



Пятая международная конференция • Школа молодых учёных

ФИЗИКА — НАУКАМ О ЖИЗНИ

Санкт-Петербург • 16–19 октября • 2023



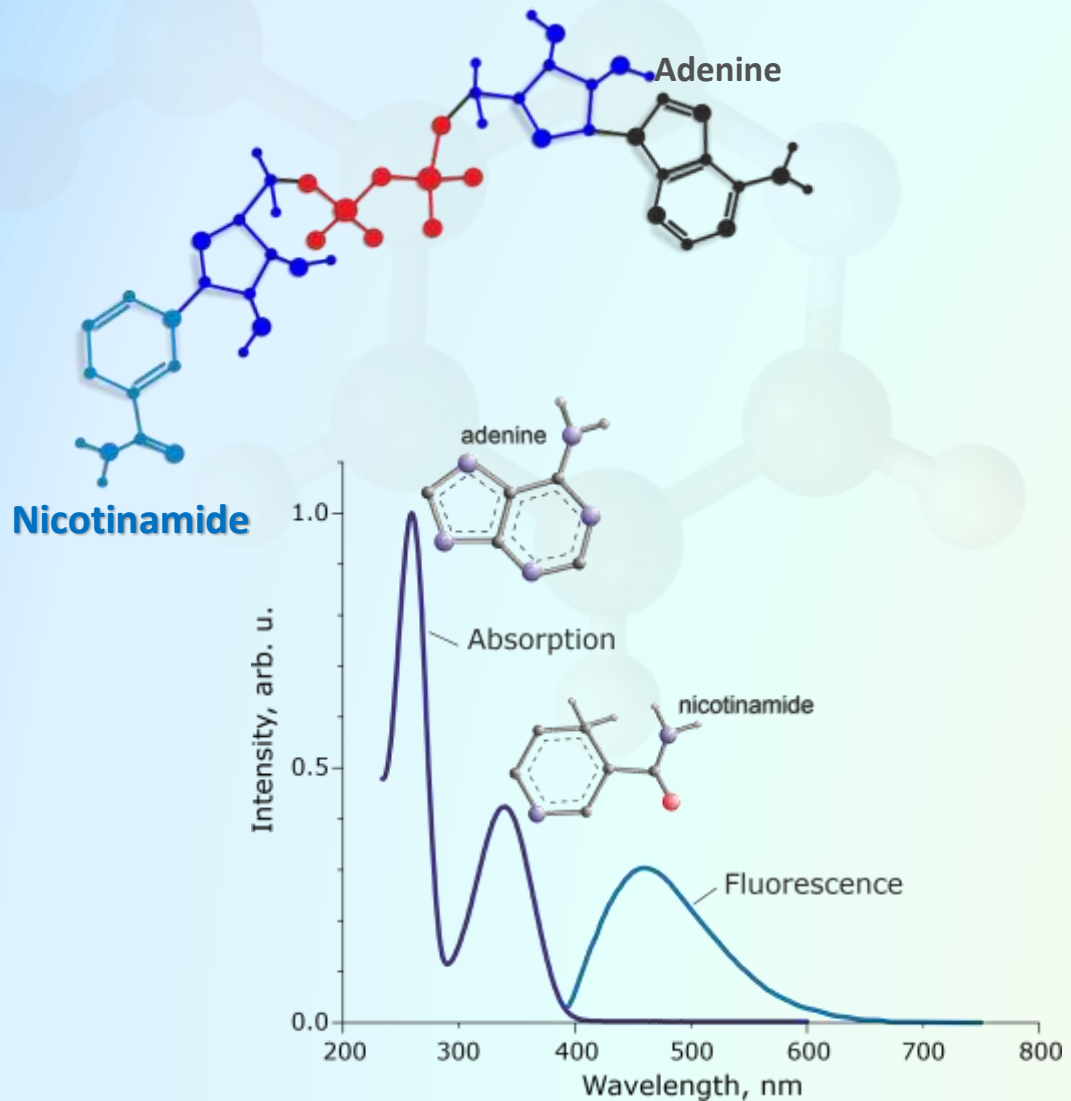
Исследование механизмов безызлучательной релаксации возбужденных состояний молекул NADH и FAD путем анализа квантового выхода и времен затухания флуоресценции

И.А. Горбунова, М.Э. Сасин, Д.А. Волков, Д.В. Яшков, О.С. Васютинский
лаб. оптики биомолекул и кластеров, ФТИ им. А.Ф. Иоффе

