

Белорусский государственный университет

УДК 535.371: 535.354: 535.338.42

**Маскевич
Александр Александрович**

**ДИНАМИКА ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ПРОЦЕССОВ В
МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРАХ В РАСТВОРАХ И АДсорБИРОВАННОМ
СОСТОЯНИИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук
по специальности 01.04.05 – оптика

Минск, 2016

Работа выполнена

в УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы».

Научный консультант – **Туроверов Константин Константинович,**

доктор физико-математических наук, профессор,
заместитель директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Институт цитологии
Российской академии наук», г. Санкт-Петербург.

Официальные оппоненты: **Зенькевич Эдуард Иосифович,**

доктор физико-математических наук, профессор,
профессор кафедры технической физики
Белорусского национального технического
университета;

Комяк Анатолий Иванович,

доктор физико-математических наук, профессор,
профессор кафедры лазерной физики и
спектроскопии Белорусского государственного
университета;

Крук Николай Николаевич,

доктор физико-математических наук,
заведующий кафедрой физики
УО «Белорусский государственный технологический
университет».

Оппонирующая организация – ГНУ «Институт физики НАН Беларуси».

Защита состоится 08 апреля 2016 г. в 14-00 на заседании совета по защите
диссертаций Д **02.01.17** при Белорусском государственном университете по
адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 8 (корпус юридического
факультета), ауд. 407. Телефон 8-017 209-57-09.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке
Белорусского государственного университета.

Автореферат разослан _____ 2016 г.

Ученый секретарь совета

по защите диссертаций

доктор физико-математических наук

профессор

И.М. Гулис

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что после поглощения кванта света происходит изменение электронной структуры молекулы, которое часто сопровождается изменением ее геометрии. Органические красители, у которых после поглощения света происходит поворот одного фрагмента относительно другого, сопровождаемый внутримолекулярным переносом заряда, получили название молекулярных роторов. Благодаря конформационной лабильности, молекулярные роторы рассматриваются как перспективные зонды для определения вязкости жидкостей, в особенности в локально малых объемах (мембраны, клетки, капилляры кровеносных сосудов). Возможность управления внутримолекулярным движением может быть использована для построения устройств, имеющих нанометровые размеры, - молекулярных моторов или молекулярных машин. Управление таких «молекулярных устройств» можно осуществить с помощью световых импульсов, причем время их срабатывания может составлять несколько пикосекунд. Несмотря на перспективы практического применения, фотофизические свойства, структура молекулярных роторов, в особенности в адсорбированном состоянии и при встраивании в макромолекулы, изучены недостаточно.

Бензтиазоловое производное, тиофлавин Т (ThT), является одним из соединений, молекулы которого могут быть использованы для исследования быстрых фотопроцессов благодаря большой амплитуде торсионного движения его молекулярных фрагментов. ThT также широко используется в биомедицинской аналитике для детекции амилоидных фибрилл.

К моменту начала исследований, представленных в настоящей работе, процессы трансформации энергии и структуры молекулы в возбужденном состоянии, механизм встраивания красителя в амилоидные фибриллы, а также причины значительного увеличения квантового выхода флуоресценции были неизвестными.

Большое значение для изучения быстрых фотопроцессов в молекулярных роторах имеет использование кинетической флуорометрии. Однако кинетическая флуорометрия не нашла широкого применения для их изучения в силу отсутствия методов анализа кривых затухания флуоресценции сложных, гетерогенных систем.

Таким образом, данная работа направлена на изучение фотофизических свойств и структуры молекулярных роторов на примере ThT в растворах, адсорбированном состоянии и в составе макромолекулярных комплексов, а также на развитие методов кинетических исследований сложных молекулярных комплексов. Решение этих вопросов не только создает теоретическую базу флуоресцентной спектроскопии молекулярных роторов, но и позволяет предложить конкретные схемы их практического применения.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках следующих научных программ и отдельных проектов: Республиканская программа фундаментальных исследований «Фотон-БГУ», № госрегистрации 19961890, 1996–2000 гг., задание «Изучение комбинационного рассеяния света и люминесценции молекулярных систем с разными уровнями организации, адсорбированных на шероховатых поверхностях металлов»; проект INTAS, № 2001–2100, № госрегистрации 2003191, 2002–2004 гг., «Люминесценция и комбинационное рассеяние света в периодических наноструктурах»; проект INTAS, № 2001–2331, № госрегистрации 2003190, 2002–2004 гг., «Полупроводниковые нанокристаллы как эффективные флуоресцентные метки: синтез, биоконъюгация и применение в неизотопном анализе биомолекул»; № 5-01 Спектроскопические проявления специфических взаимодействий противоопухолевых препаратов с биомолекулярными системами *in vitro*; программа Министерства образования Республики Беларусь на 2001–2005 гг. «Спектроаналитика», задание «СПАН 1-14», № госрегистрации 200214, A22-01 «Изучение межмолекулярных взаимодействий в системе белок – органический лиганд методом многопараметрического анализа флуоресценции и молекулярного моделирования»; государственная комплексная программа научных исследований «Молекулярные и клеточные механизмы жизнедеятельности растительных и животных систем как основа для разработки новых сельскохозяйственных и медицинских технологий», 2006–2010 гг., № госрегистрации 200 759, задание «Молекулярные основы взаимодействия некоторых биологически активных соединений с мишенями раковых клеток и механизмы устойчивости эритроцитов к различным гемолизирующим агентам» (Биологическая инженерия и биобезопасность 53.); проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Б97-387 № госрегистрации 19983145 1998–2000 гг. «Структурно-функциональные перестройки микросомальных мембран печени при модификации альдегидами и их связь с функционированием системы микросомального окисления»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Х04Р-169, 2004–2006 гг., № госрегистрации 20044280 «Исследование структуры и динамики полимеризации амилоидных фибрилл при использовании в качестве флуоресцентных меток водорастворимых полупроводниковых наноструктур»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Х06Р-115, № госрегистрации 200 772, 2006-2008 гг. «Механизм избирательного взаимодействия тиофлавина Т с амилоидными фибриллами. Тиофлавин Т как молекулярный ротор»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ №

X08P-217, № госрегистрации 20083022, 2008–2010 гг. «Различные представления о спектральных свойствах тиофлавина Т и механизмах его инкорпорации в амилоидные фибриллы. Что же на самом деле?»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Ф09МС-046, № госрегистрации 20103194, 2009–2011 гг. «Сверхбыстрые фотоиндуцируемые процессы в молекулярных роторах»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Ф11МС-046, № госрегистрации 20126050, 2011–2013 гг., «Структурные превращения молекулы тиофлавина Т в адсорбированном состоянии: исследование методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) и квантово-химических расчетов»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Х10Р-227, № госрегистрации 20103210, 2010–2012 гг., «Специфичность инкорпорации тиофлавина Т в амилоидные фибриллы. Взаимодействие красителя с белками в нативном состоянии, нуклеиновыми кислотами, мицеллами и полиэлектролитами»; проект Фонда фундаментальных исследований РБ № Ф12Р-198, № госрегистрации 20123413, 2012–2014 гг., «Химически модифицированные формы тиофлавина Т – новые зонды для детекции и изучения структуры амилоидных фибрилл».

Тема диссертации отвечает следующим приоритетным направлениям, утвержденным постановлением Совета Министров РБ от 19 апреля 2010 г. № 585 «Об утверждении перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы»:

3.5. биоинформатика, нанобиология; 4.5. новые устройства для диагностики и лечения заболеваний человека, включая разработанные с использованием молекулярно-генетических технологий и применением физических факторов; 5.1. методы математического и компьютерного моделирования, компьютерные технологии и интеллектуальные системы поддержки принятия решений; 5.12. аппаратно-программное обеспечение измерительно-управляющих систем, приборов и датчиков, цифровая обработка сигналов, средства автоматизации промышленных предприятий, транспорта и испытательных центров; 6.1. фундаментальные проблемы взаимодействия излучения с неорганическими и органическими веществами в разных фазах, в том числе с биологическими тканями, клеточными структурами и организмами; 6.8. физические процессы в эпитаксиальных многослойных структурах, тонких полупроводниковых и диэлектрических пленках, на границах раздела между слоями и технологии создания таких структур; 12.4. нанотехнологии для медицинских и биологических приложений.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось определение механизма фотоиндуцированных процессов в молекулах красителей, обладающих структурной лабильностью

(молекулярных роторов), в растворах, адсорбированных на поверхности и в составе супрамолекулярных комплексов.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи.

1. Определение основных фотофизических процессов, определяющих спектрально-кинетические характеристики флуоресценции молекулярных роторов в модельных системах на примере ThT.

2. Исследование спектрально-люминесцентных свойств молекулярных роторов на примере ThT при его встраивании в нативные белки и их агрегаты, в том числе и в АФ и объяснение причин значительного увеличения квантового выхода при встраивании красителя в АФ.

3. Определение наиболее информативных для диагностических целей параметров флуоресценции красителя, встроенного в АФ.

4. Изучение колебательных спектров (ИК, КР и ГКР) ThT и определение структуры и фотофизических свойств молекулы в растворе, в адсорбированном состоянии, а также в составе комплекса с амилоидными фибриллами.

5. Разработка программно-аппаратного комплекса, включающего установку для измерения длительности затухания флуоресценции в пикосекундном и наносекундном временных диапазонах, а также методику и программное обеспечение, позволяющие моделировать функцию затухания свечения с учетом гетерогенности микроокружения, а также торсионной и сольватной релаксации.

Объектами исследования являлись красители, обладающие фотоиндуцированным внутримолекулярным переносом заряда (ВМПЗ), в том числе красители, у которых ВМПЗ сопровождается поворотом одних фрагментов относительно других, - молекулярные роторы – тиофлавин Т (ThT) и его производные.

Предметом исследования служили фотофизические процессы, протекающие в молекулярных роторах и других красителях, для которых характерен ВМПЗ. Основное внимание было уделено объяснению физических причин зависимости их спектральных свойств от полярности и вязкости микроокружения и стехиометрии встраивания в макромолекулы.

Выбор данных объектов исследования не случаен. Тиофлавин Т широко используется для детекции и исследования АФ, которые являются индикатором возникновения ряда социально значимых заболеваний. Он также является чувствительным флуоресцентным зондом для определения вязкости жидкостей в микрообъемах. Для выяснения влияния роли отдельных функциональных групп на спектральные свойства красителя исследовались также его производные ВТА-1 и ВТА-2.

Использование в качестве экспериментальных систем концентрированных

растворов, пленок поливинилового спирта, а также комплексов красителя с амилоидными фибриллами, с белками и ДНК позволило определить наиболее важные параметры флуоресценции ThT, которые могут быть использованы для медико-биологических приложений.

Научная новизна

В работе предложена модель протекания фотофизических процессов в молекулярных роторах после поглощения кванта света, позволяющая объяснить спектральные свойства флуоресцентного зонда ThT в растворах и при встраивании в амилоидные фибриллы. Эта модель служит основой для нового подхода к использованию флуоресцентных зондов для детекции и исследования амилоидных фибрилл и других белковых агрегатов.

На примере ThT предложена новая методика анализа кинетики затухания флуоресценции комплексов молекулярных роторов с макромолекулами, основанная на представлении кинетики непрерывным распределением флуорофоров по длительности свечения. Данная методика позволяет использовать ThT как флуоресцентный зонд для биофизических и диагностических исследований процессов агрегации белков и детекции амилоидных фибрилл.

В работе впервые выполнено отнесение колебательных полос ThT и рассмотрены процессы, определяющие интенсивность основных колебательных полос и флуоресценции молекул красителя, адсорбированных на ГКР-активные субстраты.

Предложена новая схема супрамолекулярного комплекса «ThT - амилоидные фибриллы», на основании которой показана связь параметров кинетики затухания флуоресценции со стехиометрией встраивания зонда в структуру биополимера. Предложено теоретическое обоснование специфичности молекулярных роторов по отношению к амилоидным фибриллам и другим белковым агрегатам.

Дано объяснение аномально высокого значения степени поляризации флуоресценции растворов молекулярных роторов, у которых торсионная релаксация является процессом тушения флуоресценции; впервые приведены экспериментальные доказательства того, что торсионная релаксация протекает за время, значительно меньшее, чем броуновское вращение молекулы в целом.

Положения, выносимые на защиту

1. Модель фотофизических процессов в молекулярных роторах, включающая схему энергетических уровней, структуру молекулы в основном и возбужденном состоянии и схему внутримолекулярного переноса заряда, позволяет объяснить спектральные свойства флуоресцентного зонда тиофлавина Т и его производных в растворе и в составе супрамолекулярных комплексов.

Квантовый выход, длительность затухания свечения тиофлавина Т и его производных определяются скоростью торсионной релаксации фрагментов молекул друг относительно друга, являющейся основным тушащим процессом. Данные красители в катионной форме являются молекулярными роторами.

2. Высокое, близкое к предельному, значение степени поляризации флуоресценции МР, в том числе и тиофлавина Т, в растворах является следствием того, что фотоиндуцированное торсионное вращение, определяющее длительность затухания флуоресценции красителя, осуществляется за время, много меньшее времени вращения молекулы в целом.

Анизотропия флуоресценции тиофлавина Т и других молекулярных роторов, у которых торсионная релаксация является тушащим процессом, не является информативным параметром, отражающим структуру или динамику молекул флуорофоров и их микроокружения.

3. Молекулярные роторы являются наиболее селективными флуоресцентными зондами для детекции и исследования амилоидных фибрилл и других упорядоченных белковых агрегатов.

Значительное (почти на три порядка) увеличение квантового выхода и длительности затухания флуоресценции тиофлавина Т в присутствии в растворе амилоидных фибрилл связано с ограничением торсионной подвижности фрагментов молекул красителя при их встраивании в белковую структуру.

4. Новый подход, основанный на совместном использовании данных стационарной и кинетической флуорометрии, при представлении кинетики затухания флуоресценции непрерывным распределением, создает теоретическую основу использования тиофлавина Т как флуоресцентного зонда для биофизических и диагностических исследований процессов агрегации белков и диагностики амилоидоза.

