном распространении. Энергия зондирующих импульсов на кювете составила около 0.5 нДж.

Зондирующий луч, проходя через кювету, отражался от делителя пучка (BS) и затем направлялся в канал регистрации. В канале регистрации две ортогональные компоненты поляризации зондирующего излучения  $I_X$  и  $I_Y$  разделялись с помощью призмы Глана. Чтобы избежать попадания излучения накачки в канал регистрации использовалась система фильтрации, состоящая из дихроичного зеркала и поглощающего фильтра. Компоненты поляризации зондирующего пучка  $I_X$  и  $I_Y$  регистрировались с помощью балансной системы детектирования, состоящей из двух идентичных кремниевых фотодиодов (SPD) (DET10A/M, ThorLabs) и дифференциального интегратора (DI) с полосой пропускания 0–4 МГц. Схема была настроена таким образом, чтобы иметь нулевой выходной разностный сигнал, при отсутствии воздействия импульсов накачки. Разностные сигналы с выхода дифференциального интегратора  $\Delta I_{ab}(t) = I_X(t) - I_Y(t)$  с амплитудной модуляцией на частоте 100 кГц выделялись с помощью синхронного усилителя (LOCK-IN) (SR844 RF, Stanford Instruments) с узкой полосой частот порядка 3 Гц.

## 5.2 Сигналы линейного дихроизма NADH и их анализ

Экспериментальный сигнал разностного поглощения ортогональных поляризационных компонент зондирующего излучения  $I_X(t) - I_Y(t)$  для водного раствора NADH представлен на Рис. 5.4.

Как видно из Рис. 5.4, сигнал содержит высокий узкий пик при относительно коротких временах задержки, меньших, чем 1 пс, и гораздо более широкий несимметричный максимум при более длительных временах задержки. На вставке к Рис. 5.4 узкий максимум показан в увеличенном масштабе. Подобный пик проявлялся в сигнале при наблюдении чистой воды или водных растворов

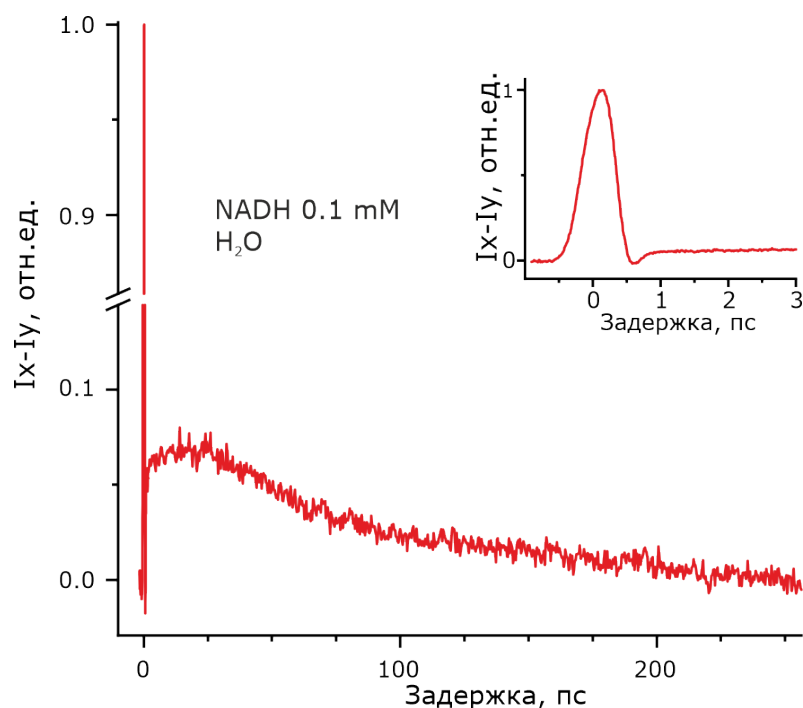


Рисунок 5.4 — Экспериментальный сигнал разностного поглощения ортогональных компонент поляризации зондирующего излучения для водного раствора NADH.

этанола, при этом широкий пик на более длительных временах задержки в отсутствие NADH не наблюдался. Узкий интенсивный пик отражает сложные многофотонные нелинейные процессы, происходящие в растворе во время перекрытия импульсов накачки и зондирования. Описание природы этого узкого пика выходит за рамки настоящей работы и далее обсуждаться не будет. При более длительных временах задержки (более 2 пс) широкий затухающий сигнал на Рис. 5.4 представляет собой сигнал линейного дихроизма NADH и отражает динамику анизотропной колебательной и вращательной релаксации молекул NADH в возбужденном состоянии. Последующие разделы настоящей Главы посвящены анализу этого сигнала,

Для доказательства резонансного поведения сигнала линейного дихроизма NADH были проведены измерения зависимости максимума амплитуды сигнала  $\Delta I_{ab}(t)$  от длины волны накачивающего и зондирующего излучения, а также от мощности излучения накачки. Результаты измерений представлены на Рис. 5.5 а) и б).

Как видно из Рис. 5.5 а), при средней мощности излучения накачки до 120 мВт амплитуда сигнала растет линейно, как и ожидалось для однофотонного поглощения, и только при более высоких мощностях сигнал отклоняется

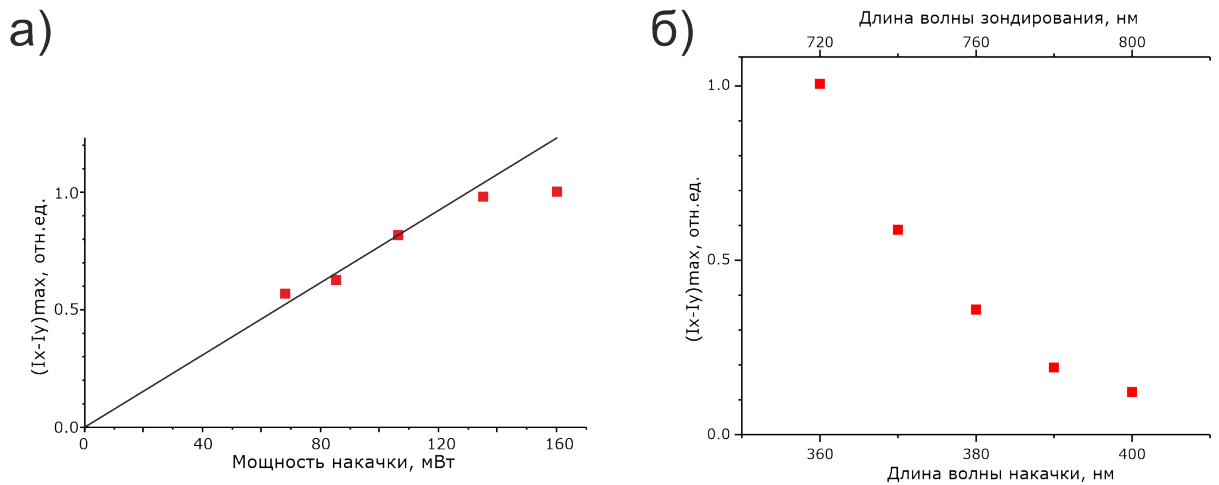


Рисунок 5.5 — Максимум интенсивности сигнала линейного дихроизма NADH в зависимости от а) средней мощности излучения накачки и б) длины волны накачивающего и зондирующего излучения.

от линейного поведения и выходит на насыщение. Как видно на Рис. 5.5 б), амплитуда сигнала резко уменьшается при увеличении длины волны луча накачки с 360 нм до 400 нм. Это наблюдение хорошо согласуется со схемой резонансного возбуждения на Рис. 5.1 б) и полосой поглощения NADH, показанной на Рис. 5.1 б).

Анализ сигналов линейного дихроизма NADH проводился на основе теоретической модели, подробно описанной в работе [A3]. Основные выражения, использованные для построения модели приведены в Приложении В.2. Согласно этой модели сигнал линейного дихроизма NADH был представлен с помощью выражения, в котором были разделены процессы анизотропной колебательной релаксации, вращательной диффузии и изотропные процессы уменьшения населенности возбужденного состояния:

$$\Delta I_{ab}(t) = [A_1 + (A_0 - A_1) e^{-t/\tau_v}] e^{-t/\tau_r} w(t), \quad (5.3)$$

где  $\tau_v$  – время анизотропной колебательной релаксации,  $\tau_r$  – время вращательной диффузии,  $A_0$  и  $A_1$  – предэкспоненциальные коэффициенты.

Функция  $w(t)$  в выражении 5.3 характеризует уменьшение населенности первого возбужденного состояния NADH:

$$w(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}, \quad (5.4)$$



где  $\tau_1$  и  $\tau_2$  – времена затухания флуоресценции NADH, а  $a_1$  и  $a_2$  их вклады в сигнал. При этом, параметры  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и их вклады в сигнал  $a_1$  и  $a_2$  были определены независимо в экспериментах по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции NADH методом TCSPC (см. Главу 2). Экспериментальные значения времен затухания флуоресценции  $\tau_1$  и  $\tau_2$  и соотношение весовых коэффициентов  $a_2/a_1$  представлены в Таблице 8.

Поскольку шум в экспериментальном сигнале можно рассматривать как аддитивный гауссов шум с равной дисперсией, то для нахождения подгоночных параметров  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $\tau_v$  и  $\tau_r$  была использована стандартная функция суммы квадратов отклонений  $\Phi = \sum_i (\Delta I_{ab}(t_i) - (\Delta I_{ab})_i)^2$ . Для решения задачи нелинейной оптимизации (поиска минимума целевой функции) был алгоритм дифференциальной эволюции, реализованный в библиотеке *SciPi*.

В результате аппроксимации экспериментальных сигналов были определены время анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$ , время вращательной диффузии  $\tau_r$  и коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  в зависимости от концентрации этанола.

Таблица 8 — Времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , и отношение весовых коэффициентов  $a_2/a_1$  в растворах вода–этанол различной концентрации. Параметры были получены из экспериментов по наблюдению затухания поляризованной флуоресценции NADH методом TCSPC (см. Главу 2).

EtOH, % vol	$\tau_1$ , пс	$\tau_2$ , пс	$a_2/a_1$
0 %	$230 \pm 40$	$590 \pm 50$	$0.34 \pm 0.02$
16 %	$245 \pm 35$	$600 \pm 40$	$0.38 \pm 0.02$
27%	$280 \pm 30$	$680 \pm 40$	$0.31 \pm 0.01$
45%	$280 \pm 20$	$670 \pm 10$	$0.43 \pm 0.03$
64%	$300 \pm 30$	$720 \pm 30$	$0.48 \pm 0.07$
92%	$300 \pm 30$	$830 \pm 20$	$0.71 \pm 0.14$

### 5.3 Полученные экспериментальные результаты

Экспериментальные сигналы линейного дихроизма NADH, зарегистрированные при различных концентрациях этанола при временах задержки более 5 пс, представлены на Рис. 5.6, где точки представляют собой экспериментальные данные, а сплошные линии – результат аппроксимации.

