

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт автоматики и электрометрии  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(ИАиЭ СО РАН)

На правах рукописи

Добрынина Елизавета Александровна

**РАЗВИТИЕ СПЕКТРОСКОПИИ РАССЕЯНИЯ МАНДЕЛЬШТАМА-  
БРИЛЛЮЭНА ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Специальность 1.3.6 — «Оптика»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
физико–математических наук

Научный руководитель:  
д.ф.-м.н., Суровцев Николай Владимирович

Новосибирск – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>ГЛАВА 1. Обзор литературы и постановка задачи .....</b>	<b>13</b>
§ 1.1. Рассеяние Мандельштама-Бриллюэна .....	13
§ 1.2. Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна как метод исследования механобиологии.....	17
п.1.2.1. Важность упругих модулей для характеристики биоматериалов.....	17
п.1.2.2. Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для характеризации упругих свойств материалов .....	20
§ 1.3. Водные растворы солей из лиотропного ряда Гофмейстера .....	21
п.1.3.1. Эффекты высаливания белков из водных растворов .....	22
п.1.3.2. Уравнение Джонса-Доула - изменения вязкости растворов с концентрацией растворенного вещества .....	23
п.1.3.3. Влияние растворенных ионов солей на характеристики водного раствора	24
§ 1.4. Фосфолипидные мембраны .....	26
п.1.4.1. Фосфатидилхолины. Насыщенные/ненасыщенные фосфолипиды и температура фазового перехода .....	26
п.1.4.2. Методы исследования фосфолипидных систем. Важность исследования фосфолипидов в широком диапазоне температур .....	27
п.1.4.3. Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию фосфолипидов .....	30
§ 1.5. Белковые системы и биологические ткани .....	34
п.1.5.1. Исследование упругих свойств биологических тканей .....	35
п.1.5.2. Перспектива применения спектроскопии рассеяния Мандельштама- Бриллюэна к исследованию тканей.....	37
п.1.5.3. Проблема влияния воды на спектр РМБ гидратированных материалов.....	38
§ 1.6. Заключение к Главе 1 .....	39
<b>ЦЕЛЬ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>41</b>
<b>ГЛАВА 2. Техника эксперимента по спектроскопии рассеяния Мандельштама- Бриллюэна.....</b>	<b>43</b>

§ 2.1. Интерферометр Фабри-Перо .....	43
§ 2.2. Тандем интерферометров Фабри-Перо .....	46
п.2.2.1. Тандемная система интерферометров Фабри-Перо .....	46
п.2.2.2. Принцип работы спектрометра TFP-1 .....	47
п.2.2.3. Настройка спектрометра TFP-1 .....	49
§ 2.3. Описание экспериментальной установки .....	51
§ 2.4. Возможности различных геометрий рассеяния при исследовании планарных образцов.....	52
<b>ГЛАВА 3. Водные растворы солей из лиотропного ряда Гофмейстера .....</b>	<b>55</b>
§ 3.1. Проведение эксперимента на водных растворах солей при комнатной температуре.....	55
п.3.1.1. Изготовление образцов.....	55
п.3.1.2. Определение показателя преломления .....	56
п.3.1.3. Параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	57
п.3.1.4. Эксперимент по исследованию спектров комбинационного рассеяния света водных растворов .....	57
§ 3.2. Анализ результатов рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.....	59
п.3.2.1. Характерный спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, определение параметров спектра .....	59
п.3.2.2. Концентрационная зависимость скорости звука водных растворов .....	62
п.3.2.3. Концентрационная зависимость ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.....	63
§ 3.3. Анализ экспериментальных результатов комбинационного рассеяния света ....	64
п.3.3.1. Поляризованный спектр комбинационного рассеяния света .....	66
п.3.3.1. Деполяризованный спектр КРС.....	68
§ 3.4. Обсуждение результатов. Взаимосвязь с параметром $V_{JD}$ , характеризующего изменение вязкости раствора .....	72
п.3.4.1. Связь параметра, характеризующего изменение скорости звука с концентрацией, с параметром $V_{JD}$ .....	74
п.3.4.2. Связь параметра, характеризующего изменение ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна с концентрацией, с параметром $V_{JD}$ .....	75

п.3.4.3. Связь параметра, отражающего тетраэдрический порядок водородной сетки, с параметром <i><b>VJD</b></i> .....	76
п.3.4.4. Связь параметра, характеризующего водородную связь в водном растворе, с параметром <i><b>VJD</b></i> .....	77
§ 3.5. Заключение по исследованию водных растворов солей серии Гофмейстера методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	78
<b>ГЛАВА 4. Фосфолипидные мембраны</b> .....	81
§ 4.1. Проведение эксперимента по исследованию фосфолипидных мембран в широком диапазоне температур.....	81
п.4.1.1. Изготовление образцов синтетических фосфолипидов .....	81
п.4.1.2. Температурные измерения и параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	83
§ 4.2. Монокомпонентные системы синтетических фосфолипидов .....	84
п.4.2.1. Анализ экспериментальных результатов. Температурные зависимости параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для различных геометрий рассеяния .....	84
п.4.2.2. Обсуждение результатов. Температурные зависимости скоростей звука в разных геометриях рассеяния .....	89
§ 4.3. Двойные системы синтетических фосфолипидов .....	96
п.4.3.1. Влияние холестерина на фазовый переход фосфолипидных систем .....	96
п.4.3.2. Температурное поведение двойной смеси в области сосуществования фаз .....	99
§ 4.4. Биологические мембраны эритроцитов .....	101
п.4.4.1. Изготовление образцов: выделение мембран эритроцитов из крови .....	101
п.4.4.2. Анализ и обсуждение экспериментальных результатов. Температурные зависимости параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Сравнение температурного поведения с модельными системами .....	102
§ 4.5. Заключение по исследованию фосфолипидных мембран методом РМБ .....	105
<b>ГЛАВА 5. Коллагенсодержащие ткани: бычья вена и перикард</b> .....	107
§ 5.1. Проведение эксперимента: подготовка образцов тканей и параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	107
§ 5.2. Анализ экспериментальных результатов .....	108

п.5.2.1. Характерный спектр перикардиальной ткани, определение параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	108
п.5.2.2. Характерный спектр венозной стенки, определение параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна .....	109
§ 5.3. Обсуждение результатов .....	111
п.5.3.1. Влияние обработки на параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированных тканей .....	111
п.5.3.2. Влияние обработки на параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна высушенных тканей .....	115
п.5.3.3. Сравнение продольного гигагерцового модуля с модулем Юнга .....	117
§ 5.4. Заключение по исследованию коллагенсодержащих тканей бычьей яремной вены и бычьего перикарда методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.....	121
<b>ГЛАВА 6. Модельная система: яичный белок, водный раствор бычьего сывороточного альбумина .....</b>	<b>123</b>
§ 6.1 Проведение эксперимента по исследованию модельной белковой системы.....	123
п.6.1.1. Подготовка образцов .....	123
п.6.1.2. Экспериментальная установка по одновременному измерению рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света .....	124
§ 6.2. Анализ и обсуждение экспериментальных результатов .....	125
п.6.2.1. Анализ спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света.....	125
п.6.2.2. Обсуждение результатов. Сравнение спектров неупругого рассеяния света нативного и денатурированного яичного белка.....	128
§ 6.3. Заключение по исследованию яичного белка методом РМБ.....	133
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>135</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....</b>	<b>139</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>141</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (РМБ) является бесконтактным и неинвазивным методом, основанным на явлении неупругого рассеяния света, который позволяет получить информацию о вязкоупругих свойствах материалов, в частности о скорости звука и величине продольного упругого модуля в гигагерцовом диапазоне. Указанные преимущества служат причиной все большего числа применений спектроскопии РМБ к биологически значимым материалам, включая биорелевантные растворы, липиды и белки.

В последнее десятилетие спектроскопия РМБ активно развивается как метод оптической эластографии с целью характеристики биомеханики тканей, клеток и их имитаций как *ex vivo* (вне организма) [1-2], так и *in vivo* (в естественных условиях) [3]. Однако, биофизическая интерпретация измерений с помощью спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна до сих пор является предметом научных дискуссий, а ее значимость для многих актуальных вопросов биомеханики остается не до конца определенной. В научном сообществе существует проблема связи продольного упругого модуля ( $M$ ), определяемой спектроскопией РМБ, с модулем Юнга ( $E$ ). С одной стороны, в литературе известен ряд работ, посвящённых установлению феноменологической связи между  $M$  и  $E$  [4-7]. С другой стороны, для высокогидратированных материалов водная компонента оказывает влияние на позицию дублета Мандельштама-Бриллюэна, а значит, и на продольный упругий модуль, в ряде работ отмечается отсутствие корреляции между  $M$  и  $E$  [8]. Так как неотъемлемой частью биологических объектов является вода, это затрудняет прямую интерпретацию сдвига бриллюэновской линии в терминах «жесткости» и требует более тщательного анализа и выявления вкладов составляющих компонент, чтобы корректно связать скорость звука, определяемую методом РМБ, со структурными и механическими характеристиками.

Данная диссертационная работа направлена на развитие спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна с концентрацией внимания на корректной интерпретации спектров РМБ, получаемых при исследовании гетерогенных биологических сред. Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна характеризует гигагерцовый продольный упругий модуль материала из анализа позиции бриллюэновского пика, а также релаксационный отклик из ширины пика РМБ.

К биологически значимым материалам относят не только сами биомолекулы, но и их комплексы. При этом важную роль в их формировании и функционировании играет окружающий раствор, который преимущественно состоит из воды. Добавление различных веществ к воде приводит к существенным изменениям ее термодинамических свойств, а характеристики водного раствора оказывают влияние на свойства биомолекул, в частности, на структуру белков. Для изучения взаимосвязи между параметрами спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и структурой воды вокруг растворителя, в диссертационном исследовании будут рассмотрены водные растворы солей серии Гофмейстера, которые известны различиями в способности создавать/разрушать структуру водородных связей. В зависимости от характера влияния ионов их разделяют на космотропы, создающие структурный порядок, и хаотропы, разрушающие структуру. Косвенное подтверждение различного влияния ионов проявляется в экспериментах по измерению вязкости раствора [9]. Несмотря на многочисленные исследования влияния ионов на молекулы воды, до сих пор нет общепринятой теории, которая могла бы детально объяснить механизм взаимодействия растворенного вещества и растворителя. В связи с этим, несмотря на долгую историю, исследованию проблемы серии Гофмейстера и в настоящее время уделяется повышенное внимание. Поскольку эксперименты по измерению вязкости водных растворов показали наличие эффектов различного влияния ионов на сетку водородных связей воды, можно ожидать, что указанные явления могут быть изучены также и методом спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. В свою очередь, спектроскопия комбинационного рассеяния света позволяет исследовать влияние ионов на структуру водородных связей посредством анализа частот валентных ОН-колебаний.

Другим важным и не менее интересным объектом исследования в настоящей работе являются системы фосфолипидных мембран. Мембранные системы, сформированные из синтетических фосфолипидов, получили широкое распространение при моделировании клеточных процессов. Наиболее интригующие вопросы возникают при исследовании фазовых переходов типа “порядок-беспорядок” таких биологических систем. Молекулы липида в присутствии воды формируют бислои и при изменении температуры могут находиться в низкотемпературном упорядоченном состоянии геля или в высокотемпературном состоянии флюида. Спектры РМБ мембран фосфолипидов были изучены при температурах выше 0°C и при фазовых переходах [10-12]. Выбор

температур обусловлен тем, что такие условия близки к физиологическому состоянию клеточной мембраны. Проведение исследований в широком диапазоне температур необходимо для изучения влияния различных степеней свободы мембраны [13-14]. Данное исследование может быть полезно в задачах сохранения биологического материала при криоконсервации, поскольку разрушение мембраны при замораживании является одной из ключевых причин гибели клеток в ходе криопротоколов. Одним из важных параметров фосфолипидных бислоев являются их механические свойства, которые могут изменяться в зависимости от состава, наличия неоднородностей, фазового и конформационного состояния системы. Методика рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в области исследования липидных систем может помочь в понимании механизмов изменения подвижности, вязкости и жесткости мембран клеток при воздействии на них лекарственных веществ и влиянии заболеваний.

Еще одним объектом диссертационного исследования являются белковые системы, включающие фибриллярные белки, такие как коллаген и эластин в биологической ткани, а также глобулярные белки бычьего сывороточного альбумина и яичного белка, состоящего преимущественно из овальбумина и лизоцима. Фибриллярные белки составляют основу биологических тканей живых организмов. Однако белки в ткани выстраиваются в сложную иерархическую структуру по-разному, в зависимости от типа ткани. Именно из-за важности коллагенсодержащих тканей активно применяются и исследуются возможности различных методик для изучения структуры тканей, их свойств и воздействия заболеваний, а также разработки имплантов на основе фибриллярных белков. С целью достижения определенных характеристик и высокой биосовместимости и долговечности разработка протоколов обработки биоимплантов остается актуальной научной проблемой. В качестве имплантируемого материала широко применяются ткани бычьего перикарда и клапансодержащая бычья яремная вена. Как правило, имплантируемый материал проходит процедуру преимплантационной обработки стабилизирующими агентами с целью решения проблем отторжения имплантата иммунной системой, кальцинации имплантируемой ткани и механического износа. Стабилизирующие агенты способствуют сшивке тканей посредством образования перекрестных связей между волокнами белка. Однако эти воздействия влияют на свойства тканей, в частности на их механические характеристики. В настоящее время в медицинских учреждениях как правило, измерения жесткости и упругого модуля

биопротезов проводятся на этапе преимплантационного исследования с применением механических тестов, разрушающих материал. Перспектива использования неинвазивных методов и характеристики *in situ* (на месте) создает запрос на развитие спектроскопии Мандельштама-Бриллюэна в этой области, на что направлены работы последних лет [1, 7, 15-22]. Однако возможности и ограничения метода при применении к тканям еще до конца не изучены. Ограничивающим фактором применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию биологических тканей является влияние водной компоненты, которая воздействует как на биомеханику тканей, так и на спектр РМБ.

Целью настоящей диссертационной работы является исследование возможностей и развитие спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для характеристики биологически значимых материалов, включая водные растворы солей, липиды и белки. Работа направлена на установление взаимосвязей между гигагерцовым продольным модулем упругости и механическими свойствами материала, его молекулярной структурой. В соответствии с поставленной целью в диссертационном исследовании были сформулированы следующие задачи:

1. Установление зависимости между положением ионов в ряду Гофмейстера и параметрами спектра РМБ, а также выявление влияния ионов на полосу валентных ОН-колебаний в спектрах комбинационного рассеяния света. Для этого рассматривается большая группа солей, ионы которых располагаются в различных частях ряда Гофмейстера:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCNS}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ .

2. Исследование температурных изменений параметров спектра РМБ планарных слоев фосфолипидов в гидратированном состоянии в широком диапазоне температур от 90 до 320 К в зависимости от степени насыщенности углеводородных хвостов (насыщенные фосфолипиды DMPC, DPPC, ненасыщенный фосфолипид DOPC), состава (смеси фосфолипидов DPPC/DOPC, смеси с холестерином), а также сравнение спектров РМБ модельных систем и выделенных мембран эритроцитов.

3. Применение спектроскопии РМБ для исследования упругого отклика тканей бычьей яремной вены и перикарда на разных стадиях преимплантационной обработки. Определение взаимосвязи между продольным гигагерцовым модулем, определяемым из спектров РМБ, и модулем Юнга, полученным из механических испытаний на растяжение.

4. Определение влияния на спектр РМБ структурных изменений высокогидратированных материалов, которые приводят к увеличению модуля Юнга и происходят при неизменном уровне гидратации и химическом составе, на примере герметично запечатанного яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина.

К новым научным результатам, полученным в ходе исследования, можно отнести следующие:

1. Обнаружена корреляция между коэффициентами в линейном члене концентрационных зависимостей частоты валентных ОН-колебаний и комплексного продольного модуля упругости с коэффициентом вязкости Джонса-Доула. Показано, что степень влияния различных ионов на тетраэдрическую структуру сетки водородных связей воды не коррелирует с классификацией ионов в терминах коэффициента Джонса-Доула.

2. Из анализа спектров РМБ систем насыщенных и ненасыщенных (содержащих двойные С=С связи в цепочках жирных кислот) фосфолипидов показано, что значительная часть изменений гигагерцового упругого модуля в твердоподобной гелевой фазе взаимосвязана с изменениями в конформационной структуре фосфолипидов.

3. Спектры РМБ выделенных мембран эритроцитов демонстрируют температурную зависимость, характерную для модельных липидных бислоев.

4. Спектроскопия РМБ коллагенсодержащих тканей показала, что продольный упругий модуль гидратированных тканей слабо изменяется в результате преимплантационной обработки. Продемонстрирован потенциал применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию белкового каркаса высушенной ткани. Установлено, что консервация ткани в спиртовых растворах приводит к увеличению продольного модуля упругости коллагеновых и эластиновых волокон.

5. Обнаружено, что при денатурации образцов яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина при неизменном уровне гидратации изменения положения линии РМБ не отражают роста макроскопического модуля Юнга от 0 до 3.5-6 кПа.

Практическая значимость результатов, полученных в диссертационном исследовании, заключается в выявлении факторов влияющих на параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Сравнительные исследования различных

биологических образцов имеют решающее значение для корректного анализа и интерпретации данных бриллюэновского эксперимента в биологических значимых материалах. Результаты, полученные в рамках настоящей работы, будут полезны специалистам, занимающимся применением спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для биомедицинских задач.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Концентрационные зависимости параметров спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и полосы валентных ОН-колебаний в комбинационном рассеянии света водных растворов солей определяются положением их ионов в ряду Гофмейстера, характеризуемым коэффициентами вязкости Джонса-Доула.

2. Латеральный продольный упругий модуль бислоев фосфолипидов возрастает более чем в 2 раза с понижением температуры внутри гелевой фазы, что превышает изменения, наблюдаемые при переходе гель-флюид. Нелинейная температурная зависимость продольного упругого модуля связана с изменениями конформационных состояний углеводородных цепочек.

3. Гигагерцовый упругий модуль, определяемый спектроскопией рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, не имеет взаимно однозначного соответствия с изменением модуля Юнга, вызванным сшивками и изменением структуры гидратированных биоматериалов.

Результаты работы докладывались автором на следующих конференциях и семинарах: 58-я Международная научная студенческая конференция (10-17 апреля 2020, Новосибирск); 59-я Международная научная студенческая конференция (12-21 апреля 2021, Новосибирск); 7-й Урало-Сибирский семинар «Спектроскопия комбинационного рассеяния света» (23-25 августа 2021, Екатеринбург); 11-я Молодежная конкурс-конференция «Оптические и информационные технологии» (11 ноября 2021, Новосибирск); 60-я Международная научная студенческая конференция (10-20 апреля 2022, Новосибирск); Российская конференция и школа молодых ученых по актуальным проблемам спектроскопии комбинационного рассеяния света «Комбинационное рассеяние – 95 лет исследований» (5-9 июня 2023, Новосибирск). Результаты также докладывались на научном семинаре ИАиЭ СО РАН 18 июня 2026 г.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией.

## ГЛАВА 1. Обзор литературы и постановка задачи

В данной главе приведена теория рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (РМБ), обсуждены ключевые особенности спектроскопии РМБ в области механобиологии, введены основные понятия и характерные параметры для биологически значимых материалов, рассматриваемых в данном исследовании: водные растворы солей из лиотропного ряда Гофмейстера, фосфолипидные мембраны, простые белковые системы и реальные коллагенсодержащие биологические ткани, а также рассмотрен вопрос возможности применения спектроскопии РМБ к высокогидратированным материалам.

### § 1.1. Рассеяние Мандельштама-Бриллюэна

Рассеяние электромагнитной волны в конденсированной среде обусловлено наличием пространственно-временных флуктуаций диэлектрической проницаемости  $\delta\varepsilon(r, t)$ , возникающих вследствие теплового движения атомов и молекул. Согласно электродинамической теории, базирующейся на уравнениях Максвелла [23-24], спектральная интенсивность света  $I(q, \omega)$  пропорциональна пространственно-временной корреляционной функции этих флуктуаций, которую можно записать в виде [24-25]:

$$I(q, \omega) \propto \int e^{-i\omega t} \langle \delta\varepsilon(q, t) \delta\varepsilon^*(q, 0) \rangle dt, \quad (1.1)$$

где  $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_s$  — волновой вектор рассеяния, равный разности волновых векторов падающего ( $\vec{k}_i$ ) и рассеянного ( $\vec{k}_s$ ) излучения;  $\omega = \omega_i - \omega_s$  — частота рассеяния. В изотропной среде модуль волнового вектора рассеяния  $q$  однозначно определяется длиной волны падающего света  $\lambda$  и углом рассеяния  $\theta$  (внутри среды) [25]:

$$q = |q| = 2|k_i| \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (1.2)$$

где  $n$  — показатель преломления среды.

Явление рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (РМБ) обусловлено неупругим рассеянием света на тепловых акустических фононах (звуковых волнах). Звуковые волны сопровождаются локальной деформацией среды. В линейном континуальном приближении флуктуации диэлектрической проницаемости  $\delta\varepsilon_{ik}$  прямо пропорциональны компонентам тензора деформации  $\xi_{lm}$  через упруго-оптический тензор  $P_{iklm}$  [25]:

$$\delta\varepsilon_{ik} = P_{iklm} \xi_{lm}. \quad (1.3)$$

Следовательно, спектр рассеянного света напрямую отражает спектр тепловых флуктуаций механических смещений в среде.

В термодинамически равновесной системе спектр спонтанных тепловых флуктуаций связан с мнимой частью обобщенной восприимчивости  $\chi''(q, \omega)$  посредством флуктуационно-диссипационной теоремы (ФДТ) [26]:

$$I(q, \omega) \propto \frac{k_B T}{\omega} \chi''(q, \omega). \quad (1.4)$$

Для нахождения функции восприимчивости  $\chi(q, \omega)$  и установления связи спектра рассеянного света с механическими свойствами среды рассмотрим динамический отклик материала на внешнее возмущение. Для этого рассмотрим решение волнового уравнения в приближении сплошной среды для продольного смещения  $u(x, t)$  (распространяющегося вдоль вектора  $\vec{q}$ ) под действием внешней стимулирующей объемной силы  $f(x, t)$ :

$$\rho \frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \frac{\partial \sigma}{\partial x} + f, \quad (1.5)$$

где  $\rho$  — плотность, а  $\sigma$  — механическое напряжение. В линейной вязкоупругой среде напряжение пропорционально относительной деформации согласно закону Гука [27]:

$$\sigma = M \cdot \frac{\partial u}{\partial x}, \quad (1.6)$$

где  $\frac{\partial u}{\partial x}$  - относительная деформация, а  $M$  — продольный модуль упругости.

Для описания затухающих акустических волн в вязкоупругой среде вводится комплексный продольный модуль упругости:

$$M^*(\omega) = M'(\omega) - iM''(\omega), \quad (1.7)$$

где действительная часть  $M'$  (модуль накопления) определяет упругие свойства среды и скорость распространения звука, а мнимая часть  $M''$  (модуль потерь) описывает вязкое трение и диссипацию энергии.

Подставляя решение для плоской волны в виде  $u_x \propto e^{-i\omega t + iqx}$  в выражение для напряжения (1.6) и уравнение (1.5) получаем:

$$(q^2 M^* - \rho \omega^2) u = f. \quad (1.8)$$

Восприимчивость среды  $\chi(q, \omega)$ , являющаяся коэффициентом пропорциональности (откликом) между смещением  $u$  и приложенной силой  $f$ , принимает вид:

$$\chi(q, \omega) = \frac{u}{f} = \frac{1}{q^2 M^* - \rho \omega^2} = \frac{1}{(q^2 M' - \rho \omega^2) - i(q^2 M'')}. \quad (1.9)$$

Умножая числитель и знаменатель на комплексно-сопряженное выражение, выделим мнимую часть восприимчивости  $\chi''(q, \omega)$ , которая отвечает за диссипацию энергии в среде:

$$\chi''(q, \omega) = \frac{q^2 M''}{(q^2 M' - \rho \omega^2)^2 + (q^2 M'')^2}. \quad (1.10)$$

Согласно флуктуационно-диссипационной теореме (1.4), в классическом высокотемпературном пределе ( $k_B T \gg \hbar \omega$ ) интенсивность спектра спонтанных тепловых флуктуаций плотности  $I(q, \omega)$ , регистрируемая в эксперименте РМБ, прямо пропорциональна величине  $\chi''(\omega)/\omega$ . Таким образом, получаем итоговое уравнение, описывающее форму спектральной линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна [25]:

$$I(q, \omega) \propto \frac{k_B T}{\omega} \left[ \frac{q^2 M''}{(q^2 M' - \rho \omega^2)^2 + (q^2 M'')^2} \right]. \quad (1.11)$$

Можно показать, что мнимая часть восприимчивости спектра выражается через два независимых контуров Лоренца, для этого сделаем замену  $\Delta \omega^2 = \frac{q^2 M'}{\rho}$  и  $\omega \Gamma = \frac{q^2 M''}{\rho}$ . В результате подстановки получаем:

$$\chi''(q, \omega) = \frac{1}{\rho} \frac{\omega \Gamma}{(\omega^2 - \Delta \omega^2)^2 + (\omega \Gamma)^2} = \frac{1}{\rho \omega_1} \left[ \frac{\Gamma/2}{(\omega - \omega_0)^2 + (\Gamma/2)^2} - \frac{\Gamma/2}{(\omega + \omega_0)^2 + (\Gamma/2)^2} \right]. \quad (1.12)$$

Можно заметить, что максимум интенсивности функции Лоренца находятся на позиции  $\omega = \pm \omega_0$ , где  $\omega_0$  - частота линии РМБ, которая сдвинута относительно измеряемого сдвига РМБ  $\Delta \omega$  из-за затухания через  $\omega_0^2 = \Delta \omega^2 - \Gamma^2/4$ , при этом в спектре  $\Gamma$  является полной шириной линии на половине высоты (FWHM), как показано на рис.1.1.

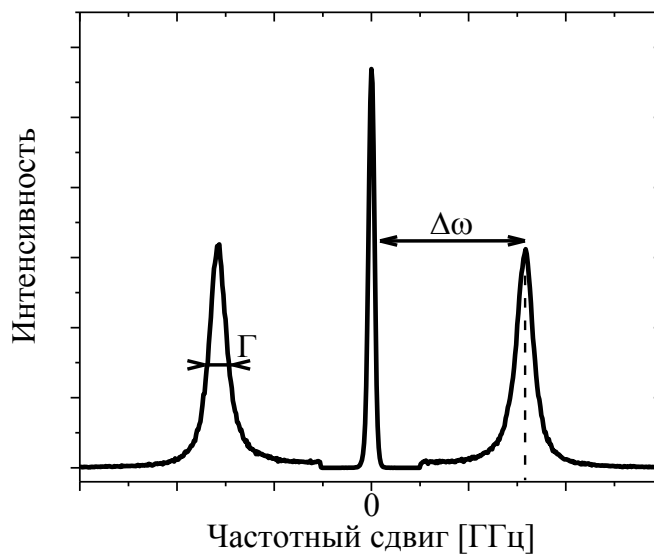


Рис.1.1. Характерный спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна: в центре – упругая линия; по краям – дублет Мандельштама-Бриллюэна.

Для нахождения связи между параметрами измеряемой спектральной линии РМБ и комплексным модулем упругости  $M^*$  рассмотрим собственные колебания системы. Собственные моды системы определяются полюсами функции восприимчивости в комплексной плоскости частот [26], то есть условием равенства знаменателя выражения (1.9) нулю:

$$(q^2 M^* - \rho \omega_c^2) u = 0. \quad (1.13)$$

Свободные затухающие акустические колебания описываются комплексной частотой  $\omega_c$ , в которой действительная часть соответствует измеряемому в эксперименте частотному сдвигу пика РМБ  $\Delta\omega$ , а мнимая часть описывает временное затухание амплитуды волны и связана с полной шириной спектральной линии на полувысоте  $\Gamma$ :

$$\omega_c = \Delta\omega - i(\Gamma/2). \quad (1.14)$$

Подставим комплексный модуль  $M^*$  из (1.7) и квадрат комплексной частоты  $\omega_c^2$  из (1.14) в дисперсионное уравнение (1.8):

$$q^2(M' - iM'') = \rho(\Delta\omega^2 - \Gamma^2/4 - i\Delta\omega\Gamma). \quad (1.15)$$

Приравнивая отдельно действительные и мнимые части левой и правой частей уравнения (1.15), мы получаем точную систему уравнений, связывающую упругие свойства среды с параметрами спектра РМБ:

$$q^2 M' = \rho(\Delta\omega^2 - \Gamma^2/4). \quad (1.16)$$

$$q^2 M'' = \rho\Delta\omega\Gamma. \quad (1.17)$$

Тогда из выражения (1.16) следует, что частотный сдвиг РМБ  $\omega_0$  однозначно определяет упругую (действительную) часть продольного модуля:

$$M' = \rho \left( \frac{\omega_0}{q} \right)^2. \quad (1.18)$$

Поскольку явление рассеяния Мандельштама-Бриллюэна происходит на масштабах больших межатомных расстояния, спектр колебательных возбуждений можно рассматривать в приближении континуальной среды, где имеем линейный закон дисперсии  $\omega = v_c q$ , где  $v_c$  – скорость звука, распространяющегося в среде. Поэтому уравнение (1.18) преобразуется к виду:

$$M' = \rho v_c^2. \quad (1.19)$$

Из (1.17) следует, что полная ширина линии на полувысоте  $\Gamma$  определяется мнимой частью модуля упругости:

$$\Gamma = \frac{q^2 M''}{\rho \Delta\omega}. \quad (1.20)$$

Разделив мнимую часть (1.17) на действительную (1.16), мы получаем точное аналитическое соотношение для тангенса угла механических потерь:

$$\frac{M''}{M'} = \frac{\Delta\omega\Gamma}{\Delta\omega^2 - \Gamma^2/4} = \frac{\Delta\omega\Gamma}{\omega_0^2}. \quad (1.21)$$

Выражение (1.21) является прямым следствием решения уравнения (1.5). Однако в литературе [17-18] часто встречается иная форма этого выражения. Для наглядности в уравнении (1.21) вынесем  $\Delta\omega$  из знаменателя, тогда получим:

$$\frac{M''}{M'} = \frac{\Gamma/\Delta\omega}{1 - (\Gamma/2\Delta\omega)^2}. \quad (1.22)$$

Если допустить, что спектральные линии акустических фононов являются относительно узкими, то есть их ширина на полувысоте существенно меньше частотного сдвига ( $\Gamma \ll \Delta\omega$ ), то слагаемым  $(\Gamma/2\Delta\omega)^2$  в знаменателе формулы (1.22) можно пренебречь. Тогда точное выражение (1.22) сводится к формуле, широко применяемой на практике:

$$\frac{M''}{M'} = \frac{\Gamma}{\Delta\omega}. \quad (1.23)$$

Таким образом, спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна позволяет бесконтактно и локально определять полный комплексный продольный модуль упругости материала на гигагерцовых частотах, где частотный сдвиг пика РМБ  $\Delta\omega$  характеризует упругость ( $M'$ ), а его ширина  $\Gamma$  характеризует высокочастотную локальную вязкость ( $M''$ ).

## **§ 1.2. Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна как метод исследования механобиологии**

### **п.1.2.1. Важность упругих модулей для характеристики биоматериалов**

Упругие свойства материалов связаны с их способностью восстанавливать форму после деформации при воздействии внешних сил, а способность материала сопротивляться деформации характеризуется упругим модулем. Разнообразие методов механического воздействия и направлений приложения силы позволяет определить разные типы модулей упругости. Основными из них являются модуль Юнга, объемный модуль, сдвиговой модуль и продольный упругий модуль, представленные на рис.1.2 [18].

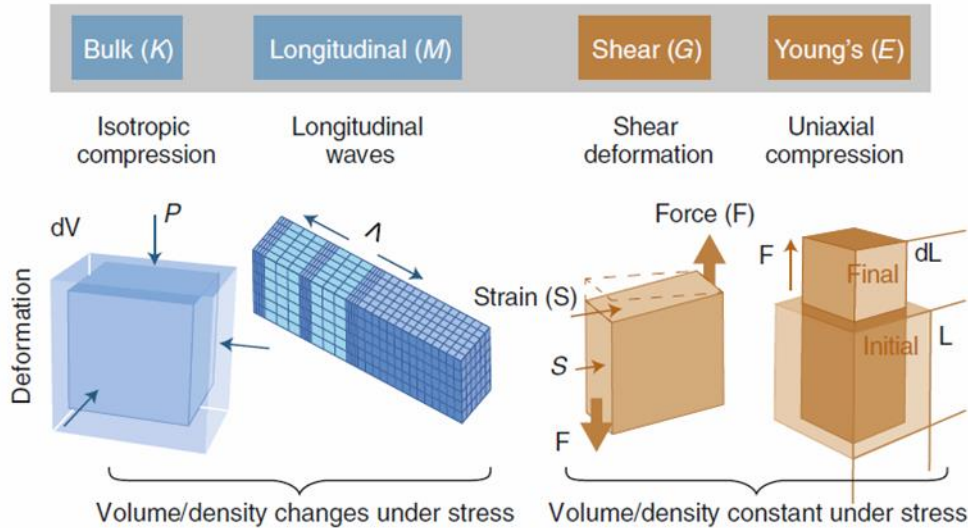


Рис.1.2. Изображение деформаций для разных упругих модулей. Модули объемной ( $K$ ) и продольной ( $M$ ) упругости (синий) связаны с деформациями, изменяющими объем образца. С другой стороны, модули сдвига ( $G$ ) и Юнга ( $E$ ) (оранжевые) характеризуют деформации, сохраняющим объем. Рисунок заимствован из [18].

Модуль Юнга ( $E$ ) описывает сопротивление материала растяжению/сжатию при одноосном растяжении. При этом объект сохраняет постоянную плотность или объем, согласно формуле:

$$P = E \frac{dL}{L}, \quad (1.24)$$

где  $P$  – давление,  $L$  – начальная длина,  $dL$  – изменение длины.

Модуль сдвига ( $G$ ) характеризует отклик материала на сдвиговую нагрузку при сохранении его объема через (1.25).

$$G = \frac{F/S}{\Delta x/L}, \quad (1.25)$$

где  $F$  – приложенная сила,  $S$  – площадь, на которую действует сила,  $\Delta x$  – смещение, а  $\Delta x/L$  – сдвиговая деформация.

Объёмный модуль упругости ( $K$ ) описывает способность материала изменять свой объем ( $dV$ ) при всестороннем сжатии ( $dP$ ), который описывается выражением:

$$K = -V \frac{dP}{dV}. \quad (1.26)$$

Продольный упругий модуль ( $M$ ) аналогичен модулю Юнга, за исключением того, что деформация материала в направлениях, ортогональных оси приложения силы, ограничена (равна нулю), т.е. материал не может расширяться/сжиматься в латеральном направлении. Как правило, упругость однородных материалов может быть описана любыми двумя упругими модулями, а остальные могут быть определены из них. Так,

например, модуль Юнга (E) связан с объемным модулем (K) и модулем сдвига (G) через соотношение (1.27) [27]

$$E = \frac{9KG}{3K+G} \quad (1.27)$$

А продольный модуль (M) выражается как сумма объемного и сдвигового модулей [27]:

$$M = K + \frac{4}{3}G \quad (1.28)$$

Строение биологических материалов достаточно сложно. Биологические ткани являются неоднородными и образованы сочетанием нескольких химически разнородных компонентов. Упругие свойства таких систем играют определяющую роль, обеспечивая стабильность и функциональность клеток, тканей и органов. Например, стенка кровеносного сосуда (вены, артерии и другие) представляет собой многослойную структуру, включающую гладкие мышечные клетки, коллагеновые и эластиновые волокна, липидные гранулы и неорганические соединения. У венозной стенки выделяют три основных слоя, которые имеют разный состав и имеют различное назначение. Такая сложная структура и состав определяют механические свойства тканей. Закономерно, что подобная структурная и химическая неоднородность приводит к анизотропии механических свойств, что означает, что их упругие свойства зависят от направления.

Недавние исследования подчеркнули растущее значение механических свойств клеток и тканей для правильного выполнения физиологических функций внутри организма, а их изменения потенциально могут привести к различным заболеваниям, таким как сердечно-сосудистые [28], метаболические [29], нейродегенеративные заболевания [30] и различного рода воспаления [31-37]. Поэтому, исследование реологических свойств клеток и тканей как в физиологических, так и в патологических условиях не только имеет потенциал для использования этих свойств в качестве маркеров заболеваний, но также способствует развитию методик исследования механической чувствительности биологических материалов.

Из-за широкого спектра механического поведения, демонстрируемого такими объектами как клетки и ткани, одного метода может быть недостаточно для определения их упругих характеристик. Для количественного определения механических свойств мягких биологических сред применяются классические методы статических испытаний на растяжение и сжатие, или динамических испытаний на ударную прочность и

усталость. Из реакции образца на статическую или динамическую нагрузку с применением моделей механики сплошных сред находят значения механических характеристик образца, например, модуль Юнга. Однако, эти методики накладывают ограничение на размер и жесткость измеряемых объектов, а также требуют сохранения целостности материала в ходе измерений. По этой причине в настоящее время все активнее разрабатываются и используются методики, которые различаются пространственным и временным разрешением [38]. Получение информации на микро- или наномасштабе могут не всегда точно отражать механические свойства на макроскопическом уровне, что может быть проблемой при изучении тканей или органов большого размера. Биологические ткани часто неоднородны по своему составу и структуре, что может привести к вариабельности результатов при измерениях. Также статические методы могут не улавливать динамические изменения клеток и тканей, которые могут меняться во времени под воздействием физиологических или патологических процессов или от изменения окружающей среды (температура, влажность, pH). Некоторые методы требуют контакта с образцом, что может повлиять на его механические свойства, поэтому бесконтактные методы исследований являются более предпочтительными с точки зрения сохранения целостности образца.

#### **п.1.2.2. Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для характеристики упругих свойств материалов**

Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна получила широкое распространение с момента ее первой демонстрации в биологии [39] более десяти лет назад, включая исследование внутриклеточной биомеханики в целых живых клетках [4, 40-43] и организмов [44], анализ фазовых переходов типа жидкость-твердое тело в отдельных субклеточных структурах [41, 45-47], а также биомеханическую оценку тканей и костей [48-53], 3D-картирование биомеханики тканей глаза как *ex vivo* (вне организма) [1-2], так и *in vivo* (в естественных условиях) [3]. В последние годы спектроскопия РМБ стала популярной методикой исследования вязкоупругих свойств материалов в приложении не только для решения фундаментальных биофизических задач, но и для медицинских задач [1, 17-22]. Зачастую многие исследования направлены на определение значения и/или изменения упругого модуля, определяемого спектроскопией

Мандельштама-Бриллюэна, а также поиск связи между продольным модулем упругости и квазистатическим модулем Юнга [4, 6-7].

Несмотря на эти достижения, данная методика также имеет определенные ограничения, которые необходимо учитывать. Чтобы правильно определить действительную и мнимую части продольного модуля, необходимо знание локального показателя преломления и плотности материала. Поскольку такие измерения экспериментально трудно выполнить *in situ* (на месте), это часто указывается как внутреннее ограничение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Также недавно Р.-J. Wu и др. [8] обратили внимание на влияние водной компоненты в высокогидратированных материалах, таких как гидрогели, на спектр РМБ, в частности на реальную часть продольного модуля. Они отметили, что в таких материалах корреляции продольного упругого модуля с модулем Юнга нет. Это свидетельствует о некорректности прямой интерпретации сдвига рассеяния Мандельштама-Бриллюэна исключительно в терминах «жесткости» материала, и обуславливает необходимость поиска подхода для интерпретации параметров спектра РМБ с структурными и механическими процессами.

Хотя во многих работах и отмечают существование феноменологической корреляции между этими модулями [5-6], она должна быть установлена путем тщательной калибровки и в зависимости от образца. Кроме того, необходимо учитывать вклад водной компоненты, которая является неотъемлемой частью биологических образцов, и этот факт необходимо учитывать при биологической интерпретации результатов, полученных с помощью спектроскопии Мандельштама-Бриллюэна. Следствием этого стал не только повышенный интерес к методике в области биомедицинских исследований, но также послужило причиной дискуссий, касающихся интерпретации измеряемых физических величин и их связи с вкладом отдельных компонентов, особенностями структуры и присутствием воды.

### **§ 1.3. Водные растворы солей из лиотропного ряда Гофмейстера**

К биологически значимым материалам также могут быть отнесены вода и водные растворы, поскольку вода составляет основу тканей и организмов и участвует в их жизнедеятельности, по сути, большинство биохимических процессов сводится к химическим реакциям в водном растворе. Несмотря на большое количество

исследований, посвященных свойствам воды и ее растворов, всё еще остаются нерешенные вопросы в этой области. Одним из них является изучение влияния растворенных в воде ионов на свойства водных растворов. Добавление солей к воде приводит к существенным изменениям ее термодинамических свойств. Поскольку вода является основным компонентом клеток и организмов и служит средой для многих биохимических реакций, характеристики водного раствора оказывают колоссальное влияние на свойства биомолекул, в частности, на свойства белков.

### п.1.3.1. Эффекты высаливания белков из водных растворов

Эффекты стабилизации или дестабилизации белка в водном растворе были первоначально определены чешским фармакологом Францем Гофмейстером [54] в экспериментах по «засолению» (повышению растворимости) и «высаливанию» (агрегации и осаждения) альбумина (яичного белка) в растворах электролитов в 1888 году. Целью этих экспериментов являлось выявление особенностей влияния солей на различные физиологические процессы. Ф. Гофмейстер определил наименьшие концентрации соли, вызывающие помутнение раствора альбумина, и составил ряд ионов, расположив их по мере убывания высаливающей способности. Таким образом был сформирован лиотропный ряд Гофмейстера, который представлен на рисунке 1.3 [55].

В результате большого внимания научного сообщества к исследованию лиотропных рядов было установлено, что влияние анионов значительно сильнее, чем у катионов. Ионы были разделены по характеру влияния на хаотропы (разрушители структуры, 1962 год) [56] и космотропы (создатели структуры, 1985 год) [57]. Космотропы за счет сильного взаимодействия с водой воздействуют на гидратные оболочки вокруг молекул белка, снижая их растворимость (процесс высаливания). В свою очередь хаотропы способны повышать растворимость белков в водных растворах при низких концентрациях с последующей денатурацией при повышении концентрации соли.

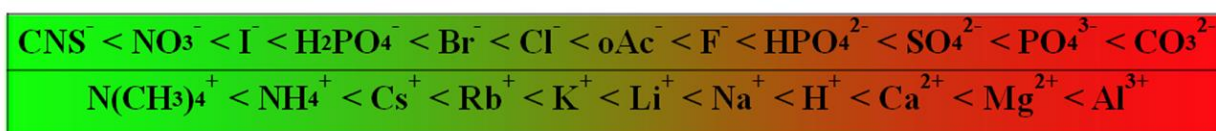


Рис.1.3. Ряд Гофмейстера: хаотропы (слева) и космотропы (справа) в приблизительном порядке силы.

Явлению воздействия солей на стабилизацию или дестабилизацию белка в водном растворе было предложено несколько объяснений. Одно из них основано на прямом взаимодействии растворенных ионов с биомолекулами, в то время как согласно более поздним теориям добавленные в воду ионы влияют на стабильность белков посредством модификаций водородных связей воды [58]. Несмотря на интенсивные исследования [59-70], направленные на интерпретацию ряда Гофмейстера с точки зрения масштабов длин взаимодействия растворенного вещества и растворителя, структурного перехода порядок/беспорядок [69-72], ионной специфичности [70-71], механизм взаимодействия соли и растворителя остается пока неясным.

### **п.1.3.2. Уравнение Джонса-Доула - изменения вязкости растворов с концентрацией растворенного вещества**

Механизм влияния добавленных в воду ионов на водородные связи обусловлен следующим. Известно, что молекула воды ( $H_2O$ ) состоит из одного атома кислорода (O) и двух атомов водорода (H), связанных ковалентными связями. В целом молекула воды электронейтральна, однако, из-за разницы в электроотрицательности между кислородом и водородом, электронные облака в связях O-H смещены к кислороду. Это делает атом кислорода частично отрицательно заряженным, а атомы водорода – частично положительно заряженными. Водородные связи образуются, когда положительно заряженный атом водорода одной молекулы воды притягивается к отрицательно заряженному атому кислорода другой молекулы воды. Таким образом, каждая молекула воды может участвовать в образовании четырех водородных связей, в двух из которых она является донором протона (атомы водорода), а в двух других выступает в роли акцептора протона (атом кислорода).

В жидком состоянии структуры водородных связей неупорядочены и конфигурации ближайшего окружения у всех молекул воды различны. Эти структуры являются нестабильными и могут изменяться. Добавленные в воду ионы способны влиять на своё ближайшее окружение, приводя к «созданию» (космотропы) или «разрушению» (хаотропы) водородных связей воды. Косвенное подтверждение этой гипотезы проявляется в экспериментах по измерению вязкости раствора.

При добавлении соли вязкость водного раствора меняется довольно сильно с концентрацией растворенного вещества и может быть описана уравнением Джонса-Доула (1.29) [9].

$$\eta/\eta_0 = 1 + Ac^{1/2} + B_{JD}c \dots, \quad (1.29)$$

где  $c$  – это концентрация соли,  $\eta$  представляет собой вязкость раствора;  $\eta_0$  - вязкость воды; коэффициент  $A$  характеризует ион-ионное взаимодействие и может быть вычислен с помощью уравнения Фалькенхаген-Вернона [75];  $B_{JD}$ -коэффициент характеризует взаимодействие между ионами соли и молекулами воды.

Эта формула справедлива для водных растворов солей низких концентраций [( $<0,5$  моль/л) или ( $<0,1$  моль/л для бинарных сильных электролитов)]. Для больших концентраций нужно также учитывать коэффициенты разложения при больших степенях  $c$ . Согласно имеющимся исследованиям, добавление космотропных ионов приводит к повышению вязкости раствора, что отражается в положительных коэффициентах  $B_{JD}$  для космотропных солей, в то время как для хаотропов  $B_{JD}$ -коэффициент имеет отрицательное значение. Этот факт находится в соответствии с тем предположением, что космотропы структурируют сетку водородных связей воды, а хаотропы разупорядочивают её. Таким образом, коэффициент  $B_{JD}$  может быть рассмотрен как количественная мера космотропности и хаотропности ионов. Однако методы оптической спектроскопии позволяют взглянуть на этот процесс на микроскопическом уровне. Комбинационное рассеяние света чувствительно к изменению сетки водородных связей (через полосу валентных ОН-колебаний), а РМБ отражает изменение скорости и затухания гиперзвуковых фононов, распространяющихся по этой водородной сетке. Установление связи между коэффициентами Джонса-Доула и параметрами оптических спектров является важной задачей.

### **п.1.3.3. Влияние растворенных ионов солей на характеристики водного раствора**

Несмотря на многочисленные исследования влияний ионов на молекулы воды, до сих пор детально не ясен механизм их взаимодействия. Множество работ указывают на то, что растворенные ионы влияют на структуру воды внутри первой сольватационной оболочки диссоциирующих ионов, но не на водородные связи окружающих молекул

жидкости. Недавние исследования показали [76], что этот эффект может распространяться также за пределы первого гидратного слоя, но всё же он локализован на небольших расстояниях вокруг ионов. Таким образом, до сих пор нет общепринятой теории, которая могла бы детально объяснить механизм взаимодействия растворенного вещества и растворителя. В связи с этим, не смотря на долгую историю, исследованию проблемы серии Гофмейстера и в настоящее время уделяется повышенное внимание.

Влияние растворенных в воде солей на структурные особенности водородной сетки исследовалось с использованием различных экспериментальных методов, таких как МД-моделирование [77], инфракрасная спектроскопия [78], спектроскопия комбинационного рассеяния света [79], ядерно-магнитный резонанс (ЯМР-спектроскопия) [80], фотоэлектронная спектроскопия [81]. Поскольку эксперименты по измерению вязкости водных растворов показали наличие эффектов различного влияния ионов на сетку водородных связей воды, ожидаемо, что указанные явления успешно могут быть изучены также и методом спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.

Водные растворы имеют большое значение для развития направления биофизических исследований методом спектроскопии РМБ, поскольку вода сильно влияет на гигагерцовые фононы клеток [82-83]. В работе S. V. Adichtchev и др. [84] спектроскопия РМБ была применена для характеристики вязкости биорелевантных растворов. Было обнаружено, что частоты фононов рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в водных растворах биорелевантных молекул в большинстве случаев демонстрируют универсальную концентрационную зависимость. Однако, концентрационные зависимости глицина и триглицина отклоняются от этой тенденции, что было объяснено различиями в структуре их гидратационного слоя. Исследование водных растворов солей серии Гофмейстера методом РМБ способно пролить свет на проблему взаимосвязи между сдвигом частоты рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и структурой воды вокруг растворенного вещества. Дополнительным методом характеристики влияния ионов на ОН-связи воды может служить спектроскопия комбинационного рассеяния света, которая успешно продемонстрировала свою применимость к исследованию солей лиотропного ряда [59, 79, 85-86]. Как правило, в подобных исследованиях влияние анионов и катионов рассматривается независимо: соли с одинаковым анионом и различными катионами или соли с одинаковым катионом и различными анионами. Комплексное исследование лиотропного ряда Гофмейстера методами оптической спектроскопии будет отличаться

новизной и иметь актуальное значение для более глубокого понимания не только обсуждаемой проблемы взаимодействия ионов с структурой водородной сети воды, но и интерпретации спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в материалах, где большую роль играет вода.

## § 1.4. Фосфолипидные мембраны

Важную роль в жизнедеятельности клеток играет плазматическая мембрана, которая преимущественно состоит из фосфолипидных молекул. Фосфолипиды представляют собой сложные липиды, состоящие из полярной головной группы атомов (глицерин или другой многоатомный спирт) и неполярных «хвостов», образованных остатками насыщенных/ненасыщенных жирных кислот. Главная особенность этих молекул состоит в том, что их «головка» гидрофильна, а «хвосты» гидрофобны, это позволяет им в присутствии воды образовывать двойной слой, как показано на рисунке 1.4.

