

**УТВЕРЖДАЮ**

**ДИРЕКТОР ОИЯИ**

\_\_\_\_\_  
“ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2023 г.

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОТКРЫТИЯ  
ПРОЕКТА ПО НАПРАВЛЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ  
В ПРОБЛЕМНО-ТЕМАТИЧЕСКОМ ПЛАНЕ ОИЯИ**

**1. Общие сведения о проекте**

**1.1. Шифр темы**

**1.2. Шифр проекта**

**1.3. Лаборатория**

Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка

**1.4. Научное направление**

04-4 Физика конденсированных сред, радиационные и радиобиологические исследования

**1.5. Наименование проекта**

Нанобиофотоника

**1.6. Руководители проекта**

Г.М. Арзуманян, К.З. Маматкулов

**1.7. Заместитель руководителя проекта**

Ерсултан Арынбек

## **2. Научное обоснование и организационная структура**

### **2.1. Аннотация**

Проект «Нанобиофотоника» разработан для реализации в рамках новой темы «Оптические методы исследований конденсированных сред» в Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка. Он представляет собой междисциплинарный исследовательский проект на стыке таких научных направлений, как колебательная (рамановская) спектроскопия и микроскопия, нанофотоника, фотобиология, флуоресцентная микроскопия, и нанобиотехнологии в целом. Концептуально проект «Нанобиофотоника» нацелен на решение ряда фундаментальных и прикладных задач в области изучения физических, оптических и транспортных свойств низкоразмерных материалов (2D материалы и гетероструктуры ван-дер-Ваальса), а также двух актуальных и социально-значимых проблем в области Наук о Жизни касательно программируемой клеточной гибели и липид-белковых взаимодействий. Последние будут сопровождаться моделированием биологических систем методом молекулярной динамики и теория функционала плотности.

Важной составляющей проекта «Нанобиофотоника» будет также и блок некоторых методологических задач, среди которых следует особо отметить освоение рамановской спектроскопии сверхнизких частот ( $\sim 10 \text{ см}^{-1}$ ) при различных длинах волн возбуждающего лазерного излучения. Это позволит кардинально снять ограничение рамановской спектроскопии при изучении низкочастотных колебаний кристаллических решеток и скелетных колебаний биологических образцов.

Международное сотрудничество, прежде всего со странами-участницами ОИЯИ, а также студенческая программа, будут традиционно в центре внимания руководителей проекта «Нанобиофотоника» в период его реализации.

### **2.2. Научное обоснование (цель, актуальность и научная новизна, методы и подходы, методики, ожидаемые результаты, риски)**

Междисциплинарный проект «Нанобиофотоника» нацелен на оптические исследования конденсированного состояния вещества комплементарно с нейтронными и радиобиологическими исследованиями, традиционно ведущимися в ОИЯИ. Формально, основные цели и задачи предлагаемого исследовательского проекта отражены в его названии, состоящей из двух частей: нанофотоника – раздел фотоники, занимающийся изучением физических явлений, возникающих при взаимодействии фотонов с объектами нанометровых размеров, и биофотоника – соответственно, с биологическими объектами. По существу же проекта «Нанобиофотоника», исследовательская программа состоит из ряда конкретных актуальных задач взаимодействия фотонов с конденсированными средами с использованием, прежде всего, рамановской спектроскопии и КАРС микроспектроскопии, флуоресцентной микроскопии, циркулярного дихроизма, некоторых других оптически-ассоциированных методов и подходов, а также спектроскопии ЯМР, рентгеновского рассеяния, атомно-силовой и электронной микроскопии.

Ниже рассмотрим научную программу проекта «Нанобиофотоника» более детально.

## **НАНОФОТОНИКА:**

### **Основная цель:**

***Исследование физических и оптических свойств двумерных материалов (2DMs) и гетероструктур ван-дер-Ваальса (vdWHs), таких как MoS<sub>2</sub>, WSe<sub>2</sub>, NbSe<sub>2</sub>, графен, графен/MoS<sub>2</sub>, WS<sub>2</sub>/hBN и др.***

Со времен открытия методики получения графена в 2004 году, двумерные материалы (2DMs) привлекают большое внимание из-за качественных изменений их физических и химических свойств вследствие эффекта квантового размера, связанного с их наноразмерными толщинами. Атомарно тонкие двумерные дихалькогениды переходных металлов (TMDCs), такие как MoS<sub>2</sub>, WSe<sub>2</sub> и другие, проявляют сильную связь между светом и веществом, и обладают зонами прямого перехода в инфракрасном и видимом спектральных диапазонах, что делает их потенциально интересными кандидатами для различных применений в электронике, оптике и оптоэлектронике. Они могут быть собраны в гетероструктуры и сочетать в себе уникальные свойства составляющих их монослоев.

Двумерные материалы обладают слабыми межслойными ван-дер-ваальсовыми связями, но сильной внутрислойной ковалентной связью. Физика двумерных материалов и ван-дер-ваальсовых гетероструктур (vdWHs) сложна, и исследование обещает привести к новым физическим явлениям в наноструктурах MoS<sub>2</sub>, WSe<sub>2</sub>, NbSe<sub>2</sub>, графен/MoS<sub>2</sub>, WS<sub>2</sub>/hBN и др. Некоторые из этих явлений связаны с транспортными свойствами 2D экситонов, взаимодействием между различными степенями свободы квазичастиц и взаимодействием квазичастиц с электронами, дырками и дефектами, ап-конверсионной люминесценцией и др.

В данном проекте мы предлагаем использовать рамановскую спектроскопию (спонтанную и усиленную) для исследования фундаментальных свойств 2DMs, включая количество слоев, толщину, дефекты, уровень легирования и связь различных состояний в интерфейсах 2DMs и vdWHs. В целом, рамановская спектроскопия 2DMs и vdWHs демонстрирует некоторые уникальные особенности, которые относятся к возбуждению поверхностных мод, пространственно-ограниченных фононов, а также фононов, связанных с поверхностными и межфазными степенями свободы. В рамановской спектроскопии, межслойные фононные моды связаны с колебаниями интерфейсов, где слои могут рассматриваться как элементарная ячейка в модели линейной цепи. Акустическая ветвь фононных мод от межслоевых интерфейсов в 2DMs и vdWHs может также наблюдаться с помощью рамановской спектроскопии.

В данном проекте мы предлагаем исследовать связь электронов и квазичастиц (зарядовая и решеточная степень свободы) в 2DMs и vdWHs, которая очень чувствительна к толщине, порядку укладки и силе связи интерфейсов 2DMs и vdWHs. Связь фонона с дополнительными степенями свободы, такими как электрон - фонон, дефект - фонон, плазмон – фонон, также может быть обнаружена с помощью рамановской спектроскопии с целью исследования комплексного механизма транспортных свойств в 2DMs и vdWHs. Мы ожидаем, что рамановские моды должны обладать определенной энергией и импульсом для связи между квазичастицами.