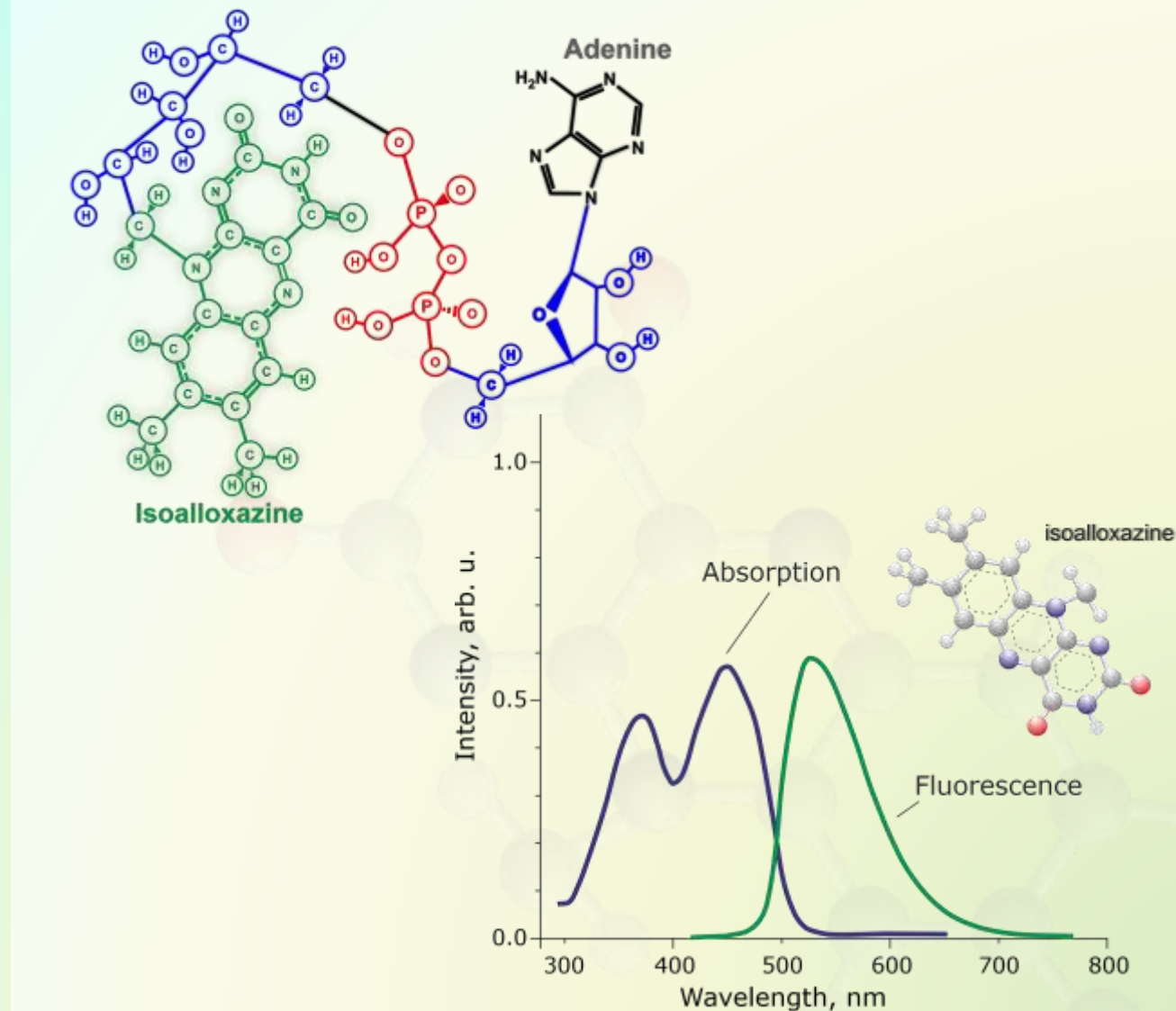
Объекты исследования

NADH и **FAD** являются внутриклеточными коферментами, участвующими в реакциях клеточного метаболизма

NADH



FAD



Актуальность

Наблюдение время-разрешенной флуоресценции NADH и FAD в живых клетках (FLIM)

Фундаментальное значение:

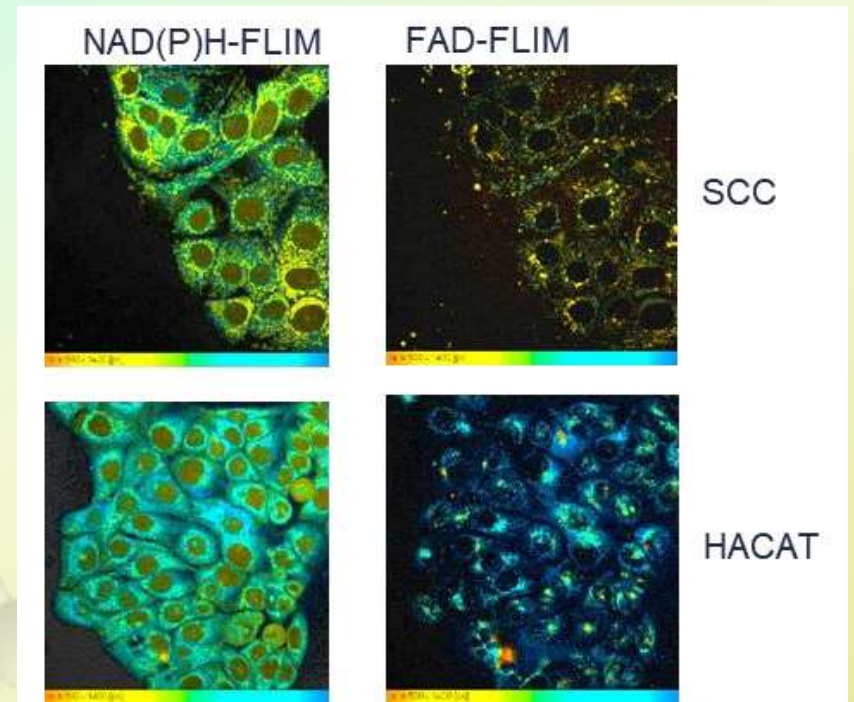
- Исследование механизмов окислительно-восстановительных реакций в живых клетках
- Развитие методов дифференциации здоровых и патологических клеток

Возможные практические приложения:

