

Низкочастотная спектроскопия биомолекул в водных растворах с помощью четырехволнового смешения

А.Ф.Бункин, С.М.Першин

Спектроскопия четырехфотонного рассеяния (ЧФР) применена для регистрации вращательных резонансов молекул H_2O и H_2O_2 в водных растворах ДНК и денатурированной ДНК в диапазоне ± 10 см⁻¹ со спектральным разрешением 3 ГГц. Обнаружен значительный рост резонансного вклада вращательных переходов этих молекул в растворе по сравнению с дистиллированной водой. Этот факт интерпретирован как проявление специфических свойств гидратного слоя на границе воды с молекулами ДНК и денатурированной ДНК. Анализ спектров ЧФР показал, что концентрация молекул H_2O_2 в гидратном слое молекулы ДНК выросла в 3 раза после денатурации. Получены также спектры ЧФР водных растворов белка α -химотрипсин в спектральном диапазоне ± 7 см⁻¹ при концентрациях 0–20 мг/см³. Обнаружено, что скорость гиперзвука в водном растворе белка, измеряемая по сдвигу компонент Мандельштама–Бриллюэна в спектре рассеяния, имеет кубическую зависимость от концентрации и достигает 3000 м/с при 20 мг/см³.

Ключевые слова: спектроскопия четырехфотонного рассеяния, ДНК, гидратный слой.

1. Введение

Известно, что вода играет важнейшую роль в механизме функционирования молекул протеинов и ДНК в нативных условиях. Одна из основных задач настоящей работы – выяснение физики взаимодействия молекулы биополимера и молекулы воды, что существенно для понимания механизма конформации молекул белка [1–3], протекания жидкости сквозь капилляры и проницаемости клеточных мембран [4], стабильности биологических структур в водном окружении [5]. К настоящему времени установлено [6–9], что свойства воды, окружающей биополимеры, существенно отличаются от свойств объемной воды без биомолекул. Причина этого до конца не ясна. Расчеты молекулярной динамики показали, что в контактном (гидратном) слое вокруг некоторых протеинов [6, 7] и углеводов [8] существуют достаточно жесткие структуры, состоящие из молекул воды. Например, гидратный слой препятствует сближению эритроцитов в водной суспензии и достижению предельной концентрации, определяемой их геометрическими размерами [10]. При этом толщина гидратного слоя может достигать нескольких микрон при диаметре эритроцита человека ~ 7 мкм [10]. Такие образования изучались разными методами, в том числе спектроскопией микроволнового поглощения [9]. Однако в этом случае возникают серьезные трудности из-за сильного поглощения воды в далеком ИК диапазоне, что заставляет проводить измерения в тонких слоях (с характерной толщиной 25–450 мкм) в условиях неконтролируемого локального нагрева, т. е. в условиях, далеких от естественных.

Основная трудность изучения гидратных слоев биомолекул и наночастиц с помощью оптической спектроскопии состоит в малом количестве молекул, входящих в гидратный слой, сигнал от которых нужно выделить на фоне сигнала молекул воды, расположенных вне этого слоя. Поэтому применяемый метод должен быть неразрушающим, создающим минимальное возмущение (например, нагрев), и достаточно чувствительным (т. е. имеющим высокое отношение сигнал/шум). Такой подход должен давать возможность проводить измерения в области, где оптический спектр максимально зависит от межмолекулярных взаимодействий. Для воды этой областью является диапазон от единиц до примерно 200 см⁻¹, где расположены трансляционные (~ 180 см⁻¹) и поперечные (~ 60 см⁻¹) межмолекулярные колебания.

