

УТВЕРЖДАЮ
Директор ЛНФ

Е.В. Лычагин

« » _____ 2023 г.

**Отчет по теме «Современные тенденции и разработки в области Рамановской микроспектроскопии и фотолюминесценции для исследований конденсированных сред» и по проекту «Биофотоника» за 2021 - 2023 гг.
№ темы: 04-4-1133-2018/2023**

Руководители темы: Г.М. Арзуманян, Н. Кучерка
Руководители проекта: Г.М. Арзуманян, Н. Кучерка

В 2021 - 2023 гг, научно-исследовательская деятельность Сектора рамановской спектроскопии ЛНФ реализовывались в соответствии с основными задачами темы № 1133 ПТП ОИЯИ: «Современные тенденции и разработки в области рамановской микроспектроскопии и фотолюминесценции для исследования конденсированных сред» и включенного в тему проекта «Биофотоника».

Наряду с нейтронными и синхротронными исследованиями, оптическая спектроскопия, в том числе рамановская, имеет свою определенную нишу в изучении свойств, структуры и диагностики конденсированных сред. Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния) является мощным аналитическим инструментом с широким набором возможностей. Этот метод базируется на неупругом рассеянии падающего на образец излучения. При этом сдвиг частот падающего излучения соответствует колебательной энергии определенных связей в молекуле. Колебательные спектры являются чрезвычайно специфическими и чувствительными характеристиками молекул. К преимуществам метода рамановской спектроскопии, прежде всего, следует отнести ее высокую чувствительность, неинвазивность, отсутствие необходимости использования внешних маркеров (флюорофоров) для визуализации исследуемого образца. Как рамановская, так и ИК-Фурье спектроскопия дают спектральную характеристику колебаний молекул («молекулярный отпечаток») и применяются для определения химической структуры образца. При этом рамановская спектроскопия может дать дополнительную информацию о низкочастотных модах и колебаниях, которые указывают на особенности кристаллической решетки и молекулярной структуры. С этой целью одной из методических задач темы было освоение техники низкочастотной рамановской спектроскопии.

Проект «Биофотоника» нацелен на фундаментальные и прикладные исследования в области спонтанной и нелинейной рамановской микроспектроскопии. Один блок задач был связан с изучением механизмов и природы аномального соотношения интенсивностей линий антистоксовой (аСт) и стоксовой (Ст) компонент в спектрах гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Второй крупный блок исследований касался ряда задач в области Наук о Жизни с применением рамановской спектроскопии и флуоресцентной микроскопии. В частности, это касалось фундаментальных вопросов по выявлению механизмов и сигнальных путей

фотоиндуцированного нетоза – программируемой клеточной гибели, поиску спектральных маркеров этого явления, а также некоторых особенностях липид-белкового взаимодействия в различных мембранных миметиках.

Основные ожидаемые результаты по завершении этапов темы или проектов:

- Выявление особенностей соотношения интенсивности рамановских пиков аСт/Ст в ГКР спектрах в зависимости от мощности излучения накачки и режима лазерной накачки.
- Выявление конформационных изменений в липидном бислое при добавлении холестерина и мелатонина различной концентрации. Сравнение результатов с нейтронным рассеянием.
- Анализ и интерпретация рамановских спектров липосом/липидисков со встроенными мембранными белками и «пустых» липосом/липидисков.
- Получение новой информации о структуре мембранных миметиков со встроенными белками.
- Поиск спектральных/рамановских маркеров НЕТОЗ-а.
- Определение механизмов формирования НЕТОЗ-а под действием УФ- и видимого излучения.
- Отработка методики рамановской спектроскопии сверхнизких частот $\sim 10 \text{ см}^{-1}$.

Подробное изложение научных результатов за 2021-2023 гг.

1. Исследование аномалии соотношения интенсивности линий аСт / Ст в спектрах ГКР в зависимости от мощности возбуждающего лазера и режима лазерной накачки.

1.1 Мотивация.

Спектры ГКР, наряду с интенсивным сигналом, демонстрируют ряд отличительных особенностей по сравнению со спектрами спонтанного комбинационного рассеяния света, записанными в «нормальных» (не ГКР) условиях. В частности, это относится к отношениям интенсивностей антистоксовых и стоксовых молекулярных спектральных линий (отношения аS/S). Эти отношения при спонтанном комбинационном рассеянии света вдали от электронных резонансов и в случае термодинамического равновесия определяются соотношением Больцмана с поправкой на частотный фактор рассеяния, т.е.

$$R_{aS}/R_S = (\nu_L + \nu_V)^3 / (\nu_L - \nu_V)^3 \times \exp(-h c \nu_V / kT), \quad (1)$$

где R_{aS} и R_S - скорости антистоксова и стоксова рассеяния в [фотон/с]; ν_L и ν_V - частоты падающего возбуждающего излучения и раман-активной колебательной моды в см^{-1} ; h , c и k - постоянная Планка, скорость света и постоянная Больцмана соответственно. Это соотношение в первую очередь определяется относительной заселенностью верхнего и нижнего уровней задействованных переходов.

Анализ экспериментальных результатов, полученных при исследовании спектров ГКР, показал, что во многих случаях соотношение 1 не выполняется, даже если принять во внимание зависимость локального фактора усиления электромагнитного поля (ЛФУЭ) от длины волны. Внимание к этой проблеме возросло после опубликованной в 1996 г. статьи Кнейппа и др., в которой авторы впервые сообщили о свидетельствах оптической (рамановской) накачки колебательных состояний в условиях ГКР. Интерпретация экспериментальных результатов, связанных с оптической накачкой, стала предметом значительных дискуссий в литературе, при

этом многие авторы отрицают существование эффекта и приписывают экспериментальные наблюдения либо лазерному нагреву, либо вкладу ЛФУЭ, либо их комбинациям.

Все это побудило нас самостоятельно провести исследования по этой теме. Таким образом, цель настоящего исследования состоит в том, чтобы уточнить и количественно оценить роль механизмов, ответственных за наблюдаемое расхождение отношений aS/S с определенными соотношением Больцмана для теплового равновесия населенностей верхнего и нижнего колебательных уровней, соответствующих возбужденных раман-активных переходов.

1.2 Экспериментальная часть

В данной работе исследуются особенности зависимости отношения aS/S от интенсивности возбуждения в ГКР спектрах в определенной точке в беспорядочно наноструктурированной ГКР-активной поверхности при непрерывном лазерном излучении с длиной волны 785 нм при низких интенсивностях, обеспечивающих воспроизводимость спектральных профилей ГКР. Лазер ближнего инфракрасного диапазона (ИК) был выбран для измерений, поскольку он удобен для исследования биологических образцов, являющимися основными объектами для многочисленных практических исследований методом ГКР и прозрачных в ближнем ИК диапазоне длин волн. В качестве молекул-репортеров для рамановского рассеяния использовались фрагменты биохимически значимых органических молекул 5,50-дителибис (2-нитробензойной кислоты) (DTNB) - тиолатов 2-нитробензойной кислоты (TNB) - ковалентно связанными с наноразмерными частицами Ag на подложке пористого Si. Частицы различных размеров, форм и расстояний друг от друга стохастически покрывают подложку и образуют на ее поверхности множество трехмерных наноструктур с большим разнообразием связанных ЛФУЭ.

Получены зависимости отношения интенсивности линий для трех соответствующих пар колебательных линий тиолата 2-нитробензойной кислоты (TNB) от плотности мощности возбуждающего излучения в ГКР спектрах. С помощью этих данных, нами были уточнены и количественно оценены вклады, ответственные за несоответствия (разногласия) полученных отношений, определяемых тепловыми равновесными населенностями верхнего и нижнего колебательных уровней, соответствующих комбинационным переходам. Этими вкладами являются:

- (i) спектральный профиль контура ЛФУЭ,
- (ii) локальный нагрев конъюгатов молекул-репортеров / AgP под действием излучения на 785 нм, и
- (iii) оптическая (рамановская) накачка верхних колебательных уровней рассматриваемых переходов.

1.2.1 Рамановская установка, образцы и результаты

Для регистрации ГКР-спектров использовался 3D сканирующий лазерный конфокальный рамановский микроскоп (Confotec NR500, SOL Instruments Ltd., Беларусь). Для возбуждения использовалось излучение непрерывного узкополосного одномодового лазера на длине волны $\lambda_L = 785$ нм (0785L-21A-NI-NT-NF, Integrated Optics, Литва) мощностью до 130 мВт. Лазерный пучок с малой расходимости фокусировался на поверхность образца с использованием инвертированного микроскопа (TE2000S, NIKON) с объективом Olympus MPLFLN 40 x 0,75 NA. Диаметр лазерного пятна на поверхности составлял ≈ 1 мкм. Интенсивность возбуждения регулировали с помощью калиброванных фильтров нейтральной плотности.

Свет, рассеянный в обратном направлении и собранный объективом, направлялся на входную щель решетчатого монохроматора-спектрографа с фокусным расстоянием 520 мм с решеткой 150 штрихов на миллиметр, обеспечивающей дисперсию 12,6 нм / мм. Многослойный диэлектрический заграждающий фильтр (StopLine NF03-785E-25, Semrock) с коэффициентом супрессии $> 10^6$ в пределах полосы ≈ 40 нм блокировал отраженный и рэлеевский свет возбуждающего лазера и позволял регистрировать спектры одновременно в антистоксовом и стоксовом диапазонах. Передающая оптика позволяла регистрировать рамановское рассеянное излучение с волновыми числами от -3260 см^{-1} (на 625 нм) до 2075 см^{-1} (на 938 нм) в антистоксовом и стоксовом диапазонах соответственно.