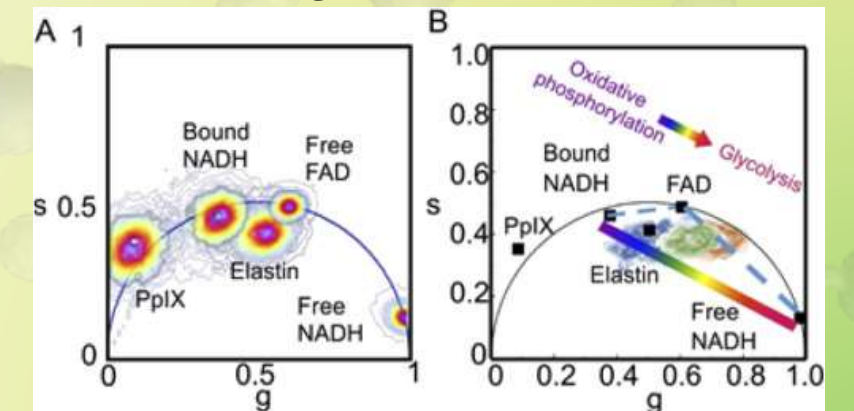
- Диагностика социально значимых заболеваний
- Оценка эффективности лекарственных препаратов на клеточном уровне

Задачи:

- Анализ квантового выхода и времен затухания флуоресценции NADH и FAD в зависимости от параметров микроокружения и молекулярных конформаций.
- Разработка теоретических моделей для описания путей релаксации возбужденного состояния NADH и FAD.



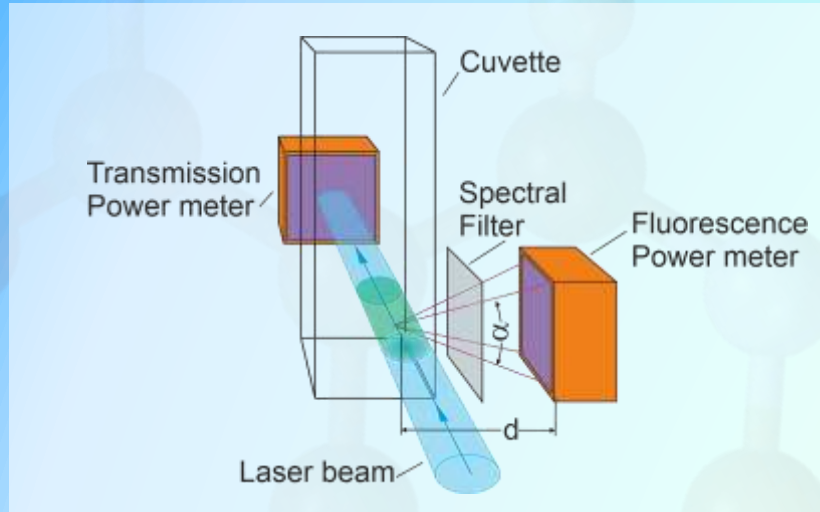
Lifetime images of NADH and FAD in living cells, Becker & Hickl



Phasor FLIM histogram using to determine metabolic shift [Wang et al, Bio Opt. Express, 2020] 3

Методы эксперимента

Измерения квантового выхода



Возбуждение NADH: 355 нм

Возбуждение FAD: 450 нм

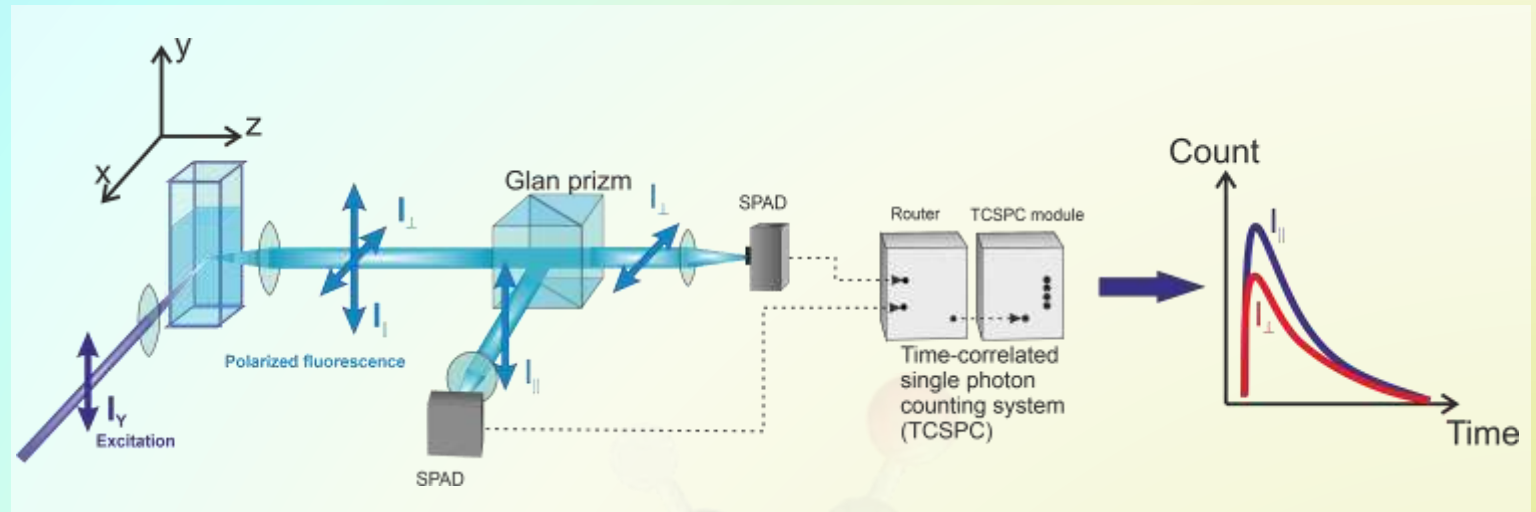
$$Q = NG \frac{\langle I_{fl} \rangle}{\langle I_{tr}^{sol} \rangle - \langle I_{tr}^{mol} \rangle}$$

$\langle I_{fl} \rangle$ - интенсивность флуоресценции

$\langle I_{tr}^{mol} \rangle$ - интенсивность прошедшего излучения

$\langle I_{tr}^{sol} \rangle$ - интенсивность прошедшего излучения через растворитель

Измерения времен затухания флуоресценции



Источник возбуждения: вторая гармоника Ti:Sa лазера.