В рамках проекта предлагается провести работу, которая может выявлять рамановские моды, исходящие от возбуждения частиц и квазичастиц. Кроме того, для исследования пограничной связи фононов в 2D и vdWHs предлагается использовать межслойные и внутрислойные рамановские моды в vdWHs. Это откроет окно для управления пограничными свойствами с целью улучшения качества различных устройств. Эта область мало изучена, и рамановская спектроскопия может стать важным и подходящим методом в этом вопросе.

Из-за усиленного кулоновского взаимодействия, двумерные материалы проявляют сильные экситонные эффекты, что приводит к многочастичным явлениям, охватывающим как внутрислойные, так и межслойные экситоны. Экситоны прочно связаны в низкоразмерных материалах и доминируют в оптическом отклике даже при комнатной температуре, что делает их привлекательными материалами для фундаментальных исследований и различных применений. Несмотря на большое количество исследований физики экситонов в двумерных полупроводниках, удивительно разнообразный экситонный ландшафт, включающий различные экситонные состояния, остается привлекательным для изучения. В частности, до сих пор не исследована нерадиационная рекомбинация, опосредованная высокой концентрацией дефектов и рассеянием квазичастиц с экситонами, понимание этих аспектов может быть полезно для создания эффективных оптоэлектронных устройств.

Некоторые важные особенности фононных мод могут не обнаруживаться в спонтанном рамановском рассеянии. Однако, когерентное антистоксово рамановское рассеяние (КАРС) является уникальным методом для наблюдения комплексного поведения фононов в зависимости от толщины 2DMs, дефектов, температуры, легирования и возмущений электронных состояний, вызванных некоторыми другими внутренними и внешними степенями свободы. Вышеупомянутые возмущения и связи, мало изучены в 2DMs и vdWHs, и потому нам представляется, что КАРС будет полезен в этом аспекте за счет усиленного рамановского сигнала.

Проект также включает в себя исследование одно- и многофононной апконверсионной люминесценции (АКЛ) в монослоях дихалькогенидов переходных металлов и их гетероструктурах. В процессе АКЛ требуется дополнительная энергия для продвижения электронов, возбужденных фотонами низкой энергии, в зону проводимости или дефектную зону исследуемых материалов. Эта дополнительная энергия может быть получена за счет фононного поглощения, многофотонного поглощения и оже-рекомбинации. Первые два типа механизмов АКЛ будут в центре внимания наших исследований. Одно-фононное поглощение, в сравнении с многофононным поглощением и Оже-рекомбинацией, является более эффективным процессом, и часто, требует только непрерывное лазерное возбуждение. В этом типе АКЛ падающий фотон возбуждает электрон из основного состояния в виртуальное или реальное промежуточное состояние с последующим поглощением одного или нескольких фононов из решетки, чтобы перевести этот электрон в конечное состояние. В дополнение к поглощению фононов, многофотонное поглощение также может перевести электроны из виртуального или реального промежуточного состояния, возбужденного фотонами низкой энергии, в конечное состояние. В этом процессе несколько фотонов низкой энергии поглощаются одновременно

(когерентное многофотонное поглощение) или последовательно (многоступенчатое поглощение) через промежуточные состояния.

Еще один вопрос этой части проекта касается низкоэнергетических (низкочастотных) рамановских измерений межслойной связи с использованием трех режекторных фильтров BraggGrate в сочетании только с одним монохроматором.

В заключительной части описания данного раздела проекта «Нанобиофотоника» отметим, что в настоящее время нами проведены первые тестовые измерения рамановских спектров образцов графена/hBN и монослойного графена (рис. 1 и 2, соответственно).

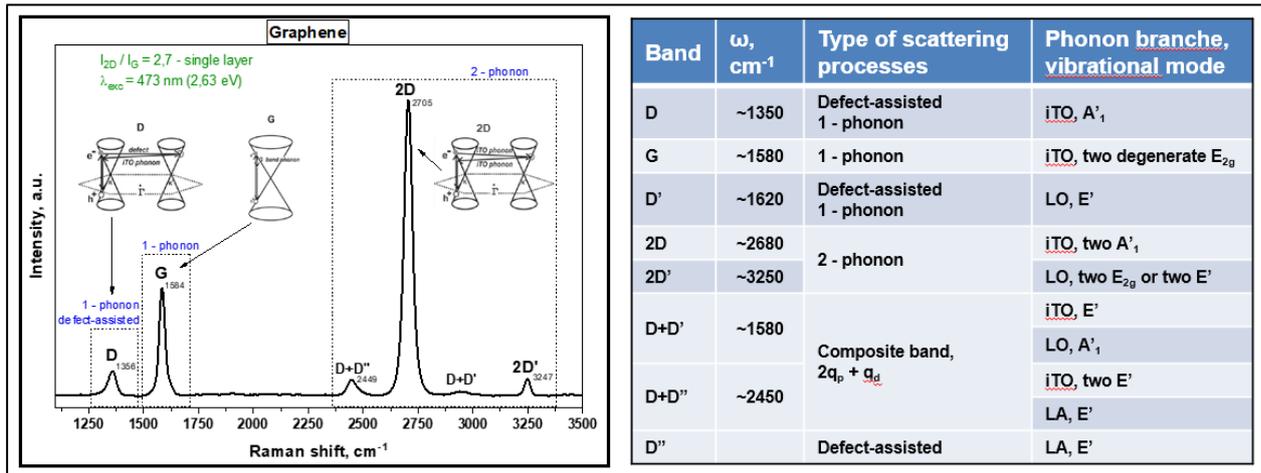


Рис.1. Рамановский спектр монослойного графена / hBN на подложке SiO<sub>2</sub>, 285нм

