

На правах рукописи

Окотруб Константин Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАМОРАЖИВАЕМЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК  
МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА**

01.04.05 – оптика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико–математических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук (ИАиЭ СО РАН)

Научный руководитель: доктор физико–математических наук  
Суровцев Николай Владимирович

Официальные оппоненты: Втюрин Александр Николаевич  
доктор физико–математических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт физики им. Л.В.  
Киренского Сибирского отделения Российской  
академии наук, заведующий лабораторией.

Дзюба Сергей Андреевич  
доктор физико–математических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт химической кинетики  
и горения им. В.В. Воеводского Сибирского  
отделения Российской академии наук,  
заведующий лабораторией, заведующий кафедрой  
химической и биологической физики  
Новосибирского государственного университета.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт спектроскопии  
Российской академии наук

Защита состоится «29» января 2016 г. в 11<sup>30</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 003.005.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте автоматики и электрометрии Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Коптюга, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИАиЭ СО РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.  
Ученый секретарь диссертационного совета

д.ф.–м.н.

Ильичев Л.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Криоконсервация – технология сохранения биологических объектов путем их охлаждения до температур, при которых прекращаются все биологические процессы. Эта технология играет важную роль в современных биологических исследованиях [1,2,3], медицине [1] и хозяйстве/промышленности [1].

Основная проблема, возникающая при криоконсервации, заключается в том, чтобы сохранить препарат от разрушения в процессе замораживания до криогенных температур и последующем отогреве. Замораживание клетки – это сложный процесс, в ходе которого клетка и её окружение претерпевают целый ряд радикальных изменений. При охлаждении в клеточном окружении образуется лёд, который может приводить к механическим повреждениям и обезвоживанию препарата [4]. В результате обезвоживания в замораживаемом образце увеличивается концентрация криопротекторов, происходит дегидратация структур клетки. При дальнейшем охлаждении в зависимости от замораживаемого раствора в образце происходит либо эвтектическая кристаллизация, либо стеклование раствора криопротектора. Сама замораживаемая клетка также претерпевает фазовые переходы мембран (в зависимости от состава, разные мембраны будут претерпевать фазовый переход гель-флюид по-разному). Все вышеупомянутые изменения способны привести к серьезным нарушениям в работе клетки и даже её гибели.

Выживание клетки во многом зависит от протоколов замораживания/размораживания, от того, насколько хорошо в этих протоколах учтены особенности процессов, протекающих в ходе криоконсервации клетки. Поэтому, исследование процессов, протекающих при заморозке/разморозке клетки, является одной из наиболее актуальных задач криобиологических исследований.

Для исследования изменений, происходящих при замораживании клеток, используются различные методы, такие как: оптическая и электронная микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), ИК спектроскопия. Однако, по сравнению с упомянутыми методиками, спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) обладает уникальным набором сильных сторон. Метод КРС является бесконтактным (в отличие от ДСК), позволяет получать информацию о химическом составе (в отличие от оптической криомикроскопии и ДСК), хорошо подходит для работы с водными образцами (в отличие от ИК спектроскопии). Возможно проведение измерений

с высоким пространственным разрешением, соответствующим разрешению конфокальной микроскопии. Поэтому вполне логично ожидать, что метод КРС позволит получить новую информацию и серьезно расширит имеющиеся знания о процессах, протекающих в замораживаемой клетке. Тем не менее, спектроскопия КРС применяется сравнительно недавно (первая работа появилась в 2010 году [5]). Метод требует адаптации эксперимента для работы с замораживаемыми биообъектами, а его потенциал остаётся во многом нереализованным.

**Целью** настоящей диссертационной работы является исследование замораживаемых биологических клеток методом спектроскопии комбинационного рассеяния света.

#### **Основные задачи работы.**

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Развитие экспериментальной методики измерения спектров КРС от одиночных клеток в диапазоне температур от 100 до 300 К.
2. Получение и интерпретация спектров КРС от замороженных клеток.
3. Исследование спектров резонансного КРС (РКРС) цитохромов в замораживаемых клетках.
4. Применение разработанных методов для исследования состояния замораживаемых эмбрионов мыши.

#### **Научная новизна работы:**

1. Экспериментально получены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружено, что при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и ниже в спектрах КРС появляются пики на 1640, 1660, 3408, 3425, 3545  $\text{cm}^{-1}$ , которые были интерпретированы как линии гидрогалита ( $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Показано, что пространственное распределение гидрогалита зависит от скорости охлаждения: при скорости  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  вокруг дрожжевых клеток образуется слой из продуктов эвтектической кристаллизации, а при скорости  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  включения гидрогалита распределяются равномерно.
2. Экспериментально показано, что зависимость скорости выцветания линий резонансного КРС (РКРС) цитохромов от интенсивности облучения описывается суммой квадратичной функцией и независимым от интенсивности вкладом. Квадратичный вклад

объяснен фотоиндуцированным процессом окисления цитохромов, в котором участвуют два фотона. Независящий от интенсивности вклад связан с естественными окислительно-восстановительными реакциями, протекающими в дрожжевой клетке.

