

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

На правах рукописи

Окотруб Константин Александрович

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

01.04.05 – «Оптика»

диссертация на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

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

Новосибирск, 2015

Оглавление

Оглавление.....	2
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы и постановка задачи	9
1.1. Криоконсервация биологических клеток	9
1.1.1. Криоконсервация.....	9
1.1.2. Механизмы повреждения замораживаемых биологических клеток	11
1.1.3. Методы исследования процессов, протекающих при замораживании клеток	14
1.1.3.1. Оптическая микроскопия	15
1.1.3.2. Электронная микроскопия.....	16
1.1.3.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	17
1.1.3.4. ИК спектроскопия.....	17
1.1.3.5. Спектроскопия КРС.....	17
1.2. Комбинационное рассеяние света от биологических клеток	18
1.2.1. Комбинационное рассеяние света	18
1.2.2. Спектроскопия КРС биологических клеток.....	20
1.3. Постановка задачи.....	23
Глава 2. Описание эксперимента по измерению спектров КРС от замораживаемых биологических клеток	24
2.1. Оптическая схема установки для измерения КРС от микрообъектов.....	24
2.2.1. Оптическая схема	24
2.2.2. Оценка пространственного разрешения.....	28
2.2. Общий вид спектра КРС от биологической клетки	31
2.3. Эксперименты по измерению КРС от замораживаемых биологических клеток.....	33
Глава 3. Исследование эвтектической кристаллизации с помощью спектроскопии КРС	36
3.1. Экспериментальная часть	36
3.1.1. Приготовление препарата	36
3.1.2. Эксперимент, проводимый на TriVista 777	36
3.2. Идентификация линий на частотах выше 3400 см^{-1} , возникающих при замораживании препарата	37
3.3. Пространственное распределение включений гидрогалита в образце	40
Глава 4. Исследование зарядового состояния цитохромов в дрожжевых клетках с помощью спектроскопии КРС	45
4.1. Роль цитохромов в клеточном метаболизме и эффект резонансного КРС	45

4.1.1.	Роль цитохромов в работе дыхательной электрон-транспортной цепи	45
4.1.2.	Резонансное КРС цитохромов	48
4.2.	Уменьшение интенсивности линий резонансного КРС цитохромов под действием интенсивного излучения	49
4.2.1.	Приготовление препарата и детали эксперимента	49
4.2.2.	Изменение интенсивности вклада цитохромов под действием излучения	50
4.2.3.	Обсуждение	54
4.3.	Температурная зависимость резонансного КРС цитохромов	57
4.3.1.	Температурная зависимость кинетики фотоиндуцированного окисления цитохромов	57
4.3.2.	Влияние температуры на зависимость кинетики фотоиндуцированного окисления цитохромов от интенсивности облучения	60
Глава 5.	Применение разработанных подходов для решения практических задач	65
5.1	Применение спектроскопии КРС для исследования замораживаемых эмбрионов	65
5.1.1.	Приготовление препарата	65
5.1.1.1.	Стандартный протокол медленного программного замораживания	66
5.1.1.2.	Протоколы замораживания в эксперименте КРС	66
5.1.2.	Результаты	69
5.1.2.1.	Определение концентрации криопротектора в замораживаемом препарате ...	69
5.1.2.2.	Вклад цитохромов в спектры КРС замораживаемых эмбрионов	71
5.1.2.3.	Исследование температурных изменений в упорядочении липидов эмбрионов по спектрам валентных СН колебаний	73
5.1.3.	Обсуждение	75
5.2.	Измерение количества ДНК в ядрах клеток	77
5.2.1.	Эксперимент	77
5.2.1.1.	Препарат	77
5.2.1.2.	Освещение ядер, коррекция неоднородности освещения	77
5.2.2.	Результаты	82
5.2.3.	Обсуждение	84
Заключение	86
Список сокращений и условных обозначений	88
Список цитируемой литературы	89
Публикации автора по теме диссертации	100

Введение

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. При замораживании клетка попадает в крайне неблагоприятные условия, вызванные замерзанием окружающего водного раствора (которое, как правило, сопровождается образованием льда), обезвоживанием клеток, а также изменением свойств клеточных мембран. Существует своеобразная конкуренция между различными факторами, приводящими к гибели замораживаемых клеток. Наиболее наглядной демонстрацией этой конкуренции является «двухфакторная гипотеза» криоповреждения [4]. После образования внеклеточного льда концентрация растворенного в окружающей среде вещества возрастает. Это приводит к росту осмотического давления, и оттоку воды из клетки. При дальнейшем охлаждении в препарате уменьшается доля жидкой воды, а концентрация внутриклеточного вещества возрастает. Если проводить охлаждение слишком быстро, то, вследствие ограниченной пропускной способности мембраны, клетки замерзают до того, как выровняется перепад осмотического давления. В результате образуется внутриклеточный лёд, который, как считается, приводит к механическим повреждениям клеток [4]. В случае медленного охлаждения клетка успешно обезвоживается и концентрированный раствор внутриклеточного вещества замерзает в аморфном состоянии. Внутриклеточный лёд не образуется, но клетки могут погибнуть из-за длительного выдерживания в гипертонической среде. Таким образом, в результате конкуренции различных негативных факторов существует некоторая оптимальная скорость охлаждения, которая сильно зависит от типа замораживаемого препарата. Например, для эритроцитов, мембраны которых очень хорошо пропускают воду, оптимальная скорость составляет ~ 3000 °C/мин, а для крупных яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих не превышает 1 °C/мин. На практике режим охлаждения является всего лишь одним из длинного списка оптимизируемых параметров протоколов криоконсервации.

Вопрос о выживании клеток во многом зависит от протокола замораживания, от того насколько хорошо в протоколе учтены особенности клетки и процессов, протекающих при замораживании. Для каждого типа клеток применяется свой специальный

криоконсервационный протокол. В свою очередь разработка протоколов тесно связана с имеющимися представлениями о процессах, которые протекают при замораживании клеток, а также с экспериментальными методиками, позволяющими характеризовать изменения, происходящие при замораживании клеток.

При разработке протоколов часто используется модель «мешка с солёной водой» [5], в которой клеточная мембрана рассматривается в виде «мешка», а все содержимое клетки отождествляется с «солью» - растворенным в воде веществом, не способным проникать через мембрану. В рамках этой модели можно достаточно точно описывать эффекты предсказываемые двухфакторной гипотезой, однако, при этом многие эффекты, связанные непосредственно с изменениями в замораживаемой клетке, полностью выпадают из рассмотрения. Поэтому на практике разработка протоколов проводится эмпирическим или полуэмпирическим путем, основанным на анализе физических свойств раствора криопротектора и использовании одной из моделей, основанной на представлении «мешка с солёной водой».

Другой особенностью, влияющей на разработку криоконсервационных протоколов, является ограниченный набор экспериментальных методик применяемых для изучения процессов, протекающих при замораживании клеток. Большинство биологических методик не подходят для исследования замороженных клеток из-за необходимости проведения экспериментов при низких температурах, в криостате и из-за того, что в ходе криоконсервации клетки попадают в замороженную твердую матрицу. К используемым методам можно отнести криомикроскопию (оптическую и электронную), дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), ИК спектроскопию, спектроскопию комбинационного рассеяния света (КРС).

Метод КРС обладает уникальным набором сильных сторон. Методика является бесконтактной (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 [6]. 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 методами спектроскопии комбинационного рассеяния света.

Для решения поставленной цели в диссертационной работе были сформулированы 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.

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

1. Экспериментально получены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружено, что при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и ниже в спектрах КРС появляются пики 1640, 1660, 3408, 3425, 3545 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 РКРС цитохромов от интенсивности облучения описывается квадратичной функцией с дополнительным независимым от интенсивности вкладом. Квадратичный вклад объяснен фотоиндуцированным процессом окисления цитохромов, в котором участвуют два фотона. Независимый 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 ~ 32.5 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.

С точки зрения практической значимости, результаты, полученные в диссертационной работе, являются важными как для расширения фундаментального знания о том, какие изменения происходят при замораживании биологических объектов, так и для решения конкретных задач разработки протоколов криоконсервации.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Продукты эвтектической кристаллизации, возникающие в препаратах на базе физиологического раствора, могут быть выявлены по колебательным модам 1640, 1660, 3408, 3425, 3545 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.

Результаты работы докладывались автором на следующих конференциях и семинарах: 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 научном семинаре ИАиЭ СО РАН 27 февраля 2015 г.

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией.

Глава 1. Обзор литературы и постановка задачи

В данной главе обсуждаются ключевые аспекты криоконсервации биологических клеток, а также основные факторы, влияющие на выживание клеток. Рассмотрены физические методы, применяемые для исследования замораживаемых клеток. Обсуждается методика спектроскопии КРС и особенности её применения к биологическим клеткам.

1.1. Криоконсервация биологических клеток

1.1.1. Криоконсервация

Криоконсервация – техника сохранения биологических клеток путем их охлаждения до криогенных температур [1,2] является одной из важнейших прикладных задач в криобиологии. Считается, что эффект консервации замороженных клеток является результатом термоактивационной зависимости скоростей большинства процессов $q(T)$ от температуры

$$q(T) \propto e^{-\frac{U}{kT}}, \quad (1.1)$$

где U - энергия активации [5,7,8]. Другим важным фактором в замедлении скоростей реакций является высокая вязкость замороженного материала.

Предполагается, что при температуре жидкого азота препараты могут храниться значительно дольше срока человеческой жизни. В настоящее время экспериментально показано, что эмбрионы мыши успешно сохраняются в замороженном состоянии в течение десятилетий [9], а время хранения не влияет на работу клеток [10]. Ископаемые семена растения смолевки были пророщены спустя 30 тысяч лет хранения в вечной мерзлоте [11]. Таким образом, ключевым этапом криоконсервации, сильнее всего влияющем на сохранность препарата, является не хранение при низких температурах, а стадии замораживания и последующего размораживания.

На этих стадиях препарат претерпевает значительные изменения, которые способны привести к его разрушению. В настоящее время существуют клетки, замораживание которых не вызывает больших проблем (например: гаметы человека, эмбрионы мыши), и криоконсервация которых превратилась в рутинную операцию. Однако для большинства клеток других типов (и видов), а также тканей задача криоконсервации остается нерешенной [2].

Выделяют два разных подхода для решения задачи охлаждения клетки до криогенных температур: так называемая «витрификация» [12] и медленное «программное замораживание» [13].

Первый подход, витрификация, заключается в максимально быстром охлаждении препарата до низких температур. Скорости охлаждения должны быть достаточно большими, чтобы большая часть переохлажденного вещества стекловалась. Стеклование чистой воды, даже в объёме $\sim 10^{-3}$ мм³ является очень сложной, если не неразрешимой задачей [14]. Поэтому, в раствор в достаточно высоких концентрациях добавляют криопротектор, который увеличивает склонность раствора к стеклованию. При этом скорости замораживания препарата оцениваются > 20000 °С/мин [15]. Для достижения таких скоростей при замораживании необходимо использовать сверх малые объемы препарата. Этого достаточно для успешного замораживания одиночных яйцеклеток и эмбрионов [16]. Поэтому серьезным недостатком витрификации является накладывание достаточно жестких ограничений на размер замораживаемого препарата. Также, в силу высокой концентрации используемого раствора криопротектора и высоких скоростей замораживания этот подход считается весьма требовательным к нюансам выполнения протокола замораживания.

Второй подход, программное замораживание, заключается в использовании значительно меньших скоростей охлаждения, что приводит к образованию льда. В этом случае задача заключается в смягчении негативных факторов, возникающих при относительно малых скоростях охлаждения. При замораживании клетка переживает три фазовых перехода: фазовый переход мембран (в зависимости от состава, разные мембраны претерпевают фазовый переход гель-флюид по-разному), кристаллизацию воды (внеклеточной и внутриклеточной), эвтектическую кристаллизацию или стеклование раствора криопротектора. Вопрос о выживании клетки во многом зависит от протокола, от того насколько хорошо в протоколе учтены особенности процессов, протекающих при замораживании клетки. Среди недостатков этого подхода обычно выделяют большое время замораживания (которое может измеряться часами), а также необходимость использования дорогостоящего программного замораживателя.

Исторически программное замораживание начали использовать раньше витрификации [12,13]. В настоящее же время оба подхода активно используются и демонстрируют сходную эффективность [16].

Поскольку температурные эксперименты, представленные в работе, относятся к медленному замораживанию, витрификация в дальнейшем рассматриваться не будет.

1.1.2. Механизмы повреждения замораживаемых биологических клеток

При медленном программном замораживании существуют разнообразные механизмы повреждения замораживаемых клеток. Однако не все из них хорошо изучены из-за эффекта «конкуренции» и из-за ограниченности набора подходящих методик.

Эффект конкуренции различных механизмов гибели клетки очень доступно продемонстрирован в двухфакторной гипотезе, предложенной П. Мазуром в начале шестидесятых годов [17]. При замораживании после возникновения внеклеточного льда концентрация растворенного в окружающей среде вещества растет, что приводит к росту осмотического давления, которое в свою очередь приводит к оттоку воды из клетки. Концентрация внутриклеточного вещества растет с уменьшением доли жидкой воды в препарате. При дальнейшем охлаждении концентрированный раствор внутриклеточного вещества замерзает в аморфном состоянии, не приводя к механическим повреждениям. Но само по себе выдерживание клеток в обезвоженном состоянии, как правило, губительно [5, 3, 7]. Если проводить охлаждение слишком быстро, то, вследствие ограниченной пропускной способности мембраны, клетки замерзают до того, как выровняется перепад осмотического давления. В такой ситуации клетки замерзают со слишком низкой концентрацией внутриклеточного вещества, что приводит к образованию кристалликов внутриклеточного льда. Считается, что образование внутриклеточного льда приводит к механическим повреждениям клеток. Таким образом, существует оптимальная скорость охлаждения, которая может сильно варьироваться в зависимости от типа клеток (см. рис. 1.). Для эритроцитов, мембраны которых

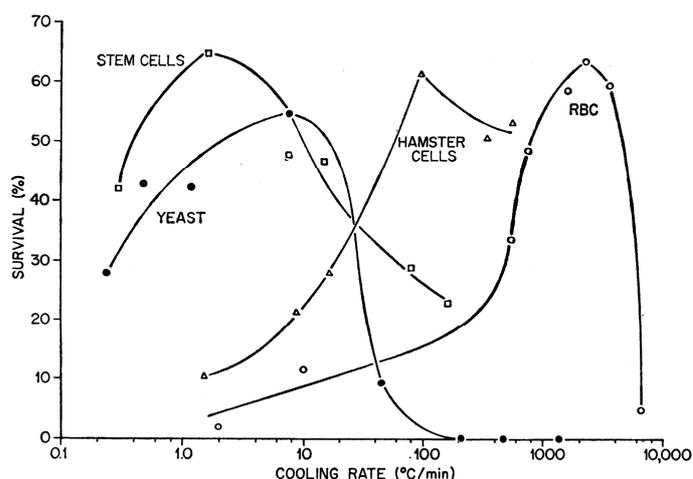


Рис. 1. Эффект скорости охлаждения на выживаемость клеток разных типов: стволовые клетки (stem cells), дрожжи (yeast), клетки хомяка (hamster cells), эритроциты (RBC). График заимствован из работы [4].