Для оценки однородности распределения интенсивности линий ГКР-спектров анализа поверхности образца и поиска участков на поверхности с наибольшим локальным усилением поля для дальнейших детальных исследований зависимости отношения aS / S от интенсивности возбуждения проводилась спектральная картирование.

Используемая в экспериментах ГКР-активная подложка представляла собой произвольно наноструктурированную поверхность из частиц серебра, нанесенных на поверхность пористого кремния. Пористость и средний диаметр пор пористого материала составляли 72% и 60 нм, соответственно. Формирование AgP на образцах por-Si проводили методом иммерсионного осаждения в 3 мМ водно-спиртовом растворе AgNO_3 в течение 70 мин. Por-Si с покрытием из серебра был выбран в качестве ГКР подложки, поскольку известно, что он обеспечивает сверхвысокую чувствительность (до предела обнаружения одиночной молекулы) в сочетании с чрезвычайно длительным сроком хранения (до 3 лет) благодаря особенностям поверхности por-Si, улучшающие химическую стабильность частиц Ag.

Морфология посеребренных образцов изучалась с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Hitachi-4800. Рисунок 1 наглядно демонстрирует, что полученные частицы Ag имеют различные размеры и формы и расположены на различных расстояниях друг от друга, образуя множество трехмерных структур серебра.

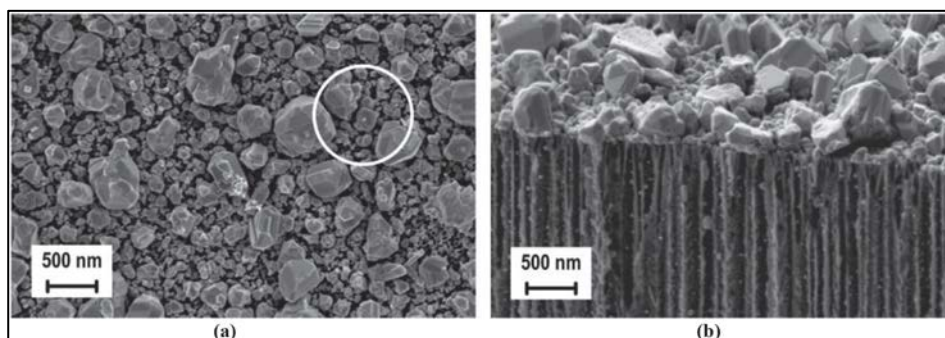


Рис. 1. Характерный вид сверху на сканирующем электронном микроскопе (а) и изображения поперечного сечения (б) AgP на поверхности por-Si. Белый кружок указывает на пятно возбуждающего лазерного луча (диаметром 1 мкм) на поверхности.

Анализ СЭМ изображения (вид сверху, рис. 1а) с помощью программного обеспечения ImageJ показывает, что размеры около 50% AgP лежат в диапазоне от нескольких нанометров до 150 нм. В тоже время, образец также содержит AgP с размером поперечного сечения 150–300 нм ($\sim 40\%$) и 300–600 нм ($\sim 10\%$). Белый кружок на изображении рис. 1а указывает на возможное расположение пятна возбуждающего лазерного луча диаметром 1 мкм. Очевидно, что в экспериментах лазером возбуждались участки с наиболее вероятным множеством горячих точек и большим количеством депонированных молекул-репортеров: фрагменты молекул DTNB

($C_{14}H_8N_2O_8S_2$) представленные на рисунке 2 - радикалы TNB. Конъюгаты TNB / AgP получали путем погружения образца AgPs / por-Si в $10^{-5}M$ раствор молекул DTNB в дистиллированной воде с этанолом примерно на 2 часа с последующей сушкой.

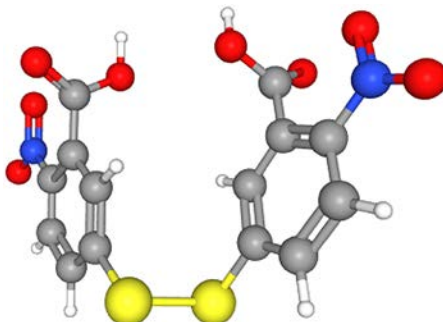


Рис.2. Трехмерное изображение молекулярной структуры молекулы 5,50-дителиобис (2-нитробензойной кислоты) (DTNB) [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6254#section=3D-Conformer>]

На металлической поверхности, S—S связь молекулы разрывается, и тиолаты ковалентно связываются с поверхностью AgP. Каждая частица может быть покрыта большим количеством молекул-репортеров, которое, по оценкам, превышает 10^4 . Радикалы TNB не поглощают возбуждающее излучение, антистоксово или стоксово излучение. Наиболее интенсивные линии комбинационного рассеяния в ГКР спектрах TNB соответствуют симметричному валентному колебанию нитрогруппы (NO_2) и модам ароматического кольца, и, сдвинуты соответственно на 1338 , 1070 и 1570 см^{-1} .

Чтобы охарактеризовать однородность ГКР спектральных профилей TNB / AgP / por-Si и распределения интенсивностей спектральных линий по поверхности, были записаны 2D спектральные карты («матрицы» спектров ГКР). Типичные размеры области картирования составляли $10 \times 10\text{ мкм}$ с шагом 1 мкм . При условии, что площади горячих точек имеют порядок нескольких нм^2 , количество горячих точек, освещаемых лазерным лучом в конкретной пространственной точке, может варьироваться от точки к точке от нуля до большого, но неконтролируемого значения (см. рисунок 1).

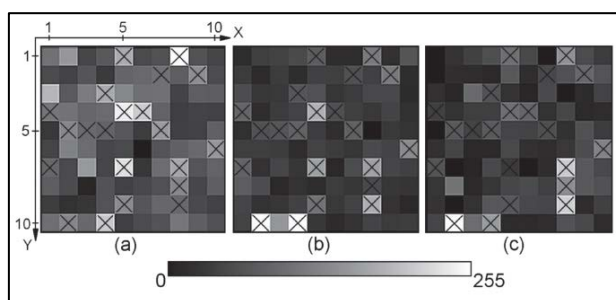


Рис.3. Картины интенсивности линии TNB для волновых чисел 1338 (а), -1338 (б) и -1070 см^{-1} (в) при интенсивности накачки $I_L \approx 105\text{ мкВт} / \text{мкм}^2$; крестиками отмечены некоторые пиксели, на которых четко видны все три линии.

На рис.3 представлены примеры двумерных распределений интенсивностей наиболее сильных линий TNB в стоксовом (с волновым числом 1338 см^{-1}) и антистоксовом (с волновыми числами -1338 и -1070 см^{-1}) диапазонах ГКР спектров как функция пространственного положения фокального пятна луча. Соответствующая карта записывалась при интенсивности возбуждения $I_L \approx 105\text{ мкВт} / \text{мкм}^2$, и каждый спектр накапливался в течение короткого интервала 1 с .

Картина на рис. 3а показывает, что в стоксовом диапазоне самая сильная спектральная линия при 1338 см^{-1} обнаруживается примерно в 45% пространственных точек. В этих точках также обнаруживаются другие относительно сильные линии комбинационного рассеяния 1070 и 1570 см^{-1} , которые, однако, примерно в три раза слабее. В то же время, в антистоксовом диапазоне, линии с волновым числом -1338 см^{-1} наблюдаются практически во всех пространственных точках, где регистрируются соответствующие стоксовы линии. Более слабые линии с волновыми числами -1070 см^{-1} и особенно -1570 см^{-1} реже выделяются над локальным фоновым шумом из-за небольшого времени экспозиции 1 с, используемого при картировании. Следовательно, даже при максимальной интенсивности возбуждения наиболее сильные раман-резонансные пики TNB могут быть одновременно зарегистрированы как в стоксовом, так и в антистоксовом диапазонах не во всех пространственных точках области картирования.

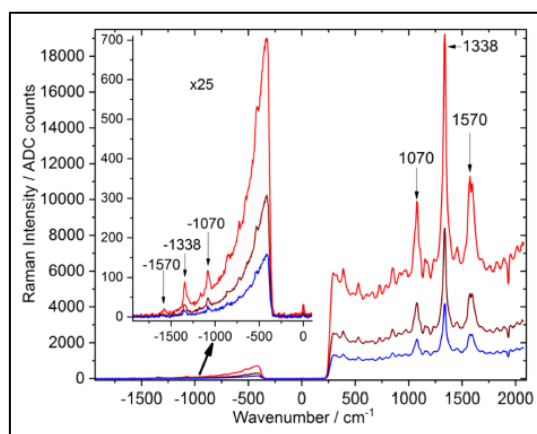


Рис.4. Антистоксовые и стоксовые ГР спектры TNB/ AgP/por-Si в определенной пространственной точке при интенсивностях возбуждения 25, 51 и 105 мкВт/мкм²; разрыв в центре спектров определяется пропусканием notch-фильтра.

На рис. 4 представлены полученные в экспериментах спектры. Интенсивности линий, используемые для построения паттернов, вычислялись как спектральные амплитуды, интегрированные в «вороте» определенной спектральной ширины после вычитания локального спектрального фона. В каждом паттерне интенсивность линий нормирована на максимальное значение.