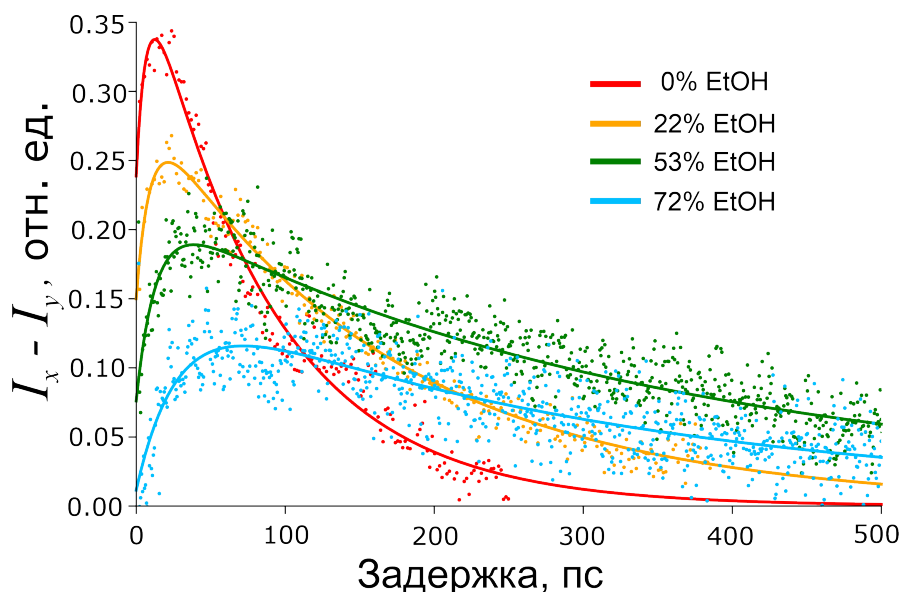


Рисунок 5.6 — Экспериментальные сигналы линейного дихроизма NADH при различных концентрациях этанола в растворе. Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – результат аппроксимации.

Как видно из Рис. 5.6 при увеличении концентрации этанола в растворе максимум сигнала сдвигается в сторону более длительных времен задержки, а скорость затухания хвоста значительно уменьшается. Такое поведение сигналов при увеличении концентрации этанола в растворе связано с увеличением характерных времен анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  и вращательной диффузии  $\tau_r$ . Параметры, полученные в результате анализа сигналов на Рис. 5.6 с помощью выражения 5.3, представлены на Рис. 5.7 и 5.8.

Как видно на Рис. 5.7 а), время анизотропной колебательной релаксации увеличивается линейно при увеличении концентрацией этанола в растворе в пределах экспериментальных погрешностей. Было получено, что время вращательной диффузии, полученное методом накачка-зондирование и представленное синими точками на Рис. 5.7 б), согласуется с данными, полученными методом TCSPC (оранжевые точки), в пределах погрешности эксперимента.

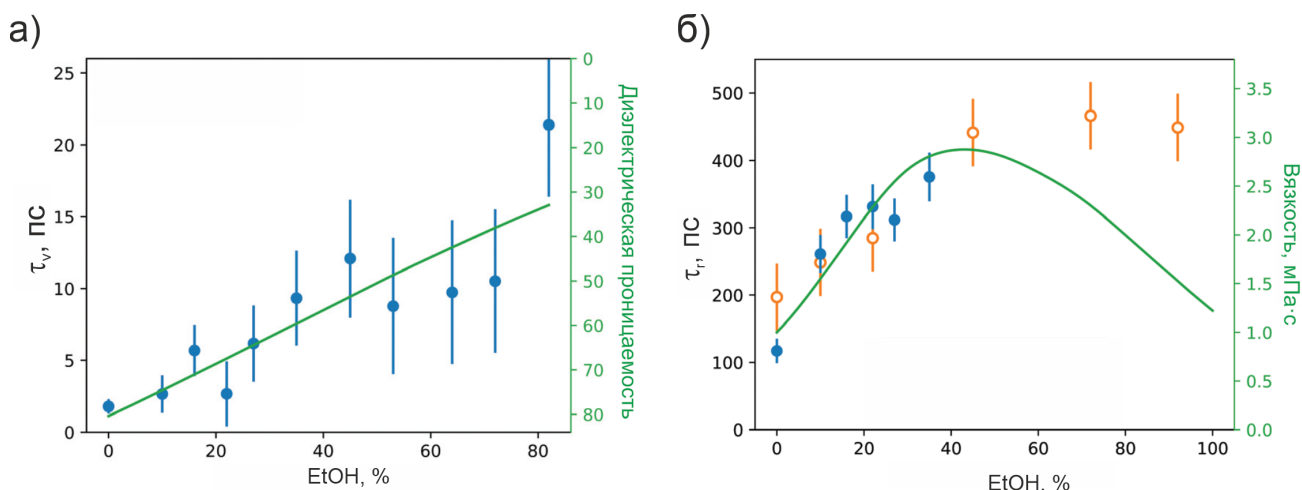


Рисунок 5.7 — а) Время анизотропной колебательной релаксации (синие точки) в зависимости от концентрации этанола в растворе, зеленая сплошная линия – вязкость водных растворов этанола; б) Время вращательной диффузии в зависимости от концентрации этанола в растворе, полученное: синие точки – методом накачка-зондирование, оранжевые точки – методом TCSPC, зеленая сплошная линия – вязкость водных растворов этанола.

Как показано на Рис. 5.8, коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  линейно уменьшаются при увеличении концентрации этанола в растворе в пределах экспериментальных погрешностей. Было получено, что коэффициент  $A_1$  при концентрации этанола порядка 93 % меняет свой знак, а коэффициент  $A_0$  переходит через 0 при 50 % этанола в растворе.

#### 5.4 Анизотропные процессы релаксации в возбужденном состоянии NADH

Для интерпретации полученных данных была разработана квантовомеханическая модель, основанная на формализме неприводимых сферических тензоров. В рамках модели рассмотрен общий случай возбуждения ансамбля молекул типа асимметричного волчка двумя короткими лазерными импульсами [A3]. Временную зависимость сигналов линейного дихроизма можно объяснить на основе выражений В.7-В.9 и В.12-В.13, представленных в Приложении В.2. Согласно уравнению В.12 вклад от процессов вращательной диффузии всегда приводит к уменьшению интенсивности сигнала со временем, в то время как

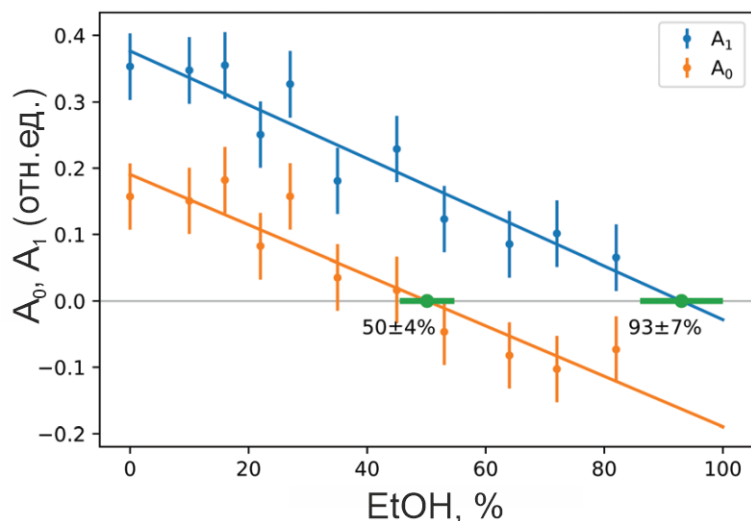


Рисунок 5.8 — Весовые коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  в зависимости от концентрации этанола в растворе.

уравнение В.14 предполагает, что вклад анизотропной колебательной релаксации может привести как к увеличению, так и к уменьшению интенсивности в зависимости от знака разницы предэкспоненциальных коэффициентов  $A_0 - A_1$ . Как видно на Рис. 5.6, интенсивность сигнала возрастала при малых временах задержки, поскольку  $A_0$  было всегда больше  $A_1$  (см. Рис. 5.8), что соответствует условию  $(A_0 - A_1) < 0$  в уравнении В.14.

Согласно уравнениям В.13 и В.14, коэффициент  $A_0 = R_2^{pr}(t)|_{t=0}$  характеризует угол  $\theta$  между дипольным моментом перехода  $\mathbf{d}^{(pu)}$  между состояниями  $S_0 \rightarrow S_1$  и дипольным моментом перехода  $\mathbf{d}^{(pr)}$  между состояниями  $S_1 \rightarrow S_2$  в начальный момент времени после воздействия импульса накачки  $t = 0$ , как показано на Рис. 5.5 б), а коэффициент  $A_1 = R_2^{pr}(t)|_{t \rightarrow \infty}$  характеризует угол  $\theta$  в конце процесса колебательной релаксации в возбужденном состоянии NADH ( $t \gg \tau_{vib}$ ). При этом, согласно уравнению В.8, параметры  $A_1$  и  $A_2$  зависят от интегралов перекрытия электронно-колебательных волновых функций  $S_1$  и  $S_2$ . В ходе колебательной релаксации ядерная конфигурация NADH в возбужденном состоянии переходит в новое положение равновесия, схематически обозначенное как минимум сечения потенциальной поверхности на Рис. 5.5 б). Согласно приближению Борна-Оппенгеймера в процессе возбуждения ядра молекулы не успевают перестроиться, поэтому момент времени  $t = 0$  относится к конфигурации ядер в основном равновесном состоянии, а момент окончания процессов колебательной релаксации  $t \gg \tau_{vib}$   $A_1$  относится к равновесной конфигурации ядер NADH в первом возбужденном состоянии.

Как показано на Рис. 5.8, коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  линейно уменьшались при увеличении концентрации этанола в растворе в пределах погрешности и при определенных концентрациях этанола меняли свой знак. Этот результат может быть интерпретирован с использованием двух сценариев, которые могут дополнять друг друга: (1) угол  $\theta$  между дипольными моментами перехода  $\mathbf{d}^{(pu)}$  и  $\mathbf{d}^{(pr)}$  больше в момент времени  $t = 0$ , чем в момент времени  $t = t \rightarrow \infty$  и/или (2) интегралы перекрытия электронно-колебательных состояний и/или модули дипольных моментов  $\mathbf{d}^{(pu)}$  и  $\mathbf{d}^{(pr)}$  в уравнениях В.8 и В.9 больше для переходов, индуцированных зондирующими импульсами, чем для переходов, индуцированных импульсами накачки. Разделение механизмов (1) и (2) не выходит в рамки настоящей работы и требует дополнительных вычислений методами квантовой химии. В настоящей работе была применена упрощенная модель, в рамках которой предполагается, что отрицательный знак разности  $A_0 - A_1$  в основном обусловлен тем, что интегралы перекрытия, характеризующие коэффициент  $A_0$ , были меньше, чем интегралы перекрытия, характеризующие коэффициент  $A_1$ , и что коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  зависят главным образом от угла  $\theta$  между дипольными моментами перехода  $\mathbf{d}^{(pu)}$  и  $\mathbf{d}^{(pr)}$ .