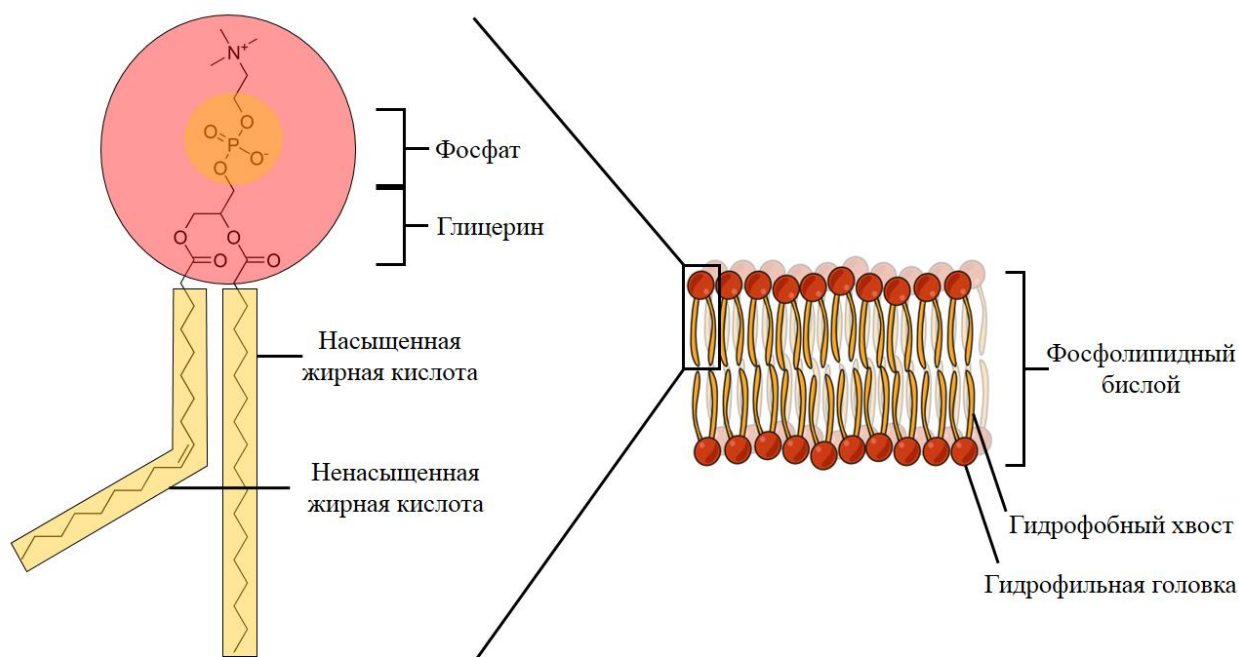


Рис.1.4. Молекула фосфолипида (слева) и фосфолипидный бислой (справа).

### п.1.4.1. Фосфатидилхолины. Насыщенные/ненасыщенные фосфолипиды и температура фазового перехода

Липидный бислой является структурной основой биологических мембран. Наиболее распространёнными фосфолипидами клеточных мембран считаются

фосфатидилхолины [87], поэтому именно они чаще всего становятся основой модельных мембран.

Фосфолипидные молекулы чувствительны к изменениям температуры. При повышении температуры фосфолипиды могут перейти из состояния геля, когда их углеводородные хвосты упорядочены, в разупорядоченное состояние флюида, схематическое описание этого процесса представлено на рисунке 1.5. Температура перехода ( $T_m$ ) из гелевого состояния во флюидное зависит от вида фосфолипидной молекулы и является важной характеристикой бислоя.

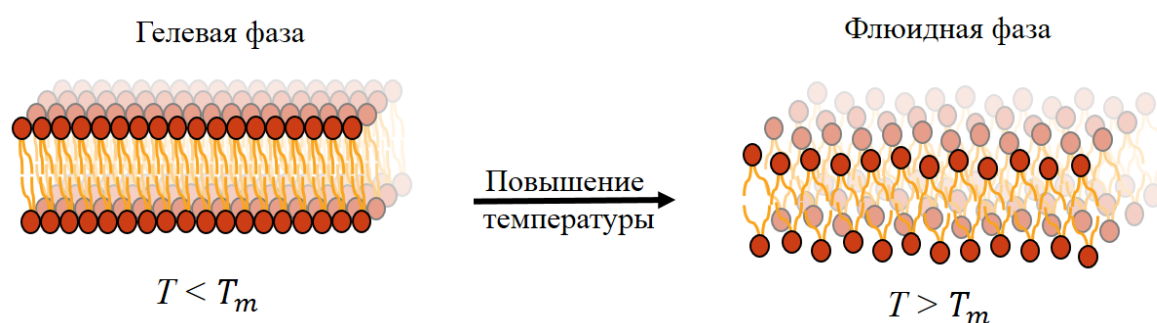


Рис.1.5. Состояния геля и флюида липидного бислоя.

В процессах транспорта и перестройки мембраны большую роль играет степень насыщенности фосфолипидных хвостов. Цепочки жирных кислот в хвостах липидов могут отличаться как по длине, так и по степени насыщенности (по наличию двойной связи  $C=C$ ). Если атомы углерода в углеводородной цепочке соединяются одинарными связями, то такой фосфолипид называется насыщенным, а если хвосты содержат одну или несколько двойных  $C=C$  связей, то липид называется ненасыщенным (рис.1.4). Ненасыщенные жирные кислоты в хвостах изогнуты из-за наличия двойной связи, поэтому липидные молекулы с насыщенными хвостами могут упаковываться плотнее друг к другу.

#### **п.1.4.2. Методы исследования фосфолипидных систем. Важность исследования фосфолипидов в широком диапазоне температур**

Фосфолипидные бислои с их уникальными структурами и свойствами являются не только интересными объектами химической физики, но и широко изучаются в качестве моделей биомембран и биосовместимых контейнеров для доставки лекарств и генов. Характерные размеры липидного бислоя составляют около 5 нм, для получения информации о его структуре, упаковке, форме и размере применяются различные

экспериментальные методы: рентгеновское излучение и рассеяние нейтронов [88-95], электронная микроскопия [96-98], спектроскопия резонансного переноса энергии Форстера [97, 99-100], атомно-силовая микроскопия [101-104]. Помимо структуры липидного бислоя некоторые методы направлены на исследование распределения веществ в мембране и определение кинетики проникновения веществ через нее в диффузионных процессах, как например метод ядерного магнитного резонанса [105-111]. Некоторые методы характеризуют релаксационные/транспортные или упругие реакции, такие методики как электронный спиновый резонанс [112-115], метод фотолюминесценции [116-119], неупругое рассеяние нейтронов [120-122], механические характеристики [123-125], а также инфракрасная спектроскопия [126-128] и спектроскопия комбинационного рассеяния света [126, 129-131].

Одной из важнейших характеристик липидных систем является ее фазовое состояние. Для определения температуры фазового перехода и энтальпии липидных систем применяют дифференциальную сканирующую калориметрию [14]. Другой распространённый метод, позволяющий оценить, как фазовое состояние бислоя, так и конформации углеводородных цепей, является спектроскопия комбинационного рассеяния света [14, 132].

При температурах около 20–40 °С большинство природных липидных мембран находятся в жидкокристаллическом (флюидном) состоянии, которое обеспечивает необходимую подвижность и проницаемость для функционирования мембранных белков и транспортных систем, поэтому большая часть работ по исследованию гидратированных фосфолипидных бислоев проведена в диапазоне температур выше 0°С. Проведение исследований фосфолипидных мембран в широком диапазоне температур, включая криогенные, важно не только для развития фундаментальных представлений о природе фазовых переходов, но также и для понимания процессов сохранения живых клеток при криоконсервации. Понимание структурно-динамических изменений липидных мембран при низких температурах является ключевым для разработки эффективных протоколов криоконсервации клеток, тканей и эмбрионов. Именно в процессе замораживания и последующего отогрева мембраны подвергаются наибольшему риску, начиная от фазовых переходов и перестройки липидной упаковки и заканчивая образованием внутрикристаллического льда и осмотическими повреждениями.

Некоторые исследования фосфолипидных мембран, проведенные в низкотемпературных условиях, методами электронного спинового резонанса [133-134] и рассеяния нейтронов [135] указывают на то, что некоторые релаксационные степени свободы возбуждаются даже в твердоупорядоченной (гелевой) фазе, несмотря на ее общее описание как полностью упорядоченного состояния. Более того, исследования с помощью спектроскопии КРС в широком диапазоне температур однозначно приводят к выводу, что даже значительно ниже уровня перехода гель-жидкость некоторые молекулы фосфолипидов находятся в конформационно неупорядоченном состоянии, как это имеет место в случае неупорядоченной жидкой фазы [136-137]. Наличие экспериментальных данных, включая криогенные, может стать источником дополнительной информации, необходимой для более глубокого понимания процессов, протекающих внутри фосфолипидных слоев при заморозке и криоконсервации. Тем не менее, в настоящее время все еще недостаточно данных о липидных бислоях в таком широком температурном диапазоне. Проблемы криоконсервации и последующего выживания клетки или эмбриона напрямую зависят от изменений липидных оболочек в процессе замораживания или размораживания биоматериала. Важно не только сохранить мембрану целостной, но и сохранить ее функциональные свойства.

Несмотря на то, что липидный бислой представляет собой достаточно жесткий каркас, что имеет важное значение для поддержания формы клеточных структур и отделения клетки от внешней среды, мембраны клеток являются гибкими и эластичными, сохраняя целостность клетки при умеренных механических нагрузках и нарушениях осмотического равновесия между клеткой и окружающей средой. Для количественного определения механических свойств мягких биологических сред применяются классические методы статических испытаний на растяжение и сжатие, или динамических испытаний на ударную прочность и усталость. Из реакции образца на статическую или динамическую нагрузку с применением моделей механики физики сплошных сред находят конкретные значения механических характеристик образца, например, модуль Юнга. Исследование механических свойств классическими методами на фосфолипидной мембране является сложной задачей, требующей точности и сохранения целостности материала в ходе измерений. Толщина мембраны составляет всего ~4–5 нм, а площадь образцов зачастую не превышает десятков квадратных микрометров, что делает прямое механическое тестирование чрезвычайно сложным.

По этой причине в настоящее время все активнее разрабатываются и используются бесконтактные методики. Одним из наиболее распространённых подходов является анализ упругого отклика мембраны на контролируемые внешние воздействия (например, гидродинамическое течение, осмотический стресс или приложенное давление). В работах [138-140] с помощью таких методов были определены модуль упругости при растяжении и модуль изгиба для различных липидных составов. Также развиваются электрические методы, основанные на измерении ёмкости и проводимости мембран в присутствии переменного электрического поля. В работах [141-142] методом электроформации гигантских униламиллярных везикул в сочетании с электродеформацией определяли модуль изгиба бислоев. Не менее важной для понимания взаимодействия мембранных белков и липидного бислоя является упругость при сжатии, которая характеризует сопротивление мембраны изменению толщины под действием внешнего давления или встраивания белковых доменов [143-144]. Несмотря на успешность перечисленных подходов, все они обладают определёнными ограничениями, например, требуют сложной подготовки образцов (гигантские везикулы или свободно стоящие бислои) и чувствительны к электролитам в окружающем растворе. Для измерения продольного модуля упругости в гигагерцовом диапазоне частот применяется спектроскопия рассеяния Мандельштама–Бриллюэна. Этот метод основан на неупругом рассеянии света на тепловых акустических фононах (гиперзвуковых волнах) в среде, что позволяет бесконтактно и неинвазивно определять продольный модуль упругости (или скорость звука) без какого-либо механического воздействия на образец. Именно бесконтактность и неинвазивность метода рассеяния Мандельштама–Бриллюэна служат причиной всё большего числа его применений к биологическим объектам [18, 145] и клеткам [4, 146-147], включая фосфолипидные мембраны (п.1.3.3).

#### **п.1.4.3. Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию фосфолипидов**

До недавнего времени применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к фосфолипидным двойным слоям было ограничено лишь несколькими работами в диапазоне температур выше 0 °С [10-12]. Наибольшее внимание в этих исследованиях направлено на изучение влияния степени насыщенности водой (гидратации) на свойства фосфолипидов, в частности на температуру фазового перехода

гель-флюид. Как правило, к рассматриваемым простым моно- или двухкомпонентным модельным системам липидов добавлялся холестерин или иные агенты с целью лучшего моделирования мембран клеток. При этом основной интерес проводимых исследований был ограничен областью комнатной температуры и температурным интервалом вблизи фазового перехода гель-флюид.

В широком диапазоне температур методом РМБ было проведено несколько исследований. В работе [14] в диапазоне температур от  $-190^{\circ}\text{C}$  до  $70^{\circ}\text{C}$  был исследован насыщенный фосфолипид 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), в структурной организации многослойной везикулы (схематично приведена на рис.1.5), в зависимости от степени гидратации. В результате работы авторы показали схожее температурное поведение скорости звука до  $-25^{\circ}\text{C}$  для образцов с разным содержанием воды и корреляцию изменения полученных зависимостей со степенью гидратации при более высоких температурах. Было обнаружено, что температурные зависимости скорости звука претерпевают скачок при температуре фазового перехода гель-флюид (для DPPC составляет  $42^{\circ}\text{C}$ ), а амплитуда этого скачка зависит от степени гидратации образца. Кроме того, было установлено, что температурная зависимость липидных бислоев продолжает изменяться внутри гелевой фазы при низких температурах, причем эти изменения значительно превышают скачок при переходе гель-флюид  $T_m$ . Полученный результат аномального поведения свойств липидной системы DPPC внутри гелевой фазы, полученный в работе [14], согласуется с данными комбинационного рассеяния света [137]. Обычно считается, что ниже температуры перехода гель-флюид фосфолипид должен находиться в упорядоченном гелевом состоянии и, следовательно, свойства бислоя не должны изменяться. Последние исследования [14, 137] указывают на то, что даже ниже температуры перехода гель-флюид часть молекул фосфолипидов находится в конформационно-неупорядоченном состоянии, и процессы упорядочения продолжают происходить вплоть до очень низких температур. По этой причине при исследовании липидных систем важно изучать не только влияние состава на свойства мембран, но также и их характеристики при низких температурах.

Как правило, объектами исследования липидных систем является водная суспензия многослойных везикул, схематично представлена на рис.1.6а. Однако у данной структурной организации фосфолипидных бислоев есть ряд недостатков. В частности, большой вклад воды в составе суспензии затрудняет исследования при низких

температурах из-за образования льда, который может нарушать целостность мембраны и вносит вклад в спектр РМБ. Кроме того, бислоем является анизотропной средой, и вклады в упругий отклик от разных направлений относительно бислоя могут различаться. Работая же с суспензией везикул, невозможно разделить вклады от различных направлений. Применение планарных систем позволяет решить эти проблемы, как благодаря отсутствию избыточной воды в образце, так и путем независимого измерения латерального направления (вдоль слоев) и ортогонально к ним, схематично приведены на рис.1.6б.

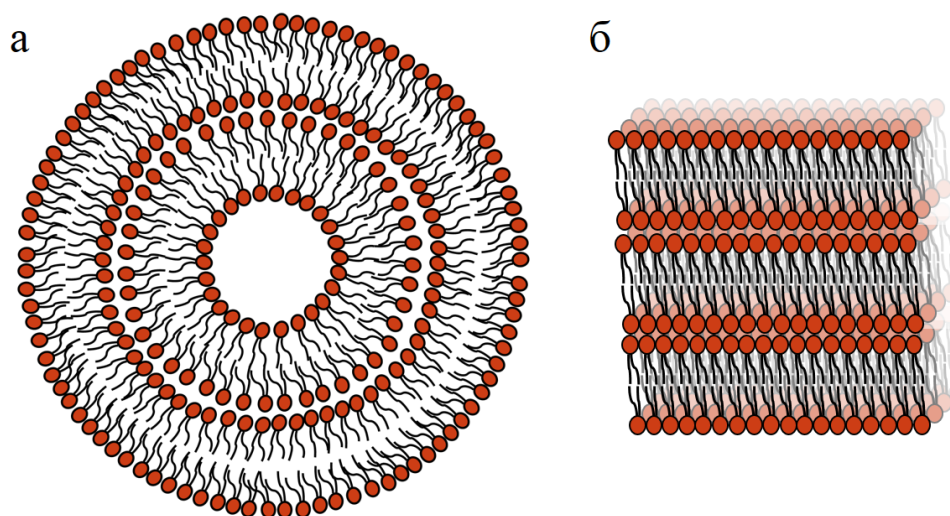
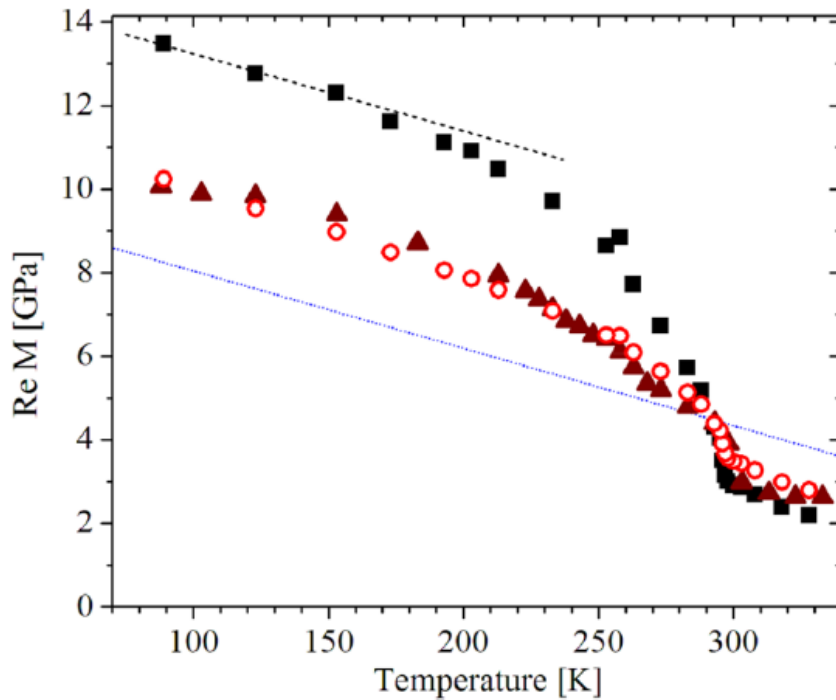


Рис.1.6. Везикулы (а) и упорядоченные планарные слои (б) фосфолипидов.

В недавней работе [148] были проведены температурные исследования везикул, а также гидратированных и дегидратированных планарных образцов насыщенного фосфолипида димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) от 90 до 333 К. Результаты исследования демонстрируют влияние на гигагерцовую скорость звука следующих параметров: фазовый переход, степень гидратации, структурная организация бислоя (упорядоченные планарные слои или везикулы). Скорость звука гидратированных образцов DMPC показала значительные изменения, вызванные температурой, в твердоподобном состоянии геля как для везикулярных образцов, аналогично DPPC из [14], так и для планарных систем. В работе этот эффект объяснили температурно-индуцированными возбуждениями неупорядоченных конформационных состояний углеводородных цепей из данных комбинационного рассеяния света [137], а также ангармоническими эффектами. При сравнении температурной зависимости упругого модуля планарного образца с результатами для везикулярного было обнаружено, что

индуцированные температурой изменения в плоских бислоях были сильнее, чем для везикул, как показано на рисунке 1.7.

Липидный бислой представляет собой анизотропную среду, механические свойства которой существенно различаются в латеральном (вдоль слоя липидов) и ортогональном направлениях. В суспензиях многослойных везикул направления бислоев распределены хаотично по отношению к волновому вектору регистрируемых фононов, что приводит к усреднению упругого отклика. Переход к упорядоченным планарным системам в сочетании с выбором оптической геометрии эксперимента позволяет селективно возбуждать и регистрировать фононы, распространяющиеся строго вдоль или поперек липидных слоев, тем самым можно исследовать упругую анизотропию мембраны.



*Рис.1.7. Температурные зависимости упругого модуля для гидратированных плоских образцов (квадраты) и суспензий везикул (треугольники – эксперимент; круги - теория).*

*Синей пунктирной линией показано предсказание упругого модуля в латеральном направлении. Рисунок заимствован из [148].*

Полученная в работе зависимость для плоского образца характеризует упругие свойства ортогональные к бислоям липидов. Разница для планарных и везикулярных образцов была объяснена из предположения о том, что результат для случая везикул является суммой вклада от поперечного (ортогонально к слоям) и продольного (вдоль

слоев) направлений. На основании этого в работе была выдвинута гипотеза о слабой температурной зависимости упругого модуля в латеральном направлении, которая на рисунке 1.7 представлена синей пунктирной линией.

Несмотря на многообразие существующих исследований фосфолипидных мембран, для расширения возможностей применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию липидных систем существует несколько актуальных вопросов. Одним из ключевых вопросов является универсальность наблюдаемой зависимости, является ли это особенностью только насыщенного фосфолипида. Другим не менее важным вопросом является определение характера температурной зависимости латеральной скорости звука, будет ли она слабо зависимой от температуры или линейной. Можно ли считать общим правилом корреляцию скорости звука с долей молекул в основной (полностью транс-) конформации [148]? В чем разница между низкотемпературными и высокотемпературными скоростями звука для насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов? Решения этих задач важны для понимания взаимосвязи между гигагерцовым модулем упругости и молекулярная и мезоскопическая структура фосфолипидных бислоев, между модулем упругости и релаксационными степенями свободы (ангармонизм). А также для понимания взаимосвязи между гигагерцовым модулем упругости и молекулярной и конформационной структурой фосфолипидных бислоев. Решение этих задач планируется в рамках диссертационного исследования.

### **§ 1.5. Белковые системы и биологические ткани**

Белки состоят из 20 основных аминокислот, множество комбинаций которых определяет большое разнообразие белковых молекул с различными функциями. Существуют 4 уровня структурной организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная [149]. Начальная последовательность аминокислотных остатков, соединенных в цепь, называется первичной структурой белка. Когда полипептидная нить начинает локально упорядочиваться с образованием водородных связей, то говорят о вторичной структуре белка. Самые распространённые типы вторичной структуры выделяют  $\alpha$ -спирали,  $\beta$  – листы,  $\pi$  – спирали, 3-спирали и неупорядоченные фрагменты. Вторичные структуры далее сворачиваются, что приводит к образованию структуры более высокого порядка, а именно, третичной структуры, которая стабилизируется

главным образом водородными связями, электростатическими взаимодействиями, гидрофобными взаимодействиями и взаимодействиями Ван-дер-Ваальса. По форме обычно белки разделяют на фибриллярные (нитевидные) и глобулярные (шарообразные). При взаимодействии нескольких полипептидных цепей образуются белковые комплексы, которые являются четвертичной структурной организацией белка.

Морфологические различия белков определяют их свойства и напрямую связаны с их функциями, среди которых преобладают фибриллярные (коллаген, эластин) и глобулярные (ферменты, рецепторы). Глобулярные белки обладают высокой растворимостью, поскольку на поверхности белковой молекулы расположены преимущественно полярные (гидрофильные) аминокислоты, а неполярные (гидрофобные) аминокислоты скрыты в ядре белка. Фибриллярные белки, такие как коллаген и эластин, составляют основу биологических тканей живых организмов, они являются механически прочными и химически неактивными белками. Однако, белки в ткани выстраиваются в сложную иерархическую структуру по-разному, в зависимости от типа ткани. Именно из-за важности коллагенсодержащих тканей, активно применяются и исследуются возможности различных методик для изучения структуры тканей, их свойств и воздействия заболеваний, а также разработки имплантов на основе фибриллярных белков.

#### **п.1.5.1. Исследование упругих свойств биологических тканей**

Ткани на основе коллагена и эластина являются важнейшими компонентами многих живых организмов, включая человека. Важность этих тканей стимулирует изучение их механических свойств, структуры, поиск взаимосвязей между свойствами тканей и заболеваниями, а также разработку биоимплантатов на основе волокнистых белков. Механические свойства коллагеновых и эластиновых тканей определяются сложностью их архитектуры [150], включающей различные уровни организации, от индивидуальных белковых нитей до сложных межмолекулярных сетей и крупных морфологических образований. Такая многослойная структура создает значительные сложности при определении соответствующих механических характеристик, требуя специальных методов анализа, количественной оценки и описания многомасштабной механики материала.

Существует несколько экспериментальных возможностей для определения механики волокнистых тканей на микроскопическом уровне. К ним относятся дифракция рентгеновских лучей [151], которая применяется для определения кристаллической структуры и ориентации белковых молекул, позволяя выявить степень организации и направленность коллагеновых волокон; метод MEMS [152] используются для тестирования малых объемов ткани, например, отдельных фрагментов или тонких срезов, с возможностью оценки упругости и устойчивости к нагрузке; атомно-силовая микроскопия позволяет получать изображение поверхностей и измерять жесткость отдельных волокон и клеток, обеспечивая высокое разрешение на микро- и наноуровнях.

На макроскопическом уровне для изучения механических свойств материалов в лабораторных условиях применяются реологические тесты. Реология занимается исследованием поведения вещества под воздействием сил деформирования и течения, таким образом, давая возможность оценить важные физические характеристики материала, такие как вязкость, упругость и пластичность. В медицинском тестировании преимплантационных тканей применяют так называемый Stress-Strain Test [153-154]. Квазистатические механические испытания на растяжение заключается в деформировании образца (растягивании) с постоянной скоростью и одновременной регистрации прикладываемого усилия (силы). Типичные кривые напряжение-деформация демонстрируют характерные стадии, как упругий отклик (образец быстро восстанавливает форму после снятия нагрузки), неупругое поведение (образец частично сохраняет остаточную деформацию), прочность на разрыв (разрыв образца при достижении максимальной нагрузки). Механический параметр, полученный из такого теста, включает расчет модуля Юнга ( $E$ ), который описывает отношение напряжения к относительной деформации в пределах упругой зоны.

Механические испытания тканей позволили понять, как состав и организация сетей в определенных тканях обеспечивают необходимые механические свойства. Однако данные методы определения механических характеристик ткани являются инвазивными и/или разрушающими методами, что стимулирует развитие бесконтактных и неинвазивных экспериментальных методов характеристики упругих свойств тканей *in vivo*. Среди новых методов, предлагающих альтернативу классическим методикам, выделяется спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.

### **п.1.5.2. Перспектива применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию тканей**

Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна использует неупругое рассеяние света акустическими фононами и обладает преимуществами оптической спектроскопии; она бесконтактна и неинвазивна и может характеризовать материал с микронным пространственным разрешением. В последнее десятилетие спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна активно применяется к биологическим объектам, включая ткани [1, 17-22, 155-156]. Однако возможности и ограничения метода при применении к тканям еще до конца не изучены.

Многие исследования направлены на определение значения и/или изменения упругого модуля, определяемого спектроскопией РМБ, а также поиск связи между продольным модулем упругости и квазистатическим модулем Юнга. В известных работах [4, 6, 48] огромное внимание направлено на выявление перспективы определения модуля Юнга клеток и гидрогелей на основании данных эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. На основании результатов сравнения данных РМБ с данными атомно-силовой микроскопии и реологических тестов, авторы работ делают вывод об изменении модуля упругости за счет различного содержания биополимера, полимеризации и объемного соотношения жидкости и твердого вещества в таких высокогидратированных объектах. В этих публикациях измерения с помощью метода РМБ рассматривались как показатель жесткости.

Ранее метод спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна применялся к образцам гидратированного бычьего перикарда, включая нативный и сшитые образцы, пригодные для применения в кардиохирургии [7]. Продольный гигагерцовый модуль и модуль Юнга были определены в экспериментах на основе спектров РМБ и при одноосном растяжении, соответственно. Было обнаружено, что оба модуля упругости в ткани, сшитой ультрафиолетовым излучением, были выше, чем в нативных образцах и образцах, фиксированных глутаровым альдегидом. По результатам работы был сделан вывод о том, что спектроскопия РМБ может предложить неинвазивную альтернативу для определения биомеханики тканей и обеспечить потенциал для постоянного анализа во время лечения.

Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна продемонстрировала возможность разделения вкладов белков с различными упругими характеристиками

высушенной ткани яремной вены крупного рогатого скота [157]. В данном случае спектр РМБ высушенных образцов вен включал отчетливые линии рассеяния, интерпретируемые как вклад эластиновых и коллагеновых волокон. Хотя исследование высушенных образцов является своего рода деструктивным (инвазивным) тестом, данные спектроскопии РМБ высушенных образцов могут предоставить дополнительную информацию об упругой реакции и структурной организации белкового каркаса.

В связи с результатами работ [7, 157] возникает несколько вопросов: Можно ли наблюдать отчетливые пики рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в областях эластина и коллагена в увлажненных тканях? Существует ли однозначное соответствие между продольным модулем упругости, полученным по данным спектроскопии РМБ, и модулем Юнга, полученным в результате испытаний на растяжение, позволяющее сделать вывод о преимуществах спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, как это было сделано в [7]?

### **п.1.5.3. Проблема влияния воды на спектр РМБ гидратированных материалов**

В области применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна как метода оптической эластографии научные мнения разделились. Информация, содержащаяся в спектрах РМБ, до сих пор остается предметом дискуссий из-за фундаментальных проблем в понимании роли воды в биомеханике и связи данных РМБ с низкочастотными макроскопическими механическими параметрами. Как уже отмечалось, с одной стороны, спектроскопия РМБ позволяет характеризовать биомеханику тканей сопоставимо с данными реологических тестов, а сама методика может служить неинвазивной альтернативой к характеристике упругих свойств тканей.

Однако, с другой стороны, в работах [8, 158] ставится под сомнение применение спектроскопии РМБ к характеристике упругих свойств высокогидратированных материалов. P. Sassi и др. [158] исследовали растворы глобулярных белков в процессе гелеобразования. Однако данные для белковых растворов слабо отличались от результатов РМБ для чистой воды. P.-J. Wu и др. [8] применили спектроскопию РМБ к гидрогелям полиэтиленоксида (PEO) и полиакриламида (РА). При рассмотрении всех данных авторами не было выявлено четкой взаимосвязи между продольным модулем упругости ( $M$ ) и модулем Юнга ( $E$ ). В обеих работах уделяют особое внимание влиянию

водной компоненты на спектр РМБ высокогидратированных материалов и предостерегают от прямого применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в качестве оптической биоэластографии. Это говорит о том, что на результаты измерений рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, применяемых к биологическим тканям, может аналогичным образом влиять содержание воды, хотя различия в гидратации между тканями и роли связанной воды могут иметь дополнительные последствия и необходимы дальнейшие исследования факторов, влияющих на изменение спектра Мандельштама-Бриллюэна биологических материалов.

Модуль Юнга ( $E$ ) и модуль ( $M$ ), определяемый методом спектроскопии РМБ, могут быть выражены через объемный модуль ( $K$ ) и модуль сдвига ( $G$ ). В то время как модуль Юнга пропорционален модулю сдвига через соотношение (1.27):  $E = 9KG/(3K+G)$ , модуль  $M$  определяется как сумма объемного и сдвигового модулей (1.28):  $M = K + 4G/3$ . Изменение модуля упругости при сдвиге изменяется иначе, чем объемный модуль, что приводит к различному изменению  $E$  и  $M$ . Поскольку мягкие биологические ткани содержат большое количество воды, они являются практически несжимаемыми. Для таких сред объемный модуль на несколько порядков превышает сдвиговой ( $K \gg G$ ). В результате продольный модуль  $M \approx K$  определяется преимущественно гидратацией, в то время как модуль Юнга  $E \approx 3G$  характеризует сдвиговую жесткость структурного каркаса. Именно это фундаментальное различие лежит в основе проблемы корректной интерпретации данных спектроскопии РМБ для определения упругих свойств высокогидратированных материалов.

Возникает принципиальный вопрос: изменится ли регистрируемый модуль  $M$ , если многократно изменить модуль Юнга при неизменной гидратации и химическом составе материала? Экспериментальный ответ на этот вопрос позволил бы адекватно оценить возможность применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию биомеханики высокогидратированных материалов.

## § 1.6. Заключение к Главе 1

Проведенный обзор литературы показывает, что спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (РМБ) является мощным бесконтактным и неинвазивным оптическим методом исследования вязкоупругих свойств конденсированных сред в гигагерцовом диапазоне частот. В последнее десятилетие метод РМБ приобрел высокую

популярность в области механобиологии. Однако, несмотря на активное расширение областей применения, фундаментальная интерпретация спектров РМБ для сложных биологических систем остается предметом научных дискуссий. Корректное применение метода к высокогидратированным материалам требует решения ряда конкретных физических и методических задач:

1. Определение влияние ионов на структуру водородной сети воды. Для понимания роли растворителя требуется установить взаимосвязь между акустическими параметрами спектров РМБ, структурными изменениями водородной сетки (влияние ионов ряда Гофмейстера) и коэффициентами макроскопической вязкости.

2. Описание анизотропии и фазового поведения фосфолипидных мембран. Для оценки упругой анизотропии бислоев необходим переход от исследований суспензий везикул к планарным системам. Также актуально изучение связи скорости звука с конформационной структурой липидов в широком температурном диапазоне, включая низкотемпературную гелевую фазу.

3. Исследование проблемы влияния водной компоненты на спектр РМБ для упругого модуля высокогидратированных материалов. Необходимо выяснить, чувствителен ли регистрируемый продольный модуль упругости ( $M$ ), определяемый в биологических тканях преимущественно сжимаемостью воды, к изменениям жесткости (модуля Юнга  $E$ ) материала при неизменной гидратации.

Таким образом, для корректной интерпретации результатов спектроскопии РМБ в механобиологии необходимо последовательное и комплексное изучение влияния воды на акустические свойства биоматериалов разного уровня организации: от простых ионных растворов к модельным липидным мембранам, белковым структурам и реальным биологическим тканям. Необходимость решения описанных проблем определяет цель и задачи настоящего диссертационного исследования

## ЦЕЛЬ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна дает информацию о вязкоупругих свойствах материалов, в частности о скорости звука и величине упругого модуля в гигагерцовом диапазоне. Вследствие ее бесконтактности и неинвазивности, данная методика неупругого рассеяния света перспективна для исследования биологически значимых материалов, включая биорелевантные растворы, липиды и белки. Целью настоящей диссертационной работы является исследование возможностей и развитие спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для характеристики биологически значимых материалов, включая водные растворы солей, липиды и белки. Работа направлена на установление взаимосвязей между гигагерцовым продольным модулем упругости и механическими свойствами материала, его молекулярной структурой. Для достижения поставленной цели в ходе диссертационного исследования будут решаться следующие задачи:

1. Установление зависимости между положением ионов в ряде Гофмейстера и параметрами спектра РМБ, а также выявление влияния ионов на полосу валентных ОН-колебаний в спектрах комбинационного рассеяния света. Для этого рассматривается большая группа солей, ионы которых располагаются в различных частях ряда Гофмейстера:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCNS}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ .

2. Исследование температурных изменений параметров спектра РМБ планарных слоев фосфолипидов в гидратированном состоянии в широком диапазоне температур от 90 до 320 К в зависимости от степени насыщенности углеводородных хвостов (насыщенные фосфолипиды DMPC, DPPC, ненасыщенный фосфолипид DOPC), состава (смеси фосфолипидов DPPC/DOPC, смеси с холестерином), а также сравнение спектров РМБ модельных систем и выделенных мембран эритроцитов.

3. Применение спектроскопии РМБ для исследования упругого отклика тканей бычьей яремной вены и перикарда на разных стадиях преимплантационной обработки. Определение взаимосвязи между продольным гигагерцовым модулем, определяемым из спектров РМБ, и модулем Юнга, полученным из механических испытаний на растяжение.

4. Определение влияния на спектр РМБ структурных изменений высокогидратированных материалов, которые приводят к увеличению модуля Юнга и происходят при неизменном уровне гидратации и химическом составе, на примере

герметично запечатанного яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина.

## **ГЛАВА 2. Техника эксперимента по спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

В данной главе описаны теория рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, принцип работы и характеристики классических спектральных приборов, которые используются для регистрации РМБ, приведена оптическая схема для экспериментальных исследований, а также продемонстрированы возможности использования различных геометрий рассеяния при исследовании планарных образцов спектроскопией РМБ.

### **§ 2.1. Интерферометр Фабри-Перо**

Скорость распространения звуковых волн в конденсированной среде составляет порядка нескольких км/с, что соответствует гигагерцовому частотному диапазону для возбуждающей линии видимого диапазона. Для получения низкочастотных спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, как правило, используют интерферометр Фабри-Перо, который обладает высокой разрешающей способностью и позволяет получать спектры вблизи линии возбуждения.

Классический интерферометр Фабри-Перо представляет собой две стеклянные или кварцевые пластины, установленных строго параллельно друг другу. Внутренние поверхности пластин обработаны с высокой степенью точности и покрыты высокоотражающим слоем (серебро, алюминий, многослойные диэлектрические покрытия). Принцип работы интерферометра Фабри – Перо состоит в разбиении первичной плоской волны вследствие многократных отражений на пластинах интерферометра на последовательность вторичных волн и последующую интерференцию между ними [159]. Данный процесс схематично приведен на рисунке 2.1. Расстояние между зеркалами задается величиной  $d$ , показатель преломления среды между ними  $n$ .

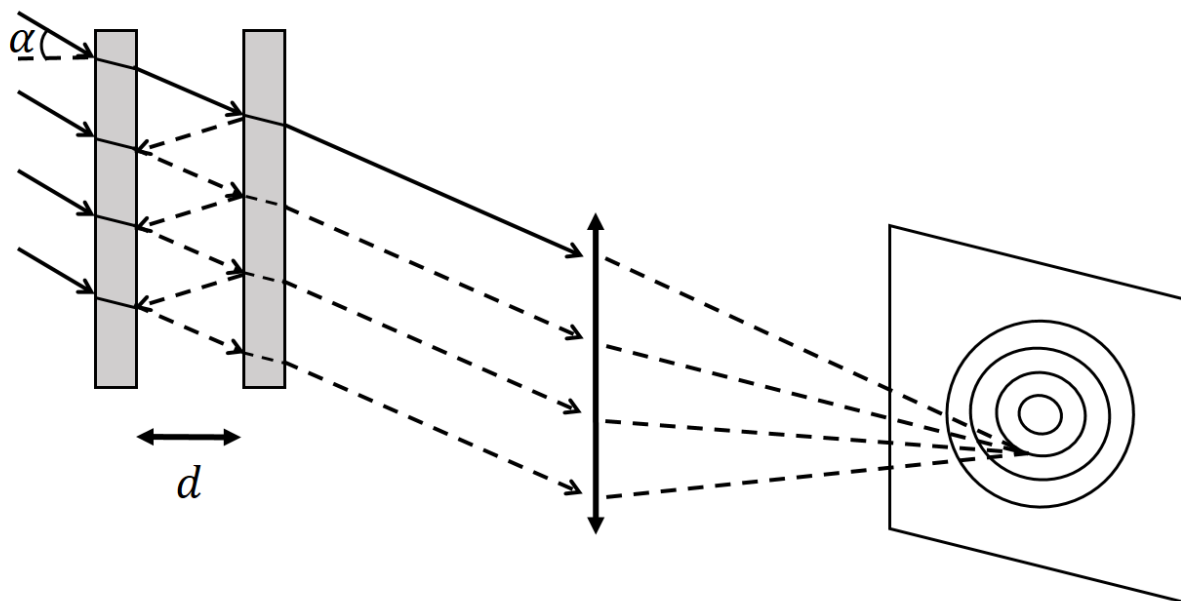


Рис.2.1. Образование интерференционной картины с помощью эталона Фабри-Перо.

Параллельный пучок, сформированный монохроматическим излучением (лазером) с длиной волны  $\lambda$  попадает в интерферометр через первую пластину под углом  $\alpha$ . Небольшая часть излучения ( $\sim 5\%$ ) выходит из интерферометра при достижении второй пластины, а большая часть излучения отражается. Вследствие такого частичного отражения, стартовое излучение разделяется на два пучка – выходящий из интерферометра и отраженный. В результате многократных отражений между зеркалами параллельны пучки, вышедшие из интерферометра, конструктивно интерферируют друг с другом, в результате чего в фокальной плоскости объектива появляется интерференционная картина.

Максимум интерференции соответствует целому числу длин волн и принимает вид:

$$2dn \cos(\alpha) = m\lambda, \quad (2.1)$$

а минимум:

$$2dn \cos(\alpha) = \left(m + \frac{1}{2}\right)\lambda, \quad (2.2)$$

где  $m$  – порядок интерференции.

При заданном расстоянии  $d$  интерферометр будет передавать только определенные длины волн  $\lambda$ , определенные по формуле:

$$T = \frac{\tau_0}{1 + (4F^2/\pi^2)\sin^2(2\pi d/\lambda)}, \quad (2.3)$$

где  $\tau_0$  – максимальное значение пропускания, определяемое потерями в системе, а  $F$  (finesse) – разрешающая способность. Уравнение (2.3) показывает, что проходят только те длины волн, которые удовлетворяют условию (2.4).

$$d = \frac{1}{2} m\lambda \quad (2.4)$$

На рис.2.2 представлена функция пропускания интерферометра Фабри-Перо для соседних порядков длин волн.

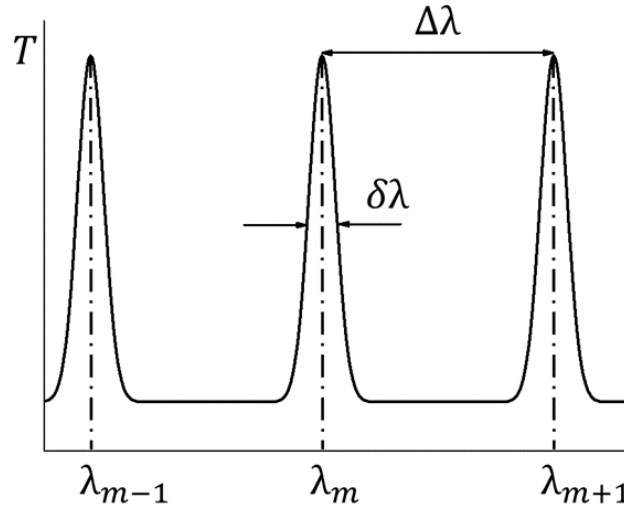


Рис.2.2. Функция пропускания интерферометра Фабри-Перо от длины.

В интерференционной картине происходит наложение спектров соседних порядков. Расстояние между двумя соседними максимумами пропускания по длинам волн для данного  $d$  называется свободным спектральным диапазоном ( $FSR_\lambda = \Delta\lambda$ ). Условие наложения спектров соседних порядков с  $\lambda$  и  $\lambda - \Delta\lambda$  имеет вид:  $m\lambda = (m + 1)(\lambda - \Delta\lambda)$ . Откуда:

$$FSR_\lambda = \frac{\lambda}{m} = \frac{\lambda^2}{2d n \cos(\alpha)} \quad (2.5)$$

Разрешающая способность  $F$  зависит от расстояния между последовательно передаваемыми длинами волн  $\Delta\lambda$  ( $FSR$ ) и ширины данного пика пропускания  $\delta\lambda$  через:

$$F = \frac{\Delta\lambda}{\delta\lambda} \quad (2.6)$$

Таким образом, исследуемый спектр должен полностью лежать в пределах диапазона длин волн  $\Delta\lambda$ . Согласно условию (2.5) можно сделать спектральный диапазон больше, уменьшая  $d$ , однако,  $\delta\lambda$  будет увеличиваться пропорционально  $\Delta\lambda$  и, таким образом, разрешение уменьшается.

Для сканирования интерферометра необходимо выполнить условие интерференции (2.1) для разных длин волн. В соответствии с этим уравнением это можно

осуществить либо за счет изменения показателя преломления  $n$  между зеркалами (изменяя давление среды внутри интерферометра), либо меняя расстояние между зеркалами  $d$ . Во втором случае важным моментом является контроль строгой параллельности зеркал необходимый для эффективной работы прибора. В данной работе эксперименты были проведены на спектрометре TFP-1 (JRS Scientific Instruments), где реализована тандемная система из двух интерферометров Фабри-Перо, разработанного Дж. Р. Сандеркоком [160-161].

## § 2.2. Тандем интерферометров Фабри-Перо

### п.2.2.1. Тандемная система интерферометров Фабри-Перо

В спектрометре TFP-1 (JRS Scientific Instruments) используется система двух последовательно установленных интерферометров Фабри-Перо, которая приведена на рисунке 2.3. Интерферометры Фабри – Перо FP1 и FP2 установлены последовательно на пути пучка рассеянного излучения под углом  $\varphi$ , в результате чего они имеют различающиеся расстояния между зеркалами (базы интерферометра)  $d$  и  $d\cos(\varphi)$ , соответственно.

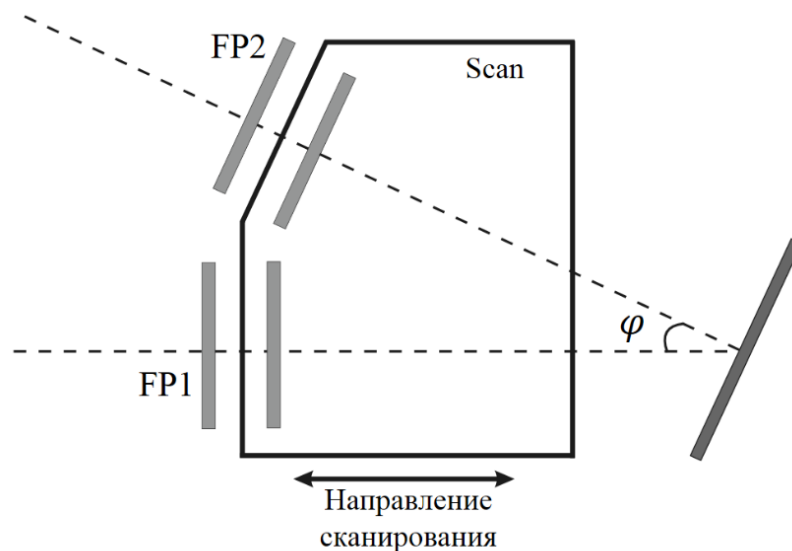


Рис.2.3. Тандемная система сканирования интерферометров Фабри-Перо (FP1 и FP2) в спектрометре TFP-1 (JRS Scientific Instruments).  $\varphi$  – угол между оптическими путями интерферометров.

Таким образом, для двух интерферометров будет различаться свободный спектральный диапазон, т.е. максимумы функции пропускания более высоких порядков интерференции подавят друг друга, как показано на рис.2.4. В случае TFP-1 угол между

оптическими путями интерферометров составляет  $\cos(\varphi)=0.95$ . Для указанного значения гашение максимумов в результирующей интерференционной картине будет наблюдаться вплоть до двадцатого порядка интерференции.

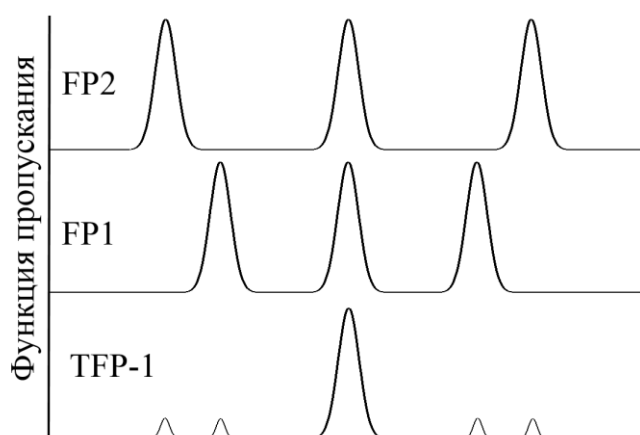


Рис.2.4. Функция пропускания тандема интерферометров Фабри-Перо.

Для реализации синхронного сканирования FP1 и FP2 одно из зеркал каждого интерферометра располагается на подвижной пластине Scan, которая изменяет расстояние между зеркалами с помощью пьезо-подвижек. Сканирование осуществляется в направлении перпендикулярном первому интерферометру FP1, как показано на рис.2.3. При такой конструкции движение платформы приводит к изменению базы FP1 на величину  $\delta d$ , а, вследствие несоосного расположения интерферометров, расстояние между зеркалами FP2 меняется на величину  $\delta d \cos(\varphi)$ . Следовательно, выполняется условие синхронности сканирования ( $\delta d_1 / \delta d_2 = d_1 / d_2$ ). В цикле сканирования достаточно смещения платформы на несколько микрометров.

### п.2.2.2. Принцип работы спектрометра TFP-1

Рассмотрим оптическую схему и принцип работы тандема интерферометров TFP-1, которая приведена на рис.2.5. Рассеянное на исследуемом образце излучение фокусируется на входную диафрагму P1, размер которой варьируется от 150 до 1000 микрометров в зависимости от используемой базы интерферометра. Далее, после прохода через апертуру A1, определяющую необходимый угол сбора рассеянного света в спектрометр, начинается первое прохождение излучения через тандем. После отражения от зеркала M1 из зашедшего в спектрометр излучения линзой L1 формируется параллельный пучок, направляемый зеркалом M2 на первый интерферометр FP1. Затем вышедшее из FP1 излучение, пройдя через первое из трех отверстий маски A2 (красный

цвет на рис. 2.4), направляется зеркалом M3 на второй интерферометр FP2, после прохождения которого сколлимированный световой пучок нормально падает на уголкового отражателя Pr1 и, несколько сместившись по вертикали относительно своей первоначальной траектории, отражается в обратном направлении. На этом заканчивается первый проход света через тандем.

При втором проходе спектрометра отраженное от призмы излучение возвращается параллельно своему первоначальному направлению на FP2 и далее, пройдя через второе отверстие маски A2 (синий цвет), попадает на первый интерферометр. После прохождения через FP1 свет фокусируется линзой L1 на зеркало M4. Поскольку отраженный от призмы свет возвращается несколько ниже первоначального пути, сфокусированный пучок проходит под зеркалом M1 и не отражается от него. Комбинация линзы L1 и зеркала M4, лежащего в ее фокальной плоскости, служит пространственным фильтром, отсекающим пучки, отраженные от задних частей интерферометров.