5. Перенос заряда, который имеет место при сорбции тиофлавина Т на поверхность серебряных наночастиц, не сопровождается нарушением нативности молекулы красителя. Интенсивность колебательных полос спектров ГКР тиофлавина Т на ГКР-активных субстратах определяется вероятностью возбуждения локализованных плазмонов на поверхности серебряных наночастиц и электронных состояний с переносом заряда комплекса ThT-Агколлоид.

Взаимодействие красителя с поверхностью серебряных наночастиц осуществляется через атом серы тиазолового кольца молекулы; встраивание в амилоидные фибриллы происходит посредством метильных групп, связанных с атомами азота тиазолового и бензольного колец.

6. Предложенная на основании данных флуоресцентной и колебательной (ГКР) спектроскопии схема супрамолекулярного комплекса «тиофлавин Т-

амилоидные фибриллы», предполагает две моды встраивания красителя в мономерной форме в белковую структуру, отличающиеся жесткостью микроокружения.

Двухмодальная кинетика затухания флуоресценции тиофлавина Т, интеркалированного в амилоидные фибриллы, отражает возможность двух вариантов встраивания красителя в мономерной форме в белковую структуру, отличающихся жесткостью микроокружения.

7. Программно-аппаратный комплекс, включающий субнаносекундный флуорометр и методическое обеспечение, позволяет производить измерения и анализ кинетики затухания флуоресценции красителей и их комплексов, отличающихся значительной гетерогенностью (в растворах, адсорбированном состоянии и при встраивании в макромолекулы).

Личный вклад соискателя ученой степени

Цель и основные задачи исследования сформулированы соискателем в результате их обсуждения с научным консультантом профессором К.К. Туроверовым. Экспериментальные и теоретические исследования, анализ результатов и их интерпретация выполнены соискателем лично.

Соавторы публикаций С.А. Маскевич, Л.Н. Кивач, Г.А. Гачко участвовали в постановке задач, обсуждении результатов исследований и написании отдельных частей публикаций, которые в данной работе не используются.

Соискателем была создана экспериментальная установка – импульсный флуорометр, разработаны методики проведения измерений и обработки данных с использованием метода наименьших квадратов. В.И. Степура, С.К. Башарину принадлежит программная реализация разработанных методов анализа. П.Т. Балинский, С.А. Кургузенков, А.В. Лавыш участвовали в тестировании методик измерений и компьютерных программ в рамках выполнения дипломных и магистерских работ, руководителем которых являлся соискатель. Коллеги из ГрГУ В.И. Степура, С.А. Кургузенков, А.В. Лавыш совместно с В.А. Кузмицким также выполнили часть квантово-химических расчетов энергии и структуры ThT в основном и возбужденном состоянии. Постановка задачи для вычислений и интерпретация результатов расчетов осуществлялась самим соискателем.

Все представленные в работе спектрально-люминесцентные исследования, обработка, анализ результатов и их интерпретация выполнены соискателем лично. Измерения с помощью динамической фемтосекундной спектроскопии проведены коллегами в Институте Физики НАН Беларуси под руководством С.А. Тихомирова. И.П. Черенкевич, И.Б. Заводник, И.М. Арцукевич, А.В. Арцукевич, В.У. Буко, И.В. Тарасюк, М.В. Борисюк, Т.С. Глебович, М.В. Легеда, В.Е. Воронич, А.Ю. Лицкевич занимались

подготовкой биоматериалов, определяли условия, обеспечивающие нативность образцов при проведении спектральных исследований.

Н.Д. Стрекаль, А.Е. Герман, Г.Т. Василюк, В.Ф. Осирко, О.С. Кулакович, И.Р. Набиев, А.В. Феофанов, В.А. Олейников, Р.С. Адамчик, И.Ф. Свекло, С.Г. Подтынченко проводили исследования оптических свойств плазмонных пленок серебра, коллоидных наночастиц и других ГКР-активных субстратов, условий получения максимального усиления вторичного излучения исследованных в настоящей работе красителей.

Разработка методов получения, исследований амилоидных фибрилл, синтез и очистка красителей, проверка их гомогенности осуществлялась В.Н. Уверским, а также коллегами из г. Санкт-Петербурга под руководством КК. Туроверова и коллегами из БГУ под руководством Е.С. Воропая в рамках совместных белорусско-российских проектов. Эти же исследователи участвовали в обсуждении результатов исследований взаимодействия ThT с амилоидными фибриллами и подготовке материалов публикаций, не вошедших в данную диссертацию.

Е.Е. Трофименко участвовал в написании раздела учебного пособия, материалы которого не использовались в данной работе.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований, включенные в диссертацию, были доложены на следующих международных научных конференциях, съездах и симпозиумах: Международная конференция «Современные проблемы лазерной физики и спектроскопии» (Беларусь, Гродно, 1993); 5th International Conference on Laser Applications in Life Sciences (Belarus, Minsk, 1994); 6th International Conference on Laser Applications in Life Sciences (Germany, Jena, 1996); XVIIIth International Conference on Photochemistry (Poland, Warsaw, 1997); III Международной конференции по Лазерной физике и спектроскопии (Беларусь, Минск, 1997); The Jablonski Centennial Conference on Luminescence and Photophysics (Poland, Torun, 1998); 8th European Conference on the Spectroscopy Biological Molecules (Netherlands, Enschede, 1999); XXV European Congress of Molecular Spectroscopy, EUCMOS XXV (Portugal, Coimbra, 2000); 3, 4 съезд Белорусского общества фотобиологов и биофизиков (Беларусь, Минск, 1998, 2000); Международная научная конференция «Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (2002); VI–XI съезды Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Беларусь, Минск, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014); VI международная научная конференции «Лазерная физика и оптические технологии» (Беларусь, Гродно, 2006; Минск, 2010); VIII Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Россия, Пушкино, 2004); 11th. European conference Spectroscopy

Biological Molecules (Germany, Auschaffenburg, 2005); The International Conference on Nano/molecular Photochemistry and Nanomaterials for Green Energy Development [Solar`10] (Egypt, Cairo, 2010); III Italian Meeting on Raman Spectroscopy and Non-Linear Optical Effects (CIRS–2014) (Italia, Parma, 2014).

Результаты диссертации Маскевича А.А. используются в учебном процессе физико-технического факультета ГрГУ им. Я. Купалы при чтении лекций и выполнении лабораторных работ по курсу «Оптика» и спецкурсам «Математические методы анализа», «Физико-химические методы анализа» (издано 3 учебных пособия).

Разработанный соискателем программно-аппаратный комплекс используется в ГрГУ им. Я. Купалы для выполнения ряда научных проектов.

Методы анализа кривых затухания флуоресценции внедрены в научный процесс в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)».

Разработка «Программное обеспечение для анализа кинетики затухания флуоресценции» реализована как коммерческий продукт в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Университет ИТМО, Российская Федерация).

Опубликованность результатов диссертации

Основные результаты диссертации опубликованы в 58 научных работах, из которых 32 статьи в научных изданиях в соответствии с требованиями п.18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (общим объемом 19 авторских листов), 2 статья в других научных изданиях, 19 статья в сборниках материалов научных конференций, 7 тезисах.

По результатам диссертации опубликовано 3 учебных пособия.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из оглавления, перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, шести глав, заключения, библиографического списка и приложения. Полный объем диссертации составляет 233 страницы. Диссертация содержит 88 рисунков, занимающих в совокупности 36 страниц, 18 таблиц на 13 страницах и 1 приложение на 13 страницах. Библиографический список состоит из 353 наименований, включая собственные публикации автора, и занимает 29 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **Главе 1** диссертации рассмотрены объекты и методы исследований.

Описана методика приготовления образцов, приведены структурные формулы исследованных красителей. Изложена методика измерений спектров флуоресценции, КР и ГКР. Дано подробное описание ГКР-активных субстратов, методика их получения и модификации.

Для определения структуры молекул в основном и возбужденном состоянии проводились квантово-химические расчеты, использующие методы *ab initio*, полуэмпирические, а также методы, основанные на теории функционала плотности (DFT-методы). Подробно рассмотрена процедура расчета колебательных спектров тиюфлавина Т (ThT).

Значительное место в главе занимает описание разработанного соискателем пикосекундного флуорометра. Изложена методика выполнения измерений, а также обработки данных. Для определения временного разрешения флуорометра разработана оригинальная методика, основанная на зависимости длительности и квантового выхода флуоресценции молекулярных роторов от вязкости раствора. Из полученных данных следует, что если длительность флуоресценции не менее 60 пс, то относительная погрешность ее определения не превосходит 10 %.

Во второй главе рассмотрены разработанные методы анализа экспериментальных данных, позволяющее представлять функцию затухания в виде непрерывного распределения флуорофоров $\alpha(\tau)$ по константам излучательных переходов. В качестве распределения $\alpha(\tau)$ использовалась сумма нескольких гауссиан или распределение произвольной формы. Численный эксперимент показал, что относительная погрешность определения параметров распределения Гаусса для большинства практически важных случаев не превышает 5 %.

Метод максимума энтропии (МЭМ) для анализа кинетики затухания флуоресценции. Согласно МЭМ искомое распределение $\alpha(\tau)$ определяется в результате поиска максимума функционала Ψ :

$$\Psi = S - \mu(\chi^2 - 1), \quad (1)$$

где S – функция энтропии, μ – дополнительный варьируемый параметр, χ^2 – функционал, имеющий следующий вид:

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N W_i [I(t_i) - I_{calc}(t_i)]^2, \quad (2)$$

где, в свою очередь, $I(t_i)$ и $I_{calc}(t_i)$ – экспериментальные и расчетные значения функции затухания, $W(t_i)$ – соответствующий статистический вес. В соответствии с МЭМ производится выбор такой функции $\alpha(\tau)$ из набора возможных, одинаково хорошо описывающих кинетические данные, которая максимизирует функцию энтропии S :

$$S = \int_0^{\infty} \left[\alpha(\tau) - m(\tau) - \alpha(\tau) \log \frac{\alpha(\tau)}{m(\tau)} \right] d\tau, \quad (3)$$

где $m(\tau)$ – стартовая модель, описывающая наиболее вероятное априорное распределение флуорофоров по временам затухания флуоресценции.

В зависимости от того, какое значение при анализе принимает параметр μ , роль энтропии или функционала χ^2 , т. е. их влияние на выбор искомого распределения $\alpha(\tau)$, будет изменяться.

Для определения точности восстановления спектра распределения по длительности свечения проведена серия модельных экспериментов. Установлено, что при анализе данных, где число отсчетов в максимуме составляет $5 \cdot 10^3$ – $5 \cdot 10^4$, оптимальным является значение параметра регуляризации $\mu \approx 1$, которое позволяет получать с хорошим качеством подгонки достаточно узкое и гладкое распределение, не содержащее при этом дополнительной структуры, не характерной для данной модели.

Результаты моделирования позволили сформулировать практические критерии, следуя которым можно сделать правильный выбор относительно использования модели дискретного или непрерывного распределения флуорофоров по длительности затухания свечения при анализе кривых затухания флуоресценции.

Глава 3 посвящена фотофизическим свойствам тиюфлавина Т в модельных условиях.

В молекуле ThT выделено три фрагмента (рисунок 1): бензтиазольное кольцо (фрагмент I), бензольное кольцо (фрагмент II) и диметиламиногруппа (фрагмент III). Для того, чтобы определить и проанализировать возможные конформации ThT в основном и возбужденном состоянии, выбраны два торсионных угла (рисунок 1): ϕ (N8-C10-C12-C13) и ψ (C14-C15-N18-C19). В значительной степени эти два угла полностью определяют пространственную структуру молекулы.

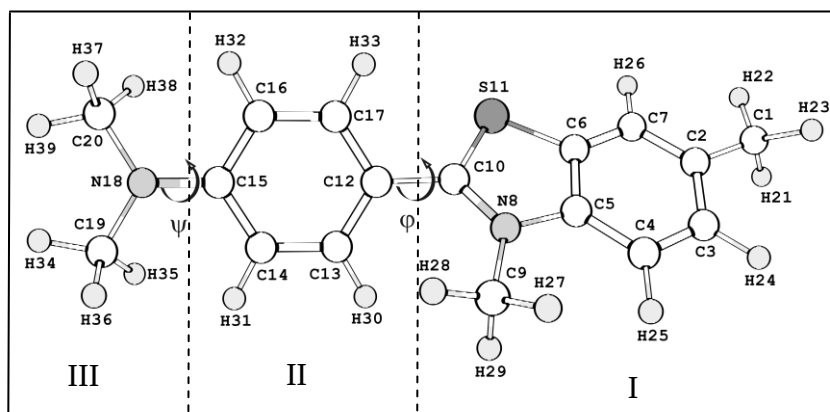
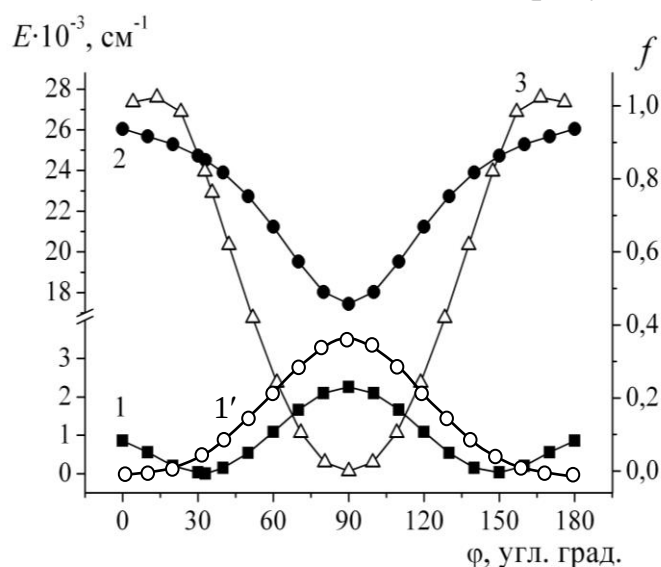


Рисунок 1. – Химическая структура и пространственная модель катиона ThT

Квантово-химический расчет молекулы ThT в основном состоянии свидетельствует о том, что зависимость энергии молекулы от угла φ между бензтиазольным и аминобензольным кольцами имеет минимумы, разделенные невысокими энергетическими барьерами (700 см^{-1} по данным полуэмпирических методов, или $1200\text{--}1500 \text{ см}^{-1}$ по данным *ab initio* методов в базисах 3-21G, 6-31G), в то время как энергетический барьер, препятствующий вращению диметиламиногруппы, гораздо выше ($\sim 4000 \text{ см}^{-1}$).