Согласно уравнению В.14, коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  могут в целом иметь либо положительные, либо отрицательные значения в диапазоне  $1 \geq A_{0,1} \geq -1/2$ , где максимальное значение  $A_{0,1} = 1$  относится к случаю, когда дипольные моменты переходов  $\mathbf{d}^{(pu)}$  и  $\mathbf{d}^{(pr)}$  параллельны друг другу, и минимальное значение  $A_{0,1} = -1/2$  относится к случаю, когда эти дипольные моменты перпендикулярны друг другу. На основании этого предположения был проведен анализ зависимости  $A_0$  и  $A_1$  от концентрации этанола в растворе: линейное уменьшение обоих коэффициентов связано с тем, что угол  $\theta$  увеличивается с увеличением концентрации этанола за счет изменения электронной конфигурации молекул NADH в возбужденном состоянии.

Согласно уравнениям В.13 и В.14, время  $\tau_v$  характеризует скорость поворота дипольного момента перехода из  $S_1$  в  $S_2$  в процессе колебательной релаксации в первом возбужденном состоянии NADH. Как видно на Рис. 5.7 а), время анизотропной колебательной релаксации увеличивалось линейно при увеличении концентрации этанола в растворе в пределах экспериментальных погрешностей. Это увеличение может быть объяснено взаимодействием молекул NADH в возбужденном состоянии с окружающими молекулами раствора. Вода является

более полярным растворителем, чем этанол, таким образом эффективное электростатическое поле, наведенное окружающими молекулами воды, оказывается сильнее чем в случае этанола. Это приводит к тому, что в чистом водном растворе возмущения возбужденных молекул NADH внешним полем оказываются сильнее, соответственно скорость процессов колебательной релаксации растет. Диэлектрическая проницаемость растворов вода–этанол [161] показана на Рис. 5.7 а) сплошной зеленой линией в обратном масштабе. Как видно на Рис. 5.7 а), время анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  обратно пропорционально диэлектрической проницаемости раствора в пределах экспериментальных погрешностей. Это предположение также подтверждается *ab initio* расчетами структуры NADH в условиях различной диэлектрической проницаемости, результаты которых были представлены и подробно обсуждались в Главе 4. Было получено, что при уменьшении диэлектрической проницаемости раствора меняется распределение зарядов на никотинамиде, особенно заряд на атоме кислорода амидной группы (см. Рис. 4.5), что приводит к изменению скорости безызлучательных процессов релаксации.

Время вращательной диффузии  $\tau_r$  характеризует вращение молекул NADH в возбужденном состоянии, которое происходит при взаимодействии с молекулами растворителя. На Рис. 5.7 б) представлено время вращательной диффузии, полученное методом накачка - зондирование (синие кружки), и время вращательной диффузии, полученное методом поляризационной флуоресцентной спектроскопии (оранжевые кружки). В отличие от времени анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$ , зависимость времени вращательной диффузии  $\tau_r$  от концентрации этанола имела нелинейный характер. Согласно результатам, приведенным в Главе 2, время вращательной диффузии NADH в водных растворах метанола зависело как от вязкости раствора, так и от относительной концентрации сложенных конформаций NADH. Как показано на Рис. 5.7 б), время вращательной диффузии при концентрациях этанола в растворе менее 40 % пропорционально вязкости раствора (зеленая кривая). При концентрациях выше 40 %, время вращательной диффузии также было пропорционально вязкости, однако значение этого времени было выше оценочного для данных значений вязкости, что объясняется значительным увеличением относительной концентрации развернутых конформаций NADH. Расчет относительного коли-

чества сложенных конформаций NADH подробно описан в Приложении А, результаты расчета для водных растворов метанола приведены Главе 2.

## 5.5 Краткие итоги

1. Разработан новый метод исследования динамики возбужденных состояний биологических молекул, основанный на схеме накачка-зондирование, с модуляцией поляризации пучка накачки и применением балансной системы детектирования для регистрации сигналов разностного поглощения ортогональных компонент поляризации зондирующего излучения  $\Delta I_{ab}(t) = I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$ .
2. Разработанный метод позволил достигнуть высокого временного разрешения порядка 300 фс и высокой чувствительности. В результате впервые были получены сигналы линейного дихроизма при энергии импульсов накачки порядка 1 нДЖ. Метод был применен для исследования линейного дихроизма NADH в водных растворах этанола различной концентрации.
3. В результате анализа сигналов линейного дихроизма NADH были определены время анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$ , лежавшее в диапазоне от 2 до 30 пс, и время вращательной диффузии  $\tau_r$ , лежавшее в диапазоне от 150 до 500 пс. При этом время вращательной диффузии, полученное из экспериментов методом накачка-зондирование, хорошо согласуется со значением времени вращательной диффузии, полученного из экспериментов по исследованию поляризованной флуоресценции NADH.
4. Обнаружено, что время анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  увеличивается линейно при увеличении концентрации этанола в растворе. Показано, что увеличению времени анизотропной колебательной релаксации происходит за счет изменения полярности водных растворов этанола.
5. Обнаружено, что время вращательной диффузии  $\tau_r$  имеет нелинейную зависимость от концентрации этанола в растворе. Показано, что время

- вращательной диффузии чувствительно к изменению вязкости раствора и относительной концентрации сложенных и развернутых конформаций NADH.
6. Обнаружена зависимость коэффициентов  $A_0$  и  $A_1$  от концентрации этанола в растворе, а именно оба коэффициента линейно уменьшались при увеличении концентрации этанола в растворе в пределах погрешности эксперимента и при концентрациях этанола 50% и 93% меняли свой знак.
  7. Интерпретация времени анизотропной колебательной релаксации  $\tau_v$  и коэффициентов  $A_0$  и  $A_1$  была проведена с помощью теоретической модели, основанной на формализме неприводимых сферических тензоров. Согласно этой модели время анизотропной колебательной релаксации обусловлено поворотом дипольного момента перехода из  $S_1$  в  $S_2$  за счет перестройки ядерной конфигурации NADH в процессе колебательной релаксации. В свою очередь коэффициенты  $A_0$  и  $A_1$  характеризуют угол между дипольным моментом перехода  $S_0 \rightarrow S_1$  и дипольным моментом перехода  $S_1 \rightarrow S_2$  в начальный момент времени  $t=0$  и при достижении равновесной ядерной конфигурации в первом возбужденном состоянии NADH, соответственно.

Времена затухания анизотропной релаксации и вращательной диффузии, которые были определены методом поляризационно-модуляционной спектроскопии накачка-зондирование, имеют большое значение для понимания сложных биохимических процессов в живых клетках и тканях. Например, время вращательной диффузии  $\tau_r$  при определенных условиях пропорционально вязкости раствора и, следовательно, может быть использовано для определения локальной внутриклеточной и внеклеточной вязкости. [158] Более того, параметры анизотропии поглощения  $A_0$  и  $A_1$  и время анизотропной колебательной релаксации чувствительны к изменению условий микроокружения, что в целом можно использовать для исследований локализации различных биологических молекул внутри клетки. В свою очередь это открывает большую перспективу в разработке неинвазивного метода диагностики клеточного метаболизма.[3]



## Заключение

Основные результаты работы заключаются в следующем.

1. Были определены времена затухания флуоресценции NADH  $\tau_1$  и  $\tau_2$  в водных растворах этанола, метанола и пропиленгликоля различной концентрации. Обнаружено, что эти времена увеличиваются, при увеличении концентрации спиртов в растворе. При этом вклад времени  $\tau_2$  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 скорость процессов безызлучательной релаксации в возбужденном состоянии NADH.
3. На основе модели Эйнштейна-Стокса был проведен анализ зависимости времени вращательной диффузии NADH  $\tau_r$  от концентрации метанола в растворе. Разработан принципиально новый метод определения относительного количества сложенных и развернутых конформации NADH, который основан на измерении времен вращательной диффузии NADH. Показано, что изменение конформационного состава NADH при изменении свойств растворителя обуславливает увеличение  $\tau_r$  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  $\tau_v$  в первом возбужденном состоянии NADH в водных растворах этанола различной концентрации. Был обнаружен линейный рост  $\tau_v$  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 Polarization Modulation 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., Bezverkhonii 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., Bezverkhonii 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., Krasnopevtceva 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 сокращений и условных обозначений

**NADH** - Никотинамид аденин динуклеотид восстановленный

**NA** - Никотинамид

**AD** - Аденин

**OPE** - Однофотонное возбуждение

**TPE** - Двухфотонное возбуждение

**TCSPC** - Время-корреляционная система счета фотонов

**FLIM** - Флуоресцентная время-разрешенная микроскопия

**TDM** - Дипольный момент перехода

**PEM** - Фотоупругий модулятор

**PES** - Поверхности потенциальной энергии

## Список литературы

1. Многофотонная микроскопия с эндогенным контрастом: природа флуорофоров 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 pump–probe measurements of electronic motion via a conical intersection / D. A. Farrow [et al.] // J. Chem. Phys. — 2008. — Vol. 128. — P. 144510.
8. 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.
9. Principles of fluorescence spectroscopy / ed. by J. R. Lakowicz. — Third. — Springer, 2006. — P. 954.

10. Time-Resolved Spectroscopy: Instrumentation and Applications / F. Ariese [et al.] // Encyclopedia of Analytical Chemistry. — 2017. — P. 1–55.
11. Modern Spectroscopy / ed. by M. J. Hollas. — Fourth. — John Wiley, Sons Ltd, 2004.
12. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering / ed. by P. Vasa, D. Mathur. — Springer, 2016.
13. *Hamilton G., Sanabria H.* Multiparameter fluorescence spectroscopy of single molecules // Spectroscopy and Dynamics of Single Molecules Methods and Applications. — Elsevier, 2019. — Chap. 6. P. 269–333.
14. Modern Optical Spectroscopy With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry / ed. by W. W. Parson. — Second. — Springer, 2015.
15. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples / C. Wurth [et al.] // Nature Protocols. — 2013. — Vol. 8, no. 8. — P. 1535–1550.
16. *Weber G.* Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent // The Biochemical journal. — 1952. — Vol. 51, no. 2. — P. 155–167.
17. Fluorescence Lifetime Spectroscopy And Imaging Principles and Applications in Biomedical Diagnostics / ed. by L. Marcu, P. M. W. French, D. S. Elson. — CRC PressTaylor, Francis Group, 2015.
18. 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.
19. *Kumar V., Schlucker S., Hasselbrink E.* Ultrafast time-resolved molecular spectroscopy. — Elsevier, 2020. — P. 563–594.
20. *Ranawat H., Pal S., Mazumder N.* Recent trends in two-photon auto-fluorescence lifetime imaging (2P-FLIM) and its biomedical applications // Biomedical Engineering Letters. — 2019. — Vol. 9, no. 3. — P. 293–310.