Длительность импульса: 100 фс

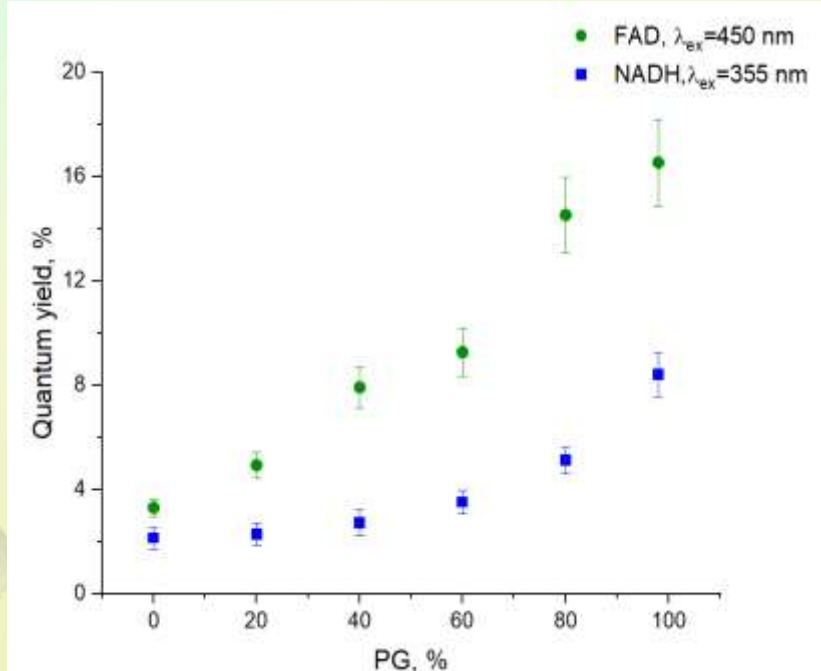
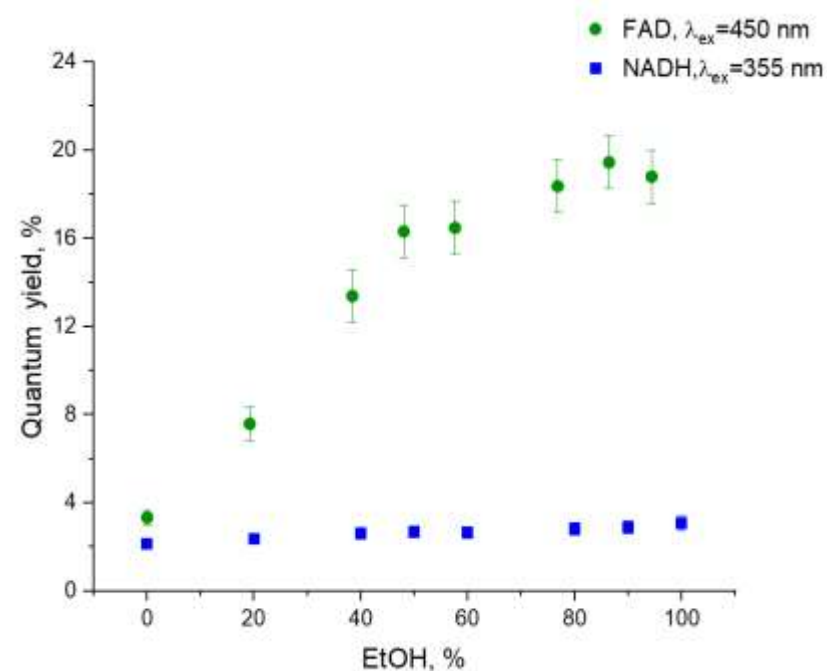
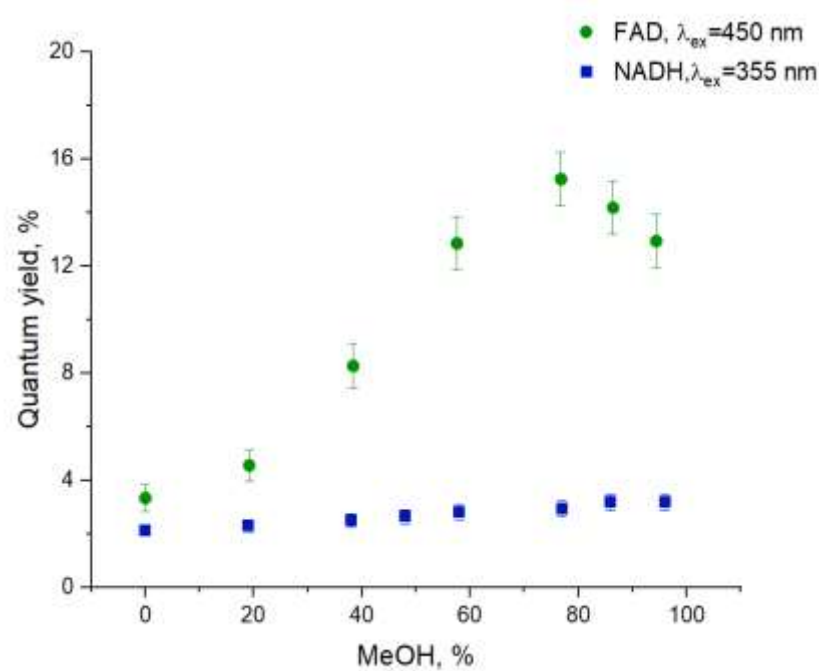
Частота повторения: 80 MHz

$$I(t) = \frac{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}{3}$$

$$I(t) = I_0 \sum_{l=1}^n a_l e^{-\frac{t}{\tau_l}} * IRF(t)$$

Растворители: водные растворы этанола, метанола и пропиленгликоля

Квантовый выход флуоресценции NADH и FAD



- Установлена зависимость квантового выхода флуоресценции NADH и FAD от концентрации пропиленгликоля, этанола и метанола в растворе
- Характер зависимости квантового выхода отличается для молекул FAD и NADH:
 - В случае FAD квантовый выход увеличивается в 4-5 раз в растворах спиртов по сравнению с водным раствором
 - В случае NADH зависимость квантового выхода отличается для одноосновных и двухосновных спиртов