Перспективным подходом к решению таких задач является спектроскопия четырехфотонного рассеяния (ЧФР) света [11, 12], в которой используются два лазерных поля с частотами ω_1 и ω_2 , лежащими в видимом диапазоне, т. е. в окне прозрачности биологического образца; при этом разность $\omega_1 - \omega_2$ сканируется в микроволновом диапазоне. В наших экспериментах доступный спектральный диапазон составляет

$$-1200 \text{ см}^{-1} < (\omega_1 - \omega_2)/2\pi c < 300 \text{ см}^{-1},$$

где c – скорость света в вакууме. При этом два лазерных пучка с частотами ω_1 и ω_2 пересекаются в жидкости на встречных направлениях под углом $\sim 170^\circ$. Физика четырехфотонного взаимодействия в этой области частотных отстроек ($\omega_1 - \omega_2 = 0 - 36$ ГГц) допускает широкий набор углов волнового синхронизма, поэтому мы использовали указанный угол пересечения пучков, чтобы обеспечить максимальную длину области их пересечения при условии пространственного разделения. Длина оптического пути лазерных импульсов подбиралась так, чтобы импульсы встречались внутри образца. Измеряемым параметром здесь служит интенсивность излучения на

А.Ф.Бункин, С.М.Першин. Научный центр волновых исследований Института общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 117942 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: abunkin@kapella.gpi.ru, pershin@orc.ru

частоте $\omega_s = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$, прошедшего поляризованный анализатор, скрещенный с поляризацией волны $E^{(2)}$, нелинейная поляризация которого имеет следующий вид [11, 12]:

$$P_i^{(3)} = 6\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) E_j^{(1)} E_k^{(2)} E_l^{(1)*}. \quad (1)$$

Здесь $\chi^{(3)}$ – кубическая восприимчивость среды; $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ – амплитуды взаимодействующих полей; интенсивность регистрируемого сигнала $I_s \propto |\chi^{(3)}|^2 I_1^2 I_2$. При настройке разности частот $\omega_1 - \omega_2$ на частоту какого-либо колебательного или вращательного молекулярного резонанса на этом переходе в исследуемой среде возникает ансамбль когерентных состояний, описываемых коллективными квантовомеханическими переменными.

Ранее [13–16] с помощью ЧФР мы наблюдали вращательные спектры комбинационного рассеяния (КР) света молекул H_2O в дистиллированной воде и водных растворах, а также хорошо разрешенные вращательные ЧФР-спектры молекул H_2O , H_2O_2 и OH в дистиллированной воде. Спектральное разрешение спектрометра ($\sim 0.12 \text{ см}^{-1}$, т.е. $\sim 3.6 \text{ ГГц}$) позволяло вращательные линии молекулы H_2O отнести к переходам орто- или параизомеров. Здесь ортоизомерами называются молекулы H_2O , у которых спины протонов параллельны и полный ядерный спин равен единице, а параизомерами – молекулы H_2O с антипараллельными ядерными спинами, полный спин которых равен нулю. Появление вращательных спектров H_2O интерпретировано как результат свободного вращения молекул воды в слоях пониженной плотности вблизи наночастиц гидрофобных примесей, существующих в любых видах дистиллированной воды [17, 18]. Недавно этот вывод о наличии свободных молекул H_2O в жидкой воде был подтвержден в другом эксперименте с помощью спектроскопии малоуглового рассеяния рентгеновского излучения на синхротроне пятого поколения в Стэнфорде (США) [19].

В настоящей работе мы сосредоточимся на изучении спектров ЧФР водных растворов ДНК и денатурированной ДНК в спектральном диапазоне $\pm 10 \text{ см}^{-1}$. Кроме того, проанализируем спектры четырехфотонного рассеяния лазерного излучения белка-фермента α -химотрипсин в водных растворах при различных концентрациях. Покажем, что сдвиг резонансов Мандельштама–Бриллюэна водного раствора белка зависит от его концентрации и монотонно возрастает при ее увеличении. Такое поведение упругости раствора может быть обусловлено существенным изменением свойств слоя молекул воды на границе белка.