Для более досконального исследования зависимости отношения aS / S от интенсивности возбуждения, ГР спектры регистрировались в определенных пространственных точках, обнаруженных в ходе картирования, чтобы обеспечить максимальную интенсивность линий при более длительных временах экспозиции в несколько десятков секунд. Рамановские сдвиги в антистоксовом и стоксовом диапазонах достигали 2000 см^{-1} . На рис. 4 представлено несколько спектров, записанных при этих различных, но низких интенсивностях возбуждения, при которых спектральные профили все еще хорошо воспроизводятся. Чтобы проверить воспроизводимость при увеличении интенсивности лазера, спектры многократно регистрировали при уменьшенных интенсивностях, чтобы гарантировать, что полученный спектр похож на тот, который был записан ранее при той же интенсивности как в спектральном профиле, так и в амплитудах пиков TNB. В случае исследуемой ГР-активной поверхности AgP/por-Si диапазон воспроизводимости соответствовал интенсивностям возбуждения $I_L \leq 105\text{ мкВт/мкм}^2$. В этом диапазоне интенсивностей все вариации ГР спектров были полностью обратимыми, и не наблюдались спектральные сдвиги наиболее сильных линий комбинационного рассеяния, а также каких-либо значительных относительных изменений их интенсивностей.

Наиболее интенсивные линии относятся к переходам молекул TNB с колебательными частотами $\nu_{R1} = 1570 \text{ см}^{-1}$ (с пиками при $\lambda_{aS} / \lambda_S = 699/895 \text{ нм}$), $\nu_{R2} = 1338 \text{ см}^{-1}$ (с пиками при $\lambda_{aS}/\lambda_S = 710/877 \text{ нм}$) и $\nu_{R3} = 1070 \text{ см}^{-1}$ (с пиками при $\lambda_{aS} / \lambda_S = 724/857 \text{ нм}$). На рисунке 4 антиСтоксовы части спектров также показаны увеличенными, чтобы более отчетливо продемонстрировать слабые антистоксовы линии комбинационного рассеяния. Меньшие (в $\sim 100\text{--}600$ раз) амплитуды этих линий в основном определяются малой заселенностью верхних колебательных уровней при температуре окружающей среды (295 К). Для определения зависимости интенсивностей резонансных линий от интенсивности возбуждения, последние рассчитывались как высоты пиков над уровнем локального спектрального фона, аппроксимированные к центрам линий. Такой подход оправдан близостью значений ширин линий.

1.2.2. Анализ данных

Анализ экспериментальных данных, описывающих силу стоксовой и антистоксовой линий $R_{S, aS}$ в виде зависимостей от интенсивности возбуждения I_L , представленных для определенной пространственной точки на рисунке 5, показывает, что в диапазоне воспроизводимости интенсивностей возбуждения ($I_L < 105 \text{ мкВт/мкм}^2$) сила стоксовой линии может, как и ожидалось, описываться линейными зависимостями от интенсивности лазера I_L :

$$R_{Si}(I_L) = B_i \cdot I_L, \quad (2)$$

принимая во внимание, что сила антистоксовой линии демонстрирует линейную зависимость от I_L только при низких интенсивностях лазера, в то время как при более высоких интенсивностях может быть описана квадратичными полиномами I_L :

$$R_{aSi}(I_L) = C_i \cdot I_L + D_i \cdot I_L^2, \quad (3)$$

где B_i, C_i [количество в секунду \times ($\text{мкм}^2/\text{мкВт}$)] и D_i [количество в секунду \times ($\text{мкм}^2/\text{мкВт}$)²] являются подобранными коэффициентами зависимостей.

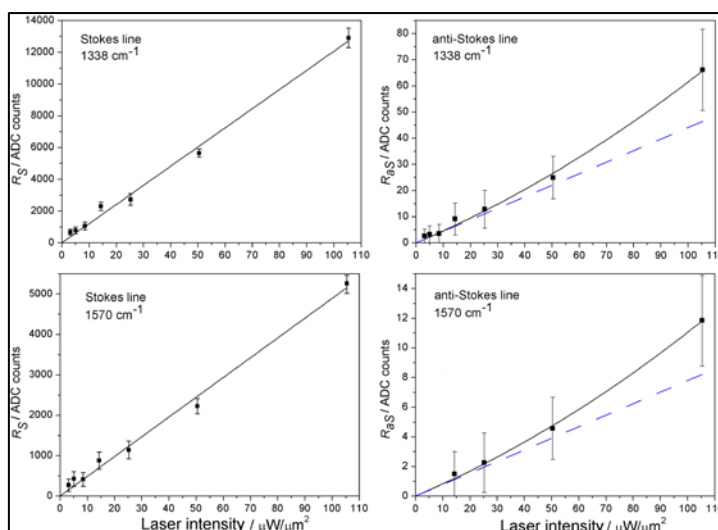


Рис. 5. Зависимости интенсивности возбуждающего лазера от интенсивности линий Стокса и Антистокса в спектрах SERS молекул TNB на поверхности AgPs/por-Si; квадраты - экспериментальные данные, сплошные линии – наилучшим образом соответствуют линейным (уравнение 2, Стокса) и квадратичным (уравнение 3, Антистокса) зависимостям. Синие пунктирные линии на графиках представляют асимптотические линейные вклады в квадратные зависимости уравнения 3.

Очевидно, что в рассматриваемой ситуации соотношения aS/S ratios $\rho_i(I_L) = R_{aS}/R_{St}$ будут линейно зависеть от I_L :

$$\rho_i(I_L) = \rho_{0i} + \rho_{1i} \cdot I_L, \quad (4)$$

с параметрами $\rho_{0i} = C_i/B_i$ и $\rho_{1i} = D_i/B_i$ [мкм²/мкВт]. Следует отметить, что использование соотношений выгодно, поскольку оно обеспечивает возможность исключить количество и пространственное распределение горячих точек и рассеивающих молекул в пределах площади, освещаемой лазером, площадью 1 мкм², которые трудно оценить или измерить.

На рис. 6 представлены полученные в экспериментах спектры при возбуждении образца в отдельности непрерывным и пикосекундным лазером при одинаковых мощностях, а также их комбинацией. На рис.6а приведены не обработанные спектры, а на рис 6б – с вычетом люминесцентного фона. Видно, что наиболее интенсивные линии комбинационного рассеяния в ГР спектрах TNB соответствуют симметричному валентному колебанию нитрогруппы (NO₂) и модам ароматического кольца, и, сдвинуты соответственно на 1334, 1070 и 1570 см⁻¹.

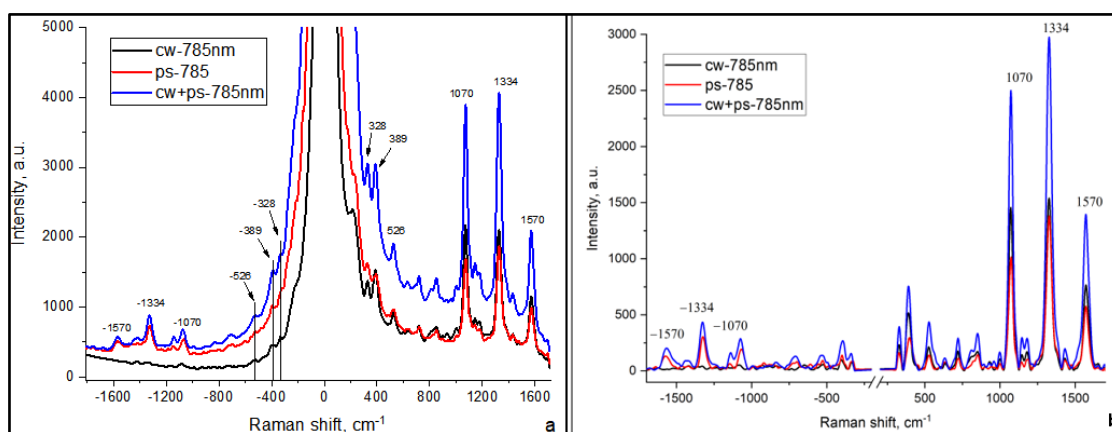


Рис.6. Антистоксовые и стоксовые ГР спектры молекул TNB при возбуждении непрерывным и пикосекундным лазером, а также их комбинацией: а) необработанные спектры, б) с вычетом люминесцентного фона. Разрыв в центре спектров определяется пропуском notch-фильтра.

Из полученных результатов наглядно видно, что интенсивность колебательных полос в антистоксовой части спектра существенно меньше (как минимум на порядок величины) в случае возбуждения непрерывным лазером по сравнению с пикосекундным режимом возбуждения при одинаковых мощностях накачки в том и в другом случае. При этом, в стоксовой части спектра интенсивности полос сопоставимы по амплитуде. В случае комбинированной накачки амплитуда как стоксовых, так и соответствующих антистоксовых компонент спектра практически суммируются по двум накачкам.

1.2.3 Выводы

В данном исследовании было экспериментально показано, что при интенсивности непрерывного лазера возбуждения на 785 нм в диапазоне 3–105 мкВт/мкм² спектры комбинационного рассеяния молекул-репортеров TNB на произвольно наноструктурированной ГР-активной поверхности AgP/por-Si воспроизводимы. Это демонстрирует стабильность исследуемого образца и дает возможность измерить зависимость интенсивности одновременно регистрируемых амплитуд антистоксовой и стоксовой линий. Измерения показывают, что в

диапазоне воспроизводимости стоксовых и антистоксовых линий TNB с волновыми числами ± 1070 , ± 1388 и ± 1570 см^{-1} следуют, соответственно, линейной и квадратичной зависимости от интенсивности возбуждения.

Анализ отношений интенсивностей антистоксовых к стоксовым линиям в зависимости от интенсивности возбуждения, которая оказалась линейной, позволяет уточнить и оценить вклады в эти отношения: (i) плазмонного спектрального профиля ЛФУЭ, (ii) лазерного нагрева конъюгатов TNB/AgP, и (iii) усиленная локальным полем оптическая рамановская накачка колебательных состояний TNB. Показано, что эти три вклада объясняют отклонение от соотношения Больцмана с поправкой на коэффициент частоты рассеяния.