Времена затухания флуоресценции NADH и FAD

$$I_{tot}(t) = I_0 \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) * IRF(t)$$

NADH

Solvent	τ_1 , ns (a_1)	τ_2 , ns (a_2)
H ₂ O	0.26 (0.74)	0.62 (0.26)
MeOH 98%	0.30 (0.41)	0.72 (0.59)
EtOH 98%	0.38 (0.33)	0.93 (0.67)
PG 98%	0.56 (0.44)	1.23 (0.56)

FAD

	450 nm	
Solvent	τ_1 , ns (a_1)	τ_2 , ns (a_2)
H ₂ O	2.40 (0.69)	4.52 (0.31)
MeOH 80 %	3.23 (0.61)	4.58 (0.39)
EtOH 80 %	2.57 (0.13)	4.51 (0.87)
PG 80 %	3.01 (0.15)	5.30 (0.75)

- **Время-разрешенная флуоресценция NADH и FAD характеризуется двумя временами затухания флуоресценции**
- **Наблюдается увеличение обоих времен затухания флуоресценции NADH с увеличением концентрации спиртов в растворе**

Процессы релаксации в возбужденном состоянии многоатомных молекул

$$I(t) = \frac{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}{3} \approx I_0 R_0^{fl}(t) N(t) \sum_{l=1}^2 a_l e^{-t/\tau_l}$$

(I) Колебательная релаксация (1 - 10 пс):

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

(II) Быстрые процессы тушения флуоресценции (1 - 10 пс):

$$N(t) \approx N_1 + N_2 e^{-t/\tau_q}$$

(III) Медленные излучательные и безызлучательные процессы (0.1-10 нс):

$$\sum_{l=1}^2 a_l e^{-t/\tau_l}$$

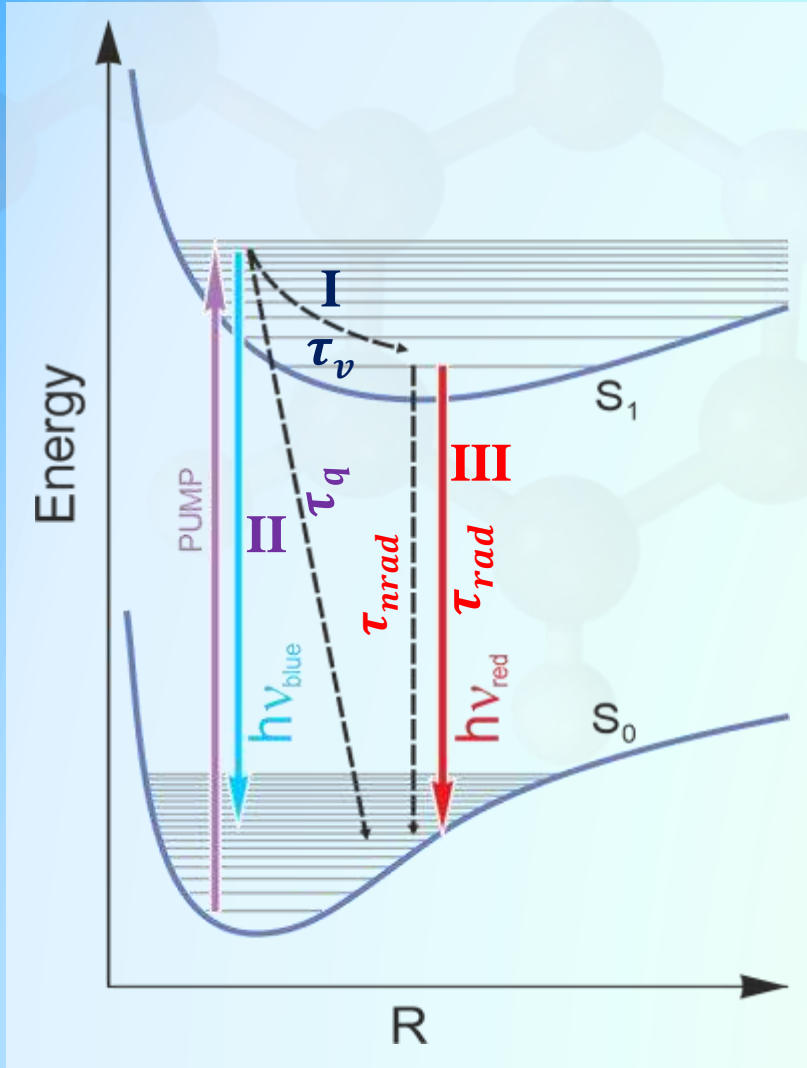
$$\frac{1}{\tau_l} = \frac{1}{\tau_{rad}} + \frac{1}{\tau_{nrad}}$$