3. Экспериментальная температурная зависимость скорости выцветания линий РКРС цитохромов обнаруживает особенности при температуре образования внеклеточного льда ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). При более высоких температурах скорость выцветания линий РКРС цитохромов практически не меняется, а при более низких ( $T < -15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) скорость выцветания уменьшается. Экспериментально продемонстрировано, что образование внеклеточного льда может приводить к увеличению интенсивности линий РКРС цитохромов.
4. Температурная зависимость фотоиндуцированного окисления цитохромов описывается суммой термоактивационного закона и слагаемым, независимым от температуры. Определена температурная зависимость скорости естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в замораживаемых клетках. Показано, что эта зависимость хорошо описывается активационным законом с энергией барьера  $\sim 32.5\text{ кДж/моль}$ .
5. Показано, что метод КРС может быть применен при решении ряда практически значимых биологических задач: измерение количества ДНК, определение локальной концентрации криопротектора, характеристика фазового состояния липидов и зарядового состояния цитохромов.

**Практическая значимость работы:** Результаты, полученные в диссертационной работе, вносят существенный вклад в развитие экспериментальных подходов для исследования замораживаемых биологических клеток. Предложенные методы, а также полученные экспериментальные данные будут полезны специалистам, занимающимся исследованием биологических объектов в экстремальных условиях и разработкой протоколов криоконсервации.

**Защищаемые положения:**

1. Продукты эвтектической кристаллизации, возникающие в препаратах на базе физиологического раствора, могут быть выявлены по колебательным модам  $1640, 1660, 3408, 3425, 3545\text{ см}^{-1}$ , относящимся к гидрогалиту ( $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

2. Под воздействием излучения с длиной волны 532 нм в дрожжевых клетках происходит смещение окислительно-восстановительного баланса цитохромов *b* и *c* типа в сторону уменьшения концентрации цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии, при этом эффективная скорость фотоиндуцированных реакций описывается квадратичной зависимостью от интенсивности облучения.
3. Исследование фотоиндуцированного изменения окислительно-восстановительного баланса цитохромов методом резонансного комбинационного рассеяния света позволяет характеризовать замедление реакций в электрон-транспортной цепи в клетках при замораживании.
4. Метод комбинационного рассеяния света позволяет исследовать локальную концентрацию криопротектора, фазовое состояние липидов, зарядовое состояние цитохромов, скорость фотовыцветания линий цитохромов в замораживаемых эмбрионах мыши и определять количество ДНК в ядрах клеток крови.

**Апробация работы.** Результаты работы были доложены и обсуждены автором на следующих семинарах и конференциях: Молодежная конкурс-конференция “Фотоника и оптические технологии” (26–28 марта 2012, Новосибирск); 50-я юбилейная Международная научная студенческая конференция “Студент и научно-технический прогресс” (13-19 апреля 2012, Новосибирск); Всероссийская конференция “Комбинационное рассеяние – 85 лет исследования” (26-29 августа 2013, Красноярск); Молодежная конкурс-конференция “Фотоника и оптические технологии” (14-16 апреля 2014, Новосибирск); Международная конференция «Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы» (28–30 октября 2014, Пущино, Россия); Пятый «Сибирский семинар по спектроскопии по спектроскопии комбинационного рассеяния света» (28-30 сентября 2015, Новосибирск). Результаты также докладывались на научных семинарах ИАиЭ СО РАН.

**Личный вклад автора.** Основные результаты, изложенные в работе, получены автором лично. Он активно участвовал во всех этапах исследований: от планирования экспериментов до обсуждения результатов, теоретического анализа и подготовки статей.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 14 работ, включая материалы конференций. Четыре работы [1-4] опубликованы в международных

рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка цитируемой литературы и одного приложения. Работа изложена на 101 странице текста, содержит 61 рисунок, 2 таблицы и список литературы из 143 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, показана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, перечислены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации материалов диссертации.

**Первая глава** является обзорной, в ней рассмотрены современные подходы криоконсервации биологических клеток, экспериментальные подходы для исследования протекающих при замораживании клеток процессов. Обсуждается методика спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) и особенности её применения к биологическим клеткам.

В первом параграфе данной главы обсуждены ключевые аспекты криоконсервации биологических клеток. Рассмотрены основные факторы, влияющие на выживание клеток при криоконсервации: образование вне- и внутриклеточного льда, эвтектическая кристаллизация, обезвоживание клетки, токсичность раствора криопротектора, фазовый переход мембран клетки. Проведен обзор экспериментальных методов (оптическая и электронная микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, инфракрасная спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния света), применяемых для исследования процессов, протекающих при замораживании клеток.

Во втором параграфе представлены базовые аспекты теории комбинационного рассеяния света. Обсуждаются особенности применения спектроскопии КРС для исследования биологических клеток: зависимость фототоксичности от мощности и длины волны излучения, измерение от малых объемов, также проблемы спектрального анализа. Третий параграф посвящен постановке цели и задач.