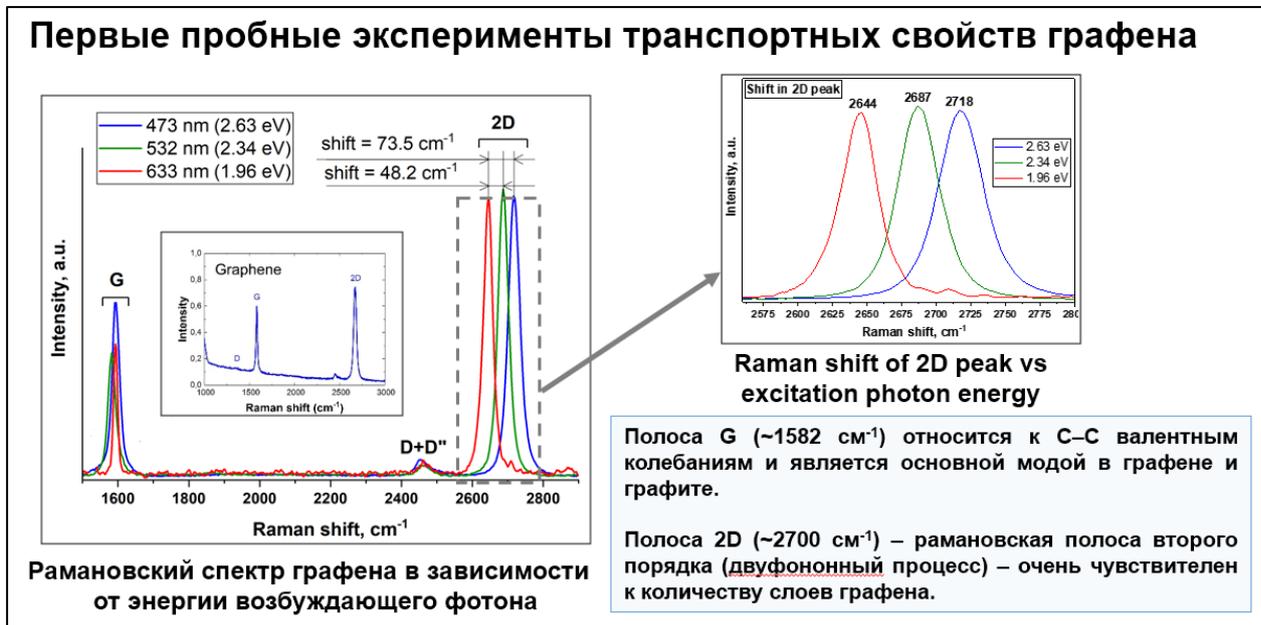


Рис.2 Рамановский сдвиг 2D-полосы графена в зависимости от энергии возбуждающего фотона

Полученные рамановские спектры, хоть и носят предварительный характер, однако, внушают определенный оптимизм для будущих рамановских/оптических исследований как известных, так и новых низкоразмерных материалов.

## **БИОФОТОНИКА (Науки о Жизни)**

### **Основные цели и задачи:**

- 1. Изучение липид-белковых взаимодействий в различных мембранных миметиках: конформационные трансформации и вторичная структура пептидов.*
- 2. Программированная клеточная гибель – фотоиндуцированный нетоз: механизмы, сигнальные пути и рамановские маркеры.*

#### **1. Изучение липид-белковых взаимодействий в различных мембранных миметиках: конформационные трансформации и вторичная структура пептидов.**

Взаимодействие белков и пептидов с липидными мембранами играет большую роль в поддержании целостности и функциональности клеточной мембраны, и значительные изменения в этих взаимодействиях вовлечены в патологию многих заболеваний. В частности, неправильное сворачивание и агрегация пептидов участвует в развитии болезни Альцгеймера, хотя точная связь между структурой белка и патологией болезни Альцгеймера до сих пор не до конца ясна. Именно поэтому, на современном этапе развития экспериментальных и теоретических методов анализа различных молекулярных систем все более востребованной становится разработка комплексных подходов по выявлению закономерностей их взаимодействия с клеточными мембранами и изучению происходящих при этом конформационных трансформаций и структурных изменений в исследуемой биологической системе. В связи с этим начатые нами около полутора лет назад исследования липид-белковых взаимодействий, в основном только методом рамановской спектроскопии, планируется продолжить в новом проекте в более расширенном экспериментальном формате с применением циркулярного дихроизма и ЯМР спектроскопии. Компьютерное моделирование также будет составной частью этих работ.

Среди пептидов, одним из наиболее интригующих объектов в исследованиях липид-белковых взаимодействий являются пептиды группы бета-амилоидов (A $\beta$ ), образующиеся из трансмембранного белка предшественника (APP, amyloid precursor protein). Различные виды A $\beta$  или промежуточные продукты могут вносить изменения в липидные мембраны – начиная от разрушений до механической дестабилизации. Среди различных видов A $\beta$ , основной компонент сенильных бляшек, A $\beta$ (1-42), считается вероятным триггером нейродегенеративного каскада благодаря своей цитотоксичности. A $\beta$  состоит из полипептида с 42 аминокислотами, 10 из которых (сегменты 25-35) составляют трансмембранный сегмент APP, а также часть полной длины пептида A $\beta$ . Поэтому этот короткий трансмембранный сегмент часто используется в исследованиях белковых взаимодействий и разделения в мембране. Более короткий вид A $\beta$ (25-35) также является мембранно-активным и сохраняет большую часть биологической и нейротоксической активности A $\beta$ (1-42).

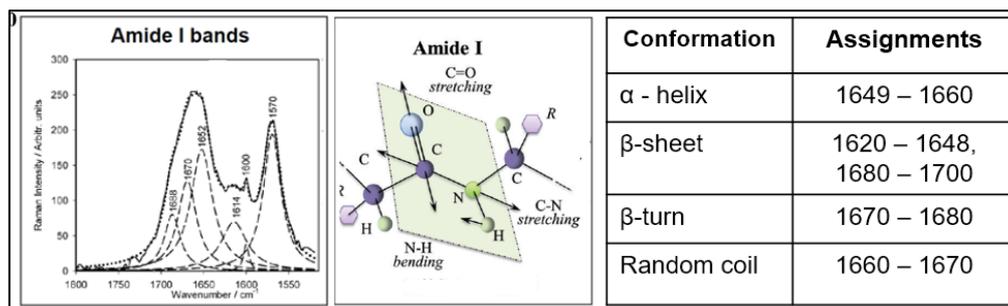
Именно эти две аллоформы A $\beta$  планируется изучить в рамках предлагаемого проекта, как в липидном окружении, так и вне его. Однако, это не ограничивает исследования и других белков, например, лизоцима, с которым, в последнее время, также ассоциируют образования амилоидных бляшек, приводящих к болезни Альцгеймера.