Исследования показали, что при возбуждении образца излучением на длине волны 785 нм отношение интенсивности антистоксовых к стоксовым линиям в зависимости режима накачки существенно отличаются.

2. Синтез липодисков / липодисков со встроенными белками и изучение их химической структуры и морфологии с помощью рамановской спектроскопии.

Одним из современных методов выделения мембранных белков является использование сополимера стирола и малеиновой кислоты (SMA). Этот амфипатический сополимер может встраиваться в биологические мембраны и легко разрушать их. В результате образуются дискоидные фрагменты мембраны размером 10-40 нм, окруженные поясом сополимера. Такие частицы известны как SMALP (липидные частицы SMA) или липодиски. Полимер не имеет сродства к каким-либо конкретным липидам, и в SMALP соотношение липидов остается таким же, как и в исходной мембране. Мембранные белки, экстрагированные SMA, довольно стабильны и могут быть очищены и проанализированы различными биохимическими методами. Преимущество SMA-экстракции заключается в возможности полного отказа от моющих средств в процессе очистки белка. Это означает лучшее сохранение нативной конформации и липидного микроокружения белков. Сохранение липидного микроокружения было продемонстрировано для ряда белков, экстрагированных SMA, с использованием тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии. Однако эти методы являются косвенными и требуют предварительной экстракции липидов из образцов с использованием смесей органических растворителей с различными добавками. В настоящее время не существует универсального метода экстракции, который одинаково хорошо подходил бы для всех классов липидов. Таким образом, необходимо выбрать конкретную методологию для целевого класса. В данной работе мы использовали рамановскую спектроскопию и масс-спектрономию (МС) для анализа наличия липидов в липодисках, стабилизирующих рекомбинантный белок Kv7.1 человека. Рекомбинантный белок Kv7.1 человека экспрессировали в клеточной линии НЕК. Фракции элюирования, содержащие белок Kv7.1, объединяли и подвергали экстракции липидов с использованием модифицированного метода Фолча.

В отличие от МС, рамановскую спектроскопию можно применять к intactным липодискам. Исследуемая система содержала три химически различных компонента (SMA, Kv7.1 и липиды), и многие из регистрируемых пиков в рамановском спектре перекрываются. Это несколько усложняет идентификацию пиков в спектре (рис. 7) к колебаниям химических связей конкретного компонента системы.

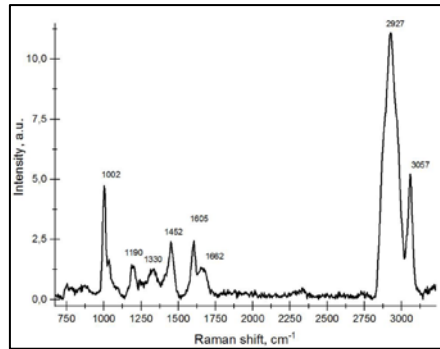


Рис.7. Рамановский спектр Kv7.1 содержащего SMALP, измеренный при лазерном возбуждении 473 нм

В частности, рамановский сдвиг на $\sim 1000 \text{ см}^{-1}$ может быть отнесен к фенилаланину в Kv7.1, стиролу в SMA или растяжению C-H в любом из трех компонентов. Однако пик в области отпечатка пальца с центром при 1452 см^{-1} (мода ножниц - CH_2), а также характерные для липидов интенсивные пики в области $\sim 2800\text{-}3000 \text{ см}^{-1}$ указывают на их присутствие и подтверждают данные, полученные с помощью МС. Таким образом было показано, что, когда рекомбинантный белок Kv7.1 выделяется с использованием SMA, он сохраняет липиды вокруг белковых молекул. МС подтвердила, что липиды присутствовали в липодисках, а спектроскопия комбинационного рассеяния обнаружила несколько специфических спектральных пиков, которые можно отнести к липидам. Исследования липодисков с помощью рамановской спектроскопии все еще продолжаются.

3. Изучение конформационных изменений модельных липидных мембран с различными добавками методом рамановской спектроскопии.

Хорошо известно, что добавление различных молекул к мембране может изменить ее физические свойства и структуру, что, в свою очередь, может повлиять на ее функциональность. Поэтому очень важно знать происхождение этих изменений и понимать межмолекулярные взаимодействия, ответственные за внедрение различных добавок в мембрану.

В 2021 году были проведены исследования с использованием синтетических липидов, которые широко используются для моделирования плазматической мембраны с целью изучения ее свойств. Была создана модель липидного бислоя, содержащего фосфолипид DPPC и его различные комбинации с молекулами холестерина и мелатонина с целью максимально схоже имитировать естественные клеточные мембраны. Холестерин и мелатонин встраиваются в липидный бислой в разных положениях. Было высказано предположение, что мелатонин находится в области головной группы бислоя и, таким образом, делает его более текучим. С другой стороны, холестерин должен включаться параллельно в область углеводородной цепи с его гидрофильной головкой, близкой к головной группе липида. Такая локализация холестерина делает мембрану более жесткой и утолщенной в поперечном направлении из-за увеличения упорядоченности углеводородных цепей.

Рамановские исследования проводились на образцах, приготовленных следующим образом. DPPC в виде порошка растворяли в смеси хлороформ / метанол (2 : 1) в концентрации 1 мг / мл. Чтобы полностью удалить растворитель из полученной смеси, ее сначала выдерживали в потоке газообразного азота, а затем помещали в вакуум на ночь. На следующем этапе тонкую пленку DPPC на дне колбы смешивали с 30 мл дистиллированной воды с использованием вихревого шейкера в течение 10–15 с для образования суспензии липосом. На последнем этапе

10 мкл пробы анализируемого вещества капали на кварцевое стекло микроскопа для дальнейших рамановских измерений.

Образцы располагались на столике с моторизованной регулировкой положения образца (Prior Scientific, H117TE). Лазерное излучение фокусировалось на образец микрообъективом 40 x (NA-0,6) в пятно ~ 1 мкм. Мощность лазера на образце контролировалась регулируемым нейтральным фильтром с оптической плотностью 0–3. Все спектры комбинационного рассеяния были собраны в геометрии обратного рассеяния и диспергированы дифракционной решеткой с разрешением 1200 штрихов на миллиметр, установленной в монохроматоре-спектрографе MS520. CCD камера (ProScan HS-101H), использовалась для регистрации спектров, собранных при различных локализациях аналитов. Мы зондировали сигналы в диапазоне волновых числе 600–1600 cm^{-1} с разрешением 0,9 cm^{-1} (рис. 8).

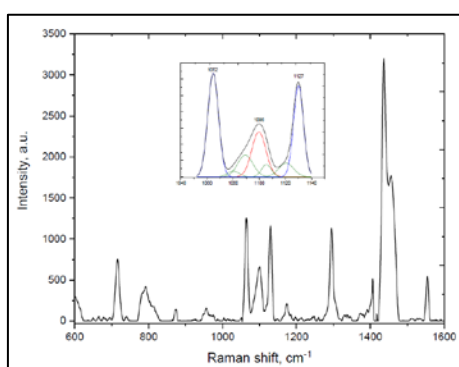


Рис.8. Рамановский спектр DPPC при возбуждении непрерывным лазером на 532 нм мощностью 4 мВт. Верхняя вставка - деконволюция спектра между 1040 и 1150 cm^{-1} на 7 гауссовых линий, состоящих из двух транс (1062 cm^{-1} , 1127 cm^{-1} , синий), одного гоша (1096 cm^{-1} , красный) и 4-х рамановских полос холиновой группы (зеленый).

Спектры комбинационного рассеяния света в спектральном интервале от 1030 cm^{-1} до 1150 cm^{-1} были разложены в 7 гауссовских линий. Оценивались спектральные массы (интеграл площади) трех из этих линий для оценки динамики упорядоченности/беспорядка в наших системах. Рамановские пики при 1127 cm^{-1} и 1062 cm^{-1} характеризуют асимметричные и симметричные колебания атомов углерода и, как известно, происходят из транс структуры. Линия комбинационного рассеяния на 1096 cm^{-1} связана с чувствительностью таких колебаний к одному гош-дефекту и / или с образованием различных гош-изомеров. Следовательно, отношение спектральных масс при 1127 cm^{-1} и 1062 cm^{-1} к таковому при 1096 cm^{-1} может использоваться для оценки отношения транс / гош конформеров молекул DPPC. Все измерения проводились при температуре окружающей среды.

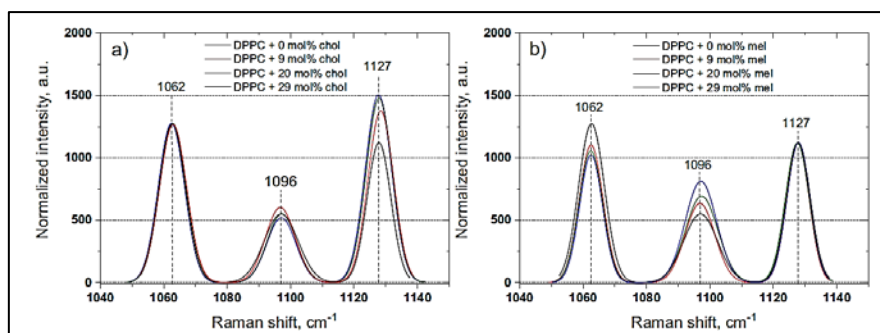


Рис.9. Нормализованные спектры комбинационного рассеяния: а) ДПФХ / холестерин и б) ДПФХ / мелатонин смесей при различных концентрациях компонентов (9, 20 и 29 мол.%).