2. Эксперимент

Эксперименты проводились на установке, описанной в [20]. Две встречные волны $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ с частотами ω_1 и ω_2 распространялись в кювете ($20 \times 30 \times 50 \text{ мм}$) с водными растворами биополимеров при комнатной температуре. Входное и выходное окна кюветы были изготовлены из плавленого кварца и имели уровень деполяризации проходящего лазерного излучения не более 10^{-3} . Волна $E^{(1)}$ (излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера, работающего на одной продольной моде, $\lambda_1 = 532 \text{ нм}$; ширина спектра излучения менее 0.01 см^{-1}) имела круговую поляризацию внутри кюветы с жидкостью и интенсивность $\sim 60 \text{ МВт/см}^2$. Перестраиваемое по длине волны ($500–$

545 нм) излучение лазера на красителе $E^{(2)}$ с интенсивностью не более 10 МВт/см^2 было линейно поляризовано. Частота повторения импульсов генерации лазеров составляла 1 Гц , длительность импульса $\sim 10 \text{ нс}$.

При такой поляризации взаимодействующих волн в сигнале, определяемом нелинейностью (1), отсутствует нерезонансный вклад от электронной подсистемы среды [11, 12]. Это обстоятельство объясняется тем, что при циркулярной поляризации одной из волн лазерной накачки эффективная кубическая восприимчивость центросимметричной среды имеет вид [11, 12]

$$\chi^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) = \chi_{1122}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) - \chi_{1212}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1). \quad (2)$$

При выполнении для компонент тензора нерезонансной (электронной) восприимчивости $\chi_{ijkl}^{(3)\text{nr}}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1)$ соотношений Клейнмана [12] нерезонансный (недиспергирующий) пьедестал в спектрах ЧФР исчезает, поскольку $\chi_{1122}^{(3)\text{nr}}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) = \chi_{1212}^{(3)\text{nr}}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1)$. Это в общем случае неверно для резонансных компонент тензора $\chi_{ijkl}^{(3)\text{r}}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1)$, связанных с молекулярными колебаниями и вращениями, а также флуктуациями плотности и энтропии среды.

Поскольку орты поляризации волны сигнала E_s на частоте ω_s и волны $E^{(2)}$ неколлинеарны, а направления распространения волн совпадают, сигнал ЧФР выделялся призмой Глана. Ширина аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.12 \text{ см}^{-1}$) и возможный спектральный диапазон измерений ($-1200 \dots 300 \text{ см}^{-1}$) определялись выходными характеристиками лазера на красителе, который накачивался излучением третьей гармоники Nd:YAG-лазера и обеспечивал перестройку длины волны излучения $E^{(2)}$ по программе, задаваемой в компьютере. Для каждого значения частоты ω_s производилось усреднение сигнала по $10–30$ отсчетам, затем частота лазера на красителе перестраивалась автоматически с шагом 0.119 см^{-1} . Нулевая частотная отстройка привязывалась по резонансам Мандельштама–Бриллюэна, дальнейшая перестройка длины волны контролировалась по модам интерферометра Фабри–Перо с базой 7 мм . Ошибка измерения амплитуды сигнала ЧФР задавалась программным способом и обычно не превышала 10% . Точность измерения частот резонансов определялась шириной аппаратной функции спектрометра, поэтому в случае фитинга огибающих по табличным данным могло наблюдаться расхождение с измеренным контуром в пределах этой величины.

Измерения проводились в дважды дистиллированной воде, водных растворах белка α -химотрипсин (концентрация до 20 мг/см^3), ДНК (15 мг/см^3), денатурированной ДНК при той же концентрации, а также в 1% -ном водном растворе перекиси водорода (H_2O_2). Сигнал ЧФР возникал в области (длиной $\sim 5 \text{ мм}$) пересечения лазерных пучков в образце. Дополнительная дегазация изучаемых жидкостей не проводилась. Молекулы ДНК выделялись по методике, описанной в [21]. Денатурация ДНК достигалась нагревом образца до 90°C с последующим охлаждением до комнатной температуры.