После отражения от зеркала M4 начинается третий проход излучения через оптическую систему тандема. Пройдя через интерферометры и третье отверстие в апертуре A2 (зеленый цвет), свет отражается зеркалом M5 на призму Pr2. Зеркало M6 направляет пучок на выходную диафрагму и является юстируемым при изменении длины волны используемого лазера. Вышедшее из тандема излучение регистрируется лавинным фотодиодом и обрабатывается многоканальным анализатором на 1024 канала. Дальнейшая обработка выполняется компьютерным программным обеспечением.

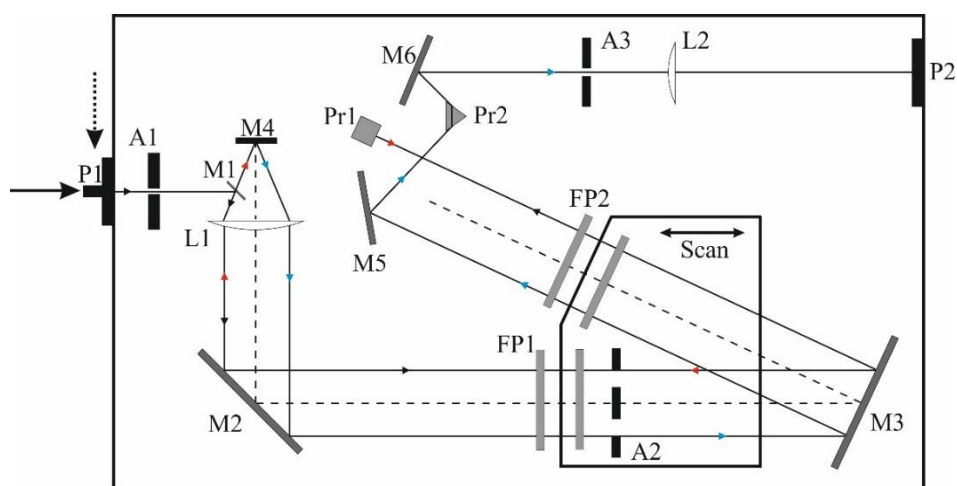


Рис.2.5. Тандем интерферометров Фабри-Перо: A1-3 – отверстия; M1-6 – зеркала; L1-2 – линза; Pr1-2 – призма; P1 и P2 – вход и выход, соответственно; FP1-2 – интерферометры Фабри-Перо. Пунктирной стрелкой указан канал для опорного (референсного) сигнала, а сплошной стрелкой указан канал для полезного сигнала (рассеянного от образца излучения).

После каждого цикла сканирования происходит проверка и настройка параллельности зеркал каждого интерферометра. Для этого системой используется постоянное лазерное излучение (опорный сигнал) на рисунке 2.4 указано пунктирной стрелкой, поступающее в спектрометр через отдельный канал. Затем производится сравнение текущего значения интенсивности опорного сигнала с его значением в начальный момент измерений, на основании этого делается вывод о необходимости дополнительной автоматической юстировки. Юстировка параллельности зеркал интерферометров FP1 и FP2 производится путем настройки неподвижных зеркал с использованием трех пьезо-подвижек, регулирующих наклон зеркала в двух направлениях. Благодаря этому удается достигнуть высокой разрешающей способности и высокого контраста прибора, что позволяет измерять слабые сигналы вблизи интенсивной упругой линии.

Опорное излучение дает несмещенную центральную линию лазерного излучения в спектр РМБ, поэтому для в ходе сканирования тандема используется механический затвор, который периодически перекрывает входную диафрагму, в этот момент открывается второй затвор опорного пучка для подстройки спектрометра.

Согласно формуле (2.5) область свободной дисперсии интерферометра определяется расстоянием между зеркалами. Для спектрометра TFP-1, как правило, используются расстояния между зеркалами в диапазоне от 0.1 мм до 20 мм, что позволяет регистрировать спектры РМБ в диапазоне от 0.3 ГГц до 1000 ГГц. При регистрации сигналов вблизи упругой линии порядка единиц гигагерц используется большая база интерферометров. Ограничение на максимальное значение базы интерферометра связано с тем, что стабильность работы и сохранение юстировки прибора в ходе сканирования сильно зависят от расстояния между зеркалами. На больших базах системе сложно сохранять параллельность зеркал в ходе работы, и интерферометры теряют юстировку.

### **п.2.2.3. Настройка спектрометра TFP-1**

Первоначальная настройка спектрометра включает согласование двух интерферометров FP1 и FP2 независимо. Для этого в схему интегрируются светоделительные пластины так, чтобы свет проходил через светоделитель на первый интерферометр FP1, затем отраженный свет проходил через вторую светоделительную пластину на FP2, откуда дважды отраженный луч направляется на фотоумножитель, как

показано на рис.2.6а. Интенсивность отраженного излучения стремится к нулю, поэтому в непрерывном режиме минимальное значение достигается при оптимальной настройке интерферометра. В регистрируемом сигнале появятся две серии, состоящие из трех провалов, которые соответствуют нулевому и первому порядку интерференции каждого интерферометра (рис.2.6б). Настройка параллельности зеркал интерферометров приведет к увеличению провалов в регистрируемом сигнале (рис.2.6в). Затем, изменяя относительное расстояние между интерферометрами ( $d - d\cos(\varphi)$ ), обеспечиваем совпадение пары пиков, т.е. согласование двух интерферометров. Таким образом, предварительная настройка спектрометра будет завершена.

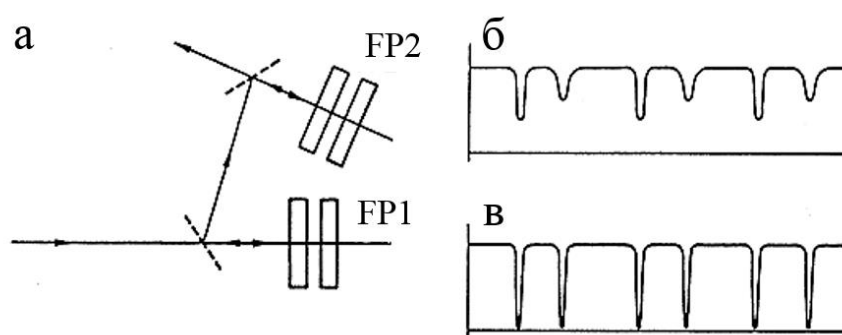


Рис.2.6. (а) Схема для независимой настройки интерферометров FP1 и FP2; (б) интенсивность отражения для двух неидеально выровненных интерферометров; (в) интенсивность после правильной настройки, но до согласования интерферометров.

Регистрация спектров рассеяния Мандельштама–Бриллюэна осуществлялась с помощью программного комплекса GHOST, разработанного для управления тандемным интерферометром Фабри–Перо TFP-1. Оцифрованный сигнал с фотодетектора записывается в виде массива данных, состоящего из 1024 точек (каналов), равномерно распределённых по одному порядку интерференции. Поскольку сканирование зазора интерферометра осуществляется с помощью пьезоэлементов, связь между номером канала  $k$  (от 1 до 1024) и относительным спектральным положением является линейной. Для перевода полученных спектров в шкалу частот (сдвигов относительно линии возбуждения) используется соотношение:

$$\Delta\nu(k) = (k - k_0) \cdot \delta, \quad (2.7)$$

где  $k_0$  – номер канала, соответствующий максимуму упруго рассеянного излучения (лазерная линия), а  $\delta$  – калибровочный коэффициент, имеющий размерность частоты на канал. Величина  $\delta$  определяется свободной спектральной областью (FSR) интерферометра:

$$\delta = \frac{FSR}{N} \quad (2.8)$$

Значение FSR устанавливается в процессе юстировки прибора и выбора базы  $d$ . Поскольку между зеркалами интерферометров находится воздух ( $n = 1$ ) и при условии нормального падения излучения, выражение (2.5) в частотных единицах принимает вид:

$$FSR_{\nu} = \frac{c}{2d} \text{ [Гц]} \quad 1 \quad (2.9)$$

где  $c$  – скорость света в вакууме ( $3 \cdot 10^8$  м/с).

В ходе обработки нулевой канал выбирался автоматически по максимуму интенсивности, после чего линейно пересчитывались положения стоксовых и антистоксовых компонент относительно него.

Таким образом, конечный спектр представлял собой зависимость относительной интенсивности в условных единицах от частотного сдвига (ГГц). Для повышения отношения сигнал/шум запись производилась многократно (от 50 до нескольких тысяч сканов) с последующим сложением. Количество сканов зависит от уровня сигнала образца.

### § 2.3. Описание экспериментальной установки

Экспериментальная установка, включающая в себя 3+3-тандем интерферометров Фабри-Перо (JRS Scientific Instruments), приведена на рисунке 2.7. В качестве источника излучения использовался одномодовый твердотельный лазер с длиной волны  $\lambda = 532.1$  нм. Как показано на рисунке, лазерное излучение делится на два луча, проходя через стеклянную пластину. Малая часть излучения, отражаясь от зеркала M1, направляется через референсный (опорный) канал в спектрометр, где используется для подстройки интерферометров FP1 и FP2 в ходе сканирования. Основная часть излучения (сигнальный луч) проходит через фильтр на основе эталона Фабри-Перо для чистки лазерного пучка, подробнее описано в [162].

В случае эксперимента рассеяния назад излучение, отражаясь от зеркала M2, направляется по каналу BS, представленном на рис.2.7. После отражения от призмы P1 свет фокусируется линзой L1 ( $\varnothing 25$  mm,  $f = 150$  mm) на образец. Этой же линзой формируется параллельный пучок из рассеянного от образца излучения в обратном направлении. Далее излучение, сфокусированное второй линзой L2 ( $\varnothing 25$  mm,  $f = 400$  mm), направляется в спектрометр через диафрагму (пинхол) P1 с использованием двух

перископических зеркал M3 и M4. Дальнейший ход излучения внутри спектрометра подробно описан в параграфе 2.2.

Переход от геометрии BS к 90°-каналу рассеяния осуществляется путем извлечения зеркала M2 из оптической схемы. В этом случае свет, отражаясь от зеркала M5, фокусируется на образец линзой L3 ( $\varnothing 25 \text{ mm}$ ,  $f = 150 \text{ mm}$ ). Рассеянный от образца свет собирается линзой L1 и далее заводится в спектрометр по тому же оптическому пути, что и для канала BS.

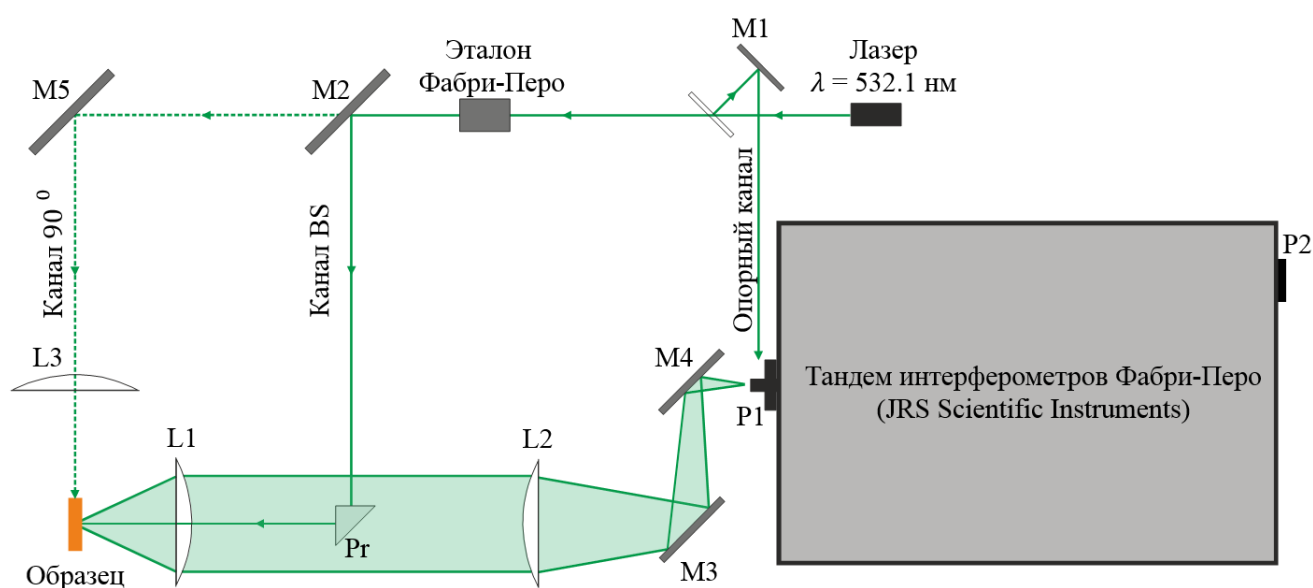


Рис.2.7. Схема экспериментальной установки рассеяния Манделъштама-Бриллюэна: M1-5 – зеркала; L1-3 – линзы; Pr - призма; P1-2 – пинхол спектрометра.

Данная оптическая схема позволяет получать спектры РМБ образца в геометрии обратного рассеяния света через канал BS или спектры РМБ в геометриях рассеяния 90A и 90R через канал 90°. Подробнее особенности и возможности различных геометрий рассеяния описаны в параграфе 2.4.

## § 2.4. Возможности различных геометрий рассеяния при исследовании планарных образцов

Следствием линейного закона дисперсии и формулы (1.2) можно выразить взаимосвязь положения компонент дублета Манделъштама-Бриллюэна  $\Delta\omega$  со скоростью звука в веществе  $v_c$ :

$$\Delta\omega = 2n \frac{v_c}{c} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \Omega, \quad (2.10)$$

где  $c$  - скорость света;  $\theta$  - угол рассеяния;  $\Omega$  - частота лазерного излучения;  $n$  – показатель преломления.

Согласно формуле (2.10) сдвиг частоты линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна зависит от угла между волновыми векторами падающего и рассеянного излучения. При изменении угла рассеяния спектр РМБ будет характеризовать фононы, распространяющиеся в другом направлении. Стандартные геометрии рассеяния приведены на рисунке 2.8.

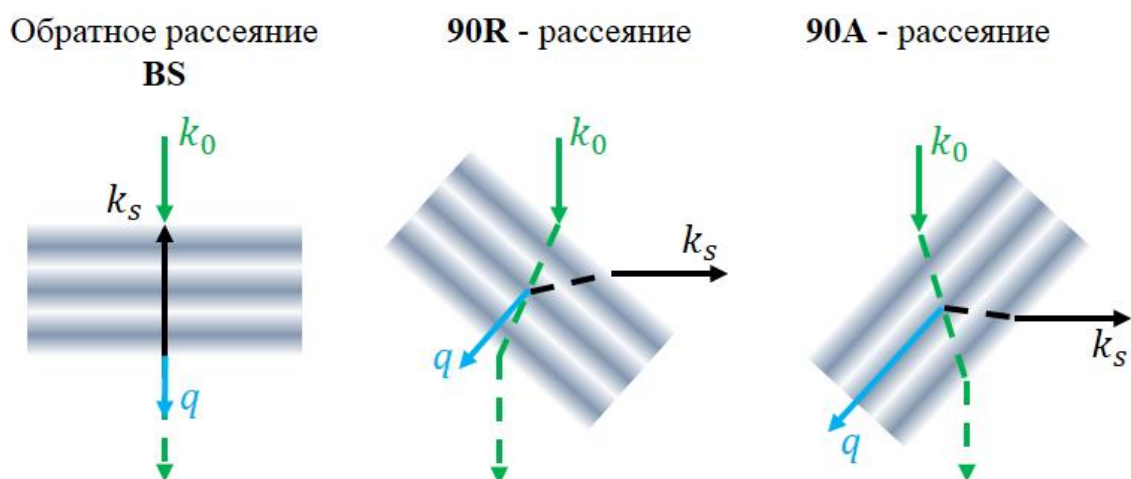


Рис.2.8. Стандартные геометрии рассеяния BS, 90R, 90A: сигнальный луч  $k_0$  (отмечен зеленым цветом),  $k_s$  – волновой вектор рассеяния (выделен черным);  $q = k_0 - k_s$  – волновой вектор фононов (показан голубым цветом).

В случае изотропной среды скорости звука во всех направлениях будут на одинаковой частоте. Однако, при исследовании анизотропного материала спектры РМБ различных геометрий рассеяния будут характеризовать скорости звука, соответственно и упругий модуль, в разном направлении.

Рассмотрим на примере слоистой структуры, представленной на рисунке 2.8. В геометриях BS и 90R в спектр рассеянного света дают вклад фононы (волновой вектор фононов  $q$ ), распространяющиеся перпендикулярно к слоям, следовательно, спектры РМБ в этих геометриях несут информацию об упругих свойствах в ортогональном к слоям направлении. Исследование скорости звука и упругого модуля вдоль слоев возможно с применением геометрии рассеяния 90A, при которой в неупругое рассеяние света вносят вклад фононы, направленные вдоль слоев (латеральные фононы).

Значения скоростей звука для различных геометрий рассеяния могут быть определены из позиций линий Мандельштама-Бриллюэна согласно формулам (2.11-2.13), полученным из (2.10):

$$v_{BS} = \frac{\Delta\omega\lambda_0}{2n} \quad (2.11)$$

$$v_{90R} = \frac{\Delta\omega\lambda_0}{\sqrt{4n^2-2}} \quad (2.12)$$

$$v_{90A} = \frac{\Delta\omega\lambda_0}{\sqrt{2}} \quad (2.13)$$

В формуле (2.13) для пересчета скорости звука в геометрии рассеяния 90А отсутствует зависимость от показателя преломления среды. Следовательно, эта оптическая геометрия удобна при исследовании биологических и полимерных мембран, так как позволяет напрямую определять латеральную скорость звука  $v_{90A}$  без необходимости отдельного измерения локального показателя преломления образца.

### ГЛАВА 3. Водные растворы солей из лиотропного ряда Гофмейстера

На стабильность белков в водном растворе оказывают влияние ионы солей посредством модификаций водородных связей. В зависимости от характера влияния ионов их разделили на космотропы, создающие структурный порядок, и хаотропы, разрушающие структуру, косвенное подтверждение различного влияния ионов на сетку водородных связей проявляется в экспериментах по измерению вязкости раствора. Параметром, часто используемым в качестве количественной меры способности к структурообразованию/разрушению, является коэффициент В Джонса–Доула ( $B_{JD}$ ), который описывает линейный член в концентрационной зависимости макроскопической вязкости  $\eta$  раствора (1.29). Хотя коэффициент  $B_{JD}$  Джонса–Доула часто используется в качестве маркера структурообразования/разрушения ( $B_{JD} > 0$  для структурообразующих частиц и  $B_{JD} < 0$  для структуроразрушающих частиц), его описание, интерпретация и даже связь с параметрами структурообразования/разрушения недостаточно хорошо изучены.

С целью более глубокого понимания проблемы взаимосвязи между параметрами спектров рассеяния Мандельштама–Бриллюэна и структурой воды было проведено исследование водных растворов солей из лиотропного ряда Гофмейстера. Методы спектроскопии рассеяния Мандельштама–Бриллюэна и комбинационного рассеяния света способны помочь в понимании воздействия ионов на водородные связи воды на различных пространственных масштабах. В данной главе описаны корреляции между коэффициентом вязкости Джонса–Доула  $B_{JD}$  и параметрами спектров РМБ, связанными с действительной и мнимой частями модуля упругости (скоростью звука и релаксацией, соответственно), а также поляризованными и деполаризованными спектрами КРС, отражающими тетраэдрическую структуру водородной сети и длины водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$ , соответственно.

#### § 3.1. Проведение эксперимента на водных растворах солей при комнатной температуре

##### п.3.1.1. Изготовление образцов

Для приготовления водных растворов использовались порошки химически чистых солей [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCNS}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CuCl}_2$ ], ионы которых лежат в различных областях ряда Гофмейстера, как

представлено на рис.1.3. Соли смешивали с дистиллированной водой при комнатной температуре, таким образом получали растворы в диапазоне весовых концентраций до 20% (в диапазоне молярной концентрации до 4,5 моль/л). Взвешивание происходило на электронных весах при комнатной температуре с точностью до 0.1 мг. Растворы помещались в стеклянную кювету высокого оптического качества и запечатывали парафином, с целью предотвращения испарения воды в ходе эксперимента.

### **п.3.1.2. Определение показателя преломления**

Показатель преломления  $n$  измерялся с помощью рефрактометра ИРФ-454 Б2М для всех исследуемых растворов. Принцип действия рефрактометра основан на явлении полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления. Измерения были проведены при включенном осветителе в проходящем через прозрачную исследуемую среду свете. Перед началом измерений были проведены подготовительные процедуры. Прежде всего, после внесения рефрактометра в помещение его необходимо выдержать в течение суток для установления теплового равновесия. Коррекция шкалы прибора производилась на основе воды по таблице значений показателя преломления при комнатной температуре (при 23°C показатель преломления воды – 1,3327).

При работе с жидкостями на чистую поверхность измерительной призмы было нанесено две-три капли исследуемого раствора. Затем опускалась осветительная призма и прижималась застёжкой. После установки исследуемого образца на измерительной призме наводили окуляр на отчетливую видимость перекрестия. Поворотом зеркала была достигнута наилучшая освещенность шкалы, и при наблюдении в окуляр маховиком граница светотени была выставлена точно на перекрестие и по шкале показателей преломления было получено значение коэффициента  $n$ . Цена деления шкалы -  $5 \cdot 10^{-4}$ .

На рис.3.1 представлены зависимости показателя преломления  $n$  водных растворов солей как функция концентрации. Концентрационные зависимости показателя преломления для всех солей описывались выражением  $n = n_0 + \Delta n * c$ , где  $c$  – молярная концентрация, а  $n_0 = 1.327$  – показатель преломления воды при комнатной температуре. Параметр  $\Delta n$ , найденный в результате подгонки, представлен в таблице 1 в параграфе 3.4. Согласно формуле (2.11) из позиции линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна ( $\Delta\omega_{BS}$ )

и показателя преломления ( $n$ ) может быть определено значение скорости звука. Это было сделано для водных растворов всех солей, исследованных в работе.

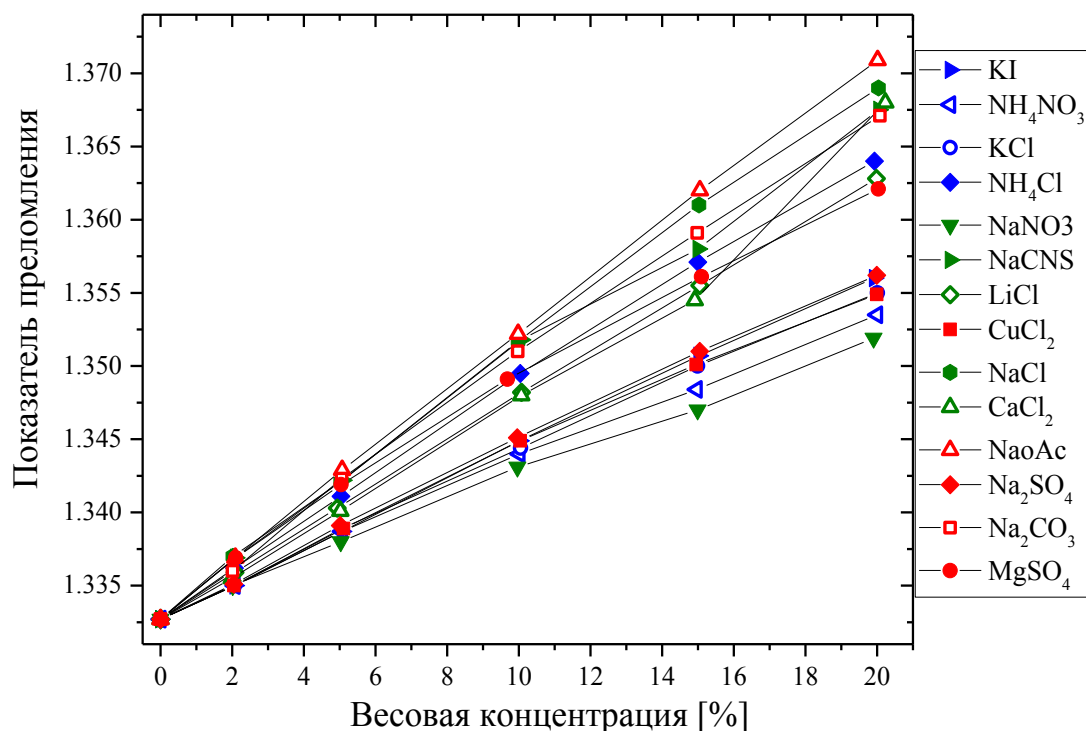


Рис.3.1. Динамика изменения показателя преломления для всех исследованных водных растворов солей от весовой концентрации.

### п.3.1.3. Параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна

Описание экспериментальной установки представлено в главе 2 параграфе 2.3. В оптической схеме образец располагался вертикально в геометрии обратного рассеяния света. Падающее излучение фокусировалось линзой  $f = 150$  мм на образец и этой же линзой собирался рассеянный свет согласно схеме, представленной на рис.2.7. В ходе эксперимента P1 и P2 спектрометра составляли 450 и 700 микрон, соответственно. Расстояние между зеркалами интерферометра составляло  $L = 10$  мм, что соответствует зоне свободной дисперсии 15 ГГц. Используемые параметры спектрометра обеспечили разрешающую способность 100, что соответствует спектральному разрешению  $\sim 0,1$  ГГц.

### п.3.1.4. Эксперимент по исследованию спектров комбинационного рассеяния света водных растворов

Спектры комбинационного рассеяния света водных растворов солей серии Гофмейстера были получены на экспериментальной установке представленной на

рисунке 3.2, в эксперименте была реализована схема рассеяния под углом  $90^\circ$ . В качестве источника излучения применялся твердотельный лазер Millennium с длиной волны  $\lambda = 532.1$  нм. Луч фокусировался линзой (L1) с фокусным расстоянием  $f = 60$  мм на образец. Параллельный пучок рассеянного излучения, сформированный линзой (L2) с фокусным расстоянием  $f = 90$  мм, проходил через призму Дове (Pr), предназначенную для поворота изображения на  $90^\circ$ . Пройдя через крайовой фильтр (F), пучок фокусировался собирающей линзой (L3) с фокусным расстоянием  $f = 225$  мм и зеркалом (M4) направлялся в спектрометр TriVista777 через входную щель. Спектрометр работал в режиме одиночного спектрометра с шагом дифракционной решетки – 900 штрихов на мм. Краевой фильтр предназначен для подавления интенсивного лазерного излучения в рассеянном свете.

Спектры КРС в области валентных ОН-колебаний регистрировались для состояний поляризации VV (поляризованной) и HV (деполяризованной), где V и H обозначают вертикальную и горизонтальную поляризацию, соответственно, относительно плоскости рассеяния. Переход от одной поляризации к другой осуществлялся поворотом пластины  $\lambda/2$  относительно поляризатора, пропускающего вертикальную поляризацию. Калибровка спектрометра по длине волны проводилась по спектру неоновой разрядной лампы, спектры КРС которой измерялись независимо в начале и в конце измерений.

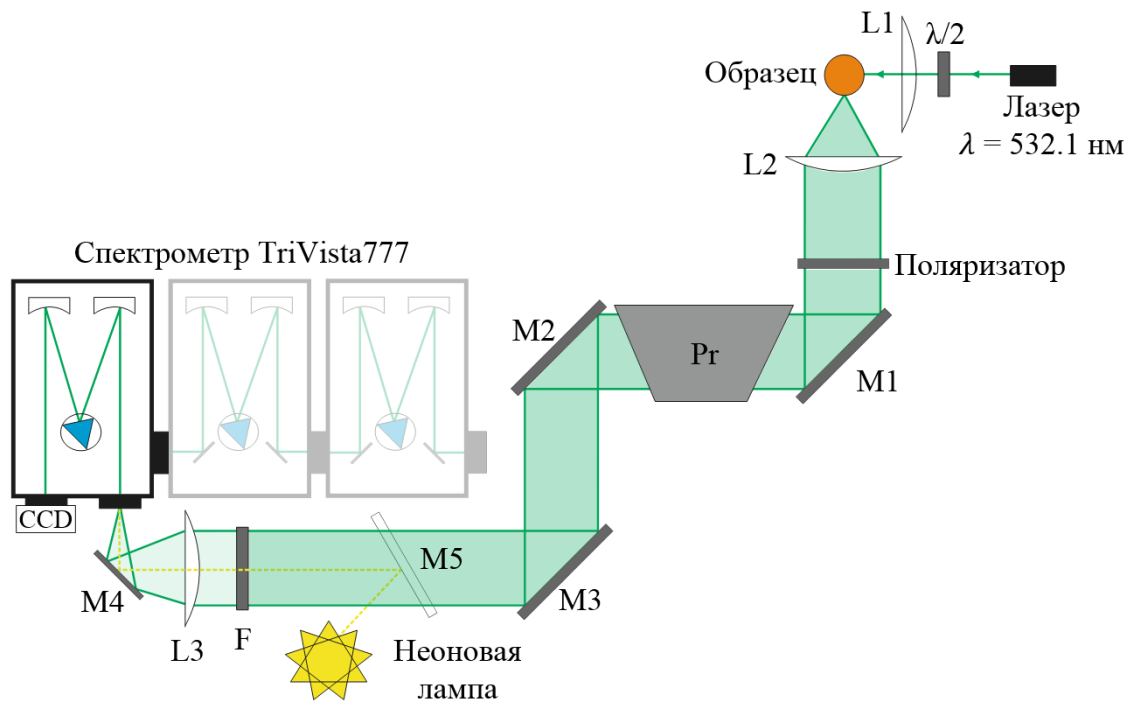


Рис.3.2. Схема экспериментальной установки комбинационного рассеяния света: L1-L3 – линза; M1-M4 – зеркала; M5 – откидное зеркало; Pr – призма Дове; F – крайовой фильтр.

## § 3.2. Анализ результатов рассеяния Мандельштама-Бриллюэна

### п.3.2.1. Характерный спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, определение параметров спектра

На рисунке 3.3 приведено изменение сдвига частоты РМБ для случая водного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в зависимости от молярной концентрации растворенного вещества для лучшей визуализации динамики приведен только правый бриллюэновский пик. Можно заметить, что линия РМБ смещается в сторону высоких частот при увеличении концентрации соли, а также увеличивается и ширина пика. Репрезентативные спектры РМБ растворов для близких молярных концентраций соли около 1.6–1.7 моль/л приведены на рисунке 3.4. Аналогичные спектры для всех солей показаны на рисунке 3.5, где концентрация солей соответствует: 1.13 моль/л для  $\text{KI}$ , 1.4 моль/л для  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1.44 моль/л для  $\text{CuCl}_2$ , 1.64 моль/л для  $\text{MgSO}_4$ , 1.92 моль/л для  $\text{CaCl}_2$ , 1.7 моль/л для  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1.71 моль/л для  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.71 моль/л для  $\text{NaSCN}$ , 1.69 моль/л для  $\text{NaNO}_3$ ; 1.7 моль/л для  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ , 1.89 моль/л для  $\text{KCl}$ , 1.66 моль/л для  $\text{NaCl}$ , 1.75 моль/л для  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.17 моль/л для  $\text{LiCl}$ . Из приведенных графиков видно, что эффект смещения и уширения пика РМБ не универсален для разных солей, а чувствителен к влиянию ионов, входящих в состав соли. Таким образом можно сделать вывод, что спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна чувствителен к изменению концентрации и природе добавляемых ионов.

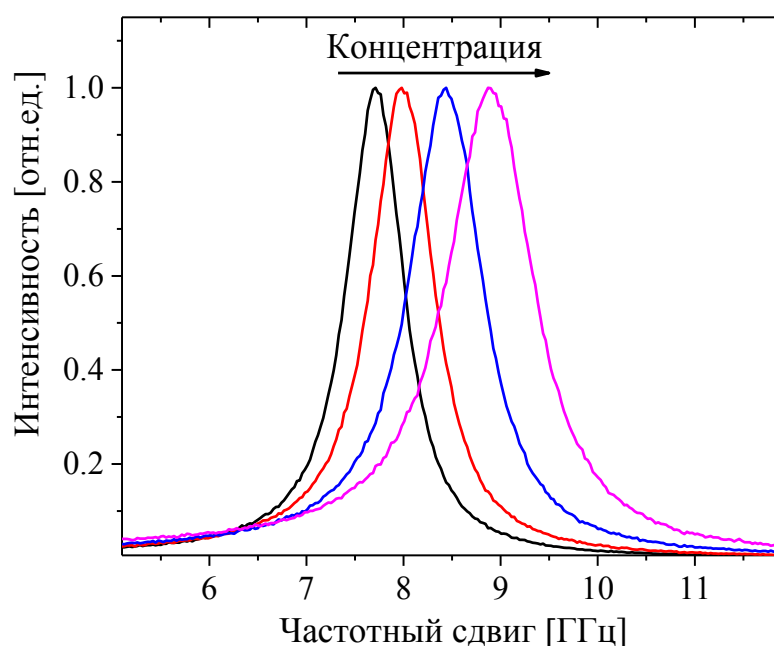


Рис.3.3. Изменение правого пика РМБ для водного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в зависимости от молярной концентрации.

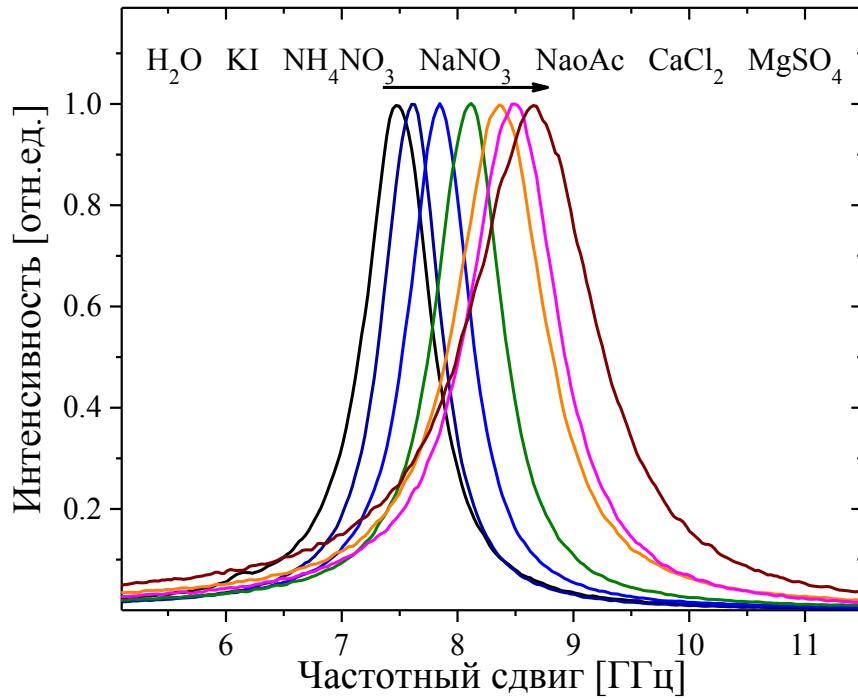


Рис.3.4. Репрезентативные спектры РМБ некоторых растворов солей для близких молярных концентраций соли около 1.6–1.7 моль/л.

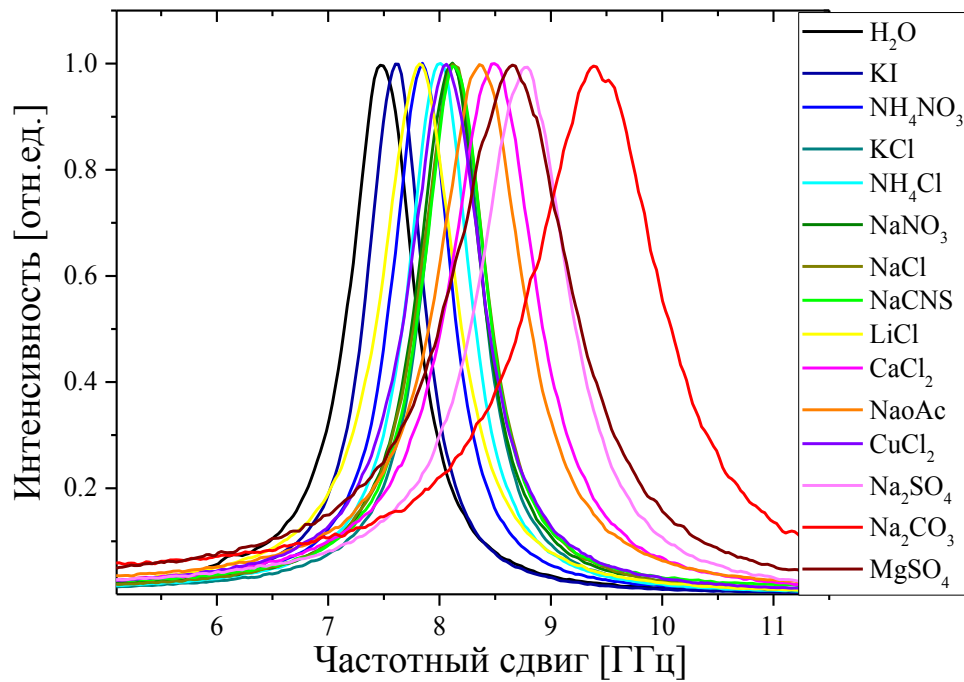


Рис.3.5. Репрезентативные спектры РМБ для воды и водных растворов всех исследуемых солей.

Для детального анализа параметров бриллюэновских линий каждая из компонент дублета была описана функцией затухающего гармонического осциллятора (ДНО).

$$I(\nu) = \frac{I_0}{\pi} \frac{\Gamma \omega_0^2}{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + (\Gamma \omega)^2} \quad (3.1)$$

где  $\omega_0$  – частота фонона,  $\Gamma_0$  - ширина линии. Пример подгонки спектров рассеяния Манделъштама-Бриллюэна воды функцией ДНО приведена на рисунке 3.6. Из параметров подгонки были получены значения позиции и ширины линий.

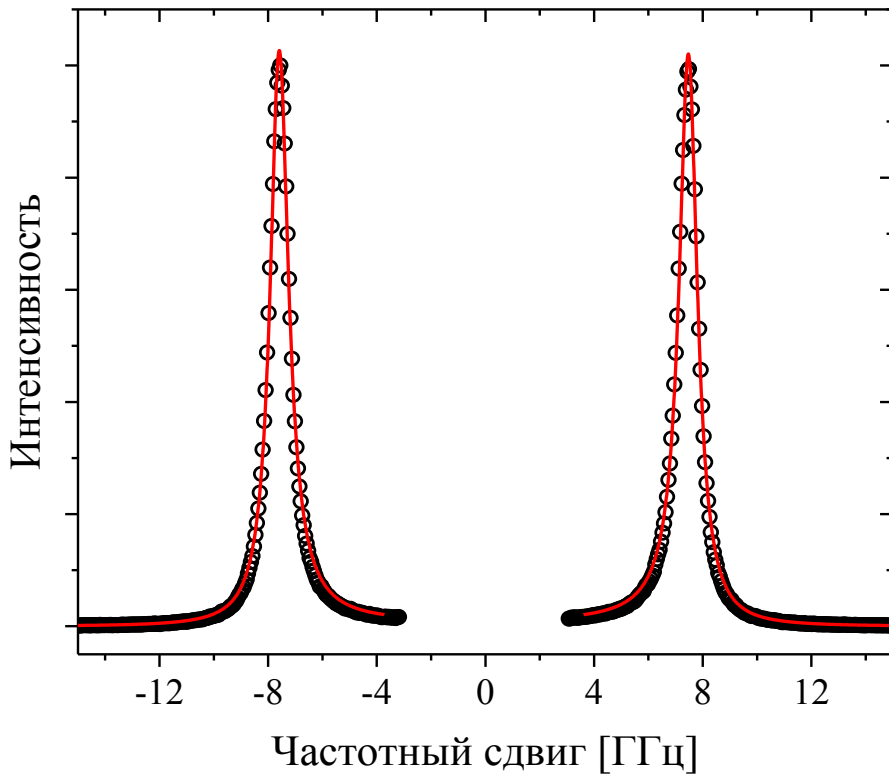


Рис.3.6. Описание экспериментальных спектров РМБ (кружки) функцией затухающего гармонического осциллятора ДНО (красная линия).

Как видно из приведенного рисунка 3.3, увеличение концентрации растворенного вещества приводит к высокочастотному сдвигу линий Манделъштама-Бриллюэна, при этом сдвиг частоты линии РМБ увеличивается с ростом концентрации солей в растворах по-разному для разных солей. Линия РМБ в растворах смещается в сторону более высоких частот по сравнению с водой (только растворы KI не имеют сдвига). Этот сдвиг соответствует увеличению скорости звука и, соответственно, увеличению модуля упругости.

Особенность той или иной соли проявляется в величине сдвига частоты РМБ, который, как правило, больше для растворенных веществ с более высокой космотропной силой. А разница между солями, называемыми космотропными ( $C_2H_3NaO_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$  и другие), и солями, описанными как хаотропные (KI,  $NH_4NO_3$ ,  $NaNO_3$  и другие), заключается в скорости этого увеличения.

### п.3.2.2. Концентрационная зависимость скорости звука водных растворов

Дублет рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, наблюдаемый в спектрах, соответствует неупругому рассеянию света на акустических фонах. Для геометрии обратного рассеяния скорость звука  $v_{br}$  определяется позицией пика РМБ  $\omega_{br}$  и показателем преломления  $n$  через (2.10) для геометрии обратного рассеяния света. На рисунке 3.7 показаны концентрационные зависимости скоростей звука для всех исследуемых веществ, нормированные на скорость звука воды ( $v_0 = 1500$  м/с), при этом статистическая погрешность не выходит за пределы символа.

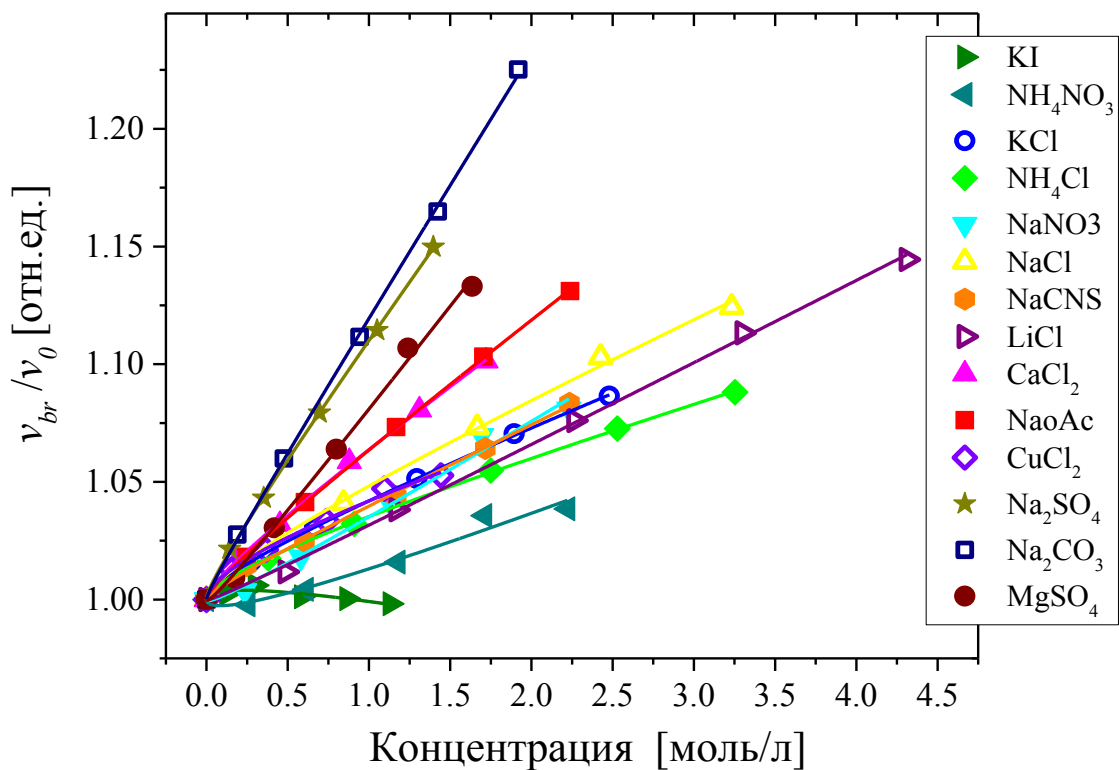


Рис.3.7. Изменение скорости звука водных растворов с молярной концентрацией соли, нормированное на скорость звука воды  $v_0 = 1500$  м/с. Линиями приведены подгонки зависимостей линейной функцией.

Из графика видно, что при увеличении доли растворенного вещества скорость звука в растворе тоже увеличивается. Однако степень возрастания скорости звука различна для разных солей. Кроме того, можно проследить связь между положением ионов в ряду Гофмейстера и изменением скорости звука в среде. Так для случаев космотропов скорость звука в растворе меняется сильнее, чем для хаотропов. Полученный результат можно объяснить следующим образом: если предположение о

том, что космотропы создают упорядоченные структуры вокруг себя, в то время как хаотропы почти не взаимодействуют с молекулами воды верно, то при одном и том же количестве растворенного вещества водный раствор космотропа будет характеризоваться более высокой упорядоченностью, чем хаотропа, и, как следствие, большим значением скорости звука.

Для количественной оценки влияния соли на изменение скорости звука концентрационные зависимости  $v_{br}$  (рис.3.7) были описаны линейной аппроксимацией, заданной формулой (3.2) с введением коэффициента  $B_{br}$ , аналогичного по смыслу коэффициенту Джонса-Доула  $B_{JD}$ .

$$\frac{v_{br}}{v_0} = 1 + B_{br}c \quad (3.2)$$

Данные подгонки экспериментально полученных зависимостей скорости звука ( $v_{br}$ ) от концентрации изображены на рисунке 3.7 линиями.

### **п.3.2.3. Концентрационная зависимость ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Величина частотного сдвига РМБ  $\omega_{br}$  определяет действительную часть модуля упругости  $M'$  через (1.19), а ее ширина  $\Gamma_{br}$  связана с  $M''$  через (1.20). Ширина линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна была определена на основе аппроксимации экспериментальных данных функцией ДНО (3.1). На рисунке 3.8 представлена концентрационная зависимость  $\Gamma_{br}$ , нормализованной к ширине линии РМБ воды ( $\Gamma_0$  (вода) = 0.58 ГГц), для всех водных растворов солей.

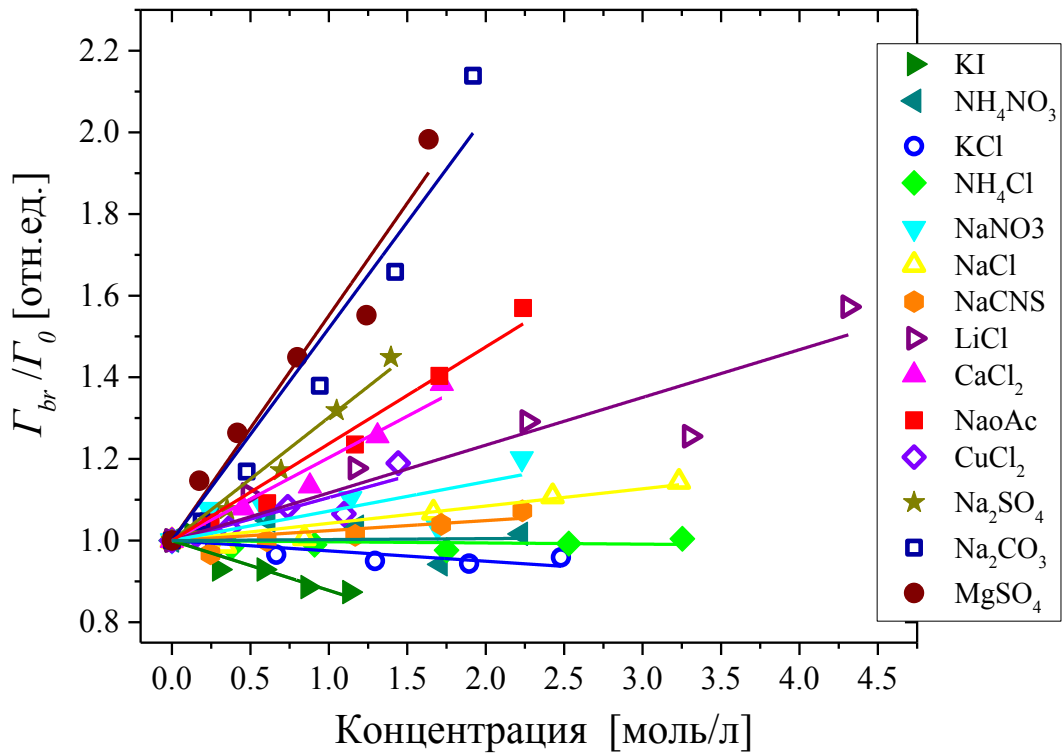


Рис.3.8. Концентрационная зависимость ширины линии РМБ, нормированной на ширину пика РМБ для воды  $\Gamma_0 = 0.58$  ГГц, для всех исследуемых растворов солей. Линиями приведены подгонки зависимостей линейной функцией.

Для количественной оценки влияния соли на ширину линии РМБ  $\Gamma_{br}$  была описана линейной аппроксимацией, заданной выражением (3.3), что позволило получить аналог ширины линии  $B_\gamma$  коэффициента Джонса-Доула  $B_{JD}$ .

$$\frac{\Gamma_{br}}{\Gamma_0} = 1 + B_{\Gamma c} \quad (3.3)$$

Можно заметить, что для более космотропных солей характерно увеличение ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, в то время как хаотропные соли не демонстрируют заметных изменений ширины линии Бриллюэна и имеют тенденцию к ее уменьшению.

### § 3.3. Анализ экспериментальных результатов комбинационного рассеяния света

Если возбуждающий свет имеет линейную поляризацию, различают поляризованный спектр КРС (VV) и деполаризованный спектр (HV), отражающие зависимость интенсивности света с направлением поляризации параллельно и перпендикулярно поляризации возбуждающего света, соответственно.