Наличие метильной группы, присоединенной к атому азота бензтиазольного кольца, препятствует реализации строго планарной конформации колец и обуславливает существование энергетического барьера при $\varphi = 0$ (180°). Квантово-химический расчет аналога молекулы ThT, в котором метильная группа при атоме азота N5 замещена на атом водорода (2-(4'-(диметиламино)фенил)-6-метил-бензтиазол, ВТА-2), показал, что его молекула в основном состоянии является плоской (рисунок 2).



Расчет производился методом *ab initio* методом в базисе 3-21G/RHF

Рисунок 2. – Зависимость энергии основного (1, 1'), возбужденного (2) состояния и силы осциллятора перехода $S_1 \rightarrow S_0$ (3) молекулы ThT (1, 2, 3) и ВТА-2 (1') от торсионного угла φ

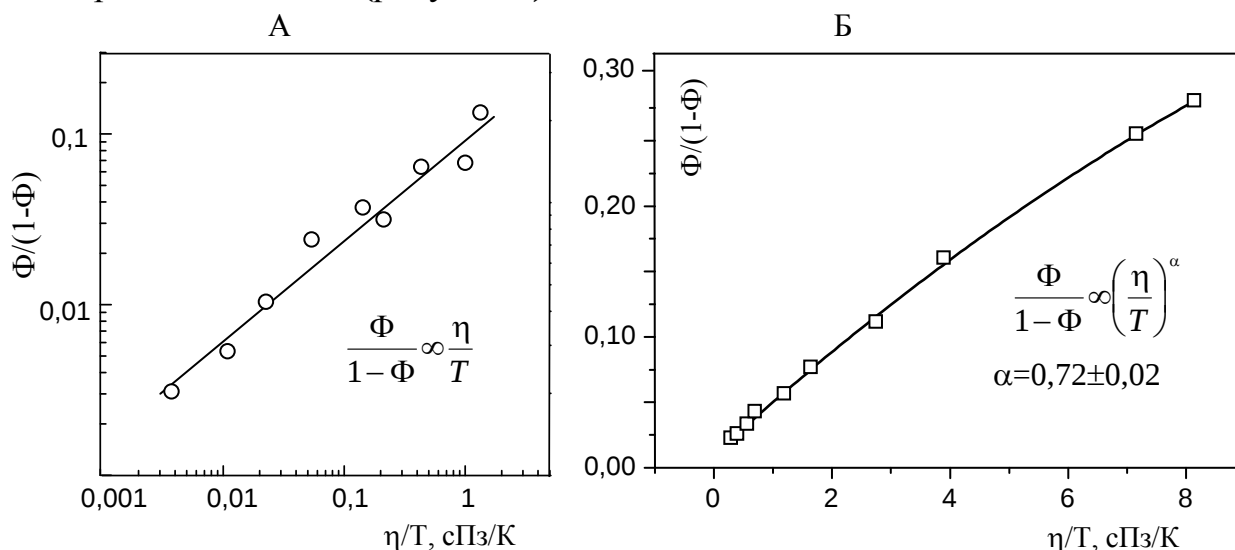
В основном состоянии положительный заряд сосредоточен преимущественно на бензтиазольном кольце (фрагменте I, рисунок 1). Он составляет $+0.6e$ при $\varphi = 0^\circ$, $+0.7e$ при $\varphi = 37^\circ$ и $+0.8e$ при $\varphi = 90^\circ$. Заряд на фрагментах II и III при этих углах φ составляет, соответственно, $+0.4e$, $+0.3e$ и $+0.2e$. Переход в возбужденное Франк-Кондоновское состояние S_1^* сопровождается существенным перераспределением электронной плотности, связанной с переносом отрицательного заряда на фрагмент I.

Неравномерное распределение зарядов между фрагментами молекулы ThT в основном состоянии и его существенное перераспределение при переходе в возбужденное состояние приводит к тому, что в полярном

растворителе изменение (уменьшение) энергии молекулы в основном состоянии значительно больше, чем в возбужденном. По этой причине увеличение полярности растворителя сопровождается коротковолновым сдвигом спектра поглощения ThT.

Для объяснения причин значительного возрастания квантового выхода флуоресценции ThT в вязких растворах и в присутствии в водных растворах амилоидных фибрилл, сделано предположение о существовании зависящего от вязкости канала деактивации возбужденного состояния ThT. Этот канал дезактивации связан с торсионным вращением бензтиазольного и аминобензольного колец, сопровождаемым внутренней конверсией в основное состояние. Подтверждением тому служат результаты квантово-химических расчетов (рисунок 2), из которых следует, что сила осциллятора перехода $S_1(\text{TICT}) \rightarrow S_0$, равна нулю, т.е. релаксированное состояние является неизлучающим. Квантовый выход флуоресценции Φ , таким образом, определяется главным образом соотношением константы излучательного перехода k_r и скорости торсионной релаксации k_ϕ ; последняя зависит от температуры T и вязкости раствора η : $\frac{\Phi}{1-\Phi} = \frac{k_r}{k_\phi} \propto \frac{\eta}{T}$.

Для экспериментальной проверки этого предположения рассмотрена зависимость квантового выхода флуоресценции зонда от вязкости, которая изменялась, варьированием температуры и содержания глицерина в водно-глицериновых смесях (рисунок 3).



Кривая 1 измерена при температуре 293 К,
кривая 2 измерена в 99% глицерине. $\lambda_{\text{возб}} = 410 \text{ нм}$

Рисунок 3. – Зависимость квантового выхода флуоресценции ThT от вязкости (А) и температуры растворителя (Б)

Полученные экспериментальные данные показывают, что в водно-глицериновых растворах при 293 К величина $\frac{\Phi}{1-\Phi}$ для ThT изменяется пропорционально величине η/T (рисунок 3, А). Это подтверждает тот факт, что в водно-глицериновых растворах константа тушения определяется торсионной релаксацией фрагментов молекулы красителя. Однако, аналогичная зависимость для ThT в 99 % глицерине, вязкость которого изменялась нагреванием раствора, является нелинейной, что объясняется пространственной неоднородностью вязких растворов и существованием в них «свободного объема» в виде полостей.

Энергия активации процесса безызлучательной дезактивации ThT в глицерине (99%), определенная на основании зависимости квантового выхода от температуры и вязкости ($\Delta E = 4700 \pm 300 \text{ см}^{-1}$), оказалась близкой к энергии активации вязкого течения глицерина $\Delta E(\eta) = 5200 \text{ см}^{-1}$. Это служит убедительным доказательством того, что вращательная релаксация фрагментов молекулы ThT в возбужденном состоянии не связана с преодолением внутреннего активационного барьера и обусловлена исключительно вязкостью растворителя. Полученные результаты свидетельствуют о том, что флуоресцентные свойства ThT существенно зависят от вязкости растворителя. В растворителях с низкой вязкостью (вода, спирты при комнатной температуре) $\tau_{or} \ll \tau_r$ и поворот колец друг относительно друга в возбужденном состоянии происходит очень быстро. Как показывают квантово-химические расчеты, в результате торсионной релаксации молекула переходит в нефлуоресцирующее состояние (TICT-состояние) с разобщенной π -электронной системой. Константа скорости этого процесса, приводящего к безызлучательной дезактивации возбужденного состояния, определяется вязкостью растворителя.

Неравновесность состояния, из которого происходит флуоресценция ThT приводит к ее неэкспоненциальности. Измерения кинетики затухания флуоресценции красителя при значительном изменении вязкости раствора (рисунок 4), показали, что наиболее адекватным является моделирование функции затухания свечения с использованием непрерывного распределения. В качестве такого распределения удобно использовать функцию Гаусса. Положение максимумов распределений (τ_0) и их дисперсия (σ^2 , полуширина) при варьировании вязкости испытывают значительные изменения. Наибольшее значение (около 2,0 нс) средняя длительность флуоресценции и соответственно τ_0 имеет при температуре жидкого азота (-196 °С). При этой температуре распределение является чрезвычайно узким (рисунок 4), т. е. затухание флуоресценции является практически моноэкспоненциальным.

При повышении температуры глицеринового раствора величина τ_0 уменьшается, в то время как σ^2 для использованных температур имеет

максимальное значение при $T=289$ К. Дальнейшее повышение температуры раствора приводит к монотонному уменьшению полуширины распределения. Таким образом, неэкспоненциальность кинетики затухания флуоресценции является следствием неравновесности излучающего состояния растворов ThT, характерной для молекулярных роторов.

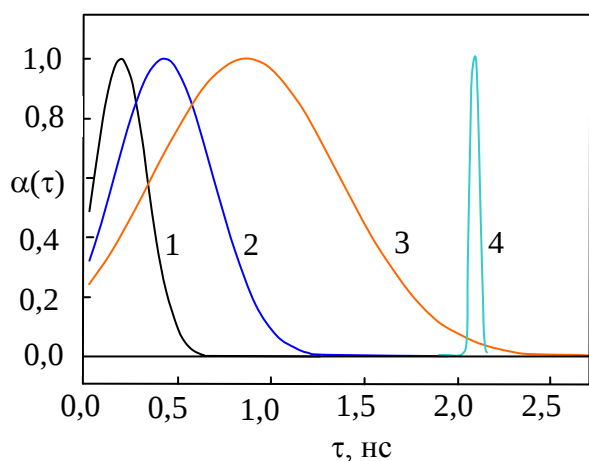


Рисунок 4. – Распределение $\alpha(\tau)$ для ThT в 99 % глицерине (1-3) и пропаноле (4) при $T=300$ (1), 289.5 (2), 278 К (3) и 77 К (4)

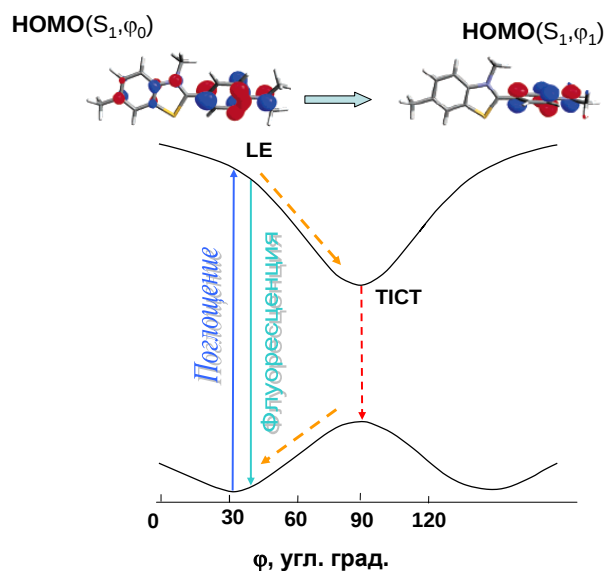
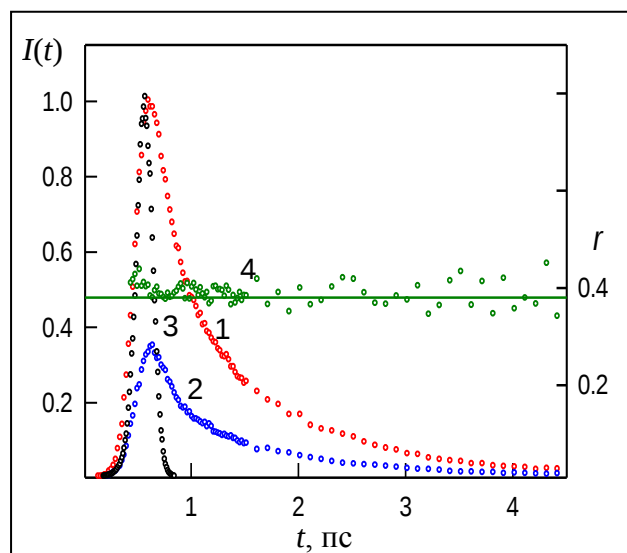


Рисунок 5. - Модель протекания фотопроцессов в молекуле ThT

Модель протекания фотопроцессов в молекуле ThT представлена на рисунке 5. В соответствии с этой моделью, в основном состоянии молекула ThT имеет неплоскую структуру, которой соответствует значение торсионного угла $\phi=37^\circ$. Минимуму энергии в возбужденном состоянии соответствует $\phi=90^\circ$. Поэтому после поглощения кванта света молекула красителя вследствие торсионного вращения переходит из неравновесного LE-состояния в релаксированное скрученное состояние (TICT-состояние). Поворот фрагментов I и II молекулы друг относительно друга сопровождается внутримолекулярным переносом заряда с бензтиазолового кольца на диметиламиногруппу (фрагмент III). В результате этого процесса происходит разрыв π -сопряжения бензолового и бензтиазолового колец. TICT-состояние является не флуоресцирующим. Излучение осуществляется только из неравновесного LE-состояния. Торсионная релаксация является тушащим процессом. Квантовый выход и длительность затухания флуоресценции красителя определяются главным образом соотношением констант скорости излучательного перехода и торсионной релаксации, которая зависит от вязкости или жесткости микроокружения, если краситель встраивается в макромолекулы. Так объясняется зависимость флуоресцентных свойств ThT от вязкости растворителя и причина значительного увеличения квантового выхода при встраивании в амилоидные фибриллы. Из рассмотренного выше следует, что причиной высокой чувствительности ThT к присутствию в растворе амилоидных фибрилл является

не специфичность их молекулярного взаимодействия, а влияние встраивания в белковую структуру на процесс внутримолекулярного тушения флуоресценции. Предложенная модель служит основой нового подхода к использованию флуоресцентных зондов для детекции и исследования амилоидных фибрилл и других белковых агрегатов.

Особенностью многих молекулярных роторов, в том числе и ThT, является высокое значение степени поляризации флуоресценции, близкое к предельному ($\sim 0,45$), которое наблюдается в растворителях, не зависимо от их вязкости. Это объясняется тем, что время вращательной релаксации молекулы ThT много больше времени торсионных колебаний фрагментов молекулы ThT друг относительно друга, приводящих к безызлучательной дезактивации ($\rho \gg \tau_{or}$). Таким образом, молекулы ThT не успевают существенно изменить свою ориентацию за время жизни возбужденного состояния. Это подтверждают прямые измерения кинетики затухания анизотропии флуоресценции ThT в маловязких растворителях с фемтосекундным временным разрешением, представленные на рисунке 6.