**Вторая глава** разделена на три параграфа и посвящена описанию эксперимента по измерению спектров КРС замораживаемых биологических

клеток в широком температурном диапазоне (от 100 до 300 К). В первом параграфе особое внимание уделено оптической схеме созданного диссертантом микроскопного стенда, а также коррекции функции пропускания и исследованию вопроса стабильности фокусировки. Представлены результаты численного моделирования аппаратной функции конфокального микроскопа для оценки пространственного разрешения в экспериментах с применением криостата. Во втором параграфе обсуждается спектр КРС от дрожжевой клетки, измеренный при комнатной температуре. Приведена интерпретация основных пиков, наблюдаемых в измеряемых спектрах. Третий параграф посвящен экспериментам при различных температурах. В нем описаны оптические криостаты и кюветы, использованные в исследовании. Особое внимание уделено вакуумному криостату, разработанному в лаборатории при непосредственном участии диссертанта и использовавшемуся в экспериментах с дрожжевыми клетками.

В третьей главе исследован вопрос возникновения спектральных особенностей в спектрах КРС, которые были нами отнесены к вкладу гидрогалита ( $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Представлены и обсуждены результаты исследования распределения продуктов эвтектической кристаллизации в замораживаемом препарате.

В третьей и четвертой главе в качестве замораживаемого препарата были использованы дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, разведённые в физиологическом растворе (0.9 wt. % NaCl). При замораживании препарата внеклеточный лёд образовывался при температурах  $-10 \div -20$  °С. После этого клетки оказывались захваченными в жидких включениях внутри льда. В измеряемых спектрах КРС появлялись спектральные особенности, соответствующие льду (рис. 1, график С). В высокочастотном диапазоне

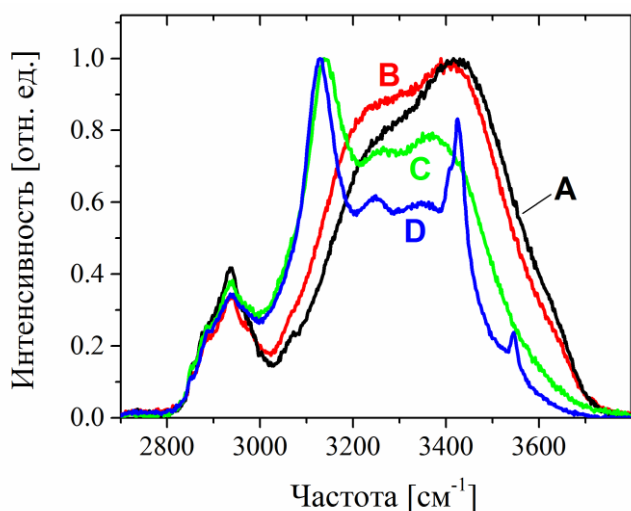


Рис. 1. Спектры КРС измеренные от дрожжевой клетки на различных стадиях замораживания. Спектр А соответствует клетке при комнатной температуре (+25 °С); В – клетке в переохлажденном растворе (-10 °С); С – клетке, окруженной льдом (-25 °С); D – клетке, охлажденной до -46 °С.



спектров КРС от клеток, охлажденных ниже  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , было замечено появление дополнительных линий на  $3408$ ,  $3425$  и  $3545\text{ см}^{-1}$  (рис. 1, график D).

В итоге вещество, к которому были отнесены эти линии, было идентифицировано как гидрогалит ( $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), который образуется при эвтектической кристаллизации раствора  $\text{NaCl}$ . Это подтверждается характером спектра, в котором присутствуют только линии, относящиеся к деформационным и валентным колебаниям водорода, а также температурой плавления (температура, при которой образуется гидрогалит,  $-21.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). После плавления образуется жидкость, спектр которой соответствует спектру высококонцентрированного водного раствора  $\text{NaCl}$ . Показано, что измеряемые спектры совпадают со спектром гидрогалита, представленным в работе, посвященной жидким включениям в минералогии [6].

Все предварительные данные [5] указывали на внутриклеточное происхождение соединения со спектром гидрогалита, но клеточная мембрана практически непроницаема для  $\text{NaCl}$ . Поэтому распределение гидрогалита в клеточной суспензии вызвало особый интерес. Для того, чтобы охарактеризовать пространственное распределение гидрогалита, проводились