21. *Jameson D. M., Hazlett T. L.* Time-Resolved Fluorescence in Biology and Biochemistry // Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy / ed. by T. G. Dewey. — Boston, MA : Springer US, 1991. — P. 105–133.
22. *Becker W., Stiel H., Klose E.* Flexible instrument for time-correlated single-photon counting // Review of Scientific Instruments. — 1991. — Vol. 62, no. 12. — P. 2991–2996.
23. *Yguerabide J.* Nanosecond Fluorescence Spectroscopy of Macromolecules // Methods Enzymol. — 1972. — Vol. 26. — P. 498–578.
24. *Grauw C. J. D., Gerritsen H. C.* Multiple Time-Gate Module for Fluorescence Lifetime Imaging // Applied Spectroscopy. — 2001. — Vol. 55, no. 6.
25. Fast fluorescence lifetime imaging techniques: A review on challenge and development / X. Liu [et al.] // Journal of Innovative Optical Health Sciences. — 2019. — Vol. 12, no. 5.
26. *Gratton E.* Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods // Journal of Biomedical Optics. — 2003. — Vol. 8, no. 3. — P. 381.
27. Rapid frequency-domain flim spinning disk confocal microscope: Lifetime resolution, image improvement and wavelet analysis / C. Buranachai [et al.] // Journal of Fluorescence. — 2008. — Vol. 18, no. 5. — P. 929–942.
28. *Xu J., Knutson J. R.* Ultrafast Fluorescence Spectroscopy via Upconversion. Applications to Biophysics // Methods in Enzymology. — 2008. — Vol. 450. — P. 159–183.
29. Ultrafast Fluorescence Spectroscopy via Upconversion and Its Applications in Biophysics / S. Cao [et al.] // Molecules. — 2021. — Vol. 26, no. 1. — P. 1–13.
30. Advanced Photon Counting / ed. by P. Kapusta, M. Wahl, R. Erdmann. — Springer, 2015.
31. *Chosrowjan H., Taniguchi S., Tanaka F.* Ultrafast fluorescence upconversion technique and its applications to proteins // FEBS Journal. — 2015. — Vol. 282, no. 16. — P. 3003–3015.

32. *Hartveit E.* Multiphoton Microscopy / ed. by E. Hartveit. — 1st ed. — Humana New York, NY, 2019.
33. *Xu C., Webb W. W.* Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm // J. Opt. Soc. Am. B. — 1996. — Vol. 13, no. 3.
34. One- and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins / A. Volkmer [et al.] // Biophysical Journal. — 2000. — Vol. 78, no. 3. — P. 1589–1598.
35. *Sarder P., Maji D., Achilefu S.* Molecular Probes for Fluorescence Lifetime Imaging // Bioconjugate Chemistry. — 2015. — Vol. 26, no. 6. — P. 963–974.
36. Two-color two-photon excitation using femtosecond laser pulses / S. Quentmeier [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2008. — Vol. 112, no. 18. — P. 5768–5773.
37. *Nandy T., Mondal S., Singh P. C.* Fluorine induced conformational switching and modulation in photophysical properties of 7-fluorotryptophan: Spectroscopic, quantum chemical calculation and molecular dynamics simulation studies // Journal of Photochemistry and Photobiology. — 2020. — Vol. 3/4. — P. 100011.
38. Time-resolved Fluorescence Spectra of Arterial Fluorescent Compounds: Reconstruction with the Laguerre Expansion Technique / J.-M. I. Maarek [et al.] // Photochemistry and Photobiology. — 2000. — Vol. 71, no. 2. — P. 178.
39. *Zewail A. H.* Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond using ultrafast lasers (Nobel lecture) // Angewandte Chemie - International Edition. — 2000. — Vol. 39, no. 15. — P. 2586–2631.
40. *Zewail A. H.* Laser Femtochemistry // Science. — 1988. — Vol. 242, no. 4886. — P. 1645–1653.
41. *Cannizzo A.* Ultrafast UV spectroscopy: From a local to a global view of dynamical processes in macromolecules // Physical Chemistry Chemical Physics. — 2012. — Vol. 14, no. 32. — P. 11205–11223.



42. Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution / T. Kumpulainen [et al.] // *Chemical Reviews*. — 2017. — Vol. 117, no. 16. — P. 10826–10939.
43. Invited Review Article: Pump-probe microscopy / M. C. Fischer [et al.] // *Review of Scientific Instruments*. — 2016. — Vol. 87, no. 3.
44. Generalized magic angle for time-resolved spectroscopy with laser pulses of arbitrary ellipticity / S. Schott [et al.] // *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*. — 2014. — Vol. 47, no. 12.
45. *Wei L., Min W.* Pump-probe optical microscopy for imaging nonfluorescent chromophores // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2012. — Vol. 403, no. 8. — P. 2197–2202.
46. Transient absorption microscopy: Advances in chemical imaging of photoinduced dynamics / D. Davydova [et al.] // *Laser and Photonics Reviews*. — 2016. — Vol. 10, no. 1. — P. 62–81.
47. *Gao B., Hartland G. V., Huang L.* Transient absorption spectroscopy of excitons in an individual suspended metallic carbon nanotube // *Journal of Physical Chemistry Letters*. — 2013. — Vol. 4, no. 18. — P. 3050–3055.
48. *Berera R., Grondelle R. van, Kennis J. T.* Ultrafast transient absorption spectroscopy: Principles and application to photosynthetic systems // *Photosynthesis Research*. — 2009. — Vol. 101, no. 2/3. — P. 105–118.
49. Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy / W. Min [et al.] // *Nature*. — 2009. — Vol. 461, no. 7267. — P. 1105–1109.
50. *Dong P.-T., Cheng J.-X.* Pump-Probe Microscopy: Theory, Instrumentation, and Applications // *Spectroscopy*. — 2017. — Vol. 32, no. 4.
51. Direct structural observation of ultrafast photoisomerization dynamics in sinapate esters / T. T. Abiola [et al.] // *Communications Chemistry*. — 2022. — Vol. 5, no. 1.
52. The First Step in Vision: Femtosecond Isomerization of Rhodopsin / R. Schoenlein [et al.] // *Science*. — 1991. — Vol. 254. — P. 412–415.
53. Femtosecond Time-Resolved UV-Visible Absorption Spectroscopy of trans-Azobenzene in Solution / I. K. Lednev [et al.]. — 1996.

54. Photoisomerization dynamics and pathways of trans - and cis -azobenzene in solution from broadband femtosecond spectroscopies and calculations / M. Quick [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2014. — Vol. 118, no. 29. — P. 8756–8771.
55. Photoisomerization and relaxation dynamics of a structurally modified biomimetic photoswitch / A. D. Dunkelberger [и др.] // Journal of Physical Chemistry A. — 2012. — т. 116, № 14. — с. 3527–3533.
56. *Zhong D., Zewail A. H.* Femtosecond dynamics of flavoproteins: Charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme // PNAS. — 2001. — Vol. 98, no. 21. — P. 11867–11872.
57. Biological water: Femtosecond dynamics of macromolecular hydration / S. K. Pal [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2002. — Vol. 106, no. 48. — P. 12376–12395.
58. Ultrafast Excited State Dynamics of Forward and Reverse trans- cis Photoisomerization of Red-Light-Absorbing Indigo Derivatives / Y. Kihara [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2022. — Vol. 129, no. 19. — P. 3539–3550.
59. Medical and biological imaging; Scanning microscopy; Ultrafast spectroscopy / T. E. Matthews [et al.] // J. Dermatol. Sci. — 2010. — Vol. 238, no. 1. — P. 883–909.
60. Time-resolved polarization imaging by pump-probe (stimulated emission) fluorescence microscopy / C. Buehler [et al.] // Biophysical Journal. — 2000. — Vol. 79, no. 1. — P. 536–549.
61. *Jiang J., Warren W. S., Fisher M. C.* Crossed-beam pump-probe microscopy // Optics Express. — 2020. — Vol. 28, no. 8. — P. 11259–11266.
62. *Chong S., Min W., Xie X. S.* Ground-state depletion microscopy: Detection sensitivity of single-molecule optical absorption at room temperature // Journal of Physical Chemistry Letters. — 2010. — Vol. 1, no. 23. — P. 3316–3322.

63. *Albrecht A. C.* Polarizations and Assignments of Transitions: The Method of Photoselection // Journal of Molecular Spectroscopy. — 1961. — Vol. 6. — P. 84–108.
64. *Kummel A. C., Sitz G. O., Zare R. N.* Determination of population and alignment of the ground state using two-photon nonresonant excitation // The Journal of Chemical Physics. — 1986. — Vol. 85, no. 12. — P. 6874–6897.
65. *Lakowicz J. R.* Topics in Fluorescence Spectroscopy Volume 5 Nonlinear and Two-Photon-Induced Fluorescence. т. 5. — 1-е изд. — Springer New York, NY, 2002. — с. 1–544.
66. *Kawski A.* Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications of Rotational Depolarization // Critical Reviews in Analytical Chemistry. — 1993. — Vol. 23, no. 6. — P. 459–529.
67. Polarized two-photon photoselection in EGFP: Theory and experiment / T. A. Masters [et al.] // Journal of Chemical Physics. — 2018. — Vol. 148, no. 13.
68. *Chen S.-Y., Van Der Meer B. W.* Theory of two-photon induced fluorescence anisotropy decay in membranes // Biophysical Journal. — 1993. — Vol. 64, no. 5. — P. 1567–1575.
69. Dynamics of two-color two-photon excited fluorescence of p-terphenyl: determination and analysis of the molecular parameters / S. Denicke [et al.] // The journal of physical chemistry A. — 2010. — Vol. 114, no. 36. — P. 9681–9692.
70. Negative fluorescence anisotropy of phosphole oxide-based dyes in nematic liquid crystals / T. Ohzono [et al.] // Communications Chemistry. — 2018. — Vol. 1, no. 1.
71. *Callis P. R.* On the theory of two-photon induced fluorescence anisotropy with application to indoles // J. Chem. Phys. — 1993. — Vol. 99, no. 1. — P. 27–37.
72. *Kierdaszuk B., Gryczynski I., Lakowicz J. R.* Two-photon induced fluorescence of proteins // Topics in Fluorescence Spectroscopy. — Springer, 2002. — P. 187–209.

73. *Callis P. R.* Two-photon-induced fluorescence // *Annu. Rev. Phys. Chem.* — 1997. — Vol. 48. — P. 271–97.
74. Fluorescence anisotropy in indole under two-photon excitation in the spectral range 385-510 nm / M. E. Sasin [et al.] // *Physical Chemistry Chemical Physics.* — 2018. — Vol. 20, no. 30. — P. 19922–19931.
75. One-and two-photon excited fluorescence lifetimes and anisotropy decays of green fluorescent proteins / A. Volkmer [et al.] // *Biophys. Journal.* — 2000. — Vol. 78, no. 3. — P. 1589–1598.
76. Anisotropy spectra of indole and N-acetyl-L-tryptophanamide observed for two-photon excitation of fluorescence / J. R. Lakowicz [et al.] // *Chemical Physics Letters.* — 1992. — Vol. 194, no. 4. — P. 282–287.
77. Picosecond photoisomerization and rotational reorientation dynamics in solution / M. Lee [et al.] // *The Journal of Chemical Physics.* — 1986. — Vol. 85, no. 8. — P. 4341–4347.
78. 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.
79. *Phillips D., Christensen R. L.* Time Correlated Single-Photon Counting (TCSPC) Using Laser Excitation // *Instrumentation Science and Technology.* — 1985. — Vol. 14, no. 3/4. — P. 267–292.
80. The role of photon statistics in fluorescence anisotropy imaging // *IEEE Transactions on Image Processing.* — 2005. — Vol. 14, no. 9. — P. 1237–1245.
81. Dynamic Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy in the Frequency Domain (rFLIM) / A. H. A. Clayton [et al.] // *Biophysical Journal.* — 2002. — Vol. 83. — P. 1631–1649.
82. Excitation wavelength dependent fluorescence anisotropy of eosin-myosin adducts Evidence for anisotropic rotations / D. L. Vandermeulen [et al.] // *Biophysical Chemistry.* — 1990. — Vol. 36. — P. 177–184.