3 – временной профиль возбуждающего импульса

Рисунок 6. – Кинетика затухания вертикально $I_{\parallel}(t)$ (1) и горизонтально поляризованной компоненты $I_{\perp}(t)$ (2) и анизотропии затухания флуоресценции ThT в водном растворе (4)

Практически полное затухание интенсивности свечения для вертикально или горизонтально поляризованной компоненты флуоресценции осуществляется за время порядка 4 пс. Анизотропия флуоресценции за это время практически не изменяется, сохраняя предельно высокие значения $r=0,38$. Как уже было отмечено, длительность затухания флуоресценции ThT в маловязких растворителях определяется константой скорости торсионной релаксации, т.е. величиной ρ . Поэтому можно сделать вывод, что высокое, близкое к предельному значение степени поляризации флуоресценции МР, у

которых торсионная релаксация является тушащим процессом, в том числе и тиофлавина Т, в растворах низкой и высокой вязкости является следствием того, что фотоиндуцированное торсионное вращение, определяющее длительность затухания флуоресценции красителя, осуществляется за время, много меньшее времени вращения молекулы в целом.

Анизотропия флуоресценции тиофлавина Т и других молекулярных роторов не является информативным параметром, отражающим структуру или динамику флуорофоров и их микроокружения.

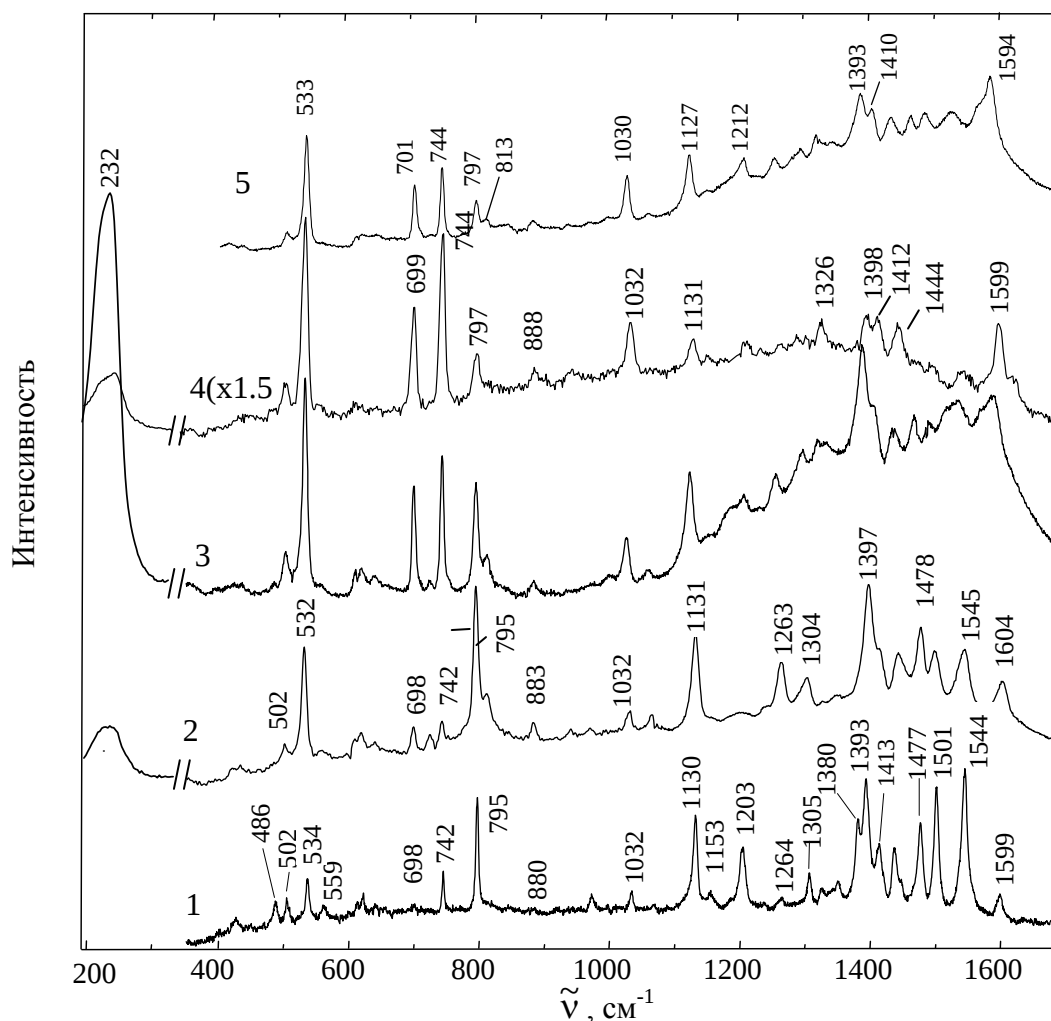
В главе 4 изучены спектры ИК, КР и ГКР тиофлавина Т в различных физико-химических условиях. Для отнесения полос колебательных спектров к типам колебаний выполнены соответствующие квантово-химические расчеты.

Наиболее интенсивными в спектрах КР являются полосы вблизи 800, 1200, 1400 и 1500 см^{-1} (рисунок 7), которые можно охарактеризовать как колебания всего скелета молекулы или С-Н связей ($\delta(\text{CH})$, $\rho(\text{CH}_3)$) одновременно различных фрагментов молекулы ThT.

Для изучения структурно-конформационных состояний адсорбированных молекул ThT и их связи с физико-химическими свойствами поверхности получены спектры ГКР красителя с использованием широкого набора ГКР-активных субстратов. В качестве таковых использованы цитратный гидрозо́ль серебра, тонкие серебряные пленки (ТСП) различной массовой толщины и топографии поверхности, модифицированные слоями полиэлектролитов. Данные ГКР-активные субстраты характеризуются также различным уровнем проявления электромагнитных и химических механизмов усиления ГКР, зависящим от длины волны возбуждения.

Анализируя приведенные на рисунке 7 спектры, можно выделить, по меньшей мере, три группы полос, отличающихся характером и степенью зависимости интенсивности от длины волны возбуждения. Во-первых, это полосы спектра ГКР, интенсивные при возбуждении 473 нм и слабые при возбуждении длиной волны 633 нм. Типичными представителями полос данной группы являются полосы при 795, 1131, 1260, 1397, 1478 и 1545 см^{-1} . Во-вторых, это полосы, подобные полосе 532 см^{-1} , относительная интенсивность которых не изменяется при переходе от $\lambda_{\text{возб}}=473$ к 633 нм. Примером такой группы полос является полоса при 1604 см^{-1} . И, в-третьих, группа полос, таких как 698, 742 и 1031 см^{-1} , относительная интенсивность которых возрастает при увеличении длины волны возбуждения.

Полосы первой группы, усиливающиеся благодаря электромагнитным взаимодействиям плазмонов с колебаниями адсорбированных молекул красителя, связаны с плоскостными колебаниями всего скелета молекулы. При этом в колебательное движение вовлечены практически все атомы циклов I, II и III.



Спектр КР ThT в порошке (длина волны возбуждения 633 нм, 1), спектр ГКР в цитратном золе, при длинах волн возбуждения 473 (2), 532, (3) и 633 нм (4) и при добавлении амилоидных фибрилл (5) при возбуждении 532 нм. Концентрация красителя $3 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Спектры (2–4) в области $190\text{--}340\text{ см}^{-1}$ уменьшены по интенсивности в 2 раза. Спектр ГКР, соответствующий возбуждению 633 нм, увеличен по интенсивности в 1.5 раза

Рисунок 7. – Спектры комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния ThT

Основной вклад в колебательные полосы 1397 и 1545 см^{-1} вносят валентные колебания $\nu(\text{C}_{10}\text{C}_{12})/\nu_{\text{as}}(\text{C}_5\text{N}_8\text{C}_{10})$. Для этих полос характерна значительная зависимость интенсивности от длины волны возбуждения (рисунок 7), причем полоса 1545 см^{-1} при красном возбуждении (633 нм) практически не проявляется. Характерно, что отмеченная зависимость имеет место как при низкой концентрации красителя ($6,0 \cdot 10^{-8}$ моль/л), когда адсорбированные на серебряной поверхности молекулы образуют монослой, так и при его высокой концентрации ($1,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Наблюдаемые зависимости объяснены как результат изменения вкладов различных механизмов усиления КР: увеличение концентрации красителя приводит к уменьшению роли молекулярных и увеличению роли электромагнитных механизмов, обладающих дальнодействием усиления; при длинноволновом

возбуждении имеет место обратный эффект, т.е. относительный вклад молекулярных механизмов увеличивается.

Усиление колебаний, ответственных за образование полос второй и третьей группы в спектре ГКР ThT, обусловлено в основном действием химических механизмов усиления и непосредственно связано с фотопереносом электрона с коллоидов серебра на хемисорбированные молекулы красителя. При этом, как видно из рисунка 7, наибольшее усиление рассеяния характерно для полос 698 и 742 см^{-1} . Колебание молекулы ThT с частотой 698 см^{-1} можно охарактеризовать как валентное $\nu(\text{C}_6\text{S}_{11})$ и деформационное $\delta(\text{C}_3\text{C}_4\text{C}_5)/\delta(\text{C}_2\text{C}_7\text{C}_6)$ в циклах I и II. При этом в процессе колебания смещения атомов цикла I происходят в направлении перпендикулярном длинной оси молекулы. Колебание молекулы с частотой 742 см^{-1} характеризуется как симметричное деформационное колебание $\delta(\text{C}_6\text{S}_{11}\text{C}_{10})$ кольца II и $\delta_s(\text{C}_{19}\text{N}_{18}\text{C}_{20})$ диметиламиногруппы, а также симметричное деформационное колебание $\delta(\text{CCC})$ колец I и III. В процессе колебаний смещения атомов циклов происходят преимущественно в направлении, перпендикулярном длинной оси молекулы ThT. Резонансный характер усиления именно полос 698 и 742 см^{-1} спектра ГКР ThT, проявляющийся при возбуждении в пределах полосы переноса заряда комплекса ThT- $\text{Ag}_{\text{коллоид}}$, и высокая интенсивность данных полос позволяют предположить, что молекулы красителя связываются с поверхностью металла атомом серы S_{11} и их короткая ось перпендикулярна поверхности.

Находясь в адсорбированном состоянии вблизи наноструктурированной поверхности серебра, молекулы ThT сохраняют нативную конформацию, характерную для растворов, которая проявляется в спектрах ГКР в виде серии характеристических полос скелетных колебаний, возбуждаемых локализованными плазмонами.

Рассматривая перспективы использования тиюфлавина Т в качестве флуоресцентного зонда в различных биомедицинских приложениях, представляется важным выяснить возможность повышения квантовой эффективности свечения молекул красителя в адсорбированном состоянии за счет использования специальных субстратов. Чтобы обеспечить резонансное взаимодействие плазмонных осцилляций и осцилляторов электронных переходов молекул тиюфлавина Т в качестве субстратов использовали о-ТСП с коротковолновым положением полосы спектра экстинкции (~ 470 нм). Были измерены спектрально-кинетические характеристики флуоресценции красителя, осажденного непосредственно на о-ТСП, а также на спейсорные мультислой, образованные полиэлектролитами ПСС и ПДАДМАХ и поливинилпиридином (14 нм). Последние были нанесены с применением технологии Ленгмюр-Блоджетт. Установлено, что увеличение квантового

выхода флуоресценции, имеющее место при адсорбции ThT вблизи поверхности ТСП, сопровождается значительным уменьшением длительности затухания свечения.

В пятой главе рассматриваются результаты исследования изменений спектральных свойств красителя при его встраивании в циклодекстрины, нативные и денатурированные белки, а также ДНК.

Увеличение квантового выхода и длительности затухания флуоресценции ThT при добавлении в раствор γ -CD (рисунок 8) вызвано образованием двух типов комплексов зонда с циклодекстрином – 1:1 и 1:2. Молекулы зонда, образующие комплекс второго типа, находятся в достаточно жестком окружении и имеют большую длительность затухания флуоресценции. Добавление в раствор ThT γ -CD при концентрации полисахарида вплоть до 10 ммоль/л не вызывает образование димеров красителя.

При добавлении в водные растворы ThT белков плазмы крови (САЧ или САБ) наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции (рисунок 8), что является результатом связывания молекул красителя с белковыми глобулами. Кинетика затухания флуоресценции зонда в этом случае является неэкспоненциальной и характеризуется двухмодальным распределением флуорофоров по длительности затухания свечения (рисунок 9).

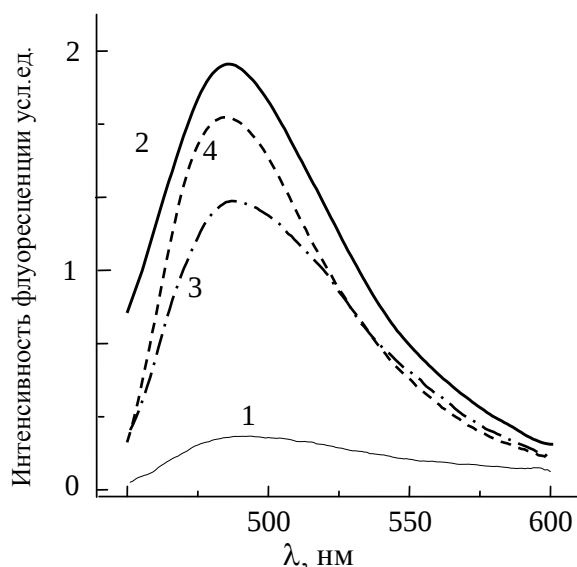


Рисунок 8. – Спектры флуоресценции ThT в воде (1) и в присутствии в растворе 4,5 мМ γ -CD (2), 1,0 мг/мл САЧ (3) и ДНК из эритроцитов цыпленка (4). Концентрация ThT 2,0 мкмоль/л, $\lambda_{\text{возб}}=420$ нм

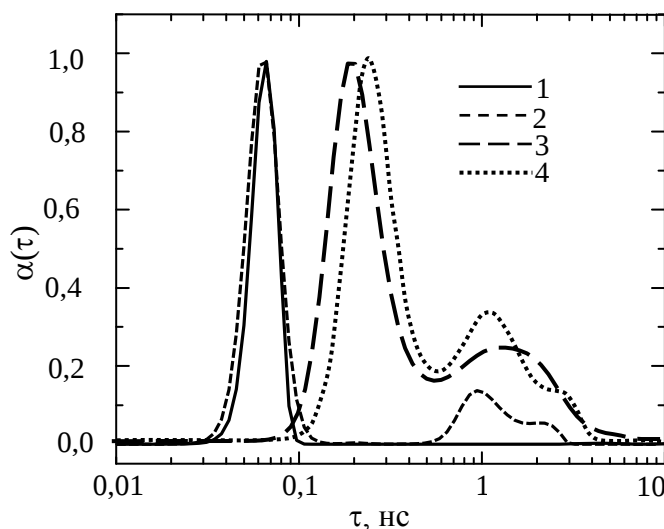


Рисунок 9. – МЭМ- анализ кривых затухания флуоресценции ThT в воде (1) и в присутствии в растворе 4,5 мМ γ -CD (2), 1,0 мг/мл САЧ (3) и ДНК из эритроцитов цыпленка (4). Концентрация ThT 2,0 мкмоль/л, $\lambda_{\text{возб}}=408$ нм

Увеличение процессов агрегации белка при повышении его концентрации, нагревании или добавлении ионов Cs^+ , приводит к возрастанию

вклада в свечение тех центров, которые характеризуются большей длительностью. Это позволяет сделать вывод о том, что две моды в кинетике затухания флуоресценции соответствуют двум типам встраивания зонда: встраивание в мономерные и агрегированные белки. Молекулы, зонда встроенные в белковые агрегаты, имеют большую длительность и, соответственно больший квантовый выход.