очень хорошо пропускают воду, оптимальная скорость ~ 3000 °C/мин [17], для дрожжевых клеток ~ 7 °C/мин [18,19], для крупных яйцеклеток и преимплантационных эмбрионов от 0.1 до 2 °C/мин [17]. На практике скорость охлаждения является не единственным параметром, варьируемым при криоконсервации. Конкуренция между различными механизмами гибели приводит еще одну задачу: проблему идентификации главного фактора (или факторов), отвечающего за гибель клеток

в зависимости от конкретного типа клеток и протокола замораживания.

Как правило, основные механизмы повреждения связывают с образованием внеклеточного и внутриклеточного льда, эвтектической кристаллизацией, обезвоживанием клеток, токсичностью криопротектора, а также с изменением свойств клеточных мембран. Рассмотрим их более детально:

- 1) Образование внеклеточного льда. При небольших концентрациях криопротектора образуется большое количество льда. Растущие кристаллы могут механически деформировать клетку [20], а в случае разрыва мембраны выдавить ее содержимое [7]. Считается, что внеклеточный лёд при контакте с клеткой является катализатором процесса образования внутриклеточного льда [21,22]. В настоящее время существуют две основные гипотезы, описывающие образование внутриклеточного льда под действием внеклеточного льда. Как это происходит неизвестно, существует две основные гипотезы, связывающие формирование внеклеточного льда с образованием внутриклеточного льда. Первая гипотеза предполагает, что клеточная мембрана при контакте с внеклеточным льдом претерпевает конфигурационные изменения, из-за которых становится эффективным центром гетерогенной нуклеации льда [23,24]. Вторая гипотеза заключается в том, что внутриклеточный лёд способен проникать в клетку через микропоры в клеточной мембране [22].
- 2) Образование внутриклеточного льда. Образование внутриклеточного льда считается крайне неблагоприятным фактором, сильно влияющим на выживаемость клеток. Основным механизмом повреждения в этом случае заключается в механическом разрыве клеточной мембраны и органелл клетки растущими ледяными кристаллитами. Однако, эта гипотеза не единственная. Также существует предположение, что основные повреждения от образования внутриклеточного льда связаны с резким обезвоживанием клетки и дегидратацией внутренних компонентов [6].
- 3) Эвтектическая кристаллизация. Раствор, сформировавшийся после образования внеклеточного льда, может застекловаться, а если концентрация криопротектора достаточно мала то может претерпеть эвтектическую кристаллизацию. Экспериментально показано, что препараты, претерпевающие эвтектическую кристаллизацию, демонстрируют меньшую выживаемость, чем препараты, замораживаемые без эвтектической кристаллизации [25,26]. Наиболее вероятным механизмом повреждения клеток является механическое повреждение кристаллитами продуктов эвтектической кристаллизации [26].

- 4) Токсичность криопротектора. Любой криопротектор при высоких концентрациях токсичен. Даже если начальная концентрация криопротектора невелика, то после образования льда она стремительно возрастает. Таким образом, при медленном замораживании клетки некоторое время подвергаются воздействию высококонцентрированного раствора криопротектора. Для минимизации этого эффекта для клеток конкретного типа подбираются криопротекторы и их комбинации, обладающие максимальным криопротективным действием при минимальной токсичности. Считается, что наиболее эффективные комбинации получаются при смешивании проникающих внутрь клетки (этиленгликоль, этанол, диметилсульфоксид) криопротекторов с непроникающими (полиэтиленгликоль, сахароза) [27].
- 5) Обезвоживание замораживаемых клеток. Согласно двухфакторной гипотезе обезвоживание предохраняет клетки от образования внутриклеточного льда. С другой стороны чрезмерное обезвоживание приводит к повреждениям, связанным с дегидратацией компонентов клетки. Предполагается, что это может приводить к нарушениям в работе белков и функционировании регуляторных механизмов замораживаемой клетки.
- 6) Изменение свойств клеточных мембран и липидных капель с понижением температуры. При понижении температуры происходит упорядочение фосфолипидов в мембранах, что также может приводить к изменению проницаемости, нарушению работы интегральных мембранных белков [28,29]. Известно, что клетки, содержащие большое количество липидных капель, хуже переносят криоконсервацию. Например, эмбрионы свиней после удаления липидных капель значительно лучше переносят криоконсервацию [30,31].

Размораживание после криоконсервации является не менее важной стадией, определяющей выживание клеток. Способ отогрева зависит от протокола замораживания. К негативным факторам, связанным с размораживанием, можно отнести:

- 1) Раскристаллизация льда. При медленном отогреве при температурах близких к температурам плавления льда происходит процесс укрупнения кристаллитов, что может привести к механическим повреждениям, сходным с повреждениями, вызываемыми образованием льда при замораживании.
- 2) Постгипертонический лизис. Отогрев замороженных клеток приводит к резкому уменьшению концентрации растворенных во внеклеточной среде веществ за счет таяния льда. Если клетка после замораживания находится в обезвоженном состоянии, то при отогреве возникает сильный перепад концентраций между веществом, растворенным внутри и вне клетки. Образовавшийся перепад осмотического давления приводит к

интенсивному потоку воды через мембрану, что может привести к разрыву клеточной мембраны. Чтобы минимизировать эффект гипертонического лизиса клетки сразу после размораживания «проводят» по нескольким растворам с постепенным уменьшением концентрации криопротектора.

Стоит отметить, что практически все из описанных выше механизмов, так или иначе связаны с переходом воды из жидкого раствора в лёд. Частичным исключением является лишь температурное изменение свойств мембран клетки и связанной с ними регуляции биологических процессов.

1.1.3 Методы исследования процессов, протекающих при замораживании клеток

Глобально все работы, посвященные экспериментальному исследованию процессов, протекающих при замораживании клеток, можно разделить на три типа: исследование модельных объектов, исследование клеток после криоконсервации, непосредственное исследование замораживаемых клеток.

Модельные объекты [32-34] и выделенные органеллы [28] регулярно используются в исследованиях. Подобные исследования удобны с точки зрения эксперимента и интерпретации результатов, однако, в силу эффекта «конкуренции», результаты этих работ не всегда могут быть перенесены на реальные клетки. Перечень модельных объектов достаточно широк. Это растворы белков, имитирующие внутренне содержимое клеток, выделенные и синтетические мембраны. Также к исследованию модельных объектов можно отнести большой пласт работ по исследованию свойств криопротекторных растворов [35-37].

В работах второго типа исследуются изменения, которые происходят с клетками, пережившими криоконсервацию. В первую очередь эти работы решают практическую задачу замораживания нового объекта и разведения клеточных культур [38,39]. Большим плюсом данного подхода является возможность использования стандартных биологических подходов, таких как прижизненное окрашивание [40-44]. Состояние клетки после криоконсервации по известному протоколу несет информацию о том, что происходило при замораживании. Как правило, для сравнения проводится несколько экспериментов с разными протоколами замораживания.

К третьему типу относятся работы, в которых проводится непосредственное исследование замороженных клеток или клеток, находящихся в стадии замораживания. К методам, применяемым в таких работах, относятся оптическая микроскопия, электронная микроскопия,

дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), ИК спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС).

1.1.3.1. Оптическая микроскопия

Для оптической микроскопии в криобиологической среде также используется термин - криомикроскопия (cryomicroscopy). Это самый старый метод для исследования процессов, протекающих при замораживании клеток. Первые микроскопные наблюдения за процессом замораживания клеток относятся к середине XIX века [45]. С тех пор произошло много технических улучшений, но в целом подход остался неизменным. Метод заключается в визуальном наблюдении процесса замораживания клеток через микроскоп в режиме светлого поля или флуоресцентной микроскопии.

При наблюдении в режиме светлого поля при замораживании клеток происходит резкое изменение оптических свойств клеток, в результате чего они темнеют (см. рис. 2) [46-49]. Как правило этот эффект объясняют тем, что в клетках образуются микрокристаллы льда, которые рассеивают проходящий свет, в результате чего клетки выглядят темнее чем окружение. Основным доводом в пользу этой гипотезы является высокая смертность клеток, «потемневших» при замораживании. С другой стороны, на данный момент не существует доказательств того, что потемнение возникает из-за внутриклеточного льда. Более того, было показано, что внутриклеточный лёд может образовываться без потемнения клеток [6]. В некоторых работах потемнение клеток связывают с эвтектической кристаллизацией [26] и агрегацией внутриклеточного вещества [6]. Скоростная съемка показывает временное различие между предполагаемым образованием внутриклеточного льда и потемнением клетки [47]. Таким образом этот подход весьма неоднозначен с точки зрения интерпретации наблюдений.

Существует несколько работ, в которых применяется флуоресцентная криомикроскопия [49]. В этом режиме криомикроскопии есть свой вариант потемнения клеток (см. рис. 2). Считается, что при формировании внутриклеточного льда происходит перераспределение красителя в клетках, в результате чего внутри клеток образуются темные пятна.

Среди новых направлений в криомикроскопии можно выделить двухфотонную флуоресцентную микроскопию [50,51]. Метод двухфотонной микроскопии позволяет уменьшить рассеяние света препаратом, при этом использовать неинвазивное

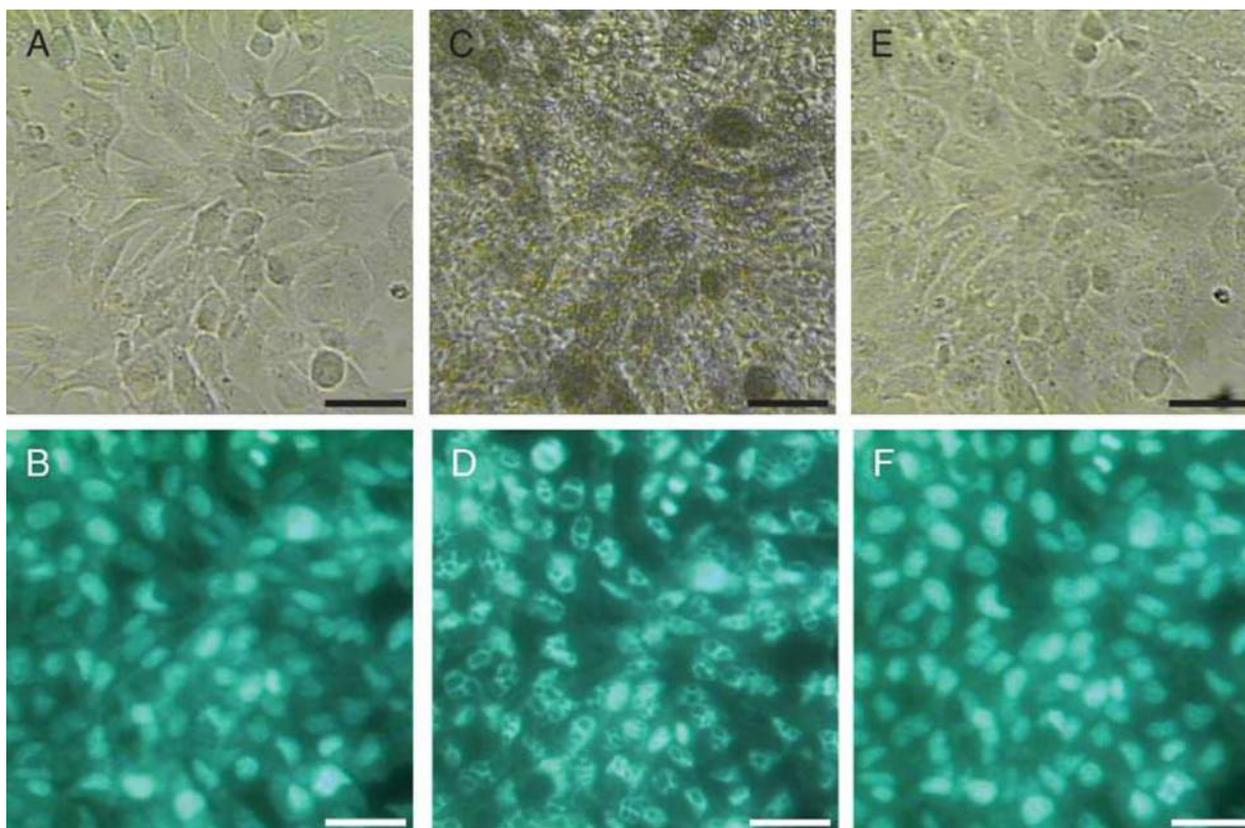


Рис. 2. Микрофотографии замораживаемых клеток (фибробласты хомяка V79-4) полученные с помощью оптической микроскопии светлого поля (А, С, Е) и флуоресцентной микроскопии (В, D, F). А, В – клетки до замораживания; С, D – замороженные; Е, F - размороженные. Размер шкалы – 20 мкм, изображения заимствованы из [49].

излучение ближнего ИК диапазона для возбуждения фотолуминесценции естественных коферментов.

Помимо потемнения клеток с помощью криомикроскопии можно наблюдать за тем, как изменяется размер замораживаемых клеток при обезвоживании, получать информацию (различной степени достоверности) о распределении льда в препарате. К сильным сторонам метода можно отнести техническую простоту, позволяющую совмещать криомикроскопию с другими методиками. Кроме того, оптическая микроскопия светлого поля неинвазивна, что позволяет сопоставлять результаты с исследованием выживаемости размороженных клеток. В тоже время, несмотря на простоту эксперимента, этот подход весьма неоднозначен с точки зрения интерпретации наблюдений.