## Конформационные трансформации и вторичная структура белков.

Рамановская спектроскопия неуклонно приобретает все большее значение для структурной характеристики биологических систем в целом, и белков, в частности. Рамановский спектр белков обычно состоит из вкладов трех основных типов колебательных мод, исходящих от полипептидной основы (амидные полосы) и ароматических и неароматических остатков боковых цепей аминокислот. Положение амидных полос зависит от конформации полипептидной основы и внутри- и межмолекулярных водородных связей. Следовательно, эти полосы можно соотнести со вторичной и третичной структурой белка. Ключевыми колебательными индикаторами этих структур являются три конформационно чувствительных амидных колебания белковой основы: амид I ( $1620-1700\text{ см}^{-1}$ ), амид II ( $1520-1570\text{ см}^{-1}$ ) и амид III ( $1220-1300\text{ см}^{-1}$ ). Эти полосы чувствительны к вторичной структуре, поскольку (i) геометрия полипептида напрямую влияет на силовые константы амидной связи и (ii) каждый тип элемента вторичной структуры участвует в водородной связи различной прочности. Изменения в силовых константах приводят к различиям в составе нормальной моды, что, в свою очередь, ответственно за сдвиг частоты и изменение интенсивности фракций амидных полос. Полоса амида I в основном обусловлена валентным растяжением C=O, не перекрывается с колебательными полосами других функциональных групп и может быть непосредственно использована для характеристики вторичной структуры белка. Полоса амида III является наиболее сложной полосой и возникает в результате различных подвижностей, включая C-N колебания в сочетании с N-H изгибом в плоскости. Полоса амида II в основном связана с растяжением C-N, изгибом N-H в плоскости, растяжением C-C, и очень слаба в нерезонансных спектрах рамановского рассеяния, что делает ее практически не обнаруживаемой. Таким образом, в целом полосы амида I и амида III считаются более чувствительными к структуре, чем полоса амида II белков и пептидов.

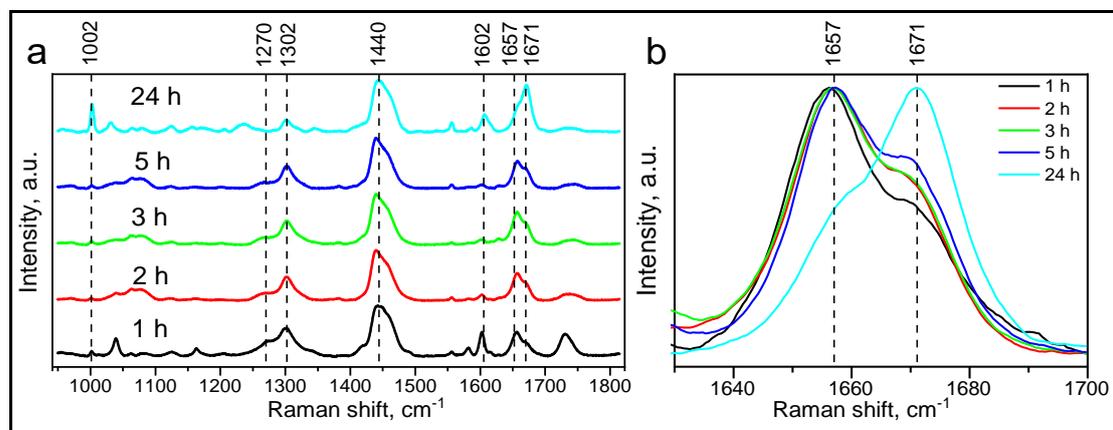
**Методы оптической спектроскопии, в частности, рамановская спектроскопия и круговой дихроизм, хорошо и эффективно зарекомендовали себя при исследовании структурных свойств, анализе агрегации и идентификации пептидов амилоида- $\beta$ . Поэтому эти задачи будут ключевыми пунктами детального исследования в предлагаемом проекте "Нанобиофотоника".**

Основными фракциями полосы амид I, отличающиеся по положению и форме, являются  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -лист,  $\beta$ -поворот и произвольная петля. Полоса амида I обычно очень широкая и, потому, требует спектральной деконвуляции с целью ее детальной интерпретации (рис.3).



**Рис.3. Деконвульированная полосы амида I рамановского спектра (слева), колебательные моды (в центре), конформации и назначения (справа).**

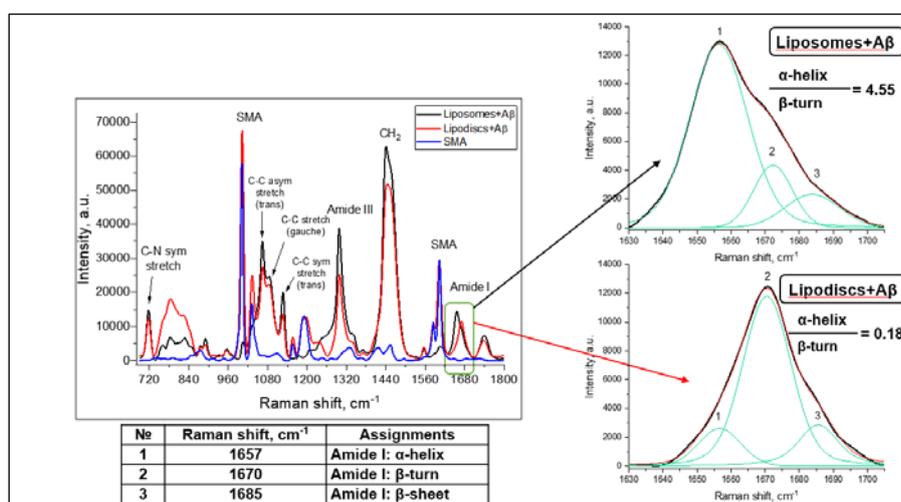
На основании наших предварительных измерений, агрегация Аβ сопровождается преобразованием структуры, богатой α-спиралями, в β-листовую вторичную структуру, характерную для агрегатов Аβ и в основном представленную в фибриллах - предшественниках болезни Альцгеймера (Рис. 4).



**Рис.4. (a) Рамановские спектры пептида Аβ(1-42) в водном растворе по часам, и (b) нормализованные спектры пептида в области линии амида I.**

Нормированные рамановские частоты на рисунке 4b ясно показывают, что в течение первых пяти часов измерений с интервалами в 1 и 2 часа, в полосе амид I спектра преобладала α-спиральная конформация на рамановской частоте 1657 см<sup>-1</sup>. После 24 часов пребывания пептида в воде спектральный вес полосы 1671 см<sup>-1</sup> заметно увеличился, что указывает на конформационный переход в β-поворот/листовую структуру. В проекте предполагается детальное и углубленное исследование вторичной структуры пептида методами рамановской спектроскопии, циркулярного дихроизма и ЯМР спектроскопии, в сопровождении с компьютерным моделированием.

Далее, предлагается изучить изменения во вторичной структуре пептидов Аβ, инкорпорированных в различные мембранные миметики, в частности в везикулы/липосомы и липодиски, с целью выявления наиболее нативной композиции. Здесь мы также имеем некоторые предварительные данные (Рис.5), демонстрирующие преимущество липосом с доминирующей фракцией α-спирали над липодисками.