Анализ кинетики затухания флуоресценции красителя, встроенного в ДНК из эритроцитов цыпленка, с использованием метода максимума энтропии также показывает наличие трех мод в распределении $\alpha(\tau)$ (рисунок 9). Короткоживущая мода затухания с максимумом распределения $\sim 0,1$ нс, очевидно, представляет собой свечение свободного красителя. Длительность свечения долгоживущей компоненты τ_3 соответствует в времени затухания флуоресценции ThT, локализованного в жестком микроокружении (пленке ПВС, пропаноле при 77 К). Очевидно, небольшая доля молекул зонда встраивается в двойную спираль ДНК так, что оба кольца контактируют с нуклеиновыми основаниями, что делает невозможной торсионную релаксацию. Значительная часть молекул ThT взаимодействует с ДНК посредством только одного фрагмента. Таким фрагментом является, по всей видимости, бензтиазоловое кольцо, на котором сосредоточен избыточный положительный заряд.

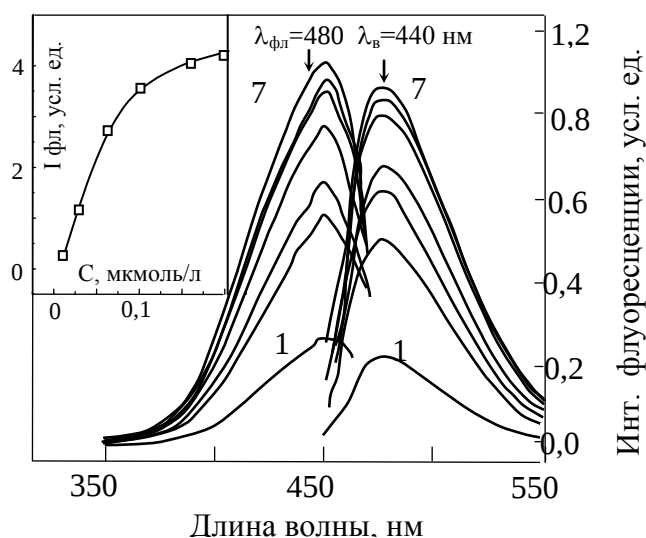
Глава 6. Подробно рассмотрены спектрально-кинетические характеристики флуоресценции ThT в составе комплекса с амилоидными фибриллами. При встраивании красителя в амилоидные фибриллы, представляющие собой жесткую структуру, релаксация является очень ограниченной, т.е. стабилизация основного состояния не происходит. Это приводит к тому, что энергия перехода в такой системе является относительно невысокой, спектр поглощения при этом испытывает значительный батохромный сдвиг, при этом максимум спектра расположен при 450 нм. Интенсивность флуоресценции красителя возрастает на несколько порядков и увеличивается по мере роста концентрации фибрилл (рисунок 10). Тиофлавин Т, инкорпорированный в амилоидные фибриллы, имеет наиболее коротковолновую флуоресценцию ($\lambda_{fl}^{max}=480-485$ нм) по сравнению со спектрами флуоресценции, зарегистрированными для ThT в воде, спиртах и других органических растворителях. Это объясняется тем, что молекулы ThT, встроенные в амилоидные фибриллы, находятся в неполярном жестком окружении, а излучение происходит из неравновесного нерелаксированного состояния, которое по энергии близко к равновесному.

МЕМ-анализ показал, что кинетика затухания флуоресценции ThT в этом случае может быть представлена двухмодальным распределением $\alpha(\tau)$ (рисунок 11). Исходя из кинетических данных, сделано предположение о том, что существует два варианта встраивания зонда в амилоидные фибриллы.

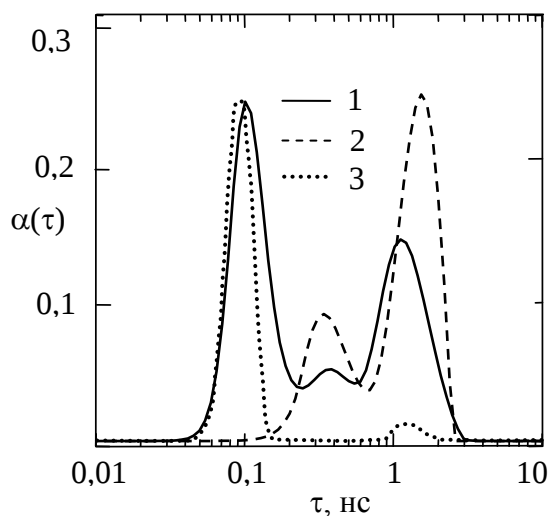
Распределение $\alpha(\tau)$ является информативным параметром, характеризующим как встраивание красителя в амилоидные фибриллы, так и структуру самих фибрилл. Анализ кинетики затухания флуоресценции ThT, встроенного в АФ, в процессе их созревания, показывает, что средняя длительность свечения увеличивается, одновременно увеличивается вклад компоненты свечения имеющей большую длительность, что отражает динамику образования упорядоченных структур, в которых флуоресцентный зонд имеет наиболее жесткую фиксацию и ограниченную торсионную динамику.

Измерение кинетики затухания флуоресценции ThT позволяет изучать процесс образования фибрилл. На рисунке 11 видно, что соотношение амплитуд долгоживущей и короткоживущей мод затухания в процессе образования фибрилл увеличивается в ~ 5 раз. Данное соотношение является хорошим индикатором «зрелости» фибрилл, а значит, может быть использовано для определения стадии фибриллогенеза.

На основе анализа кинетики затухания флуоресценции ThT, интеркалированного в амилоидные фибриллы из инсулина и лизоцима, установлены существенных отличия в распределении $\alpha(\tau)$, которые могут быть использованы при определении типа белка, образующего амилоидные фибриллы.



Концентрации амилоидных фибрилл изменялась от 0.02 до 0.14 мг/мл с шагом 0.02 мг/мл, $\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 480$ нм. На вставке - зависимость интенсивности флуоресценции ThT от концентрации фибрилл ($\lambda_{\text{фл}} = 490$ нм)
Рисунок 10. – Спектры возбуждения флуоресценции и флуоресценции ThT, инкорпорированного в амилоидные фибриллы из инсулина



1 – 2 часа созревания, 2 – 20 часов созревания

Рисунок 11. – Результаты МЭМ-анализа кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т, встроенного в амилоидные фибриллы из инсулина в процессе их созревания (1-2) и в амилоидные фибриллы из лизоцима (3)

Для определения структуры комплекса красителя с амилоидными фибриллами изучены спектры ГКР коллоидных растворов ThT при добавлении

амилоидных фибрилл. Следует отметить, высокую интенсивность колебательных полос 533 , 701 и 1594 см^{-1} , а также увеличение относительной интенсивности колебательной полосы 744 см^{-1} и значительное уменьшение интенсивности полос 797 и 1400 см^{-1} (рисунок 7, спектр 5). Основным вклад в образование последних вносят маятниковые колебания метильных групп, связанных с атомами азота N_8 , N_{18} ($\rho(\text{CH}_3)_{C9,C19}$) и деформационные колебания $\delta(\text{C}_5\text{N}_8\text{C}_9)$ и $\delta(\text{C}_{10}\text{N}_8\text{C}_9)$, что указывает на участие метильных групп, связанных с атомами азота N_8 и N_{18} , во встраивании в структуру фибрилл.

Еще одной особенностью спектра ГКР комплекса «ThT-АФ» является изменение (увеличение) соотношения интенсивности колебательных полос 1410 и 1393 см^{-1} (I_{1410}/I_{1393}) (рисунок 7). На основании анализа изменения колебательного спектра ThT предложена модель встраивания красителя в бороздки амилоидных фибрилл и связывания с металлической поверхностью (рисунок 12). В соответствии с предлагаемой моделью, ThT встраивается в амилоидные фибриллы так, что атомы азота N_8 и N_{18} входят в складку, образованную β -листами, причем непосредственно контактируют с белком связанные с этими атомами метильные группы. Взаимодействие молекулы красителя с металлом осуществляется посредством атома серы S_{11} ; плоскости колец располагаются практически перпендикулярно металлической поверхности, при этом молекула сохраняет свою нативность, т.е. ее конформация не изменяется.

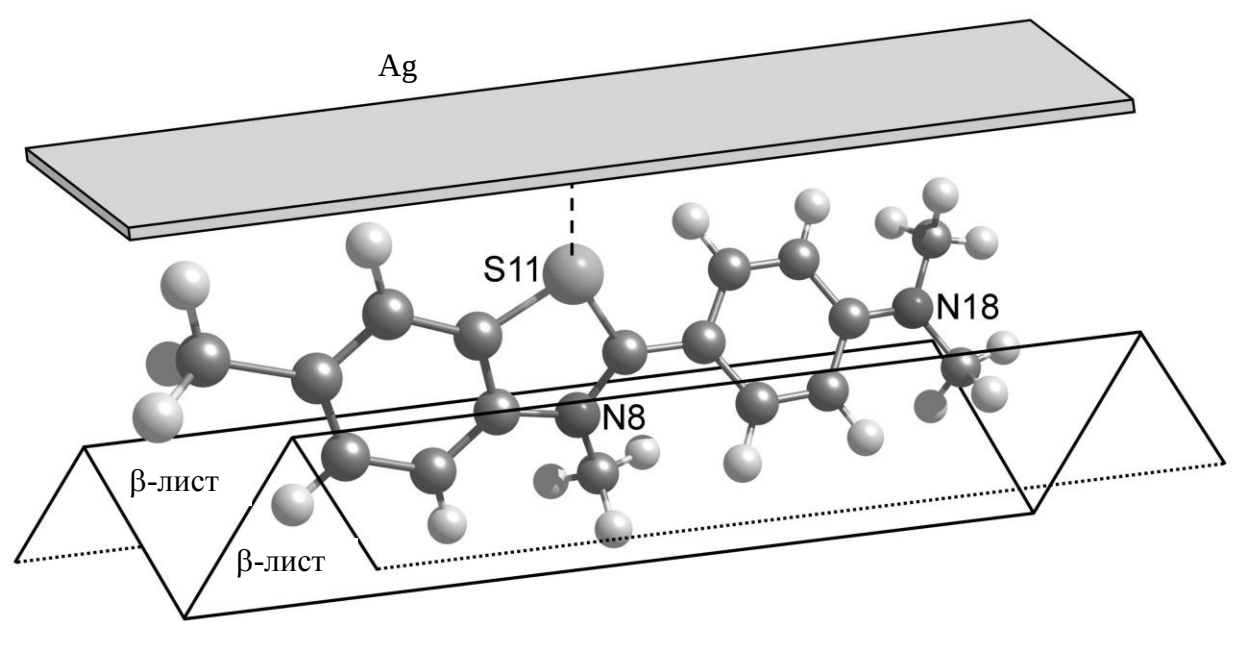


Рисунок 12. – Схема встраивания ThT в бороздки амилоидных фибрилл и связывания с металлической поверхностью сереброгидрозоля

Основываясь на полученных результатах, предложена модель встраивания ThT в амилоидные фибриллы, в соответствии с которой

существуют не одна, а две моды (типа) связывания красителя, которые отличаются по их локализации в фибриллах и жесткости фиксации красителя. Важно также отметить, что экспериментальные данные убедительно доказывают, что краситель связывается с фибриллами в мономерной форме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Создана установка для измерения длительности затухания флуоресценции – импульсный флуорометр с временным разрешением 60 пс, работающая в режиме коррелированного счета одиночных фотонов [22; 26].

2. Разработан метод анализа кинетики затухания флуоресценции сложных молекулярных систем, позволяющий представлять функцию затухания флуоресценции непрерывным распределением в виде суммы нескольких гауссиан или распределением произвольной формы [1; 4; 18; 21; 26; 37]. Положение центра распределения Гаусса определяется с относительной погрешностью, не превышающей 2 %. Относительная погрешность определения стандартного отклонения (величина σ_m) не превышает 5 % [1].

Проведенные модельные исследования показывают, что разработанный способ анализа экспериментальных кривых затухания флуоресценции на основе метода максимума энтропии является эффективным инструментом для моделирования функции затухания свечения распределением произвольной формы [19; 26–30].

Результаты моделирования позволили сформулировать практические критерии, следуя которым при анализе кривых затухания флуоресценции можно сделать правильный выбор относительно использования модели дискретного или непрерывного распределения флуорофоров по длительности затухания свечения [19; 40].