83. *Fidler V., Kapusta P.* Fluorescence Kinetics and Time-Resolved Measurement // Fluorescence Spectroscopy and Microscopy in Biology / ed. by N. H. Totowa. — 2013.
84. Imaging molecular order in cell membranes by polarization-resolved fluorescence microscopy / S. Brasselet [et al.] // Fluorescent Methods to Study Biological Membranes. — 2012. — P. 311–337.
85. *Vishwasrao H. D., Trifilieff P., Kandel E. R.* In vivo imaging of the actin polymerization state with two-photon fluorescence anisotropy // Biophysical Journal. — 2012. — Vol. 102, no. 5. — P. 1204–1214.
86. Two-photon fluorescence anisotropy microscopy for imaging and direct measurement of intracellular drug target engagement / C. Vinegoni [et al.] // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. — 2015. — Vol. 22, no. 3. — P. 179–185.
87. Two-color two-photon excited fluorescence of indole: Determination of wavelength-dependent molecular parameters / S. Herbrich [et al.] // J. Chem. Phys. — 2015. — Vol. 142, no. 2. — P. 024310.
88. Fluorescence anisotropy in indole under two-photon excitation in the spectral range 385–510 nm / M. E. Sasin [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2018. — Vol. 20, no. 30. — P. 19922–19931.
89. *Jameson D. M., Croney J. C.* Fluorescence polarization: past, present and future // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. — 2003. — Vol. 6, no. 3. — P. 167–176.
90. One- and two-photon fluorescence anisotropy of selected fluorene derivatives / K. D. Belfield [et al.] // Journal of Fluorescence. — 2005. — Vol. 15, no. 1. — P. 3–11.
91. *Bhardwaj V., Panicker M. M., Udgaonkar J. B.* Fluorescence anisotropy uncovers changes in protein packing with inclusion growth in a cellular model of polyglutamine aggregation // Biochemistry. — 2014. — Vol. 53, no. 22. — P. 3621–3636.
92. Classification of fluorescent anisotropy decay based on the distance approach in the frequency domain / G. Yahav [et al.] // Optics Express. — 2022. — Vol. 30, no. 4. — P. 6176.

93. Polarization-resolved pump-probe spectroscopy with high harmonics / Y. Mairesse [et al.] // *New Journal of Physics*. — 2008. — Vol. 10.
94. Three-dimensional orientation of the Q electronic transition dipole moment within the chlorophyll a molecule determined by femtosecond polarization resolved VIS pump-IR probe spectroscopy / M. Linke [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. — 2008. — Vol. 130, no. 45. — P. 14904–14905.
95. The first events in photosynthesis: Electronic coupling and energy transfer dynamics in the photosynthetic reaction center from rhodobacter sphaeroides / D. C. Arnett [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. — 1999. — Vol. 103, no. 11. — P. 2014–2032.
96. *Goodson T. G.* Optical excitations in organic dendrimers investigated by time-resolved and nonlinear optical spectroscopy // *Accounts of Chemical Research*. — 2005. — Vol. 38, no. 2. — P. 99–107.
97. *Lim M., Jackson T. A., Anfinrud P. A.* Orientational distribution of CO before and after photolysis of MbCO and HbCO: A determination using time-resolved polarized Mid-IR spectroscopy // *Journal of the American Chemical Society*. — 2004. — Vol. 126, no. 25. — P. 7946–7957.
98. Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps / A. Lukacs [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. — 2008. — Vol. 130, no. 44. — P. 14394–14395.
99. *Lessing H. E., Jena A. V.* Separation of rotational diffusion and level kinetics in transient absorption spectroscopy // *Chemical Physics Letters*. — 1976. — Vol. 42, no. 2.
100. *Shank C. V., Ippen E. P.* Anisotropic absorption saturation with picosecond pulses // *Applied Physics Letters*. — 1975. — Vol. 26, no. 2. — P. 62–63.
101. *Weiner H.* A Polarization of Fluorescence Study of Alcohol Dehydrogenase and its Binary and Ternary Complexes. — 1968.
102. Ultrasensitive time-resolved linear dichroism spectral measurements using near-crossed linear polarizers / D. Che [et al.] // *Chemical Physics Letters*. — 1994. — Vol. 224. — P. 145–154.

103. *Tan H.-S., Piletic I. R., Fayer M. D.* Polarization selective spectroscopy experiments: methodology and pitfalls // *J. Opt. Soc. Am. B.* — 2005. — Vol. 22, no. 9.
104. Pump-Probe Polarization Anisotropy Study of Femtosecond Energy Transfer within the Photosynthetic Reaction Center of *Rhodobacter sphaeroides* R26 / *D. M. Jonas [et al.]* // *J. Phys. Chem.* — 1996. — Vol. 100. — P. 12660–12673.
105. *Weiner A. M., Ippen E. P.* Femtosecond excited state relaxation of dye molecules in solution // *Chemical Physics Letters.* — 1985. — Vol. 114, no. 5. — P. 456–460.
106. *Tros M., Woutersen S.* Polarization-modulation setup for ultrafast infrared anisotropy experiments to study liquid dynamics // *Optics Letters.* — 2015. — Vol. 40, no. 11. — P. 2607.
107. Beyond intensity modulation: new approaches to pump-probe microscopy / *J. Jiang [et al.]* // *Optics Letters.* — 2021. — Vol. 46, no. 6. — P. 1474.
108. *Heikal A. A.* Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies // *Biomarkers in Medicine.* — 2010. — Vol. 4, no. 2. — P. 241–263.
109. Fluorescence lifetime microscopy of NADH distinguishes alterations in cerebral metabolism in vivo / *M. A. Yaseen [et al.]* // *Biomedical Optics Express.* — 2017. — Vol. 8, no. 5. — P. 2368–2385.
110. Enhanced quantification of metabolic activity for individual adipocytes by label-free FLIM / *M. Evers [et al.]* // *Scientific Reports.* — 2018. — Vol. 8, no. 1. — P. 1–14.
111. In vivo imaging of cerebral energy metabolism with two-photon fluorescence lifetime microscopy of NADH / *M. A. Yaseen [et al.]* // *Biomedical Optics Express.* — 2013. — Vol. 4, no. 2. — P. 307–321.
112. *Nakabayashi T., Islam M. S., Ohta N.* Fluorescence decay dynamics of flavin adenine dinucleotide in a mixture of alcohol and water in the femtosecond and nanosecond time range // *Journal of Physical Chemistry B.* — 2010. — Vol. 114, no. 46. — P. 15254–15260.

113. *Huang S., Heikal A. A., Webb W. W.* Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein // *Biophysical Journal*. — 2002. — Vol. 82, no. 5. — P. 2811–2825.
114. *Hull R. V., Conger P. S., Hoobler R. J.* Conformation of NADH studied by fluorescence excitation transfer spectroscopy // *Biophysical Chemistry*. — 2001. — Vol. 90, no. 1. — P. 9–16.
115. 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.
116. *Ladokhin A. S., Brand L.* Evidence for an excited-state reaction contributing to NADH fluorescence // *Journal of Fluorescence*. — 1995. — Vol. 5, no. 1. — P. 99–106.
117. *Visser A. J., Hoek A. van.* The fluorescence decay of reduced nicotinamides in aqueous solution after excitation with a UV-mode locked Ar ion laser // *Photochemistry and Photobiology*. — 1981. — Vol. 33, no. 1. — P. 35–40.
118. 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.
119. *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.
120. *Krishnamoorthy G., Periasamy N., Venkataraman B.* On the origin of heterogeneity of fluorescence decay kinetics of reduced nicotinamide adenine dinucleotide // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1987. — Vol. 144, no. 1. — P. 387–392.
121. Fluorescence of reduced nicotinamides using one- and two-photon excitation / B. Kierdaszuk [и др.] // *Biophysical Chemistry*. — 1996. — т. 62, № 1–3. — с. 1–13.
122. 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.



123. Kinetics of Light Induced Intramolecular Energy Transfer in Different Conformational States of NADH / Z. Heiner [et al.] // Journal of Physical Chemistry B. — 2017. — Vol. 121, no. 34. — P. 8037–8045.
124. *Konig K., Berns M. W., Tromberg B. J.* Time-resolved and steady-state fluorescence measurements of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide-alcohol dehydrogenase complex during UVA exposure // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. — 1997. — Vol. 37. — P. 91–95.
125. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia / M. C. Skala [et al.] // Journal of Biomedical Optics. — 2007. — Vol. 12, no. 2. — P. 024014.
126. 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.
127. Polarized fluorescence in NADH under two-photon excitation with femtosecond laser pulses / O. S. Vasyutinskii [et al.] // Optics and Spectroscopy. — 2017. — Vol. 122, no. 4. — P. 602–606.
128. *Blacker T. S., Duchon M. R.* Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence // Free Radical Biology and Medicine. — 2016. — Vol. 100. — P. 53–65.
129. *Oppenheimer N. J., Arnold L. J., Kaplan N. O.* A structure of pyridine nucleotides in solution. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1971. — Vol. 68, no. 12. — P. 3200–3205.
130. Some Effects of Environment on the Folding of Nicotinamide-Adenine Dinucleotides in Aqueous Solutions / G. McDonald [et al.] // Biochemistry. — 1972. — Vol. 11, no. 10. — P. 1920–1930.
131. *Hull R. V., Conger P. S., Hoobler R. J.* Conformation of NADH studied by fluorescence excitation transfer spectroscopy // Biophysical Chemistry. — 2001. — Vol. 90, no. 1. — P. 9–16.