1.1.3.2. Электронная микроскопия

Существует некоторое количество работ по исследованию замороженных клеток, в которых применяется электронный микроскоп [18,52,53]. В электронной микроскопии биологических клеток уже достаточно давно (и не только для криобиологических задач) применяется метод скалывания замороженных препаратов. Суть методики заключается в том,

что сначала препарат замораживается, затем делается скол, который позволяет исследовать препарат в разрезе, и после чего поверхность скола исследуется с помощью электронного микроскопа [54]. Электронная микроскопия позволяет проводить наблюдение за препаратом с пространственным разрешением, недоступным для оптической микроскопии. Тем не менее, этот метод слабо распространен из-за инвазивности (препарат разрушается, а скалывание требует серьезных отклонений от протокола замораживания), а также из-за сложности проведения эксперимента.

1.1.3.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) позволяет исследовать фазовые переходы и стеклование в препарате. Это неразрушающий метод, который применяется в криобиологических исследованиях для определения температур образования льда [26,55,56] и эвтектической кристаллизации [26] в препарате. ДСК совместима с криомикроскопией [57], что позволяет помогать в интерпретации процессов, наблюдаемых с помощью микроскопа. Было показано, что с помощью ДСК можно зафиксировать образование льда внутри отдельных яйцеклеток [55]. К недостаткам методики можно отнести необходимость охлаждения препарата с фиксированной скоростью и отсутствие пространственного разрешения.

1.1.3.4. ИК спектроскопия

Методы колебательной спектроскопии прекрасно подходят для исследования фазовых переходов. ИК спектроскопия – бесконтактная, неинвазивная методика, позволяющая проводить идентификацию химических соединений и исследовать фазовые переходы. Также как и ДСК, ИК спектроскопия совместима с криомикроскопией. Основной областью применения этого метода в криобиологии является исследование состояния мембран клеток [58-62]. К слабым сторонам ИК спектроскопии можно отнести сложности проведения экспериментов с водными образцами (из-за сильного поглощения воды в ИК диапазоне). Кроме того, этот метод обладает низким пространственным разрешением (характерный размер измеряемой области > 30 мкм).

1.1.3.5. Спектроскопия КРС

Спектроскопия КРС уже зарекомендовала себя как методика, подходящая для исследования биологических клеток. В плане проведения исследования замораживаемых клеток эта методика обладает рядом преимуществ по сравнению со всеми вышеперечисленными методиками. Спектроскопия КРС совместима с криомикроскопией. По сравнению с ИК спектроскопией метод КРС прекрасно подходит для работы с водными препаратами, а пространственное разрешение соответствует пространственному разрешению конфокального микроскопа. В тоже время методы колебательной спектроскопии позволяют

идентифицировать химический состав в измеряемой области и, таким образом, получать более однозначные результаты по сравнению с криомикроскопией и ДСК. По сравнению с электронной микроскопией КРС является практически неинвазивным методом. Не смотря на все преимущества данной экспериментальной техники, на момент начала выполнения настоящей диссертационной работы была всего одна статья, посвященная исследованию замораживаемых клеток с помощью спектроскопии КРС [6]. В первую очередь это объясняется достаточно слабым (но активно растущим) распространением данного метода в биологическом сообществе, а также необходимостью его адаптации к низкотемпературному эксперименту.

1.2. Комбинационное рассеяние света от биологических клеток

Спектроскопия КРС - это основная методика, используемая в настоящей работе. В начале этого раздела дается общая информация о методе, а затем обсуждаются особенности применения этой методики для изучения живых клеток.

1.2.1. Комбинационное рассеяние света

Комбинационное рассеяние света – рассеяние света в материале с изменением частоты за счет генерации или поглощения кванта колебательного возбуждения. Спектр комбинационного рассеяния состоит из набора линий, частоты которых (ω_{KPC}) определяются колебательными модами в рассеивающем веществе и удовлетворяют равенству

$$\hbar\omega_{KPC} = \hbar\omega_0 \pm \hbar\Omega_{кол}, \quad (1.2)$$

где ω_0 соответствует частоте возбуждающего излучения, а $\Omega_{кол}$ - частоте молекулярного колебания.

Рассмотрим схематически систему уровней молекулы (рис. 3). Каждый электронный энергетический уровень включает в себя систему колебательных подуровней. При взаимодействии с фотоном молекула может перейти из одного энергетического состояния в другое. Если энергия фотона достаточно велика, то при его поглощении молекула может перейти из невозбужденного электронного состояния в возбужденное (рис. 3, случай А). В случае взаимодействия с фотоном меньшей энергии, переход возможен только между колебательными подуровнями.

Процесс КРС можно представить как одновременное поглощение и испускание фотона. Случай, когда молекула испускает фотон с меньшей энергией соответствует выражению 1.2 со знаком минус (рис. 3, случай В). Возможен вариант, когда на момент взаимодействия с фотоном молекула находилась в некотором возбужденном колебательном состоянии, а в результате взаимодействия вернулась в невозбужденное состояние. Такой случай называют антистоксовым рассеянием, энергия испускаемого фотона будет соответствовать случаю со знаком плюс в выражении 1.2 (рис. 3, случай С). Таким образом, измеряя спектр рассеянного света как функцию разницы частот рассеянного света и частоты возбуждающего излучения, можно получить частоты собственных колебательных мод.

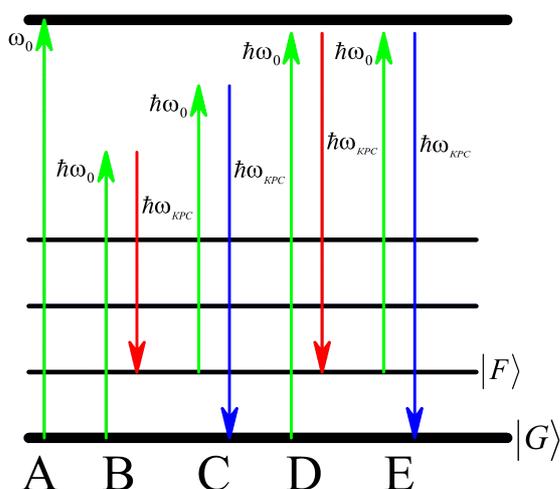


Рис. 3. Схема переходов при возбуждении вещества квантом света. А – энергии фотона достаточно для перехода молекулы на следующий электронный уровень. В – случай комбинационного стоксового рассеяния. С – случай комбинационного антистоксового рассеяния. D - случай стоксового резонансного комбинационного рассеяния E - случай антистоксового резонансного комбинационного рассеяния

Доля фотонов, рассеянных с отстройкой частоты, невелика и, как правило, не превышает 10^{-6} от общего числа рассеянных фотонов [63]. Интенсивность КРС (I_{KPC}) при смене состояния молекулы $|G\rangle \rightarrow |F\rangle$ определяется выражением

$$I_{KPC} \propto I_0 \omega_{KPC}^4 \sum_{i,j} |(\alpha_{ij})_{G \rightarrow F}|^2, \quad (1.3)$$

где I_0 - интенсивность возбуждающего излучения; ω_{KPC} - частота, на которой происходит рассеяние; $(\alpha_{ij})_{G \rightarrow F}$ - тензор поляризуемости молекулы при переходе $|G\rangle \rightarrow |F\rangle$, индексы i, j обозначают поляризацию возбуждающего и рассеянного излучения. Тензор поляризуемости задается модифицированной формулой дисперсии Крамерса-Гейзенберга [64]

$$(\alpha_{ij})_{G \rightarrow F} = \frac{1}{\hbar} \sum_E \left[\frac{\langle F | \mu_i | E \rangle \langle E | \mu_j | G \rangle}{\omega_{GE} - \omega_0 + i \frac{\Gamma_E}{2}} + \frac{\langle F | \mu_j | E \rangle \langle E | \mu_i | G \rangle}{\omega_{GE} + \omega_0 + i \frac{\Gamma_E}{2}} \right], \quad (1.4)$$

где μ_i и μ_j - операторы дипольного момента; $|E\rangle$ в промежуточное состояние, а Γ_E ширина уровня.

Из формулы (1.4) следует, что когда энергия фотонов возбуждающего излучения приближается к одному из электронных переходов $|G\rangle \rightarrow |E\rangle$, то знаменатель в первом слагаемом становится мал, и значение компонент тензора поляризуемости возрастает. В этом случае происходит резонансное КРС (РКРС) [64,65]. На практике величина резонансного эффекта зависит от конкретной электронной структуры молекулы, её симметрии и может приводить к усилению интенсивности линий КРС в 10^4 раз.

1.2.2. Спектроскопия КРС биологических клеток

Первая успешная работа по применению спектроскопии КРС к биологическим клеткам появилась в начале 90-х прошлого века [66]. В дальнейшем, с появлением доступных высокочувствительных многоканальных ПЗС детекторов и notch фильтров (позволяющих значительно повысить чувствительность спектрального оборудования), спектроскопия КРС стала активно применяться для исследования биологических объектов, в первую очередь для характеристики химического состава и распределения компонент в клетках [67-73].

К проблемам измерения КРС от биологических клеток можно отнести чувствительность препарата к интенсивному излучению (фототоксичность), пространственную неоднородность, сложный химический состав, а также, для некоторых образцов, высокий уровень фотолюминесценции.

Ещё в самых первых работах [74] было отмечено, что длительная экспозиция клеток под сфокусированным интенсивным лазерным излучением ($0.01 \div 10$ МВт/см²) может приводить к разрушению препарата [75,76]. Аналогичный эффект фототоксичности встречается при работе с оптическим пинцетом [77-79]. Выделяют два разных механизма фототоксичности. В первом механизме под воздействием излучения в клетках образуются реактивные формы кислорода (РФК), которые при высоких концентрациях приводят к целому ряду негативных эффектов [74,78,80]. Второй механизм заключается в непосредственном поглощении света ДНК, белками и коферментами [79,76]. Обычно этот вариант реализуется при использовании излучения в УФ диапазоне.

Для эффекта фототоксичности выработаны общие закономерности, обнаруженные в результате многочисленных экспериментов. Во многих работах (хотя и не во всех [81]) отмечается, что скорость фотоиндуцированного разрушения клеток прямо пропорциональна интенсивности излучения [74,78,82-84], т.е. фототоксичность определяется экспозицией. Также известно, что эффект фототоксичности зависит от длины волны облучения. Как правило, степень «токсичности» излучения падает с увеличением длины волны излучения [74,75] (детальная зависимость от длины волны определяется составом фотосенсибилизаторов для

конкретного типа клеток). Поэтому для неинвазивного измерения спектров КРС биологических клеток чаще всего применяется излучение из области ближнего ИК диапазона. Для излучения на больших длинах волн перестают работать кремниевые детекторы, и происходит уменьшение интенсивности КРС (согласно выражению 1.3, $I_{\text{КРС}} \propto \omega_{\text{КРС}}^4$).

В экспериментах с клетками предпочтительно использование микроскопных приставок, поскольку интенсивность КРС пропорциональна объему вещества, освещенного возбуждающим излучением, а объемная доля клеток в препарате не велика. При использовании микроскопного объектива освещенный объем становится сопоставим с объемом отдельной клетки. Возникает эффективное увеличение концентрации клеток в освещенном объеме, которое приводит к выделению спектра клеток из доминирующей (по объему) окружающей среды. Кроме того, микроскопный стенд позволяет проводить визуальное наблюдение клеток и решать задачи картирования (исследования пространственного распределения веществ) [67,68,85]. Использование высокоапертурных объективов позволяет работать на предельных пространственных разрешениях и собирать максимальное количество рассеянного света.

Другой проблемой, не связанной непосредственно с экспериментом, является спектральный анализ. В составе биологических клеток большое количество разнообразных органических соединений, спектры которых имеют много общих черт. Лишь некоторые отдельные линии в спектрах КРС биологических клеток можно отнести к конкретному соединению. Некоторые линии являются характерными для целого класса соединений: белков, липидов, нуклеиновых кислот. По этой причине в большинстве случаев применяется сравнительный анализ. Для этого измеряется набор спектров от различных образцов (или, как в случае картирования, различных областей), а затем проводится их сравнение. Сравнение спектров, как правило, проводится путем отслеживания интенсивностей каких-то конкретных известных линий [67,68,85], либо с использованием мультивариативного анализа [86-90] (например, анализ главных компонент [89, 90]). Последний подход в настоящее время становится все более популярным, поскольку он хорошо формализован с математической точки зрения [89], не требует практически никаких модельных соображений и выполняется в автоматизированном режиме. С другой стороны, данный подход основан на линейном разложении спектральных вкладов, что не всегда применимо к биологическими объектами. Например, вклад ДНК в спектрах КРС клетки определяется не конкретным набором линий заданной формы, а зависит от состава нуклеотидов [91], конформационного состояния [92] и прочих факторов. Несмотря на конкретный алгоритм, результаты подобного анализа оказываются зависимыми от выборки проведенных измерений (таким образом, старые результаты могут оказаться бесполезными, например, при расширении выборки). Кроме того,

отсутствие модельных соображений способно сыграть злую шутку с исследователями, в результате которой могут возникать слабо осмысленные научные работы, носящие чисто сравнительный характер выполненных измерений.

В отдельных ситуациях вклад от некоторых компонент может быть эффективно выделен методом РКРС. В этом случае подбирается излучение с длиной волны, на которой происходит РКРС от исследуемого соединения. Это позволяет значительно увеличить интенсивность исследуемых линий в спектрах, что упрощает их дальнейший анализ. Поскольку РКРС тесно связан не только с колебательным спектром молекулы, но и с поведением электронной подсистемы, спектры РКРС позволяют получать дополнительную информацию о состоянии молекулы.

Помимо проблем, относящихся к спектроскопии КРС, следует отметить, что большинство клеточных культур достаточно “капризны”. Для работы с такими культурами необходимо их содержание в специальных средах, в инкубаторах с определенными температурными и атмосферными условиями.

1.3. Постановка задачи

Метод комбинационного рассеяния света – это бесконтактный, неразрушающий метод, который может быть реализован с высоким пространственным разрешением. Применительно к задачам криобиологии метод КРС предоставляет уникальные возможности по исследованию отдельных замороженных клеток и распределения в них веществ. В области криобиологии спектроскопию КРС можно считать новой методикой исследования. Поэтому постановка эксперимента и исследование возможностей метода представляют особый интерес. Целью диссертационной работы является исследование замораживаемых биологических клеток методами спектроскопии комбинационного рассеяния света.