3. Проведены исследования спектральных свойств флуоресцентного зонда ThT в модельных условиях, в результате которых установлено, что:

- существенное влияние на его спектральные свойства оказывает метильная группа при атоме азота N₅ бензтиазольного кольца. Присутствие этой группы препятствует образованию молекулой тиюфлавина Т плоской конформации, определяет существование энергетического барьера при $\varphi=0^\circ$ (180°), приводит к тому, что минимуму энергии отвечают конформации тиюфлавина Т с $\varphi=37^\circ$, 145° , 217° и 325° , существенно снижает величину энергетического барьера при $\varphi=90^\circ$ (270°) между конформациями, отвечающими минимумам энергии [12; 15; 17; 20; 21];

- увеличение полярности растворителя приводит к значительному коротковолновому сдвигу спектров поглощения тиюфлавина Т. Это вызвано тем, что молекула тиюфлавина Т в основном состоянии стабилизирована ориентационным взаимодействием полярных диполей растворителя с положительно заряженными фрагментами тиюфлавина Т, в то время как конфигурация сольватной оболочки молекулы тиюфлавина Т в возбужденном Франк-Кондоновском состоянии является существенно неравновесной [15; 17; 59];
- положение спектра флуоресценции тиюфлавина Т слабо зависит от полярности растворителя. Это обусловлено тем, что в возбужденном состоянии торсионная релаксация фрагментов молекулы тиюфлавина Т препятствует установлению равновесия молекул тиюфлавина Т с растворителем и флуоресценция определяется переходом из частично-равновесного возбужденного состояния в частично-равновесное основное состояние [17; 20; 22];
- увеличение вязкости растворителя сопровождается значительным увеличением квантового выхода флуоресценции тиюфлавина Т. Это указывает на существование внутримолекулярной подвижности, которая приводит к безызлучательной дезактивации энергии возбуждения. Такое поведение типично для молекул, которые обычно называют **молекулярными роторами**. Процессом, приводящим к тушению флуоресценции, является переход молекулы тиюфлавина Т из состояния близкого к планарному к состоянию с торсионным углом, близким к 90° , который осуществляется за счет торсионного вращения (релаксации) фрагментов молекулы друг относительно друга [12; 16; 18; 20; 42; 44; 47; 48; 57];
- флуоресценция ThT в вязких растворителях является существенно неоднородной, так как в излучении участвуют молекулы с различным углом φ и в различной степени релаксированной сольватной оболочкой. Наиболее узкое распределение времен жизни возбужденного состояния наблюдается в средах с высокой вязкостью, когда торсионная подвижность фрагментов молекулы заторможена, и в маловязких средах, когда в излучении участвует молекулы, не успевающие изменить конформацию [18; 20].

4. Изучено влияние торсионной и сольватной релаксации на спектрально-кинетические свойства флуоресценции ThT. Для этого измерена кинетика затухания флуоресценции красителя в маловязких (вода, этанол) и вязких (глицерин) растворах. Установлено, что основной причиной неэкспоненциальности затухания и стоксового сдвига мгновенных спектров флуоресценции красителя является торсионная релаксация фрагментов его молекулы. На положение спектра флуоресценции, квантовый выход и

длительность затухания свечения ThT, существенное влияние оказывает торсионная релаксация, которая в большей степени зависит от вязкости растворителя и в меньшей степени – от его полярности [30; 32; 47; 57; 59; 61].

5. Высокое, близкое к предельному ($\sim 0,45$) значение степени поляризации флуоресценции тιοфлавина Т, в растворах является следствием того, что время вращательной релаксации молекулы красителя много больше времени торсионных колебаний фрагментов молекулы ThT друг относительно друга, приводящих к безызлучательной дезактивации ($\rho \gg \tau_{or}$), в результате чего молекулы ThT не успевают существенно изменить свою ориентацию за время жизни возбужденного состояния [18].

Анизотропия флуоресценции тιοфлавина Т и других молекулярных роторов не является информативным параметром, отражающим структуру или динамику флуорофоров и их микроокружения.

В совокупности, полученные результаты позволяют объяснить существенное, более чем на три порядка, увеличение квантового выхода флуоресценции тιοфлавина Т при инкорпорации в амилоидные и амилоидоподобные фибриллы как результат ограничения торсионной релаксации фрагментов тιοфлавина Т друг относительно друга [17; 18; 22].

6. Увеличение концентрации водных растворов ThT свыше $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л приводит к агрегации его молекул. Спектральным проявлением этого является гипсохромный сдвиг спектра поглощения и батохромный сдвиг спектра флуоресценции. Аналогичные изменения спектров наблюдаются и при увеличении концентрации красителя в пленке ПВС [28–30; 51].

На основании квантово-химических расчетов показано, что образующиеся димеры ThT имеют «сэндвичевую» структуру [29; 30; 51].

7. Внесение в водный раствор ThT полистиролсульфоната приводит к значительным изменениям спектров поглощения и флуоресценции. Причем, при наномолярных концентрациях полиэлектролита имеет место коротковолновый сдвиг спектра поглощения, а при микромолярных концентрациях наблюдается длинноволновый сдвиг спектра поглощения и флуоресценции, сопровождаемый значительным (10-кратным) увеличением ее интенсивности [30].

Отмеченные изменения спектров объяснены как результат встраивания ThT в полиэлектролит в виде димеров (при наномолярных концентрациях) или мономеров (при микромолярных концентрациях). Наиболее существенными являются электростатические взаимодействия катиона красителя с отрицательно заряженной (SO_3^-)-группой ПСС. Длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции при встраивании красителя в ПСС является результатом взаимодействия катионного красителя с полярными группами полиэлектролита, приводящим к стабилизации энергии излучающего возбужденного состояния

молекулы. Данный вывод подтвержден квантово-химическими расчетами структуры и энергии основного и возбужденных состояний ThT во внешнем электрическом поле [30].

8. В рамках метода функционала плотности с использованием расширенного набора базисных функций cc-pVDZ рассчитана молекулярная структура и спектры инфракрасного поглощения и комбинационного рассеяния тиюфлавина Т. Результаты расчета геометрических параметров молекулы хорошо согласуются с экспериментальными данными и результатами расчетов, выполненных с использованием других методов квантовой химии [23; 58].

9. Измерены спектры ГКР тиюфлавина Т с использованием в качестве субстратов гидрозолей серебра, а также термически и химически модифицированных плазмонных пленок серебра. Интенсивность колебательных полос определяется вероятностью возбуждения локализованных плазмонов на поверхности серебряных наночастиц и электронных состояний с переносом заряда комплекса ThT-Ag_{коллоид} [3; 5; 8; 9; 11; 31; 36; 53–56; 58]. Показано, что колебательные полосы могут быть отнесены к трем типам в зависимости от вкладов молекулярных и электромагнитных механизмов усиления [31; 58; 61].

Связывание красителя с поверхностью серебряных наночастиц осуществляется посредством атома серы тиазолового кольца молекулы так, что длинная ось молекулы расположена параллельно, а короткая – перпендикулярно поверхности. При этом сохраняется нативная конформация молекулы [31].

10. В результате исследования стационарной и разрешенной во времени флуоресценции ThT, адсорбированного на поверхности ТСП, модифицированной полиэлектролитами, обнаружено усиление флуоресценции, которое сопровождается уменьшением ее длительности [5; 7–9; 13; 14; 22; 33; 34; 38; 39; 43; 55].

11. Изучены спектральные свойства ThT при его встраивании в циклодекстрины и макромолекулы – белки плазмы крови и ДНК. На основании анализа спектров и кинетики затухания флуоресценции определена стехиометрия комплексов красителя с макромолекулами. Дано объяснение причин увеличения квантового выхода и длительности затухания флуоресценции, а также сдвигов спектров поглощения и флуоресценции при встраивании красителя в макромолекулы [24; 25; 30; 41; 49; 50].

Агрегация белков приводит к значительному увеличению интенсивности и длительности затухания флуоресценции ThT, однако наблюдаемые изменения на один-два порядка ниже, чем при наличии в растворе амилоидных фибрилл [15; 26; 50].

Показано, что данный краситель является чувствительным зондом для исследования процессов агрегации белков плазмы крови [29; 50].

12. Использование зондов АНС и ТНС не может однозначно дать ответ о наличии амилоидных фибрилл в образцах, содержащих также белки не в виде амилоидных фибрилл. Напротив, при наличии в растворе САЧ в нативной форме интенсивность флуоресценции ThT практически не изменяется [2; 4; 6; 10; 35; 47; 52]. Присутствие в растворе белковых агрегатов в виде фибриллярных образований приводит к значительному изменению параметров флуоресценции (интенсивности и длительности затухания). Использование этого зонда позволяет определять содержание амилоидных фибрилл даже в присутствии нативных или частично денатурированных белков [25; 50].

13. Встраивание ThT в амилоидные фибриллы сопровождается длинноволновым сдвигом спектра поглощения (~ на 35 нм), коротковолновым сдвигом спектра флуоресценции (~ на 10 нм) и значительным увеличением ее интенсивности (более, чем на два порядка). Это объясняется тем, что молекулы ThT, инкорпорированные в амилоидные фибриллы, находятся жестком окружении, а излучение происходит из Франк-Кондоновского состояния, которое по энергии близко к равновесному [12; 17; 19; 21; 24; 42].

Встраивание красителя в амилоидные фибриллы также приводит к значительному увеличению длительности затухания флуоресценции. Кинетика затухания флуоресценции является неэкспоненциальной, что является следствием гетерогенности мест связывания. Наиболее адекватным является представление функции затухания флуоресценции в виде бимодального распределения $\alpha(\tau)$, что является следствием существования двух мод встраивания красителя в амилоидные фибриллы [18; 24; 29; 32; 45; 46; 49].

14. В процессе созревания амилоидных фибрилл параметры кинетики затухания флуоресценции ThT существенно изменяются, в особенности соотношение амплитуд долгоживущей и короткоживущей мод затухания увеличивается в ~5 раз. Данное соотношение является индикатором «зрелости» фибрилл и может быть использовано для определения стадии фибриллогенеза. Анализ кинетики затухания флуоресценции ThT позволяет изучать процесс образования фибрилл [48; 49].

Сравнение кинетики затухания флуоресценции ThT, интеркалированного в амилоидные фибриллы из инсулина и лизоцима позволило выделить два их существенных отличия: а) положение максимума долгоживущей моды затухания и соотношение амплитуд, соответствующих долгоживущей и короткоживущей модам затухания. Представляется полезным использование этих отличий в качестве критериев при определении типа белка, образующего амилоидные фибриллы [19; 21; 45; 46; 49].

15. Экспериментально установлена возможность применения спектроскопии ГКР для исследования процессов интеркаляции ThT в амилоидные фибриллы. Показано, что во встраивании красителя в амилоидные фибриллы участвуют метильные группы, связанные с атомами азота тиазолового и бензольного колец [31; 58].

Проведенные методом флуоресцентной и колебательной спектроскопии исследования позволили предложить модель встраивания ThT в амилоидные фибриллы, в соответствии с которой существует два варианта встраивания красителя в бороздки фибрилл: вдоль и соответственно перпендикулярно их длинной оси. В первом случае молекулы ThT имеют ограниченную свободу торсионного вращения и характеризуются более высоким квантовым выходом, большей длительностью флуоресценции и коротковолновым спектром испускания. Во втором случае фрагменты молекул зонда имеют большую свободу торсионных движений, что приводит к значительному уменьшению их квантового выхода и длительности затухания флуоресценции [27; 45].

Сопоставление результатов модельных исследований и исследований комплекса ThT с амилоидными фибриллами показало, что краситель встраивается в биополимер в мономерной форме [26; 29; 30; 51].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Созданная экспериментальная установка эффективно используется в ГрГУ при выполнении научных проектов, курсовых, дипломных магистерских и диссертационных работ.

2. Разработанные и представленные соискателем в настоящей работе методы анализа кинетики затухания флуоресценции и соответствующее программное обеспечение используются в ГрГУ.

Кроме того, программное обеспечение реализовано как коммерческий продукт в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» (Университет ИТМО, Российская Федерация).

Данная разработка также внедрена в научный процесс Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург, РФ)».

3. Проведенные модельные исследования флуоресценции ThT в различных растворителях показали, что константа тушения его флуоресценции зависит от вязкости среды. Это позволило предложить способ определения вязкости растворов и полимеров с помощью флуоресцентного зонда Тиофлавина Т. В отличие от известного метода определения вязкости с помощью молекулярного

ротора производного юлолидина (патент WO 2005/072216 A2), предлагаемый метод является значительно более чувствительным в особенности для сред с низкой вязкостью. Это достигается благодаря тому, что молекулярная масса подвижных фрагментов ThT значительно больше массы роторных групп юлолидина.

4. В работе продемонстрирована возможность использования ThT как флуоресцентного зонда не только для изучения процессов агрегации белков плазмы крови (сывороточного альбумина человека или сывороточного альбумина быка) но и детекции агрегатов этих белков.

5. Предложен метод определения стадии фибриллогенеза на основе анализа кинетики затухания флуоресценции ThT. Предлагаемая методика в отличие от существующих, позволяет не только детектировать факт образования фибрилл, но и стадии этого процесса.

6. Обнаруженное различие в распределении $\alpha(\tau)$ для амилоидных фибрилл из инсулина и лизоцима может быть успешно использовано при проведении медико-биологических исследований на основе анализа кинетики затухания флуоресценции ThT для определения типа белка, из которого образованы фибриллы.

7. В работе впервые показана принципиальная возможность использования усиленного поверхностью вторичного излучения (спектроскопии ГКР и УПФ) для изучения комплексов «краситель-амилоидные фибриллы». В качестве усиливающих вторичное излучение субстратов могут использоваться отожженные тонкие серебряные пленки или коллоиды серебра.

8. Определение влияния тех или иных функциональных групп молекулы ThT на спектральные свойства красителя позволило предложить структуры красителей – молекулярных роторов с улучшенными спектральными характеристиками. Это стало темой ряда проектов (Ф12Р-198, Ф14Р-226), поддержанных Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований, в результате выполнения которых синтезированы новые производные ThT, обладающие длинноволновым спектром поглощения и флуоресценции и сильной зависимостью квантового выхода и длительности излучения от вязкости и жесткости микроокружения. Эти красители могут быть использованы для детекции амилоидных фибрилл не только в опытах *in vitro*, но и в *in situ* [30].