132. *Wu Y. D., Houk K. N.* Theoretical Study of Conformational Features of NAD<sup>+</sup> and NADH Analogs: Protonated Nicotinamide and 1,4-Dihyronicotinamide // *Journal of Organic Chemistry*. — 1993. — Vol. 58. — P. 2043–2045.
133. *McClain W.* Polarization of two-photon excited fluorescence // *J. Chem. Phys.* — 1973. — Vol. 58. — P. 324.
134. *Wan C., Johnson C.* Time-resolved two-photon induced anisotropy decay: The rotational diffusion regime // *J. Chem. Phys.* — 1994. — Vol. 101. — P. 10283.
135. *Shternin P. S., Gericke K.-H., Vasyutinskii O. S.* The polarisation of two-photon excited fluorescence in rotating Molecules // *Mol. Phys.* — 2010. — Vol. 108. — P. 813–825.
136. *Dote J. L., Kivelson D., Schwartz R. N.* A Molecular Quasi-Hydrodynamic Free-Space Model for Molecular Rotational Relaxation In Liquids // *J. Phys. Chem.* — 1981. — Vol. 85. — P. 2169–2180.
137. *Anderton R. M., Kauffman J. F.* Temperature-Dependent Rotational Relaxation of Diphenylbutadiene in n-Alcohols: A Test of the Quasihydrodynamic Free Space Model // *J. Phys. Chem.* — 1994. — Vol. 98. — P. 12117–12124.
138. *Hu C.-M., Zwanzig R.* Rotational friction coefficients for spheroids with the slipping boundary condition // *J. Chem. Phys.* — 1974. — Vol. 60. — P. 4354–4357.
139. *Edward J. T.* Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation // *J. Chem. Ed.* — 1970. — Vol. 47. — P. 261–270.
140. *Freed S., Neyfakh E., Tumerman L.* Influence of solvents on the intramolecular energy transfer in NADH and NADPH // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1967. — Vol. 143. — P. 432–434.
141. *Fischer P., Fleckenstein J., Hones J.* Spectroscopic investigation of dihyronicotinamides-I: conformation, absorption, and fluorescence // *Photochemistry and Photobiology*. — 1988. — Vol. 47, no. 2. — P. 139–199.

142. A fraction of NADH in solution is “dark”: Implications for metabolic sensing via fluorescence lifetime / S. Cao [et al.] // *Chemical Physics Letters*. — 2019. — Vol. 726, April. — P. 18–21.
143. *Cao R., Wallrabe H. K., Periasamy A.* Multiphoton FLIM imaging of NAD(P)H and FAD with one excitation wavelength // *Journal of Biomedical Optics*. — 2020. — Vol. 25, no. 01. — P. 1.
144. *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.
145. Correlative NAD(P)H-FLIM and oxygen sensing-PLIM for metabolic mapping / S. Kalinina [et al.] // *Journal of biophotonics*. — 2016. — Vol. 9, no. 8. — P. 1–12.
146. Correlation of intracellular oxygen and cell metabolism by simultaneous PLIM of phosphorescent TLD1433 and FLIM of NAD(P)H / S. Kalinina [и др.] // *Journal of Biophotonics*. — 2018. — т. 11, № 10. — с. 1–11.
147. Protein-bound NAD(P)H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon / J. T. Sharick [et al.] // *Scientific Reports*. — 2018. — Vol. 8, no. 1. — P. 1–13.
148. Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence / R. Niesner [et al.] // *ChemPhysChem*. — 2004. — Vol. 5, no. 8. — P. 1141–1149.
149. Metabolic imaging using two-photon excited nadh intensity and fluorescence lifetime imaging / J. Vergen [et al.] // *Microscopy and Microanalysis*. — 2012. — Vol. 18, no. 4. — P. 761–770.
150. *Oppenheimer N. J., Arnold L. J., Kaplan N. O.* Stereospecificity of the Intramolecular Association of Reduced Pyridine Coenzymes // *Biochemistry*. — 1978. — Vol. 17, no. 13. — P. 2613–2619.
151. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM / T. S. Blacker [et al.] // *Nature Communications*. — 2014. — Vol. 5. — P. 1–9.

152. On the participation of photoinduced N-H bond fission in aqueous adenine at 266 and 220 nm: A combined ultrafast transient electronic and vibrational absorption spectroscopy study / G. M. Roberts [et al.] // *Journal of Physical Chemistry A*. — 2014. — Vol. 118, no. 47. — P. 11211–11225.
153. Level Mixing and Energy Redistribution in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers / G. Haran [et al.] // *J. Phys. Chem.* — 1996. — Vol. 100. — P. 5562–5569.
154. Femtosecond Time-Resolved Photofragment Rotational Angular Momentum Alignment in Electronic Predissociation Dynamics / M. E. Corrales [et al.] // *J. Phys. Chem. Lett.* — 2016. — Vol. 7. — P. 4458–4463.
155. Dynamics of Dicyanamide in Ionic Liquids is Dominated by Local Interactions / J. Hunger [et al.] // *J. Phys. Chem. B*. — 2019. — Vol. 123. — P. 1831–1839.
156. Excited-State Vibrational Coherence and Anisotropy Decay in the Bacteriochlorophyll a Dimer Protein B820 / W. M. Diffey [et al.] // *J. Phys. Chem. B*. — 1998. — Vol. 102. — P. 2776–2786.
157. *Ferro A. A., Jonas D. M.* Pump-probe polarization anisotropy study of doubly degenerate electronic reorientation in silicon naphthalocyanine // *J. Chem. Phys.* — 2001. — Vol. 115, no. 14. — P. 6281–6284.
158. *Potma E. O., Boeij W. P. de, Wiersma D. A.* Femtosecond Dynamics of Intracellular Water Probed with Nonlinear Optical Kerr Effect Microspectroscopy // *Biophys. Journal*. — 2001. — Vol. 80. — P. 3019–3024.
159. *Fenn E. E., Wong D. B., Fayer M. D.* Water dynamics at neutral and ionic interfaces // *PNAS*. — 2009. — Vol. 106, no. 36. — P. 15243–15248.
160. *Tros M., Woutersen S.* Polarization-modulation setup for ultrafast infrared anisotropy experiments to study liquid dynamics // *Opt. Lett.* — 2015. — Vol. 40, no. 11. — P. 2607–2609.
161. *Akerlof G.* Dielectric constants of some organic solvent–water mixtures at various temperatures // *J. Am. Chem. Soc.* — 1932. — Vol. 54, no. 11. — P. 4125–4139.

162. Dynamics of Two-Color Two-Photon Excited Fluorescence of p-Terphenyl: Determination and Analysis of the Molecular Parameters / S. Denicke [et al.] // J. Phys. Chem. A. — 2010. — Vol. 114. — P. 9681–9692.
163. *Zare R. N.* Angular Momentum. — New York : Wiley, 1988.
164. *Blum K.* Density Matrix Theory and Applications. — 2nd ed. — New York : Plenum, 1996.
165. *Messiah A.* Quantum Mechanics, Vol. II. — Oxford, New York : North Holland Publishing Company, 1963.
166. Invited Review Article: Pump-probe microscopy / M. C. Fischer [et al.] // Rev. Sci. Instr. — 2016. — Vol. 87. — P. 031101.
167. Femtosecond Dynamics Solvation of Water / R. Jimenez [et al.] // Lett. Nature. — 1994. — Vol. 369. — P. 471–473.
168. *Xu J., Knutson J. R.* Quasi-Static Self-Quenching of Trp-X and X-Trp Dipeptides in Water: Ultrafast Fluorescence Decay // J. Phys. Chem. B. — 2009. — Vol. 113. — P. 12084–12089.
169. Ultrafast Fluorescence Signals from NADH: Resonant Energy Transfer in the Folded and Unfolded Forms / A. Cadena-Caicedo [et al.] // J. Phys. Chem. B. — 2020. — Vol. 124, no. 3. — P. 519–530.
170. *Lakowicz J. R.* Topics in Fluorescence Spectroscopy. Vol. 5. — New York : Plenum Press, 1997.

## Приложение А

### Вывод выражения, используемого для определения относительной концентрации сложенных конформаций NADH

Затухание анизотропии флуоресценции NADH было рассмотрено как сумма вкладов от вращательной диффузии сложенных и разложенных конформаций NADH:

$$I_{aniso}(t) = N_{fol}w_{fol}exp(-k_{fol}t) + (1 - N_{fol})w_{un}exp(-k_{un}t), \quad (A.1)$$

где  $k_{fol} = \tau_{fol}^{-1}$  и  $k_{un} = \tau_{un}^{-1}$  – скорости вращательной диффузии для сложенной и разложенной конформации, соответственно,  $N_{fol}$  – относительная концентрация сложенных конформаций NADH в основном состоянии как функция вязкости  $\eta$ , а  $w_{fol}$  и  $w_{un}$  – коэффициенты, учитывающие вероятности возбуждения и флуоресценции для сложенной и разложенной конформаций NADH.

Соотношение между вероятностями  $w_{fol}$  и  $w_{un}$  может быть получено с использованием результатов, опубликованных в работе Фред и др. [140], где экспериментально была определена интенсивность флуоресценции NADH при возбуждении на 344 нм растворах вода-метанол в зависимости от концентрации метанола  $I_{fl}(\eta)$ . Эта взаимосвязь может быть представлена в виде:

$$I_{fl}(\eta) = N_{fol}w_{fol} + (1 - N_{fol})w_{un}, \quad (A.2)$$

где вероятность  $w_{un}$  можно определить по интенсивности флуоресценции NADH в чистом метаноле  $w_{un} = I_{fl}(M)$ .

В общем случае, константы скорости  $k_{fol}$  и  $k_{un}$  не совпадают, и соответствующий сигнал может быть описан суммой двух затухающих экспонент. Однако, если  $(k_{fol} - k_{un})t \ll 1$ , то экспериментальный сигнал в выражении (A.1) может быть приблизительно представлен одноэкспоненциальной функцией:

$$I_{aniso}(t) = N_{fol}w_{fol}exp(-k_{fol}t) + (1 - N_{fol})w_{un}exp(-k_{un}t) \approx Cexp(-kt), \quad (A.3)$$

где  $C = N_{fol}w_{fol} + (1 - N_{fol})w_{un}$ .

Используя разложение Тейлора, сумма двух экспонент в уравнении (A.3) может быть представлена в виде:

$$C \exp(-\gamma t) \approx C e^{-k_{fol}t} \left( 1 - \frac{(1 - N_{fol})w_{un}}{C} \left( (k_{un} - k_{fol})t + \frac{1}{2}(k_{un} - k_{fol})^2 t^2 \right) \right). \quad (\text{A.4})$$

При взятии логарифма из левой и правой частей уравнения (A.4) и сохраняя только линейный член по  $(k_{un} - k_{fol})$ , получаем:

$$k \approx \frac{N_{fol}w_{fol}}{C} k_{fol} + \frac{(1 - N_{fol})w_{un}}{C} k_{un}. \quad (\text{A.5})$$

Таким образом, уравнение (A.5) может быть представлено в виде:

$$\frac{1}{\tau_r} \approx \frac{1 - (1 - N_{fol})\chi(\eta)}{\tau_{fol}} + \frac{N_{un}\chi(\eta)}{\tau_{un}}, \quad (\text{A.6})$$

## Приложение Б

### Результаты расчетов *ab initio* структуры NADH в растворах

Таблица 9 — Оптимизированная стабильная геометрия свернутых и развернутых конформаций NADH в основном электронном состоянии в водном растворе

Conformation	$R_{C1B-C1D}$ , Å	$R_{C6A-C2N}$ , Å	$R_{Nn-Op}$ , Å	$\chi_{O5B-O5D}$ , degree	$\varphi_{C2N-Nn}$ , degree
1 <i>trans</i>	4.993	3.896	3.429	26.185	-14.644
1 <i>cis</i>	5.026	3.912	5.549	29.582	-175.675
2 <i>trans</i>	6.488	11.989	3.430	21.566	-9.077
2 <i>cis</i>	6.092	10.698	5.379	10.520	-172.019
3 <i>trans</i>	10.486	11.557	4.632	145.964	-17.806
3 <i>cis</i>	7.751	10.655	5.346	-66.713	177.359
4 <i>trans</i>	9.771	13.001	8.499	-170.573	-13.732
4 <i>cis</i>	9.767	13.781	8.372	-169.960	-178.48366

Таблица 10 — Оптимизированная стабильная геометрия конформаций NADH в основном электронном состоянии в растворе метанола.