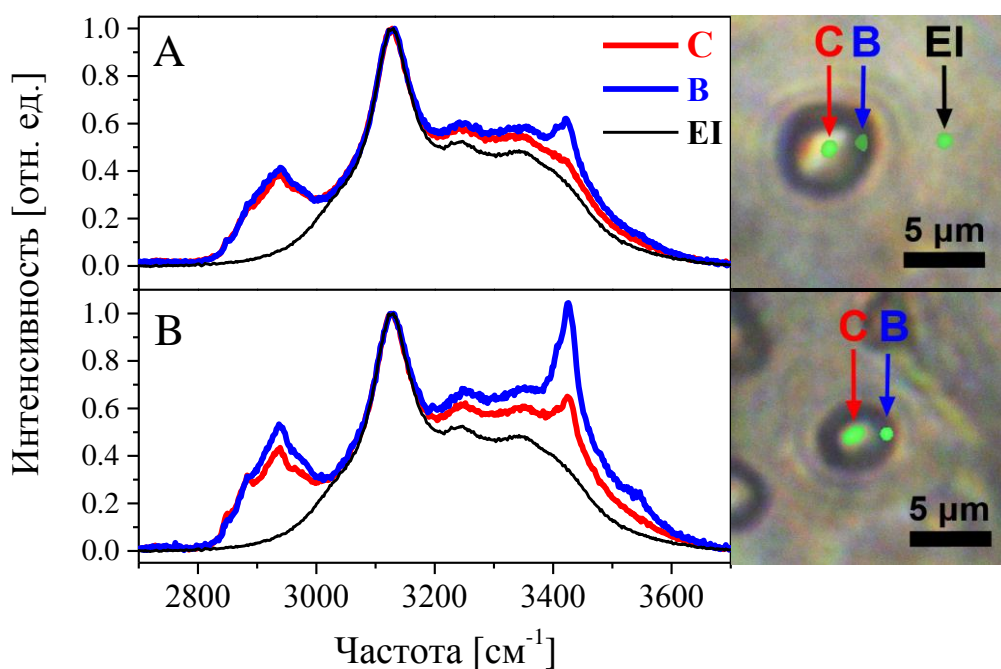


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния из разных частей медленно замороженных дрожжевых клеток при  $T = -48\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Стрелки на микрофотографии отмечают позицию лазерного луча во время измерения КРС: центр замороженной клетки (отмечен «С»), кромка клетки (отмечена «В») и внеклеточный лёд (отмечен «ЕI»). Верхняя панель демонстрирует случай, когда вокруг клетки небольшое количество гидрогалита, нижняя панель случай клетки с большим количеством гидрогалита. Обе клетки были заморожены в одном эксперименте.

измерения от центра клетки и от её кромки. Эти измерения проводились для двух различных скоростей охлаждения клеточной суспензии:  $\sim 1$  °С/мин и  $15 \div 20$  °С/мин. Оказалось, что при медленном замораживании продукты эвтектической кристаллизации распределяются вокруг клеток (рис. 2).

Используя результаты численного моделирования аппаратной функции, описанные в главе 2, было оценено количество продуктов эвтектической кристаллизации вокруг клеток. Толщина слоя, образованного продуктами эвтектической кристаллизации вокруг клетки, показанной на рисунке 2 В, составляет около  $1 (\pm 0.5)$  мкм. При высокой скорости охлаждения вклад гидрогалита не детектируется при нашей точности измерений. В этом случае можно сделать только оценку сверху, согласно которой количество гидрогалита, по крайней мере, в 60 раз ниже, чем вокруг клеток замороженных с низкой скоростью. Эффективная толщина слоя продуктов эвтектической кристаллизации вокруг клеток, замороженных со скоростью  $15 \div 20$  °С/мин не должна превышать 20 нм.

**Четвертая глава** посвящена исследованию зарядового состояния цитохромов *b* и *c* типа в замораживаемых клетках. В первых двух параграфах представлено краткое обсуждение роли цитохромов в клеточном метаболизме и эффекта резонансного КРС цитохромов (РКРС). Наиболее важным является участие цитохромов в окислительно-восстановительных реакциях в рамках электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). В ходе этих реакций происходит смена зарядового состояния гема цитохромов. При этом РКРС для цитохромов в восстановленном состоянии гема ( $\text{Fe}^{2+}$ ) в  $\sim 10$  раз интенсивнее, чем для цитохромов в окисленном состоянии гема ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [7,8].

В третьем параграфе обсуждается вопрос фотовыцветания линий относящихся к РКРС цитохромов (рис. 3). Для характеристики интенсивности вклада РКРС цитохромов использовалось отношение интенсивности пика цитохрома на  $749 \text{ см}^{-1}$  ( $I_{749}$ ) к интенсивности деформационной СН моды ( $I_{\text{сн}}$ ). Показано, что кинетика фотовыцветания может быть описана затухающей экспонентой  $I_{749}/I_{\text{сн}} = y_0 + A \cdot e^{-t/\tau}$ , где  $A$  – амплитуда фотовыцветания,  $\tau$  – характерное время фотовыцветания, а  $y_0$  – отражает баланс между окисленными и восстановленными цитохромами под действием излучения.