В данной работе были измерены поляризованный VV и деполаризованный HV спектры водных растворов солей  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCNS}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в двух спектральных диапазонах  $2400\text{-}3300\text{ см}^{-1}$  и  $3100\text{-}4000\text{ см}^{-1}$ . После корректировки два спектральных диапазона были «сшиты», в результате чего был получен спектр КРС от  $2400$  до  $4000\text{ см}^{-1}$ . Также при анализе спектров был учтен линейный вклад фотолюминесценции исследуемых растворов, который был вычтен из итоговых спектров.

На рис.3.9 приведены VV (поляризованный) и HV (деполяризованный) спектры комбинационного рассеяния света воды. Спектр воды довольно сложен и не может быть однозначно разложен на отдельные хорошо определенные линии, отвечающие конкретным колебаниям молекул воды. Однако, согласно имеющимся исследованиям в изотропном спектре воды присутствуют поляризованная линия ( $\omega \approx 3246\text{ см}^{-1}$ ), которую, как правило, ассоциируют с проявлением тетраэдрической структуры [163-165], деполаризованная линия ( $\omega \approx 3460\text{ см}^{-1}$ ), а также линия, соответствующая свободным (нескоординированным) OH-группам воды (dangling mode,  $\omega \approx 3650\text{ см}^{-1}$ ). Позиция линии деполаризованного спектра (HV) характеризует длину водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$  [166]: чем меньше расстояние, тем меньше ширина линии OH-группы.

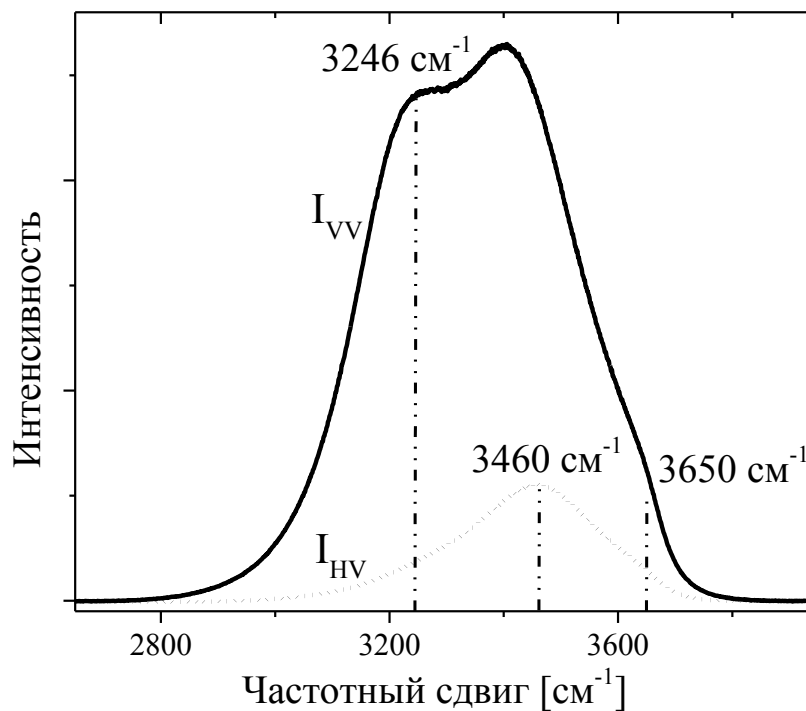


Рис.3.9. Поляризованный ( $I_{VV}$ ), деполаризованный ( $I_{HV}$ ) спектры воды.

### п.3.3.1. Поляризованный спектр комбинационного рассеяния света

Репрезентативные поляризованные спектры КРС воды и водных растворов космотропной  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1.7 моль/л) и хаотропной  $\text{KI}$  (1.13 моль/л) солей показаны на рисунке 3.10. Интенсивность спектра нормирована по интенсивности максимума на этом рисунке. В поляризованном спектре наблюдается сильный изотропный вклад с максимумом около  $3250\text{ см}^{-1}$  (пунктирная линия соответствует  $3246\text{ см}^{-1}$ ). Спектры КРС  $\text{VV}$  растворов всех солей представлены на рисунке 3.11.

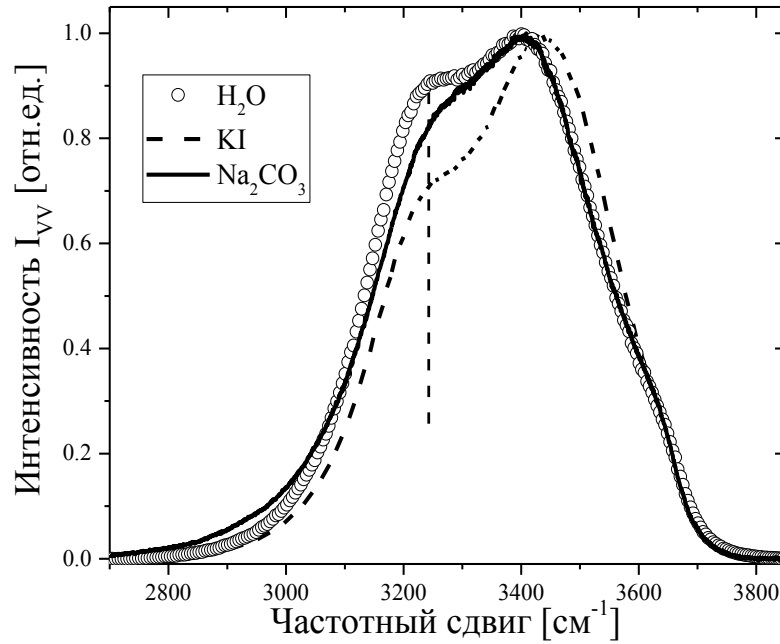


Рис.3.10. Репрезентативные поляризованные спектры КРС воды и водных растворов космотропной  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1.7 моль/л) и хаотропной  $\text{KI}$  (1.13 моль/л) солей.

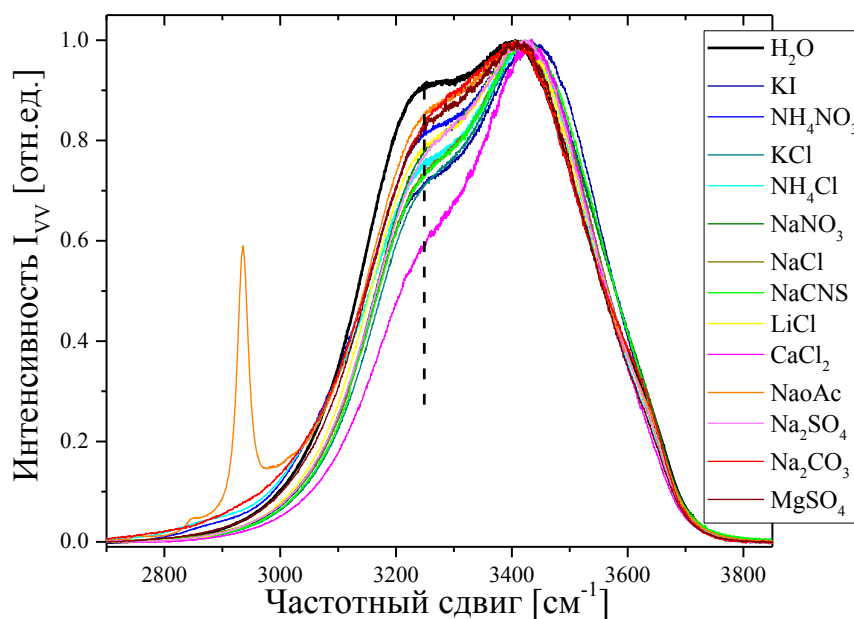


Рис.3.11. Репрезентативные поляризованные спектры КРС воды и водных растворов всех исследуемых солей.

Добавление соли уменьшает вклад, связанный с пиком  $3250\text{ см}^{-1}$ . Уменьшение поляризованного вклада  $3250\text{ см}^{-1}$ , который ассоциируют с проявлением тетраэдрической структуры, в растворах солей следует интерпретировать как уменьшение вклада симметричных мод, наиболее вероятно связанных с тетраэдрическим окружением молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ . Это выглядит естественно, поскольку все ионы служат «примесью», уменьшающей «тетраэдричность» водородной сетки. Наглядно этот эффект можно продемонстрировать, рассмотрев изменение относительной интенсивности в максимуме  $3246\text{ см}^{-1}$  по сравнению со случаем воды ( $R_{3246}$ ) как функцию концентрации растворенного вещества (рис.3.12).

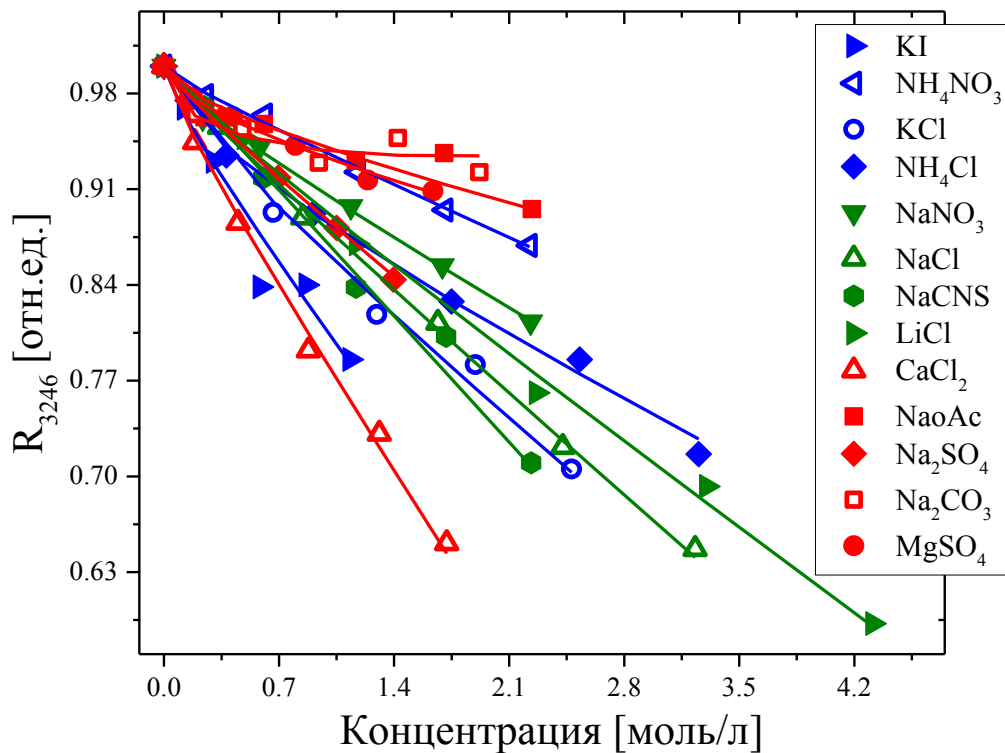


Рис.3.12. Изменение относительной интенсивности поляризованного спектра КРС по сравнению со случаем воды на частоте  $3246\text{ см}^{-1}$  ( $R_{3246}$ ) как функция концентрации растворенного вещества. Линиями приведены подгонки зависимостей квадратичным полиномом.

Как видно из приведенной зависимости, все соли довольно сильно уменьшают рассматриваемое отношение, однако корреляция между положением ионов в ряду Гофмейстера и обсуждаемой особенностью явно не наблюдается. Это может быть объяснено тем, что природа эффекта космотропности и хаотропности несколько сложнее, чем просто подавление тетраэдрической структуры.

Уменьшение  $R_{3246}$  с увеличением концентрации соли можно описать следующим квадратичным полиномом:

$$R_{3246} = 1 + B_{VV}c + Fc^2 \quad (3.4)$$

### п.3.3.1. Деполяризованный спектр КРС

Перейдем к рассмотрению эффекта влияния различных ионов на анизотропный спектр (HV), который представляет собой один пик, соответствующий деполяризованным ОН-колебаниям молекулы воды. На рис.3.13 представлены HV спектры для случая воды ( $H_2O$ ), а также самой космотропной ( $Na_2CO_3$ ) и самой хаотропной (KI) из рассмотренных солей. Спектры остальных солей располагаются между указанными двумя крайними случаями и представлены на рисунке 3.14.

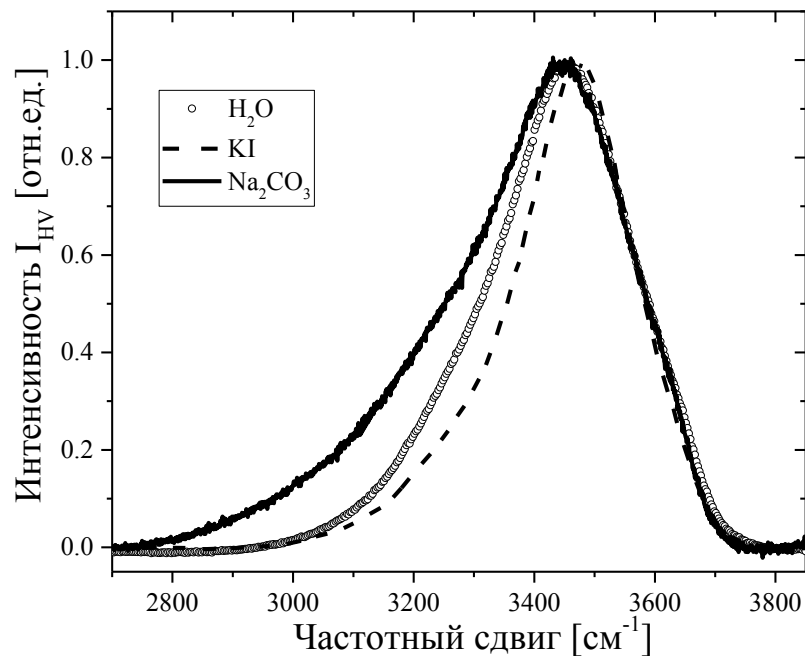


Рис.3.13. Репрезентативные спектры КРС для воды и водных растворов  $Na_2CO_3$  (космотропная соль, 1.7 моль/л) и KI (хаотропная соль, 1.13 моль/л).

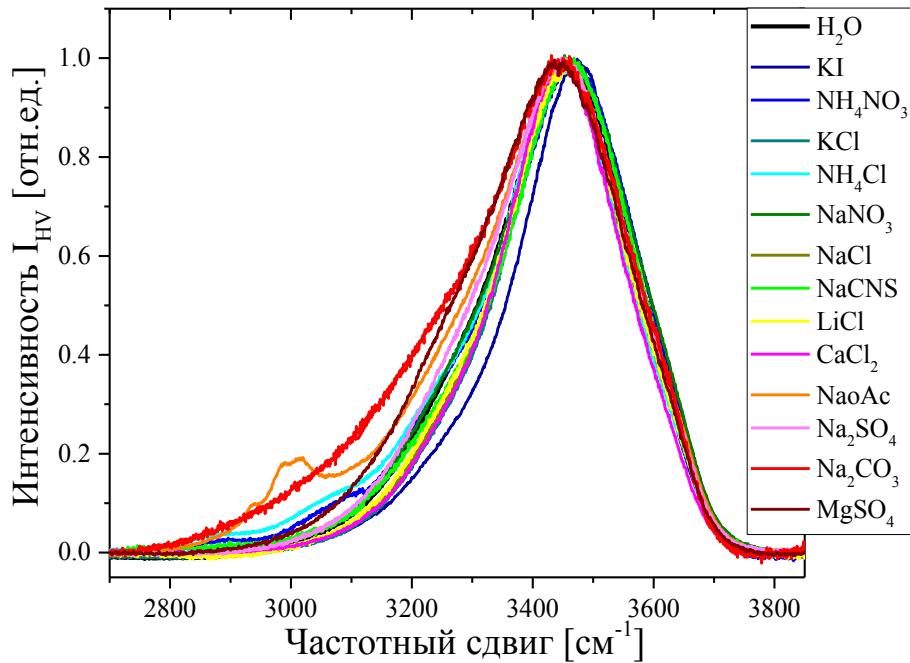


Рис.3.14. Спектры КРС исследуемых водных растворов.

Космотропные и хаотропные соли по-разному влияют на деполаризованный спектр КРС по сравнению со спектром чистой воды. В случае KI полоса КРС сужается и смещается в сторону более высоких частот. В случае  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  полоса КРС уширяется, а ее максимум смещается в область низких частот по сравнению со случаем воды. Различные факторы могут приводить к эффектам, индуцированным солью, наблюдаемым на рисунках 3.13 и 3.14. Когда полоса КРС отражает неоднородное распределение колебательных мод, локализованных в различных конфигурациях молекул воды, ионно-индуцированные изменения в распределении этих конфигураций изменяют спектральную форму полосы. Независимо от выбора конкретного описания полосы КРС в терминах конфигураций, все ионы разрушают взаимодействие вода-вода в соседней оболочке координирующих ОН-групп. Если бы роль ионов заключалась только в снижении концентрации определенных конфигураций молекул воды, то сдвиг и уширение полосы происходили бы аналогичным образом, несмотря на космотропную или хаотропную природу соли. Однако это не так (рис.3.13, 3.14), и другие факторы также следует учитывать. Такими факторами могут быть «электрические поля ионов на соседних молекулах воды» [167] и изменения частот ОН-групп из-за изменения расстояний водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$  [166]. Существует правило, согласно которому меньшее расстояние означает более низкую частоту валентных колебаний ОН-группы [166]. В последнем случае изменение полосы ОН отражает изменение распределения расстояний  $\text{OH}\cdots\text{O}$ .

Результаты, представленные на рис. 3.13 и 3.14, означают, что распределение расстояний  $\text{OH}\cdots\text{O}$  меняется по-разному для космотропных и хаотропных солей. Для количественной оценки деполаризованного спектра КРС с помощью одного параметра рассмотрим взвешенную частоту  $\langle w^{HV} \rangle$  полосы HV, подразумевая связь между шириной полосы и положением максимума. Значение  $\langle w^{HV} \rangle$  оценивалось по интенсивности КРС  $I(w)$  по формуле (3.5).

$$\langle w^{HV} \rangle = \frac{\int I(w) \cdot w \, dw}{\int I(w) \, dw} \quad (3.5)$$

В случае солей  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$  вклады валентных колебаний NH- и CH-групп в диапазоне частот  $2900\text{--}3200 \text{ см}^{-1}$  (рис.3.13) вычитались перед оценкой  $\langle w^{HV} \rangle$ . Пример такой коррекции показан на рисунке 3.15.

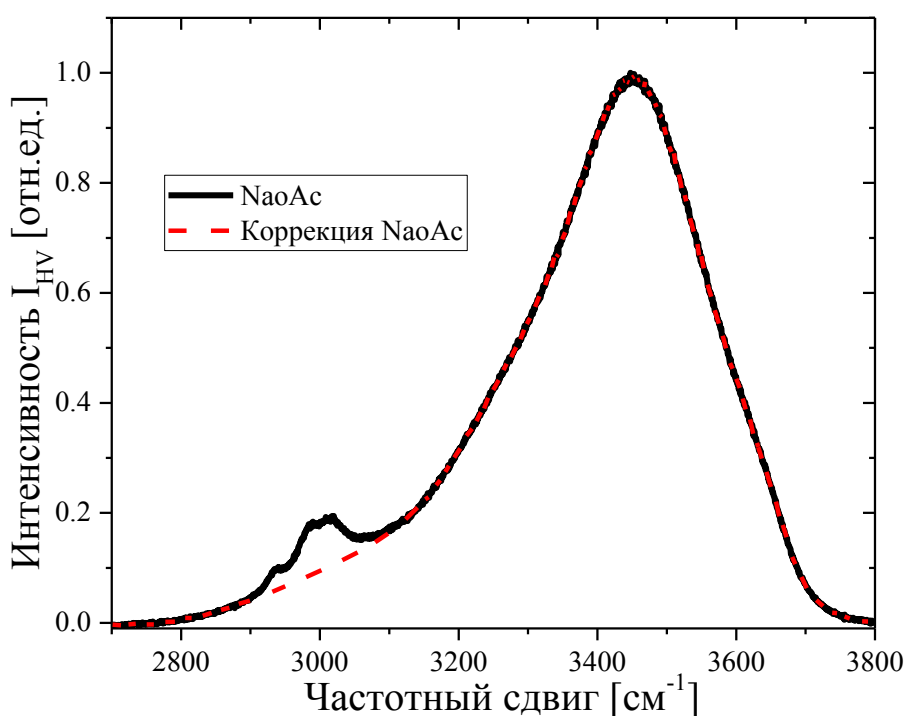


Рис.3.15. Коррекция деполаризованных спектров КРС в диапазоне частот  $2900\text{--}3200 \text{ см}^{-1}$  на примере спектра КРС водного раствора соли NaOAc. Коррекция была проведена для солей  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ , которые содержат вклады валентных колебаний NH- и CH-групп.

В случае воды взвешенная частота  $\langle w_0^{HV} \rangle$  полосы HV составил  $3433.8 \text{ см}^{-1}$ . На рисунке 3.16 показаны концентрационные зависимости отношения  $\langle w^{HV} \rangle / \langle w_0^{HV} \rangle$  для всех исследуемых солей. На приведенном графике можно заметить, что космотропные и хаотропные соли демонстрируют различное поведение нормированной взвешенной частоты деполаризованного спектра.

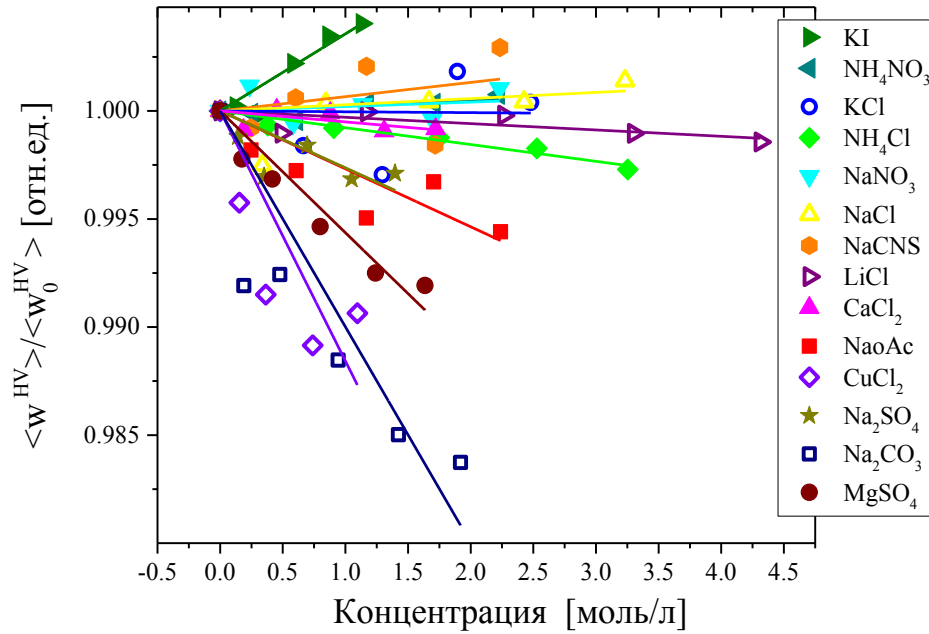


Рис.3.16. Концентрационные зависимости взвешенной частоты деполяризованного спектра КРС для всех солей относительно взвешенной частоты воды ( $\langle w^{HV} \rangle / \langle w_0^{HV} \rangle$ ). Линиями приведены подгонки зависимостей квадратичным полиномом.

Как следует из приведенных результатов, характер изменения положения взвешенной частоты с концентрацией для космотропов и хаотропов различен. Для более космотропных солей положение взвешенной частоты смещается в низкочастотную область, что отражается в отношении  $\langle w^{HV} \rangle / \langle w_0^{HV} \rangle < 1$ , в то время как для хаотропов взвешенная частота смещается в более высокочастотную область. Изменение взвешенной частоты отражает изменение ОН-полосы анизотропного спектра, что в свою очередь характеризует изменение длины водородной связи ОН...О под действием ионов. Таким образом, полученный результат свидетельствует о том, что космотропы уменьшают средние длины водородной связи в растворе, в то время как хаотропы увеличивают их. Данный результат согласуется с имеющимися представлениями о том, как космотропные и хаотропные ионы взаимодействуют с молекулами воды.

Для количественной оценки влияния соли на полосу HV КРС отношение  $\langle w^{HV} \rangle / \langle w_0^{HV} \rangle$  было описано квадратичным полиномом (3.6). Подгонки с помощью уравнения показаны на рис.3.16 сплошной линией.

$$\frac{\langle w^{HV} \rangle}{\langle w_0^{HV} \rangle} = 1 + B_{\langle w \rangle} c + F c^2 \quad (3.6)$$

### § 3.4. Обсуждение результатов. Взаимосвязь с параметром $B_{JD}$ , характеризующего изменение вязкости раствора

В ходе проведенного исследования было установлено различное влияние солей на параметры исследованных спектров, которое подтверждает теорию о специфическом влиянии космотропных и хаотропных ионов на сетку водородных связей воды. Рассмотрим более детально характеры обсуждаемых зависимостей: зависимости скорости звука из позиции линии РМБ (рис.3.7), релаксационного отклика из ширины линии дублета РМБ (рис.3.8), уровня «тетраэдричности» из интенсивности поляризованной линии спектра КРС (рис.3.12), длины водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$  из положения взвешенной частоты деполяризованного спектра (рис.3.16) от концентраций растворенных солей. Для количественной оценки опишем экспериментальные зависимости полиномом первой или второй степени и выделим параметр пропорциональности с концентрацией, аналогичному параметру вязкости водного раствора Джонса-Доула.

В данном разделе будет проведено сравнение полученных параметров с коэффициентом Джонса-Доула ( $B_{JD}$ ), который обычно используется для характеристики ионов (анионов или катионов) с точки зрения космотропной ( $B_{JD} > 0$ ) или хаотропной ( $B_{JD} < 0$ ) силы. Коэффициенты, соответствующие силе аниона и катиона, учитываются аддитивно при характеристике соли. Исследуемые параметры всех рассматриваемых солей, включая значения их коэффициентов  $B_{JD}$ , взятых из [168], приведены в таблице 1.

	Хим.фор мула соли	$B_{JD}$ [168] л/моль	$\Delta n$ л/моль	$B_{br}$ л/моль	$B_{\Gamma}$ л/моль	$B_{<w>}$ л/моль	$B_{VV}$ л/моль
1	KI	-0.089	0.0207	5.41E-03	-0.158	2.29E-03	-0.3413
2	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-0.057	0.00935	0.015	-0.028	-2.52E-03	-0.068
3	KCl	-0.022	0.00905	0.045	-0.023	-3.04E-03	-0.1507
4	NH <sub>4</sub> Cl	-0.018	0.0096	0.036	0.003	-4.24E-03	-0.1034
5	NaNO <sub>3</sub>	0.042	0.0087	0.041	0.067	-1.84E-03	-0.0927
6	NaCl	0.080	0.0091	0.05	0.067	2.60E-04	-0.1239
7	NaCNS	0.110	0.0163	0.037	0.048	-3.50E-04	-0.1275
8	LiCl	0.138	0.008	0.035	0.13	-3.60E-04	-0.111
9	CaCl <sub>2</sub>	0.290	0.0222	0.072	0.266	-7.40E-04	-0.2534
10	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> (NaOAc)	0.337	0.0111	0.068	0.14	-1.04E-02	-0.098
11	CuCl <sub>2</sub>	0.360	0.0209	0.056	0.341	-	-
12	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.376	0.0172	0.118	0.412	-5.43E-03	-0.1131
13	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.473	0.0186	0.116	0.572	-1.71E-02	-0.1025
14	MgSO <sub>4</sub>	0.592	0.0178	0.085	0.638	-9.24E-03	-0.0906

Таблица 1 — Перечень солей, исследованных в работе, вместе со значениями коэффициента  $B_{JD}$ , характеризующего космотропную/хаотропную силу, а также параметров  $B_{br}$ ,  $B_{\Gamma}$ ,  $B_{<w>}$ ,  $B_{VV}$ , полученных на основе анализа данных рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света. Коэффициент  $\Delta n$  является линейным членом концентрационных зависимостей показателя преломления ( $n = n_0 + \Delta n \cdot c$ ) для всех исследованных солей ( $n_0 = 1.3327$  – показатель преломления воды при комнатной температуре).

### п.3.4.1. Связь параметра, характеризующего изменение скорости звука с концентрацией, с параметром $V_{JD}$

На рис.3.17 приведена зависимость параметра  $V_{br}$ , полученного из описание концентрационных зависимостей скорости звука согласно формуле (3.2), от параметра Джонса – Доула  $V_{JD}$ , взятого из литературы в предположении аддитивного вклада от анионов и катионов [9]. Значения  $V_{br}$  для всех солей приведены в таблице 1.

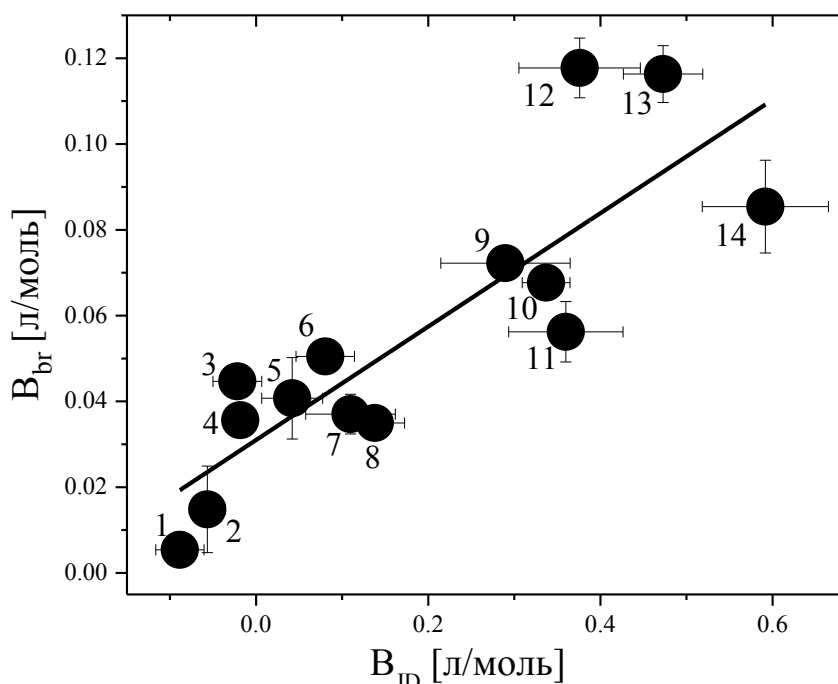


Рис.3.17. Зависимость параметра  $V_{br}$ , отражающего изменение скорости звука с концентрацией из данных РМБ, от параметра Джонса – Доула  $V_{JD}$ .

Параметр  $V_{br}$ , отражающий изменение скорости звука (гигагерцовый упругий модуль) с концентрацией, хорошо коррелирует с параметром  $V_{JD}$ , характеризующим изменение вязкости раствора. Наблюдаемая взаимосвязь обусловлена тем, что скорость распространения продольных акустических волн и вязкость определяются плотностью среды и характером межмолекулярных взаимодействий. В системах с более плотной упаковкой частиц возрастает как сопротивление сдвиговым течениям (вязкость), так и упругость среды, определяющая скорость звука. Поскольку хаотропные ионы ослабляют, а космотропные усиливают структурную сетку водородных связей, растворы космотропных солей характеризуются более высокими значениями как вязкости, так и скорости звука. Таким образом, полученная зависимость параметра  $V_{br}$  от параметра Джонса – Доула  $V_{JD}$  указывает на то, что спектроскопия рассеяния Мандельштама-

Бриллюэна может быть методикой для характеристики космотропности и хаотропности солей.

### п.3.4.2. Связь параметра, характеризующего изменение ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна с концентрацией, с параметром $V_{JD}$

Взаимосвязь между  $V_{\Gamma}$ , характеризующего изменение вязкости с концентрацией растворенной соли и определенного из уравнения (3.3), и  $V_{JD}$  показана на рисунке 3.18. Наблюдается хорошая линейная корреляция между этими  $V$ -коэффициентами.

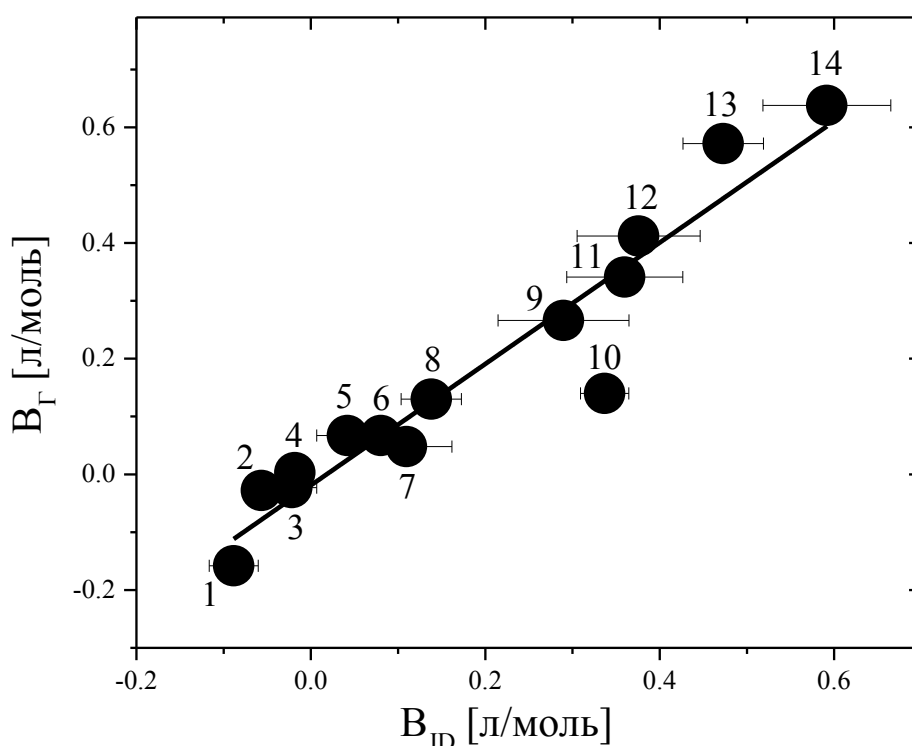


Рис.3.18. Зависимость параметра  $V_{\Gamma}$ , отражающего релаксационный отклик из ширины бриллюэновской линии, от параметра Джонса – Доула  $V_{JD}$ .

Результаты рис.3.18 означают, что макроскопическая вязкость ( $V_{JD}$ ) имеет аналог в релаксационной восприимчивости в частотном диапазоне ГГц. Это свидетельствует о том, что структурные изменения, индуцированные ионами, проявляются как на макроскопическом уровне (вязкость), так и в релаксационной динамике на пикосекундных временах и нанометровых пространственных масштабах.

### п.3.4.3. Связь параметра, отражающего тетраэдрический порядок водородной сетки, с параметром $V_{JD}$

Согласно рис.3.10 и 3.11, любая соль уменьшает концентрацию тетраэдрического окружения. Коррелирует ли скорость этого уменьшения с коэффициентом Джонса-Доула  $V_{JD}$ ? Возможная корреляция между  $V_{VV}$ , описывающего изменение интенсивности поляризованной линии КРС на  $3246 \text{ см}^{-1}$  с концентрацией согласно формуле (3.4), и  $V_{JD}$  проверена и приведена на рисунке 3.19. Как видно из представленной зависимости,  $V_{VV}$  довольно сильно отличается для различных солей, однако, явной корреляции между параметром  $V_{VV}$ , отражающим изменение полосы, ассоциируемой с тетраэдрическим порядком водородной сетки, и параметром  $V_{JD}$ , характеризующим изменение вязкости раствора, не наблюдается. По-видимому, корреляции между этими коэффициентами нет.

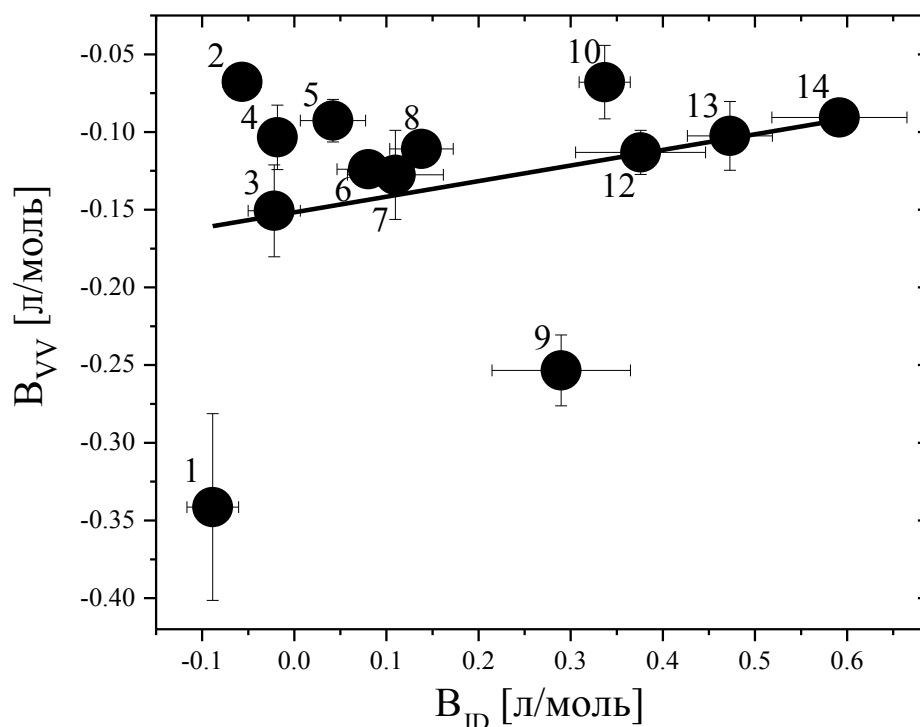


Рис.3.19. Зависимость параметра  $V_{VV}$ , отражающего уровень «тетраэдричности» из интенсивности поляризованной линии  $3246 \text{ см}^{-1}$  спектра КРС, от параметра Джонса – Доула  $V_{JD}$ .

Имеются две соли ( $KI$  и  $CaCl_2$ ), их коэффициент  $V_{VV}$  значительно ниже, чем у других. Коэффициенты  $V_{VV}$  большинства солей составляют около  $-0.1$ . Одинаковые значения  $V_{VV}$  соответствуют одинаковой эффективности этих солей в снижении концентрации тетраэдрического окружения. А способность некоторых солей снижать эту

концентрацию сильнее не может быть предсказана по значению  $V_{JD}$ . Таким образом, различные значения  $V$ -коэффициента Джонса-Доула не связаны с различной способностью подавлять тетраэдрическое окружение.

#### п.3.4.4. Связь параметра, характеризующего водородную связь в водном растворе, с параметром $V_{JD}$

$V_{<w>}$  характеризует изменение длины водородной связи и для всех исследуемых солей его значения были определены описанием концентрационных зависимостей положения взвешенной частоты деполяризованного спектра выражением (3.6). Значения  $V_{<w>}$  для всех солей приведены в таблице 1 (растворы  $\text{CuCl}_2$  были исключены из эксперимента КРС из-за высокого вклада фотолюминесценции). Возможная корреляция между  $V_{<w>}$  и  $V_{JD}$  проверена на рис.3.20.

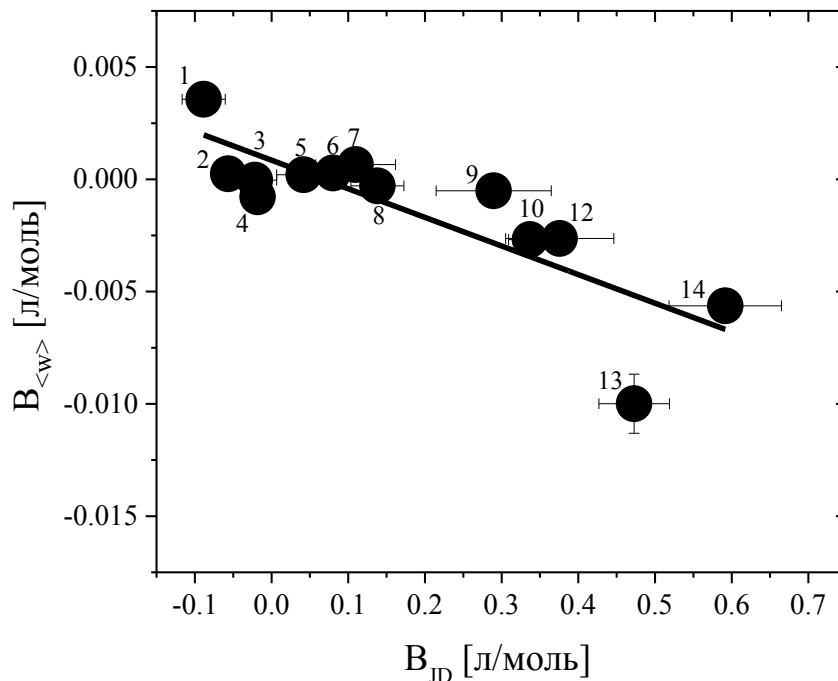


Рис.3.20. Зависимость параметра  $V_{<w>}$ , отражающего длину водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$  из положения взвешенной частоты деполяризованного спектра КРС, от параметра Джонса – Доула

$V_{JD}$ .

Видно, что увеличение  $V_{JD}$  коррелирует с уменьшением  $V_{<w>}$ . Это можно объяснить более коротким средним расстоянием  $\text{OH}\cdots\text{O}$  для более космотропных солей или более сильными средними электрическими полями, индуцированными ионами. Можно сделать вывод, что сила ионно-индуцированного изменения водной сети

коррелирует с силой линейного ионно-индуцированного изменения вязкости раствора. Это согласуется с предположением, что структура водной сети определяет вязкость разбавленных растворов, помимо прямых ион-ионных взаимодействий.

### **§ 3.5. Заключение по исследованию водных растворов солей серии Гофмейстера методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Методы спектроскопии неупругого рассеяния света, комбинационное рассеяние света и рассеяние Мандельштама-Бриллюэна, были применены к водным растворам солей из ряда Гофмейстера. В зависимости от характера влияния ионов на водородные связи воды ионы лиотропного ряда разделили на космотропы, создающие структурный порядок, и хаотропы, разрушающие структуру. Косвенное подтверждение различного влияния ионов на структуру водородной сети воды проявляется в экспериментах по измерению вязкости раствора. В результате работы было обнаружено, что макроскопическая вязкость растворов связана с их динамическим откликом в молекулярном (КРС) масштабе и в масштабе сотен нанометров (РМБ).

Из анализа растворов методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна было установлено, что при увеличении доли растворенного вещества скорость звука в растворах увеличивается. При этом скорость возрастания скорости звука различна для разных солей. Так для случаев космотропов скорость звука в растворе меняется сильнее, чем для хаотропов. Полученный результат подтверждает предположение о том, что космотропы создают упорядоченные структуры вокруг себя, в то время как хаотропы почти не взаимодействуют с молекулами воды. В этом случае при одном и том же количестве растворенного вещества водный раствор космотропа будет характеризоваться более высокой упорядоченностью, чем хаотропа, и, как следствие, большим значением скорости звука. Таким образом, спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна может быть успешно использована как дополнительная методика для классификации ионов в терминах космотропности и хаотропности. Из концентрационных зависимостей ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна было установлено, что космотропных солей характерно увеличение ширины линии РМБ, в то время как хаотропные соли не демонстрируют заметных изменений ширины линии Бриллюэна и имеют тенденцию к ее уменьшению. Это свидетельствует о чувствительности релаксационного отклика к структуре воды и природе добавляемых ионов.

Применение метода комбинационного рассеяния света к исследованию водных растворов показало, что для всех рассмотренных солей уменьшается вклад колебания, которое ассоциируют с проявлением тетраэдрической структуры ( $\omega = 3246 \text{ см}^{-1}$ ) в изотропном спектре ОН-полосы по сравнению со случаем чистой воды. Из анализа деполаризованного спектра, характеризующего длину водородных связей воды, продемонстрировано различное влияние космотропных и хаотропных ионов. Было обнаружено изменение как позиции, так и ширины линии деполаризованного спектра ОН-колебаний в зависимости от концентрации и природы рассматриваемых ионов. Для комплексного анализа влияния солей серии Гофмейстера на деполаризованный спектр КРС было предложено исследовать изменение взвешенной частоты спектра. Исходя из результатов изменения взвешенной частоты НV спектра КРС с концентрацией водных растворов различных солей было обнаружено, что космотропные ионы, которые, как предполагается, структурируют сетку водородных связей воды вокруг себя, демонстрируют рост значения взвешенной частоты по сравнению со случаем воды с увеличением концентрации, в то время как при добавлении хаотропов, которые ослабляют водородные связи воды, зависимость уменьшается.

Детальный анализ полученных данных демонстрирует корреляцию между коэффициентом Джонса-Доула для вязкости и линейными коэффициентами в концентрационных зависимостях действительной и мнимой частей гигагерцового модуля упругости (скорости звука и затухания соответственно), а также длины водородной связи ОН...О из данных комбинационного рассеяния света. При этом способность солей к структурообразованию/разрушению не связана с их способностью подавлять тетраэдрическое окружение. Найденная связь между ионно-индуцированным изменением частоты линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и структурообразующей/разрушающей способностью растворенного вещества важна для описания результатов исследований биологических объектов методом РМБ. Известная связь между частотой валентных колебаний ОН и расстояниями ОН...О приводит к следующей картине, описывающей общие тенденции. Добавление соли изменяет структуру водной сети, сокращая среднее расстояние ОН...О для космотропных солей и увеличивая его для хаотропных солей. Ионно-индуцированные изменения сопровождаются изменениями вязкости, чем короче расстояния ОН...О, тем выше коэффициент Джонса-Доула. Результаты исследования согласуются с предположением о

том, что космотропы структурируют сетку водородных связей вокруг себя, а хаотропы разупорядочивают ее, при этом структура водородной сети определяет вязкость разбавленных растворов.

## **ГЛАВА 4. Фосфолипидные мембраны**

В данной главе проведено исследование планарных фосфолипидных систем в гидратированном состоянии в широком диапазоне температур от 90 до 320 К методом рассеяния Манделъштама-Бриллюэна. Использование различных геометрий рассеяния лазерного излучения относительно упорядоченных слоев поможет исследовать температурно-индуцированные изменения упругих свойств как вдоль слоев (в латеральном направлении), так и в ортогональном к ним направлении. Исследования проведены на однокомпонентных образцах насыщенных и ненасыщенных липидов, смеси липидов и смеси с холестерином, а также рассмотрен нативный объект – мембраны эритроцитов.

### **§ 4.1. Проведение эксперимента по исследованию фосфолипидных мембран в широком диапазоне температур**

#### **п.4.1.1. Изготовление образцов синтетических фосфолипидов**

Порошки насыщенных фосфатидилхолинов 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC) и ненасыщенного фосфолипида 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC) были приобретены в Avanti Polar Lipids. Их структурные формулы, температуры фазового перехода гель-флюид и их молярные массы представлены на рисунке 4.1.

Сухой липид был смешан с дистиллированной водой в весовом соотношении воды и липидов 30:1. Процедура образования многослойных везикул с характерным диаметром ~10 мкм описана в [137]. Для этого водные растворы выдерживали в течение 2 часов при температуре 50°C для DMPC, DOPC и 60°C для DPPC, что выше температуры фазового перехода гель-флюид для исследуемых липидов. Затем суспензия подвергалась процедуре 10 термоциклов, включающих в себя процесс замораживания в жидком азоте и последующего оттаивания на водяной бане ( $T = 50-60^{\circ}\text{C}$ ).

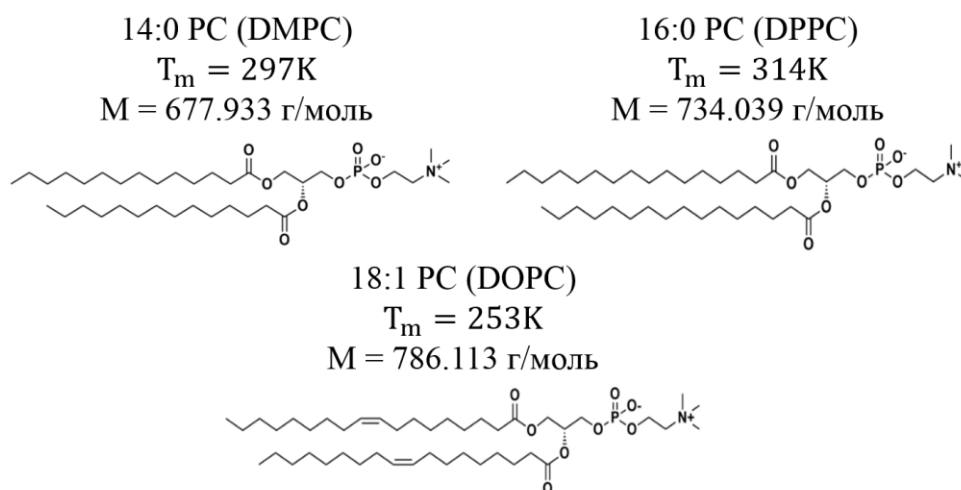


Рис.4.1. Структурные формулы насыщенных DMPC, DPPC и ненасыщенного DOPC фосфолипидов.

Для моделирования реальных биологических мембран, которые имеют сложный состав, было предложено исследовать смесь фосфолипида с холестерином DMPC/cho1 в молярном соотношении 80/20, а также смесь насыщенного и ненасыщенного липидов. Смесь DPPC/DOPC в молярном соотношении 65/35 интересна тем, что при ней сосуществуют упорядоченные и разупорядоченные фазы липидов [169]. На рисунке 4.2 приведена структурная формула холестерина и его молярная масса. Стартовые смеси были приготовлены путем смешивания липида с холестерином или DPPC с DOPC по массе с учетом молекулярной массы молекул. Затем в смеси был добавлен хлороформ в объеме 50 мкл для получения однородной суспензии. Далее растворитель удалялся путем испарения при комнатной температуре в вытяжном шкафу в течение 3 суток. Для удаления остатков молекул хлороформа смесь помещалась под вакуум еще на сутки. Затем сухие смеси DMPC/cho1 и DPPC/DOPC разбавляли водой в 10 раз. Для приготовления суспензии многослойных везикул полученный раствор отправляли на водяную баню при  $T=50-60^{\circ}\text{C}$  на 3 часа и затем подвергали процедуре циклического замораживания в жидком азоте и последующего оттаивания на водяной бане в течение 10 раз.