τ_l – наблюдаемые времена затухания флуоресценции

τ_{rad} – радиационное время жизни

$$\tau_{rad} \gg \tau_{nrad}$$

τ_{nrad} – время безызлучательной релаксации $S_1 \rightarrow S_0$



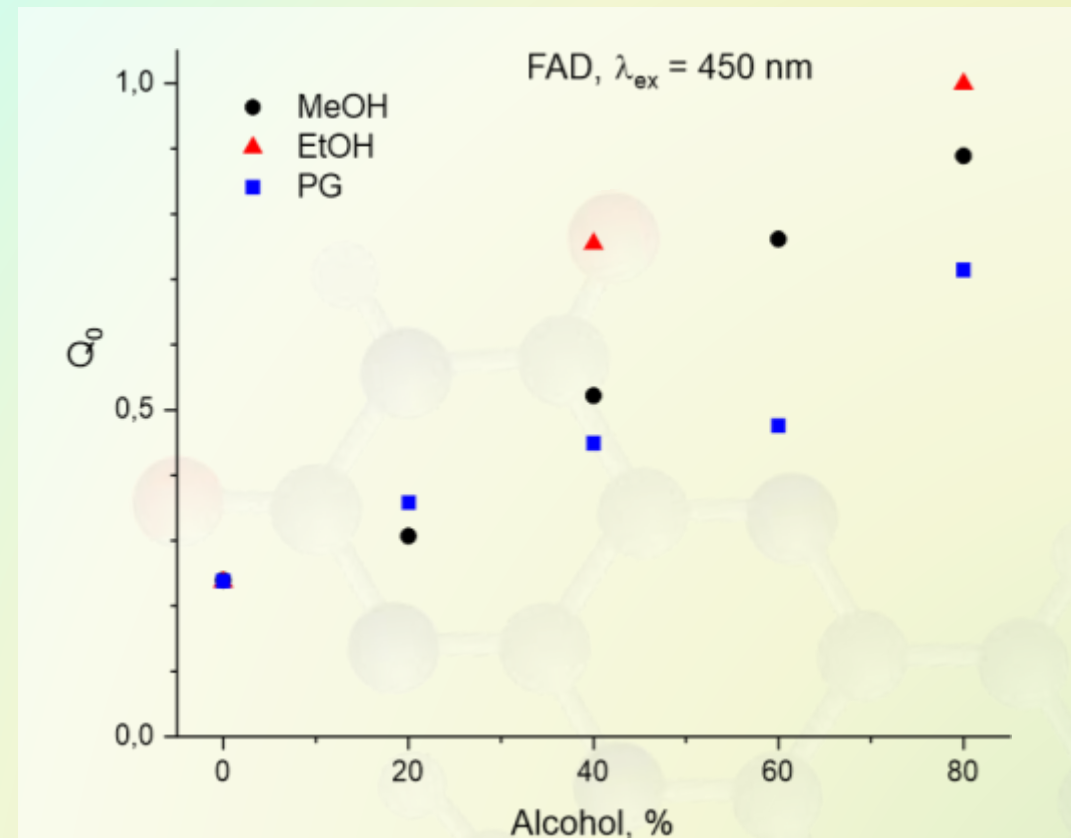
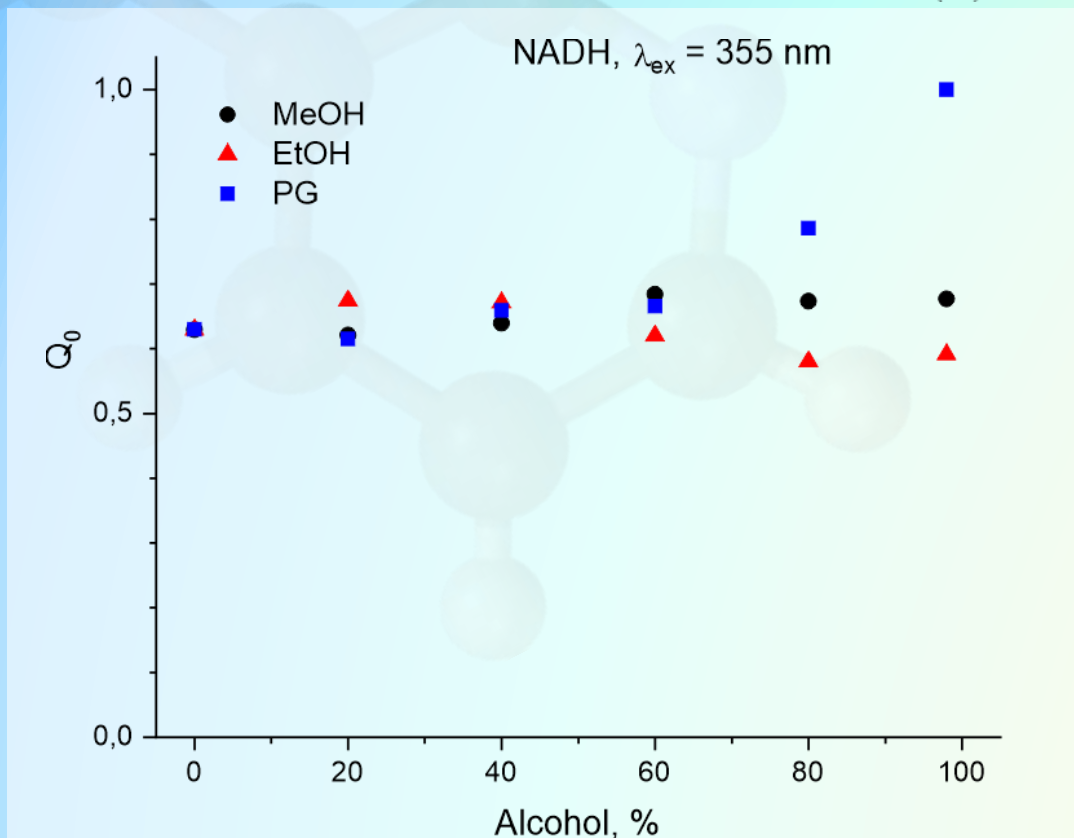
Анализ зависимости квантового выхода флуоресценции FAD и NADH

$$Q = Q_0 \frac{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}{\tau_{rad}}$$