Для достижения поставленной цели в диссертационной работе будут решаться 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.

Глава 2. Описание эксперимента по измерению спектров КРС от замораживаемых биологических клеток

Эта глава посвящена обсуждению экспериментальной установки, разработанной для измерения спектров КРС от замораживаемых биологических клеток. Также здесь представлена общая информация о спектре КРС биологической клетки.

2.1. Оптическая схема установки для измерения КРС от микрообъектов

2.2.1 Оптическая схема

Микроскопный стенд был создан диссертантом на базе микроскопа Orthoplan (Leitz) и монохроматора SP-2500i с ПЗС детектором Spec-10:256E/LN, охлаждаемым жидким азотом (Princeton Instruments). Подробная схема представлена на рисунке 4.

При заведении в оптическую схему лазерное излучение ослабляется с помощью градиентного нейтрального фильтра (2), а затем проходит через пространственный фильтр состоящий из двух линз (3,5) а также конфокальной диафрагмы (4) диаметром 90 мкм. Входной пространственный фильтр выполняет две функции: он отсеивает излучение, которое не фокусируется в заданной области фокальной плоскости, а также (вместе с апертурными диафрагмами 1 и 6) является средством контроля заведения излучения в оптическую схему. После зеркала (7) возбуждающее излучение отражается светоделительным элементом (9). Отраженное излучение заводится в объектив системой перестраиваемых зеркал (10): первое зеркало с 90% пропусканием используется для наблюдения за препаратом через микроскоп, второе зеркало с полным отражением, используется для передачи рассеянного излучения в монохроматор. Далее микроскопный объектив (11) фокусирует возбуждающее излучение на образец (12). Рассеянный назад свет собирается объективом (11) и распространяется в обратном направлении: отражается от зеркала (10), проходит через светоделительный элемент (9). Затем свет проходит через конфокальную диафрагму (19), которая используется для увеличения пространственного разрешения. Далее упруго рассеянный свет ослабляется в $\sim 10^6$ раз с помощью резкого краевого фильтра прямого падения (23). После этого свет фокусируется линзой (26) на входную щель спектрометра. Угол заведения излучения в монохроматор задается перископными зеркалами (18, 20) и диафрагмой (22). После разложения света

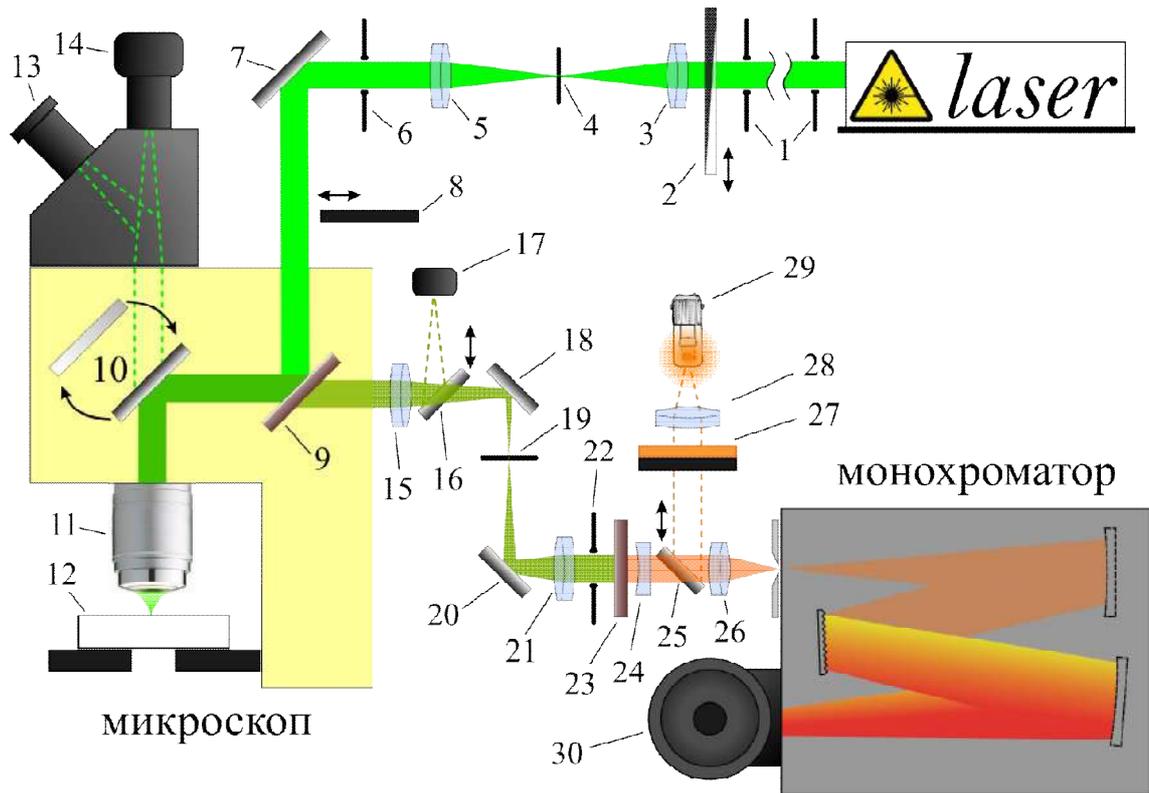


Рис. 4. Схема экспериментальной установки: 1 – апертурные диафрагмы (диаметр 3 мм); 2 – градиентный нейтральный фильтр на подвижке; 3 – линза, фокусное расстояние (f) 175 мм; 4 – конфокальная диафрагма (диаметр 90 мкм); 5 – линза, $f = 175$ мм; 6 – апертурная диафрагма; 7 – зеркало; 8 – встраиваемый в схему набор нейтральных фильтров; 9 – светоделительный элемент; 10 – система перестраиваемых зеркал; 11 – микроскопный объектив; 12 – образец; 13 – окуляры микроскопа, 14 – камера, установленная на тринокуляре микроскопа; 15 – линза, $f = 175$ мм; 16 – откидное зеркало; 17 – 1/4" КМОП камера; 18 – верхнее зеркало перископа; 19 – конфокальная диафрагма; 20 – нижнее зеркало перископа; 21 – линза, $f = 175$ мм; 22 – апертурная диафрагма; 23 – резкий краевой фильтр; 24 – длиннофокусная отрицательная плоскоцилиндрическая линза ($f \sim 1$ м); 25 – откидное зеркало; 26 – линза, $f = 25.4$ мм; 27 – набор фильтров ЖС-12 и НС; 28 – линза, $f \sim 30$ мм; 29 – неоновая лампа; 30 – многоканальный ПЗС детектор с дьюаром для заливки жидкого азота.

дифракционной решеткой монохроматора происходит измерение спектра с помощью многоканального детектора (30).

Практически все измерения проводились с использованием твердотельного лазера Millennium II (Spectra Physics) с длиной волны 532.1 нм и спектральной шириной линии < 10 ГГц. В этом случае в качестве светоделительного элемента (9) использовался изготовленный под заказ голографический фильтр, работающий под 45° углом. Фильтр пропускает 1/400 от излучения лазера и 80 % от излучения на длине волны выше 540 нм. Для дополнительного подавления упруго рассеянного света в схеме устанавливался краевой фильтр LP03-532RE-25 (Semrock) (23).

Для визуального осмотра образца и фокусировки излучения используется микроскоп. При этом лазерное излучение предварительно ослабляется встраиваемым в схему набором

нейтральных фильтров HC-2 и HC-7 (8). Далее зеркала (10) перестраиваются в режим наблюдения, в котором препарат можно увидеть через окуляры микроскопа (13) и сфотографировать с помощью подключенной к компьютеру камеры Canon Powershot SX 110 IS (14). Для точной фокусировки используется КМОП камера (17), которая встраивается в схему, с помощью откидного зеркала (16), при этом зеркала (10) остаются в положении измерения.

Промежуточная оптическая схема изначально разрабатывалась под работу с микроскопным $100\times$ объективом PL FLUOTAR L, (Leica Microsystems) с числовой апертурой $NA=0.75$, обладающим рабочим расстоянием 4.6 мм. При работе с данным объективом схема демонстрирует максимальную светопередачу и эффективную работу дифракционной решетки спектрометра. При этом размер промежуточного изображения в плоскости входной щели сопоставим с размером пикселя ПЗС детектора (26×26 мкм). Для увеличения пространственного разрешения в оптической схеме установлена конфокальная диафрагма размер которой выбирается в соответствии с экспериментом. В случае, когда требуется высокое пространственное разрешение, используется диафрагма диаметром 90 мкм. Если при фокусировке внутрь образца из-за aberrаций ожидается ухудшение пространственного разрешения, то используется диафрагма размером 120 мкм. Изображение конфокальной диафрагмы в фокальной плоскости детектора сопоставимо с размером пикселя ПЗС детектора. С одной стороны, это позволяет достигать максимального спектрального разрешения, а с другой - может приводить к искажению измеряемых спектров. Пример искажения спектра лампы накаливания за счет малого размера изображения на детекторе показан на рисунке 5. Для сохранения оптимального спектрального разрешения и устранения эффектов, связанных с неравномерной засветкой пикселей и межпиксельных областей, в оптическую схему перед фокусировкой на входную щель монохроматора добавлена длиннофокусная рассеивающая цилиндрическая линза (24). В случае, когда высокое пространственное разрешение не требуется можно увеличить уровень сигнала за счет удаления из оптической схемы конфокальной диафрагмы (19), а также собирающих линз (15,21) и рассеивающей линзы (24).

Монохроматор SP2500i схемы Черни-Тернера оптимизирован для работы в многоканальном режиме (фокусное расстояние 500 мм, относительное отверстие 1/6.5). В спектрометре установлена автоматизированная турель с тремя решетками: 1) 600 шт/мм с блеском на 500 нм, 2) 1200 шт/мм с блеском на 750 нм, 3) 600 шт/мм с блеском на 1 мкм. Калибровка положения решетки спектрометра проводится с помощью излучения неоновой лампы (29), встроенной в оптическую схему стенда. Для этого излучение лампы собирается линзой (28) и проходит через набор фильтров (27), состоящий из нейтрального фильтра и ЖС-12. Последний используется для подавления линий, которые дают вклад в спектр во втором

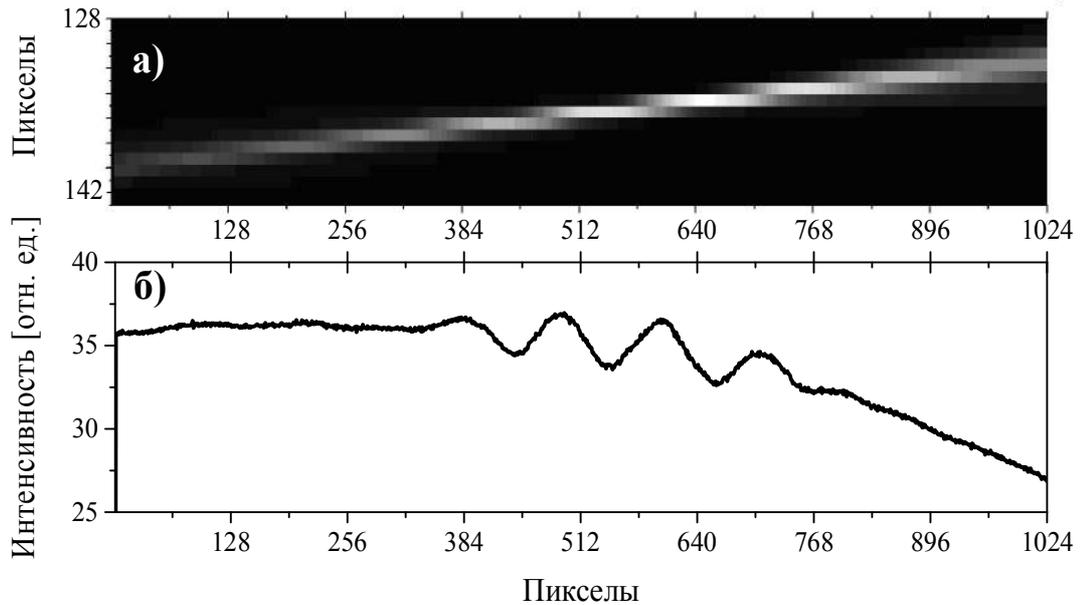


Рис. 5. Пропущенный через конфокальную диафрагму и спектрально разложенный свет от лампы накаливания. (а) - изображение на матрице ПЗС детектора; (б) – спектр лампы накаливания, который получается при вертикальном суммировании строчек матрицы (от другого изображения, аналогичного (а)). Пример сделан для дифракционной решетки 600 шт/мм с блеском для $\lambda = 1$ мкм, угол между ориентацией детектора и плоскостью спектрального разложения составляет $\sim 30'$, для остальных решеток этот угол меньше $3'$.

порядке дифракции. Измерения позиций эмиссионных линий неона проводятся с закрытой входной щелью монохроматора каждый раз после смены измеряемого спектрального диапазона.

С одной стороны созданный самодельный микроскопный стенд является более гибкой конструкцией, чем доступные коммерческие решения. С другой стороны, стенд должен обеспечивать высокую стабильность фокусировки. На рисунке 6 показано, как из-за смещения фокусировки по глубине происходит изменение интенсивности измеряемого КРС кремниевой пластины. Видно, что в течение первых 30 минут изменение сигнала пренебрежимо мало. При больших временах изменение сигнала также остается небольшим, в пределах 10% в течение часа. Тем не менее, для экспериментов с продолжительными экспозициями

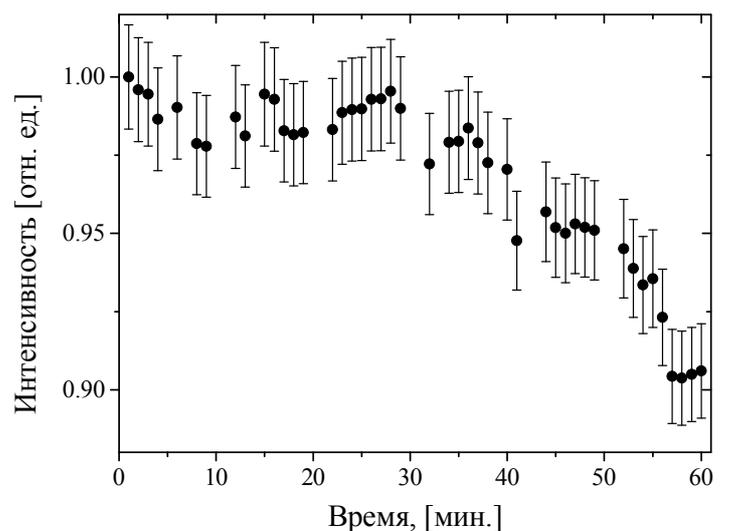


Рис. 6. Эволюция интенсивности КРС эталонной кремниевой пластинки со временем, вызванная смещением фокусировки.