9. Полученные данные и анализ литературных источников показывают, что еще одним важным применением ThT как молекулярного ротора может стать его использование для детекции биомолекулярных, а также специфических белок-лигандных взаимодействий. Важным свойством красителя, делающим его перспективным для таких применений, является то, что квантовый выход и длительность затухания флуоресценции зависят только

от стерических факторов, определяющих свободу торсионного вращения, и не зависят от полярности микроокружения.

10. Фундаментальные знания о фотофизических свойствах молекулярных роторов используются в учебном процессе в ГрГУ при проведении лекционных и практических занятий для студентов и магистрантов физических и технических специальностей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях в соответствии с требованиями п. 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь

1. Анализ затухания флуоресценции при наличии непрерывного распределения излучателей по длительности / А.А. Маскевич, С.К. Башарин, Г.А. Гачко, Л.Н. Кивач, С.А. Маскевич // Журнал прикладной спектроскопии. – 1990. – Т. 53, № 4. – С. 557–563.

2. Влияние субстратов, кофакторов и эффекторов на структуру и динамику тиаминкиназы из пивных дрожжей / И.П. Черникевич, А.А. Маскевич, С.А. Маскевич, Г.А. Гачко, И.Б. Заводник, Л.Н. Кивач // Биоорганическая химия. – 1992. – Т. 18, № 4. – С. 509–530.

3. Fluorescence features of some organic compounds and proteins adsorbed on rough silver surfaces / S.A. Maskevich, G.A. Gachko, A.A. Maskevich, N.D. Strekal // SPIE. – 1994. – Vol. 2370. – P. 131–135.

4. Флуоресценция алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей / А.А. Маскевич, И.М. Арцукевич, С.А. Маскевич, И.П. Черникевич // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, № 6. – С. 479–485.

5. Maskevich, A.A. Application of island films technique to fluorescence studies of biological structures / A.A. Maskevich, S.A. Maskevich, V.I. Stepuro // SPIE. – 1997. – Vol. 2980. – P. 539–545.

6. Maskevich, A.A. Fluorescent properties of the alcohol oxidase prostetic group and their relationship to the fuctional state of proteins / A.A. Maskevich, I.M. Artsukevich, V.I. Stepuro // Journal of Molecular Structure. – 1997. – Vol. 408/409. – P. 261–264.

7. Selective enhancement of raman and fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick cold films / N. Strekal, A. Maskevich, S. Maskevich, J.-C. Jardillier, I. Nabiev // Biopolymers (Biospectroscopy). – 2000. – Vol. 57. – P. 325–328.

8. Селективное возбуждение усиленного поверхностью вторичного свечения биомолекул субстратами на основе тонких пленок золота

/ Н.Д. Стрекаль, В.Ф. Аскирка, А.А. Маскевич, И.Р. Набиев, С.А. Маскевич // Оптика и спектроскопия. – 2000. – Т. 89, № 6. – С. 949–952.

9. Маскевич, А. А. Особенности фотохимических превращений молекул, адсорбированных на поверхности тонких серебряных пленок / А. А. Маскевич // Веснік ГрДзУ. Сер.2. – 2001. – № 1 (5). – С. 61–69.

10. Lukivskaya, O.Y. Effect of ursodeoxycholic acid on prostaglandin metabolism and microsomal membranes in alcoholic fatty liver / O. Lukivskaya, A.A. Maskevich, B.V. Buko // Alcohol. – 2001. – Vol. 25. – P. 99–105.

11. The study of the doxorubicin adsorbed onto chemically modified silver films by surface-enhanced spectroscopy / N. Strekal, A. German, G. Gachko, A. Maskevich, S. Maskevich. // Journal of Molecular Structure. – 2001. – Vol. 563–564. – P. 183–191.

12. Спектральные свойства тиофлавина Т в растворе и при комплексообразовании с амилоидными фибриллами / Е.С. Воропай, П.М. Самцов, К.Н. Каплевский, А.А. Маскевич, В.И. Степура, О.И. Поварова, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов, А.Л. Финк, В.Н. Уверский // Журнал прикладной спектроскопии. – 2003. – Т. 70, № 6. – С. 767–773.

13. Маскевич, А.А. Особенности флуоресценции белковых комплексов, адсорбированных на поверхности тонких серебряных пленок / А.А. Маскевич // Веснік ГрДУ. Сер. 2. – 2004. – № 1 (25). – С. 67–73.

14. Аскирка, В.Ф. Люминесцентные свойства митоксантрона в различных условиях микроокружения / В.Ф. Аскирка, А.А. Маскевич, В.И. Степура, С.А. Маскевич // Журнал прикладной спектроскопии. – 2004. – Т. 71, № 1. – С. 39–43.

15. ThT as an instrument for testing and investigation of amyloid and amyloid-like fibrils / K. K. Turoverov, I.M. Kuznetsova, A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, V.A. Kuzmitsky, V.N. Uversky // SPIE. – 2007. – Vol. 6733. – P. 67331R-1–67331R-11.

16. Computational Study of Thioflavin T Torsional Relaxation in the Excited State / V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, K.K. Turoverov, I.M. Kuznetsova, V.A. Kuzmitsky // J. Phys. Chem. A. – 2007. – Vol. 111, № 22. – P. 4829–4835.

17. Spectral properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form / A.A. Maskevich, V.I. Stsiapura, V.A. Kuzmitsky, I.M. Kuznetsova, O.I. Povarova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov // Journal of Proteome Research. – 2007. – Vol. 6, № 4. – P. 1392–1401.

18. Thioflavin T as a Molecular Rotor: Fluorescent Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Viscosity / V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, V.A. Kuzmitsky, V.N. Uversky, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov // J. Phys. Chem. B. – 2008. – Vol. 112, № 49. – P. 15893–15902.

19. Маскевич, А. А. Анализ кинетики затухания флуоресценции тиофлавина Т методом максимума энтропии / А.А. Маскевич, В.И. Степуро, П.Т. Балинский // Журнал прикладной спектроскопии. – 2010. – Т. 77, № 2. – С. 209–217.
20. Charge Transfer Process Determines Ultrafast Excited State Deactivation of Thioflavin T in Low-Viscosity Solvents / V.I. Stsiapura, A.A. Maskevich, S.A. Tikhomirov, O.V. Bugarov // J. Phys. Chem. A. – 2010. – Vol. 114, № 32. – P. 8345–8350.
21. Fluorescence Quantum Yield of Thioflavin T in Rigid Isotropic Solution and Incorporated into the Amyloid Fibrils / A.I. Sulatskaya, A.A. Maskevich, I.M. Kuznetsova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, Is. 10, e15385. – P. 1–7.
22. Научная деятельность кафедры общей физики в свете современных тенденций развития биомолекулярной спектроскопии / А.А. Маскевич, Л.Н. Кивач, Г.А. Гачко, С.А. Маскевич // Вестник ГрГУ. Сер.2. – 2010. – № 2. – С. 134–144.
23. Кургузенков, С.А. Расчет колебательных спектров и моделирование структуры молекулы тиофлавина Т / С.А. Кургузенков, А.А. Маскевич // Журнал прикладной спектроскопии. – 2012. – Т. 79, № 4. – С. 564–569.
24. Маскевич, А.А. Спектрально-флуоресцентный анализ взаимодействия тиофлавина Т с гамма-циклодекстрином / А.А. Маскевич, С.А. Кургузенков, А.Ю. Лицкевич // Журнал прикладной спектроскопии. – 2013. – Т. 80, № 1. – С. 39–45.
25. Маскевич, А.А. Флуоресцентные свойства тиофлавина Т при его встраивании в нативные и денатурированные белки / А.А. Маскевич, С.А. Кургузенков, А.В. Лавыш // Веснік ГрДУ. Сер. 2. – 2013. – № 2 (151). – С. 75–85.
26. Комплекс аппаратных и программных средств для исследования кинетики затухания флуоресценции / А.А. Маскевич, В.И. Ступуро, С.А. Кургузенков, А.В. Лавыш // Веснік ГрДзУ. Сер. 2. – 2013. – № 3 (159). – С. 107–119.
27. Исследование кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина / А.И. Сулацкая, Е.А. Валова, Я.Ю. Комиссарчик, Е.С. Снигиревская, А.А. Маскевич, Е.А. Дробченко, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Цитология. – 2013. – Т. 55, № 11. – С. 807–812.
28. Фотофизические свойства *транс*-2-[4 -(диметиламино)стирил]-3-этил-1,3-бензотиазолия перхлората – нового структурного аналога тиофлавина Т / А.В. Лавыш, А.И. Сулацкая, А.А. Луговский, Е.С. Воропай, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов, А.А. Маскевич // Журнал прикладной спектроскопии. – 2014. – Т. 81, № 2. – С. 209–218.

29. Спектральные проявления агрегации молекул тиофлавина Т / А.А. Маскевич, А.В. Лавыш, И.М. Кузнецова, А.И. Сулацкая, К.К. Туроверов // Журнал прикладной спектроскопии. – 2015. – Т. 82, № 1. – С. 37–43.

30. Маскевич, А.А. Особенности спектральных свойств тиофлавина Т при его встраивании в полиэлектролиты / А.А. Маскевич, А.В. Лавыш, С.А. Кургузенков // Веснік ГрДУ. Сер. 2. – 2015. – № 1 (186). – С. 60–70.

31. Спектры ГКР тиофлавина Т. Проявление электромагнитных и молекулярных механизмов усиления / А.А. Маскевич, С.А. Кургузенков, А.В. Лавыш, Л.Н. Кивач, С.А. Маскевич // ЖПС. – 2015. – Т. 82, № 4. – С. 497–504.

32. Маскевич, А.А. Кинетика затухания флуоресценции тиофлавина Т в условиях торсионной релаксации / А.А. Маскевич, А.В. Лавыш // Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 2. Матэматыка. Фізіка. Інфарматыка, вылічальная тэхніка і кіраванне. – 2015. – № 2 (192). – С. 107–119.

Статьи в других научных изданиях

33. Маскевич, А.А. Использование тонких серебряных пленок для детекции иммуноглобулинов / А.А. Маскевич, В.Е. Воронич // Низкоразмерные системы-2 : сб. науч. работ / под ред. С.А. Маскевича, В.Ф. Стельмаха, А.К. Федотова. – Гродно, 2003. – Вып. 3. – С. 154–159.

34. Флуоресцентные свойства субмонослойных пленок, полученных путем физии- и хемосорбции наночастиц CdSe/ZnS на силанизированные стекла / О.С. Кулакович, А.В. Медведь, А.А. Маскевич, Н.Д. Стрекаль, С.А. Маскевич // Низкоразмерные системы-2 : сб. науч. работ / под ред. С. А. Маскевича [и др.]. – Гродно, 2005. – Вып. 4. – С. 167–174.

Статьи в сборниках материалов научных конференций

35. Fluorescence of alcohol oxidase and its related to the structure and dynamics of protein / A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, L.N. Kivach, I.M. Artsukevich, I.P. Chernikevich // Spectroscopy of Biological Molecules : Proc. 6th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, France, Villeneuve d'Ascq, 3–8 Sept., 1995 / eds. J. C. Merlin [et al.]. – Dordrecht ; Boston ; London : Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 141–142.

36. Maskevich, A. A. Application of island films technique to fluorescence studies of microsomes / A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, S.A. Maskevich // Spectroscopy of Biological Molecules : Modern Trends, Madrid, 7–12 Sept., 1997 / eds. P. Carmona [et al.]. – Dordrecht ; Boston ; London : Kluwer Academic Publishers, 1997. – P. 315–316.

37. Fluorescence properties of pyrene in microsomal membranes / A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, L.N. Kivach, A.V. Artsukevich, V.U. Buko // *Spectroscopy of Biological Molecules : Modern Trends* Madrid, 7–12 Sept., 1997 / Annex (eds.), P. Carmona [et al.]. – Madrid, Spain, 1997. – P. 61–62.

38. Островковые пленки серебра: организация, оптические характеристики, использование в спектроскопии КР и люминесцентном анализе / С.А. Маскевич, И.Р. Набиев, А.В. Феофанов, Г.Т. Василюк, Г.А. Гачко, Л.Н. Кивач, А.А. Маскевич, С.Г. Подтынченко, Н.Д. Стрекаль, Н.В. Ивашин, М.В. Борисюк, И.В. Тарасюк // *Лазерная физика и спектроскопия : труды III конференции по лазерной физике и спектроскопии*, Гродно, 2–4 июля 1997 г. В 2 ч. / Под ред. А. А. Афанасьева. – Минск, 1997. – Т. 1. – С. 7–10.

39. Chemically modified annealed thin gold films allow selective registration of SERS or fluorescence-enhanced spectra / N. Strekal, V. Oskirko, A. German, A. Maskevich, I. Sveklo, S. Maskevich, I. Nabiev // *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions : Proc. 8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules*, Netherland, Enschede, 29 Aug.–2 Sept. / Eds. J. Greve [et al.]. – Dordrecht ; Boston ; London : Kluwer Academic Publishers, 1999. – P. 569–570.

40. Маскевич, А. А. Анализ кинетики затухания флуоресценции с использованием метода максимума энтропии / А.А. Маскевич, В.И. Степура, П.Т. Балинский // *Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; VI съезд БООФиБ*, Минск, 6–8 окт. 2004 г. : в 2 ч. / под ред. И. Д. Волотовского, С. Н. Черенкевича и др. – Минск, 2004. – Ч. I. – С. 246–248.

41. Флуоресцентные свойства тиофлавина Т при его встраивании в γ -циклодестрин / А.А. Маскевич, М.В. Легада, К.К. Туроверов, И.М. Кузнецова // *Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; VI съезд БООФиБ*, Минск, 6–8 окт. 2004 г. : в 2 ч. / Под ред. И. Д. Волотовского, С. Н. Черенкевича и др. – Минск, 2004. – Ч. II. – С. 30–32.

42. Квантово-химические расчеты Тиофлавина Т, специфического зонда на амилоидные фибриллы / В.И. Степура, А.А. Маскевич, В.А. Кузмицкий, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; VII съезд БООФиБ*, Минск, 21–23 июня 2006 г. : в 2 т. / под ред. И. Д. Волотовского, С. Н. Черенкевича и др. – Минск, 2006. – Т. 1. – С. 144–146.