3. Результаты экспериментов

На рис.1 приведены спектры ЧФР водных растворов H_2O_2 (концентрация 1%) и ДНК (15 мг/см^3) в диапазоне

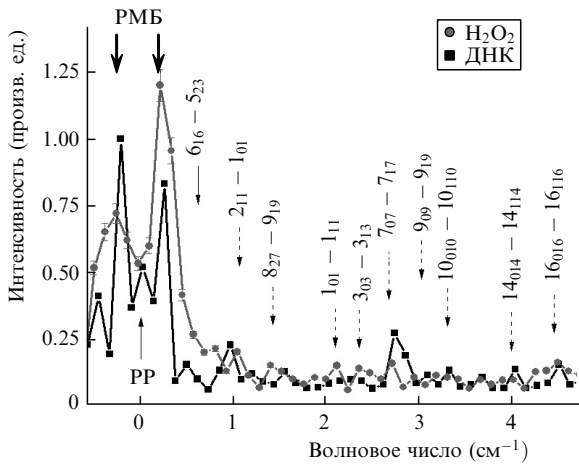


Рис.1. Спектры ЧФР лазерного излучения в водных растворах перекиси водорода и ДНК. Каждая экспериментальная точка – результат накопления по 30 лазерным выстрелам с шагом $\sim 0.12 \text{ см}^{-1}$. Жирные стрелки указывают на резонансы Манделштама–Бриллюэна (РМБ) в водном растворе ДНК. Штриховые и тонкая (сверху) стрелки обозначают вращательные резонансы молекул H_2O_2 и H_2O соответственно, согласно [22]; тонкая стрелка (снизу) – резонанс Рэлея (PP).

$-1...5 \text{ см}^{-1}$. Водный раствор перекиси водорода использовался как реперный образец с известным вращательным спектром молекулы H_2O_2 . Штриховыми стрелками на рис.1 обозначены вращательные резонансы молекулы H_2O_2 ($2_{11} - 1_{01}$) (1.25 см^{-1}), ($8_{27} - 9_{19}$) (1.47 см^{-1}), ($7_{07} - 7_{17}$) (2.75 см^{-1}), ($9_{09} - 9_{19}$) (3.06 см^{-1}), ($10_{010} - 10_{110}$) (3.24 см^{-1}), ($14_{014} - 14_{114}$) (4.12 см^{-1}), ($16_{016} - 16_{116}$) (4.65 см^{-1}); тонкая стрелка указывает переход ($6_{16} - 5_{23}$) (0.74 см^{-1}) ортоизомера молекулы H_2O . Из рисунка следует, что наиболее сильные линии вращательных спектров молекул H_2O и H_2O_2 в водных растворах ДНК и H_2O_2 совпадают с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра.

На рис.2 показаны спектры ЧФР в диапазоне от 1 до -7 см^{-1} в водном растворе ДНК (15 мг/см^3) и в дважды дистиллированной воде. Здесь толстые и тонкие стрелки

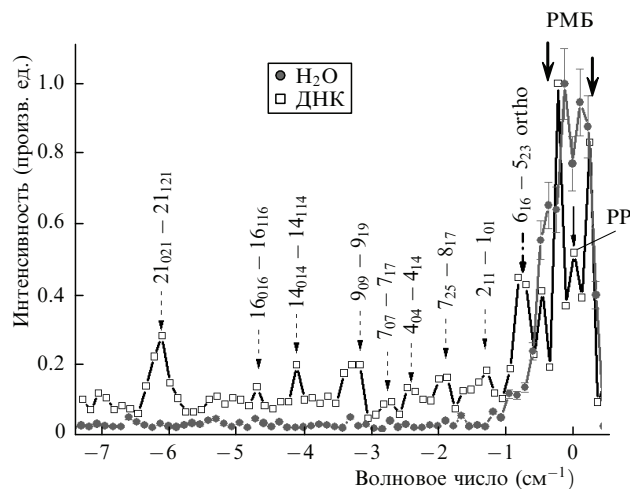


Рис.2. Спектры ЧФР водного раствора ДНК и дважды дистиллированной воды. Толстые и тонкие стрелки указывают на РМБ и PP соответственно. Штриховые стрелки обозначают различные вращательные резонансы молекулы H_2O_2 ; штрихпунктирная стрелка – резонанс ($6_{16} - 5_{23}$) ($\pm 0.74 \text{ см}^{-1}$) ортоизомера молекулы H_2O .