проводилось дополнительное отслеживание положения области фокусировки излучения.

2.2.2 Оценка пространственного разрешения

Используемый в экспериментах микроскопный объектов PL FLUOTAR L оптимизирован на работу в среде с коэффициентом преломления $n=1$. Поэтому при работе с препаратами в водных растворах ($n \approx 1.33$) возникает эффект несоответствия коэффициентов преломления, приводящий к дополнительным продольным абберациям. Аналогичный эффект возникает при работе с криостатом, в этом случае абберации возникают из-за окон (для стекол $n \approx 1.5$). Для оценки пространственного разрешения были использованы результаты численного моделирования аппаратной функции конфокального микроскопа (point spread function – *PSF*), которая является результатом произведения аппаратных функций освещения (illumination point spread function – *IPSF*) и детектирования (detection point spread function - *DPSF*):

$$PSF(x, y, z) = IPSF(x, y, z) \times DPSF(x, y, z). \quad (2.1)$$

Для оценки можно пренебречь различиями между *IPSF* и *DPSF*, связанными с поляризацией и различным размером конфокальных диафрагм, т. е.

$$PSF(x, y, z) = IPSF^2(x, y, z). \quad (2.2)$$

Задачу определения *IPSF* можно сформулировать как определение амплитуд поля сферически сходящейся волны после прохождения через одну или несколько границ раздела (рис. 7). Определение *IPSF* основывается на принципе Гюйгенса-Френеля, согласно которому каждая точка волнового фронта является источником вторичных сферических волн. В общем случае *IPSF* при фокусировке через среды с различным коэффициентом преломления можно описать выражением [93]

$$IPSF(x, y, z) = const \cdot \left[\int_0^{2\pi} \int_0^{\alpha} \vec{A}(x, y, z, \theta, \varphi) \cdot \sqrt{\cos(\theta)} \cdot \exp\left(i \sum_j (\vec{k}_j \cdot \vec{s}_j)\right) \cdot \sin(\theta) d\varphi d\theta \right]^2, \quad (2.3)$$

где \vec{A} соответствует амплитуде поля пришедшей в заданную точку из участка сферического волнового фронта, задаваемого углами θ и φ , как показано на рисунке, а α - апертурный угол. Амплитуда \vec{A} находится из формул Френеля и зависит от свойств сред в которых распространяется излучение, количества границ раздела, углов падения и поляризации излучения. Сумма в экспоненте соответствует набегу фаз в различных средах: индексом j обозначается слой, \vec{k} волновой вектор для данной среды, \vec{s} - соответственно путь, пройденный в этой среде. Множитель $\sqrt{\cos(\theta)}$ возникает при преобразовании плоской однородной волны

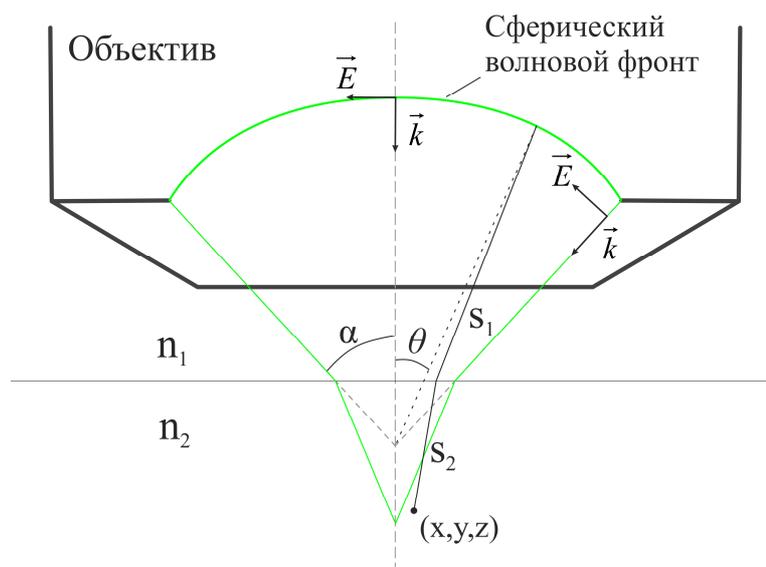


Рис. 7. Сферический волновой фронт, сходящийся за границей раздела.

в сферическую в случае идеального апланатического объектива [94]. В случае фокусировки линейно поляризованного сферического фронта через одну границу раздела известно аналитическое решение [95]. В более сложных сценариях часто применяется численный счет [93,96]. В случае, когда фокусное расстояние много больше длины волны ($\sin^2(\alpha) \cdot f/\lambda \rightarrow \infty$), может быть использовано приближение плоских волн (приближение Дебая [97]) [98,99]. Последний подход применяется в программе PSFlab [96], используемой для моделирования аппаратной функции в случае несоответствия коэффициентов преломления сред. Эта программа была использована в работе для оценки влияния aberrаций на аппаратную функцию и пространственное разрешение. На рисунке 8 показаны профили аппаратной функции для объектива PL FLUOTAR L (NA=0.75), построенные в результате численного счета: в случае фокусировки в воздушной среде; в водной среде, при фокусировке через тонкий лепесток слюды; в водной среде при фокусировке через окна вакуумного криостата.

Как видно из рисунка, в нашем случае аппаратная функция слабо искажается в случае фокусировки в воду через тонкую (~ 10 мкм) слюдяную пластинку (при условии, что глубина фокусировки в водную среду составляет ~ 10 мкм). Более значительные изменения претерпевает аппаратная функция при фокусировке в водную среду через толстый (560 мкм) слой плавленного кварца, соответствующий толщине окон криостата, который применяется в исследованиях замораживаемых препаратов. В этом случае продольные aberrации приводят к существенному увеличению продольного размера при слабом изменении латерального разрешения.

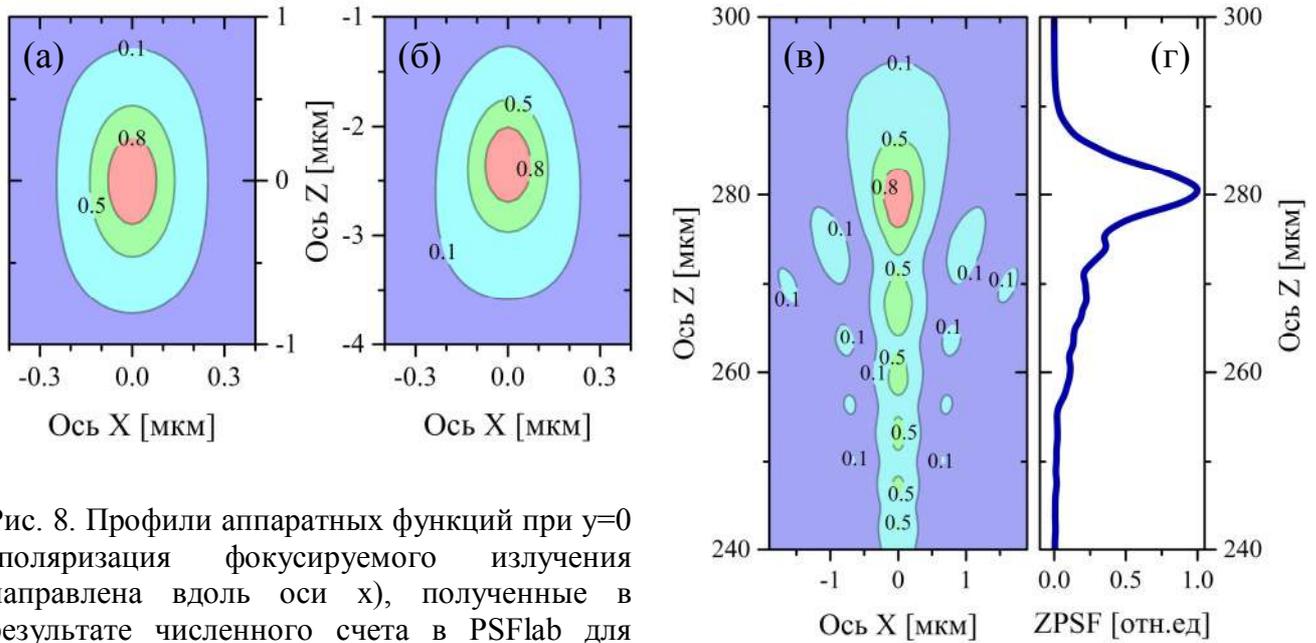


Рис. 8. Профили аппаратных функций при $y=0$ (поляризация фокусируемого излучения направлена вдоль оси x), полученные в результате численного счета в PSFlab для объектива с $NA=0.75$ и длины волны 532 нм.

(а) – профиль аппаратной функции в среде с $n=1$, соответствующей оптимальным условиям фокусировки; (б) – профиль при фокусировке в воду через 10 мкм пластинку слюды ($n=1.58$), (в) – профиль при фокусировке в воду через окно из плавленого кварца ($n=1.46$) толщиной 560 мкм. Аппаратные функции (б) и (в) вычислялись при фокусировке в воду на глубину ~ 10 мкм. (г) – $ZPSF(z)$ построенная для профиля (в).

Для исследования объектов, латеральный размер которых значительно больше латерального размера аппаратной функции, можно ввести продольный профиль аппаратной функции $ZPSF(z)$, определяемый выражением

$$ZPSF(z) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} PSF(r, \varphi, z) r dr d\varphi. \quad (2.4)$$

Если пренебречь поляризационными эффектами, то $PSF(r, \varphi, z)$ можно считать аксиально-симметричной функцией. Таким образом, из профиля аппаратной функции показанного на рисунке 8 (в) можно получить продольный профиль аппаратной функции, который изображен на рисунке 8 (г). В этом случае ширина на половине высоты $ZPSF(z)$ составляет 7 мкм. Реальный размер PSF и $ZPSF$ должен быть больше из-за того, что длина волны для стоксовой компоненты КРС несколько больше, чем длина волны возбуждающего излучения. Для работы с криостатом используется конфокальная диафрагма увеличенного размера, при увеличении глубины фокусировки в образец происходит увеличение aberrаций. Таким образом, ширину на половине высоты для $ZPSF$ в случае криостата можно оценить по порядку величины в 10 мкм.

2.2. Общий вид спектра КРС от биологической клетки

На рисунке 9 представлены спектр КРС дрожжевых клеток (усредненный по трем клеткам) и спектр физиологического раствора, измеренные на разработанной экспериментальной установке при комнатной температуре.

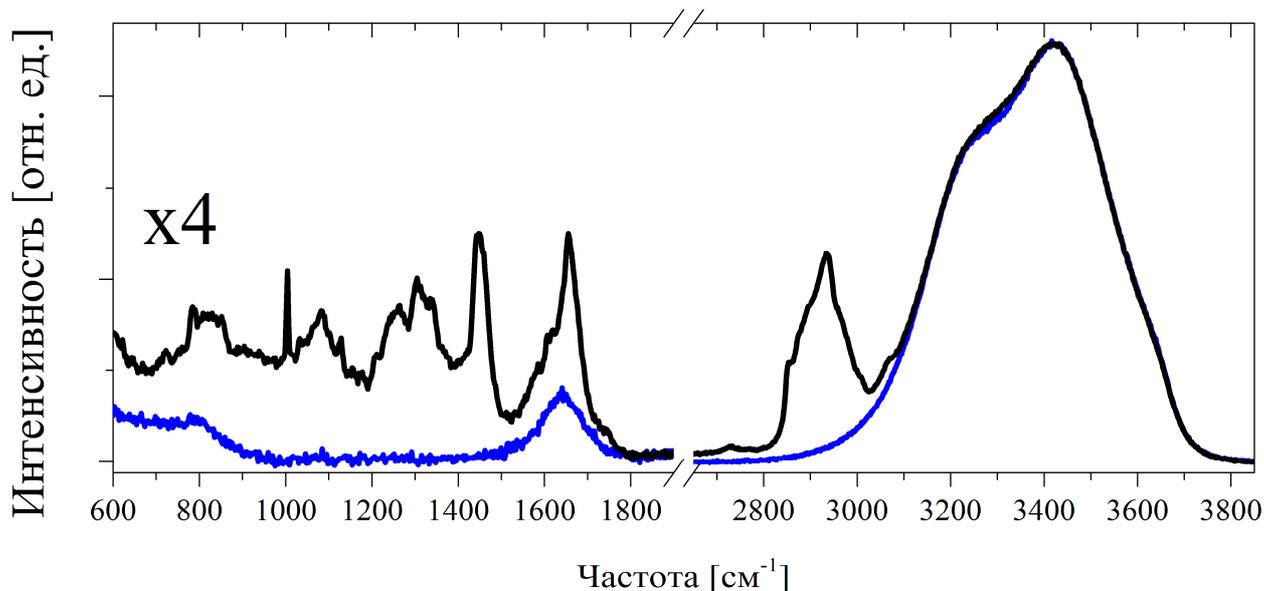


Рис. 9. Репрезентативные спектры КРС: дрожжевой клетки (черный) и физиологического раствора (синий) при комнатной температуре. Левая часть спектра домножена на 4.

К спектру воды относятся уширенные за счет водородных связей валентные ОН колебания ($3000\div 3750\text{ см}^{-1}$) и мода деформационных колебаний (1640 см^{-1}). Также к спектру воды относится линия либрационных колебаний на 2120 см^{-1} , которая на показанном спектре не видна. Более сорока линий в измеряемых спектрах относятся к КРС дрожжевых клеток (см. таблицу 1). Для наблюдения некоторых из них требуются достаточно большие времена экспозиции, поэтому на представленных выше спектрах они плохо неразличимы. Другие могут наблюдаться только в условиях РКРС. Как уже было отмечено ранее, состав клеток достаточно разнообразен, что затрудняет задачу идентификации.