Нормированные рамановские спектры в диапазоне $1030\text{ см}^{-1} - 1150\text{ см}^{-1}$ с тремя доминирующими полосами комбинационного рассеяния для нашей системы показаны на рисунках 9а и 9б. Мы рассчитали отношение спектральных масс пика 1127 см^{-1} к 1096 см^{-1} ($1127/1096$) для оценки эффекта упорядочения холестерина, в то время как отношение спектральных масс полосы 1062 см^{-1} к 1096 см^{-1} ($1062/1096$) – для оценки разупорядочивающего эффекта мелатонина.

Вклад от C–C моды валентных колебаний первичных метильных групп углеводородной цепи лучше всего характеризуется соотношением спектральных масс $1127 / 1096$, в то время как увеличение гош-конформеров лучше всего подтверждается отношением спектральных масс при $1062 / 1096$. Количественные характеристики соотношения спектральных масс как функции содержания холестерина и мелатонина в бислоях DPPC представлены на рисунке 10.

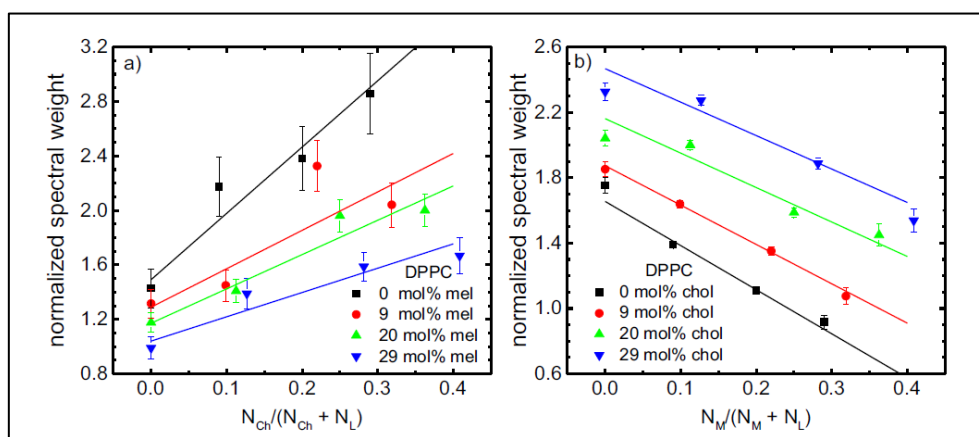


Рис.10. Зависимости соотношений транс / гош-конформеров в бислоях DPPC в зависимости от молярных долей добавленных (а) холестерина и (б) мелатонина. Черные кривые представляют влияние соединений на двухкомпонентные липидные бислои. Цветные данные соответствуют бислоям, номинально загруженным 9% (красный), 20% (зеленый) и 29% (синий) мелатонина или холестерина. Кривые представлены для направления взгляда.

На рис. 10а представлено резкое увеличение соотношения транс / гош-конформеров при добавлении холестерина к бислоям DPPC без мелатонина, что указывает на эффект придания жесткости на мембрану. Однако, эффект добавления холестерина к бислоям DPPC явно модулируется дополнительным присутствием мелатонина. Это наблюдается по уменьшающейся крутизне изменений отношения транс / гош в зависимости от концентрации холестерина в случае двойных слоев DPPC с увеличивающимся количеством мелатонина. Таким образом, на колебательную динамику липидных углеводородных цепей пропорционально влияют обе добавки. Результаты, представленные на рис. 10б для бислоев DPPC без холестерина, прямо указывают на уменьшение соотношения транс / гош конформеров при увеличении концентрации мелатонина.

Основные выводы:

- На колебательную динамику углеводородных цепей фосфолипидов пропорционально (в определенной степени) влияют обе добавки: холестерин и мелатонин.
- Динамические свойства исследуемой системы указывают на преимущественное влияние холестерина, а не мелатонина.

- При высоких концентрациях мелатонина ~ 20% и выше, эффект наведения текучести способен подавлять конденсирующий эффект холестерина.

4. Синтез липосом / липосом со встроенными белками и исследование их химической структуры методом рамановской спектроскопии.

4.1. Формирование липосом.

Синтез и формирование липосом проводилось в соответствии с протоколом, модифицированным компанией Avanti Polar Lipids (США) для синтеза липосом на базе прибора Vesicle Prep Pro – VPP, Nanion Technologies GmbH, Германия (<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/giant-vesicle-preparation>).

В данной работе для синтеза липосом использовался порошок фосфолипида DMPC, а в качестве растворителя – хлороформ (Sigma Aldrich). Вначале фосфолипид растворялся в хлороформе с концентрацией 3,4 мг/мл и, далее, 20мкл растворённого фосфолипида покапельно осаждался на проводящей стороне слайда – предметного стекла Indium Tin Oxide (ITO). Далее растворитель испарялся под вакуумом в течение не менее 60 минут. После полного высыхания образца на ITO-стекло устанавливалось резиновое уплотнительное кольцо диаметром 16 мм, что приблизительно соответствовало внешнему контуру осаждённого высушенного образца. После добавления в кольцо бидистиллированной воды в объеме 250 мкл, слайд помещался в камеру электроформации VPP. Второе ITO-стекло устанавливалось поверх кольца, и, так называемая сэндвич-конструкция, тем самым была готова к запуску и формированию липосом. Протокол формирования липосом запускался при напряжении 3В и частоте 5Гц в течение 60 минут при температуре 37°C. Сформированные таким образом липосомы аккуратно переносились в эппендорф.

4.2. Формирование системы липосомы/встроенные пептиды.

Для формирования системы липосома со встроенным пептидом, последний, после размораживания, покапельно разбавлялся бидистиллятом до концентрации 1мг/мл с определённым временным интервалом. Для электроформации системы липосомы/пептиды к высушенному под вакуумом фосфолипиду на предметном ITO-стекле с установленным резиновым уплотнительным кольцом добавляли 250 мкл растворённого в бидистилляте пептида Aβ(1-42). Второе ITO-стекло, как и в предыдущем случае, устанавливалось поверх кольца для формирования сэндвич-конструкции. Протокол формирования липосом запускался при напряжении 3В и частоте 5Гц в течение 60 минут при температуре 37°C. По завершению протокольной процедуры, липосомы со встроенным пептидом аккуратно переносились в эппендорф.

4.3. Результаты анализа системы липосомы/пептиды методом рамановской спектроскопии.

Рамановские спектры липосом со встроенными пептидами измерялись ежедневно в течении четырех дней для отслеживания кинетики рамановских частот. Особый интерес представляла линия Амид I ($1620-1690$) см^{-1} чувствительная к конформационным изменениям вторичной структуры пептида, а также спектральная область рамановских частот в диапазоне ($1030-1150$) см^{-1} , где выражены три полосы, характеризующие транс-гош конформации в липидах. Полученные результаты представлены на рисунке 11 (a,b).

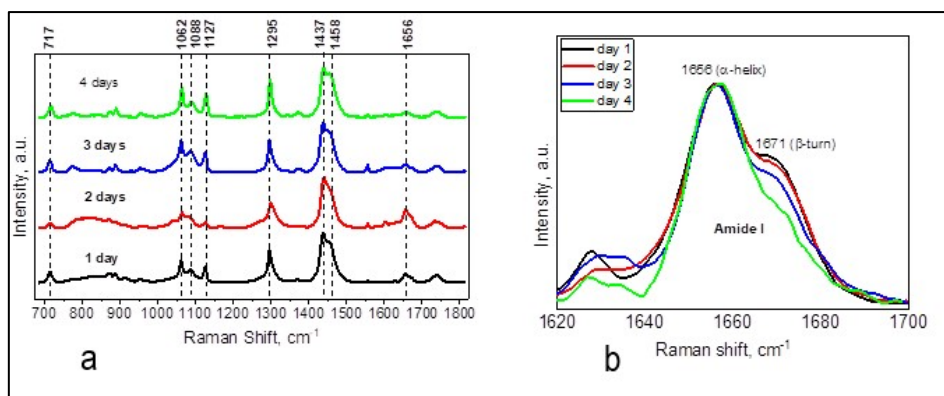


Рис.11. (а) рамановские спектры системы липосомы/пептиды по дням, (б) нормированные спектры пептида в области линии Амид I.

Нормированные рамановские частоты на рис.11b отчетливо показывают, что интенсивность/спектральный вес пика 1671 cm^{-1} (β -поворот, тип нерегулярной вторичной структуры в белках) к 4-му дню измерений заметно падает, что указывает на конформацию белка в более стабильную структуру с характерной рамановской частоте на 1656 cm^{-1} (α -спираль). Известно, что объединение множества бета-листов/бета-поворотов может приводить к белковым агрегациям и образованию фибрилл – предвестнике болезни Альцгеймера. Количественные оценки соотношения спектрального веса полосы α -спирали и бета-поворота приведены ниже в Таблице 1.

Таблица №1. Численные соотношения спектрального веса α -спирали/ β -поворота по дням.

	День первый	День второй	День третий	День четвертый
α – спираль / β – поворот	2.1	2.4	2.8	3.3

Из таблицы видно, что на четвертый день измерений, спектральный вес конформационного состояния пептида в α -спирали увеличился не менее чем в 1,5 раза. Это указывает на то, что после уравнивания системы липосома-встроенный пептид, последний сохраняет свое естественное конформационное состояние.

5. Биохимический и светоиндуцированный нетоз: анализ методом рамановской спектроскопии и флуоресцентной микроскопии.

5.1. Биохимически индуцированный нетоз.

Научно-исследовательская деятельность в 2021 году по данному направлению была посвящена применению рамановской спектроскопии и иммунофлуоресцентной микроскопии для анализа нейтрофилов, трансформированных при нетозе, и количественному определению уровня их трансформации на основе анализа спектров комбинационного рассеяния нейтрофилов.