Была найдена экспериментальная зависимость кинетики фотовыцветания линии РКРС цитохромов от мощности излучения. Зависимость скорости фотовыцветания  $\tau^{-1}(P)$  хорошо описывается суммой квадратичной зависимости

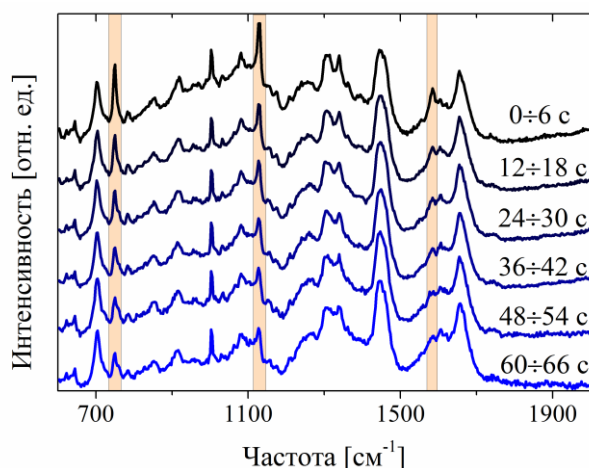


Рис. 3. Спектры РКРС от дрожжевых клеток, измеренные на разных стадиях экспозиции лазерным излучением. Мощность излучения на образце 10 мВт. Полосы отмечают линии РКРС цитохромов.

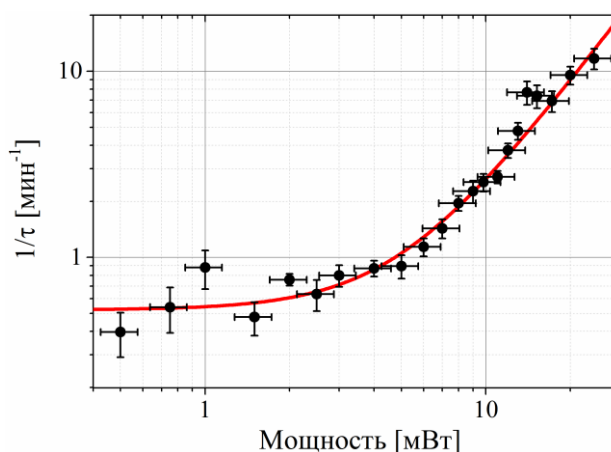


Рис. 4. Экспериментальная зависимость скорости  $\tau^{-1}(P)$  фотовыцветания линии РКРС цитохромов от мощности излучения. Сплошная линия соответствует подгонке с помощью суммы  $k_{dark} + \beta \cdot P^2$ .

и константы  $\tau^{-1}(P) = k_{dark} + \beta \cdot P^2$ . (рис. 4). Квадратичный член подразумевает, что процесс фотовыцветания цитохрома вовлекает два фотона. Предложена интерпретация, согласно которой вклад  $k_{dark}$  связан с проявлением независимых от интенсивности облучения темновых окислительно-восстановительных реакций цитохромов в составе ЭТЦ.

Четвертый параграф посвящен температурной зависимости параметров, характеризующих фотовыцветание линий РКРС цитохромов ( $\tau^{-1}$ ,  $A$ ,  $y_0$ ). Для всех трёх параметров наблюдается особенность в температурной зависимости при  $-15$  °С. Экспериментально показано, что особенность в поведении при  $-15$  °С непосредственно связана с образованием льда в образце. Наиболее яркие эффекты наблюдаются для параметра  $\tau^{-1}$ . Скорость фотоиндуцированного окисления цитохромов начинает снижаться при температурах ниже  $-15$  °С, а при  $-80$  °С выходит на низкотемпературное плато.

В пятом параграфе представлены результаты исследования параметров, характеризующих фотовыцветание линий РКРС цитохромов ( $\tau^{-1}$ ,  $A$ ,  $y_0$ ) в замораживаемых клетках в зависимости от мощности излучения в температурном диапазоне  $T = -100$  до  $+25$  °С. Построены экспериментальные температурные зависимости  $\beta(T)$  и  $k_{dark}(T)$  (рис. 5). При  $T < -15$  °С температурная зависимость для коэффициента при квадратичном члене может быть описана термоактивационным законом с независимой от температуры

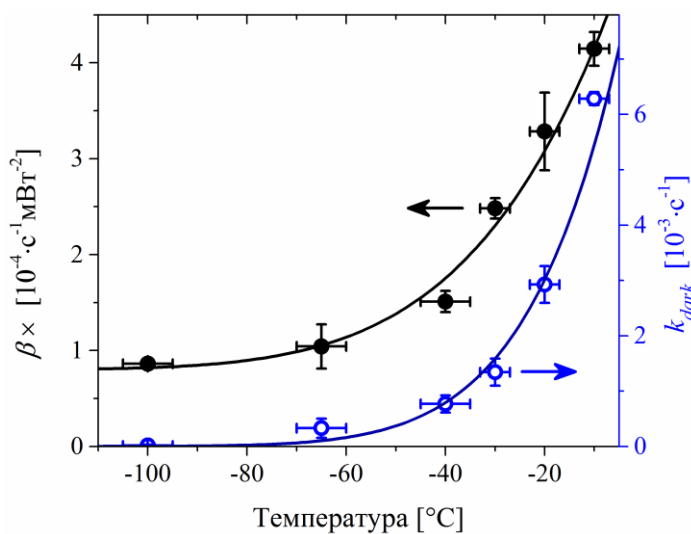


Рис. 5. Температурная зависимость вклада естественных реакций  $k_{dark}$  и коэффициента фотоиндуцированных реакций  $\beta$ . Линиями показаны подгонки термоактивационным законом для  $k_{dark}$ , а также суммой термоактивационного закона и константы для  $\beta$ .