В спектре можно выделить несколько характеристических колебательных мод, соответствующих определенным типам связей в соединениях. Валентные СН колебания находятся в диапазоне от 2800 до 3100 см^{-1} . В спектре клеток можно выделить симметричные и антисимметричные моды относящиеся к CH_2 (2850 и 2880 см^{-1} соответственно) и CH_3 (2930 и 2960 см^{-1} , соответственно). К деформационным СН колебаниям относятся линия ножничных колебаний на $1440\div 1460\text{ см}^{-1}$, а также крутильных (1300 см^{-1}) и маятниковых колебаний на

Таблица 1. Линии КРС биологической клетки.

Позиция линии см ⁻¹	Интерпретация
604	цитохром <i>c</i> [100,101]
622	фенилаланин [102,103]
645	тирозин [102,103]
672	тимин [92]
688	цитохром [100]; гуанин [92]
724	аденин [92,103]
749	цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100,103]
786	цитозин, тимин [92,103], О-Р-О [103]
814	РНК: С ₅ -О-Р-О-С ₃ [92,103,104]
830	фенилаланин [102]
852	тирозин [102,103]
879	ДНК/РНК: каркасные колебания [92], триптофан [103]
892, 905	маятниковые колебания СН ₂ [102,105]
922, 970, 992	цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100]
1004	фенилаланин [67,102,103]
1032	фенилаланин [67,102]
1050	С - О [92,105]
1064, 1081, 1102	насыщенная углеродная цепочка (С-С) [102,103]
1096	ДНК/РНК: РО ₂ [92,103]
1130	С - С цепочка транс конформация [103]
1129, 1155, 1176	цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100]
1210	фенилаланин, тирозин [67,103]
1250 (многокомпонентная)	сахара, нуклетиды [102], амидная мода III [102,103]
1300	крутильные колебания СН ₂ [105]; цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100]; амидная мода III [67,105]
1315, 1341	цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100]
1392	δ(СН ₂) колебание фосфатного каркаса, гуанин [92,102]
1450 (широкая)	ножничные колебания СН ₂ , СН ₃ [105]
1460	деформационные колебания СН ₃ [105]
1552	амидная мода II [105]
1587	цитохром <i>c</i> и <i>b</i> [100]; фенилаланин [102]
1606, 1619	С = С и/или ароматическая связь С≡С [105]
1655 (многокомпонентная)	амидная мода I (1650 см ⁻¹), а также колебания двойной связи С = С [105]
1734, 1877	С = О [105]
2850	симметричные валентные колебания СН ₂ [105]
2880	антисимметричные валентные колебания СН ₂ [105]
2930	симметричные валентные колебания СН ₃ [105]
2960	антисимметричные валентные колебания СН ₃ [105]
3005, 3065	С≡СН или =СН валентные колебания водорода [105]

892 и 905 см^{-1} . К колебаниям карбонильной моды можно отнести пики на 1734 и 1877 см^{-1} [105]. На 1656 см^{-1} находится линия, относящаяся к колебанию карбонильной группы пептидной цепи белков (амидная мода I). К колебаниям пептидной связи также относятся линия на 1555 см^{-1} (амидная мода II) и линия на 1300 см^{-1} (амидная мода III) [105].

Часть колебательных мод может быть отнесена (с той или иной степенью достоверности) к конкретным соединениям. Линия 1004 см^{-1} относится к колебанию бензольного кольца фенилаланина, который является одной из аминокислот в составе белков. Также к колебательным модам фенилаланина можно отнести линии на 622, 830, 1032, 1210 см^{-1} . Линии на 645, 852, 1210 см^{-1} относят к тирозину, который является еще одной аминокислотой в состав которой входит бензольное кольцо. Ещё в спектрах КРС присутствуют линии, которые могут быть отнесены к вкладу нуклеотидов: аденина (724 см^{-1}), тимина (672, 786 см^{-1}), гуанина (688, 1392 см^{-1}) и цитозина (786 см^{-1}). Целый набор линий на 604, 688, 749, 922, 970, 992, 1129, 1155, 1176, 1300, 1315, 1341, 1587 см^{-1} можно отнести к колебаниям гема цитохромов. Эти моды интенсивны для цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии гема при выполнении условий РКРС.

Идентификация других линии КРС неоднозначна, их можно отнести сразу к нескольким или целому классу соединений. Помимо линий характеристических колебаний к таким линиям можно отнести пики на 1064, 1081, 1102, 1250, 1655 см^{-1} . Некоторые из вышеупомянутых линий также могут быть отнесены сразу к нескольким соединениям (688, 1210, 786).

2.3. Эксперименты по измерению КРС от замораживаемых биологических клеток

Для проведения экспериментов с замораживаемыми клетками последние помещались в азотный криостат, установленный на предметном столике микроскопа (см рис. 4). В экспериментах использовалось два разных криостата: самодельный вакуумный азотный криостат и прокачной азотный криостат FTIR 600 (Linkam).

Вакуумный криостат, схема которого показана на рисунке 10, за счет эффективной теплоизоляции позволяет проводить эксперименты в широком диапазоне температур с относительно невысокой скоростью прокачки азота и сохранять фокусировку на препарате для больших времен экспозиции. Давление во внутреннем объеме криостата составляет $\sim 10^{-2}$ торр. При этом сам препарат находится в герметичной кювете, которая представляет собой два окна из плавленого кварца и фторопластовое кольцо, обжимаемые металлической оправой. Конструкция кюветы показана на рисунке 11 (А). Толщина окна, через которое проводится

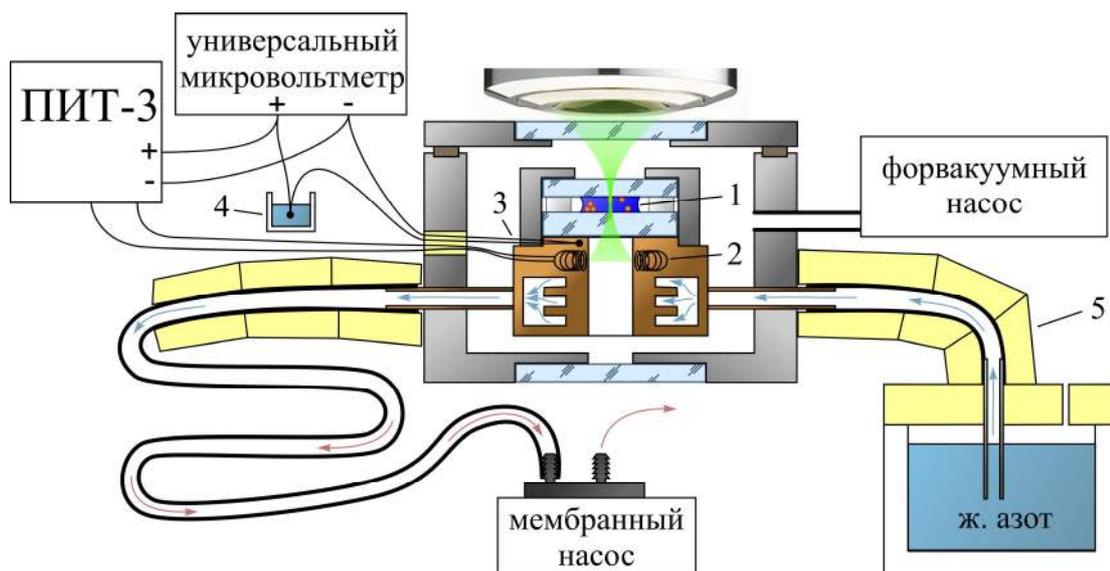


Рис. 10. Схема самодельного вакуумного прокачного азотного криостата. 1 - образец в герметичной кювете; 2 - нагревательный элемент; 3 - горячий спай дифференциальной термопары; 4 - холодный спай дифференциальной термопары в жидком азоте; 5 - теплоизоляция. Трубки для прокачки паров азота достаточной длины, чтобы в мембранный насос попадал теплый газ.

наблюдение, составляет 280 мкм. Окно такой же толщины отделяет внутренний объем криостата от окружающей атмосферы. Измерение температуры проводилось калиброванной дифференциальной термопарой хромель-алюмель. Горячий спай установлен вблизи кюветы, а холодный спай погружается в жидкий азот. Контроль температуры проводится с помощью терморегулятора ПИТ-3. Пары азота выкачиваются из дьюара с жидким азотом с помощью мембранного насоса Laboport (KNF), установленного в конце прокачного пути. Поток паров азота регулируется с помощью обжимаемой эластичной трубки. Основным недостатком вакуумного криостата является большая толщина окон, которая приводит к сильным продольным абберациям, снижающим пространственное разрешение и уровень сигнала.

В криостате FTIR 600 в качестве теплоизолятора используется не разряженный воздух, а сухой азот при атмосферном давлении. Из-за этого при глубоком охлаждении через криостат необходимо прокачивать большой поток азота, что приводит к нежелательным вибрациям и осложняет длительные измерения спектров от заданной области в образце. С другой стороны, такая конструкция позволяет проводить измерения с очень тонким окном криостата и даже совсем без окна (см. рис. 11 (В)). Таким образом, достигается высокий уровень сигнала и минимальные абберации. Поэтому FTIR 600 в основном применялся в экспериментах, где препарат охлаждался до сравнительно высоких температур (не ниже $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, в экспериментах с дрожжевыми клетками). Температура в криостате измеряется датчиком, установленным вблизи образца. Прокачка азота осуществляется специальной помпой LNP 95 (Linkam). Температура, скорость охлаждения/нагрева, а также поток паров азота регулируется контроллером T95

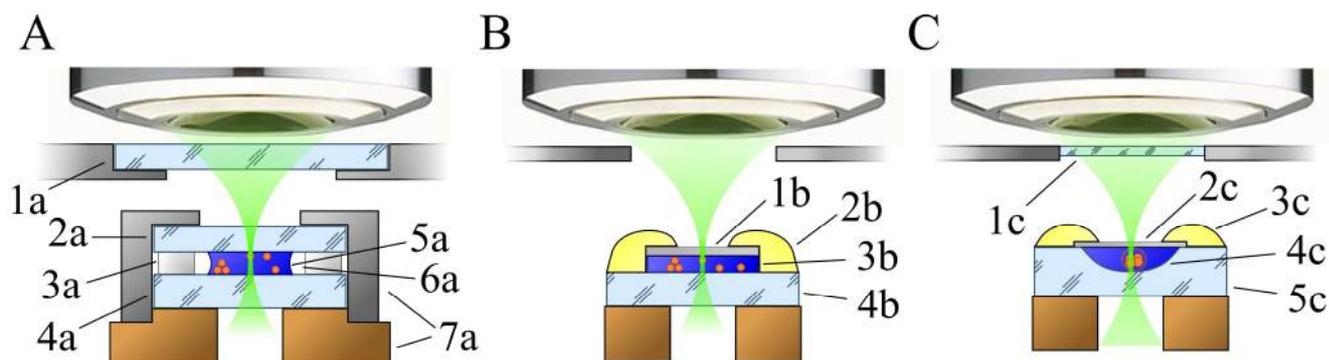


Рис. 11. Схема фокусировки на образцы, размещенные в самодельном вакуумном криостате (А) и криостате FTIR 600 (В и С). (А) - образец в вакуумном криостате: 1а - окно крышки криостата (280 мкм) из плавленного кварца, 2а - верхнее окно кюветы (280 мкм) из плавленного кварца, 3а - фторопластовое кольцо, 4а - нижнее окно кюветы из плавленного кварца, 5а - образец, 6а - воздушный зазор разделяющий образец (5а) и фторопластовое кольцо (3а), 7а - металлическая оправа. (В) - образец в криостате FTIR 600 с убранным окном: 1b - тонкая (~ 10 мкм) слюдяная пластинка, 2b - парафин, 3b - образец, 4b - предметное стекло из плавленного кварца. (С) - образец в криостате FTIR 600, в кювете для измерения КРС от преимплантационных эмбрионов мыши: 1с - окно крышки криостата (170 мкм), 2с - тонкая (~ 15 мкм) слюдяная пластинка, 3с - парафин, 4с - образец, 5с - предметное стекло с лункой глубиной 150 мкм.

(Linkam). Важным плюсом криостата FTIR 600 является возможность использовать такие же образцы, приготовленные для экспериментов при комнатной температуре. В этом случае капля клеточной суспензии накрывается тонким лепестком слюды (~10 мкм) и во избежание высыхания герметично заклеивается по периметру расплавленным парафином.

Во всех экспериментах с замораживаемыми клетками температура образца в измеряемой области дополнительно проверялась по спектрам КРС. Для этого проводились измерения КРС льда в диапазоне валентных колебаний ОН, и определялось положение пика, который с понижением температуры смещается от 3150 к 3080 см^{-1} .

Глава 3. Исследование эвтектической кристаллизации с помощью спектроскопии КРС

В данной главе исследован вопрос возникновения спектральных особенностей в спектрах КРС, которые были впоследствии 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.

3.1. Экспериментальная часть

3.1.1 Приготовление препарата

В качестве замораживаемого препарата были использованы дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Инстантные дрожжи разводились в физиологическом растворе (0.9 wt. % NaCl). Большая часть измерений, обсуждаемых в этой главе, была выполнена на микроскопном стенде с использованием вакуумного криостата. Препарат заключался в герметичную кювету, как было описано в предыдущей главе.

Также был проведен вспомогательный эксперимент на стенде со спектрометром TriVista 777. В этом случае образец представлял собой ампулу с концентрированным раствором NaCl (25 wt. %), запечатанную силикатным клеем, а затем поверх был нанесен эпоксидный клей.

3.1.2 Эксперимент, проводимый на TriVista 777

Стенд с трехрешеточным спектрометром TriVista 777 (Princeton Instruments) использовался для измерения спектров от водного раствора с 25 % (по весу) содержанием NaCl. Данный стенд позволяет проводить измерения спектра комбинационного рассеяния света от области объемом $\sim 1 \text{ мм}^3$, что в 10^7 раз больше тех объемов, которые исследуются с помощью микроскопного стенда. Подобные измерения позволяют получать спектры, в которых усреднены все имеющиеся в препарате неоднородности микронного масштаба.