обозначают резонансы Манделштама–Бриллюэна (РМБ) и Рэлея (PP) соответственно. Для удобства анализа спектры нормированы на амплитуду компоненты Манделштама–Бриллюэна. Из рис.2 видно, что вклад в сигнал ЧФР от вращательных резонансов молекул H_2O и H_2O_2 существенно растет в спектре водного раствора ДНК по сравнению со спектром дважды дистиллированной воды.

На рис.3 приведены экспериментальный и расчетный спектры ЧФР в водном растворе ДНК (15 мг/см^3), а также экспериментальный и расчетный спектры ЧФР водного раствора денатурированной ДНК при той же концентрации. Для расчета спектров ЧФР использовались стандартные выражения [12]:

$$\chi^{(3)} = \chi^{\text{nr}} + \frac{\chi^{\text{B}}}{-i + (\Delta \pm \Omega_{\text{B}})/\Gamma_{\text{ap}}} + \frac{\chi^{\text{R}}}{-i + \Delta/\Gamma_{\text{R}}} + \frac{\sum_n \chi_n^{\text{rot}}}{-i + (\Delta \pm \Omega_n)/\Gamma_{\text{ap}}}, \quad I_s \propto |\chi^{(3)}|^2 I_1^2 I_2, \quad (3)$$

где $2\Gamma_{\text{ap}}$ – спектральное разрешение спектрометра ЧФР (0.12 см^{-1}); Γ_{R} – полуширина крыла Рэлея исследуемого раствора (подгоночный параметр); χ_n^{rot} и Ω_n – резонансная нелинейная восприимчивость и частота вращательного резонанса (в см^{-1}) для молекул H_2O_2 и H_2O ; Ω_{B} – частота РМБ для водных растворов ДНК и денатурированной ДНК, измеряемые экспериментально; $\Delta = (\omega_1 - \omega_2)/2\pi c$ – частотная отстройка (в см^{-1}); χ^{B} , χ^{R} и χ^{nr} – нелинейные восприимчивости резонансов Манделштама–Бриллюэна и Рэлея, а также нерезонансная нелинейная восприимчивость раствора соответственно. Спектроскопические параметры резонансов молекул H_2O_2 и H_2O взяты из [22]. Относительная концентрация молекул H_2O_2 и H_2O в этих расчетах являлась подгоночным параметром. Рост концентрации перекиси водорода при денатурации ДНК оценивался путем сравнения параметров подгонки спектров ЧФР для растворов ДНК (кривая 2, рис.3) и денатурированной ДНК (кривая 4, рис.3). Из рисунка видно, что расчетные и экспериментальные спектры находятся в удивительном согласии. Сравнение спектроскопических параметров $\chi^{\text{rot}}/\chi^{\text{B}}$ линии $7_{25} - 8_{17}$ (1.93 см^{-1}) H_2O_2 для расчетных

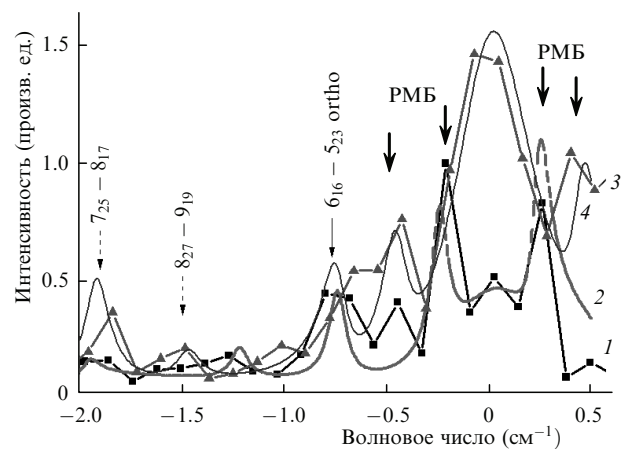


Рис.3. Экспериментальный (1) и расчетный (2) спектры ЧФР водного раствора ДНК (15 мг/см^3), а также экспериментальный (3) и расчетный (4) спектры ЧФР водного раствора денатурированной ДНК при той же концентрации. Штриховые и тонкая стрелки обозначают вращательные резонансы молекул H_2O_2 и H_2O .