Q_0 – квантовый выход процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции

$$Q_0 = \frac{N_2}{N(0)}$$

$$\tau_{rad} = \text{const}$$



Зависимость квантового выхода процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции (Q_0) от концентрации спиртов в растворе отличается для молекул FAD и NADH

Анализ зависимости квантового выхода флуоресценции NADH

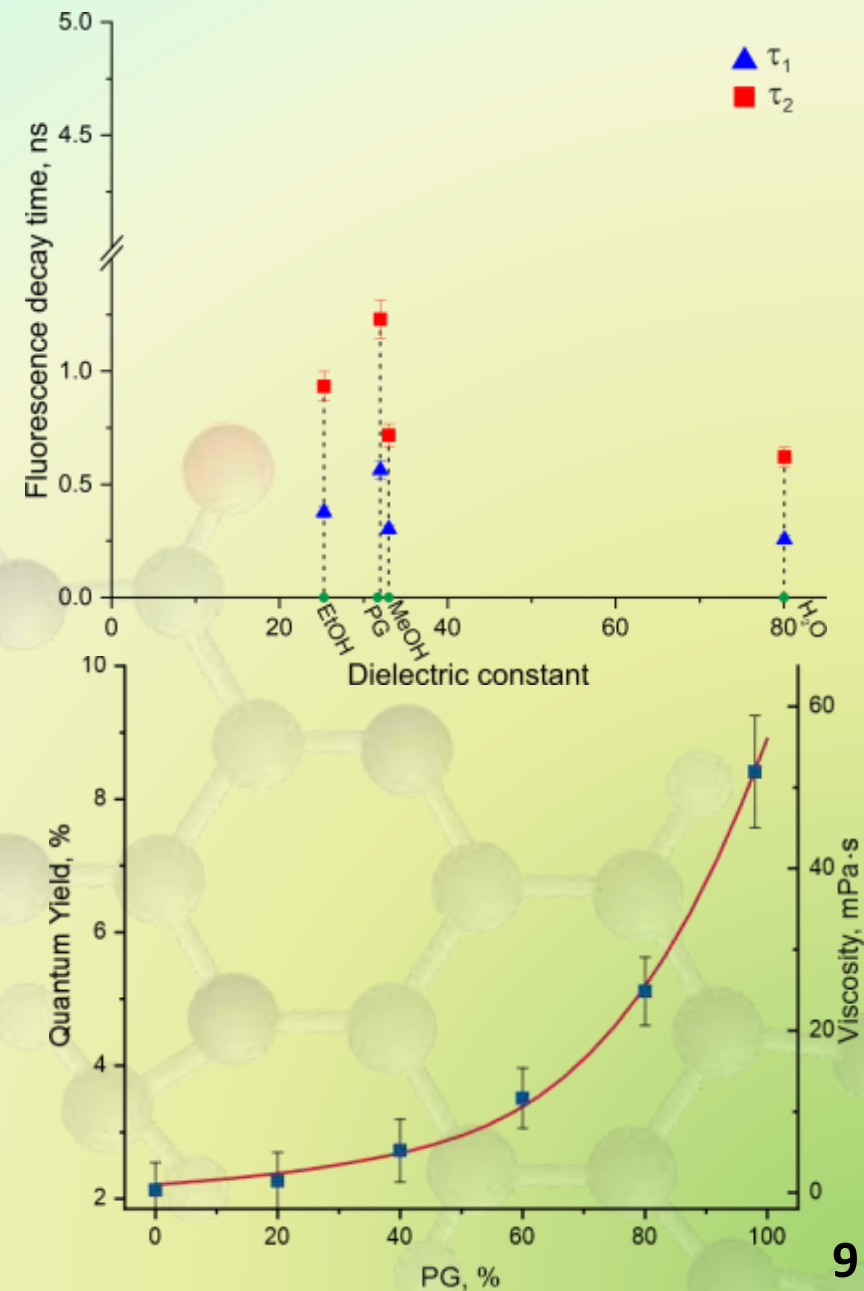
- Рост Q в зависимости от концентрации спирта происходит за счет относительно медленных наносекундных процессов безызлучательной релаксации

$$Q = Q_0 \frac{a_1\tau_1 + a_2\tau_2}{\tau_{rad}}$$

- Увеличение времен затухания флуоресценции обусловлено уменьшением полярности растворителя.

- Q_0 не зависит от конформаций NADH => Процессы быстрого пикосекундного тушения флуоресценции в NADH не обусловлены π -стэкингом

- Увеличение Q_0 в пропиленгликоле связано с замедлением процессов тушения флуоресценции при высокой вязкости раствора.