**Рис.5. Сравнительные спектры комбинационного рассеяния Аβ(1-42), пептида, введенного в липосому и липодиск**

В то время как на липид-пептидные взаимодействия могут влиять состав мембраны, водно-молекулярное окружение, концентрация пептида, термодинамическая фаза липидной мембраны также является одним из важных факторов. Это объясняется тем, что их роль в определении структурных и упруго-механических свойств мембраны связана с ее текучестью и динамикой липидов, которые, в свою очередь, влияют на способность Аβ взаимодействовать с липидной мембраной. Мы предполагаем, что в результате разрушения липидной мембраны пептидом Аβ, проявляющим свои деструктивные свойства во время фазового перехода липида, может происходить некая структурная реорганизация. Этот вопрос до сих пор был мало изучен и будет также в фокусе нашей исследовательской программы, связанной с разделом "Биофотоника".

Завершая описание этой части проекта, отметим следующее: на начальном этапе реализации проекта, комплементарные исследования липид-белковых взаимодействий методами циркулярного дихроизма и ЯМР спектроскопии намечено проводить на экспериментальной инфраструктуре внешних партнеров.

## **2. Программированная клеточная гибель – фотоиндуцированный нетоз: механизмы, сигнальные пути и рамановские маркеры.**

Нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами в циркуляции, обеспечивая первую линию защиты хозяина от патогенов. Как профессиональные фагоциты, нейтрофилы содержат антимикробные ферменты в своих гранулах и выполняют эффекторные функции, такие как фагоцитоз, дегрануляция и образование активных форм кислорода (АФК) в очагах воспаления. Нейтрофилы высвобождают деконденсированный хроматин или внеклеточные ловушки нейтрофилов (ВЛН) в ответ на различные физиологические и фармакологические стимулы. Процесс образования ВЛН, приводящий к запрограммированной гибели клеток, называется нетоз. Нетоз может быть активирован антителами, цитокинами, микрокристаллами, ионофорами кальция и калия, а также фармакологическими стимулами, такими как форбол 12-мирикат 13-ацетат (РМА). Помимо защитной функции хозяина, ВЛН играют важную роль в патогенезе различных аутоиммунных, воспалительных и злокачественных заболеваний.

В последние годы были проведены исследования фотоиндуцированного образования нетоза, в основном активированного УФ-излучением. Мы предлагаем изучить механизмы и сигнальные пути высвобождения внеклеточных ловушек под воздействием УФ, видимого и ИК света, поскольку важно контролировать последствия повреждающего действия электромагнитного излучения в широком диапазоне спектра. ***В этом состоит основная новизна предлагаемого проекта в части исследования нетоза, наряду с поиском спектральных/рамановских биомаркеров этого вида программируемой клеточной гибели.***

### ***Гипотеза о окислительно-восстановительных (редокс) центрах как первичных фотоакцепторах нетоза.***

Чтобы вызвать фотобиологический эффект, любое излучение должно быть поглощено функциональной молекулой хромофора/фотоакцептора, расположенной в какой-либо ключевой структуре клетки, способной влиять на ее активность и гомеостаз.

Примером такой ключевой структуры являются редокс-центры. В нейтрофильных гранулоцитах эффективными фотоакцепторами и преобразователями фотосигнала можно считать компоненты митохондриальной дыхательной цепи, в частности, цитохром *c* оксидазу и мембранно-связанный гетеродимерный флавогемопротеин цитохром *b*<sub>558</sub>, структурный компонент NADPH-оксидазы, содержащий редокс-центры.

Цитохром *b*<sub>558</sub> представляет собой каталитическую электронтранспортную часть NADPH-оксидазы и состоит из двух субъединиц: gp91phox и p22phox. Цитоплазматический хвост субъединицы gp91phox связывает FAD (флавин аденин динуклеотид), NADPH и гем, необходимый для переноса электронов на кислород. Цитохром *b*<sub>558</sub> является единственным мембранным компонентом фагоцитарной NADPH-оксидазы, производящей супероксидные анион-радикалы ( $O_2^{\cdot-}$ ), которые легко расщепляются до перекиси водорода.

Цитохром *c* оксидаза – это терминальный фермент аэробной дыхательной цепи эукариотических клеток, который опосредует перенос электронов от цитохрома *c* к молекулярному кислороду, играя ключевую роль в клеточной биоэнергетике. Цитохром *c* оксидаза локализована во внутренней мембране митохондрий и также известна как комплекс IV. Фотоакцепторная реактивность цитохром *c* оксидазы обусловлена четырьмя активными металлическими редокс-центрами: биядерными CuA, CuB, гемом *a* и гемом *a*<sub>3</sub>, которые имеют полосы поглощения в широком диапазоне от УФ до ближнего ИК-спектра, что позволяет осуществлять фотобиологические эффекты при различных длинах волн возбуждения.

Основными АФК в активированных нейтрофилах являются супероксидные анион-радикалы, которые, будучи слабыми окислителями, быстро дисмутируют до пероксида водорода, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Последний, в свою очередь, может подвергаться дальнейшей обработке, в результате которой образуются более активные метаболиты, такие как OH· (гидроксильные радикалы) и HClO (хлорноватистая кислота). Последний образуется в реакции между H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и анионом хлора (Cl<sup>-</sup>), опосредованной ферментом специфических гранул миелопероксидазы (МПО) в процессе окислительного взрыва активированных нейтрофилов. Приблизительно до 70% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> под действием МПО превращается в HClO, который обладает сильными микробицидными и цитотоксическими свойствами.

*Основываясь на экспериментальных результатах последних двух лет, мы намерены подтвердить выдвинутую нами гипотезу о редокс-центрах как первичных фотоакцепторах, в частности (i) используя широкий спектр различных ингибиторов митохондриальной дыхательной цепи и NADPH-оксидазы, (ii) выбирая источники излучения, адаптированные по длине волны к спектру поглощения этих двух цитохромов.*

### **Измерение АФК методом рамановской спектроскопии**

Для подтверждения участия АФК в формировании нетоза, в наших экспериментах мы будем использовать рамановскую спектроскопию для обнаружения некоторых характерных для различных АФК пиков, в частности, перекиси водорода на рамановской частоте в области 875-880 см<sup>-1</sup> (растяжение O-O), хлорноватистой кислоты на частоте ~732 см<sup>-1</sup> и некоторые другие. Измерения будут проводиться предпочтительно в режиме картирования в течение первых 10-15 мин после активации нейтрофилов светодиодами с длиной волны от УФА до ближнего ИК. Кроме того, мы намерены продолжить поиск

низкочастотных рамановских полос цитруллина как еще одного сигнального пути фотоиндуцированного нетоза.