ЧФР-спектров нативной ДНК (0.4) и денатурированной ДНК (1.3) показывает, что концентрация H_2O_2 вблизи молекул ДНК растет при денатурации более чем в 3 раза.

На рис.4,а показаны спектры ЧФР водного раствора белка α -химотрипсин при концентрациях 20 и 10 мг/см³ при комнатной температуре, на которых РМБ отмечены толстыми стрелками. Видно, что рост концентрации белка приводит к сдвигу положения РМБ в сторону больших частотных отстроек. Рис.4,б демонстрирует рост смещения РМБ в зависимости от концентрации белка в водном растворе. Нами обнаружено, что сдвиг РМБ $\Delta\nu_B$ в водном растворе при изменении относительной концентрации белка может быть аппроксимирован следующей зависимостью:

$$\Delta\nu_B = 0.25 + (5 \times 10^{16})P^3, \quad (4)$$

где P – относительная концентрация белка в водном растворе. На рисунке сплошная кривая – расчет по формуле (4), точки – эксперимент.

Сдвиг частоты РМБ определяется [23]:

$$\Delta\nu_B = V_s(2n \sin \varphi/2)/c\lambda, \quad (5)$$

где n – показатель преломления; λ – длина волны падающего лазерного излучения; φ – угол между падающим и рассеянным излучениями; V_s – продольная скорость звука в исследуемом веществе. Для дистиллированной воды при комнатной температуре $n = 1.33$, $V_s = 1490$ м/с и в условиях нашего эксперимента $\lambda = 532$ нм и $\varphi = \pi$. Тогда, согласно (5), $\Delta\nu_B = 0.25$ см⁻¹. Известно, что скорость звука V_s зависит от адиабатической сжимаемости K_s вещества [23]:

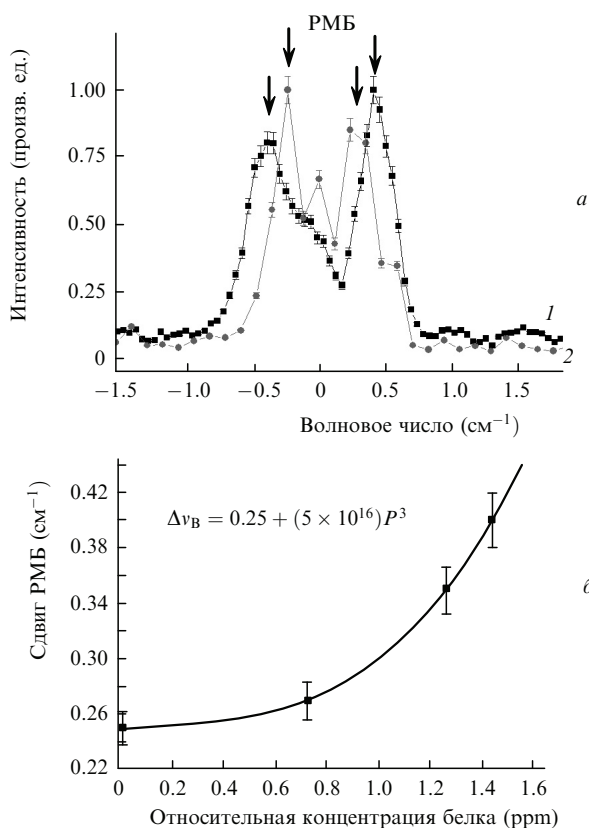


Рис.4. Спектры ЧФР водных растворов белка в концентрациях 20 (1) и 10 мг/см³ (2) (а) и зависимость сдвига РМБ в водном растворе от концентрации белка в диапазоне 0 – 1.5 ppm (б).

$$(V_s)^2 = (\rho K_s)^{-1}, \quad (5)$$

где ρ – плотность вещества. Заметный рост $\Delta\nu_B$, означающий соответствующий рост скорости звука при увеличении концентрации белка в водном растворе (рис.4,б), свидетельствует о снижении сжимаемости (повышении упругости) воды после внесения молекул белка α -химотрипсин.