43. Адамчик, Р.С. Применение отожженных тонких серебряных пленок для детекции амилоидных фибрилл / Р.С. Адамчик, А.Е. Герман, А.А. Маскевич // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; VII съезд*

БООФиБ, Минск, 21–23 июня 2006 г. : в 2 т. / Под ред. И. Д. Волотовского, С.Н. Черенкевича и др. – Минск, 2006. – Т. 2. – С. 287–289.

44. Сверхбыстрая дезактивация возбужденного состояния тиофлавина Т в маловязких растворителях / С.А. Тихомиров, В.Л. Дубовский, В.А. Кузмицкий, В.И. Степура, А.А. Маскевич // Лазерная физика и оптические технологии : сб. науч. тр. VII Междунар. науч. конф., Минск, 17–19 июня 2008 г. : в 2 т. / редкол.: Н. С. Казак [и др.]. – Минск : 2008. – Т. 2. – С. 223–226.

45. Кинетика затухания флуоресценции тиофлавина Т, интеркалированного в амилоидные фибриллы / А.А. Маскевич, В.И. Степура, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; VIII съезд БООФиБ, Минск, 25–27 июня 2008 г. : в 2 ч. / Под ред. И.Д. Волотовского, С.Н. Черенкевича [и др.]. – Минск, 2008. – Ч. 1. – С. 87–89.

46. Спектральные свойства флуоресценции тиофлавина Т, интеркалированного в амилоидные фибриллы, на различных стадиях их образования / А.А. Маскевич, В.И. Степура, С.А. Кургузенков, Т.С. Глебович, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; IX съезд БООФиБ, Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Редкол.: И.Д. Волотовский (пред.), С.Н. Черенкевич (зам. пред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2010. – Ч. 1. – С. 208–210.

47. Тиофлавин Т как молекулярный ротор: механизм изменения квантового выхода флуоресценции от вязкости микроокружения / В.И. Степура, А.А. Маскевич, С.А. Тихомиров, О.В. Буганов, В.А. Кузмицкий, С.А. Кургузенков // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; IX съезд БООФиБ, Минск, 23–25 июня 2010 г. : в 2 ч. / Редкол.: И.Д. Волотовский (пред.), С.Н. Черенкевич (зам. пред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2010. – Ч. 1. – С. 253–255.

48. Влияние вязкости и полярности растворителя на фотоиндуцированный сверхбыстрый перенос заряда в тиофлавине Т / В.И. Степура, А.А. Маскевич, С.А. Тихомиров, О.В. Буганов, В.А. Кузмицкий, С.А. Кургузенков // Лазерная физика и оптические технологии : сб. тр. VIII междунар. науч. конф., Минск, 27–30 сент. 2010 г. : в 2 т. / Под ред. В.А. Орловича, В.В. Филиппова, В.Н. Белого, В.А. Длугуновича, Н.В. Кулешова, В.Ю. Плавского, Г.И. Рябцева, Г.П. Яблонского, С.Г. Русова. – Минск, 2010. – Т. 2. – С. 166–169.

49. Кинетика затухания флуоресценции тиофлавина Т, интеркалированного в амилоидные фибриллы из различных белков / А.А. Маскевич, С.А. Кургузенков, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Лазерная физика и оптические технологии : сб. тр. VIII междунар. науч. конф., Минск, 27–30 сент. 2010 г. : в 2 т. / Под ред. В.А. Орловича, В.В. Филиппова,

В.Н. Белого, В.А. Длугуновича, Н.В. Кулешова, В.Ю. Плавского, Г.И. Рябцева, Г.П. Яблонского, С.Г. Русова. – Минск, 2010. – Т. 1. – С. 221–224.

50. Флуоресцентные свойства тιοфлавина Т при его встраивании в нативные и денатурированные белки / А.А. Маскевич, В.И. Степура, А.В. Лавыш, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; X съезд БООФиБ, Минск, 19–21 июня 2012 г. : в 2 ч. / Редкол.: И.Д. Волоотовский (пред.), С.Н. Черенкевич (зам. пред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – Ч. 1. – С. 51–53.

51. Спектральные свойства концентрированных растворов флуоресцентного зонда тιοфлавина Т / А.А. Маскевич, А.В. Лавыш, В.И. Степура, Л.Н. Кивач, А.И. Сулацкая, И.М. Кузнецова, К.К. Туроверов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. Междунар. науч. конф. ; XI съезд БООФиБ, Минск, 17–20 июня 2014 г. : в 2 ч. / Редкол.: И.Д. Волоотовский (пред.), С.Н. Черенкевич (зам. пред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – Ч. 1. – С. 87–90.

Тезисы докладов

52. Роль структуры и динамики тиаминкиназы из пивных дрожжей в регуляции метаболизма витамина В₁: флуоресцентные исследования / А.А. Маскевич, С.А. Маскевич, И.П. Черникевич, Л.Н. Кивач // Флуоресцентные методы исследования и клинической диагностики : тез. докл. IV Всесоюзн. совещания «Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение», Москва, 17–18 февр. 1992. – М., 1992. – Вып. 4. – С. 15.

53. Maskevich, A.A. Fluorescence properties of pyrene, adsorbed on silver films / A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, L.N. Kivach // Laser Applications in Life Sciences : Abst. 6th International Conference, Jena, 23–27 Sept. 1996. – Jena, 1996. – P. 1–42.

54. Maskevich, A. Photochemical transformations of the triphenylpyrasoline adsorbed on rough silver film / A. Maskevich, G. Vasilyuk // Book of abstracts : Abstr. XVIIIth International Conference on Photochemistry, Warsaw, 3–8 Aug. 1997. – Warsaw, 1997. – 3P42.

55. Применение усиленной поверхностью спектроскопии в биологии и химии / С.А. Маскевич, А.А. Маскевич, Г.Т. Василюк, Г.А. Гачко, Л.Н. Кивач, А.А. Маскевич, С.Г. Подтынченко, Н.Д. Стрекаль // Молекулярно-клеточные основы функционирования биосистем : тезисы докладов III съезда БООФиБ, Минск, 21–23 окт. 1998 г. – Минск, 1998. – С. 31–32.

56. Fluorescence properties of doxorubicin in solutions and adsorbed onto thin silver films / A. German, G. Gachko, A. Maskevich, N. Strekal, S. Maskevich // Book

of abstracts : XXV European Congress on Molecular Spectroscopy, Portugal, Coimbra, 27 Aug.–1 Sept. 2000. – Coimbra, 2000. – P. 59.

57. Photoinduced charge transfer in Thioflavin T / V. Stsiapura, A. Maskevich, S. Tikhomirov, O. Bouganau, A. Ianoul // Going NanoGreen in a big way in Cairo : Abstr. the International Conference on Nano/molecular Photochemistry and Nanomaterials for Green Energy Development [Solar'10], Egypt, Cairo, 14–17 Febr. 2010. – Cairo, 2010. – P. 89–90.

58. Kurhuzenkau, S.A. SERS and quantum chemical studies on the thioflavine T adsorption to silver nanoparticles / S.A. Kurhuzenkau, A.A. Maskevich // III Italian Meeting on Raman Spectroscopy and Non-Linear Optical Effects (CIRS–2014), Parma, 9–11 June 2014. – Parma, 2014. – P. 26.

Учебные пособия

59. Маскевич, А.А. Физический практикум по оптике : учеб. пособие / А.А. Маскевич. – Гродно : ГрГУ, 2001. – 251 с.

60. Электричество и магнетизм. Волновая оптика : учеб. пособие / А.А. Маскевич, В.Ф. Аскирка, Г.Т. Василюк, В.Е. Воронич, Е.Е. Трофименко. – Гродно : ГрГУ, 2008. – 375 с.

61. Маскевич, А.А. Оптика : учеб. пособие / А.А. Маскевич. – Минск : Новое знание ; М. : Инфра, 2012. – 656 с.

РЭЗЮМЭ

Маскевіч Аляксандр Аляксандравіч

**ДЫНАМІКА ФОТАІНДУЦЫРАВАННЫХ
ПРАЦЭСАЎ -У МАЛЕКУЛЯРНЫХ-РОТАРАХ У РАСТВОРАХ І
АДСАРБАВАНЫМ СТАНЕ**

Ключавыя словы: флуарэсцэнтная спектраскапія, аналіз дадзеных, спектраскапія ГКР, малекулярныя ротары, тыяфлавін Т, тарсіённая рэлаксацыя, фотаіндуцыраваныя працэсы, амілоідныя фібрылы.

Мэта работы: вызначэнне механізму фотаіндуцыраваных працэсаў у малекулах фарбавальнікаў, якія валодаюць структурнай рухомасцю (малекулярных ротараў), у растворах, адсарбаваных на паверхні і ў складзе супрамалекулярных комплексаў.

Метады даследавання: стацыянарная і кінетычная спектрафлуараметрыя, спектраскапія КР і ГКР, квантава-хімічнае мадэляванне, спектрафотаметрыя, флуарэсцэнтная і электронная мікраскапія, атамна-сілавая мікраскапія, кінетычная абсарбцыйная спектраскапія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. На прыкладзе ThT вызначана роля тарсіёнай дынамікі і ўнутрымалекулярнага пераносу зараду ў фарміраванні флуарэсцэнтных уласцівасцеў малекулярных ротараў у растворах, адсарбаваным стане і пры ўсталяванні ў макрамалекулы. Вызначана, што тарсіённая рэлаксацыя з'яўляецца галоўным працэсам, які тушыць флуарэсцэнцыю, і вызначае залежнасць спектральных уласцівасцей малекул фарбавальніка ад вязкасці мікраасяроддзя. Прапанавана мадэль усталявання ThT у амілоідныя фібрылы. Выяўлена ўзмацненне флуарэсцэнцыі ThT, які адсарбаваны на паверхні ТСП мадыфікаванай поліэлектралітамі, што суправаджаецца памяншэннем працягласці затухання святлення.

Створаны праграмна-апаратны комплекс, які ўключае ў сябе субнанасекундны флуарометр, методыку і праграмае забеспячэнне і дазваляе праводзіць вымярэнні і аналіз кінетыкі затухання флуарэсцэнцыі фарбавальнікаў, іх комплексаў, якія вызначаюцца значнай гетэрагеннасцю.

Рэкамендацыі па выкарыстанню і вобласць прымянення. Атрыманыя вынікі ўкаранёны ў навучальны і навуковы працэс у Гродзенскім універсітэце, а таксама ў навуковых і навучальных установах г. Санкт-Пецярбурга. Вобласць прымянення – спектраскапія, біяфізіка, медыцынская дыягностыка.

РЕЗЮМЕ

Маскевич Александр Александрович

**ДИНАМИКА ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ПРОЦЕССОВ В
МОЛЕКУЛЯРНЫХ РОТОРАХ В РАСТВОРАХ И АДСОРБИРОВАННОМ
СОСТОЯНИИ**

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, анализ данных, спектроскопия ГКР, молекулярные роторы, тиофлавин Т, торсионная релаксация, фотоиндуцированные процессы, амилоидные фибриллы.

Цель работы: определение механизма фотоиндуцированных процессов в молекулах красителей, обладающих структурной лабильностью (молекулярных роторов), в растворах, адсорбированных на поверхности и в составе супрамолекулярных комплексов.

Методы исследования: стационарная и кинетическая флуориметрия, спектроскопия КР и ГКР, квантово-химическое моделирование, спектрофотометрия, флуоресцентная и электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, кинетическая абсорбционная спектроскопия.

Полученные результаты и их новизна. На примере ThT определена роль торсионной динамики и внутримолекулярного переноса заряда в формировании флуоресцентных свойств молекулярных роторов в растворах, адсорбированном состоянии и при встраивании в макромолекулы. Установлено, что торсионная релаксация является основным тушащим флуоресценцию процессом и определяет зависимость спектральных свойств молекул красителя от вязкости микроокружения. Предложена модель встраивания ThT в амилоидные фибриллы. Обнаружено усиление флуоресценции ThT, адсорбированного на поверхности ТСП модифицированной полиэлектролитами, которое сопровождается уменьшением длительности свечения.

Создан программно аппаратный комплекс, включающий субнаносекундный флуорометр, методику и программное обеспечение, позволяющий производить измерения и анализ кинетики затухания флуоресценции красителей, их комплексов, отличающихся значительной гетерогенностью.

Рекомендации по использованию и область применения. Полученные результаты внедрены в учебный и научный процесс, в Гродненском университете, а также в научных и учебных учреждениях г. Санкт-Петербурга. Область применения – спектроскопия, биофизика, медицинская диагностика.

SUMMARY

Maskevich Aliaksandr Aliaksandrovich

DYNAMICS OF PHOTOINDUCED PROCESSES IN MOLECULAR ROTORS IN SOLUTIONS AND IN ADSORBED STATE

Keywords: fluorescence spectroscopy, data analysis, surface-enhanced Raman spectroscopy, molecular rotors, thioflavin T, torsion relaxation, photoinduced processes amyloid fibrils

The aim of this work was to determine mechanism of photoinduced processes in dye molecules with structural lability in solutions, adsorbed on surfaces, and in supramolecular complexes.

Methods of research: steady state and time-resolved fluorescence, Raman and SERS spectroscopy, quantum-chemical modeling, spectrophotometry, fluorescence and electron microscopy, atomic force microscopy, kinetic absorption spectroscopy.

Методы исследования: стационарная и кинетическая флуориметрия, спектроскопия КР и ГКР, квантово-химическое моделирование, спектрофотометрия, флуоресцентная и электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, кинетическая абсорбционная спектроскопия.

The results obtained and their novelty. Roles of torsional dynamics and intramolecular charge transfer in fluorescence properties of molecular rotors in solutions, in adsorbed state and in complexes with macromolecules were determined using ThT as a sample. It was established that torsion relaxation is the main fluorescence quenching process and determines dependence of spectral properties of the dye on microenvironment viscosity. The model of ThT intercalation in amyloid fibrils was proposed. Enhancement of ThT fluorescence accompanied by shortening of the emission lifetime was found for the dye adsorbed onto TSF modified with polyelectrolytes.

Program- instrumental complex, comprising of subnanosecond fluorimeter, methods and software, allowing to measure and analyze fluorescence decay kinetics of dyes and their complexes, characterized by significant heterogeneity, was developed.

Recommendation for future use and application fields. The obtained results were implemented in education and research processes in Grodno university and in research and educational institutes in S-Petersburg. Application field - spectroscopy, biophysics, medical research.