Кинетический анализ с использованием высокочувствительной колебательной спектроскопии, примененный для данного исследования, выявил в низкочастотном диапазоне рамановского спектра нейтрофильных клеток эволюцию (рост) пика цитруллина в течение 30-40

минут после начала воспалительного процесса, который может быть классифицирован как ранний диагноз нетоза (рис. 12).

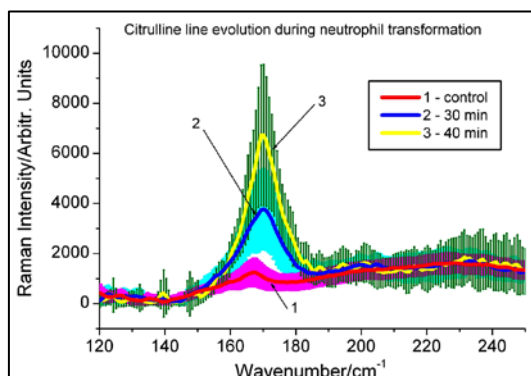


Рис.12. Низкочастотная область рамановского спектра нейтрофилов: эволюция (рост) линии цитруллина указывает на пред-активацию нетоза.

Поскольку пик с рамановским сдвигом $\sim 170 \text{ см}^{-1}$ практически отсутствует у интактных нейтрофилов и значительно увеличивается после активации, можно предположить, что он связан с накоплением цитруллина в клетке, в спектре которого есть характерный пик около 170 см^{-1} . Обычно цитруллин практически отсутствует в клетках человека, поскольку он не входит в число 20 основных аминокислот, из которых построены белки нашего тела. Однако известно, что во время активации нетоза цитруллин может продуцироваться, прежде всего, путем трансформации гистонов, наиболее важных структурных хромосомных белков внутри ядер нейтрофилов.

5.2. Нетоз, индуцированный УФА и видимым излучением.

В продолжение начатого исследования по активации нейтрофилов двумя способами: биологическими (бактериальными) и химическим (PMA) стимулами, в 2021-2022 годах мы приступили к исследованию фотоиндуцированного нетоза под воздействием УФА и видимого света. Нейтрофилы человека были выделены из цельной крови, полученной от здорового добровольного донора. В новой серии экспериментов мы применяли облучение ультрафиолетовым и видимым светом в зависимости от дозы. Анализ данных проводился с помощью флуоресцентной микроскопии и рамановской спектроскопии.

5.2.1. Выделение и облучение нейтрофилов

Периферическая кровь была взята у здоровых доноров по их устному согласию и помещена в пробирки для сбора крови EDTA. Нейтрофилы выделяли центрифугированием в двойном градиенте плотности с использованием растворов Фиколла плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ и $1,119 \text{ г/см}^3$. Затем 3 мл фиколла плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ аккуратно наслаивали поверх 3 мл фиколла плотностью $1,119 \text{ г/см}^3$ в пробирке объемом 10 мл. На полученный ступенчатый градиент плотности наслаивали 4 мл неразбавленной крови. Пробирку центрифугировали при 400g в течение 40 мин при комнатной температуре. Полученный слой нейтрофилов осторожно отбирали пипеткой в пробирку объемом 10 мл, затем объем жидкости доводили до 10 мл с помощью PBS. Суспензию нейтрофилов центрифугировали при 250g в течение 8 мин. Надосадочную жидкость удаляли и к осадку нейтрофилов добавляли 9 мл бидистиллированной воды (4 C°) для лизиса оставшихся эритроцитов. Суспензию снова центрифугировали при 250g в

течение 8 мин. Нейтрофилы ресуспендировали в питательной среде RPMI 1640 до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

Выделенные нейтрофилы облучали с помощью светодиодных источников с переключаемой длиной волны (Mightex) на следующих длинах волн: 365 нм (УФА, WLSLED-0365-04), 405 нм (синий свет, WLS-LED-0405-03), 530 нм (зеленый свет, WLS-LED-0530-03), 625 нм (оранжевый свет, WLS-LED-0625-03) и 656 нм (красный свет, WLS-LED-0656-03). Клетки облучали при комнатной температуре доза-зависимым способом: 4, 16 и 32 Дж/см². Мощность излучения светодиодов измерялась с помощью измерителя мощности PM100A (Thorlabs, США).

5.2.2. Рамановская спектроскопия

В работе была применена рамановская спектроскопия для измерений спектров радикалов, в частности H₂O₂ и HClO. Как для точечных спектральных измерений спонтанного комбинационного рассеяния, так и для картирования при возбуждении гелий-неоновым лазером с длиной волны 633 нм, использовалась установка конфокальной микроспектроскопии с высоким спектральным разрешением и высокой скоростью сканирования лазерного пятна. В его состав входит сканирующий лазерный спектрометр «Confotec CARS» (ООО «СОЛ Инструментс», Беларусь), сопряженный с инвертированным микроскопом NIKON TE2000-E.

5.2.3. Визуализация ВЛН с помощью флуоресцентной микроскопии

Чтобы исследовать уровни нетоза, клетки дважды промывали PBS, а затем нейтрофильную ДНК окрашивали красителем DAPI в течение 10 мин. После окрашивания клетки промывали 1% PBS. Фотографирование изображений в 96-луночной планшете производили с помощью люминесцентного светодиодного микроскопа Nikon Eclipse Ts2R-FL с использованием программы NIS-Elements BR, фильтра Epi-FL C-LED385 и 20-кратного объектива CFI Super Plan Fluor ELWD ADM с числовой апертурой 0,45 и рабочим расстоянием (8.2–6.9) мм. В каждой лунке было снято 20-кадров. Подсчет суммарного количества (по 20 кадрам) нетотических и интактных клеток проводили с помощью программы ImageJ.

5.2.4. Основные результаты по рамановской спектроскопии и флуоресцентной микроскопии

Первичными АФК в активированных нейтрофилах являются анионы супероксида O₂⁻, которые, будучи не сильными окислителями, быстро дисмутируют до пероксида водорода H₂O₂. Они, в свою очередь, могут подвергаться дальнейшему процессингу, в результате которого образуются более активные метаболиты, например гидроксильный радикал (OH·) и гипохлорная кислота (HOCl). Для подтверждения роли АФК в образовании ВЛН в наших экспериментах мы использовали рамановскую спектроскопию для обнаружения характерного для пероксида водорода острого пика на рамановской частоте в области 875-880 см⁻¹ (O–O растяжение) и гипохлорной кислоты на частоте ~ 732 см⁻¹. Измерения проводились в режиме картирования при возбуждении нейтрофилов He-Ne лазером на длине волны 632,8 нм в течении первых 10-15 мин после их активации светодиодами на различных длинах волн при трех дозах; 4, 16 и 32 Дж/см².

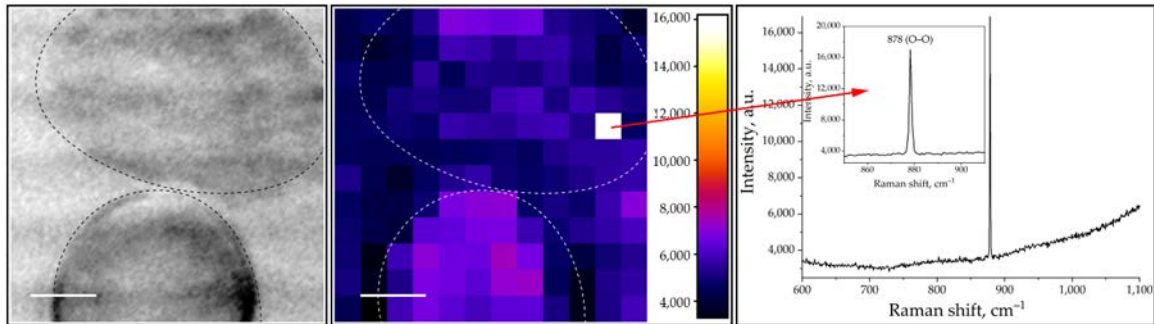


Рис. 13. Микрофотография (слева), рамановская карта (посередине) и спектр (справа) нейтрофилов, подвергшихся воздействию излучения с длиной волны 625 нм и дозой 32 Дж/см². Характерный острый пик для H₂O₂ виден справа. Спектральные ворота были выставлены в интервале 872-882 см⁻¹. Область сканирования 24 × 24 мкм, шкала: 5 мкм.

На рис.13 в центре представлена одна из полученных нами рамановских карт для облученных клеток нейтрофилов на длине волны 625 нм и при дозе 32 Дж/см². Спектральные ворота были выставлены в интервале 872-882 см⁻¹ с целью поиска и регистрации характерного узкого пика пероксида водорода. На карте видны положительные пиксели в основном с малой или умеренной интенсивностью на рамановской частоте 878 см⁻¹ (H₂O₂, O–O растяжка) и один яркий пиксель с соответствующим ему узким пиком, представленном на спектре справа.