4. Обсуждение

Известно, что вода – это сильно ассоциированная жидкость. Каждая молекула воды способна образовать до четырех водородных связей со своими соседями. Среднее координационное число водородных связей при комнатной температуре равно 3.5 [24]. Однако проведенные нами эксперименты показывают, что в спектрах ЧФР лазерного излучения в водных растворах биополимеров возникают узкие резонансы, частоты которых с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра совпадают с частотами вращательных переходов основного электронного и колебательного состояний молекул H_2O и H_2O_2 . Рост резонансного вклада вращательных переходов молекул H_2O и H_2O_2 при растворении в воде молекул ДНК и при денатурации ДНК в водном растворе отражает тот факт, что на границе вода – биополимер образуется слой воды, имеющий свойства, отличные от свойств воды в объеме, и эти свойства испытывают дальнейшие изменения при денатурации ДНК [2, 17, 18].

Также хорошо известно [25, 26], что гидратация биомолекул может приводить к структурированию молекул воды гидратной оболочки в ансамбли, подобные кристаллической решетке гексагонального льда. Это свойство качественно подтверждается в наших экспериментах ростом сдвига РМБ и соответствующим уменьшением сжимаемости раствора при увеличении концентрации белка в водном растворе (рис.4). Аналогичный рост сдвига РМБ наблюдается при денатурации ДНК (рис.3). Заметим, что увеличение концентрации эритроцитов в водной суспензии [10] сопровождается уменьшением показателя преломления воды, хотя показатель преломления эритроцита больше, чем у воды. Этот факт авторы [10] интерпретировали как образование гидратного слоя с льдоподобной структурой, поскольку показатель преломления льда ($n_{\text{ice}} = 1.309$) меньше, чем у воды (1.333).

Спектры ЧФР водных растворов биополимеров демонстрируют существенный рост резонансного вклада в сигнал ЧФР от вращательных переходов молекул H_2O и H_2O_2 по сравнению со спектром дистиллированной воды (рис.2). Отсюда можно заключить, что молекулы биополимеров позволяют существенно увеличить эффективную концентрацию свободных молекул H_2O и H_2O_2 в растворе. Отметим, что подобное явление недавно наблюдалось в водных суспензиях углеродных нанотрубок [16] с гидрофобной поверхностью.

Кубическая зависимость величины сдвига компонент Мандельштама – Бриллюэна от концентрации белка в водном растворе (рис.4,б) косвенно указывает на то, что гидратный слой формируется в объеме вокруг всей молекулы белка, как в случае с эритроцитом [10]. В противном случае, если бы формирование слоя происходило вдоль выделенного направления или плоскости, то кон-

центрационная зависимость сдвига имела меньший показатель степени. Возможно, именно этот фактор (толщина гидратного слоя) ограничивает растворимость белков в воде и определяет концентрацию насыщения при данной температуре. Очевидно, что повышение температуры будет сопровождаться «расплавом» гидратного слоя, уменьшением его толщины, что приведет к повышению концентрации насыщения.

5. Выводы

Таким образом, четырехфотонная спектроскопия воды и водных растворов белков и ДНК показала, что формирование гидратной оболочки биомолекул сопровождается значительной перестройкой структуры сетки водородных связей молекул воды. Часть молекул H_2O в окрестности, по-видимому, гидрофильных остатков биомолекул образует льдоподобную структуру, что проявляется в увеличении сдвига компонент Манделъштама – Бриллюэна. При этом другая часть молекул H_2O в процессе разрыва и образования новых водородных связей остается в свободном вращении, по-видимому, в окрестности гидрофобных остатков биомолекул, поскольку в суспензии гидрофобных углеродных нанотрубок наблюдается рост интенсивности вращательных линий молекулы H_2O [16].

Эти выводы согласуются с данными спектроскопии объемной воды методом малоуглового рассеяния рентгеновских пучков [19], в которых одновременно наблюдался характерный пик тетрагональных кластеров и свободных молекул. Кроме этого, недавно [27] в огибающей ОН-полосы валентных колебаний в спектре комбинационного рассеяния импульсов второй гармоники Nd:YAG-лазера в объемной воде мы наблюдали характеристические компоненты (3320 см^{-1}) гексамерных (льдоподобных) и тетрамерных (3450 см^{-1}) кластеров. Существенно, что при нагревании воды до 99°C положение этих частот сохранялось, а амплитуды изменялись в противофазе: вклад гексамерных кластеров уменьшался, а малоразмерных – увеличивался (как и в работе [19]).