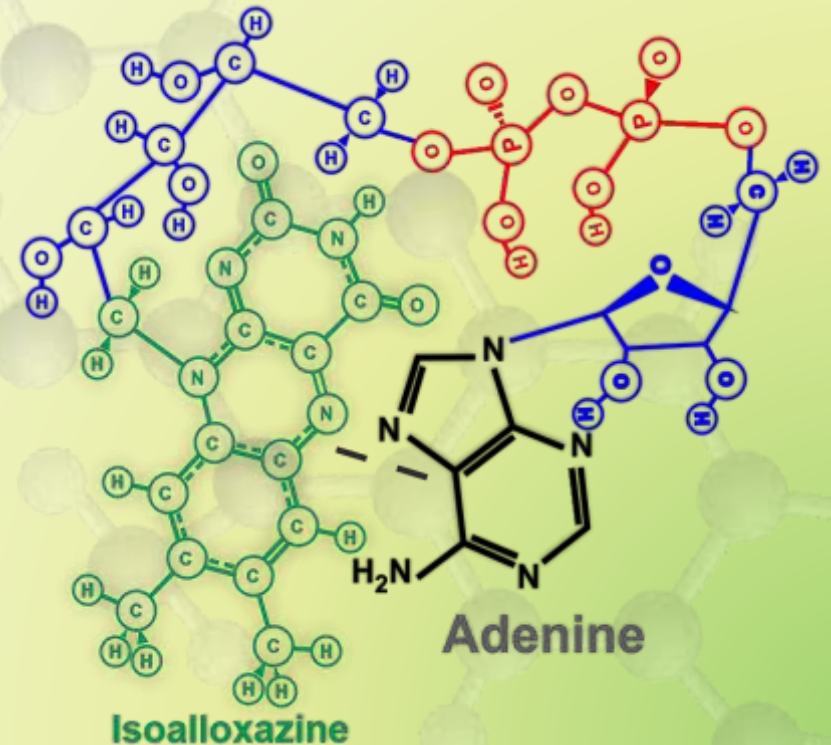


Анализ зависимости квантового выхода флуоресценции FAD

- Рост Q в зависимости от концентрации спирта происходит за счет снижения эффективности процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции

$$Q = \boxed{Q_0} \frac{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}{\tau_{rad}}$$

- Q_0 зависит от конформаций FAD => пикосекундное тушение флуоресценции в FAD обусловлено π -СТЭКИНГОМ.
- Увеличение Q_0 с увеличением концентрации спирта отражает уменьшение количества сложенных конформаций FAD.



Выводы

- **Обнаружено существенное различие в поведении квантовых выходов NADH и FAD в зависимости от концентрации спирта.**
- **Разработана модель для выяснения роли наносекундных и пикосекундных каналов релаксации в возбужденных состояниях NADH и FAD. Модель позволила разделить вклады быстрых и медленных безызлучательных процессов.**
- **Рост квантового выхода флуоресценции NADH в зависимости от концентрации спирта происходит за счет относительно медленных наносекундных процессов безызлучательной релаксации.**
- **Рост квантового выхода флуоресценции FAD в зависимости от концентрации спирта происходит за счет снижения эффективности процессов быстрого пикосекундного тушения флуоресценции.**

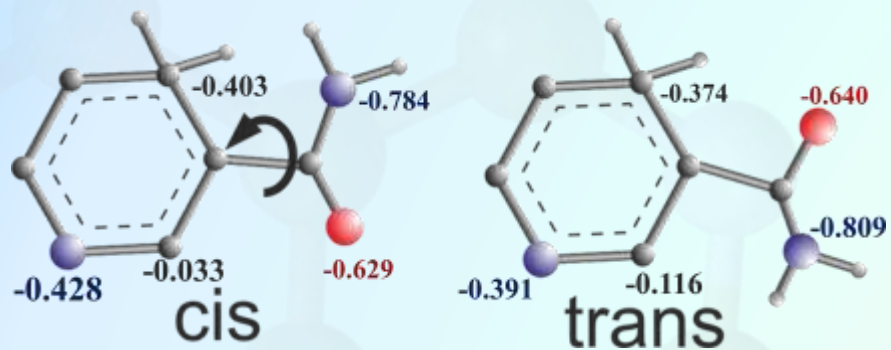


Спасибо за внимание!

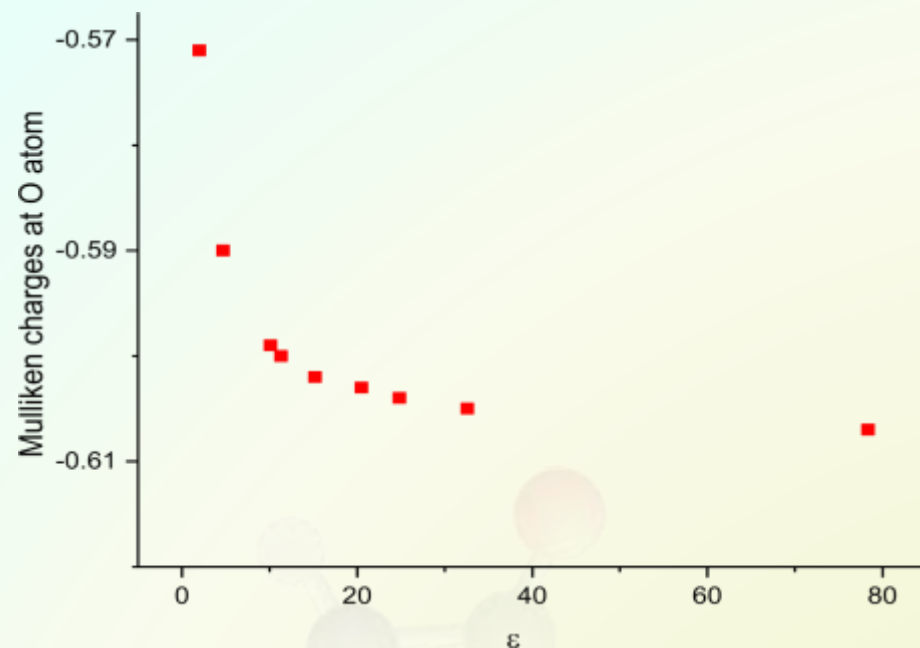
I.A. Gorbunova et al, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 436 (1), 2023

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-22-00230

- Two fluorescence decay times arise due significant difference in charge distribution in *cis* and *trans* configurations of NA ring.



Gorbunova et al, J. Phys. Chem. B 2020, 124, 47, 10682–10697



Gorbunova et al, J. Phys. Chem. B 2021, 125, 34, 9692-9707