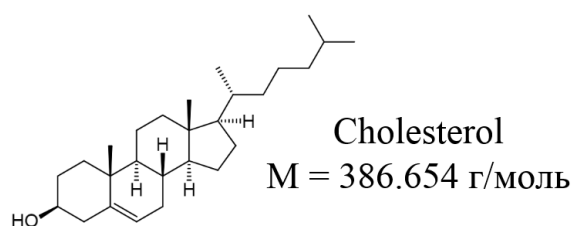


Рис.4.2. Структурная формула холестерина.

Для получения планарного образца суспензия многослойных везикул подвергалась процедуре экструзии в устройстве Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) через мембрану с размером пор 1 мкм при температуре выше  $T_m$  липида: для DMPC температура составила 40°C, для DPPC 60°C, для DOPC экструзия проводилась при комнатной температуре (20°C). Соответственно температура экструзии для смесей была аналогичной температуре для самого высокотемпературного липида в компоненте. Липидный раствор был проведен через мембрану не менее 50 раз. В результате экструзия была приготовлена суспензия однослойных везикул, которая была осаждена на стеклянной подложке. При контакте с подложкой происходит разрыв везикул с последующим их слиянием, в результате чего были сформированы плоские упорядоченные слои фосфолипидов (~10 – 100 бислоев). Сухой планарный образец запечатывался герметично в плоскую камеру с 3% водным раствором NaCl, как показано на рис.4.3. Солевой раствор обеспечивает влажность 98%, что достаточно для полной гидратации образцов фосфолипидов, при этом он препятствует конденсации воды на образце при нагревании.

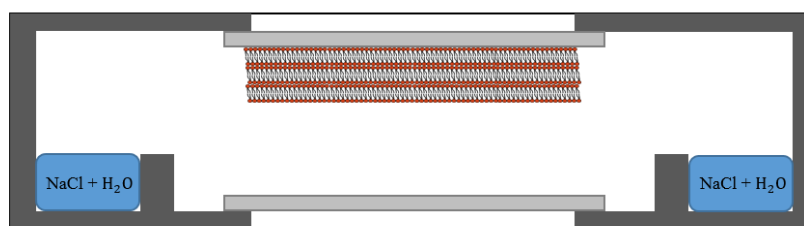


Рис.4.3. Герметичная кювета с 98% влажностью с планарным образцом фосфолипида.

#### **п.4.1.2. Температурные измерения и параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Экспериментальная установка, включающая в себя 3+3-тандем интерферометров Фабри-Перо (JRS Scientific Instruments) и используемая для измерения спектров рассеянного излучения липидных систем, приведена в главе 2, параграфе 2.3 на рисунке 2.7. Для исследования латеральных и ортогональных к слоям фононов были использованы обратного рассеяния света (BS) или под углом 90° (90A и 90R), подробнее о возможностях геометрий рассеяния описано в главе 2, параграфе 2.4. Экспериментальные исследования спектров РМБ планарных образцов проводился в диапазоне температур от 90 до 320 К с использованием азотного криостата заливного типа или криостата фирмы Linkam. Выдерживание образца на каждой температуре

осуществлялось не менее 5 минут. Точность поддержания температуры составляла  $\pm 0.2$  К.

В ходе эксперимента входной P1 и выходной P2 пинхолы спектрометра составляли 450 и 700 микрон, соответственно. Расстояние между зеркалами интерферометра варьировалось от 5 до 12 мм в зависимости от положения бриллюэновской линии, что соответствует зоне свободной дисперсии от 11 до 30 ГГц. Разрешающая способность была определена 100 (спектральное разрешение  $\sim 0.1-0.3$  ГГц).

## **§ 4.2. Моносоставные системы синтетических фосфолипидов**

### **п.4.2.1. Анализ экспериментальных результатов. Температурные зависимости параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для различных геометрий рассеяния**

Планарный фосфолипидный бислой представляет собой структурно анизотропную систему, где упаковка липидных молекул и межмолекулярное взаимодействие вдоль плоскости мембраны и поперек нее (вдоль углеводородных хвостов) различаются. Спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна позволяет селективно исследовать упругие свойства в разных направлениях за счет выбора угла между падающим и рассеянным пучками света, что однозначно задает направление волнового вектора акустического фонона. В геометриях рассеяния BS (обратное рассеяние, backscattering) и 90R образец расположен так, что регистрируемый волновой вектор фонона направлен строго перпендикулярно плоскости липидных слоев. Соответственно, сдвиг частоты РМБ в этих геометриях характеризует скорость звука в направлении, перпендикулярном плоскости бислоя. Геометрия рассеяния 90A настроена таким образом, что волновой вектор фонона направлен строго параллельно плоскости липидных слоев. Данная геометрия позволяет исследовать латеральную скорость звука (упругость вдоль поверхности мембраны). Важным преимуществом геометрии 90A является то, что расчет скорости звука не зависит от локального показателя преломления среды, согласно уравнению (2.12). Таким образом, сопоставление спектров в геометриях BS (или 90R) и 90A позволяет получить полную картину температурно-индуцированной эволюции механической анизотропии липидной мембраны.

На рисунке 4.4(а-в) представлены репрезентативные спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированного планарного образца DOPC для разных

геометрий рассеяния (BS, 90A, 90R) при трех репрезентативных температурах, включая низкую температуру, температуру немного ниже температуры плавления льда и высокую температуру, при последних двух температурах фосфолипид DOPC находится во флюидном состоянии. Для лучшей визуализации динамики изменения спектров приведен только правый бриллюэновский пик.

При повышении температуры позиция бриллюэновской линии липида сдвигается в низкочастотную область как для геометрии рассеяния BS и 90R, характеризующих упругие свойства в направлении волнового вектора ортогонального к слоям, так и для геометрии 90A, характеризующей латеральные упругие свойства. В спектрах рассеяния Манделъштама-Бриллюэна помимо линии, соответствующей вкладу липидов, присутствует пик РМБ силикатных пластин на частотах 32.5, 17.5 и 9 ГГц для геометрий BS, 90R и 90A, соответственно. В случае геометрий 90R и 90A на рис.4.4(б, в) вклад от подложки помечен звездочкой. Эта линия не меняется с изменением температуры.

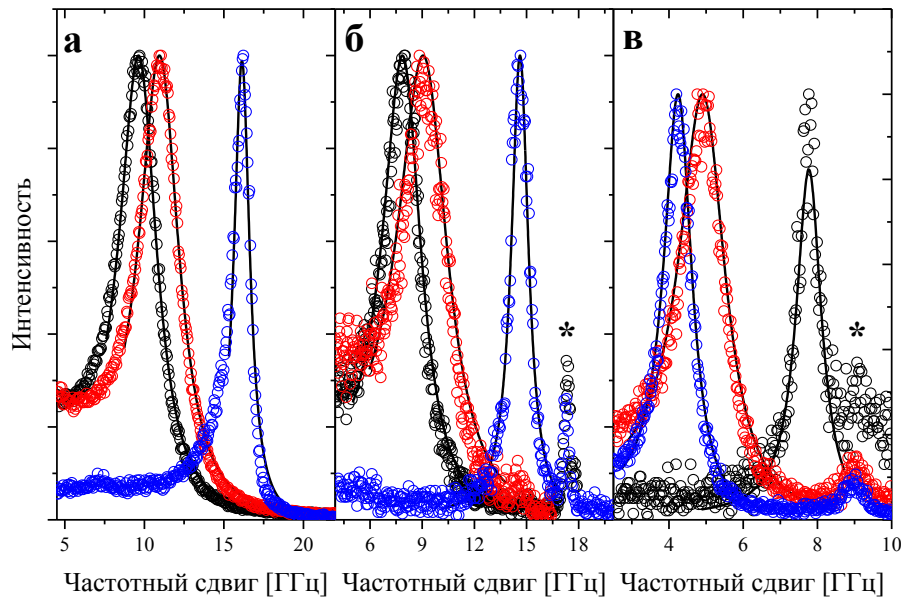


Рис.4.4. Репрезентативные спектры рассеяния Манделъштама-Бриллюэна гидратированного планарного образца DOPC в геометрии (а) BS; (б) 90R; (в) 90A. Красный спектр соответствует температуре 299 К, черный – 273 К, синий – 170 К. Звездочкой помечен пик РМБ силикатных пластин. Сплошной линией показана подгонка функцией ДНО.

Для геометрий рассеяния BS и 90R (рис.4.4 а и б) можно заметить, что линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна имеют асимметричную форму. Асимметрия пиков может быть связана либо с частичным нарушением правил отбора волнового вектора, либо с влиянием релаксационной моды на бриллюэновскую линию. Можно заметить, что

функция затухающего гармонического осциллятора ДНО (3.1) хорошо описывает только центральную и высокочастотную часть спектра и плохо отражает низкочастотное крыло спектра РМБ липида. В работе [13], помимо функции ДНО, для описания спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна липидов было предложено обобщенное гидродинамическое выражение (4.1), которое хорошо описывает асимметричную форму пиков и меняющийся с температурой низкочастотный вклад.

$$I(\omega) = \frac{I_0 \left[ \gamma_0 + \frac{\Delta^2}{\gamma(1+\omega^2/\gamma^2)} \right]}{\left[ \omega^2 - \omega_0^2 - \frac{\Delta^2 \omega^2 / \gamma^2}{1+\omega^2/\gamma^2} \right]^2 + \left[ \gamma_0 + \frac{\Delta^2}{\gamma(1+\omega^2/\gamma^2)} \right]^2}, \quad (4.1)$$

где  $\omega_0$  - сдвиг частоты,  $\gamma_0$  - фоновая ширина линии Мандельштама-Бриллюэна в высокочастотном пределе,  $\Delta^2$  - релаксационная часть продольной вязкости,  $\gamma$  - частота максимума релаксационной восприимчивости. Однако, функция затухающего гармонического осциллятора имеет меньшее количество параметров по сравнению с обобщенным гидродинамическим выражением и ее более чем достаточно для определения основных параметров дублета рассеяния Мандельштама-Бриллюэна - позиции и ширины. На рис.4.4 описание линий рассеяния Мандельштама-Бриллюэна функцией ДНО (3.1) приведено сплошной линией.

### ***Ненасыщенный фосфолипид DOPC***

На рисунке 4.5а представлены зависимости положения линии РМБ как функции температуры для всех геометрий рассеяния. Температура фазового перехода гель-флюид для DOPC составляет 253 К и на рис.4.5 отмечена в соответствии с имеющимися данными о температуре фазового перехода DOPC. При этой температуре наблюдается, что переход гель-жидкость проявляется в виде изменения наклона зависимости без видимого скачка. Ранее в работе [13] в случае фосфолипида DMPC при фазовом переходе был продемонстрирован скачок скорости звука почти на 15%.

На рис.4.5б приведено изменение ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, определяемой функцией ДНО, для различных геометрий рассеяния. Ширина линии РМБ отражает от соотношения между мнимой и действительной частями модуля упругости через (1.21). Ширина линии РМБ минимальна при низких температурах, что неудивительно, поскольку релаксация на этих температурах вносит маленький вклад в ширину линии Мандельштама-Бриллюэна. При повышении температуры до 270 К

наблюдается умеренное увеличение ширины пика, а затем на более высоких температурах ее значение резко снижается.

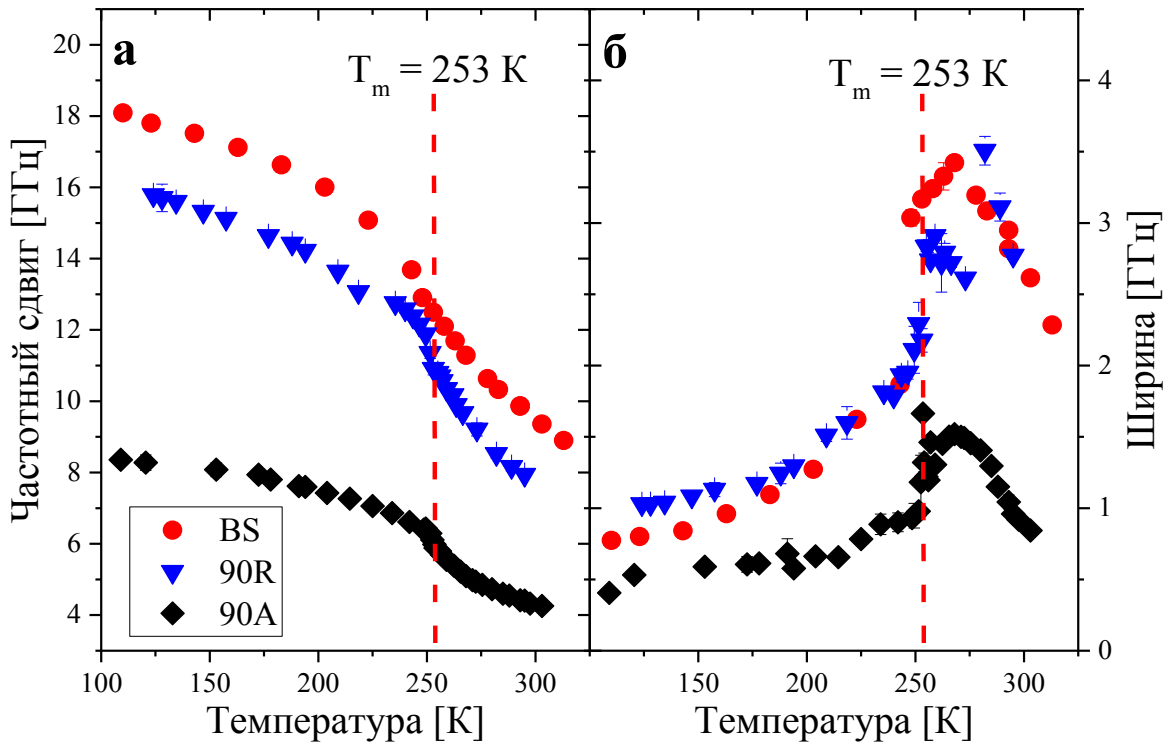


Рис.4.5. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширины (б) DOPC в геометриях BS (красные кружки); 90R (синие треугольники); 90А (черные ромбы).

### *Насыщенный фосфолипид DMPC*

Для насыщенного фосфолипида DMPC из параметров подгонки ДНО были определены позиции линий дублета Манделъштама-Бриллюэна, и проведен анализ аналогичный анализу для DOPC. На рисунке 4.6 представлены зависимости положения линии РМБ и ее ширины как функции температуры для всех геометрий рассеяния. В отличие от ненасыщенного липида DOPC ( $T_m = 253$  K) насыщенный фосфолипид DMPC имеет более высокую температуру фазового перехода ( $T_m = 297$  K). При температуре перехода гель-флюид наблюдается скачок в температурной зависимости позиции линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна, что находится в соответствии с имеющимися литературными данными [13]. Из представленных данных следует, что выраженная температурная зависимость позиции пика РМБ характерна как для насыщенных, так и для ненасыщенных фосфолипидных бислоев.

На рис.4.6б приведена температурная зависимость ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Аналогично ненасыщенному липиду, на низких температурах ширина линии РМБ минимальна. Однако, при повышении температуры значение ширины линии уменьшается после температуры фазового перехода 285 К. Это может указывать на взаимосвязь между фазовым переходом и релаксационным откликом.

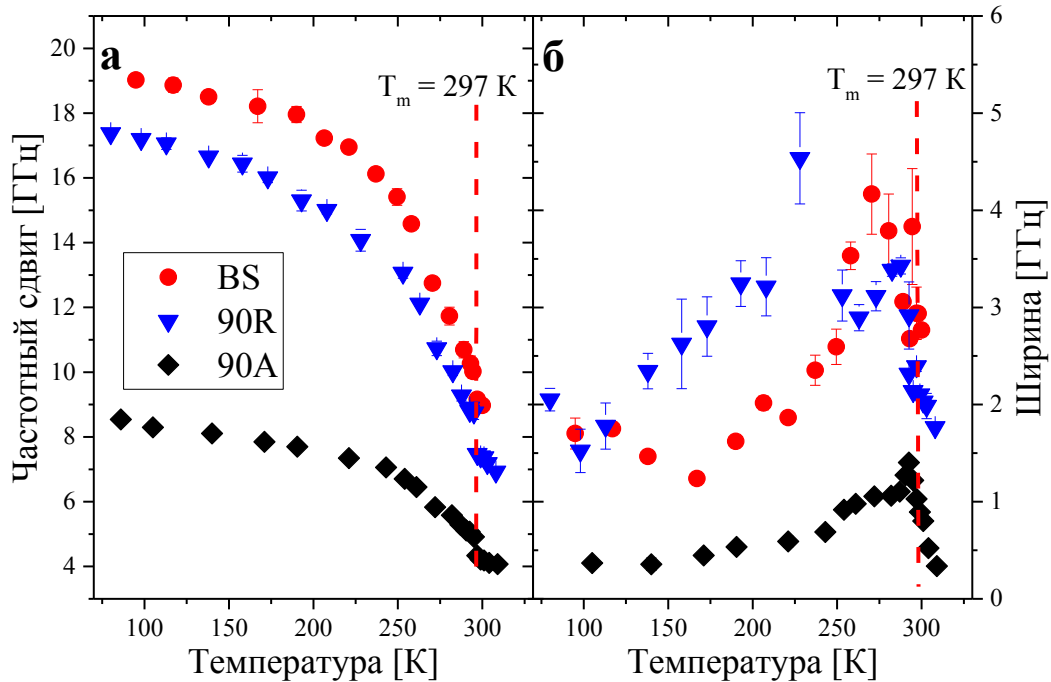


Рис.4.6. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширины (б) DMPC в геометриях BS (красные кружки); 90R (синие треугольники); 90A (черные ромбы).

### *Насыщенный фосфолипид DPPC*

На рисунке 4.7 приведены параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для насыщенного фосфолипида DPPC для двух геометрий рассеяния: BS – для фононов, распространяющихся в направлении ортогонально к бислоям, и для фононов, распространяющихся латерально. Можно заметить, что изменение частоты максимума пика РМБ с температурой ведет себя аналогичным образом, что и для других фосфолипидов. Фазовый переход DPPC на 314 К проявляется в температурной зависимости сдвига частоты РМБ в виде скачка, аналогично насыщенному липиду DMPC. Может ли данное поведение быть особенностью насыщенных фосфолипидных бислоев?

Температурные зависимости ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для двух геометрий рассеяния, представленные на рис.4.7б, демонстрируют поведение, описанное ранее для других планарных образцов фосфолипидов. Проявление максимума

в температурных зависимостях, представленных на рис.4.5б, 4.6б, 4.7б, для различных фосфолипидов на температуре около 275 К, указывает на существенный вклад релаксации в спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированных бислоев липидов, проявляющееся в виде уширения бриллюэновской линии.

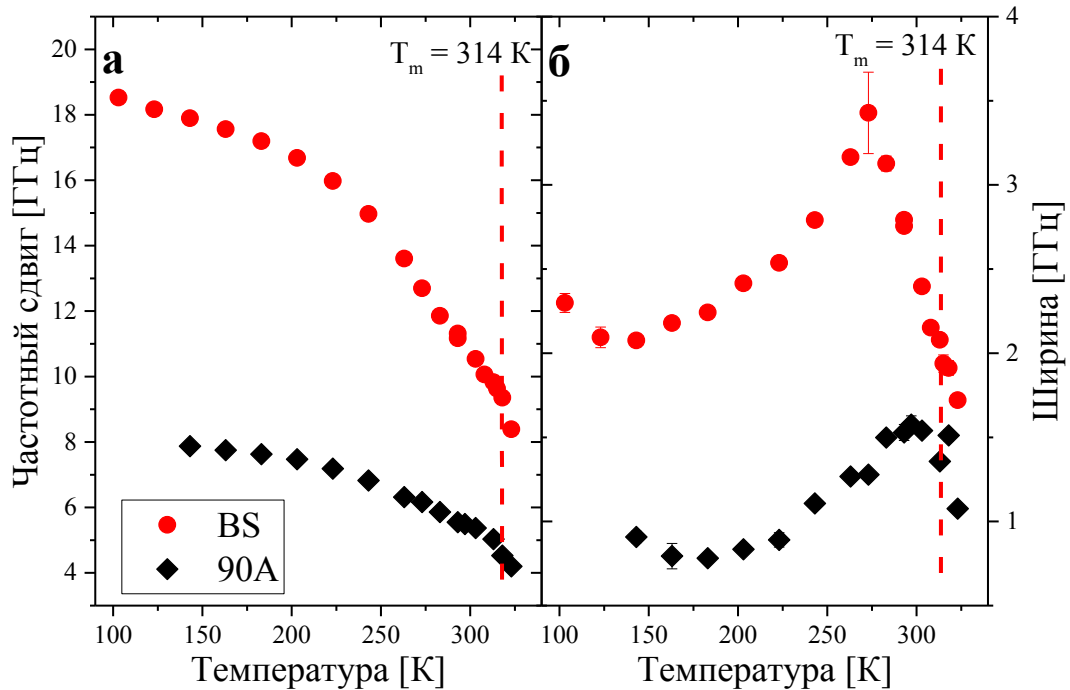


Рис.4.7. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширин (б) DPPC в геометриях BS (красные кружки); 90А (черные ромбы).

#### п.4.2.2. Обсуждение результатов. Температурные зависимости скоростей звука в разных геометриях рассеяния

Согласно формулам (2.11-2.13) из позиций дублета Мандельштама-Бриллюэна может быть определена скорость звука в латеральном (90А) и ортогональном (BS и 90R) направлениях. Показатель преломления был принят равным 1.45 [170] внутри всего температурного интервала, предполагая его слабую температурную зависимость.

На рисунке 4.8 представлены температурные зависимости скоростей гиперзвука для DMPC (рис. 4.8а) и DOPC (рис. 4.8б). Как видно из графиков, результаты для ортогонального направления, полученные в геометриях BS и 90R, хорошо согласуются между собой. Зависимости для латерального направления (90А) демонстрируют иную динамику. Представленные температурные зависимости демонстрируют существенные изменения упругих свойств липидного бислоя внутри всего исследованного диапазона температур как в ортогональном, так и в латеральном к слоям направлениях. Причем

данный эффект проявляется как для насыщенных DMPC, так и для ненасыщенных DOPC липидных систем. Можно заметить, что данные температурно-индуцированных изменений скорости звука DMPC, распространяющихся в направлении волнового вектора ортогонального к слоям (BS и 90R геометрии), согласуются со скоростями звука фосфолипида DMPC из работы [13] для геометрии обратного рассеяния света (представлены на рис.4.8а звездочками), несмотря на различные методы подготовки образца.

Температура перехода гель-флюид DMPC сопровождается скачкообразным изменением скорости звука (порядка ~15%) вблизи 297 К. Кроме того на приведенных результатах видны существенные изменения скорости звука ниже температуры перехода, когда фосфолипид находится в гелевой фазе, как в направлении ортогональном к слоям, так и латерально к ним. Зависимости скоростей звука вдоль и поперек слоев сходятся вблизи фазового перехода и после него уже в разупорядоченном состоянии флюида. В низкотемпературном пределе скорости звука вдоль слоев и ортогонально к слоям отличаются и составляют 3.15 и 3.65 км/с, соответственно.

Для ненасыщенного фосфолипида DOPC температурные зависимости скоростей звука в геометриях рассеяния 90А (волновой вектор вдоль слоев) и 90R (волновой вектор поперек слоев) представлены на рисунке 4.8б. Можно заметить, что, в отличие от зависимостей DMPC, температурное поведение скорости звука, распространяющегося в латеральном и ортогональном направлениях, близки внутри всего температурного интервала (в низкотемпературном пределе скорость звука составляет 3.15 и 3.3 км/с, для латерального и ортогонального направления, соответственно). Другой особенностью температурной зависимости скорости звука в случае DOPC является то, что фазовый переход гель-флюид проявляется в виде изменения наклона зависимости без явного скачка скорости звука на температуре фазового перехода 253 К. После прохождения фазового перехода внутри флюидной фазы липида скорость звука продолжает изменяться с ростом температуры. Вследствие более высокотемпературного фазового перехода мы не можем детектировать подобные изменения внутри флюидной фазы для случая DMPC из-за образования конденсата на поверхности образца при приближении к температуре 308К.

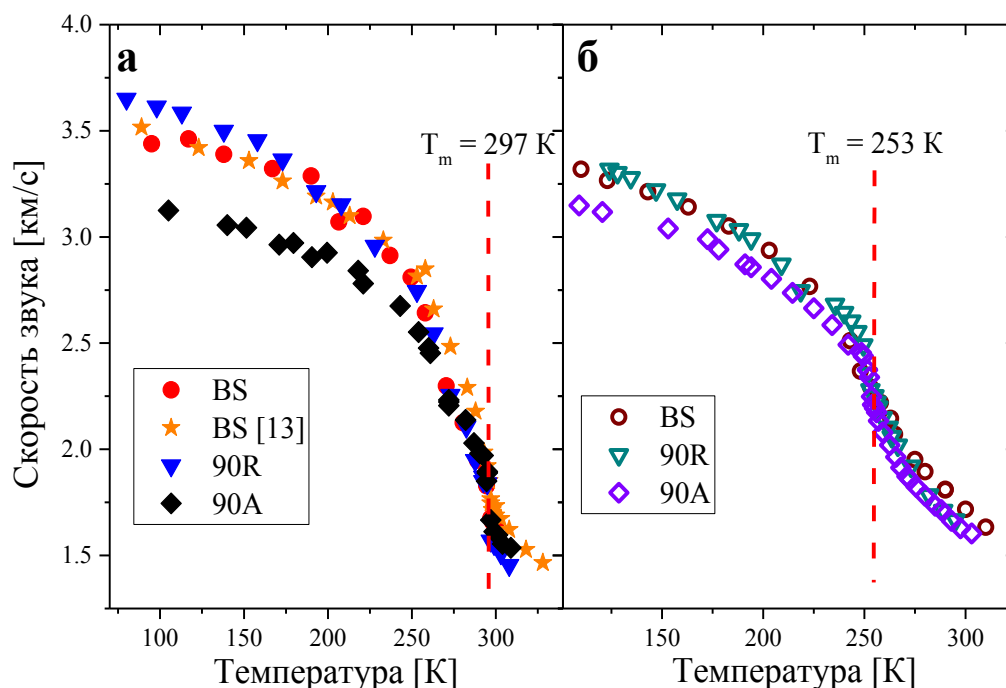


Рис.4.8. Температурные зависимости скоростей звука для насыщенного фосфолипида DMPC (а) и ненасыщенного фосфолипида DOPC (б) в разных геометриях рассеяния: ортогонально к слоям BS (кружки) и 90R (треугольник); латерально вдоль слоев 90A (ромб). Данные для геометрии BS из работы [13] показаны звездочками.

### *Сравнение результатов насыщенных и ненасыщенных фосфолипидов*

Для удобства сравнения температурно-индуцированных изменений упругих свойств DMPC и DOPC в зависимости от степени насыщенности фосфолипида рассмотрим температурные зависимости скоростей звука в геометриях рассеяния 90A и 90R, данные приведены на рисунке 4.9. Из приведенных зависимостей можно заметить, что поведение латеральной скорости звука (геометрия рассеяния 90A) совпадает внутри гелевой фазы ниже 225 K для насыщенного и ненасыщенного фосфолипидов. При приближении к фазовому переходу фосфолипидов температурные зависимости скоростей звука, для различных ориентаций начинают перекрываться и при температуре выше фазового перехода обоих липидов наблюдается наложение зависимостей для всех геометрий рассеяния и обоих фосфолипидов. Скорость звука при криогенных температурах составляет около 3.3 км/с, что в два раза больше, чем при физиологических (~1.5 км/с), что также характеризует изменение величины упругого модуля мембраны с температурой. Увеличение скорости звука при низких температурах наблюдается как для насыщенного, так и для ненасыщенного фосфолипидов. При этом характер

температурных зависимостей скоростей звука в различных направлениях схож, что опровергает ранее предложенную гипотезу [13] о слабой температурной зависимости латеральных упругих свойств липида DMPC.

Слабая зависимость скорости звука от степени насыщенности фосфолипидов во флюидном состоянии ожидаема для жидкого состояния, поскольку цис-конформеры DOPC оказывают незначительное влияние на неупорядоченное конформационное состояние углеводородных цепей. Температурные зависимости DOPC и DMPC имеют наибольшие различия в диапазоне 250-300 К, когда фосфолипидные бислои находятся в разных фазах (гелевой и флюидной). Это может указывать на влияние конформационных состояний молекул в температурную зависимость. Однако, согласие скоростей звука, распространяющихся вдоль слоев, в низкотемпературном диапазоне может быть объяснено тем, что упаковка ненасыщенных хвостов DOPC в бислоях может быть такой же плотной, как и для бислоев DMPC.

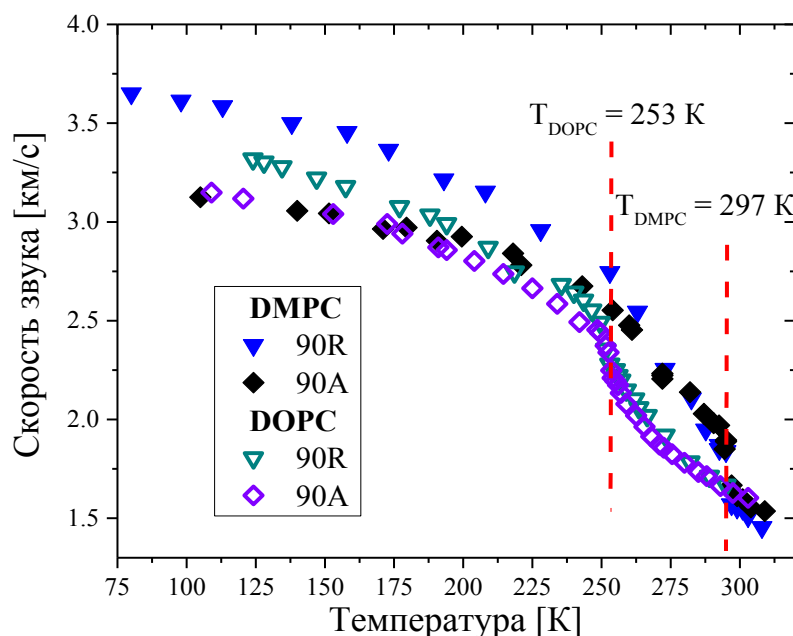


Рис.4.9. Температурные зависимости скоростей звука насыщенного DMPC и ненасыщенного DOPC в геометриях рассеяния 90A и 90R.

### *Сравнение результатов планарных образцов с данными для везикул*

Гипотеза о слабой температурной зависимости латеральных упругих свойств фосфолипида DMPC была выдвинута в работе [13] из предположения описания упругого модуля везикул комбинацией упругих модулей в латеральном и ортогональном к бислою направлениях. Ранее в главе 1, п.1.4.3 приведены основные результаты исследования и

схематическое изображение структурной организации бислоев в планарной и везикулярной формах.

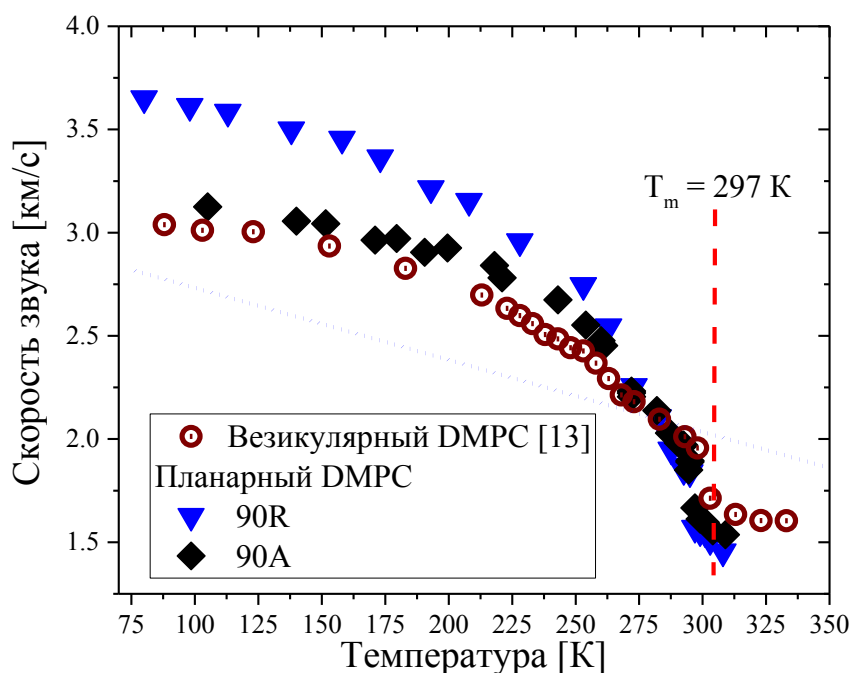


Рис.4.10. Температурные зависимости скоростей звука насыщенного фосфолипида DMPC в направлениях: латеральном к слоям (90A –ромб), ортогональном к слоям (90R –треугольник).

Полые кружки соответствуют везикулярной суспензии из [13]. Предсказание зависимости латеральной скорости звука из [13] представлено пунктирной линией.

Прямое сравнение температурных зависимостей скоростей звука в двух направлениях планарного образца с данными для везикулярного образца показано на рисунке 4.10, температурная зависимость скорости звука для везикул взята из [13]. При сравнении данных можно заметить, что латеральная скорость звука сильно изменяется с температурой, аналогично скорости звука в ортогональном направлении. При этом характер ее изменения не является квазилинейным, предсказание температурной зависимости из [13] также приведено на рисунке 4.10 пунктирной линией. Можно отметить, что температурная зависимость везикулярных образцов очень близка к зависимости, полученной для латерального направления в планарных образцах. Таким образом, можно предположить, что рассеяние света в суспензиях везикул фосфолипидов преимущественно описывается латеральными вкладами вдоль слоев. А данные для везикул могут быть использованы для оценки латеральной скорости звука, когда невозможно использование плоских образцов.

### *Сравнение с конформационными состояниями молекул*

Сильное температурно-индуцированное изменение скорости звука внутри гелевой фазы может быть связано с температурным заселением неупорядоченных конформационных состояний фосфолипидных систем внутри гелевой фазы. Концентрацию этих состояний можно оценить по данным комбинационного рассеяния света по интенсивности линии, соответствующей all-trans моде. В работах [171] и [137] доля all-trans состояний углеводородных цепей была определена с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света по моде  $1130\text{ см}^{-1}$  для насыщенного фосфолипида DMPC и ненасыщенного фосфолипида DOPC, соответственно. В представленных работах экспериментальные данные КРС были описаны следующим выражением:

$$f(T) = \frac{1 + g_k \exp(-U_k/k_B T)}{[1 + g_k \exp(-U_k/k_B T)]^2 + g_m \exp(-U_m/k_B T)}. \quad (4.2)$$

В выражении (4.2)  $g_k$  и  $U_k$  обозначают вырождение и энергию перехода скрученного состояния одной углеводородной цепи,  $g_m$  и  $U_m$  характеризуют вырождение и энергию расплавленного состояния молекулы липида.

Для комплексного анализа температурные зависимости скоростей звука были нормированы в низкотемпературном пределе. На рисунке 4.11 и 4.12 приведены нормированные температурные зависимости скоростей звука для геометрий рассеяния 90A (волновой вектор вдоль слоев), 90R и BS (волновой вектор поперек слоев) в сравнении с температурной зависимостью доли all-trans состояний углеводородных цепей (данные КРС по DMPC из [171], по DOPC из [137]). Линиями показаны модельные описания доли all-trans конформаций из (4.2), взятые также из указанных работ.

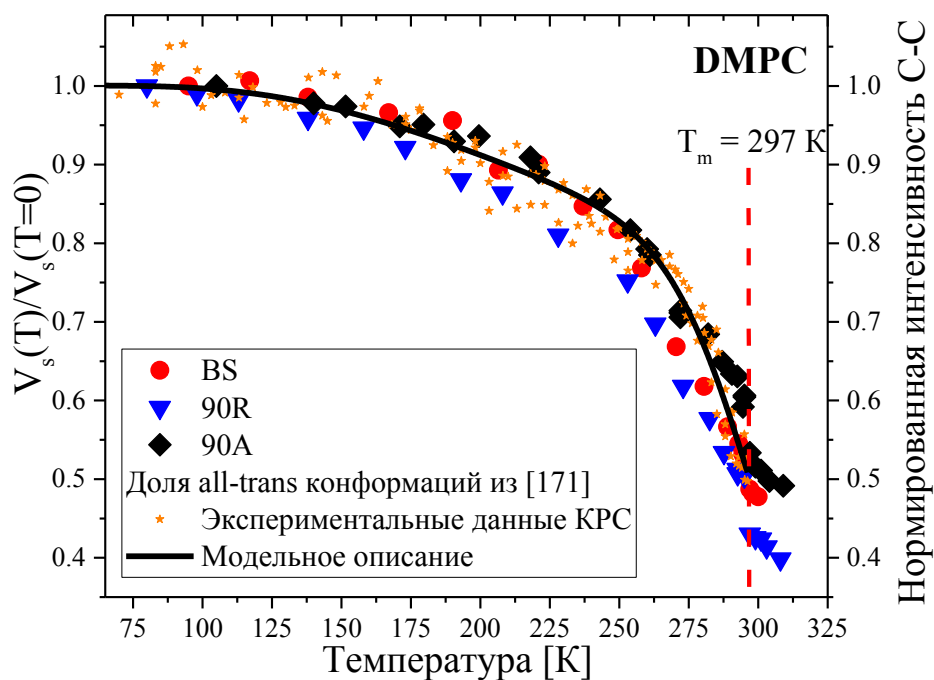


Рис.4.11. Нормированные температурные зависимости скоростей звука для геометрий рассеяния BS (кружки), 90R (треугольник) и 90A (ромб) и температурная зависимость доли all-trans состояний углеводородных цепей из КРС из [171] для фосфолипида DMPC.

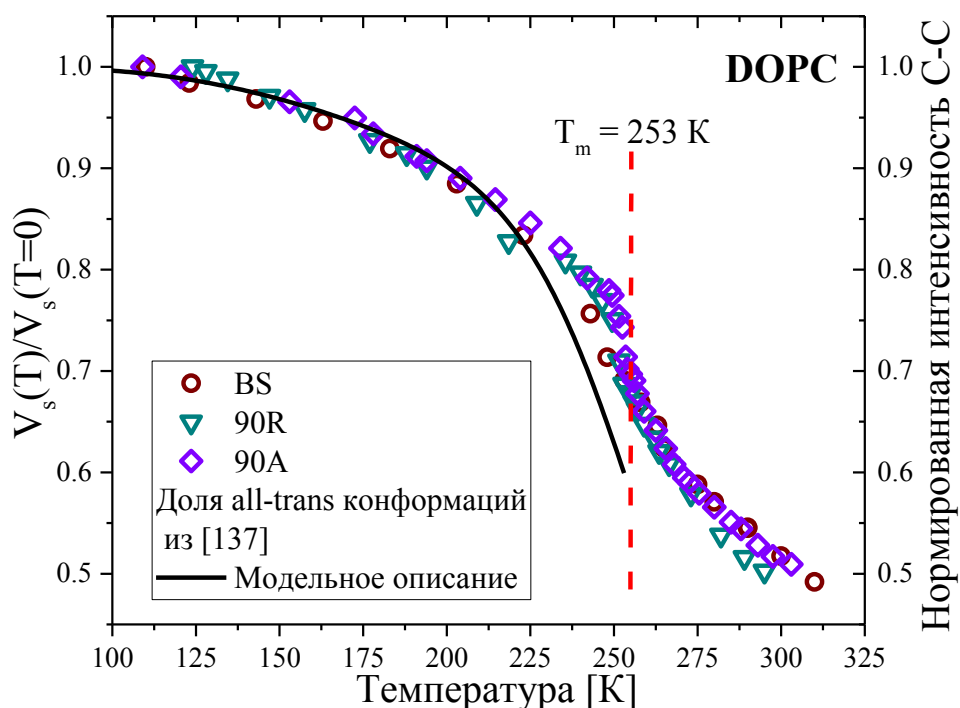


Рис.4.12. Нормированные температурные зависимости скоростей звука для геометрий рассеяния BS (кружки), 90R (треугольник) и 90A (ромб) и температурная зависимость доли all-trans состояний углеводородных цепей из КРС из [137] для фосфолипида DOPC.

Температурные зависимости из данных РМБ для насыщенного фосфолипида DMPC внутри всего температурного интервала хорошо коррелируют с долей all-trans конформаций из данных КРС [171] вплоть до фазового перехода липида, как показано на рис.4.11. Однако подобной взаимосвязи с долей неупорядоченных конформаций не наблюдается для ненасыщенного фосфолипида DOPC. При низких температурах в случае DOPC доля неупорядоченных конформационных состояний из данных по экспериментам КРС хорошо согласуется с данными бриллюэновского эксперимента, однако при приближении к фазовому переходу ( $T_m = 253$  К) зависимости расходятся (рис.4.12). Исходя из проведенного сравнения, можно сделать вывод о том, что связь между скоростью звука и долей all-trans состояний не является универсальной, а это означает в свою очередь, что в температурную зависимость скорости звука вносит вклад не только разупорядочивание углеводородных хвостов с ростом температуры.

### **§ 4.3. Двойные системы синтетических фосфолипидов**

#### **п.4.3.1. Влияние холестерина на фазовый переход фосфолипидных систем**

Влияние холестерина на фазовый переход фосфолипидных систем исследовалось в геометрии обратного рассеяния, которая несет информацию об упругих свойствах в направлении ортогональном к слоям, и в геометрии рассеяния 90А, из анализа данных которой можно исследовать поведение упругих свойств в латеральном направлении. Подробное описание изготовления смесей описано в п.4.1.1. На рисунках 4.13 и 4.14 приведены температурные изменения параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для насыщенного фосфолипида DMPC и его смесей с холестерином в геометрии BS и 90А, соответственно.

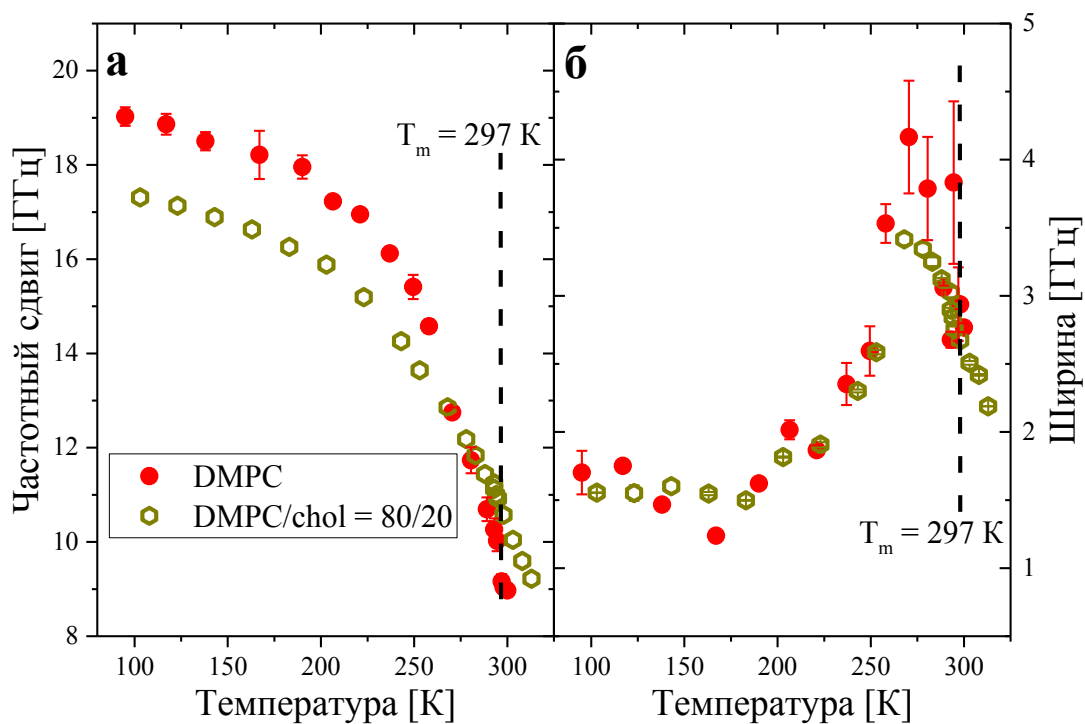


Рис.4.13. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширин (б) в геометрии BS для насыщенного фосфолипида DMPC (кружки) и смеси DMPC/chol = 80/20 (пустые шестиугольники).

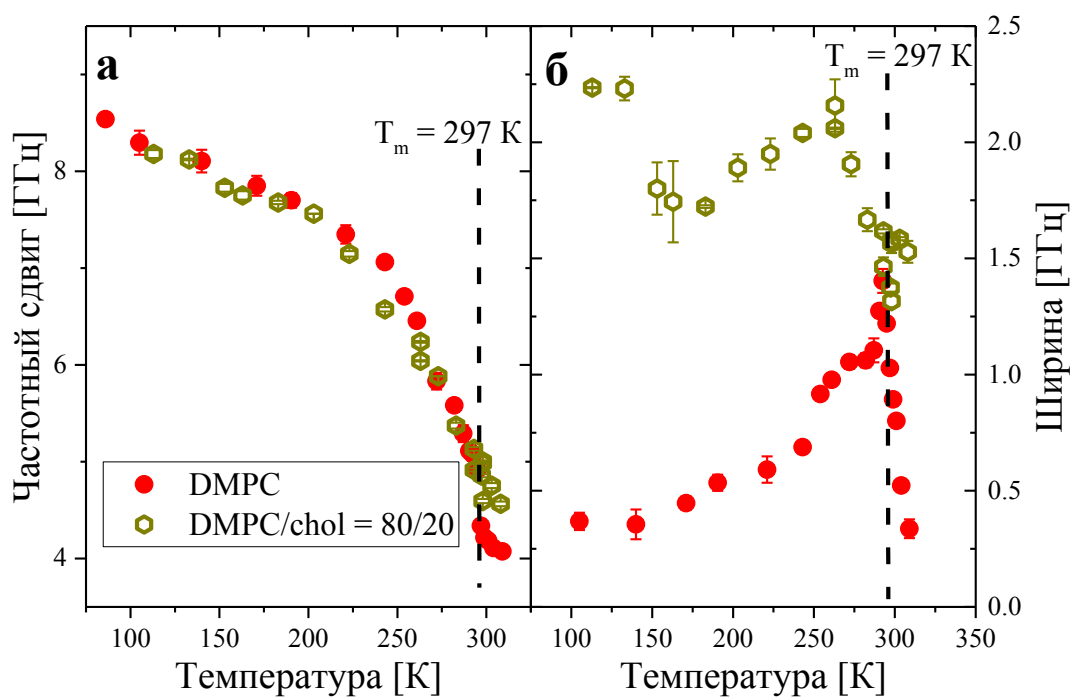


Рис.4.14. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширин (б) в геометрии 90А для насыщенного фосфолипида DMPC (кружки) и смеси DMPC/chol = 80/20 (пустые шестиугольники).

Из представленных зависимостей можно заметить, что добавление холестерина размывает фазовый переход фосфолипидной мембраны. В случае анализа данных в геометрии рассеяния назад (рис.4.13) температурная зависимость позиции линии РМБ с добавлением холестерина идет ниже чем в случае чистого липида, а фазовый переход не проявляется в виде скачка позиции линии РМБ. Данный эффект может свидетельствовать о том, что холестерин, встраиваясь в бислои, выступает в роли дефекта и не позволяет также плотно упаковаться слоям. Внутри разупорядоченной флюидной фазы наоборот наблюдается увеличение позиции линии РМБ, что может указывать на то, что липидный бислой не до конца разупорядочен. При этом зависимость ширины пиков рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, представленная на рис.4.13б, для смеси повторяет зависимость для чистого липида.

В латеральном направлении зависимости параметров спектра РМБ приведены на рисунке 4.14, зависимости частотного сдвига при понижении температуры, внутри гелевой фазы, совпадает для исследуемых образцов, что свидетельствует о том, что добавление холестерина не влияет на плотность упаковки фосфолипидных молекул в бислое. Выше перехода гель-флюид также можно заметить, что холестериновые дефекты делают мембрану несколько жестче или же мешают ей полностью разупорядочиваться. Однако ширина линии РМБ в геометрии рассеяния 90А больше, чем у монокомпонентного образца. Это может указывать на то, что структурные изменения при добавлении холестерина в мембрану связаны с изменением релаксационной моды с температурой.

На рисунке 4.15 приведены зависимости скоростей звука исследуемых систем липидов в ортогональном и латеральном направлениях к слоям. Из данных зависимостей можно оценить, что добавление холестерина приводит к изменению скорости звука внутри гелевой фазы на 9% для направления ортогонального слоям. Добавление холестерина в мембрану размывает фазовый переход температурной зависимости скорости звука. При этом холестериновые дефекты препятствуют полному разупорядочиванию фосфолипидов во флюидной фазе.