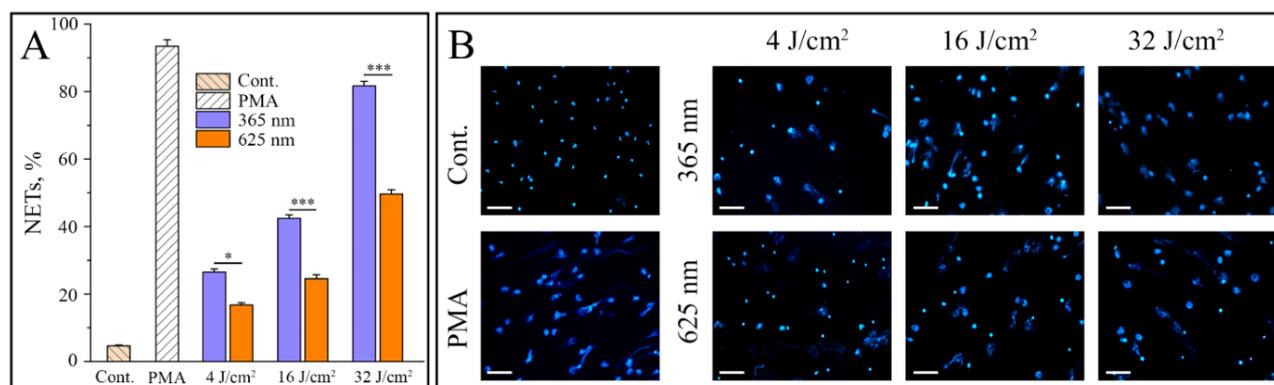
По нашему мнению, особый интерес и новизну в фотоиндуцированном нетозе может представлять также случай, когда интактные нейтрофильные клетки будут облучаться одновременно или последовательно двумя различными длинами волн, например, УФ-А и ИК. Мы считаем это интересным в связи с тем, что Солнце светит одновременно в широком диапазоне спектра, возможно, компенсируя ИК-излучением вредное воздействие средних или высоких доз УФ.

### **Визуализация фотоактивированных нейтрофилов методом флуоресцентной микроскопии.**

Для визуализации интактных и нетотических клеток после фотоактивации будет использоваться флуоресцентный светодиодный микроскоп Nikon Eclipse Ts2R-FL с программным обеспечением NIS-Elements BR, фильтром Epi-FL C-LED385 и объективом CFI Super Plan Fluor ELWD ADM 20x с числовой апертурой 0,45 и рабочим расстоянием (8,2-6,9) мм.

### **Наши текущие результаты и достижения по фотоиндуцированному нетозу.**

За последние два года мы разработали протокол выделения нейтрофилов и их облучения светодиодными источниками при различных дозах. Некоторые из полученных результатов показаны на рис.6.



**Рис.6. Высвобождение ВЛН в зависимости от дозы облучения на длинах волн 365 нм и 625 нм (рис. 6А). Образование ВЛН регистрировалось после 3 часов инкубации при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> с помощью флуоресцентного микроскопа. На рис. 6В представлены соответствующие репрезентативные изображения облученных нейтрофилов, а также стимулированных ФМА. Масштаб: 50 мкм (В).**

Учитывая: (i) зависимость выхода ВЛН от длины волны, (ii) окислительно-восстановительную чувствительность цитохрома *b<sub>558</sub>* и цитохрома *c*, нам представляется весьма вероятным, что наблюдаемый фотоиндуцированный нетоз опосредован возбуждением этих цитохромов и последующей продукцией АФК. Для проверки нашей гипотезы мы намерены использовать специфические ингибиторы NADPH-оксидазы и окислительно-восстановительной цепи митохондрий.

Список красителей, антител и ингибиторов, которые будут применяться в наших исследованиях: Sytox Green, Hoechst, DAPI, SYBR Green, FITC-связанное поликлональное антитело к миелопероксидазе (MPO), гистон H3 (D1H2) XP, катепсин G (E3N3O), FITC-

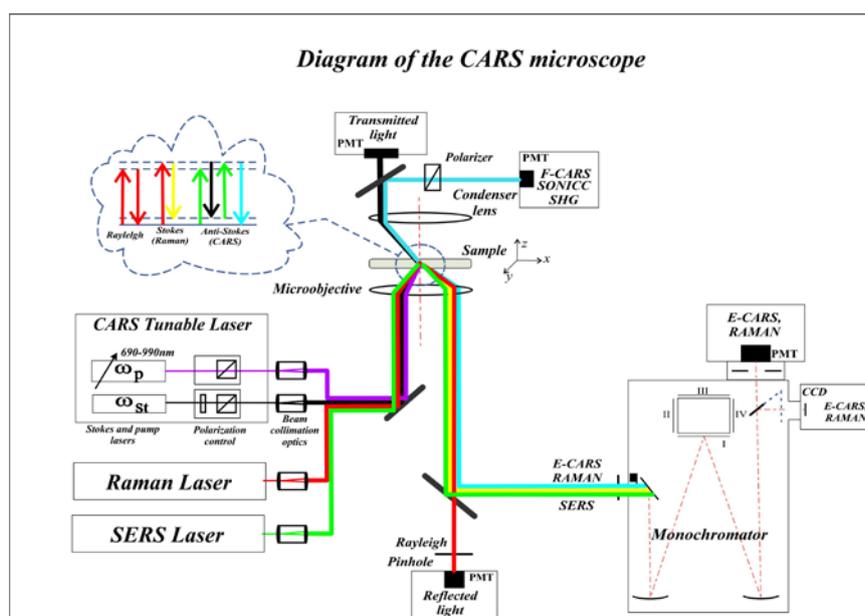
связанное поликлональное антитело к цитруллинированному гистону H3, антирабитовый IgG, HRP-связанное антитело 7074; и ингибиторы: апоцинин, GSK484, MitoTEMPO, DPI, SLPI: ингибитор протеазы секреторных лейкоцитов, NSP, ингибитор альфа1-протеиназы ( $\alpha$ 1PI),  $\alpha$ 1-анти-химотрипсин (АСТ),  $\alpha$ 2-макроглобулин, ингибитор эластазы моноцитарных нейтрофилов (MNEI или SerpinB1).

## Методы и подходы:

### *Микроспектрометр «КАРС» как базовая установка ЛНФ для оптических исследований.*

На базе 3D сканирующего конфокального лазерного микроспектрометра «КАРС», в ЛНФ успешно функционирует мультимодальная оптическая платформа, на которой проводятся эксперименты как по спонтанному рамановскому рассеянию, так и по трем ее усиленным опциям: (i) КАРС – когерентное антистоксово рассеяние света, (ii) ГКР – гигантское комбинационное рассеяние, (iii) комбинация КАРС-а с ГКР (ГКАРС). Кроме того, платформа полностью адаптирована для (i) люминесцентных измерений, в том числе и в анти-стоксовой части спектра (ап-конверсионная люминесценция), (ii) нелинейной визуализации био-объектов с использованием второй гармоники, (iii) построение химически селективных изображений (рамановских карт), (iv) 3D сканирование образцов.