Conformation	$R_{C1B-C1D}$ , Å	$R_{C6A-C2N}$ , Å	$R_{Nn-Op}$ , Å	$\chi_{O5B-O5D}$ , degree	$\varphi_{C2N-Nn}$ , degree
1 <i>trans</i>	4.993	3.895	3.421	26.163	-14.595
1 <i>cis</i>	5.026	3.907	5.544	29.666	-175.509
2 <i>trans</i>	6.490	11.984	3.435	20.906	-8.969
2 <i>cis</i>	6.093	10.686	5.389	9.937	-172.075
3 <i>trans</i>	10.409	11.824	4.652	137.844	-17.314
3 <i>cis</i>	7.736	10.645	3.296	-66.383	177.546
4 <i>trans</i>	9.772	13.799	8.50	-170.764	-13.964
4 <i>cis</i>	9.768	13.780	8.371	-170.105	-178.437



Таблица 11 — Оптимизированная стабильная геометрия конформаций NADH в первом возбужденном электронном состоянии расслабленном в водном растворе.

Conformation	$R_{C1B-C1D}$ , Å	$R_{C6A-C2N}$ , Å	$R_{Nn-Op}$ , Å	$\chi_{O5B-O5D}$ , degree	$\varphi_{C2N-Nn}$ , degree
2 <i>trans</i>	6.721	12.269	3.476	29.041	-10.629
3 <i>trans</i>	10.923	11.465	5.289	130.550	-2.074
3 <i>cis</i>	8.832	11.996	5.553	-65.382	171.855

Таблица 12 — Энергии вертикального возбуждения четырех низших возбужденных состояний, соответствующие силы осциллятора (*Osc.str.*) из основного электронного состояния и энергии дисперсии основного состояния Grimme-D3(BJ) *trans*- и *cis*-конфигураций NADH в водном растворе.

Conformation	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 1	Energy, eV. ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 2	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 3	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 4	Dispersion energy, Hartree, $10^{-4}$
1 <i>trans</i>	3.12(0.161)	3.67(0.019)	3.95(0.019)	4.22(0.029)	2023
1 <i>cis</i>	3.27(0.207)	3.75(0.000)	3.97(0.012)	4.34(0.008)	2002
2 <i>trans</i>	3.19(0.219)	4.20(0.000)	4.31(0.000)	4.34(0.003)	1761
2 <i>cis</i>	3.31(0.229)	4.20(0.000)	4.37(0.002)	4.66(0.411)	1787
3 <i>trans</i>	3.41(0.175)	3.91(0.000)	4.44(0.006)	4.59(0.000)	1679
3 <i>cis</i>	3.13(0.263)	3.92(0.000)	4.38(0.000)	4.67(0.416)	1839
4 <i>trans</i>	3.41(0.218)	3.85(0.000)	4.47(0.003)	4.54(0.000)	1725
4 <i>cis</i>	3.54(0.225)	3.86(0.000)	4.54(0.000)	4.55(0.001)	1725

Таблица 13 — Энергии вертикального возбуждения четырех низших возбужденных состояний, соответствующие силы осциллятора из основного электронного состояния и энергии дисперсии основного состояния Grimme-D3(BJ) *trans* и *cis*-конформаций NADH в метаноле.

Conformation	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 1	Energy, eV. ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 2	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 3	Energy, eV ( <i>Osc.str.</i> ) Ex. state 4	Dispersion energy, Hartree, $10^{-4}$
1 <i>trans</i>	3.13(0.156)	3.67(0.019)	3.95(0.029)	4.23(0.009)	2023
1 <i>cis</i>	3.27(0.202)	3.76(0.001)	3.96(0.012)	4.35(0.008)	2003
2 <i>trans</i>	3.19(0.215)	4.22(0.000)	4.28(0.000)	4.33(0.003)	1762
2 <i>cis</i>	3.31(0.225)	4.23(0.000)	4.34(0.002)	4.67(0.405)	1787
3 <i>trans</i>	3.41(0.172)	3.91(0.000)	4.43(0.005)	4.59(0.000)	1678
3 <i>cis</i>	3.13(0.259)	3.89(0.000)	4.41(0.000)	4.67(0.409)	1840
4 <i>trans</i>	3.42(0.216)	3.84(0.000)	4.47(0.003)	4.53(0.000)	1725
4 <i>cis</i>	3.54(0.224)	3.85(0.000)	4.54(0.000)	4.55(0.001)	1725

Таблица 14 — Компоненты дипольного момента перехода (TDM) перехода из основного электронного состояния в первое возбужденное состояние в 24 конформациях NADH в водном растворе.  $\gamma$  - это угол между направлением TDM и плоскостью NA.

Conformation	Z	X	Y	$\gamma$ , degrees
1 <i>trans</i>	-1.384	0.010	0.161	6.65
1 <i>cis</i>	1.544	0.036	-0.125	-4.64
2 <i>trans</i>	-1.612	0.033	0.074	2.63
2 <i>cis</i>	-1.622	-0.038	0.027	0.95
3 <i>trans</i>	-1.390	0.063	0.111	4.55
3 <i>cis</i>	-1.760	0.016	0.288	9.30
4 <i>trans</i>	-1.557	0.016	-0.025	-0.92
4 <i>cis</i>	-1.557	-0.020	-0.027	-0.98

Таблица 15 — Компоненты TDM перехода из основного электронного состояния в первое возбужденное состояние в 24 конформациях NADH в растворе метанола.  $\gamma$  - это угол между направлением TDM и плоскостью кольца NA.

Conformation	Z	X	Y	$\gamma$ , degrees
1 <i>trans</i>	-1.361	0.006	0.162	6.77
1 <i>cis</i>	1.523	0.041	-0.123	-4.61
2 <i>trans</i>	-1.596	0.031	0.072	2.60
2 <i>cis</i>	-1.604	-0.044	0.027	0.98
3 <i>trans</i>	-1.380	0.062	0.113	4.68
3 <i>cis</i>	-1.742	0.014	0.289	9.42
4 <i>trans</i>	-1.549	0.017	-0.022	-0.82
4 <i>cis</i>	-1.550	-0.019	-0.026	-0.97

Таблица 16 — Компоненты дипольного момента перехода флуоресценции из первого возбужденного состояния в основное электронное состояние в конформациях NADH в водном растворе.  $\gamma$  - это угол между направлением TDM флуоресценции и плоскостью пиридинового кольца.  $\xi$  - это угол между TDM возбуждения и флуоресценции.

Conformation	$Z_r$	$X_r$	$Y_r$	$\gamma$ , degrees	$\xi$ , degees
2 <i>trans</i>	1.136	0.110	-0.076	-3.79	6.79
3 <i>trans</i>	1.105	0.007	-0.071	-3.67	3.07
3 <i>cis</i>	1.764	0.025	-0.230	7.44	2.28

## Приложение В

### Теоретические модели, используемые для анализа анизотропных процессов релаксации в возбужденном состоянии NADH

#### В.1 Общие выражения для интенсивности флуоресценции при двухфотонном возбуждении

Выражение для интенсивности флуоресценции  $I(t)$  при двухфотонном возбуждении может быть представлено в виде: [135; 162]

$$\begin{aligned}
 I(t) = & -C w(t) \sum_{K_e} \sum_{K_1, K_2} \sum_{R, R'} ([\mathbf{E}_{K_1}(\mathbf{e}_1) \otimes \mathbf{E}_{K_2}(\mathbf{e}_2)]_{K_e} \cdot \mathbf{E}_{K_e}(\mathbf{e}_{fl})) \\
 & \times \frac{\sqrt{(2K_1 + 1)(2K_2 + 1)(2R + 1)(2R' + 1)}}{2K_e + 1} \left\{ \begin{array}{ccc} K_1 & K_2 & K_e \\ 1 & 1 & R' \\ 1 & 1 & R \end{array} \right\} \\
 & \times M_{K_e}(R, R', t), \tag{B.1}
 \end{aligned}$$

где  $\mathbf{E}_{K_1 Q_1}(\mathbf{e}_1)$ ,  $\mathbf{E}_{K_2 Q_2}(\mathbf{e}_2)$  и  $\mathbf{E}_{K_e Q_e}(\mathbf{e}_{fl})$  являются матрицами поляризации света [163] первого и второго фотонов возбуждения и фотонов флуоресценции, соответственно, и  $\mathbf{e}_1$ ,  $\mathbf{e}_2$  и  $\mathbf{e}_{fl}$  являются соответствующими векторами поляризации фотонов.

В условиях одноцветного двухфотонного возбуждения, которое было реализовано в экспериментах в настоящей работе, первый и второй фотоны возбуждения были одинаковыми, следовательно  $\mathbf{e}_1 = \mathbf{e}_2$ . Суммирование в уравнении (B.1) выполняется по рангам  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_e$ ,  $R$ ,  $R'$ , каждый из которых в целом ограничен значениями 0 и 2. Член  $w(t) = \left( a_1 e^{-\frac{t-t'}{\tau_1}} + a_2 e^{-\frac{t-t'}{\tau_2}} \right)$  описывает возбужденное состояние NADH, населенность которого затухает с временами  $\tau_1$  и  $\tau_2$ . Нормировочный член  $C$  пропорционален квадрату интенсивности возбуждающего излучения, член в фигурных скобках является  $9j$ -символом. Член в скобках уравнения B.1 обозначает неприводимое тензорное произведение, опре-

деленное как: [163]

$$\begin{aligned} & ([\mathbf{E}_{K_1}(\mathbf{e}_1) \otimes \mathbf{E}_{K_2}(\mathbf{e}_2)]_{K_e} \cdot \mathbf{E}_{K_e}(\mathbf{e}_{fl})) \\ &= \sum_{Q_1, Q_2, Q_e} (-1)^{Q_e} C_{K_1 Q_1 K_2 Q_2}^{K_e Q_e} \mathbf{E}_{K_1 Q_1}(\mathbf{e}_1) \mathbf{E}_{K_2 Q_2}(\mathbf{e}_2) \mathbf{E}_{K_e - Q_e}(\mathbf{e}_{fl}), \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

где  $Q_1$ ,  $Q_2$  и  $Q_e$  являются компонентами рангов  $K_1$ ,  $K_2$  и  $K_e$  в лабораторной системе координат, соответственно, а член  $C_{K_1 Q_1 K_2 Q_2}^{K_e Q_e}$  представляет собой коэффициент Клебша-Гордана.[163]

При наличии процесса вращательной диффузии, возникающего при взаимодействии многоатомных биологических молекул с молекулами растворителя,  $M$ -параметры могут быть выражены как [135]:

$$M_{K_e}(R, R', t) = -\sqrt{3} \sum_{q_e, q'_e} \left( [\mathbf{F}_1^* \otimes \mathbf{F}'_1]_{K_e q_e} \mathcal{D}_{q_e, q'_e}^{K_e}(t) [\mathbf{S}_{R'}^* \otimes \mathbf{S}_R]_{K_e q'_e}^* \right), \quad (\text{B.3})$$

где символ  $\otimes$  обозначает тензорное произведение [163] и  $\mathcal{D}_{q_e, q'_e}^{K_e}(t)$ , где  $K_e = 0, 2$ , является элементом матрицы тензора вращательной диффузии. При  $K_e = 0$  этот тензор равен единице, а при  $K_e = 2$  в условиях нашего эксперимента тензор  $\mathcal{D}_{q_e, q'_e}^2(t)$  пропорционален:

$$\mathcal{D}_{q_e, q'_e}^2(t) \sim \delta_{q_e, 0} \delta_{q'_e, 0} e^{-t/\tau_r}, \quad (\text{B.4})$$

где  $\tau_r$  - время вращательной диффузии.