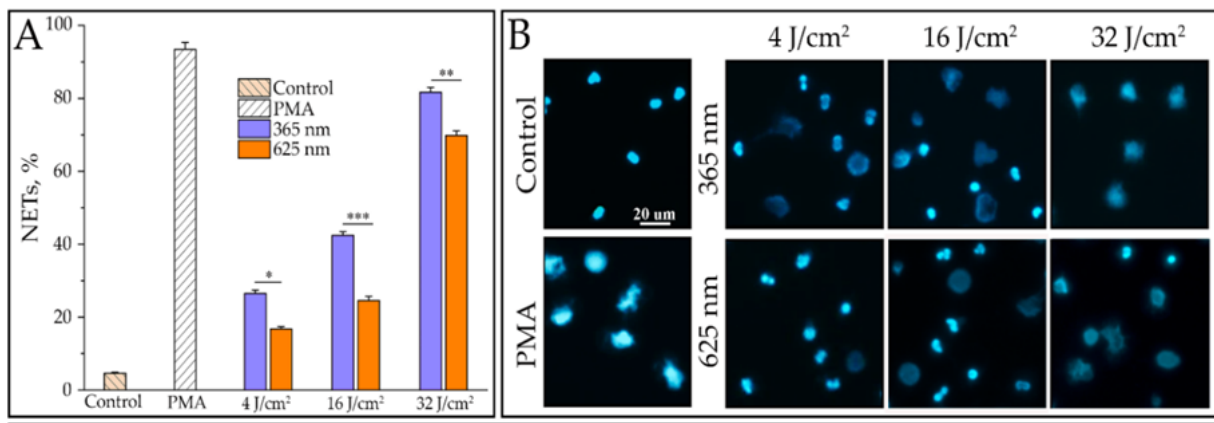


Рис. 14. Выход нетотических клеток в зависимости от дозы при длинах волн 365 нм и 625 нм [A], и соответствующие им флуоресцентные изображения [B]. Шкала: 20 мкм.

На рисунке 14А показано, что выход нетотических клеток зависит от дозы при облучении нейтрофилов ультрафиолетовым излучением (365 нм) и видимым светом (625 нм). Результаты положительного (ФМА) и отрицательного (необлученные клетки) контроля также представлены на рисунке. Соответствующие изображения флуоресцентной микроскопии показаны на рис. 14В.

Для выявления участия NADPH-оксидазы в образовании нетоза, индуцируемом под действием светового излучения, был использован специфический ингибитор NADPH-оксидазы - апоцинин. Мы также хотели выяснить, участвует ли PAD4 в формировании нетоза, индуцируемой светом. Для этого мы использовали специфический ингибитор PAD4, GSK484. Полученные результаты представлены на рисунке 15.

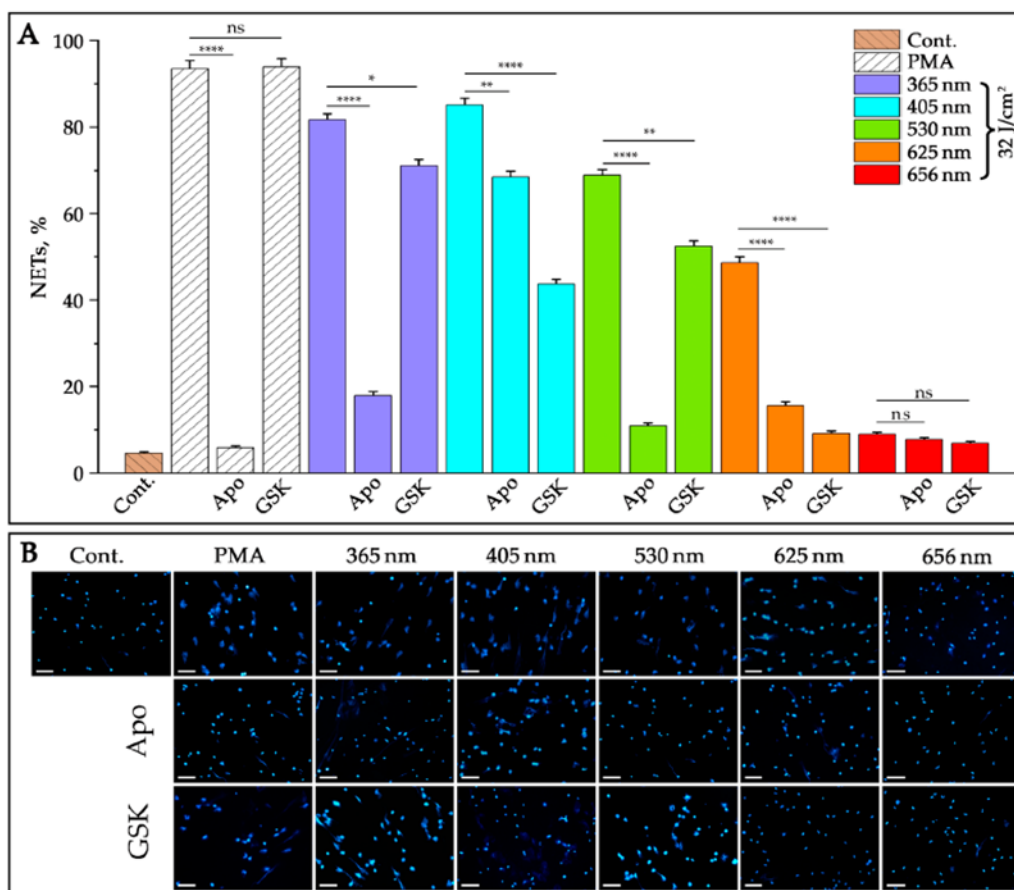


Рис. 15. Влияние селективных ингибиторов NADPH-оксидазы (апоцинин) и PAD4 (GSK484) на образование нетоза, облученных пятью длинами волн светодиодов (365, 405, 530, 625 и 656 нм) при одинаковой дозе облучения 32 Дж/см². В качестве положительного контроля использовали ФМА (50 нМ). После инкубации в течение 3 часов клетки окрашивали DAPI и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Как видно на рис. 15, апоцинин ингибирует выход нетотических клеток, индуцированный УФА и тремя длинами волн видимого света (синим, зеленым и оранжевым), что указывает на участие NADPH-оксидазы в фото-индуцированном нетозе. Что касается ингибитора PAD4, GSK484 – он вызывал более умеренное подавление нетоза, что указывает на участие PAD4 в образовании фото-индуцированного нетоза.

5.2.5. Выводы

В данном исследовании мы сфокусировались на роли излучения с различными длинами волн в индуцировании нетоза на модели нейтрофилов человека. Впервые было обнаружено, что не только УФА, но и видимый свет (синий, зеленый и оранжевый) индуцирует формирования нетоза. Используя специфические ингибиторы NADPH-оксидазы и PAD4, было продемонстрировано, что эти медиаторы классического нетоза участвуют в высвобождении нетотических клеток, индуцируемом световым излучением. Тем самым, образование АФК и цитруллинирование гистонов способствуют деконденсации хроматина в этих условиях. Результаты флуоресцентной микроскопии показали доза-зависимое образование нетотических клеток. Впервые для регистрации окислительного стресса и образования АФК была использована рамановская спектроскопия.

Наиболее вероятным фотоакцептором и преобразователем фотосигналов, на наш взгляд, является связанный с мембраной гетеродимерный флавогемопротеин цитохром *b*₅₅₈,

структурная компонента NADPH-оксидазы, содержащая окислительно-восстановительные центры.

6. Регистрация низкочастотных рамановских спектров одновременно в стоксовой и антистоксовой областях объемными Брэгг-фильтрами.

В настоящее время, большинство исследований по рамановской спектроскопии направлено на изучение внутримолекулярных колебаний рамановского смещения, которые превышают 100 см^{-1} . Вместе с тем, низкочастотная спектроскопия комбинационного рассеяния весьма перспективна для исследований большого круга материалов и позволяет получать о них важную информацию. Например, в полимерах – это продольные акустические моды, в различных кристаллах – колебания в кристаллических решетках, в углеродных нанотрубках – радиальные полносимметричные моды, в полупроводниковых материалах – акустические фононы, в газах – вращательные моды, в ДНК – колебания скелета, в фармацевтических таблетках – низкочастотные характеристические колебания, и т.д.

Регистрация рамановских спектров в низкочастотной области сопряжена с трудностями детектирования слабого КР-сигнала на фоне сильного сигнала рэлеевского рассеяния. Существующие "notch" фильтры имеют полосу порядка 300 см^{-1} (рис.16, кривая 1), которая ограничивает возможность измерения спектров в низкочастотной области. Длинноволновые пропускающие "edge" фильтры позволяют ближе подойти к лазерной линии (рис.16, кривая 2), но в спектральный детектор попадает определенная доля более интенсивного рэлеевского излучения.

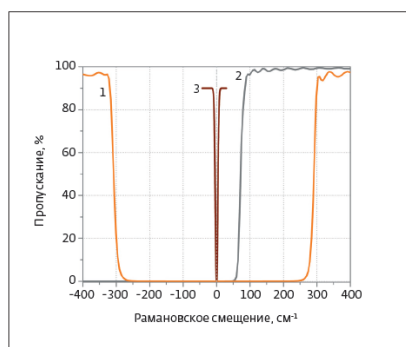


Рис.16. Полоса пропускания различных рамановских фильтров: Semrock "notch" NF01-633E-25 (кривая 1), Semrock "edge" LP02-633RE (кривая 2), OptiGrate BraggGrate BNF-633 (кривая 3).

На «КАРС» микроспектрометре ЛНФ, для выделения низкочастотного рамановского сигнала на сильном фоне рэлеевского рассеяния были использованы специальные фильтры на основе объемных брэгговских решеток BraggGrate, отличающихся высокой селективностью (рис.16, кривая 3). Достоинства этих фильтров – узкополосная полоса пропускания ($\sim 5 \text{ см}^{-1}$), высокая степень ослабления возбуждающего лазерного излучения (оптическая плотность >4) и прозрачность для рамановских сигналов (до 85%), что позволяет их применять для исследования ультранизкочастотных спектров ($<50 \text{ см}^{-1}$) в системах с одинарными монохроматорами. Еще одним достоинством таких фильтров является возможность одновременной регистрации стоксовой и антистоксовой компонент в рамановском спектре. На рис.17 представлены примеры таких спектров.