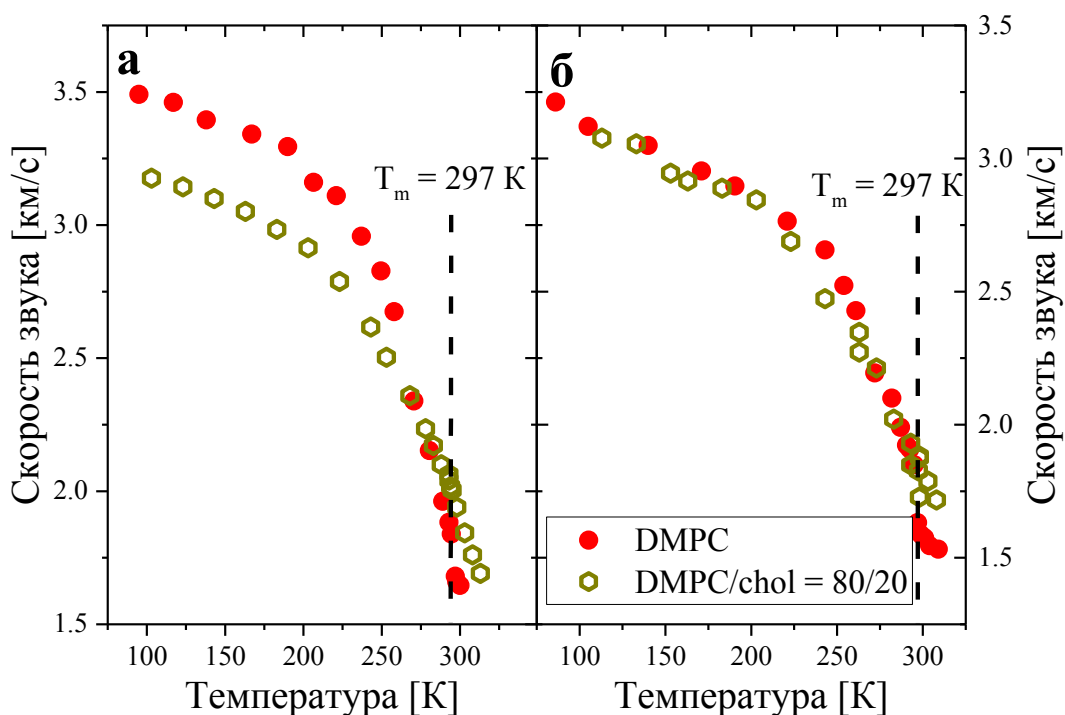


Рис.4.15. Температурные зависимости скоростей звука (а) ортогонально слоям и латерально слоям (б) для насыщенного фосфолипида DMPC (красные кружки) и смеси DMPC/chol (пустой шестиугольник желтый).

#### п.4.3.2. Температурное поведение двойной смеси в области сосуществования фаз

Смесь фосфолипидов DPPC и DOPC была приготовлена в соответствии с описанием в п.4.1.1. Концентрация 65/35 по молям согласно фазовой диаграмме, построенной на основании данных комбинационного рассеяния света [169], соответствует сосуществованию разупорядоченной и упорядоченной фаз фосфолипидов, которые при комнатных условиях находятся в различных состояниях. На рисунке 4.16 приведены зависимости позиции и ширины линии РМБ с температурой в геометрии рассеяния BS. Температурная зависимость как позиции, так и ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна смеси DPPC/DOPC повторяет зависимость DOPC. Данная смесь является однородной и, согласно фазовой диаграмме, области различных фаз сосуществуют, стоит исключить вариант расслоения фосфолипидов по составу.

В геометрии обратного рассеяния света регистрируется отклик в ортогональном к бислоям направлении. Ввиду различной структуры насыщенного DPPC и ненасыщенного DOPC фосфолипидов и, следовательно, их жесткости, при сжатии слое в ортогональном к ним направлении в упругий отклик мембран будут вносить вклад более мягкие

составляющие. Однако, данный эффект не должен влиять при исследовании отклика в латеральном (вдоль слоев) направлении.

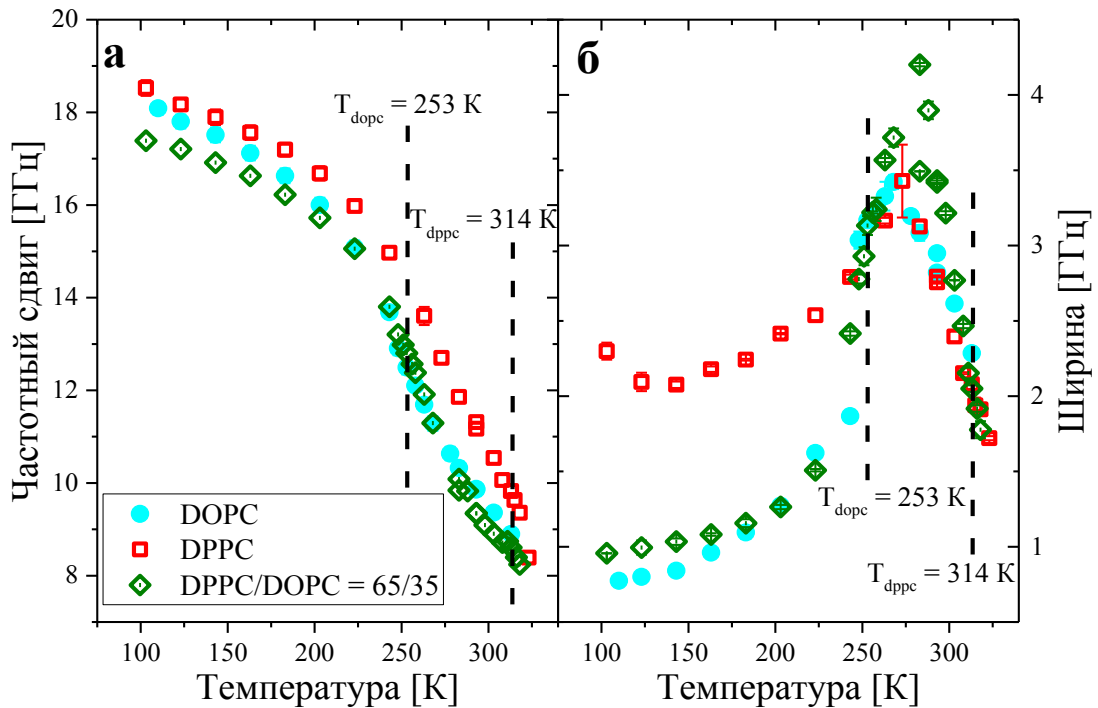


Рис.4.16. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширины (б) в геометрии BS для ненасыщенного фосфолипида DOPC (кружки), насыщенного липида DPPC (квадрат) и смеси DPPC/DOPC = 65/35 (ромб).

Температурно-индуцированные изменения латеральных компонент были исследованы с применением геометрии рассеяния 90А, результаты исследования представлены на рисунке 4.17. Температурная зависимость сдвига линии рассеяния мандельштама-Бриллюэна смеси DPPC/DOPC, характеризующие латеральные упругие свойства, проявляет фазовые переходы обоих фосфолипидов для DPPC температура перехода составляет 314К, а для DOPC 253К. Однако, внутри гелевой фазы зависимость идет ниже зависимостей обоих фосфолипидов, что может быть объяснено наличием дефектов в мембране. Температурная зависимость ширины линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна также демонстрирует два максимума, находящиеся на позиции максимумов ширины компонент смеси. Данный результат демонстрирует потенциал применения геометрии рассеяния 90А для исследования латеральных свойств гидратированных фосфолипидных пленок и их смесей методом спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.

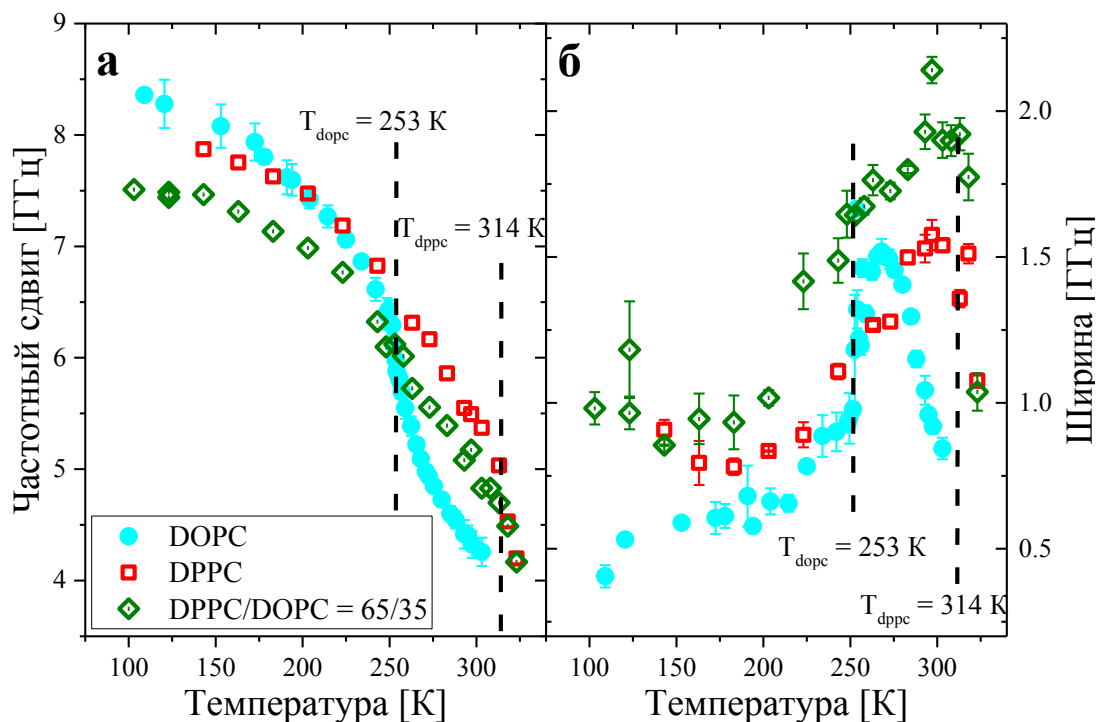


Рис.4.17. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширины (б) в геометрии 90А для ненасыщенного фосфолипида DOPC (кружки), насыщенного липида DPPC (квадрат) и смеси DPPC/DOPC = 65/35 (ромб).

## § 4.4. Биологические мембраны эритроцитов

### п.4.4.1. Изготовление образцов: выделение мембран эритроцитов из крови

Первоначальная обработка включала отделение большой массы плазмы крови от эритроцитарной массы путем осаждения. Поскольку плотность эритроцитов превышает плотность плазмы крови, поэтому клетки медленно оседают с течением времени. Добавление в пробирку антикоагулянта не дает эритроцитам слипаться вместе в этом процессе. Для получения цитоплазматических мембран отмытые эритроциты разрушались осмотическим шоком по методу Dodge [172]. В соответствии с примененным протоколом эритроциты были трижды отмыты от плазмы и белых клеток крови путем центрифугирования при 2000 об/мин (~300g) с добавлением физиологического раствора. Для выделения мембран эритроциты были помещены на 30 минут при  $T = 4^\circ\text{C}$  в лизирующий раствор. В процессе лизиса осмотическое давление заставляет воду проникать в клетки крови, приводя к их разрыву. Затем мембраны эритроцитов повторно отмывались от клеточных компонент и гемоглобина при 10000

об/мин ( $\sim 7000g$ ) в течение 10 минут. Выделенные мембраны дополнительно подвергались отмыванию в дистиллированной воде для удаления солей, затем избыток жидкости убирался путем центрифугирования при 15000 об/мин ( $\sim 10000g$ ) в течение 30 минут.

Однако, при большой насыщенности крови гемоглобином мембраны могут не до конца отмыться и иметь красноватый оттенок. В качестве метода дополнительной очистки мембран на практике применяется процедура замораживания итоговой суспензии в жидком азоте. Быстрое образование ледяных кристаллов приводит к разрыву мембран на более мелкие фрагменты, в результате чего удастся эффективнее удалить остатки клеточных компонент из суспензии. Затем также из суспензии удалялся избыток жидкости путем центрифугирования при больших оборотах, как описано ранее. Планарные образцы получали путем осаждения суспензии теней эритроцитов на стеклянную подложку. Гидратирование осуществлялось в результате помещения образца с осажденными мембранами эритроцитов в герметичную камеру с 98% влажностью в течение 24 часов.

#### **п.4.4.2. Анализ и обсуждение экспериментальных результатов. Температурные зависимости параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Сравнение температурного поведения с модельными системами**

На рисунке 4.18 представлены температурные зависимости параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (позиции 4.18а и полной ширины на половине высоты 4.18б) для выделенных мембран эритроцитов (RBC-мембраны) в геометрии рассеяния BS. Для сравнения характера поведения на рисунках также приведены соответствующие температурные зависимости для насыщенного фосфолипида DPPC, смеси DMPC/cho1 = 80/20 и тонкого образца воды ( $H_2O$ ). Температурная зависимость позиции линии РМБ мембран эритроцитов демонстрирует сильное изменение с температурой, как и в случае образцов синтетических фосфолипидов. Однако, зависимость находится систематически выше, чем для синтетических липидных систем. Учитывая схожий показатель преломления синтетических и биологических мембран, более высокая позиция пика рассеяния Мандельштама-Бриллюэна характеризует большую скорость звука и, соответственно, больший модуль упругости. При низких температурах зависимость позиции пика РМБ мембран уходит вплоть до 21.2 ГГц, что больше, чем частота рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для объемного льда (20.5 ГГц).

Однако, температурная зависимость позиции линии РМБ для воды при низких температурах почти не изменяется, преодолевая температуру плавления льда  $0^{\circ}\text{C}$ , частота бриллюэновской линии скачкообразно изменяется с 19.5 ГГц до 7 ГГц и с увеличением температуры продолжает расти. Это указывает на то, что большой частотный сдвиг пика РМБ не связан с образованием льда в образце, вероятно, данный эффект связан с наличием большого количества белков в мембране эритроцитов.

Согласно литературным данным, в мембране эритроцита количество белков составляет около 50% от общей массы мембраны, липидов 33%, холестерина 11%, а остальные компоненты представляют углеводы и другие [173]. Температурная зависимость частоты линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна RBC-мембран не проявляет явного фазового перехода, как это демонстрируют насыщенные фосфолипиды DMPC или DPPC. Вероятно фазовый переход мембран эритроцитов сильно размыт из-за наличия холестерина или белков. Ширина линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна увеличивается с температурой без выделенного максимума, как показано на рис.4.18б. Такое поведение не демонстрировала ни одна система синтетических фосфолипидов, что дополнительно подтверждает вклад иных компонент в спектр РМБ.

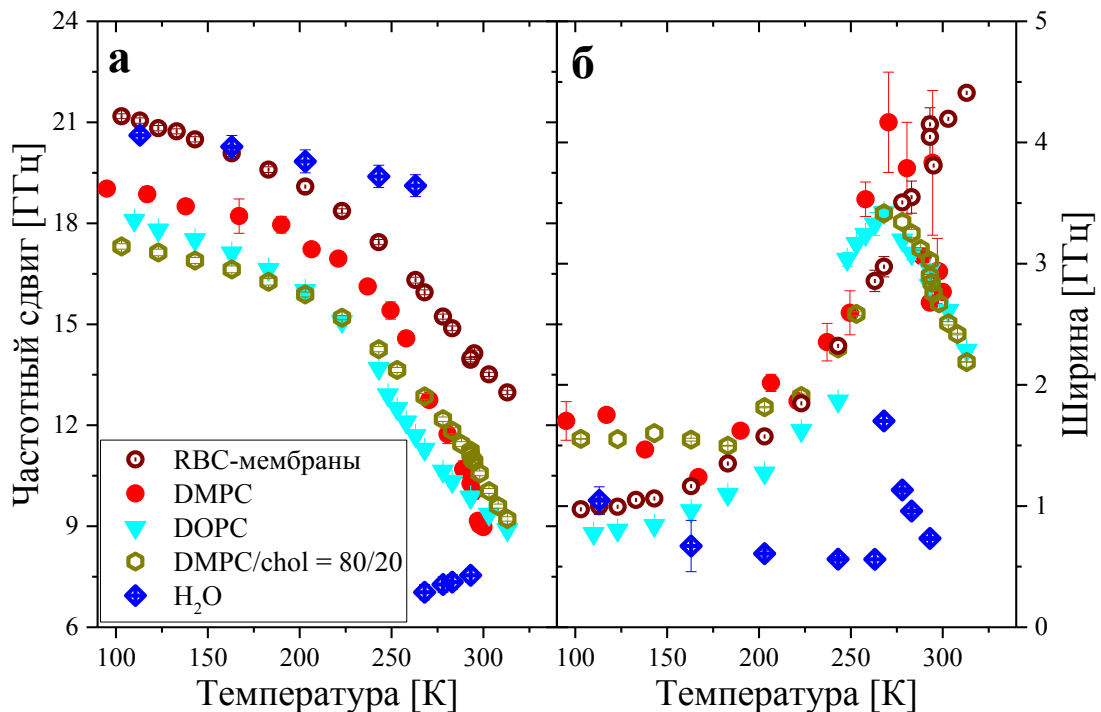


Рис.4.18. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширин (б) в геометрии рассеяния BS для выделенных мембран эритроцитов (открытые кружки), насыщенного фосфолипида DMPC (кружки), ненасыщенного фосфолипида DOPC (треугольники), смеси DMPC/chol= 80/20 (пустые шестиугольники) и воды (ромбы).

В геометрии рассеяния 90А, которая характеризует латеральные упругие свойства, зависимость также идет выше температурных зависимостей для модельных липидов, как показано на рис.4.19. Аналогичным образом, температурная зависимость эритроцитов не демонстрирует явного фазового перехода. Однако, ширина линии РМБ RBC-мембран демонстрирует максимум в области 275К, аналогично фосфолипиду DMPC.

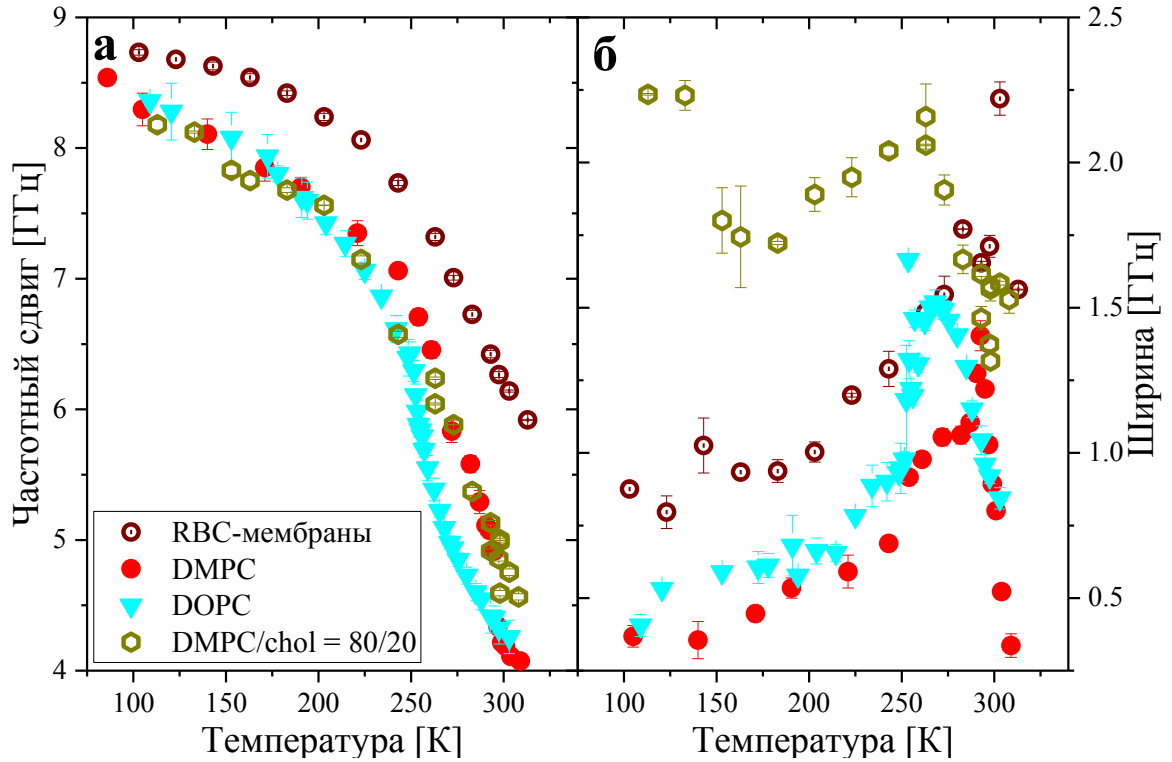


Рис.4.19. Температурные зависимости позиций линий РМБ (а) и их ширины (б) в геометрии рассеяния 90А для выделенных мембран эритроцитов (открытые кружки), насыщенного фосфолипида DMPC (кружки), ненасыщенного фосфолипида DOPC (треугольники), смеси DMPC/chol= 80/20 (пустые шестиугольники).

На рисунке 4.20 приведены зависимости скоростей звука, определяемых из спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна согласно выражениям (2.11, 2.13), для выделенных мембран эритроцитов в различных ориентациях образца. Наблюдается различие между различными ориентациями BS и 90А образца, характеризующие ортогональные к слоям и латеральные скорости звука. Скорости звука в низкотемпературном пределе составляют 3885 м/с и 3285 м/с, соответственно. В составе мембран большую часть составляет холестерин, который размывает фазовый переход в температурной зависимости скорости звука. Анизотропия скоростей звука также может быть объяснена наличием сторонних компонент в составе мембраны, например белков.

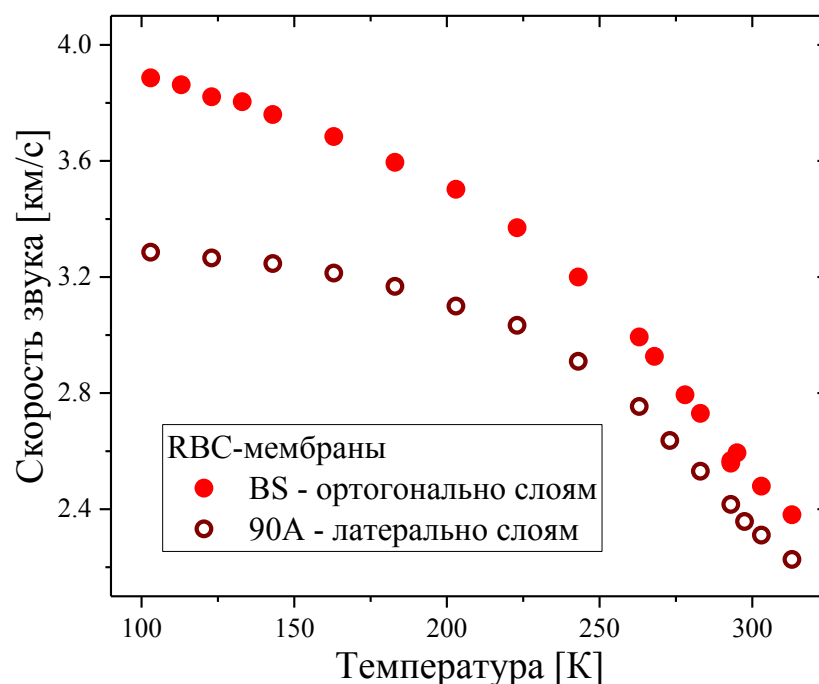


Рис.4.20. Температурные зависимости скорости звука, определенной из позиции линий РМБ, в геометрии рассеяния назад (кружки) и в геометрии рассеяния 90А (пустые кружки).

#### § 4.5. Заключение по исследованию фосфолипидных мембран методом РМБ

В ходе работы методом спектроскопии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна было проведено исследование упругих свойств планарных слоев насыщенных (DPPC, DMPC) и ненасыщенного (DOPC) фосфолипидов, их смесей и смесей с холестерином в гидратированном состоянии в широком диапазоне температур от 90 до 320 К, включающем в себя как область гелевого, так и область флюидного состояния для рассмотренных фосфолипидов. Использование планарных систем позволило изучить температурно-индуцированные изменения упругих свойств вдоль слоев (в латеральном направлении) и в направлении ортогональном к слоям.

Было установлено, что скорости звука как в латеральном направлении, так и в направлении, перпендикулярном плоскости мембраны, существенно возрастают при понижении температуры для липидных систем, причем эти эффекты внутри гелевой фазы более существенны, чем при температуре фазового перехода фосфолипидов. Вероятно, сильная температурная зависимость упругих свойств ниже температуры фазового перехода обусловлена изменениями в конформационной структуре фосфолипидов. При этом было обнаружено, что латеральные скорости звука насыщенных и ненасыщенных

фосфолипидных бислоев близки внутри гелевой фазы, что свидетельствует о незначительном влиянии изгиба C=C углеводородных хвостов на плотность упаковки липидов. При сравнении планарных образцов с суспензией везикул было получено, что в температурную зависимость везикул вносят вклад преимущественно латеральные эффекты. Добавление холестерина в систему липидов размывает фазовый переход фосфолипида, а при встраивании в бислои холестерин выступает в роли дефекта и не позволяет плотно упаковаться слоям внутри гелевой фазы, и также он препятствует полному разупорядочиванию фосфолипидов во флюидной фазе.

Также было произведено сравнение результатов для модельных липидных систем со спектрами рассеяния Мандельштама-Бриллюэна мембран эритроцитов. Температурная зависимость сдвига линии РМБ мембран эритроцитов ведет себя липидоподобным образом. Большее значение позиции линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и, как следствие, большая скорость звука мембран при низких температурах, вероятно, связано с наличием большого количества белков в мембране эритроцитов. Исходя из экспериментальных данных, наблюдается анизотропия скорости звука мембран эритроцитов, что также может быть следствием вклада белковых компонент.

## **ГЛАВА 5. Коллагенсодержащие ткани: бычья вена и перикард**

В данной главе рассмотрена возможность применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для исследования упругого отклика тканей бычьей яремной вены и перикарда, актуальных в области сердечно-сосудистой хирургии. Данные типы тканей имеют различную структуру и белковый состав, ткань перикарда характеризуется структурной однородностью и высоким содержанием коллагена, в то время как венозная стенка состоит из волокон коллагена и эластина и имеет выделенное направление. Исследование было проведено на разных стадиях преимплантационной обработки тканей: без обработки (fresh), фиксированных диэпоксидом (DE) и сохраненных после обработки в спиртовых растворах 10% (DE+10) и 20% (DE+20).

### **§ 5.1. Проведение эксперимента: подготовка образцов тканей и параметры эксперимента рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Биоматериалы были предоставлены национальным медицинским исследовательским центром им. Е.Н. Мешалкина. Свежие стенки яремной вены и перикард крупного рогатого скота были получены непосредственно после забора биоматериала у здоровых животных массой тела 400–500 кг и несколько раз промывались 0.9% водным раствором NaCl. Данные типы тканей имеют различную структуру и белковый состав, ткань перикарда является однородной и состоит преимущественно из коллагена, в то время как венозная стенка представляет собой трубкообразный фрагмент сосуда с гладкой внутренней стороной, богатой эластиновыми и коллагеновыми волокнами, и внешней стороной, богатой липидными композитами, представляющими собой скопления тонких волокон. Окружающая соединительная ткань была тщательно удалена, затем лоскут ткани отправлялся на исследования –нативные (fresh) образцы, а остальная часть претерпевала процедуру преимплантационной обработки.

Биоматериал консервировали в 5% растворе диглицидилового эфира этиленгликоля (0.1 М HEPES-буфер, pH 7.4, при комнатной температуре с заменой на 3-й день) в течение 14 дней (DE). После консервации часть образцов хранили в эфире до тестирования, вторую и третью части перемещали в растворы для хранения, содержащие 1% антимикробной смеси (феноксэтанол, 1,2-октандиол и сорбиновая кислота) и 10% или 20% этанола (образцы DE + 10 и DE + 20, соответственно). Таким образом, исследование было проведено на четырех группах образцов стенки вены и перикарда: 1.

свежие образцы тестировались сразу после отбора (не позднее 6 ч после смерти); 2. образцы, обработанные DE, тестировались сразу после сшивания; 3. Законсервированные образцы 10% образцов тестировались после 20-дневного хранения в растворе, содержащем 10% этанола; 4. 20% образцов тестировались после 20-дневного хранения в растворе, содержащем 20% этанола. Непосредственно перед экспериментом все исследуемые образцы промывали в физиологическом растворе не менее 3 раз. Для проведения эксперимента были приготовлены прямоугольные образцы с характерными размерами 5×10 мм. Типичная толщина гидратированных образцов составляла около одного миллиметра для вен и 0.5–1 мм для перикардиальной ткани.

В ходе исследования биологических тканей методом рассеяния Мандельштама – Бриллюэна было обнаружено, что рассмотрение не только полностью гидратированной, но и высушенной ткани, позволяет получить дополнительную информацию о свойствах материала. После эксперимента РМБ гидратированные образцы высушивали мягко при комнатных условиях, а затем в вакууме. Эксперимент повторяли для высушенных образцов, помещенных в вакуумную камеру, избегая воздействия комнатной влажности. Схема экспериментальной установки рассеяния Мандельштама-Бриллюэна представлена на рис.2.7 в главе 2, параграфе 2.3. Образцы тканей зажимались между стеклянными пластинами во избежание изменения уровня гидратации в процессе эксперимента и располагались вертикально, таким образом была реализована схема рассеяния назад. Для гидратированных и высушенных образцов использовались свободные спектральные диапазоны 18 и 27 ГГц, соответственно.

## **§ 5.2. Анализ экспериментальных результатов**

### **п.5.2.1. Характерный спектр перикардиальной ткани, определение параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Для каждого образца спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна были измерены в нескольких различных точках образца. Качественно все спектры РМБ имели схожую форму. Типичный спектр РМБ гидратированного свежего перикарда (стоксова часть) представлен на рис.5.1. Этот спектр демонстрирует пик, соответствующий неупругому рассеянию света на акустических фонах с видимым максимумом вблизи 8 ГГц. Положение максимума этого пика выше, чем максимум пика РМБ воды, который в данных условиях находится вблизи 7.55 ГГц. Линия РМБ перикардиальной ткани

асимметрична, что обусловлено нарушением правила отбора волнового вектора в непрозрачном материале и вкладом релаксационных процессов [13]. В случае высушенной ткани перикарда спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна содержит только один пик на частоте около 19 ГГц, которая соответствует коллагеновым волокнам [47]. Измеренные спектры были описаны функцией затухающего гармонического осциллятора ДНО (3.1), из параметров которой были определены позиции дублета Мандельштама-Бриллюэна. На рисунке 5.1 характерные РМБ спектры гидратированного и высушенного перикарда представлены пустыми кружками и квадратами, соответственно, подгонки функцией ДНО приведены сплошными линиями.

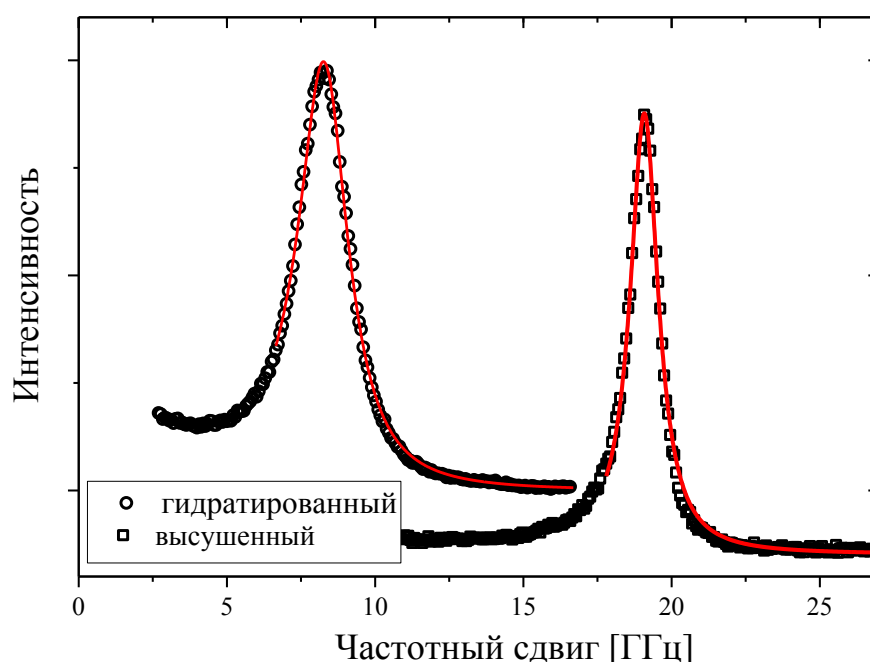


Рис.5.1. Спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированного (кружки) и высушенного (квадрат) перикарда. Подгонка спектров РМБ функцией ДНО представлено линиями.

### п.5.2.2. Характерный спектр венозной стенки, определение параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна

Поскольку ткань венозной стенки имеет гладкую сторону на внутренней части сосуда и ворсистую структуру на внешней части, то были проведены измерения от обеих сторон. На рисунке 5.2 приведены репрезентативные спектры от внутренней и внешней сторон обеих вен. Для внутренней стороны в спектре проявляется пик на частоте  $\sim 8$  ГГц. Также в некоторых спектрах РМБ гидратированных вен присутствует высокочастотное плечо на частоте  $\sim 11.5$  ГГц. В случае внешней стороны наблюдается большой разброс

спектров РМБ в различных точках, а также форма линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна имеет бимодальную форму. В зависимости от области измерения наблюдается перераспределение интенсивности между компонентами с частотными сдвигами 8 ГГц и 8.8 ГГц. Это свидетельствует о существенной неоднородности образцов, вызванной как неоднородным составом ткани, так и флуктуациями воды в материале. В целом спектры вен, взятые от разных животных, совпадают как для внутренней, так и для внешней стороны.

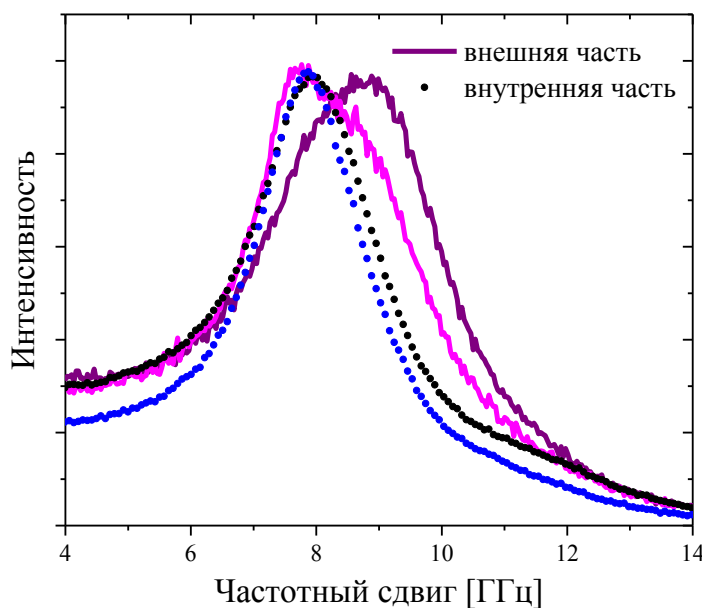


Рис.5.2. Репрезентативные спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированной венозной стенки: внешняя часть (круг) и внутренняя часть (линия).

Поскольку у образцов вены присутствует выделенное направление, спектры РМБ гладкой стороны вены были измерены для двух ориентаций ткани относительно направления поляризации лазерного излучения - параллельно и перпендикулярно по отношению к волокнам ткани. Согласно поляризационным измерениям, ориентация волокон ткани относительно направления лазерного излучения не оказывает эффекта на спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Далее спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированных вен: необработанных (fresh), зафиксированных DE, зафиксированных DE и законсервированных в спирте (10% или 20% раствор), были исследованы только с внутренней гладкой стороны. Поскольку спектр РМБ вен демонстрирует бимодальное поведение, все спектры были описаны суммой двух ДНО, как показано на рисунке 5.3. Это означает, что в освещённом объёме образца сосуществуют области с разными модулями упругости. Размер этих областей должен

составлять не менее нескольких сотен нанометров, чтобы сформировать отдельные пики Манделъштама-Бриллюэна.

В случае высушенной ткани венозной стенки спектр РМБ демонстрирует наличие двух пиков, представлено на рис.5.3. Низкочастотный пик имеет частоту около 9 ГГц и не наблюдается для некоторых пространственных местоположений лазерного пятна. Данный вклад появляется в спектрах высушенных образцов частично из-за их более высокой прозрачности, что увеличивает влияние внешней неоднородной части вены. Вероятно, этот пик соответствует некоторым отложениям липидов в ткани [157]. Высокочастотные пики на 17 ГГц и 19 ГГц, которые воспроизводятся от точки к точке и от животного к животному, связаны с вкладом волокнистых белков. Линия РМБ на частоте 19 ГГц соответствует вкладу рассеяния Манделъштама-Бриллюэна от коллагеновых волокон, а линия на 17 ГГц является вкладом эластиновых волокон и, как и ожидается, проявляется только в спектрах вен [47].

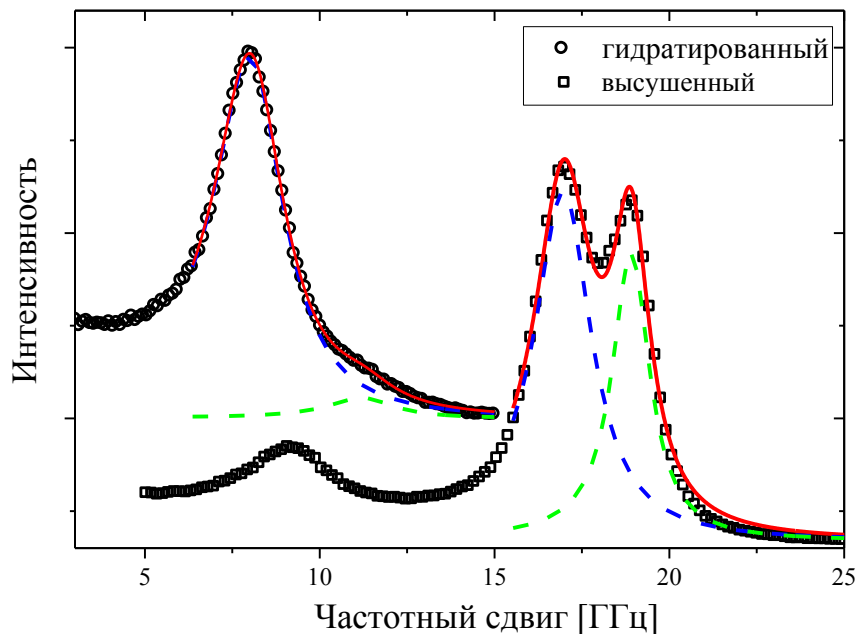


Рис.5.3. Спектры рассеяния Манделъштама-Бриллюэна гидратированной (кружки) и высушенной (квадрат) вены. Подгонка спектров РМБ функцией ДНО представлено линиями.

## § 5.3. Обсуждение результатов

### п.5.3.1. Влияние обработки на параметры спектра рассеяния Манделъштама-Бриллюэна гидратированных тканей

Все измеренные спектры рассеяния Манделъштама-Бриллюэна были аппроксимированы функцией ДНО, как описано выше. Результаты для позиции линии

РМБ  $\Delta\omega$  и ширины  $\Gamma$  исследованных образцов перикарда представлены на рис.5.4. Рисунок 5.4а показывает, что среднее положение пика рассеяния Мандельштама-Бриллюэна мало меняется после сшивания. Существует лишь небольшая тенденция к его увеличению после консервации перикарда, фиксированного DE, в спирте. Полученные данные спектров РМБ перикарда можно сравнить с данными [7], где измерения методом спектроскопии РМБ проводились при длине волны возбуждающего лазера 780 нм и двухступенчатой виртуально отображаемой фазированной решеткой (VIPA). Поскольку частота сдвига бриллюэновской линии зависит от длины волны лазера согласно уравнению (1.7), данные [7] для свежих и фиксированных глутаровым альдегидом образцов были перемасштабированы для длины волны 532.1 нм текущего эксперимента (рис.5.4а). В целом, результаты обоих исследований хорошо согласуются. Кроме того, в [7] было отмечено, что разброс значений  $\omega_{Br}$  из разных пространственных точек уменьшается при обработке сшивающим агентом глутаровым альдегидом. В текущем эксперименте набор данных РМБ для разных животных демонстрирует аналогичную тенденцию. Эта тенденция имеет аналог в ширине линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (рис.5.4б), где среднее значение  $\Gamma$  и его разброс уменьшаются после сшивания. Таким образом, можно сделать вывод, что сшивание делает гидратированный перикард более упруго однородным без существенного изменения модуля упругости в масштабе сотен нанометров.

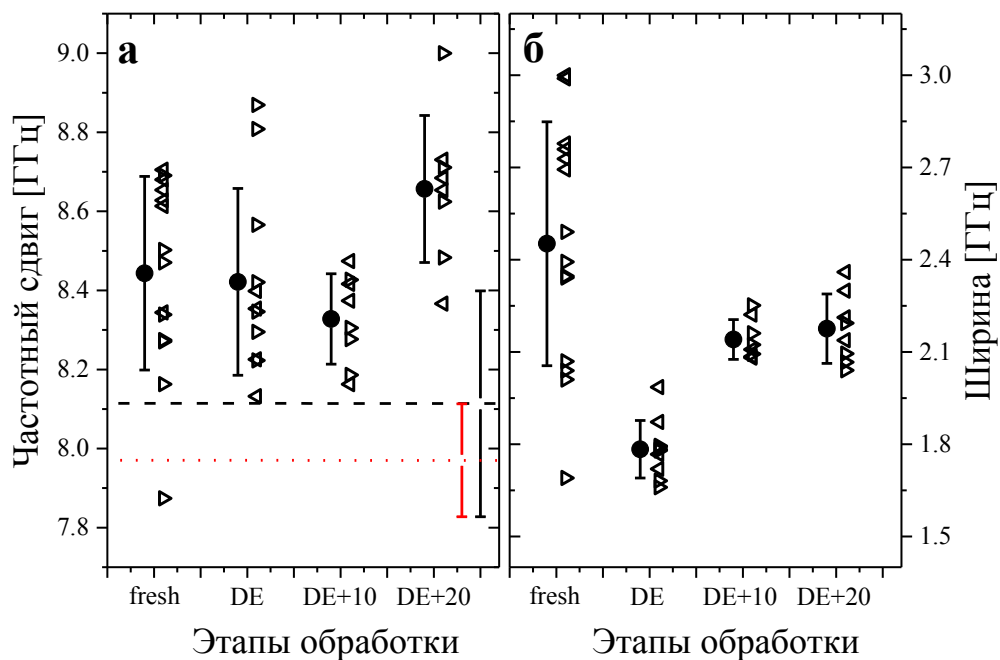


Рис.5.4. Частотный сдвиг  $\Delta\omega$  (а) и ширина  $\Gamma$  (б) линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для образцов ткани гидратированного перикарда. Значения для разных животных соответствуют

разным треугольникам (левому и правому). Кружки представляют собой среднее значение разброса сдвига частоты по разным точкам и животным, «усы» являются стандартным отклонением. В (а) также приведено положение пика РМБ из [7], пересчитанное до длины возбуждения 532.1 нм для свежего (черная штриховая линия) и фиксированного GA (красная пунктирная линия) перикарда.

Параметры спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для внутренней гладкой части вены приведены на рисунке 5.5. Параметры приведены только для основного пика, соответствующего рассеянию света от волокнистых белков. Наблюдается тенденция к небольшому увеличению среднего положения пика вблизи 8.5 ГГц при сшивании, однако, эта тенденция ниже разброса экспериментальных данных. Может ли такой разброс быть обусловлен локальными флуктуациями модуля упругости за счет разнообразного состава ткани венозной стенки или же флуктуациями воды в образце? При этом изменение параметров спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для вены не согласуется с данными РМБ для гидратированного перикарда, который демонстрирует небольшую тенденцию к уменьшению частотного сдвига линии с обработкой ткани (рис.5.4). Согласно t-тесту Стьюдента в случае данные позиций РМБ вены среднее положение пика рассеяния Мандельштама-Бриллюэна между нативными образцами и образцами, обработанными диэпоксидом, не имеют значимых различий и значение  $p = 0.1$ . Для перикарда также не наблюдается различий между данными РМБ с обработкой DE.

Вероятно, наблюдаемые эффекты не зависят от изменения гигагерцового упругого модуля ткани с обработкой. Ширина линии РМБ для вены, представленная на рис.5.5б также демонстрирует неизменность пика от обработки.

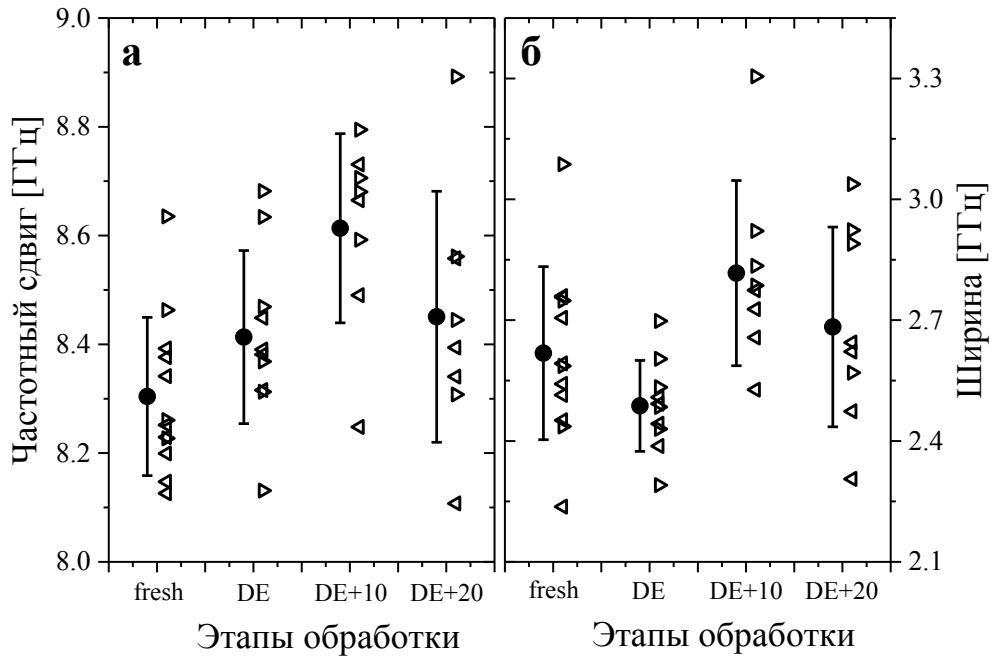


Рис.5.5. Частотный сдвиг  $\Delta\omega$  (а) и ширина  $\Gamma$  (б) линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для образцов гидратированной ткани вены. Значения для разных животных соответствуют разным треугольникам (левому и правому). Кружки представляет собой среднее значение разброса сдвига частоты по разным точкам и животным, «усы» являются стандартным отклонением.

Сравнение экспериментально полученных данных для гидратированной ткани перикарда с данными [7], представленное на рис.5.4а, демонстрирует хорошее согласие. Несмотря на то, что спектры рассеяния Мандельштама-Бриллюэна получены на разных экспериментальных установках, с отличающимися длинами волн возбуждающего излучения и различных животных. Это положительно характеризует метод рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для данного типа исследований. Однако, положение пика РМБ и, соответственно, продольный упругий модуль, определяемый из данных спектроскопии РМБ, сильно зависят от концентрации воды. Основной причиной разброса значений положения бриллюэновской линии, измеренных для разных локальных точек ткани, являются локальные флуктуации содержания воды, что отражается в ширине линии РМБ.

Спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна гидратированных венозных стенок является бимодальным и описывается суммой двух пиков. Пик с более низкой частотой, доминирующий в спектре, связан с вкладом фибриллярных белков. Его положение  $8.3 \pm 0.15$  ГГц ниже положения пика РМБ в случае гидратированного свежего перикарда  $8.5 \pm 0.25$  ГГц. Перикард в основном состоит из коллагена, тогда как венозная стенка содержит сопоставимое количество коллагена и эластина. Таким образом, несколько

более низкое положение пика РМБ в случае венозной стенки может быть связано с более низким модулем упругости эластина. Следует ожидать, что разница в модулях упругости гидратированного эластина и коллагена невелика по сравнению с шириной пика РМБ (рис.5.4 и 5.5), поэтому отдельные вклады эластина и коллагена в экспериментальный спектр гидратированной ткани невозможно различить.

Изучение влияния обработки диглицидиловым эфиром этиленгликоля показывает, что сшивание ткани слабо влияет на параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в перикарде и вене (рис.5.4 и 5.5). В обоих случаях наблюдается небольшая тенденция к повышению положения бриллюэновской линии при консервации спиртом. Однако, эти эффекты меньше разброса экспериментальных значений и обусловлены локальными колебаниями концентрации воды. А наблюдаемые слабые тенденции, вероятно, связаны с изменениями гидратации белка после сшивания и консервации спиртом.

### **п.5.3.2. Влияние обработки на параметры спектра рассеяния Мандельштама-Бриллюэна высушенных тканей**

Поскольку продольный модуль упругости гидратированных тканей, определяемый методом спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, чувствителен к влиянию воды, а квазистатическая механическая жесткость определяется белковым каркасом, то исследование высушенных образцов тканей перикарда и вены могут помочь в получении дополнительной информации об упругих свойствах белкового матрикса методом спектроскопии РМБ. Конечно, дегидратация белков изменяет их упругие свойства, а сам процесс является инвазивным и необратимым, что позволяет нивелировать влияние водной компоненты на параметры спектров РМБ, а также даст возможность больше узнать о распределении белков и влиянии сшивки на белковый каркас.

Типичный спектр рассеяния Мандельштама-Бриллюэна высушенных тканей представлен на рис.5.1 и 5.3. Можно заметить, что дегидратация ткани смещает пик РМБ в сторону более высоких частот. При этом спектры перикарда и вены сильно различаются, в первом случае спектр Бриллюэна представляет собой один пик, в то время как в случае вены спектр РМБ имеет бимодальную форму с явно выделенными максимумами. Параметры аппроксимации спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна высушенной ткани перикарда функцией ДНО представлены на рисунке 5.6. На рис.5.6 показано, что

разброс значений позиции  $\Delta\omega$  и ширины  $\Gamma$  линии РМБ примерно одинаков для необработанных и обработанных образцов. Таким образом, можно сделать вывод, что более высокий разброс параметров для гидратированных образцов (рис.5.4) связан с неоднородностями, вызванными водой. Также видно, что сшивание диглицидиловым эфиром этиленгликоля (DE) не влияет на значение  $\Delta\omega$  сухого перикарда, в то время как дополнительная обработка в спирте показывает тенденцию к увеличению положения линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна.