Кратко опишем оптическую платформу, схематически представленную на рис.7. Для возбуждения спонтанного рамановского сигнала используются лазеры на трех длинах волн: (1) газовый He-Ne лазер (модель Melles Griot 05-LHP-991) с выходной мощностью 10 мВт на длине волны 632.8 нм и расходимостью пучка меньше 1мрад, (2) лазер с диодной накачкой на длине волны 532нм с плавно регулируемой выходной мощностью до 20мВт (модель SLM-417-20), и (3) стабилизированный одномодовый лазер на длине волны 785 нм с выходной мощностью 100 мВт, (модель I0785SD0100B-IS-HD).



**Рис.7. Оптическая схема мультимодальной оптической платформы на базе микроскопа «КАРС».**

Для генерации КАРС-сигналов, на платформе установлен твердотельный пикосекундный иттрий-ванадатный лазер ( $\text{YVO}_4:\text{Nd}$ ) с диодной накачкой, работающий в режиме пассивной синхронизации мод. Лазер разработан и изготовлен Литовской фирмой EKSPLA (модель PT257 + SOPO). Выходные параметры базового лазера на длине волны 1064 нм – длительность импульса 7 пс, средняя мощность 5 Вт, частота повторения импульсов 85 МГц. Для перестройки длины волны излучения с целью резонансной настройки волны накачки на молекулярные колебательные уровни анализируемого образца, в данной модели лазера реализована схема внутррезонаторной перестройки длины волны излучения с помощью оптического параметрического генератора (ОПГ), работающего в режиме синхронной накачки (SOPO – synchronously pumped optical parametric oscillator). Накачка нелинейного кристалла LBO в ОПГ осуществляется второй гармоникой (532 нм, 6 пс, 2 Вт) основного излучения, а перестройка длины волны происходит за счет изменения температуры кристалла LBO в пределах от 107°C до 148°C (некритичный по температуре фазовый синхронизм). Это обеспечивает перестройку длины волны накачки в широком спектральном диапазоне от 690 нм до 990 нм. Во всей перестроечной спектральной полосе ширина линии излучения составляет от 5 до 7  $\text{см}^{-1}$  с длительностью импульса 5-6 пс при типичных значениях выходной мощности от 40 до 150 мВт. В качестве стокс-волны используется лишь небольшая часть (около 10%) от основного излучения (1064 нм). В резонаторе предусмотрена также контролируемая от компьютера оптическая линия задержки, позволяющая с большой точностью синхронизовать и совмещать во времени волну накачки со стоксовой волной. XY-гальванометрический сканер с компьютерным управлением (GSI-Lumonics VM1000) обеспечивает быстрое сканирование образца в латеральной фокальной плоскости объектива.

Используя такую оптическую платформу, образцы можно спектрально визуализировать в диапазоне частот ( $1000\text{-}3580$ )  $\text{см}^{-1}$ , который охватывает все наиболее важные колебательные моды биомолекул. Пять каналов детектирования позволяют регистрировать два сигнала в прямом и три в обратном направлении. Контроль поляризации регулируется полуволновой пластиной в стоксовом луче.

### Ожидаемые результаты

#### 1. Изучение физических и оптических свойств 2D материалов и гетероструктур вандер-Ваальса (vdWHs), таких как: $\text{MoS}_2$ , $\text{WSe}_2$ , $\text{NbSe}_2$ , графен/ $\text{MoS}_2$ и $\text{WS}_2/\text{hBN}$ методами рамановской спектроскопии и апконверсионной люминесценции:

- исследование фундаментальных, резонансных, межслойных, и индуцированных дефектами колебательных мод;
- исследование дисперсионной зависимости отдельных пиков (D, 2D и др.) рамановского спектра 2D материалов и vdWHs в Стоксовой и/или антиСтоксовой областях от:
  - энергии фотона накачки;
  - мощности лазерного возбуждения.
- экситон-фононные взаимодействия, транспортные свойства экситонов;
- изучение характеристик ап-конверсионной люминесценции (АКЛ) при одно- и многофононном поглощении в различных 2DM и vdWHs;

- исследование транспортных свойств АКЛ в зависимости от длины волны возбуждения (возможные резонансные эффекты);
- выявление характеристик температурной зависимости АКЛ в зависимости от мощности возбуждающего излучения.

## **2. Липид-белковые взаимодействия:**

- синтез различных мембранных миметиков и изучение их морфологических и оптических свойств (продолжение начатых работ);
- исследование и детальный анализ вторичной структуры белков, встроенных в мембранные миметики с помощью рамановской спектроскопии (прежде всего амидные полосы спектра), кругового дихроизма, в т.ч. и температурные зависимости;
- изучение конформационных трансформаций в липид-белковых структурах в т.ч. температурные зависимости;
- моделирование липид-белковых взаимодействий методами молекулярной динамики (MD) и теории функционала плотности (DFT).

## **3. Спектроскопия и микроскопия программируемой клеточной гибели: нетоз**

- идентификация первичных фотоакцепторов фотоактивированного нетоза под действием УФ, видимого и ИК излучения.
- дальнейший поиск и идентификация спектральных маркеров нетоза.
- эффект одновременного и последовательного воздействия на интактные клетки нейтрофилов излучения двух источников света на разных длинах волн.
- применение иммунофлуоресцентной микроскопии в исследованиях программируемой клеточной гибели.

### **Риски**

Основной риск связан с периодическим, раз в два года, профессиональным сервисным обслуживанием пикосекундного лазера (фирма Ekspla, Литва), входящего в комплектацию «КАРС» микроспектрометра. Однако, начиная с прошлого, 2022 года, этот риск нами практически снят: сервисное обслуживание этого лазера может проводить на договорной основе российская компания ООО "Промэнерголаб". Первый опыт работы с этой компанией уже состоялся и прошел успешно.

### **2.3. Предполагаемый срок выполнения**

2024-2027 гг.