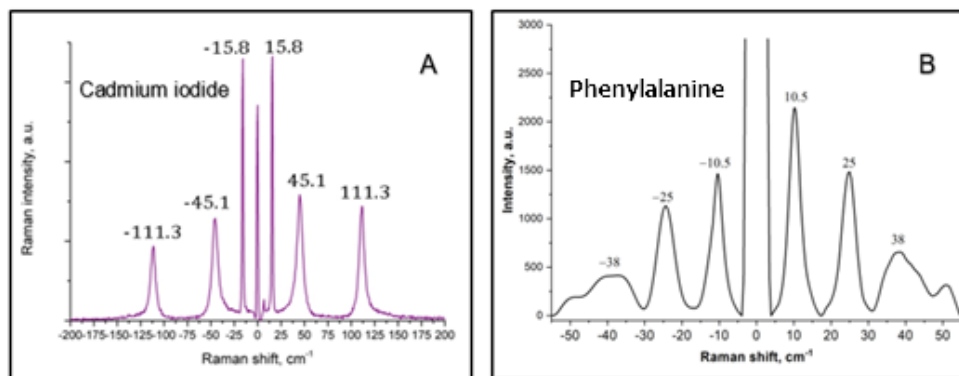


Рис.17. Низкочастотный рамановский спектр (А) йодида кадмия, узкий пик при $15,8 \text{ см}^{-1}$ соответствует моде E_2 политипа $4H$; (В) фенилаланин, моды решетки

Вывод: в результате проведенных нами исследований была продемонстрирована эффективность применения брэгговских объемных фильтров в «КАРС» микроспектрометре, для регистрации ультранизкочастотных спектров ($<30 \text{ см}^{-1}$) различных материалов при возбуждении образцов лазером на длине волны 633 нм .

Публикации 2021 – 2023гг.

1. Arzumanyan G.M., Mamatkulov K.Z., Vorobyeva M.Y., et al., "Plasmon resonance, thermal, and optical contributions to anti-Stokes-to-Stokes line strength ratios in continuous wave-excited surface-enhanced Raman scattering spectra of molecules at random Ag surface", *J Raman Spectroscopy*, **2021**, 52, 1515–1528, doi.org/10.1002/jrs.6190, (Microspectrometer "CARS").
2. Baibarac M., Arzumanyan G.M., Daescu M., et al., "Anisotropic Photoluminescence of Poly(3-hexyl thiophene) and Their Composites with Single-Walled Carbon Nanotubes Highly Separated in Metallic and Semiconducting Tubes", *Molecules*, **2021**, 26, 294, doi.org/10.3390/molecules26020294, (Microspectrometer "CARS", partially).
3. Kondela Tomas, Dushanov Ermuhammad, Vorobyeva Maria, et al., "Investigating the competitive effects of cholesterol and melatonin in model lipid membranes", *BBA*, **2021**, Biomembranes 1863, 9, doi.org/10.1016/j.bbame.2021.183651, (Microspectrometer "CARS", partially).
4. Karlova M., Bagrov D., Vorobyeva M., et al., "Raman spectroscopy reveals lipids in protein-containing SMA-stabilized lipodiscs", (Microspectrometer "CARS"), *Microsc. Microanal.*, **2021**, 27 (Suppl 1), [doi:10.1017/S1431927621006267](https://doi.org/10.1017/S1431927621006267).
5. Siarhei Zavatski, Hanna Bandarenka, Łukasz Hetmanczyk, Joanna Hetmanczyk, Maria Vorobyeva, Yersultan Arynbek, Kahramon Mamatkulov, Grigory Arzumanyan, "Model phospholipid interaction with cholesterol and melatonin: Raman spectroscopy and density functional theory study", *J Raman Spectroscopy*, **2022**, 53 (9) 6 1540-1550, [DOI: 10.1002/jrs.6409](https://doi.org/10.1002/jrs.6409), (Microspectrometer "CARS").
6. Anka Jevremovic, Ana Stanojkovic, Dragana Arsenijevic, Aleksandar Arsenijevi, Grigory Arzumanyan, Kahramon Mamatkulov, et al., "Mitigating toxicity of acetamiprid removal techniques – Fe modified zeolites in focus" *Journal of Hazardous Materials*, **2022**, 436, doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129226, (Microspectrometer "CARS", partially).
7. Grigory Arzumanyan, Kahramon Mamatkulov, Yersultan Arynbek, Darya Zakrytnaya, Anka Jevremović, Nina Vorobjeva, "Radiation from UV-A to Red Light Induces ROS-Dependent Release of Neutrophil Extracellular Traps", «International Journal of Molecular Sciences» **2023**, Volume 24, Issue 6, 5770, doi.org/10.3390/ijms24065770.
8. Hanna Bandarenka, Siarhei Zavatski, Yersultan Arynbek, Kahramon Mamatkulov, Grigory Arzumanyan, «Conformational analysis of molecular systems based on liposomes and lipodiscs modified with $A\beta$ -peptide (1-42) by Raman spectroscopy and computer modeling», **2023**, submitted to the Journal "Biomembranes".
9. Sergei Kurakin, Dina Badreeva, Sergey Efimov, Timur Mukhametzyanov, Ermuhammad Dushanov, Tatiana Murugova, Oleksandr Ivankov, Darya Zakrytnaya, Artyom Shutikov, Kahramon Mamatkulov, Norbert Kočerka, "Arrangement of lipid vesicles and bicelle-like structures formed in the presence of $A\beta(25-35)$ peptide", **2023**, in preparation.

Конференции 2021 – 2023 гг.

1. Arzumanyan G.M., "Search of Raman markers of NETosis, 15-16 Sept., **2021**, Cairo, Egypt, **keynote plenary report** (online).
2. Vorobyeva M.Yu., "The dynamical properties of DPPC lipid bilayer: Raman spectroscopy characterization", 33rd Nano congress for Future Advancements, 28-29 April **2021**, London, UK, oral section report (online)
3. Arynbeq Y., "Combined study of lipid bilayers by Raman spectroscopy, neutron scattering and MD simulation", YOUNG MULTIS - Multiscale Phenomena in Condensed Matter - conference for young researchers, 5-7 July **2021**, Krakow, Poland, oral section report (online).
4. Mamatkulov K., "Raman study of conformational changes in phospholipids", 20-24 Sept., **2021**, Almaty, Kazakhstan, Oral report (online)
5. Arynbeq Y., Arzumanyan G.M., "Competitive effect of cholesterol and melatonin in incorporated in lipid membrane: Raman characterization", 11-15 Oct., **2021**, Almaty, Kazakhstan, oral section report
6. Arzumanyan G.M., "CARS microspectroscopy in biomedical applications", 4th Global Webinar on Applied Science, Engineering and Technology (WEBAS-2022)", 22-23 October, **2022**, Live Stream, online.
7. Mamatkulov K.Z., "Synthesis and characterization of green nanofiber-based composite materials", 5th International Caparica Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, 24-27 January **2022**, Caparica, Portugal, online.
8. Arynbeq Y., "Investigation of the Structure and Dynamics of Complex Membrane Systems by Neutron and Raman Scattering Techniques", International Workshop on Nuclear and Particles Physics, 24-30 April, **2022**, Almaty, Kazakhstan, Oral report.
9. Arynbeq Y., Investigation for spectral biomarkers: chemical, UV and light induced NETosis", JINR Association of Young Scientists and Specialists (AYSS), "Alushta-XI", 5-12 June, **2022**, Alushta. Oral report.
10. Zakrytnaya D.S. Photoinduced neutrophil extracellular traps, VII Congress of Biophysicists of Russia, 17-23 April, **2023**, Krasnodar. Poster.
11. Shutikov A.A. Investigation of conformational changes in peptide A β (1-42) by Raman spectroscopy, VII Congress of Biophysicists of Russia, 17-23 April, **2023**, Krasnodar. Oral report.
12. Mamatkulov K.Z., "Photo-Induced Neutrophil Extracellular Traps: The Role of Cytochromes", International Conference on Radiation applications, May 29 - June 2, 2023, Anavyssos, Greece

Образовательная программа в 2021 – 2023 гг. в секторе Рамановской спектроскопии

Летняя студенческая практика:

1. Студентка Кравцунова Дарья, тема: «Раман-маркеры НЕТоза», 2021г.
2. Студентка Геронина Анна, 2022г.
3. Студентка Кисина Алёна, 2022, 2023г.

Стажировка

1. Курбонов Сарвар Санжар – 6-и месячная стажировка, май-ноябрь 2022г., Узбекистан.

Научно-исследовательская работа

1. Геронина Анна, тема: «Фотосинтез в растениях и бактериях» 03.2022 - 05.2022.
2. Кисина Алёна, тема: «Ап-конверсионная фотолюминесценция в 2Д материалах и гетероструктурах Ван-дер-Ваальса» 2023г.

Дипломная бакалаврская работа

1. Геронина Анна, «Исследование 2Д материалов и ван-дер-ваальсовых гетероструктур методом рамановской спектроскопии», 2023г.

Международное сотрудничество по теме 1133:

Армения, Республика Беларусь, Болгария, Египет, Индия, Куба, Польша, Россия, Румыния, Сербия, Словацкая Республика, Узбекистан, Украина в рамках программ сотрудничества или грантов.

Информация о поддержке темы ПП стран-участниц ОИЯИ в виде грантов и программ по сотрудничеству:

В 2021 – 2023гг. тема № 1133 в разные годы была поддержана полномочными представителями следующих стран: Болгария, Польша, Румыния, Сербия, Словацкая Республика.

Руководители темы 1133:

_____ Г.М. Арзуманян

_____ Н. Кучерка