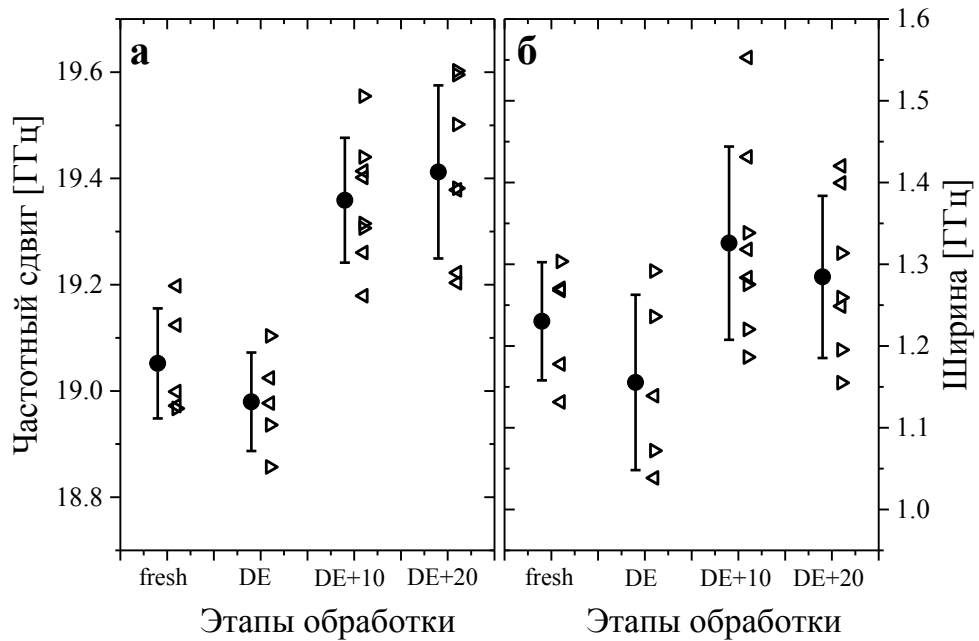


Рис.5.6. Частотный сдвиг  $\Delta\omega$  (а) и ширина  $\Gamma$  (б) линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна для высушенной ткани перикарда. Значения для разных животных соответствуют разным треугольникам (левому и правому). Кружки представляет собой среднее значение разброса сдвига частоты по разным точкам и животным, «усы» являются стандартным отклонением.

В спектрах рассеяния Манделъштама-Бриллюэна высушенной вены (рис.5.3) высокочастотные пики связаны с вкладом фибриллярных белков, параметры их аппроксимации суммой двух ДНО и их средние значения представлены на рис.5.7. Из рисунка 5.7а можно заметить, что обработка стабилизирующим агентом не влияет на положение пиков эластина и коллагена, тогда как фиксация DE с последующей консервацией в этаноле приводит к смещению максимумов компонент РМБ в высокочастотную область, ассоциируемых со вкладом коллагена, так и пиков эластина.

Обработка тканей диглицидиловым эфиром этиленгликоля (DE) не оказала заметного влияния на положение линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна высушенного перикарда и стенки вены. Однако консервация в спиртах после обработки

выявляет значительное увеличение положения линии РМБ как в перикарде, так и в стенке вены (рис.5.6 и 5.7). В случае стенки вены наблюдается увеличение обоих пиков, связанных с коллагеном и эластином. Этот результат означает, что конформация и/или межмолекулярное взаимодействие фибриллярных белков изменяется при консервации в спиртовом растворе таким образом, что белки принимают более компактную структуру в высушенном состоянии, что отражается в более высоком модуле упругости. Таким образом, спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна продемонстрировала потенциал ее применения к высушенным тканям в качестве метода для детектирования изменений в межмолекулярной упаковке, вызванных обработкой.

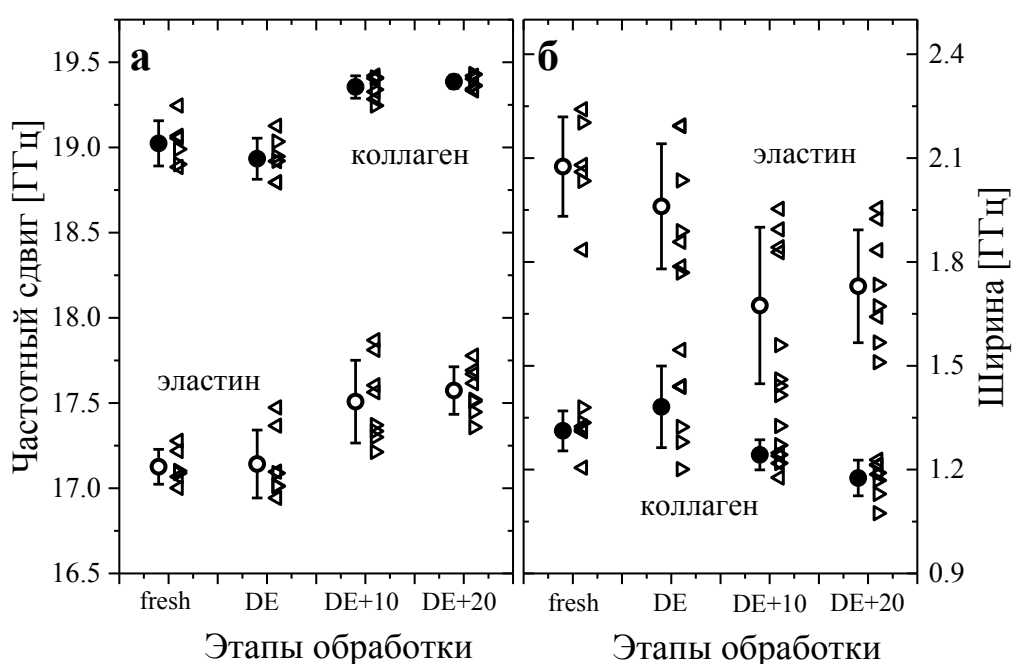


Рис.5.7. Частотный сдвиг  $\Delta\omega$  (а) и ширина  $\Gamma$  (б) линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для высушенной ткани венозной стенки. Значения для разных животных соответствуют разным треугольникам (левому и правому). Средние значения и стандартные отклонения определены для разных белков: черные кружки соответствуют пику с более высокой частотой - коллагену, а светлые кружки соответствуют эластину. «Усы» являются стандартным отклонением.

### п.5.3.3. Сравнение продольного гигагерцового модуля с модулем Юнга

Поскольку спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна способна характеризовать упругие свойства материала, было бы интересно сравнить продольный модуль упругости с другими экспериментальными методами. Согласно исследованиям белкового каркаса тканей (рис.5.6, 5.7), положение максимума пика РМБ в коллагене венозной стенки и перикарда составило  $19.0 \pm 0.1$  ГГц, а пик эластина в венозной стенке

имел значение  $17.1 \pm 0.1$  ГГц. Для вычисления значения продольного упругого модуля фибриллярных белков необходимо определить их показатель преломления и плотность. В [47] значения  $n$  и  $\rho$  составляют 1.5 и  $1.35 \text{ г/см}^3$ , соответственно, эти значения характерны для фибриллярных белков и типичны для мышц. Уравнения (2.11) и (1.19) приводят к оценке продольного модуля упругости 15.3 и 12.4 ГПа для коллагена и эластина, соответственно. Данная оценка модуля упругости фибриллярных белков в ткани достаточно хорошо согласуется с значениями 15.2 и 10.5 ГПа для коллагена и эластина, соответственно, которые были определены из модуля сдвига  $G$  и объемного модуля  $K$ , измеренных в [47] с помощью спектроскопии РМБ для отдельных коллагеновых и эластиновых волокон, извлеченных из сухожилия хвоста крысы и затылочной связки. Таким образом, пики РМБ высушенного перикарда и венозной стенки (рис.5.1, 5.3) отражают модуль упругости коллагеновых и эластиновых волокон.

Ввиду того, что взаимосвязь между продольным гигагерцовым модулем, определяемым спектроскопией рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, и квазистатическим модулем Юнга является объектом активных дискуссий, на биологических тканях были проведены механические испытания коллегами в национальном медицинском исследовательском центре им. Е.Н. Мешалкина. Далее кратко опишем процедуру проведения реологических тестов и определения модуля Юнга. Для проведения одноосных механических испытаний образцы были подготовлены в форме собачьей кости  $9 \times 28$  мм с помощью вырубного штампа. Образцы вен были вырезаны вдоль центральной оси сосуда (осевые, II-образцы), а вторая часть – по окружности сосуда (кольцевые, O-образцы). Преобладающее направление коллагеновых волокон определялось в каждом образце перикарда после визуального осмотра согласно общепринятым методикам [174]. Одна часть образцов перикарда была вырезана таким образом, чтобы коллагеновые волокна были параллельны оси испытания (II-образцы), а волокна остальных образцов были ориентированы ортогонально к оси испытания (O-образцы).

Все образцы перед испытанием выдерживались в 0,9% растворе хлорида натрия при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Испытание на одноосное растяжение проводили с постоянной скоростью растяжения  $10 \text{ мм/мин}$  на испытательной машине ESM 301L (Mark-10 Corporation), оснащенной компьютеризированным динамометром (0–100 Н); образцы испытывали во влажном состоянии, без предварительной подготовки. Толщину ткани

измеряли с помощью цифрового толщиномера (Mitutoyo, Япония) в трех точках рабочей зоны образца. Все образцы тканей были растянуты до разрыва, а модуль Юнга (E) был вычислен вблизи конечной точки упругой фазы с использованием модифицированного метода, предложенного в работе [175]:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}, \quad (5.1)$$

где  $\sigma$  – напряжение,  $\varepsilon$  – деформация в выбранной точке. Значения модуля Юнга E, полученные в ходе эксперимента по механическим испытаниям, представлены на рис.5.8.

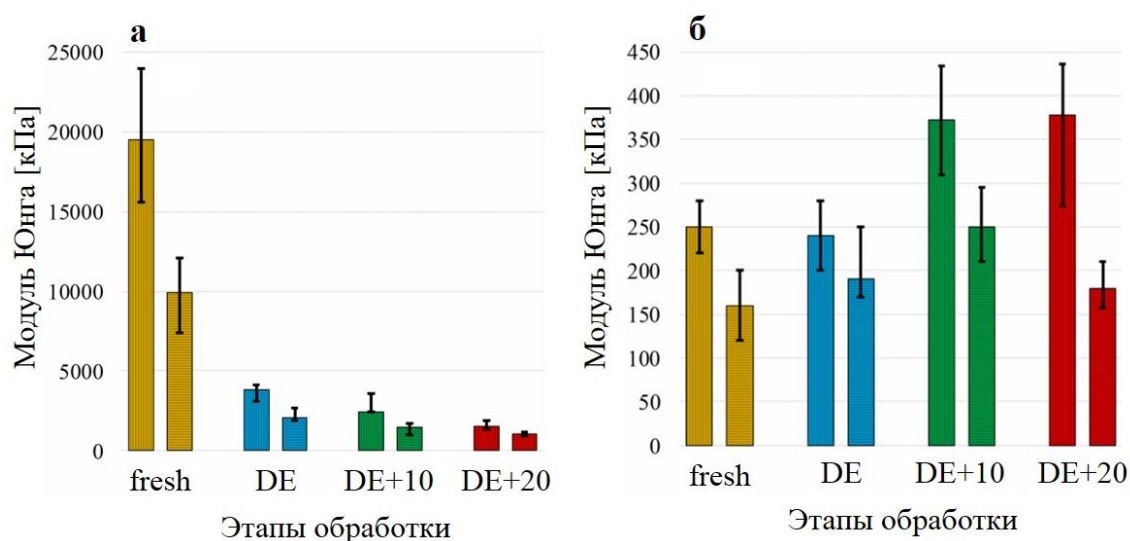


Рис.5.8. Модуль упругости Юнга перикарда (а) и венозной стенки (б). Левые столбцы соответствуют II-образцам, правые – O-образцам.

Видно, что значения модуля Юнга (E) существенно различаются для образцов перикарда и вен. Более того, хранение в DE приводит к значительному снижению E для перикарда, в то время как для образцов вен величина модуля Юнга остаётся того же порядка величины. Наблюдаемый эффект изменения упругих свойств после хранения в водном растворе этанола различен для перикарда и вен. Стоит отметить, что проявляется явное снижение E для перикарда и тенденция к увеличению для вен. Этот результат контрастирует с данными рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (рис.5.4 и 5.5), где оба типа тканей демонстрируют незначительный эффект от обработки диглицидиловым эфиром этиленгликоля (DE) и тенденцию к увеличению после хранения в растворе спирта.

Сравнение значения модуля Юнга и продольного модуля упругости, определенного из позиции сдвига РМБ, показано на рисунке 5.9. Зависимости демонстрируют существование слабой корреляции между этими параметрами, которая

может быть описана линейной аппроксимацией с коэффициентом Пирсона 0.76 для обеих ориентаций стенок вен (П и О). Таким образом, это сравнение данных РМБ и механических данных исключает однозначное соответствие между продольным модулем упругости в ГГц и модулем Юнга, полученным в ходе испытаний на растяжение, вопреки предположениям, встречающимся в литературе. Это может быть объяснено за счет того, что, согласно выражению (1.27), модуль Юнга пропорционален модулю сдвига, который отражает вязкостно-релаксационный отклик на низкой частоте и может изменяться иначе в зависимости от применяемой обработки, чем модуль объемной упругости. А также в отличие от эксперимента Мандельштама-Бриллюэна, который характеризует отклик материала в масштабе сотен нанометров, в механических испытаниях модуль Юнга является макроскопическим и чувствителен к структурным изменениям в масштабе больше микрона.

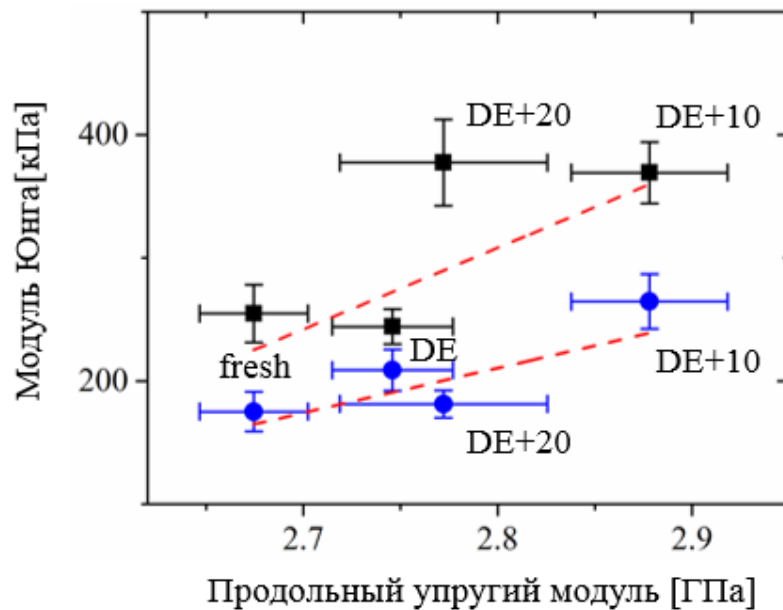


Рис.5.9. Модуль Юнга ткани венозной стенки в П-ориентации (квадрат) и в О-ориентации (кружки) в зависимости от продольного модуля упругости, полученного в эксперименте рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Линии соответствуют линейным аппроксимациям.

#### **§ 5.4. Заключение по исследованию коллагенсодержащих тканей бычьей яремной вены и бычьего перикарда методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна**

Рассмотрена возможность применения спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для исследования упругого отклика тканей бычьей яремной вены и перикарда, необработанным и обработанным сшивающими агентами, чтобы выяснить ее потенциал для характеристики тканей, которые имеют медицинское значение в кардиохирургии. Было обнаружено, что примененный сшивающий 5% раствор диглицидилового эфира этиленгликоля с последующей обработкой спиртом или без нее слабо влияет на положение линии РМБ гидратированной ткани с легкой тенденция к увеличению. Однако, эта тенденция меньше, чем разброс позиции Бриллюэновского пика от разных точек образца. Несмотря на сопоставимые количества коллагена и эластина в венозной стенке, для гидратированной ткани в спектре Бриллюэна наблюдался только один пик, который может быть связан с фибриллярными белками. Разброс положения и ширины пиков РМБ уменьшается с обработкой материала в перикарде, но не в стенке вены.

Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к высушенному перикарду и стенке вены позволило проверить влияние преимплантационной обработки и последующей консервации в спиртовых растворах на белковый каркас тканей. Было обнаружено, что сшивание не влияет на модуль упругости высушенной ткани, в то время как консервация в спиртовом растворе увеличивает модуль упругости, что свидетельствует о более компактной структуре белков. В случае венозной стенки спектр РМБ демонстрирует бимодальное поведение, что показало чувствительность спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к коллагеновым и эластиновым волокнам внутри ткани. Влияние обработки и консервации в спирте также проявлялось как для пиков коллагена, так и для пиков эластина. Продольные модули упругости, оцененные из параметров спектров РМБ, сухих необработанных образцов хорошо согласовались с литературными данными для отдельных коллагеновых и эластиновых волокон. Полученный результат показывает потенциал спектроскопии РМБ к характеристике высушенной ткани и выявления изменений, связанных с постобработкой биоимплантов.

Исследован вопрос о связи продольного гигагерцового упругого модуля, определяемым методом спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, и

статического модуля Юнга, полученного из данных реологических испытаний на растяжение, для тканей в процессе обработки. Показано отсутствие прямой корреляции между этими параметрами. Полученный результат свидетельствует о том, что спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна предоставляет иную информацию об упругом отклике, чем модуль Юнга, а одновременное применение обеих методик может стать эффективным подходом для определения механизмов изменения упругого ответа тканей после обработки.

## **ГЛАВА 6. Модельная система: яичный белок, водный раствор бычьего сывороточного альбумина**

Ключевой вопрос исследования заключается в том, проявляется ли эффект формирования структурных сшивок в гидратированной ткани на продольный гигагерцовый модуль упругости  $M$  при сохранении неизменного химического состава? Чтобы детально углубиться в вопрос влияния воды на параметры спектра РМБ в данной главе проведено исследование яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве модельных материалов, которые при неизменном химическом составе и уровне воды могут находиться в двух состояниях: жидкости с нулевым модулем Юнга и упругого гидрогеля.

### **§ 6.1 Проведение эксперимента по исследованию модельной белковой системы**

#### **п.6.1.1. Подготовка образцов**

Яичный белок был получен из свежих куриных яиц. Жидкую фракцию яичного белка собирали с помощью шприца через яичную скорлупу. Гомогенизированную смесь яичного белка получали путем центрифугирования суспензии при 2000 об/мин в течение 5 минут. Смесь яичного белка помещали и герметизировали между кварцевыми стеклами с тефлоновой прокладкой толщиной 700 или 150 мкм. Для коррекции собственного белкового вклада валентных ОН-колебаний в спектры КРС яичного белка дополнительно были включены в исследование образцы яичного белка, высушенные при комнатных условиях. Порошок бычьего сывороточного альбумина (БСА) смешивали с дистиллированной водой для получения раствора 15 % по массе. Водный раствор БСА помещали между кварцевыми стеклами с прокладкой толщиной 1 мм.

Образцы помещали на терморегулируемый столик Linkam, который поддерживал температуру  $20 \pm 0.1$  °C во время экспериментов. Были изучены два состояния образцов: исходное жидкое состояние и гелеобразное состояние после термической денатурации. Денатурацию проводили при температуре 70 °C в течение 10 минут для полной денатурации белка яичного белка [176] и водного раствора бычьего сывороточного альбумина [177].

### **п.6.1.2. Экспериментальная установка по одновременному измерению рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света**

Схема экспериментальной установки одновременного измерения спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света представлена на рисунке 6.1. Часть схемы соответствующая методике РМБ аналогична принципиальной схеме экспериментальной установки, представленной на рисунке 2.7 в главе 2, параграфе 2.3. Оптический путь падающего излучения проходил через канал BS. Образец помещался на терморегулируемый столик Linkam горизонтально, таким образом была реализована геометрия рассеяния назад. Сначала измерения были выполнены на нативных образцах при 20 °С, затем образцы денатурировали при 70 °С, после чего повторно измерили их при 20 °С в денатурированном состоянии. В нативном состоянии образцы белков представляют собой прозрачную жидкость, после денатурации образцы становились твердоподобным гелем.

Синхронное измерение РМБ и КРС яичного белка было реализовано путем разделения рассеянного пучка на два с помощью пластины 70/30, как показано на рисунке 6.1. Отраженная часть излучения (30%) отправлялась через волокно на спектрометр по измерению комбинационного рассеяния света, а 70% излучения отправлялось на спектрометр для регистрации рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Это позволило получить спектры РМБ и КРС с одной точки образца. Спектры РМБ были измерены в свободном спектральном диапазоне 27 ГГц, при этом пинхолы P1 и P2 составили 450 и 700 мкм, соответственно.

Свет, отраженный от пластины 70/30, проходил через фильтр F, отражающего длину волны 532 нм, предназначенного для подавления упругого излучения в рассеянном свете. Затем линзой L3 с фокусным расстоянием  $f = 50$  мм рассеянное излучение заводилось в сердцевину одномодового волокна диаметром 50 мкм. Вышедший из оптического волокна свет, заводился линзами L4 с фокусным расстоянием  $f = 80$  мм и L5 с  $f = 200$  мм в однорешеточный спектрометр SP2500i (Princeton Instruments), оснащенный CCD-детектором. Входная щель составляла 100 мкм. Спектры были получены в спектральном диапазоне от 1900 до 4000  $\text{см}^{-1}$  с временем получения одного спектра 60 с. Чтобы избежать изменения поляризационных условий вследствие изменения оптического качества исследуемого объекта, в оптическую схему была введена

четвертьволновая пластинка ( $\lambda/4$ ). Таким образом возбуждающее излучение имело круговую поляризацию.

Длины волн спектров калибровались с использованием неоновой разрядной лампы. Эталонный эффект спектрометра КРС был корректирован с помощью функции пропускания, оцененной с использованием широкого спектра люминесценции фильтра ОС12. Первоначальная обработка данных включала коррекцию всплесков интенсивности и вычитание базовой линии, как описано далее в пункте 6.2.1.

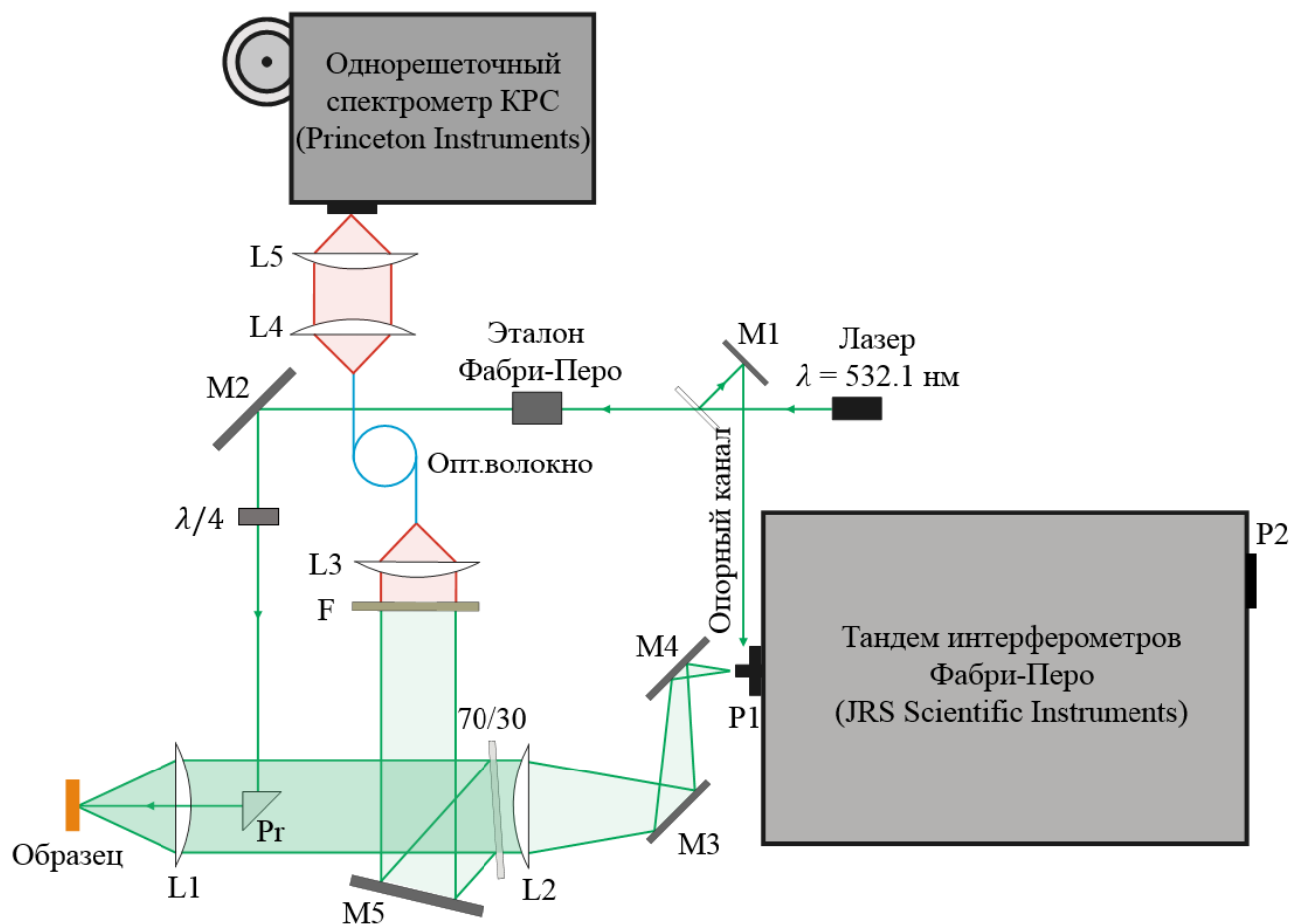


Рис.6.1. Схема экспериментальной установки синхронного измерения спектров комбинационного рассеяния света и рассеяния Мандельштама-Бриллюэна: M1-5 – зеркала; L1-5 – линзы; Pr - призма; P1-2 – пинхол спектрометра РМБ; F – краевой фильтр.

## § 6.2. Анализ и обсуждение экспериментальных результатов

### п.6.2.1. Анализ спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и комбинационного рассеяния света

Из спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна первоначально была «вырезана» интенсивная упругая линия, затем интенсивность спектров была нормирована на

максимум дублета РМБ. Параметры спектров рассеяния Мандельштама-Бриллюэна были определены из подгонки дублета функцией ДНО (3.1), как представлено на рисунке 6.2. Диапазон аппроксимации составлял от 7.2 до 27.5 ГГц, чтобы уменьшить влияние низкочастотного крыла.

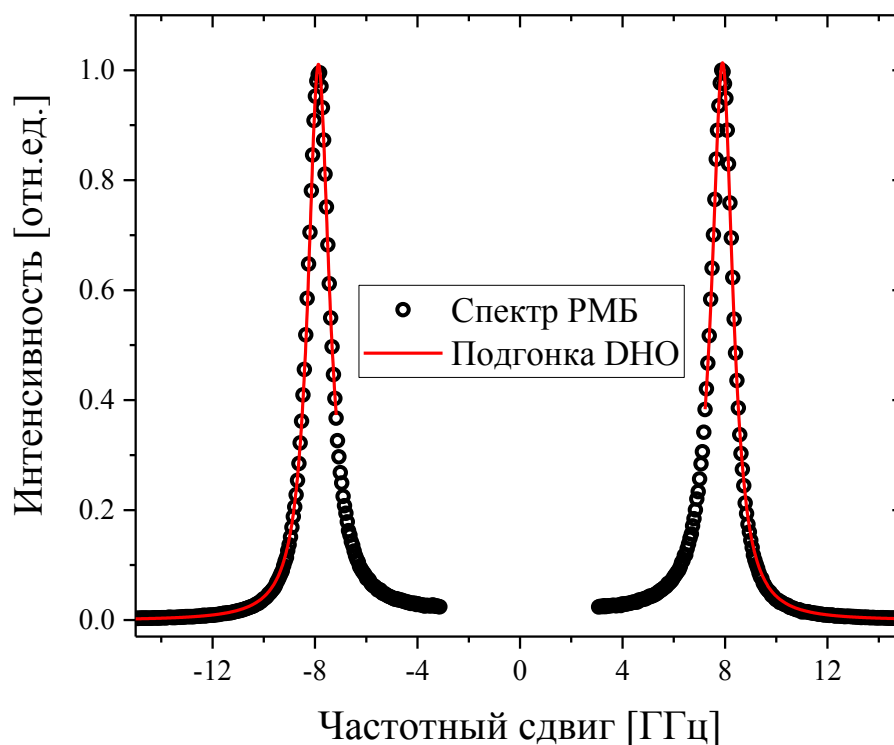


Рис.6.2. Описание экспериментальных спектров РМБ (кружки) функцией затухающего гармонического осциллятора ДНО (красная линия).

Первоначальная обработка спектров комбинационного рассеяния света включала коррекцию всплесков интенсивности. С целью подавления эталонного эффекта спектрометра, проявляющегося в виде периодических изменений интенсивности, были измерены спектры КРС фильтра ОС12. Фотолюминесцентная подставка в спектрах ОС12 корректировалась на полином 5-й степени, в результате чего был получен спектр коррекции эталонного эффекта, представленного на рис.6.3 во вставке. Подставка спектра КРС яичного белка представляла собой линейную функцию (на рис.6.3 показана пунктирной линией). На рисунке 6.3 представлены демонстрационные спектры коррекции КРС нативного яичного белка. Данная процедура была выполнена для всех спектров КРС белка.

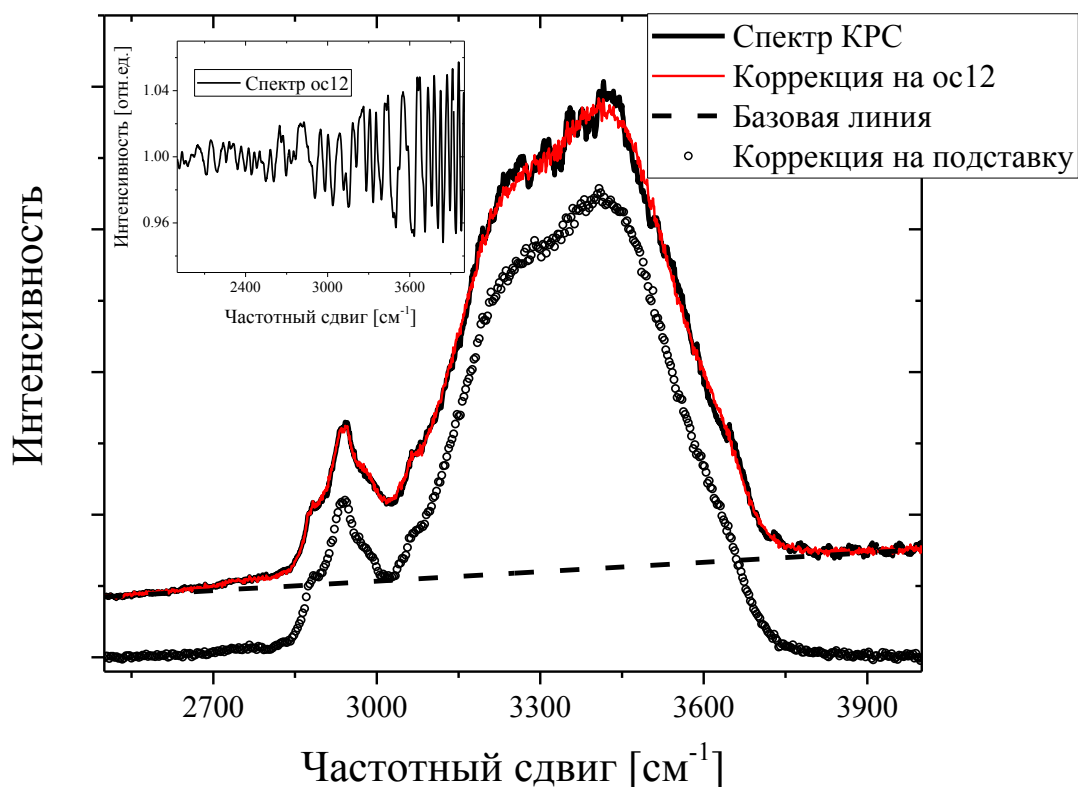


Рис.6.3. Коррекция спектров КРС: первоначальный спектр КРС (черный); корректировка эталонного эффекта (красный) по спектрам КРС фильтра ос12 (вставка); вычитание подставки (кружки).

В спектре КРС присутствуют полосы валентных колебаний СН с максимумом около  $2930\text{ см}^{-1}$ , соответствующей белковому вкладу, и полосы валентных колебаний ОН при  $3420\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует вкладу воды. По соотношению интенсивностей этих линий можно охарактеризовать степень гидратации материала. [178]

Чтобы проверить влияние воды на спектр РМБ, были проведены измерения при различных концентрациях воды, которые достигались в процессе сушки при комнатной температуре. На рисунке 6.4 показана зависимость положения линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в зависимости от степени гидратации, определяемой соотношением интенсивностей ОН/СН. Видно, что кривые для нативного и денатурированного яичного белка смещены на постоянное значение с относительной разницей примерно в 2%. Кривые на рис. 6.4 позволяют оценить влияние локальных флуктуаций степени гидратации образца на положение линии РМБ.

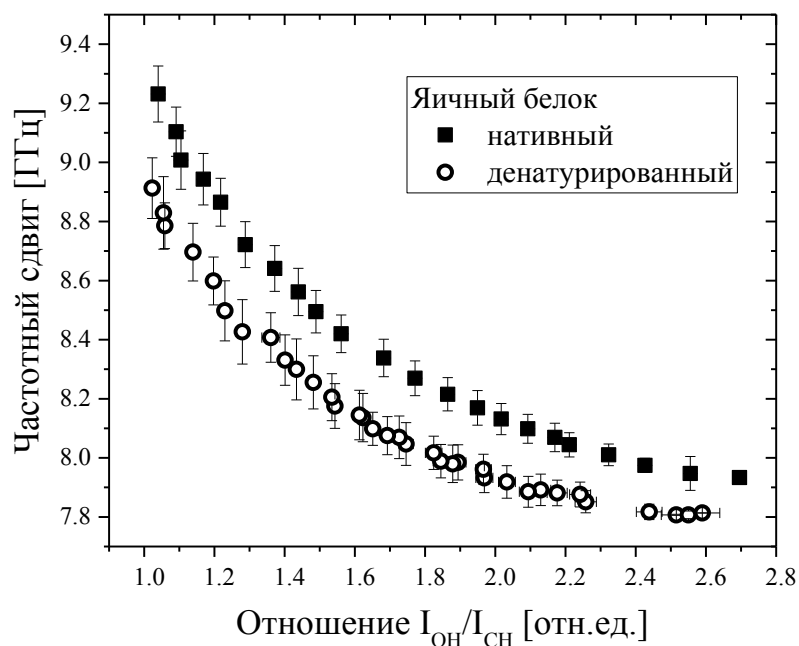


Рис.6.4. Положение линии РМБ для образцов нативного (квадраты) и денатурированного (кружки) яичного белка в зависимости от соотношения  $I_{ОН}/I_{СН}$ .

### п.6.2.2. Обсуждение результатов. Сравнение спектров неупругого рассеяния света нативного и денатурированного яичного белка

Для каждого образца в нативном и денатурированном состоянии были измерены спектры КРС и соответствующие спектры РМБ в нескольких разных точках образца. Репрезентативные спектры неупругого рассеяния света от образцов яичного белка в нативном и денатурированном состояниях при  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  показаны на рис.6.5. Видно, что денатурация не влияет на форму полосы валентных колебаний СН с максимумом около  $2930\text{ см}^{-1}$ . Полоса валентных колебаний ОН одинакова для яичного белка в разных состояниях, что подтверждает одинаковую степень гидратации. Наблюдаемый в спектрах дублет рассеяния Манделъштама-Бриллюэна соответствует неупругому рассеянию света акустическими фононами, на рис.6.5б представлена стоксова часть спектра. Позиция максимума линии РМБ жидкого яичного белка имеет максимум на частоте 8.01 ГГц, а после денатурации смещается в область более низких частот (приблизительно до 7.85 ГГц). Данные положения линий РМБ выше, чем в случае воды 7.55 ГГц при тех же условиях.

В низкочастотной части спектра рассеяния Манделъштама-Бриллюэна наблюдается крыло, обусловленное связью фонона с релаксацией. [179] Для яичного белка низкочастотное крыло выше в случае денатурированного образца (рис.6.5б). С

другой стороны, многократное рассеяние света также может вносить вклад в этом частотном диапазоне из-за нарушения правила сохранения волнового вектора в результате изменения мутности образца. Поскольку относительный вклад многократного рассеяния уменьшается с уменьшением толщины образца, чтобы исключить возможное влияние мутности, вызванной денатурацией, были измерены спектры РМБ для образца со значительно меньшей толщиной. Как видно (рис.6.5б), низкочастотное крыло одинаково для образцов обеих толщин, что исключает эффект многократного рассеяния. Следовательно, увеличение низкочастотного крыла после денатурации связано с изменением релаксационного отклика. Структурные изменения в гидратированных белках в процессе денатурации сопровождаются сдвигом релаксационного отклика от частот выше линии рассеяния Манделъштама-Бриллюэна к более низким частотам. Этот сдвиг проявляется в увеличении низкочастотного крыла и уширении линии РМБ.

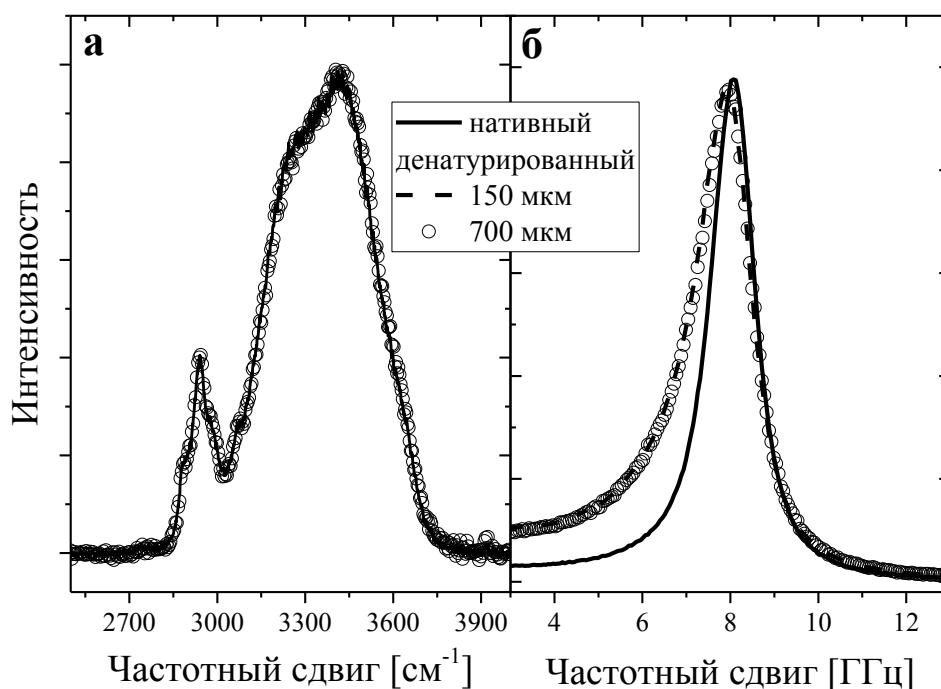


Рис.6.5. Репрезентативные спектры КРС (а) и РМБ (б) яичного белка толщиной 700 мкм в нативном состоянии (сплошная линия) и денатурированном состоянии (пустые кружки) при  $T = 20$  °С. Штриховая линия на рисунке (б) соответствует денатурированному образцу толщиной 150 мкм.

На рисунке 6.6 представлены репрезентативные спектры комбинационного рассеяния света и рассеяния Манделъштама-Бриллюэна для образцов нативного и денатурированного БСА. Положение линии РМБ в нативном состоянии составляло 8.06 ГГц, а после термической денатурации сместилось в сторону более высоких частот до

8.12 ГГц. Аналогично случаю яичного белка, ширина линии РМБ образца БСА также увеличивается после денатурации, при этом низкочастотное крыло незначительно увеличивается.

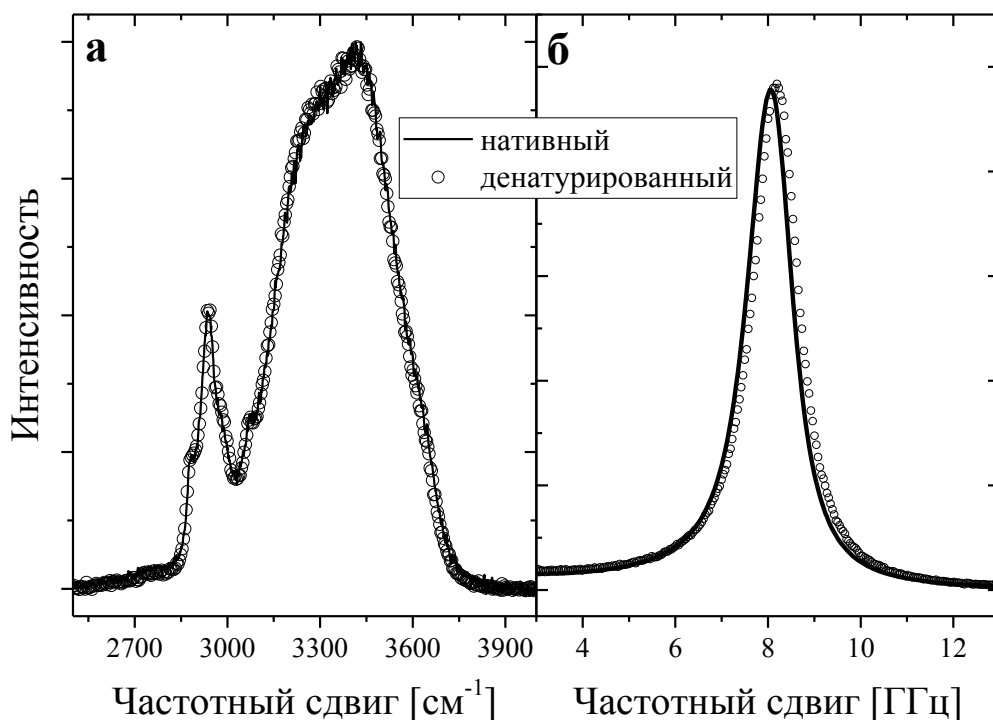


Рис.6.6. Репрезентативные спектры КРС (а) и РМБ (б) образца БСА в его нативном состоянии (сплошная линия) и после термической денатурации (пустые кружки) при  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

На рисунке 6.7 показаны значения позиции линии РМБ в зависимости от отношения  $I_{OH}/I_{CH}$  для различных пространственных точек образцов в нативном состоянии и после денатурации для яичного белка и БСА. Положение максимума линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для денатурированного образца яичного белка уменьшается почти на 2% по сравнению с нативным образцом. Для образца БСА сдвиг РМБ увеличивается на 0.7% после денатурации в гелеобразном состоянии, в отличие от яичного белка. Линии на рис.6.7 имеют тот же наклон, что и кривые на рис.6.4 для соответствующего диапазона гидратации, и иллюстрируют влияние концентрации воды на положение линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Видно, что наблюдаемый эффект гелеобразования, вызванного денатурацией, на положение линии РМБ не связан с точностью определения концентрации воды.

Можно ожидать, что переход из жидкого состояния в твердоподобное должен привести к увеличению объемного модуля и, следовательно, продольного модуля упругости, что, в свою очередь, приведет к увеличению частотного сдвига линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Однокомпонентные растворы БСА соответствуют

этому ожиданию, хотя эффект слабый (0.7 %). Однако многокомпонентные образцы яичного белка, представляющие собой реальный биологический объект, демонстрируют иное поведение, приводящее к уменьшению положения максимума линии РМБ после гелеобразования. Следует отметить, что для разных образцов яичного белка (из разных партий яиц) данный эффект варьировался от 0.3 % до 2 %. Таким образом, можно сделать вывод, что процесс гелеобразования (денатурации) оказывает слабое влияние на положение линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна высокогидратированных материалов. Наблюдаемые слабые эффекты не имеют четкой связи с изменениями механических свойств материала.

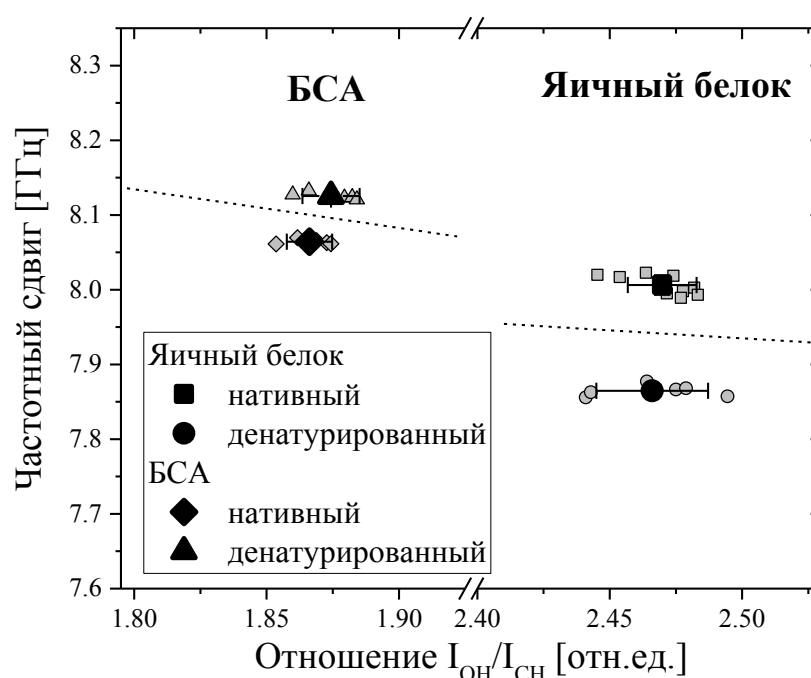


Рис. 6.7. Положение линии РМБ для нативных и денатурированных образцов в зависимости от отношения  $I_{OH}/I_{CH}$ . Образец яичного белка обозначен квадратами и кружками, а образец БСА — ромбами и треугольниками для нативного и денатурированного состояний, соответственно.

Серые символы соответствуют данным из разных точек образцов, а черные символы — их усредненным значениям. Линии иллюстрируют влияние концентрации воды согласно данным рис. 6.4.

Из положения линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, плотности и показателя преломления может быть определен продольный модуль упругости, согласно формулам (2.10) и (1.19). Объемная плотность исследуемых образцов была определена путем взвешивания. Показатель преломления был принят равным 1.35 для нативного яичного белка [180] и 1.36 для водного раствора БСА [181]. Учитывая, что спектры

комбинационного рассеяния света нативных и денатурированных образцов при одинаковой концентрации совпадают (рис.6.5а, рис.6.6а), можно принять равными плотность и показатель преломления исследуемых образцов до и после денатурации. Согласно формулам (2.11) и (1.19) из данных, представленных на рис.6.7, был определен продольный упругий модуль 2.56 ГПа для исходного образца БСА и 2.59 ГПа для образца после денатурации. В случае яичного белка его продольный модуль уменьшается с 2.56 ГПа до 2.46 ГПа после денатурации.

Относительные изменения продольного модуля можно сравнить с изменениями модуля Юнга. В случае яичного белка модуль Юнга увеличивается с 0 кПа до 3.5 кПа после гелеобразования [182-183]. В случае образца БСА модуль Юнга был определен путем измерения деформации образца при постоянной нагрузке. Квазистатический модуль Юнга равен 0 кПа в жидком состоянии и 6 кПа после гелеобразования. Таким образом, вызванное денатурацией гелеобразование образцов яичного белка и БСА привело к увеличению модуля Юнга на несколько порядков, в отличие от слабого и неоднозначного эффекта для продольного модуля упругости.

Согласно результатам работ по применению спектроскопии РМБ в офтальмологии, в частности при исследовании заболеваний роговицы, наблюдались изменения положения линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна на величину порядка  $10^{-2}$ , которые авторы связывали с изменениями механических свойств ткани [1, 184]. Однако в случае контролируемой гидратации сильные изменения модуля Юнга, на порядки превышающие ожидаемые для изменений, вызванных патологией, приводят к слабому и неоднозначному эффекту на продольный модуль РМБ. Можно сделать вывод о том, что нет однозначного соответствия между положением линии РМБ и изменениями жесткости гидратированных биоматериалов, интерпретируя ранее наблюдаемые эффекты как вызванные изменениями гидратации.

В отличие от результатов, полученных при изучении зависимости между положением линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна и изменением жесткости, ширина линии спектра РМБ в исследуемых образцах заметно увеличивается после гелеобразования. На рисунке 6.8 представлены значения полной ширины на половине высоты линии РМБ для нативных и денатурированных образцов яичного белка и БСА в зависимости от степени гидратации. Ширина линии увеличивается после денатурации для обоих образцов: с 1.16 до 1.39 и с 1.10 ГГц до 1.19 ГГц для яичного белка и БСА,

соответственно. Этот эффект подчеркивает потенциал анализа ширины линии Бриллюэна для обнаружения структурных изменений в гидратированных биоматериалах. Увеличение ширины линии можно объяснить усилением релаксационного отклика на частоте линии РМБ после денатурации, вызванным замедлением релаксаций, частота которых в жидком состоянии была выше положения линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна.