константой  $\beta(T) = \beta_0 + q_0 \cdot e^{-U/k_B T}$ . Значение активационной энергии  $14.6 (\pm 15 \%)$  кДж/моль соответствует энергии, необходимой для реакции восстановления молекулярного кислорода до супероксида ( $O_2^-$ ). Температурная зависимость  $k_{dark}(T)$  может быть описана термоактивационным законом с активационной энергией  $32.5 (\pm 8 \%)$  кДж/моль. Энергия барьера соответствует энергии фосфатной связи в АТФ. С другой стороны энергия барьера ( $32.5$  кДж/моль) соответствует разности окислительно-восстановительных потенциалов в  $330$  мВ) сопоставима с разностью окислительно-восстановительного потенциала на некоторых этапах ЭТЦ.

**Пятая глава** диссертации посвящена использованию разработанных подходов для исследования замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши и измерению количества ДНК в ядрах клеток.

В первом параграфе обсуждаются измерения спектров КРС от эмбрионов мыши и раствора глицерина. Сначала обсуждается протокол применяемого на практике протокола замораживания преимплантационных эмбрионов, проводится сравнение с программами замораживания, используемыми в экспериментах по измерению КРС.

Был предложен подход к оценке концентрации криопротекторного раствора в замораживаемом препарате. Сначала из спектра раствора вычитался вклад глицерина, интенсивность которого оценивалась по СН полосе на  $2883 \text{ см}^{-1}$ . После этого вычислялась площадь под оставшимся контуром валентных ОН колебаний, соответствующим вкладу воды. Для определения концентрации использовалось отношение интенсивности вклада глицерина к

площади ОН контура воды. Данный подход позволяет проводить количественное сопоставление вкладов двух компонент в обход детального исследования чувствительности контура ОН полосы к концентрации глицерина и температуре.

При замораживании эмбрионов наблюдается увеличение интенсивности линий РКРС цитохромов. Как и в случае дрожжевых клеток, этот эффект отчасти связан с увеличением доли цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии, отчасти связан с замедлением процесса фотовыцветания линий цитохромов.

Было обнаружено, что с понижением температуры в спектрах КРС замораживаемых эмбрионов наблюдается увеличение интенсивности пика антисимметричных валентных  $\text{CH}_2$  колебаний на частоте  $2880 \text{ см}^{-1}$  (рис. 6). Увеличение отношения интенсивностей линии на  $2880 \text{ см}^{-1}$  и  $2850 \text{ см}^{-1}$  соответствует упорядочению неполярных углеродных цепочек липидов и может быть использовано в качестве индикатора упорядочения гидрофобных углеродных цепочек липидных структур [9]. Была построена температурная зависимость отношения интенсивностей линий  $\text{CH}_2$  мод  $I_{2880}/I_{2850}$ . Наблюдается резкий скачок этого отношения в температурном интервале от  $-37$  до  $-47 \text{ }^\circ\text{C}$ , который может быть интерпретирован как фазовый переход липидов в более упорядоченное гель состояние. Таким образом, метод КРС позволяет отслеживать состояние липидных структур непосредственно в замораживаемых клетках.

Результаты исследования спектров КРС замораживаемых эмбрионов указывают на универсальность метода КРС и на возможность их применения для изучения актуальных с точки зрения криоконсервации биообъектов.

Второй параграф пятой главы посвящена изучению возможности измерения количества ДНК с помощью метода КРС. Измерение количества ДНК является мощным инструментом для геномного анализа и медицинских

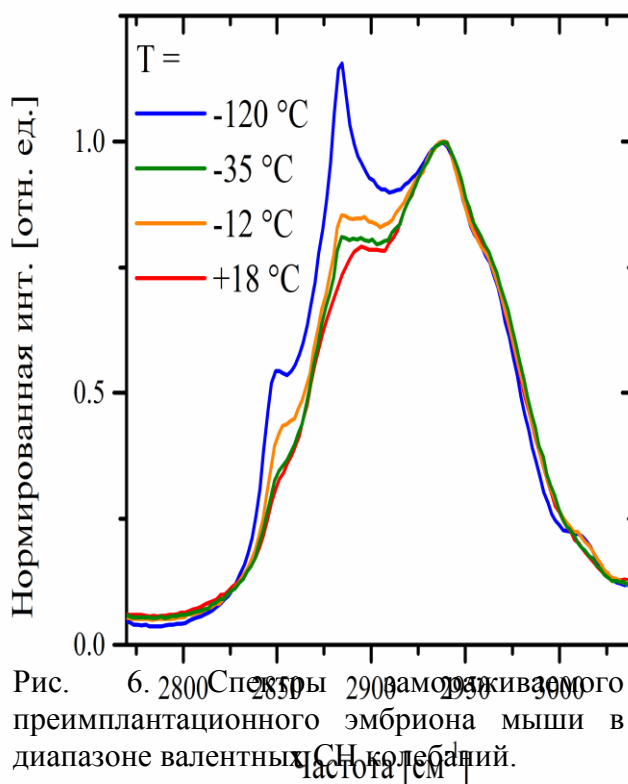


Рис. 6. Спектры замораживаемого преимплантационного эмбриона мыши в диапазоне валентных  $\text{CH}_2$  колебаний.