### **2.4. Участвующие лаборатории ОИЯИ**

- Лаборатория нейтронной физики им И.М. Франка:  
Балашою Мария
- Лаборатория информационных технологий им. М.Г. Мещерякова:  
Стрельцова Оксана
- Лаборатория радиационной биологии:  
Душанов Эрмухаммад

## 2.4.1 Потребности в ресурсах МИВК

Вычислительные ресурсы	Распределение по годам			
	2024	2025	2026	2027
Хранение данных (ТБ) - EOS - Ленты				
Tier 1 (ядро-час)				
Tier 2 (ядро-час)				
СК «Говорун» (ядро-час) - CPU - GPU	300	300	300	300
Облака (CPU ядер)				

## 2.5. Участвующие страны, научные и научно-образовательные организации:

Организация	Страна	Город	Участники	Тип соглашения
Ереванский государственный университет, ЕГУ	Армения	Ереван	Лалаян А.А.	Совместные работы
Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, БГУИР	Беларусь	Минск	Бондаренко А.В., Завацкий С.А.	Совместные работы
Институт физических исследований, Национальный исследовательский центр	Египет	Каир	Медхат А. А. Ибрагим	Совместные работы, протокол
Университет Мизорам	Индия	Айзавл	Мутукумаран Босе	Совместные работы
Центр атомных исследований им. Индиры Ганди	Индия	Калпаккам	Кумар Ниранджан	Совместные работы
Институт ядерной физики	Казахстан	Алматы	Назаров Куаныш	Совместные работы
Центр передовых исследований, СЕАС	Куба	Гавана	Паэс Амира	Совместные работы
Московский государственный университет	Россия	Москва	Воробьева Н.В.	Совместные работы

Институт наукоёмких технологий и передовых материалов, ДВФУ	Россия	Владивосток	Голик С.С.	Совместные работы
Первый С-П медицинский университет им. акад. И.П. Павлова	Россия	Санкт-Петербург	Моисеев А.А.	Совместные работы
Белградский университет	Сербия	Белград	Милоевич-Ракич Майя, Йевремович Анка	Совместные работы
Джизакский филиал Национального университета Узбекистана имени Мирзо Улугбека	Узбекистан	Джизак	Уралов А.И.	Совместные работы, протокол

## 2.6. Организации-соисполнители:

- ООО «СОЛ инструмента», Минск, Республика Беларусь,
- Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Минск, Республика Беларусь,
- ООО «Русграфен», Москва, Россия,
- Центр атомных исследований им. Индиры Ганди, Калпаккам, Индия.

## 3. Кадровое обеспечение

### 3.1. Кадровые потребности в течение первого года реализации

№№ п/п	Категория работника	Основной персонал, Сумма FTE	Ассоциированный персонал Сумма FTE
1.	научные работники	4,0	
2.	инженеры	3,0	
3.	специалисты	5,0	
4.	служащие	-	
5.	рабочие	-	
	<b>Итого:</b>	<b>12,0</b>	

## 3.2. Доступные кадровые ресурсы

### 3.2.1. Основной персонал ОИЯИ

№№ п/п	Категория работников	ФИО	Подразделение	Должность
1.	научные работники	Арзуманян Григорий Макичевич	Сектор Рамановской спектроскопии	Начальник сектора рамановской спектроскопии
		Маматкулов Кахрамон Зиядуллаевич	Группа нелинейной микроспектроскопии	Начальник группы нелинейной микроспектроскопии
		Арынбек Ерсултан	Группа нелинейной микроспектроскопии	Младший научный сотрудник
2.	инженеры	Мелькова Ирина Николаевна	Сектор Рамановской спектроскопии	Инженер
		Морковников Иван Алексеевич	Группа нелинейной микроспектроскопии	Инженер- программист
3.	специалисты	Дамир Айжан	Группа нелинейной микроспектроскопии	Лаборант
		Дёмина Екатерина Михайловна	Группа нелинейной микроспектроскопии	Старший лаборант
		Закрытная Дарья Сергеевна	Группа нелинейной микроспектроскопии	Лаборант
		Шутиков Артём Александрович	Группа нелинейной микроспектроскопии	Лаборант
		Геронина Анна Александровна	СРС	Лаборант
		Кисина Алёна Дмитриевна	СРС	Лаборант
		Пугачевская Ирина Михайловна	СРС	Секретарь- референт
4.	рабочие	-	-	-

### 3.2.2. Ассоциированный персонал ОИЯИ

Категория работников	Организация-партнер	Сумма FTE
Научные работники		
инженеры		
специалисты		
рабочие		
<b>Итого:</b>		

## 4. Финансовое обеспечение

### 4.1. Полная сметная стоимость проекта

Прогноз полной сметной стоимости (указать суммарно за весь срок, за исключением ФЗП).

**814,00 k\$**

### 4.2. Внебюджетные источники финансирования

Предполагаемое финансирование со стороны соисполнителей/заказчиков - общий объем.

#### Руководители проекта:

Арзуманян Г.М. \_\_\_\_\_

Маматкулов К.З. \_\_\_\_\_

Дата представления проекта в ДНОД: \_\_\_\_\_

Дата решения НТС лаборатории: **29.03.2023** номер документа: \_\_\_\_\_

Год начала проекта: **2024**

Наименования затрат, ресурсов, источников финансирования		Стоимость (тыс. долл.) потребность и в ресурсах	Стоимость, распределение по годам				
			2024	2025	2026	2027	
	Международное сотрудничество (МНТС)	92	23	23	23	23	
	Материалы	214	46	51	56	61	
	Оборудование и услуги сторонних организаций (пуско-наладочные работы)	452	98	110	115	129	
	Услуги научно-исследовательских организаций	32	8	8	8	8	
	Научно-информационное обеспечение: в) информационное обслуживание	16	4	4	4	4	
	Сервисные расходы	8	4		4		
Необходимые ресурсы	Нормо-час	Ресурсы					
		– FTE					
		– Установка «КАРС» микроспектрометр	6000	1500	1500	1500	1500
		– реактора.	-				
Источники финансирования	Бюджетные средства	Бюджет ОИЯИ (ст. 4, 5, 6, 10, 11, 14)	<b>814</b>	183	196	210	225
	Внебюджет (доп.смета)	Вклады соисполнителей Средства по договорам с заказчиками Другие источники финансирования					

Руководители проекта Арзуманян Г.М. \_\_\_\_\_

Маматкулов К.З. \_\_\_\_\_

Экономист Лаборатории Сорокина Ж.В. \_\_\_\_\_

# ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

## НАНОБИОФОТОНИКА

ШИФР ПРОЕКТА

ШИФР ТЕМЫ

ФИО РУКОВОДИТЕЛЕЙ ПРОЕКТА

Г.М. Арзуманян, К.З. Маматкулов

УТВЕРЖДЕН

ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ ЛАБОРАТОРИИ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛИ ТЕМЫ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА

ОДОБРЕН ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ

\_\_\_\_\_

ФИО

\_\_\_\_\_

ПОДПИСЬ

\_\_\_\_\_

ДАТА