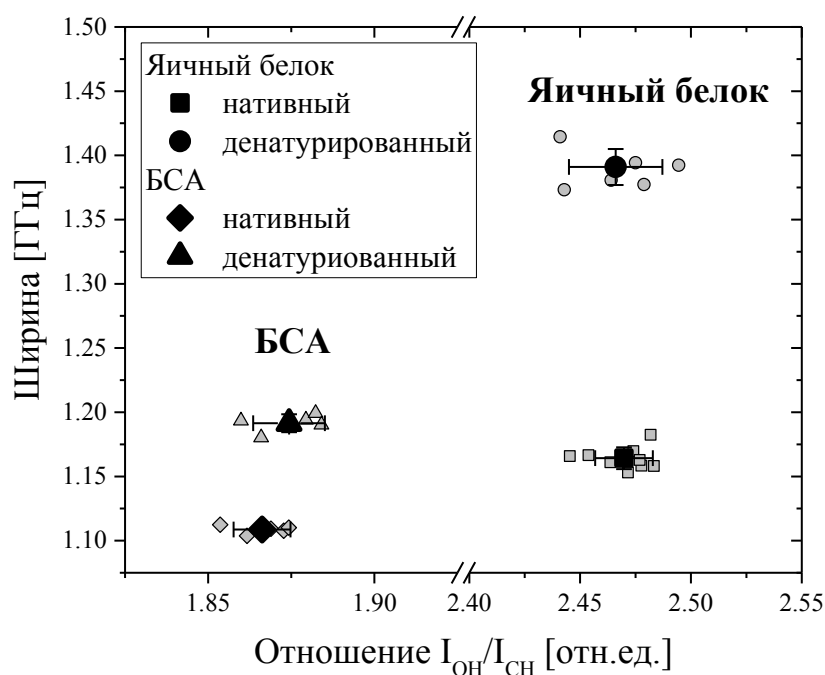


Рис.6.8. Ширина линии РМБ в зависимости от уровня гидратации, измеренная отношением максимумов полос валентных колебаний ОН и СН для нативного (квадраты и ромбы) и денатурированного (кружки и треугольники) яичного белка и БСА, соответственно. Серые символы соответствуют данным из разных точек образцов, а черные символы — их усредненным значениям.

### § 6.3. Заключение по исследованию яичного белка методом РМБ.

Для изучения потенциала спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна в характеристике жесткости биологических тканей в нашем исследовании двух модельных белковых материалов, жесткость которых значительно изменяется после денатурации, было исключено неконтролируемое влияние воды. Одним из материалов был водный раствор БСА, вторым — яичный белок со сложным составом. Было обнаружено, что изменение модуля Юнга на несколько порядков после денатурации не приводит к однозначному изменению продольного модуля упругости, определяемого

спектроскопией рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. Для образца бычьего сывороточного альбумина линия РМБ сдвигается незначительно в сторону высоких частот, в то время как для яичного белка сдвиг линии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна смещается в сторону низких частот, причем данные эффекты составляют менее нескольких процентов. Таким образом можно сделать вывод, что при неизменном химическом составе и уровне воды величина частотного сдвига РМБ не демонстрирует однозначной корреляции с макроскопической жесткостью сильно гидратированных биоматериалов. Следует отметить, что ширина линии РМБ однозначно увеличивается после денатурации, что делает ее перспективным индикатором жесткости биоматериала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного диссертационного исследования спектроскопия рассеяния Мандельштама-Бриллюэна (РМБ) была применена к анализу водных растворов солей серии Гофмейстера, систем мембран синтетических фосфолипидов, их смесей и цитоплазматических мембран эритроцитов, а также коллагенсодержащих биологических тканей и модельных белковых систем яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина.

На основании анализа спектров РМБ биорелевантных растворов была установлена корреляция между макроскопической вязкостью, описываемой коэффициентом Джонса–Доула ( $B_{JD}$ ), и концентрационными зависимостями спектральных параметров — сдвига и ширины линии РМБ, определяющих действительную и мнимую части гигагерцового модуля упругости (скорость и затухание гиперзвука), а также расстояний водородной связи  $\text{OH}\cdots\text{O}$ , полученных из спектров комбинационного рассеяния света (КРС). Полученные результаты согласуются с представлением, согласно которому космотропы упорядочивают сетку водородных связей, а хаотропы — разупорядочивают, причем именно структура водородной сети определяет вязкость разбавленных растворов. Анализ поляризованных спектров КРС продемонстрировал одинаковую эффективность солей в нарушении тетраэдрического окружения воды, которая не может быть предсказана на основании значения  $B_{JD}$ . Таким образом, способность ионов к структурообразованию или разрушению не коррелирует с их влиянием на тетраэдрическое окружение молекул воды.

Исследование температурно-индуцированных изменений параметров спектров РМБ мембранных систем проведено в широком температурном диапазоне 90–320 К, охватывающем как флюидное, так и гелевое состояния всех рассмотренных фосфолипидов. Анализ температурных зависимостей положения линии РМБ, связанного со значением скорости звука и продольным упругим модулем, показал, что значительная часть изменений происходит в твердоподобной гелевой фазе. Данный эффект объясняется тем, что даже ниже температуры фазового перехода фосфолипиды в мембране не являются полностью упорядоченными; локальные разупорядочения сохраняются вплоть до криогенных температур. Сильная температурная зависимость параметров спектра РМБ проявляется как для насыщенных (DMPC, DPPC), так и для ненасыщенного (DOPC) фосфолипидов и обусловлена изменениями конформационной структуры липидных цепей. При исследовании латеральной скорости звука планарных

липидных систем по спектрам РМБ выявлено незначительное влияние цис-двойных связей ( $C=C$ ) в углеводородных хвостах на плотность упаковки липидов. Сравнение спектров планарных образцов и суспензий везикул показало, что температурная динамика спектральных параметров везикул определяется преимущественно латеральными эффектами. Введение холестерина в липидный бислои приводит к размыванию фазового перехода, что было интерпретировано следующим образом: холестерин выступает в роли структурного дефекта, препятствуя плотной упаковке цепей в гелевой фазе и ограничивая степень разупорядочения липидов во флюидной фазе. Сравнение спектров РМБ модельных липидных систем и мембран эритроцитов показало, что температурная зависимость сдвига рассеяния Мандельштама-Бриллюэна нативных мембран носит липидоподобный характер, однако большой частотный сдвиг линии РМБ при низких температурах, вероятно, обусловлен присутствием большого количества трансмембранных белков.

Применение спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна к исследованию упругого отклика тканей бычьей яремной вены и перикарда показало, что обработка диглицидиловым эфиром этиленгликоля с последующей консервацией в спиртовом растворе или без нее слабо влияет на положение линии РМБ гидратированных тканей (наблюдается лишь слабая тенденция к увеличению). Для исключения вклада свободной воды в исследуемый спектр РМБ анализ был проведен также на высушенных фиксированных образцах. В высушенном состоянии в спектрах РМБ удалось разделить вклады от двух основных белков коллагена и эластина, входящих в состав ткани, а также оценить влияние обработки на структуру белкового матрикса. Установлено, что обработка эфиром не изменяет спектральные параметры линии РМБ высушенной ткани по сравнению с нативной, тогда как консервация в спиртовых растворах приводит к увеличению бриллюэновского сдвига, что свидетельствует о более плотной упаковке как коллагеновых, так и эластиновых волокон. Полученные результаты демонстрируют потенциал спектроскопии РМБ для характеристики высушенных тканей и выявления изменений, связанных с постобработкой биоимплантов. Наряду с оптическими измерениями, для исследуемых образцов были проведены реологические испытания на растяжение. Сравнение продольного гигагерцового модуля (определенного из спектров РМБ) и статического модуля Юнга (полученного из механических испытаний) выявило отсутствие однозначного соответствия между этими параметрами, что указывает на

различную природу информации, извлекаемой из спектральных и механических измерений. Для выявления эффекта образования сшивок и роли воды на продольный гигагерцовый модуль, определяемый из параметров спектра РМБ, было проведено исследование модельных белковых систем (яичного белка и водного раствора бычьего сывороточного альбумина). Данные образцы при неизменном химическом составе и уровне гидратации при высоких температурах могут переходить из жидкого (нативного) состояния в твердоподобное состояние упругого геля (денатурированное). При этом модуль Юнга этих систем меняется от 0 до 3.5-6 кПа. Показано, что процесс денатурации при фиксированной гидратации не приводит к однонаправленному изменению продольного гигагерцового упругого модуля, при этом позиция линии РМБ меняется в пределах нескольких процентов. Это говорит об отсутствии прямой корреляции между макроскопической жёсткостью и упругим модулем, определяемой спектроскопией рассеяния Мандельштама-Бриллюэна, для высокогидратированных материалов. В отличие от частоты, ширина линии РМБ демонстрирует однозначный рост после денатурации, что позволяет рассматривать её как индикатор жесткости биоматериала.

В рамках выполненной диссертационной работы сформулированы следующие основные результаты:

1. На основании анализа спектров РМБ растворов солей установлены корреляции между коэффициентом вязкости Джонса-Доула и коэффициентами в линейном члене концентрационных зависимостей действительной и мнимой частей гигагерцового модуля упругости.

2. Исследование спектров КРС водных растворов солей показало, что концентрационное изменение взвешенной частоты деполяризованного спектра КРС, отражающей длину водородной связи, коррелирует с классификацией ионов в терминах коэффициента Джонса-Доула. Из анализа поляризованных спектров КРС установлено, что различное положение ионов солей в ряду Гофмейстера не связано с их способностью подавлять тетраэдрическое окружение водородной сетки воды.

3. Исследование температурных зависимостей спектров РМБ систем фосфолипидов показало, что изменения скорости звука внутри твердоподобной гелевой фазы превышают изменения при фазовом переходе гель-флюид. Сильная температурная зависимость упругих свойств ниже температуры фазового перехода связана с конформационными изменениями углеводородных хвостов фосфолипидов.

4. Выявлено, что наличие двойных С=C связей в углеводородных хвостах незначительно влияет на температурную зависимость латеральной скорости звука липидных бислоев в гелевой фазе. Продемонстрировано, что температурное поведение скорости звука везикул фосфолипидов описывается преимущественно латеральной скоростью звука бислоев.

5. Применение спектроскопии РМБ к исследованию двойных липидных смесей при концентрации сосуществования упорядоченной и разупорядоченной фаз фосфолипидов продемонстрировало, что низкотемпературный предел скорости звука смеси располагается ниже, чем у индивидуальных компонент, а добавление холестерина приводит к размытию фазового перехода в температурной зависимости скорости звука. Температурная зависимость скорости звука выделенных мембран эритроцитов имеет липидоподобный характер.

6. Исследование спектров РМБ коллагенсодержащих тканей показало, что в случае гидратированных образцов частота бриллюэновской линии слабо чувствительна к обработке ткани диглицидиловым эфиром этиленгликоля. В случае высушенных образцов перикарда и венозной стенки обнаружено увеличение частотного сдвига линии РМБ эластиновых и коллагеновых волокон при хранении обработанной ткани в спиртовых растворах.

7. Исследование модельных белковых систем (водный раствор бычьего сывороточного альбумина, яичный белок) показало, что при денатурации нет взаимно однозначного соответствия между изменениями модуля Юнга и продольного модуля упругости, определяемого спектроскопией РМБ. При этом ширина линии РМБ после денатурации возрастает для обоих белков.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Результаты** работы изложены в следующих публикациях:

Статьи в журналах ВАК:

1. Dobrynina E. A., Zyкова V. A., Adichtchev S. V., Surovtsev N. V. Gigahertz elastic modulus and OH stretching frequency correlate with Jones–Dole’s B-coefficient in aqueous solutions of the Hofmeister series //The Journal of Chemical Physics. — 2023. — Vol. 158. — №. 3. — P. 034504. (9 pages)
2. Dobrynina E. A., Zyкова V. A., Surovtsev N. V. In-plane and out-of-plane gigahertz sound velocities of saturated and unsaturated phospholipid bilayers from cryogenic to room temperatures //Chemistry and Physics of Lipids. — 2023. — Vol. 256. — P. 105335. (7 pages)
3. Dobrynina E. A., Zyкова V. A., Zhuravleva I. Y., Kuznetsova E. V., Surovtsev N. V. Brillouin spectroscopy of medically relevant samples of bovine jugular vein and pericardium //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. — 2024. — Vol. 321. — P. 124692. (9 pages)

Публикации в тезисах и трудах конференций:

4. Добрынина Е.А. Изучение влияния солей, представителей ряда Гофмейстера, на сетку водородных связей воды. // Материалы 58-ой международной научной студенческой конференции, секция «Фотоника и квантовые оптические технологии». 10-17 апреля 2020, г.Новосибирск, Россия. С.14.
5. Добрынина Е.А. Изучение влияния солей, представителей ряда Гофмейстера, на полосу ОН-колебаний в спектрах комбинационного рассеяния света. // Материалы 59-ой международной научной студенческой конференции, секция «Фотоника и квантовые оптические технологии». 12-23 апреля 2021, г.Новосибирск, Россия. С.210.
6. Добрынина Е.А., Зыкова В.А. Изучение водных растворов солей из ряда Гофмейстера методами оптической спектроскопии. // Материалы 7-го Урало-Сибирского семинара «Спектроскопия комбинационного рассеяния света». 23-25 августа 2021, г.Екатеринбург, Россия. С. 16-17.
7. Добрынина Е.А. Изучение температурной зависимости скорости звука в гидратированных фосфолипидных пленках DMPC методом рассеяния Мандельштама-

Бриллюэна. // Материалы 11-ой молодежной конкурс-конференции «Оптические и информационные технологии». 11 ноября 2021, г.Новосибирск, Россия. С. 8-9.

8. Добрынина Е.А. Возможности спектроскопии рассеяния Мандельштама-Бриллюэна для исследования и характеристики мембран эритроцитов человека. // Материалы 60-ой международной научной студенческой конференции, секция «Физические методы в естественных науках и материаловедении», подсекция «Химическая и биологическая физика». 10-20 апреля 2022, г.Новосибирск, Россия. С.228.

9. Добрынина Е.А. Зыкова В.А. Суровцев Н.В. Изучение температурной зависимости упругих свойств гидратированных планарных слоев фосфолипидов методом рассеяния Мандельштама-Бриллюэна. // Материалы российской конференции и школы молодых ученых по актуальным проблемам спектроскопии комбинационного рассеяния света «Комбинационное рассеяние – 95 лет исследований». 5-9 июня 2023, г.Новосибирск, Россия. С.60.

**СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Scarcelli G. et al. Biomechanical characterization of keratoconus corneas ex vivo with Brillouin microscopy //Investigative ophthalmology & visual science. – 2014. – Vol. 55. – №. 7. – P. 4490-4495.
2. Scarcelli G. et al. Brillouin microscopy of collagen crosslinking: noncontact depth-dependent analysis of corneal elastic modulus //Investigative ophthalmology & visual science. – 2013. – Vol. 54. – №. 2. – P. 1418-1425.
3. Scarcelli G., Yun S. H. In vivo Brillouin optical microscopy of the human eye //Optics express. – 2012. – Vol. 20. – №. 8. – P. 9197-9202.
4. Scarcelli G. et al. Noncontact three-dimensional mapping of intracellular hydromechanical properties by Brillouin microscopy //Nature methods. – 2015. – Vol. 12. – №. 12. – P. 1132-1134.
5. Edginton R. S. et al. Dual scale biomechanics of extracellular matrix proteins probed by Brillouin scattering and quasistatic tensile testing //Biophysics, Biology and Biophotonics III: the Crossroads. – SPIE, 2018. – Vol. 10504. – P. 33-39.
6. Bailey M. et al. Viscoelastic properties of biopolymer hydrogels determined by Brillouin spectroscopy: A probe of tissue micromechanics //Science advances. – 2020. – Vol. 6. – №. 44. – P. eabc1937.
7. Jannasch A. et al. Brillouin confocal microscopy to determine biomechanical properties of SULEEI-treated bovine pericardium for application in cardiac surgery //Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2021. – Vol. 79. – №. 1. – P. 179-192.
8. Wu P. J. et al. Water content, not stiffness, dominates Brillouin spectroscopy measurements in hydrated materials //Nature methods. – 2018. – Vol. 15. – №. 8. – P. 561-562.
9. Zhao H. Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids //Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. – 2006. – Vol. 81. – №. 6. – P. 877-891.
10. LePesant J. P., Powers L., Pershan P. S. Brillouin light scattering measurement of the elastic properties of aligned multilamella lipid samples //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – Vol. 75. – №. 4. – P. 1792-1795.
11. Manglkammer W., Krüger J. K. Brillouin scattering of lipid membranes //Journal de Physique IV (Proceedings). – EDP sciences, 2005. – Vol. 129. – P. 65-67.

12. Sassi P. et al. Infrared versus light scattering techniques to monitor the gel to liquid crystal phase transition in lipid membranes //Journal of Raman Spectroscopy. – 2015. – Vol. 46. – №. 7. – P. 644-651.
13. Zykova V. A., Adichtchev S. V., Surovtsev N. V. Effect of the hydrocarbon chain disorder in phosphatidylcholine bilayers on gigahertz sound velocity //The Journal of Physical Chemistry B. – 2020. – Vol. 124. – №. 41. – P. 9079-9085.
14. Adichtchev S. V. et al. Raman spectroscopic study of phase coexistence in binary phospholipid bilayers //Applied Spectroscopy. – 2021. – Vol. 75. – №. 1. – P. 87-93.
15. Beroud J. et al. Brillouin spectroscopy: a new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films //Bio-Medical Materials and Engineering. – 2013. – Vol. 23. – №. 4. – P. 251-261.
16. Villalba-Orero M. et al. Assessment of myocardial viscoelasticity with Brillouin spectroscopy in myocardial infarction and aortic stenosis models //Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – №. 1. – P. 21369..
17. Palombo F., Fioretto D. Brillouin light scattering: applications in biomedical sciences //Chemical reviews. – 2019. – Vol. 119. – №. 13. – P. 7833-7847.
18. Prevedel R. et al. Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology //Nature methods. – 2019. – Vol. 16. – №. 10. – P. 969-977.
19. Alunni Cardinali M. et al. Brillouin and Raman micro-spectroscopy: A tool for micro-mechanical and structural characterization of cortical and trabecular bone tissues //Materials. – 2021. – Vol. 14. – №. 22. – P. 6869.
20. Hammoud B. et al. Brillouin microscopy for focal biomechanical measurements in normal and keratoconic corneas: A narrative review //Survey of Ophthalmology. – 2025. – Vol. 71. – №. 2. – P. 662-673.
21. Loveless B. A. et al. The utilization of Brillouin microscopy in corneal diagnostics: a systematic review //Cureus. – 2024. – Vol. 16. – №. 7. - С. e65769.
22. Zhang H. et al. Motion-Tracking Brillouin Microscopy Evaluation of Normal, Keratoconic, and Post-Laser Vision Correction Corneas //American journal of ophthalmology. – 2023. – Vol. 254. – P. 128-140.
23. Фабелинский И. Л. Молекулярное рассеяние света // М.: Наука, 1965. 511 с.
24. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. Т. VIII. Электродинамика сплошных сред.// М.: ФИЗМАТЛИТ, 2005. 656 с.

25. Суровцев Н. В. Спектроскопия конденсированных сред: Учеб. пособ. // Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2010. 237 с.
26. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. Т. V. Статистическая физика. Ч. I. // М.: ФИЗМАТЛИТ, 2002. 616 с.
27. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. Т. V. Теория упругости // М.: Наука, 1987. 248 с.
28. Mehta V. et al. Mechanical forces regulate endothelial-to-mesenchymal transition and atherosclerosis via an Alk5-Shc mechanotransduction pathway // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7. – №. 28. – P. eabg5060.
29. Zhu W. et al. PIEZO1 mediates a mechanothrombotic pathway in diabetes // *Science Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 14. – №. 626. – P. eabk1707.
30. Hall C. M., Moeendarbary E., Sheridan G. K. Mechanobiology of the brain in ageing and Alzheimer's disease // *European Journal of Neuroscience*. – 2021. – Vol. 53. – №. 12. – P. 3851-3878.
31. Javier-Torrent M., Zimmer-Bensch G., Nguyen L. Mechanical forces orchestrate brain development // *Trends in Neurosciences*. – 2021. – Vol. 44. – №. 2. – P. 110-121.
32. Reuten R. et al. Basement membrane stiffness determines metastases formation // *Nature materials*. – 2021. – Vol. 20. – №. 6. – P. 892-903.
33. Harada T. et al. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival // *Journal of Cell Biology*. – 2014. – Vol. 204. – №. 5. – P. 669-682.
34. Cross S. E. et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients // *Nano-enabled medical applications*. – Jenny Stanford Publishing, 2020. – P. 547-566.
35. Weder G. et al. Increased plasticity of the stiffness of melanoma cells correlates with their acquisition of metastatic properties // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 10. – №. 1. – P. 141-148.
36. Byfield F. J. et al. Endothelial actin and cell stiffness is modulated by substrate stiffness in 2D and 3D // *Journal of biomechanics*. – 2009. – Vol. 42. – №. 8. – P. 1114-1119.
37. Wullkopf L. et al. Cancer cells' ability to mechanically adjust to extracellular matrix stiffness correlates with their invasive potential // *Molecular biology of the cell*. – 2018. – Vol. 29. – №. 20. – P. 2378-2385.

38. Handler C., Testi C., Scarcelli G. Advantages of integrating Brillouin microscopy in multimodal mechanical mapping of cells and tissues //Current Opinion in Cell Biology. – 2024. – Vol. 88. – P. 102341.
39. Scarcelli G., Yun S. H. Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging //Nature photonics. – 2008. – Vol. 2. – №. 1. – P. 39-43.
40. Margueritat J. et al. High-frequency mechanical properties of tumors measured by Brillouin light scattering //Physical review letters. – 2019. – Vol. 122. – №. 1. – P. 018101.
41. Antonacci G. et al. Background-deflection Brillouin microscopy reveals altered biomechanics of intracellular stress granules by ALS protein FUS //Communications biology. – 2018. – Vol. 1. – №. 1. – P. 139.
42. Rad M. A. et al. Micromechanical characterisation of 3D bioprinted neural cell models using Brillouin microspectroscopy //Bioprinting. – 2022. – Vol. 25. – P. e00179.
43. Keshmiri H. et al. Brillouin light scattering anisotropy microscopy for imaging the viscoelastic anisotropy in living cells //Nature Photonics. – 2024. – P. 1-10.
44. Bevilacqua C. et al. Imaging mechanical properties of sub-micron ECM in live zebrafish using Brillouin microscopy //Biomedical Optics Express. – 2019. – Vol. 10. – №. 3. – P. 1420-1431.
45. De Santis R. et al. Mutant FUS and ELAVL4 (HuD) aberrant crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis //Cell reports. – 2019. – Vol. 27. – №. 13. – P. 3818-3831. e5.
46. Koski K. J. et al. Non-invasive determination of the complete elastic moduli of spider silks //Nature materials. – 2013. – Vol. 12. – №. 3. – P. 262-267.
47. Palombo F. et al. Biomechanics of fibrous proteins of the extracellular matrix studied by Brillouin scattering //Journal of The Royal Society Interface. – 2014. – Vol. 11. – №. 101. – P. 20140739.
48. Antonacci G. et al. Quantification of plaque stiffness by Brillouin microscopy in experimental thin cap fibroatheroma //Journal of the Royal Society Interface. – 2015. – Vol. 12. – №. 112. – P. 20150843.
49. Pruidze P. et al. Brillouin scattering spectroscopy for studying human anatomy: Towards in situ mechanical characterization of soft tissue //Journal of the European Optical Society. – 2023. – Vol. 19. – №. 1. – C. 31.
50. Ryu S. et al. Label-free histological imaging of tissues using Brillouin light scattering contrast //Biomedical optics express. – 2021. – Vol. 12. – №. 3. – P. 1437-1448.

51. Cardinali M. A. et al. Brillouin micro-spectroscopy of subchondral, trabecular bone and articular cartilage of the human femoral head //Biomedical optics express. – 2019. – Vol. 10. – №. 5. – P. 2606-2611.
52. Lainović T. et al. Micromechanical imaging of dentin with Brillouin microscopy //Acta Biomaterialia. – 2020. – Vol. 105. – P. 214-222.
53. Alunni Cardinali M. et al. Brillouin–Raman microspectroscopy for the morpho-mechanical imaging of human lamellar bone //Journal of The Royal Society Interface. – 2022. – Vol. 19. – №. 187. – P. 20210642.
54. Hofmeister F. About the science of the effects of salts: About the water withdrawing effect of the salts //Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. – 1888. – Vol. 24. – P. 247-260.
55. Chaplin M. THE WATER MOLECULE, LIQUID WATER, HYDROGEN BONDS, AND WATER //Water: The forgotten biological molecule. – 2011. – P. 1.
56. Hamaguchi K., Geiduschek E. P. The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix //Journal of the American Chemical Society. – 1962. – Vol. 84. – №. 8. – P. 1329-1338.
57. Collins K. D., Washabaugh M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces //Quarterly reviews of biophysics. – 1985. – Vol. 18. – №. 4. – P. 323-422.
58. Gurney R. W., Gurney R. W. Ionic processes in solution. – 1953. – 275 p.
59. Li R. et al. Hydrogen bonded structure of water and aqueous solutions of sodium halides: a Raman spectroscopic study //Journal of molecular structure. – 2004. – Vol. 707. – №. 1-3. – P. 83-88.
60. Sun Q. Raman spectroscopic study of the effects of dissolved NaCl on water structure //Vibrational Spectroscopy. – 2012. – Vol. 62. – P. 110-114.
61. Ahmed M. et al. How ions affect the structure of water: a combined Raman spectroscopy and multivariate curve resolution study //The Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – Vol. 117. – №. 51. – P. 16479-16485.
62. Nickolov Z. S., Miller J. D. Water structure in aqueous solutions of alkali halide salts: FTIR spectroscopy of the OD stretching band //Journal of colloid and interface science. – 2005. – Vol. 287. – №. 2. – P. 572-580.
63. Johnson C. M., Baldelli S. Vibrational sum frequency spectroscopy studies of the influence of solutes and phospholipids at vapor/water interfaces relevant to biological and environmental systems //Chemical reviews. – 2014. – Vol. 114. – №. 17. – P. 8416-8446.

64. Tielrooij K. J. et al. Cooperativity in ion hydration //science. – 2010. – Vol. 328. – №. 5981. – P. 1006-1009.
65. Kohagen M. et al. Exploring ion–ion interactions in aqueous solutions by a combination of molecular dynamics and neutron scattering //The journal of physical chemistry letters. – 2015. – Vol. 6. – №. 9. – P. 1563-1567.
66. Kanno H. et al. Structure-making ions become structure breakers in glassy aqueous electrolyte solutions //Chemical Physics Letters. – 2006. – Vol. 427. – №. 1-3. – P. 82-86.
67. Yonehama K. et al. Variation of the uncoupled OD stretching frequency with electrolyte concentration in aqueous electrolyte solutions //Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 2009. – Vol. 82. – №. 5. – P. 563-569.
68. Luo Z. X. et al. Electroneutrality breakdown and specific ion effects in nanoconfined aqueous electrolytes observed by NMR //Nature communications. – 2015. – Vol. 6. – №. 1. – P. 6358.
69. Xie W. J., Gao Y. Q. A simple theory for the Hofmeister series //The journal of physical chemistry letters. – 2013. – Vol. 4. – №. 24. – P. 4247-4252.
70. Collins K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process //Methods. – 2004. – Vol. 34. – №. 3. – P. 300-311.
71. Collins K. D. Why continuum electrostatics theories cannot explain biological structure, polyelectrolytes or ionic strength effects in ion–protein interactions //Biophysical chemistry. – 2012. – Vol. 167. – P. 43-59.
72. Ball P., Hallsworth J. E. Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2015. – Vol. 17. – №. 13. – P. 8297-8305.
73. Collins K. D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure //Biophysical journal. – 1997. – Vol. 72. – №. 1. – P. 65-76.
74. Cox W. M., Wolfenden J. H. The viscosity of strong electrolytes measured by a differential method //Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing papers of a mathematical and physical character. – 1934. – Vol. 145. – №. 855. – P. 475-488.
75. Zieliński R. Effect of temperature on the viscosity of aqueous solutions of alkyltrimethylammonium bromides //Zeitschrift für Physikalische Chemie. – 1991. – Vol. 173. – №. 1. – P. 63-78.

76. Andreev M. et al. Influence of ion solvation on the properties of electrolyte solutions //The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – Vol. 122. – №. 14. – P. 4029-4034.
77. Lee E., Choi J. H., Cho M. The effect of Hofmeister anions on water structure at protein surfaces //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2017. – Vol. 19. – №. 30. – P. 20008-20015.
78. Schwaab G., Sebastiani F., Havenith M. Ion hydration and ion pairing as probed by THz spectroscopy //Angewandte Chemie International Edition. – 2019. – Vol. 58. – №. 10. – P. 3000-3013.
79. Gong Y. et al. Raman spectroscopy of alkali halide hydration: hydrogen bond relaxation and polarization //Journal of Raman Spectroscopy. – 2016. – Vol. 47. – №. 11. – P. 1351-1359.
80. Mäemets V., Koppel I. Effect of ions on the  $^{17}\text{O}$  and  $^1\text{H}$  NMR chemical shifts of water //Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. – 1998. – Vol. 94. – №. 21. – P. 3261-3269.
81. Wei Z. Y. et al. Comparison of the Microsolvation of  $\text{CaX}_2$  ( $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ ) in Water: Size-Selected Anion Photoelectron Spectroscopy and Theoretical Calculations //The Journal of Physical Chemistry A. – 2021. – Vol. 125. – №. 16. – P. 3288-3306.
82. Mattana S. et al. Non-contact mechanical and chemical analysis of single living cells by microspectroscopic techniques //Light: Science & Applications. – 2018. – Vol. 7. – №. 2. – P. 17139-17139.
83. Shao P. et al. Effects of corneal hydration on Brillouin microscopy in vivo //Investigative ophthalmology & visual science. – 2018. – Vol. 59. – №. 7. – P. 3020-3027.
84. Adichtchev S. V. et al. Brillouin spectroscopy of biorelevant fluids in relation to viscosity and solute concentration //Physical review E. – 2019. – Vol. 99. – №. 6. – P. 062410.
85. Okazaki Y. et al. Comparative study on the properties of hydration water of Na- and K-halide ions by Raman OH/OD-stretching spectroscopy and dielectric relaxation data //The Journal of Physical Chemistry A. – 2014. – Vol. 118. – №. 16. – P. 2922-2930.
86. Schmidt D. A. et al. Rattling in the cage: Ions as probes of sub-picosecond water network dynamics //Journal of the American Chemical Society. – 2009. – Vol. 131. – №. 51. – P. 18512-18517.
87. Р. Геннис, Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 624 с.

88. Kučerka N. et al. The effect of cholesterol on short-and long-chain monounsaturated lipid bilayers as determined by molecular dynamics simulations and X-ray scattering //Biophysical journal. – 2008. – Vol. 95. – №. 6. – P. 2792-2805.
89. Nagle J. F. et al. Structure of the gel phase of diC22: 1PC lipid bilayers determined by x-ray diffraction //Biophysical Journal. – 2023. – Vol. 122. – №. 6. – P. 1033-1042.
90. Sekine A. et al. Effect of polyols on membrane structures of liposomes: A study using small-angle X-ray scattering data and generalized indirect Fourier transformation //Chemistry and Physics of Lipids. – 2022. – Vol. 249. – P. 105253.
91. Gupta R. et al. 1, 3 dialkylated imidazolium ionic liquid causes interdigitated domains in a phospholipid membrane //Langmuir. – 2022. – Vol. 38. – №. 11. – P. 3412-3421.
92. Takechi-Haraya Y. et al. Detection of material-derived differences in the stiffness of egg yolk phosphatidylcholine-containing liposomes using atomic force microscopy //Chemistry and physics of lipids. – 2020. – Vol. 233. – P. 104992.
93. DiPasquale M. et al. Influence of ceramide on lipid domain stability studied with small-angle neutron scattering: The role of acyl chain length and unsaturation //Chemistry and physics of lipids. – 2022. – Vol. 245. – P. 105205.
94. Harvey R. D. et al. Absolute scattering length density profile of liposome bilayers obtained by SAXS combined with GIXOS: a tool to determine model biomembrane structure //Applied Crystallography. – 2023. – Vol. 56. – №. 6. – P. 1639-1649.
95. Benedetto A., Kelley E. G. Absorption of the [bmim][Cl] ionic liquid in DMPC lipid bilayers across their gel, ripple, and fluid phases //The Journal of Physical Chemistry B. – 2022. – Vol. 126. – №. 17. – P. 3309-3318.
96. Tchoreloff P. et al. A structural study of interfacial phospholipid and lung surfactant layers by transmission electron microscopy after Blodgett sampling: influence of surface pressure and temperature //Chemistry and physics of lipids. – 1991. – Vol. 59. – №. 2. – P. 151-165.
97. Dao T. P. T. et al. Mixing block copolymers with phospholipids at the nanoscale: from hybrid polymer/lipid wormlike micelles to vesicles presenting lipid nanodomains //Langmuir. – 2017. – Vol. 33. – №. 7. – P. 1705-1715.
98. Gu L. et al. Nanostructured lipid carriers for the encapsulation of phloretin: Preparation and in vitro characterization studies //Chemistry and physics of lipids. – 2022. – Vol. 242. – P. 105150.

99. Moreno M. M. et al. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2009. – Vol. 1788. – №. 6. – P. 1296-1303.
100. Svetlovics J. A., Wheaten S. A., Almeida P. F. Phase separation and fluctuations in mixtures of a saturated and an unsaturated phospholipid //Biophysical journal. – 2012. – VOL. 102. – №. 11. – P. 2526-2535.
101. Johnston L. J. Nanoscale imaging of domains in supported lipid membranes //Langmuir. – 2007. – VOL. 23. – №. 11. – P. 5886-5895.
102. Chen Z. et al. Lipid phase influences the dynamic interactions between graphene oxide nanosheets and a Phospholipid membrane //The Journal of Physical Chemistry B. – 2021. – Vol. 125. – №. 14. – P. 3589-3597.
103. Vazquez R. F. et al. Asymmetric bilayers mimicking membrane rafts prepared by lipid exchange: Nanoscale characterization using AFM-Force spectroscopy //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2021. – Vol. 1863. – №. 1. – P. 183467.
104. Dopierała K. et al. Effect of 1-alkyl-1-methylpiperidinium bromides on lipids of fungal plasma membrane and lung surfactant //Chemistry and physics of lipids. – 2022. – Vol. 248. – P. 105240.
105. Bernabeu A., Shapiro S., Villalaín J. A MAS-NMR study of the location of (+)-totarol, a diterpenoid bioactive molecule, in phospholipid model membranes //Chemistry and physics of lipids. – 2002. – Vol. 119. – №. 1-2. – P. 33-39.
106. Veatch S. L. et al. Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104. – №. 45. – P. 17650-17655.
107. Fritzsche K. J., Kim J., Holland G. P. Probing lipid–cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and <sup>13</sup>C solid-state NMR //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2013. – Vol. 1828. – №. 8. – P. 1889-1898.
108. Yasuda T. et al. Deuterium NMR of raft model membranes reveals domain-specific order profiles and compositional distribution //Biophysical Journal. – 2015. – Vol. 108. – №. 10. – P. 2502-2506.

109. Deo T. et al. Application of DNP-enhanced solid-state NMR to studies of amyloid- $\beta$  peptide interaction with lipid membranes //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 236. – P. 105071.
110. Umegawa Y., Matsumori N., Murata M. Recent Solid-State NMR Studies of Hydrated Lipid Membranes //Annual Reports on NMR spectroscopy. – 2018. – Vol. 94. – P. 41-72.
111. Suga K., Umakoshi H. Detection of nanosized ordered domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch binary lipid mixture systems of large unilamellar vesicles using a TEMPO quenching method //Langmuir. – 2013. – Vol. 29. – No. 15. – P. 4830-4838.
112. Shin Y. K., Freed J. H. Dynamic imaging of lateral diffusion by electron spin resonance and study of rotational dynamics in model membranes. Effect of cholesterol //Biophysical journal. – 1989. – Vol. 55. – №. 3. – P. 537-550.
113. Bartucci R. et al. Time-resolved electron spin resonance studies of spin-labelled lipids in membranes //Chemistry and physics of lipids. – 2006. – Vol. 141. – №. 1-2. – P. 142-157.
114. Syryamina V. N., Dzuba S. A. Phospholipid bilayer relaxation dynamics as revealed by the pulsed electron-electron double resonance of spin labels //The Journal of Chemical Physics. – 2012. – Vol. 137. – №. 14. - P. 145102.
115. Marquezin C. A. et al. The interaction of a thiosemicarbazone derived from R-(+)-limonene with lipid membranes //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 234. – P. 105018.
116. Amaro M. et al. Time-resolved fluorescence in lipid bilayers: selected applications and advantages over steady state //Biophysical journal. – 2014. – Vol. 107. – №. 12. – P. 2751-2760.
117. Nojima Y., Iwata K. Viscosity heterogeneity inside lipid bilayers of single-component phosphatidylcholine liposomes observed with picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy //The Journal of Physical Chemistry B. – 2014. – Vol. 118. – №. 29. – P. 8631-8641.
118. Ma Y. et al. Time-resolved laurdan fluorescence reveals insights into membrane viscosity and hydration levels //Biophysical journal. – 2018. – Vol. 115. – №. 8. – P. 1498-1508.

119. Chang Z. et al. Exploring interactions between lipids and amyloid-forming proteins: a review on applying fluorescence and NMR techniques //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 236. – P. 105062.
120. Nagao M. et al. Probing elastic and viscous properties of phospholipid bilayers using neutron spin echo spectroscopy //The journal of physical chemistry letters. – 2017. – Vol. 8. – №. 19. – P. 4679-4684.
121. Kelley E. G. et al. Scaling relationships for the elastic moduli and viscosity of mixed lipid membranes //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117. – №. 38. – P. 23365-23373.
122. Miao S. et al. Lipid membrane flexibility in protic ionic liquids //The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2022. – Vol. 13. – №. 23. – P. 5240-5245.
123. Niri V. H. et al. Simultaneous monitoring of electroformation of phospholipid vesicles by quartz crystal microbalance and optical microscopy //Chemistry and physics of lipids. – 2010. – Vol. 163. – №. 1. – P. 36-41.
124. Eid J. et al. Elastic moduli of lipid membranes: Reproducibility of AFM measures //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 234. – P. 105011.
125. Kamble S., Patil S., Appala V. R. M. Nano-mechanical characterization of asymmetric DLPC/DSPC supported lipid bilayers //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 234. – P. 105007.
126. Schultz Z. D., Levin I. W. Vibrational spectroscopy of biomembranes //Annual review of analytical chemistry. – 2011. – Vol. 4. – №. 1. – P. 343-366.
127. D'Angelo G. et al. Multiple interacting collective modes and phonon gap in phospholipid membranes //The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2018. – Vol. 9. – №. 15. – P. 4367-4372.
128. Cernescu A. et al. Label-free infrared spectroscopy and imaging of single phospholipid bilayers with nanoscale resolution //Analytical Chemistry. – 2018. – Vol. 90. – №. 17. – P. 10179-10186.
129. Broadhurst C. L. et al. Continuous gradient temperature Raman spectroscopy of 1-stearoyl-2-docosahexaenoyl, 1-stearoyl-2-arachidonoyl, and 1, 2-stearoyl phosphocholines //Chemistry and physics of lipids. – 2021. – Vol. 239. – P. 105116.

130. Mishra S., Mishra A. K. Raman microspectroscopic and quantum chemical investigations of neuroleptic drugs interactions with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) lipid //Vibrational Spectroscopy. – 2021. – Vol. 114. – P. 103242.
131. Shamaeva D. V., Okotrub K. A., Surovtsev N. V. Coexistence of lipid phases in multilayer phospholipid films probed by Raman mapping //Analyst. – 2022. – Vol. 147. – №. 16. – P. 3748-3755.
132. Surovtsev N. V., Dzuba S. A. Conformational changes of lipids in bilayers at the dynamical transition near 200 K seen by Raman scattering //The Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – Vol. 113. – №. 47. – P. 15558-15562.
133. Golysheva E. A., Dzuba S. A. Lipid chain mobility and packing in DOPC bilayers at cryogenic temperatures //Chemistry and Physics of Lipids. – 2020. – Vol. 226. – P. 104817.
134. Aloï E., Bartucci R. Influence of hydration on segmental chain librations and dynamical transition in lipid bilayers //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2022. – Vol. 1864. – №. 1. – P. 183805.
135. Ferrand M. et al. Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – Vol. 90. – №. 20. – P. 9668-9672.
136. Pink D. A., Green T. J., Chapman D. Raman scattering in bilayers of saturated phosphatidylcholines. Experiment and theory //Biochemistry. – 1980. – Vol. 19. – №. 2. – P. 349-356.
137. Dmitriev A. A., Surovtsev N. V. Temperature-dependent hydrocarbon chain disorder in phosphatidylcholine bilayers studied by Raman spectroscopy //The Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – Vol. 119. – №. 51. – P. 15613-15622.
138. Rawicz W. et al. Elasticity, strength, and water permeability of bilayers that contain raft microdomain-forming lipids //Biophysical journal. – 2008. – Vol. 94. – №. 12. – P. 4725-4736.
139. Marsh D. Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers //Chemistry and physics of lipids. – 2006. – Vol. 144. – №. 2. – P. 146-159.
140. Fa N. et al. Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2007. – Vol. 1768. – №. 7. – P. 1830-1838.

141. Balantič K. et al. Calcium ion effect on phospholipid bilayers as cell membrane analogues //Bioelectrochemistry. – 2022. – Vol. 143. – P. 107988.
142. Zabala-Ferrera O., Liu P., Beltramo P. J. Determining the Bending Rigidity of Free-Standing Planar Phospholipid Bilayers //Membranes. – 2023. – Vol. 13. – №. 2. – P. 129.
143. Mouritsen O. G., Bloom M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes //Biophysical journal. – 1984. – Vol. 46. – №. 2. – P. 141-153.
144. Andersen O. S. et al. Single-molecule methods for monitoring changes in bilayer elastic properties //Methods in Membrane Lipids. – 2007. – P. 543-570.
145. Poon C. et al. Brillouin imaging for studies of micromechanics in biology and biomedicine: from current state-of-the-art to future clinical translation //Journal of Physics: Photonics. – 2020. – Vol. 3. – №. 1. – P. 012002.
146. Mattana S. et al. Non-contact mechanical and chemical analysis of single living cells by microspectroscopic techniques //Light: Science & Applications. – 2018. – Vol. 7. – №. 2. – P. 17139-17139.
147. Margueritat J. et al. High-frequency mechanical properties of tumors measured by Brillouin light scattering //Physical review letters. – 2019. – Vol. 122. – №. 1. – P. 018101.
148. Zykova V. A., Adichtchev S. V., Surovtsev N. V. Effect of the hydrocarbon chain disorder in phosphatidylcholine bilayers on gigahertz sound velocity //The Journal of Physical Chemistry B. – 2020. – Vol. 124. – №. 41. – P. 9079-9085.
149. Khan R. H., Siddiqi M. K., Salahuddin P. Protein structure and function //Basic biochemistry. – 2017. – Vol. 5. – P. 1-39.
150. Momot K. I. Hydrated collagen: where physical chemistry, medical imaging, and bioengineering meet //The Journal of Physical Chemistry B. – 2022. – Vol. 126. – №. 49. – P. 10305-10316.
151. Sasaki N., Odajima S. Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique //Journal of biomechanics. – 1996. – Vol. 29. – №. 5. – P. 655-658.
152. Shen Z. L. et al. Stress-strain experiments on individual collagen fibrils //Biophysical journal. – 2008. – Vol. 95. – №. 8. – P. 3956-3963.
153. Chachra D. et al. Effect of applied uniaxial stress on rate and mechanical effects of cross-linking in tissue-derived biomaterials //Biomaterials. – 1996. – Vol. 17. – №. 19. – P. 1865-1875.

154. Mirkhalaf M. et al. Personalized Baghdadite scaffolds: stereolithography, mechanics and in vivo testing //Acta Biomaterialia. – 2021. – Vol. 132. – P. 217-226.
155. Beroud J. et al. Brillouin spectroscopy: a new tool to decipher viscoelastic properties of biological scaffold functionalized with nanoscale films //Bio-Medical Materials and Engineering. – 2013. – Vol. 23. – №. 4. – P. 251-261.
156. Villalba-Orero M. et al. Assessment of myocardial viscoelasticity with Brillouin spectroscopy in myocardial infarction and aortic stenosis models //Scientific reports. – 2021. – Vol. 11. – №. 1. – P. 21369.
157. Zykova V. A., Surovtsev N., Zhuravleva I. Possibilities of Brillouin spectroscopy in the study of xenogeneic collagen-containing materials //Optical Elastography and Tissue Biomechanics VIV. – SPIE, 2022. – Vol. 11962. – P. 19-23.
158. Sassi P. et al. Reversible and irreversible denaturation processes in globular proteins: from collective to molecular spectroscopic analysis //Journal of Raman Spectroscopy. – 2012. – Vol. 43. – №. 2. – P. 273-279.
159. Лебедева В.В. Техника оптической спектроскопии // М.: Изд-во МГУ. 1986. 352 P.
160. Lindsay S. M., Anderson M. W., Sandercock J. R. Construction and alignment of a high performance multipass vernier tandem Fabry–Perot interferometer //Review of scientific instruments. – 1981. – Vol. 52. – №. 10. – P. 1478-1486.
161. Mock R., Hillebrands B., Sandercock R. Construction and performance of a Brillouin scattering set-up using a triple-pass tandem Fabry-Perot interferometer //Journal of Physics E: Scientific Instruments. – 1987. – Vol. 20. – №. 6. – P. 656.
162. Pang S. M., Lv Y. P., Zhang J. Spurious signals identification in Brillouin light scattering spectrum //Journal of Raman Spectroscopy. – 2024. – Vol. 55. – №. 9. – P. 1019-1026.
163. Walrafen G. E., Chu Y. C. Linearity between structural correlation length and correlated-proton Raman intensity from amorphous ice and supercooled water up to dense supercritical steam //The Journal of Physical Chemistry. – 1995. – Vol. 99. – №. 28. – P. 11225-11229.
164. Sun Q. The Raman OH stretching bands of liquid water //Vibrational Spectroscopy. – 2009. – Vol. 51. – №. 2. – P. 213-217.

165. Morawietz T. et al. The interplay of structure and dynamics in the Raman spectrum of liquid water over the full frequency and temperature range //The Journal of Physical Chemistry Letters. – 2018. – Vol. 9. – №. 4. – P. 851-857.
166. Novak A. Hydrogen bonding in solids. Correlation of spectroscopic and crystallographic data // Large Molecules. Structure and Bonding. – Berlin, Heidelberg: Springer, 1974. – Vol. 18. – P. 177–216.
167. Smith J. D., Saykally R. J., Geissler P. L. The effects of dissolved halide anions on hydrogen bonding in liquid water //Journal of the American Chemical Society. – 2007. – Vol. 129. – №. 45. – P. 13847-13856.
168. Jenkins H. D. B., Marcus Y. Viscosity B-coefficients of ions in solution //Chemical reviews. – 1995. – Vol. 95. – №. 8. – P. 2695-2724.
169. Zaytseva Y. V., Zaytseva I. V., Surovtsev N. V. Conformational state diagram of DOPC/DPPCd62/cholesterol mixtures //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2022. – Vol. 1864. – №. 4. – P. 183869.
170. Brechling A. et al. Structural organization of DMPC lipid layers on chemically micropatterned self-assembled monolayers as biomimetic systems //Journal of biotechnology. – 2004. – Vol. 112. – №. 1-2. – P. 115-125.
171. Zaytseva Y. V., Adichtchev S. V., Surovtsev N. V. Raman study of temperature-induced hydrocarbon chain disorder in saturated phosphatidylcholines //Chemistry and Physics of Lipids. – 2020. – Vol. 230. – P. 104926.
172. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes //Archives of biochemistry and biophysics. – 1963. – Vol. 100. – №. 1. – P. 119-130.
173. Reid M. E., Westhoff C. M. Membrane blood group antigens and antibodies //Blood Banking and Transfusion Medicine. – Churchill Livingstone, 2007. – P. 53-68.
174. Gauvin R. et al. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants //Journal of biomaterials applications. – 2013. – Vol. 28. – №. 4. – P. 552-565.
175. Joyce K., Rochev Y., Rahmani S. Assessment of the uniaxial experimental parameters utilised for the mechanical testing of bovine pericardium //Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2019. – Vol. 96. – P. 27-37.

176. Llave Y. et al. Analysis of color changes in chicken egg yolks and whites based on degree of thermal protein denaturation during ohmic heating and water bath treatment //Journal of food engineering. – 2018. – Vol. 222. – P. 151-161.
177. Lin V. J. C., Koenig J. L. Raman studies of bovine serum albumin //Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1976. – Vol. 15. – №. 1. – P. 203-218.
178. Laktionova A. V., Zykova V. A., Surovtsev N. V. Brillouin Scattering in Collagen-Based Hydrogels //Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2024. – Vol. 88. – №. Suppl 2. – P. S180-S184.
179. Zhang H. P. et al. Brillouin scattering study of salol: Exploring the effects of rotation-translation coupling //Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. – 2004. – Vol. 70. – №. 1. – P. 011502.
180. Deng Z. et al. Determination of continuous complex refractive index dispersion of biotissue based on internal reflection //Journal of biomedical optics. – 2016. – Vol. 21. – №. 1. – P. 015003-015003.
181. Barer R., Tkaczyk S. Refractive index of concentrated protein solutions //Nature. – 1954. – Vol. 173. – №. 4409. – P. 821-822.
182. Nagano T., Nishinari K. Rheological studies on commercial egg white using creep and compression measurements //Food Hydrocolloids. – 2001. – Vol. 15. – №. 4-6. – P. 415-421.
183. Ahmed J. et al. Protein denaturation, rheology, and gelation characteristics of radio-frequency heated egg white dispersions //International Journal of Food Properties. – 2007. – Vol. 10. – №. 1. – P. 145-161.
184. Cao J. et al. Brillouin microscopy: an emerging tool for biomechanical analysis in ophthalmology //Journal of Refractive Surgery. – 2025. – Vol. 41. – №. 7. – P. e731-e746.