задач. Однако большинство подходов основано на окрашивании ДНК, и их точность ограничена нестехиометричностью реакции окрашивания. Метод КРС не требует добавления меток и, таким образом, свободен от неточностей, связанных с добавлением красителя.

Приобретенный опыт проведения экспериментов с биообъектами, а также широкие возможности модификации нашего микроскопного стенда, были использованы для решения задачи измерения КРС от ядер целиком. Для этого оптическая схема была модифицирована таким образом, чтобы плоскость фокусировки возбуждающего излучения была смещена относительно плоскости, от которой собирается рассеянный свет. При этом в плоскости, от которой собирается рассеянное излучение, оптическая схема формирует круглое пятно.

Для измерения количества ДНК исследовалась интенсивность пика на  $1096\text{ см}^{-1}$ , соответствующего каркасным  $\text{PO}_2$  колебаниям, которые слабо зависят от конформационного состояния и состава ДНК. На примере ядер клеток крови четырех видов было показано, что по интенсивности линии на  $1096\text{ см}^{-1}$  в спектрах КРС возможно измерение количества ДНК со стандартным отклонением, не превышающим 10 %.

**В заключении** приведены основные результаты диссертационной работы:

1. Экспериментально получены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружено, что при температуре  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  и ниже в спектрах КРС появляются пики на  $1640, 1660, 3408, 3425, 3545\text{ см}^{-1}$  которые были интерпретированы как линии гидрогалита ( $\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Показано, что пространственное распределение гидрогалита зависит от скорости охлаждения: при скорости  $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$  вокруг дрожжевых клеток образуется слой из продуктов эвтектической кристаллизации, а при скорости  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$  включения гидрогалита распределяются равномерно.
2. Показано, что уменьшение интенсивности линий резонансного КРС цитохромов в клетках описывается затухающей экспонентой. Экспериментально обнаружено, что увеличение интенсивности облучения приводит к квадратичному росту скорости выцветания линий резонансного КРС цитохромов в дополнение к вкладу, не зависящему от интенсивности. Квадратичный вклад объяснен фотоиндуцированным процессом окисления цитохромов, в котором

участвуют два фотона. Независящий от интенсивности вклад был связан с естественными окислительно-восстановительными реакциями, протекающими в дрожжевой клетке независимо от облучения.

3. Экспериментальная температурная зависимость скорости выцветания линий резонансного КРС цитохромов демонстрирует особенности при температуре образования внеклеточного льда (-15 °С). При более высоких температурах скорость выцветания линий РКРС цитохромов практически не меняется, а ниже -15 °С скорость выцветания уменьшается. Было экспериментально продемонстрировано, что образование внеклеточного льда может приводить к увеличению интенсивности линий РКРС цитохромов.
4. Температурная зависимость фотоиндуцированного окисления цитохромов может быть описана суммой термоактивационного закона и слагаемого, независимого от температуры. Определена температурная зависимость скорости естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в замораживаемых клетках. Показано, что эта зависимость хорошо описывается активационным законом с энергией барьера ~32.5 кДж/моль.
5. Метод КРС применен для исследования процессов, протекающих при замораживании преимплантационных эмбрионов мыши: измерена локальная концентрации криопротектора (глицерина) в замораживаемом препарате, охарактеризовано фазовое состояние липидов, исследовано зарядовое состояние цитохромов и скорость выцветания линий цитохромов в замораживаемых эмбрионах.
6. Продемонстрирована возможность измерения количества ДНК в ядрах клеток с помощью спектроскопии КРС. Экспериментально показано, что метод КРС позволяет измерять количество ДНК в ядрах клеток крови с 10% точностью.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Okotrub K. A., Surovtsev N. V. Raman scattering evidence of hydrohalite formation on frozen yeast cells // *Cryobiology*. – 2013. – V. 66. – №. 1. – P. 47-51.
2. Okotrub K. A., Surovtsev N. V. Photobleaching of the resonance Raman lines of cytochromes in living yeast cells // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2014. – V. 141. – P. 269-274.
3. Okotrub K. A., Surovtsev N. V., Semeshin V. F., L. V. Omelyanchuk L. V. Raman spectroscopy for DNA quantification in cell nucleus // *Cytometry Part A*. – 2015. – V. 87. – №. 1. – P. 68-73.
4. Амстиславский С. Я., Брусенцев Е. Ю., Окотруб К. А., Рожкова И. Н. Криоконсервация эмбрионов и гамет для сохранения генетических ресурсов лабораторных животных // *Онтогенез*. – 2015. – Т. 46. – №. 2. – P. 67-81.
5. Окотруб К. А. Спектры комбинационного рассеяния света дрожжевых клеток // *Материалы молодежной конкурс – конференции «Фотоника и оптические технологии»*. – 26-28 марта 2012. – Новосибирск. – С. 42.
6. Окотруб К. А. Исследование суспензии замороженных дрожжевых клеток в физиологическом растворе методом комбинационного рассеяния света // *50-я юбилейная Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс»*. - 13-19 апреля 2012. – Новосибирск. - С. 22.
7. Окотруб К. А. Исследование спектров КРС замороженных дрожжевых клеток // *Материалы Всероссийской конференции “Комбинационное рассеяние – 85 лет исследований” и 4-ого Сибирского семинара “Спектроскопия комбинационного рассеяния света”*. – 26-29 августа 2013. – Красноярск. - С. 38.
8. Окотруб К. А. Применение микроспектроскопии резонансного комбинационного рассеяния света для характеристики зарядового состояния цитохромов в замораживаемых дрожжевых клетках // *Материалы молодежной конкурс – конференции «Фотоника и оптические технологии»*. - 14-16 апреля 2014. – Новосибирск. – С. 19.
9. Окотруб К. А. Измерение количества и состава ДНК в клетках крови методом комбинационного рассеяния света // *Материалы молодежной конкурс – конференции «Фотоника и оптические технологии»*. – 14-16 апреля 2014. - Новосибирск. – С. 60.
10. Окотруб К. А., Суровцев Н. В. Исследование образования гидрогалита при криоконсервации дрожжевых клеток в физиологическом растворе методом комбинационного рассеяния света // *Международная конференция "Криоконсервация генетических ресурсов. Современное*