Эксперимент проводился в геометрии рассеяния под прямым углом (Рис. 12). В качестве источника возбуждающего излучения использовался Ar лазер Stabilite 2017 (Spectra Physics) на длине волны 488 нм. Предварительно лазерное излучение заводилось в предмонохроматор (1) для отсекания плазменных линий. Затем оно фокусировалось в образец, помещенный в

гелиевый криостат замкнутого цикла DE204SI (Advanced Research Systems) под управлением контроллера 331S (LakeShore). Мощность фокусируемого излучения составляла 200 мВт, а фокусируемый объем был $\sim 1 \text{ мм}^3$. Часть рассеянного света собиралась под прямым углом, проходила через призму Дове (3) и фокусировалась на входную щель спектрометра. Монохроматоры спектрометра были установлены в режиме вычитания дисперсии.

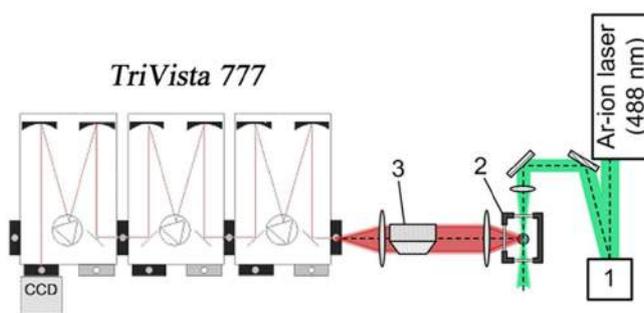


Рис. 12. Схема эксперимента на стенде TriVista777. 1 - предмонохроматор; 2 - криостат; 3 - призма Дове.

3.2. Идентификация линий на частотах выше 3400 см^{-1} , возникающих при замораживании препарата.

При замораживании препарата внеклеточный лёд образовывался при температурах $-10 \div -20 \text{ }^\circ\text{C}$. После этого клетки оказывались заключенными в жидких включениях внутри льда. В измеряемых спектрах КРС появлялись спектральные особенности, соответствующие льду (рис. 13, график С). В высокочастотном диапазоне спектров КРС от клеток, охлажденных ниже $-40 \text{ }^\circ\text{C}$, было замечено появление дополнительных линий на $3408, 3425$ и 3545 см^{-1} (рис. 13, график D). Подобные спектральные особенности (линия на 3425 см^{-1}) наблюдались в работах [33, 6], где они были отнесены к следам веществ органического происхождения, захваченных внутриклеточным льдом. При этом отмечалось, что эти линии являются спектральной особенностью внутриклеточного льда. Более конкретных предположений о природе

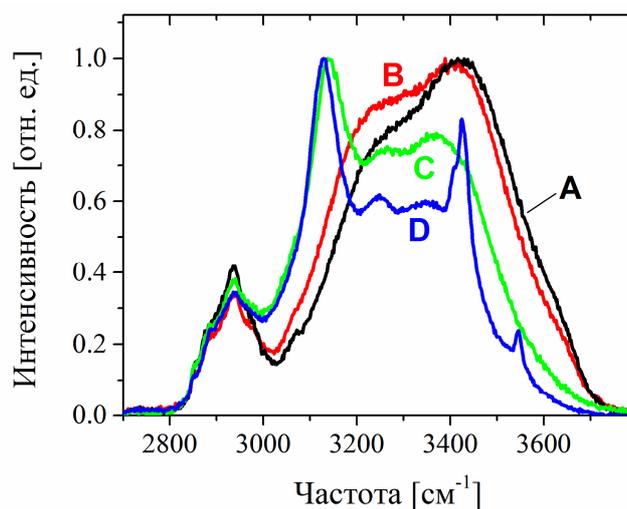


Рис. 13. Спектры КРС измеренные от дрожжевой клетки на различных стадиях замораживания. Спектр А соответствует клетке при комнатной температуре ($+25 \text{ }^\circ\text{C}$); В – клетке в переохлажденном растворе ($-10 \text{ }^\circ\text{C}$); С – клетке, окруженной льдом ($-25 \text{ }^\circ\text{C}$); D – клетке, охлажденной до $-46 \text{ }^\circ\text{C}$.

этих линии дано не было.

Исходя из гипотезы предложенной [6], была предпринята работа по идентификации соединения, которое могло бы привести к появлению данных линий. Вначале было экспериментально обнаружено, что эти линии наблюдаются в спектрах КРС, полученных при фокусировке в клеточное окружение. Причем обнаружить эти линии при замораживании физиологического раствора без добавления клеток не удалось.

Измерения, проведенные от клеточного окружения, указывают на то, что спектр идентифицируемого вещества обладает всего двумя линиями на 1640 и 1660 см^{-1} , попадающими в спектральный диапазон от 600 до 1800 см^{-1} . Положение линий соответствует $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ связям. Из-за небольшого набора линий было выдвинуто предположение, что в этом соединении отсутствуют какие-либо $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{H}$ связи, характерные для органических соединений.

Таким простым спектром могут обладать только простейшие метаболиты, такие как аммиак (NH_3) или мочевины ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$). Поэтому было проведено измерение спектров КРС замораживаемых водных растворов с этими соединениями. Оказалось, что спектры этих соединений отличны от спектра искомого вещества (см. рис. 14).

В экспериментах также наблюдались включения, связанные с кристаллизацией этих соединений (аммиака и мочевины). Значительная доля закристаллизованного вещества была замечена на кромке замороженной капли препарата (рис. 15). Во время дальнейших экспериментов с замороженной клеточной суспензией, было также отмечено наличие областей с включениями, подобными тем, которые наблюдались в замороженных растворах аммиака и мочевины. Исследуя области с высокой концентрацией примесей, удалось получить спектр от «чистого» вещества (рис. 16). Также было обнаружено, что искомое вещество исчезает при -20 $^{\circ}\text{C}$. Полученные результаты (отсутствие $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ и $\text{C}-\text{H}$) противоречат идее об органической природе данных соединений. Немногочисленные клеточные метаболиты, которые не содержат этих связей, демонстрируют спектры КРС отличные от наблюдаемых. Поэтому было выдвинуто предположение, что данное соединение является гидратом. Был

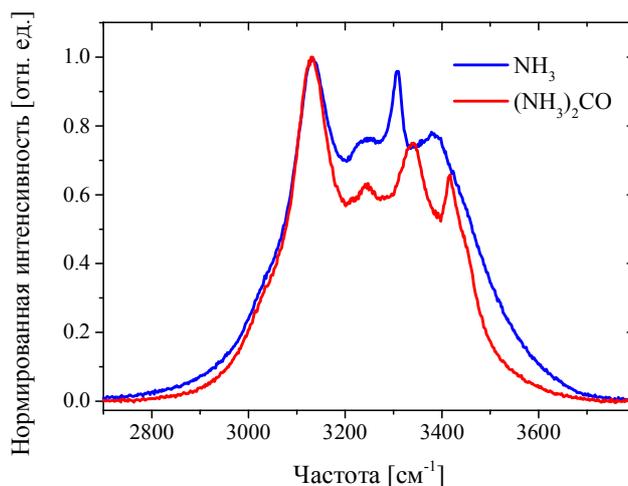


Рис. 14. Спектры КРС от включений в замороженных водных растворах аммиака (NH_3) и мочевины ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$)



Рис. 15. Сшивка нескольких фотографий от замороженной капли физиологического раствора. Темные неоднородности соответствуют областям, куда выпадают вещества, растворенные в растворе. Темная кромка слева и справа соответствует границе капли. Шкала – 30 мкм.

проведен повторный эксперимент по исследованию замороженного физиологического раствора.

В результате было показано, что на кромке замороженной капли происходит кристаллизация соединения, которое имеет тот же спектр с линиями на 3408 , 3425 , 3545 см^{-1} . Таким образом, это соединение кристаллизуется из физиологического раствора.

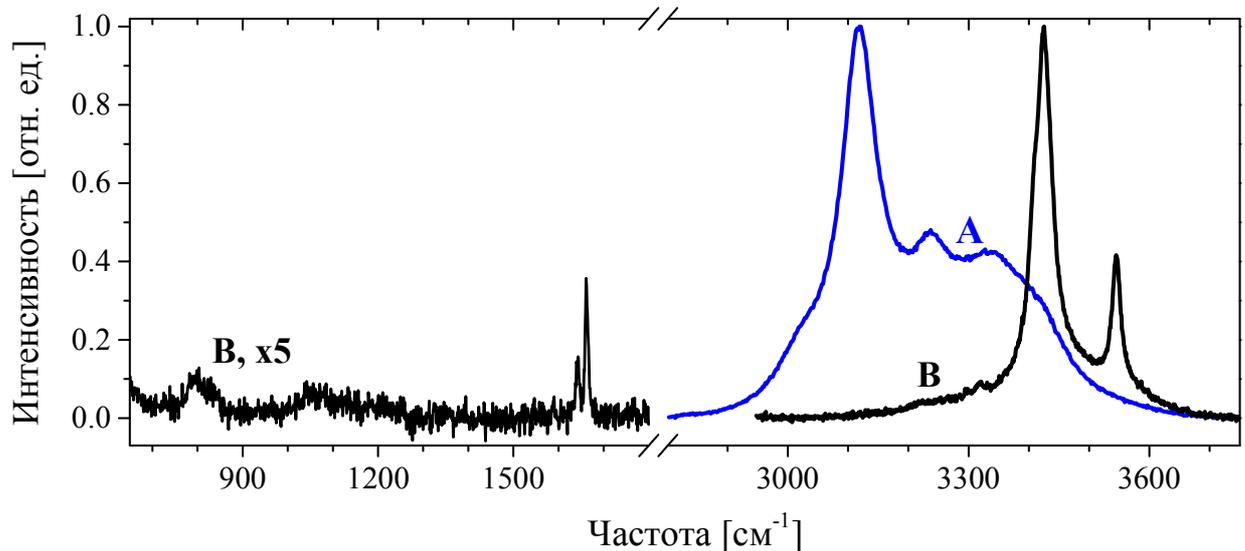


Рис. 16. Спектры КРС продуктов эвтектической кристаллизации. А – спектр льда ($T = -73$ °С); В – гидрогалит ($T = -22$ °С). Левая часть домножена на 5. На частотах ниже 1300 см^{-1} находится сторонний вклад от плавящего кварца.

В итоге вещество было идентифицировано как гидрогалит ($\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), который образуется при эвтектическом замерзании раствора 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 °С согласно [106]). После плавления образуется жидкость, спектр которой соответствует спектру высококонцентрированного раствора NaCl [107]. Как впоследствии выяснилось, измеряемые спектры совпадают со спектром гидрогалита, представленным в работе, посвященной жидким включениям в минералогии [108].

3.3. Пространственное распределение включений гидрогалита в образце

Все предварительные данные указывали на внутриклеточное происхождение соединения со спектром гидрогалита, но клеточная мембрана практически непроницаема для NaCl. Поэтому распределение гидрогалита в клеточной суспензии вызвало особый интерес. Для того, чтобы охарактеризовать пространственное распределение гидрогалита, проводились измерения от центра клетки и от кромки. Эти измерения проводились для двух различных скоростей охлаждения клеточной суспензии: ~ 1 °C/мин и $15\div 20$ °C/мин. Скоростной режим охлаждения поддерживался до эвтектического замерзания препарата.

В спектрах КРС от кромки клеток вклад гидрогалита интенсивнее, чем в спектрах, измеренных от центра (см. рис. 17). Для отдельной клетки интенсивность спектра гидрогалита от кромки оказалась сравнима (разброс значений укладывается в 30 %). Между разными клетками уровень вклада гидрогалита в спектр может сильно варьироваться (см. рис. 17 А и В). Наличие следов гидрогалита при фокусировке в центр клетки, скорее всего, является следствием недостатка продольного разрешения, которое в нашем случае значительно больше размеров клеток.

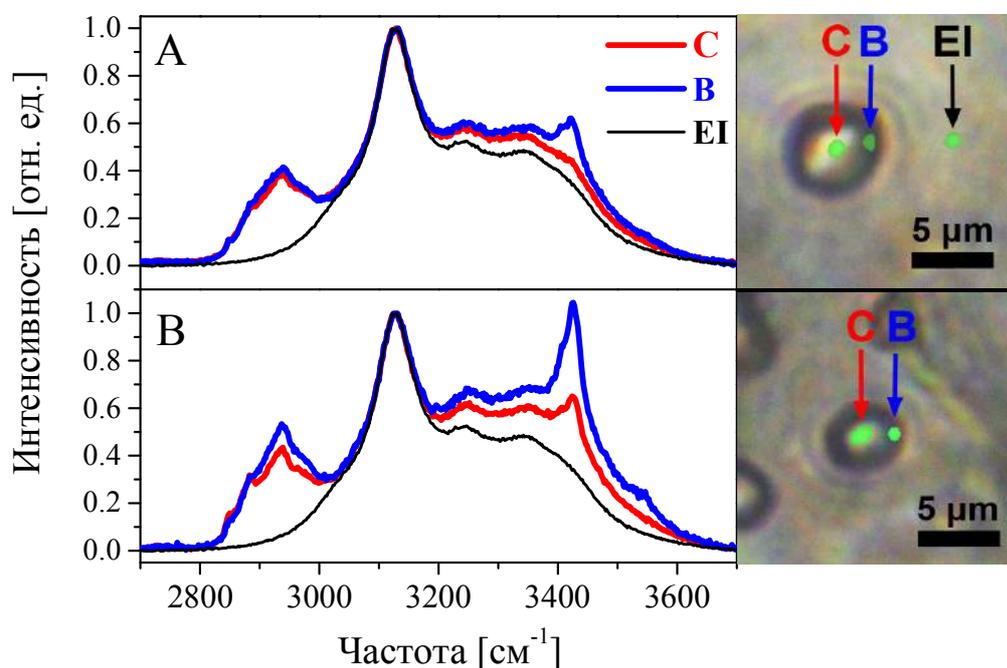


Рис. 17. Спектры комбинационного рассеяния из разных частей дрожжевых клеток при $T = -48$ °C. Стрелки на микрофотографии отмечают позицию лазерного луча во время измерения КРС: центр замороженной клетки (отмечен «С»), кромка клетки (отмечена «В») и внеклеточный лёд (отмечен «ЕI»). Верхняя панель демонстрирует случай, когда вокруг клетки небольшое количество гидрогалита, нижняя панель случай клетки с большим количеством гидрогалита. Обе клетки были заморожены в одном эксперименте.