Настоящая работа частично поддержана РФФИ (гранты № 09-02-01173, 08-02-00008, 10-02-90301-Вьет_а).

1. Garde S., Hammer G., Garcia A.E., Paulaitis M.E. Pratt L.R. *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 4966 (1998).
2. Miller T.F., Vanden-Eijnden E., Chandler D. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **104**, 14559 (2007).
3. Liu P., Huang X.H., Zhou R.H., Berne B.J. *Nature (London)*, **437**, 159 (2005).
4. Zhu Y., Granick S. *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 106102 (2002).
5. Levy Y., Onuchic J.N. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **101**, 3325 (2004).
6. Tarek M., Tobias D.J. *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 275501 (2002).
7. Bizzarri A.R., Canistraro S. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 6617 (2002).
8. Lee S.L., Debenedetti P.G., Errington J.R. *J. Chem. Phys.*, **122**, 204511 (2005).
9. Heugen U., Schwaab G., Brundermann E., Heyden M., Yu X., Leitner D.M., Havenith M. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **103**, 12301 (2006).
10. Захаров С.Д., Иванов А.В., Вольф Е.Б., Данилов В.П., Мурина Т.М., Нгуен К.Т., Новиков Е.Г., Панасенко Н.А., Перов С.Н., Скопинов С.А., Тимофеев Ю.П. *Квантовая электроника*, **33**, 149 (2003).
11. Shen Y.R. *The Principles of Nonlinear Optics* (New York: Wiley, 1984).
12. Ахманов С.А., Коротеев Н.И. *Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света* (М.: Наука, 1981).
13. Бункин А.Ф., Першин С.М., Нурматов А.А. *УФН*, **176**, 883 (2006).
14. Bunkin A.F., Pershin S.M., Nurmatov A.A. *Laser Phys. Lett.*, **3**, 275 (2006).
15. Bunkin A.F., Pershin S.M. *J. Raman Spectr.*, **39**, 726 (2008).
16. Bunkin A.F., Pershin S.M. *Laser Phys. Lett.*, **4**, 656 (2007).
17. Miller T.F., Vanden-Eijnden E., Chandler D. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **104**, 14559 (2007).
18. Willard A.P., Chandler D. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 6187 (2008).
19. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904743106.
20. Bunkin A.F., Nurmatov A.A. *Laser Phys.*, **13**, 328 (2003).
21. Бункин А.Ф., Нурматов, А.А. Першин С.М., Хусаинова Р.С., Потехин С.А. *Квантовая электроника*, **37**, 941 (2007).
22. Rothman L., Jacquemart D., Barbe A., et al. *J. Quantum Spectrum Radiat. Transfer*, **96**, 139 (2005); www.elsevier.com/locate/jqsrt.
23. Фабелинский И.Л. *УФН*, **164**, 897 (1994).
24. Walrafen G.E., in *Water: A Comprehensive Treatise*. Ed. by F. Franks (New York: Plenum, 1972, Vol. 1); Walrafen G.E. *J. Phys. Chem.*, **94**, 2237 (1990); Castner E.W., Chang Y.J., Chu Y.C., Walrafen G.E., *ibid*, **102**, 653 (1995); Eisenberg D., Kauzmann W. *The Structure and Properties of Water* (Oxford: Clarendon Press, 2005).
25. Yamaguchi T., Matsuoka T., Koda S. *J. Chem. Phys.*, **120**, 7590 (2004).
26. Liou Y.-C., Tocilj A., Davies P.L., Jia Z. *Nature*, **406**, 322 (2000).
27. Першин С.М., Адикс Т.Г., Лукьянченко В.А., Нигматуллин Р.Р., Потапов А.А. *Нелинейный мир*, **7**, 79 (2009).