- состояние, проблемы и перспективы" – 27-31 октября 2014. – Пущино // Биофизика живой клетки. – Т. 10. – С. 137-139.
11. Окотруб К. А., Суровцев Н. В., Пехотова К. Д., Фрай Л. В., Брусенцев Е. Ю., Амстиславский С. Я. Верификация протоколов замораживания преимплантационных эмбрионов методом комбинационного рассеяния света // Международная конференция "Криоконсервация генетических ресурсов. Современное состояние, проблемы и перспективы" – 27-31 октября 2014. - Пущино // Биофизика живой клетки. – Т. 10. – С. 140-142.
  12. Окотруб К. А. Исследование зарядового состояния цитохромов в замораживаемых биологических клетках методом комбинационного рассеяния света // Пятый "Сибирский семинар по спектроскопии комбинационного рассеяния света" – 28-30 сентября 2015. - Новосибирск. – С. 19.
  13. Толмачев Н. С., Окотруб К. А. Применение метода КРС для исследования процессов, происходящих в замораживаемых эмбрионах мыши // Пятый "Сибирский семинар по спектроскопии комбинационного рассеяния света" – 28-30 сентября 2015. - Новосибирск. – С. 21.
  14. Окотруб К. А., Суровцев Н. В. Семешин В. Ф., Омелянчук Л. В. Использование Рамановской спектроскопии для измерения содержания ДНК в клеточном ядре // Пятый "Сибирский семинар по спектроскопии комбинационного рассеяния света" – 28-30 сентября 2015. - Новосибирск. – С. 70.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stacey G. N., Day J. G. Putting cells to sleep for future science //Nature biotechnology. – 2014. – V. 32. – №. 4. – P. 320-322.
2. Zhmakin A. I. Fundamentals of cryobiology. – Springer. – 2008. – 285 P.
3. Жмакин А. И. Физические основы криобиологии //Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178. – №. 3. – С. 243-266.
4. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems //Science. – 1970. – V. 168. – №. 3934. – P. 939-949.
5. Dong J. et al. Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells //Biophysical journal. – 2010. – V. 99. – №. 8. – P. 2453-2459.
6. Bakker R. J. Raman spectra of fluid and crystal mixtures in the systems H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O–NaCl and H<sub>2</sub>O–MgCl<sub>2</sub> at low temperatures: applications to fluid-inclusion research //The Canadian Mineralogist. – 2004. – V. 42. – №. 5. – P. 1283-1314.
7. Spiro T. G., Strekas T. C. Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state //Journal of the American Chemical Society. – 1974. – V. 96. – №. 2. – P. 338-345.
8. Kakita M., Kaliaperumal V., Hamaguchi H. Resonance Raman quantification of the redox state of cytochromes b and c in-vivo and in-vitro //Journal of biophotonics. – 2012. – V. 5. – №. 1. – P. 20-24.
9. Surovtsev N. V. et al. On the low-temperature onset of molecular flexibility in lipid bilayers seen by Raman scattering //The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – V. 112. – №. 39. – P. 12361-12365.