Сферические компоненты тензора двухфотонного возбуждения  $\mathbf{S}_{R\gamma}$  в уравнении (B.3) с рангом  $R$  и его составляющая  $\gamma$  определяются как [135]:

$$S_{R\gamma} = 2 \sum_{q_1, q_2, n_i} C_{1q_1 1q_2}^{R\gamma} \frac{\langle n_e | \hat{d}_{q_2} | n_i \rangle \langle n_i | \hat{d}_{q_1} | n_g \rangle}{E_i - E_g - h\nu}, \quad (\text{B.5})$$

где  $R = 0, 2$ ,  $\gamma = -R \dots R$ ,  $\nu$  - частота фотонов возбуждения, члены в угловых скобках являются элементами матрицы дипольного момента перехода, а суммирование выполняется по сферическим проекциям в молекулярной системе координат  $q_1, q_2 = -1, 0, 1$  и по квантовым числам всех виртуальных промежуточных состояний  $n_i$ .

Соотношение между сферическими компонентами тензора двухфотонного возбуждения  $S_{R\gamma}$  в уравнении (В.5) и декартовыми компонентами тензора  $S_{ij}$  приведены в работах [69].

Члены  $E_i$  и  $E_g$  в уравнении (В.5) представляют собой электронные энергии промежуточного и основного состояний соответственно. Сферические компоненты дипольного момента перехода флуоресценции  $\mathbf{F}_1$  в уравнении (В.3) определяются исходя из следующего выражения:

$$F_{1qfl} = \langle n_f | \hat{d}_{qfl} | \tilde{n}_e \rangle. \quad (\text{В.6})$$

## В.2 Общие выражения для поглощения зондирующего излучения

Общие выражения для поглощения зондирующего излучения были получены на основе метода неприводимых сферических тензоров [164]. Для построения выражений был рассмотрен случай возбуждения ансамбля молекул типа асимметричного вытянутого волчка двумя лазерными импульсами.

Для этого были рассмотрены суммарные молекулярные угловые моменты основного, первого, второго возбужденных состояний  $J_g, J_1, J_2$  и их проекции на лабораторную ось  $Z$  соответственно  $M_g, M_1, M_2$ . Взаимодействие между молекулярными электрическими дипольными моментами и излучением накачки и зондирования были выражены через скалярные произведения:  $V_{pu} \sim \mathbf{d}^{(pu)} \mathbf{e}_{pu}$ ,  $V_{pr} \sim \mathbf{d}^{(pr)} \mathbf{e}_{pr}$ , где  $\mathbf{d}^{(pu)}$  и  $\mathbf{d}^{(pr)}$  - дипольные моменты молекул в основном и возбужденном состояниях, и  $\mathbf{e}_{pu}$  и  $\mathbf{e}_{pr}$  - поляризации накачки и зондирующего излучения, соответственно.

Комбинируя выражения матрицы плотности для однофотонных переходов [164]  $S_0 \rightarrow S_1$  и  $S_1 \rightarrow S_2$  после некоторых преобразований алгебры углового момента, выражение для поглощения зондирующего пучка может быть представлено в виде:

$$I_{ab}(t) = I_0 \sum_l a_l e^{-t/\tau_l} \sum_K \left( E_K(\mathbf{e}_{pu}) \cdot E_K(\mathbf{e}_{pr}) \right) [C_{10 K0}^{10}]^2 R_K^{pr}(t) D_{00}^K(t), \quad (\text{В.7})$$

где

$$R_K^{pr}(t) = \sum_{v_1, v_2} \rho_{v_1, v_2}(t) |\langle \chi_{v_2} | \chi_{v_1} \rangle|^2 P_K(\cos \theta_{v_2 v_1}) \int \Phi_{pr}(\omega) \delta(\omega_{v_2} - \omega_{v_1} - \omega) d\omega \quad (\text{B.8})$$

и

$$R^{pu} = \sum_{v_g, v_1} |\langle \chi_{v_1} | \chi_{v_g} \rangle|^2 N_g(v_g) \int \Phi_{pu}(\omega) \delta(\omega_{v_1} - \omega_{v_g} - \omega) d\omega, \quad (\text{B.9})$$

где  $I_0 = C_{pu} R^{(pu)} I_{pr} |\langle \psi_1^{el} | d_0^{(pu)} | \psi_g^{el} \rangle|^2 |\langle \psi_2^{el} | d_0^{(pr)} | \psi_1^{el} \rangle|^2$ .

Элементы матрицы дипольных моментов перехода в уравнениях (B.7)-(B.9) записываются как произведение элементов электронной матрицы и интегралов перекрытия Франка-Кондона. Электронные матричные элементы дипольного момента  $\mathbf{d}^{pu}$  в  $I_0$  записываются в системе координат накачки, а матричные элементы дипольного момента  $\mathbf{d}^{pr}$  записываются в системе координат зондирующего излучения.  $\delta$  функции в уравнениях (B.8) и (B.9) указывают на справедливость сохранения энергии в оптических переходах [165].

Выражения (B.7)-(B.9) являются общими и могут быть использованы для описания нескольких типов сверхбыстрых резонансных двухфотонных процессов: переходное поглощение [48; 166], вынужденное излучение [104], и ап-конверсионное преобразование [142; 167–169] при любой поляризации пучков накачки и зондирования. В частных случаях вынужденного излучения и ап-конверсионного преобразования уравнения (B.7)-(B.9) остаются практически неизменными, когда конечное состояние  $E_2$  совпадает с основным состоянием  $E_g$ .

Член  $R_K^{pr}(t)$  в уравнении (B.8) описывает быструю релаксацию возбужденного состояния. В этой работе он был получен в результате формального рассмотрения, где угол  $\theta$  зависел от времени  $t$  как функция ядерной конфигурации.

Если  $K = 0$ , то член  $P_0(\cos \theta_{v_2 v_1}) = 1$  и член  $R_0^{pr}(t)$  в уравнении (B.8) описывает быструю изотропную колебательную релаксацию в возбужденном состоянии  $E_1$  из-за эволюции интегралов перекрытия  $|\langle \chi_{v_2} | \chi_{v_1} \rangle|^2$ , как также схематично показано на Рис. 5.5 б).

Используя точные значения матрицы поляризации излучения  $E_{KQ}(\mathbf{e})$  [163] в уравнении (В.7) и предполагая, что луч накачки линейно поляризован вдоль оси X, изотропная часть сигнала может быть представлена в виде:

$$I_{ab}^{iso}(t) = \frac{I_X + 2I_Y}{3} = \frac{I_0}{3} R_0^{pr}(t) \sum_l a_l e^{-t/\tau_l}. \quad (\text{В.10})$$

То же выражение справедливо и для условия магического угла. В случае NADH в первом возбужденном состоянии сумма превышает  $l$  в уравнении (В.10) обычно ограничивается двумя членами, представляющими вклады от двух изотропных времен затухания флуоресценции.

Если  $K = 2$ , то член  $R_2^{pr}(t) = \langle P_2(\cos \theta) \rangle$  в уравнении (В.8), где угловые скобки означают усреднение по колебательным волновым функциям, описывает анизотропную релаксацию в возбужденном состоянии  $E_1$ . Член  $\langle P_2(\cos \theta) \rangle$  хорошо известен в теории анизотропии флуоресценции [170] и спектроскопии накачка-зондирование [104]. Как показано в уравнении (В.8) в рамках настоящей модели этот член зависит от времени и характеризует быструю анизотропную релаксацию в возбужденном состоянии  $E_1$ .

Используя уравнения (В.7)-(В.9), выражение для описания линейного дихроизма NADH может быть представлено в более простой форме:

$$\begin{aligned} \Delta I_{ab}(t) &= I_X - I_Y \\ &= I_0 \left( a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2} \right) r(t), \end{aligned} \quad (\text{В.11})$$

где предполагается, что излучение накачки линейно поляризовано вдоль оси X,  $\tau_1, \tau_2$  - времена жизни, характеризующие первое возбужденное состояние, а  $r(t)$  - анизотропия.

В случае NADH анизотропия может быть представлена в виде:

$$r(t) = \frac{2}{5} D_{00}^2(t) R_2^{pr}(t). \quad (\text{В.12})$$

Коэффициент анизотропии в уравнении (В.12) зависит от времени из-за вклада нескольких эффектов. Первый член в уравнении (В.12) описывает вра-

щательную диффузию, происходящую из-за дисперсии распределения направлений молекулярных осей [170]:

$$D_{00}^2(t) \sim e^{-t/\tau_r}. \quad (\text{B.13})$$

Второй член в уравнении (B.12) зависит от времени из-за изменения угла  $\theta$  между дипольными моментами  $\mathbf{d}^{pu}$  и  $\mathbf{d}^{pr}$ . Было сделано предположение, что возбуждение до состояния S1 при  $t = 0$  приводит к образованию колебательного волнового пакета, который описывается матрицей плотности  $\rho_{v_1 v_1'}(0)$ . В рамках Марковского приближения, подходящего для наших экспериментальных условий, релаксация многоуровневой колебательной системы в состоянии S1 может характеризоваться временем релаксации  $\tau_v$ . Время колебательной релаксации  $\tau_v$  определяется как фазировкой колебательных мод, так и затуханием из-за взаимодействия с молекулами растворителя. В рамках этого приближения член  $R_2^{pr}(t)$  в уравнениях (B.8) и (B.12) может быть представлен в виде:

$$R_2^{pr}(t) \approx A_1 + (A_0 - A_1)e^{-t/\tau_v}, \quad (\text{B.14})$$

где независимые от времени члены  $A_0$  и  $A_1$  определяют значения члена  $R_2^{pr}(t)$  в ядерных конфигурациях, которые относятся к основному молекулярному состоянию  $S_0$  при  $t = 0$  и состоянию  $S_1$  (при  $t \rightarrow \infty$ ), соответственно:  $A_0 = R_2^{pr}(t)|_{t=0}$ ,  $A_1 = R_2^{pr}(t)|_{t \rightarrow \infty}$ .