Вклад гидрогалита практически не наблюдается ни внутри, ни вокруг клеток, ни в окружающем льду (см. рис. 18 А). Только для отдельных областей в объеме препарата можно обнаружить слабые следы гидрогалита, интенсивность которых сравнима с уровнем шума (см. рис. 18 В).

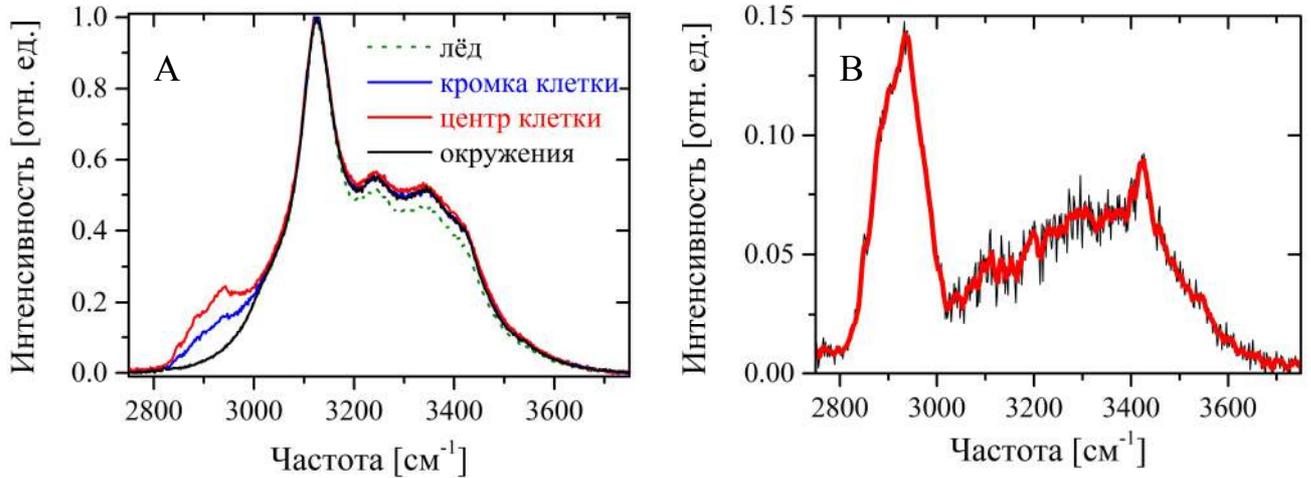


Рис 18.. А - спектры, полученные от разных областей препарата. пунктирная линия - спектр льда, получаемый при медленном охлаждении, синяя линия - кромка клетки, красная линия - центр клетки, черная линия - характерный спектр льда, измеренный в быстро замороженном образце. В - спектр гидрогалита, наблюдаемый при вычитании спектра льда медленно замороженного образца из спектра кромки одной из клеток.

В дополнение к спектральным различиям также наблюдаются визуальные изменения структуры внеклеточного льда в зависимости от скорости охлаждения (рис. 19). В случае медленного охлаждения наблюдается уменьшение размера дрожжевых клеток, вызванное обезвоживанием. Внеклеточный лёд вокруг клеток выглядит относительно однородным. При

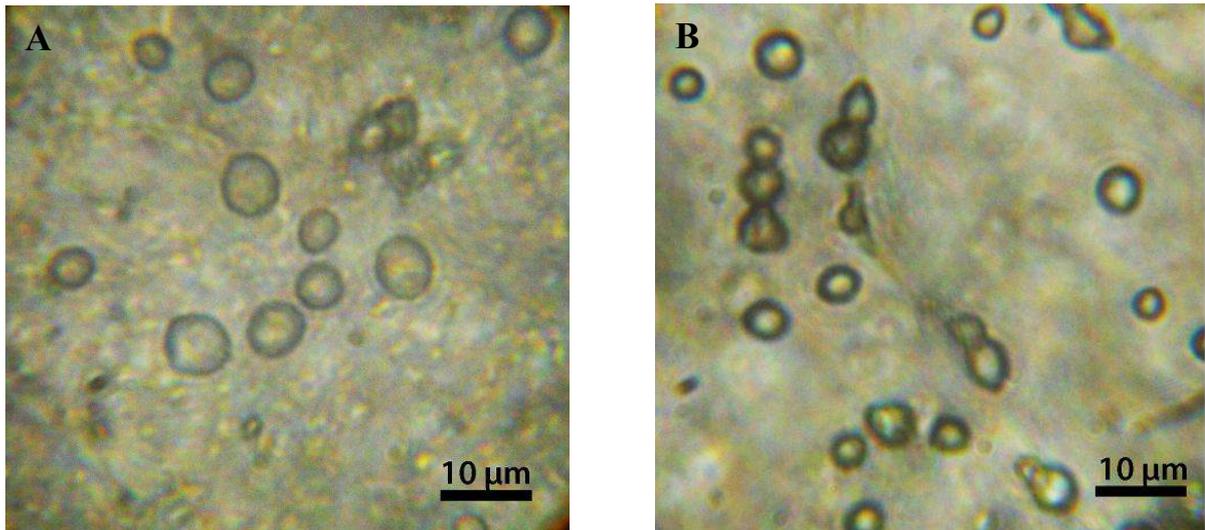


Рис. 19. Фотографии клеток во льду, сделанные при температурах ниже температуры эвтектического замерзания. А – фотография, полученная при скорости охлаждения 15÷20 °С/мин. В - фотография, полученная при скорости охлаждения ~1 °С/мин.

быстром охлаждении объем клеток остается практически неизменным, а внеклеточный лёд выглядит неоднородным.

Таким образом, распределение продуктов эвтектической кристаллизации сильно зависит от режима замораживания. При медленном охлаждении лёд вытесняет растворенную в воде соль во включения, которые замерзают при температурах ниже эвтектической кристаллизации. Клетки благодаря своему составу и постепенному обезвоживанию замерзают уже после образования внеклеточного льда. Поэтому при медленном охлаждении ионы Na^+ и Cl^- скапливаются вокруг клеток, и при дальнейшем замерзании образуется “шуба” из эвтектически замороженного вещества.

При быстром охлаждении степень переохлаждения физиологического раствора возрастает. Это приводит к увеличению концентрации и скорости роста зародышей льда, что в свою очередь приводит к уменьшению расстояний, на которые перемещаются ионы Na^+ и Cl^- до того, как происходит окружение льдом. В результате, при быстром охлаждении образуется большое количество маленьких (масштабом, не превышающем ~ 1 мкм) включений концентрированного раствора NaCl , который впоследствии претерпевает эвтектическое замерзание. Гидрогалит распределяется по всему объему препарата равномерно, в виде небольших включений. Клетки же в этом случае замерзают (образуется внутриклеточный лёд), не претерпевая обезвоживания.

Согласно работам [19, 18] оптимальной скоростью охлаждения для *Saccharomyces cerevisiae* в растворе NaCl является скорость 7 °C/мин. Скорости охлаждения в проведенных нами экспериментах (~ 1 и $15 \div 20$ °C/мин) являются двумя разными отклонениями от оптимальной скорости. Результаты проведенных экспериментов хорошо согласуются с двухфакторной моделью гибели клеток. При медленном охлаждении происходит обезвоживание клеток, вызванное высокой концентрацией раствора NaCl в окружении. При быстром охлаждении клетки сохраняют свой первоначальный объем, а количество продуктов эвтектической кристаллизации вокруг них минимально.

По спектрам КРС можно оценить объемную долю продуктов эвтектической кристаллизации вокруг клеток. Для этого воспользуемся упрощенным представлением о том, что продукты эвтектической кристаллизации распределяются равномерным образом вокруг замороженной клетки. Также необходимо учитывать размер и форму аппаратной функции. Согласно оценке, выполненной в предыдущей главе, поперечный размер области, от которой происходит измерение, составляет около 1 мкм в диаметре, а продольный размер области оценивается в ~ 10 мкм (ширина на полувысоте). В нашем случае можно считать, что поперечный размер аппаратной функции меньше размера клетки, а $ZPSF(z)$ значительно

больше размера клетки. Таким образом, вблизи клетки возможно пренебречь зависимостью $ZPSF(z)$ от z . В рамках этого представления при фокусировке в центр клетки интенсивность вклада линий гидрогалита определяется только толщиной слоя, претерпевшего эвтектическую кристаллизацию.

Для оценки толщины слоя необходимо знать соотношение интенсивностей КРС от гидрогалита и льда. Калибровка этого соотношения выполнялась с помощью стенда со спектрометром TriVista777, на котором были проведены измерения спектров КРС раствора 25 % NaCl (по весу). Интенсивность спектра КРС гидрогалита зависит от объёмной доли этого вещества в области фокусировки. Для однородной (в сравнении с объемом, в который фокусируется возбуждающее излучение) системы, состоящей из льда и гидрогалита, независимо от формы и размера аппаратной функции всегда выполняется соотношение

$$\frac{v_{hh}}{v_{ice}} = \xi \cdot \frac{I_{hh}^0}{I_{ice}^0}, \quad (3.1)$$

где v_{ice} , v_{hh} - объёмные доли льда и гидрогалита в области фокусировки, $\xi = I_{ice}^0 / I_{hh}^0$ отношение между удельными интенсивностями КРС льда и гидрогалита. Для количественной характеристики I_{ice}^0 была выбрана интенсивность пика на частоте $\sim 3130 \text{ см}^{-1}$ (положение зависит от температуры), I_{hh}^0 был задан интенсивностью пика на частоте 3425 см^{-1} (после вычитания спектра льда). После эвтектической кристаллизации объем препарата состоит на 77.5 % из льда и на 22.5 % из гидрогалита (для плотности последнего 1.61 г/см^3). Оказалось, что $\xi = 0.187$ для температурного диапазона $-30 \div -50 \text{ }^\circ\text{C}$ (см. рис. 20). В случае клетки, показанной на рисунке 17 В, отношение вкладов гидрогалита и льда в спектр КРС составляет 0.04. После вычитания диаметра клетки (в которой, как предполагается, отсутствует внутриклеточный лёд) из продольной длины измеряемого объема общий слой гидрогалита может быть оценен в $\sim 0.4 \text{ мкм}$. Доля гидрогалита в смеси продуктов эвтектической кристаллизации составляет 25.6 %, а при фокусировке в центр клетки в область фокусировки попадают два слоя: над клеткой и под ней. С учетом этих деталей толщина слоя, образованного продуктами эвтектической кристаллизации вокруг клетки,

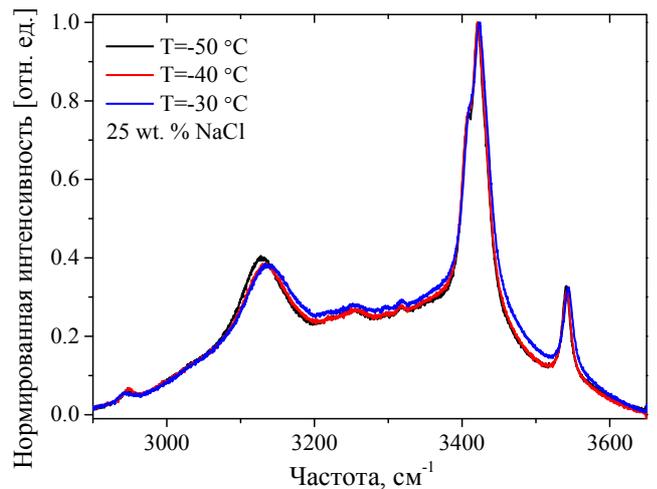


Рис. 20. Спектры эвтектически замороженного раствора NaCl, полученные при температурах -30 , -40 , $-50 \text{ }^\circ\text{C}$.

показанной на рисунке 17 В, соответствует $1 (\pm 0.5)$ мкм. При высокой скорости охлаждения вклад гидрогалита не превышает уровня шума измеренных спектров КРС. В этом случае можно только сделать оценку сверху, согласно которой количество гидрогалита по крайней мере в 60 раз ниже, чем вокруг медленно замороженных клеток. Эффективная толщина слоя продуктов эвтектической кристаллизации вокруг клеток, замороженных со скоростью $15\div 20$ °С/мин не должна превышать 20 нм.

После публикации нашего исследования по распределению гидрогалита в замораживаемой суспензии дрожжевых клеток [Okotrub K.A. et al. *Cryobiology* (2013) 66:47-51] Г. Циммерманн и коллеги выполнили работу по исследованию распределения гидрогалита в суспензии замораживаемых фибробластов мыши [109]. В работе было показано, что при замораживании гидрогалит может располагаться не только вне клеток, но и внутри. Считается, что дрожжевые клетки достаточно легко переносят выдерживание в гипертонических средах в отличие от клеток млекопитающих. Таким образом, возможно разрушение фибробластов на стадиях замораживания, предшествующих эвтектической кристаллизации. Из сравнения результатов, полученных в нашей работе и [109], можно предположить, что исследование распределения гидрогалита позволяет получать информацию не только о том, как протекает эвтектическая кристаллизация, но и о целостности замораживаемых клеток на предшествующих стадиях.

Глава 4. Исследование зарядового состояния цитохромов в дрожжевых клетках с помощью спектроскопии КРС

В настоящей главе представлены результаты исследования вклада резонансного комбинационного рассеяния (РКРС) цитохромов в спектр дрожжевой клетки. В начале главы представлено краткое обсуждение роли цитохромов в клеточном метаболизме. В следующей части обсуждается эффект уменьшения интенсивности (фотовыцветания) линий цитохромов. В последней части проводится исследование температурной зависимости фотовыцветания цитохромов.

4.1. Роль цитохромов в клеточном метаболизме и эффект резонансного КРС

4.1.1. Роль цитохромов в работе дыхательной электрон-транспортной цепи

Цитохромы – небольшие белки ($\sim 10^4$ а. е. м.), ключевой особенностью которых является наличие гемма - порфиринового комплекса с атомом железа (см. рис. 21), который может находиться в различных зарядовых состояниях: восстановленном (Fe^{2+}) и окисленном (Fe^{3+}). В зависимости от спектра поглощения гемы цитохромов разделяют на три группы: *a*, *b*, *c*. Полоса поглощения для цитохрома *c* находится в районе 550 нм, для цитохрома *b* на ~ 560 нм, а для цитохрома *a* на ~ 605 нм. Такое разделение носит чисто исторический характер, при этом тип гема не отражает каких-либо функций конкретного белка в клетке.

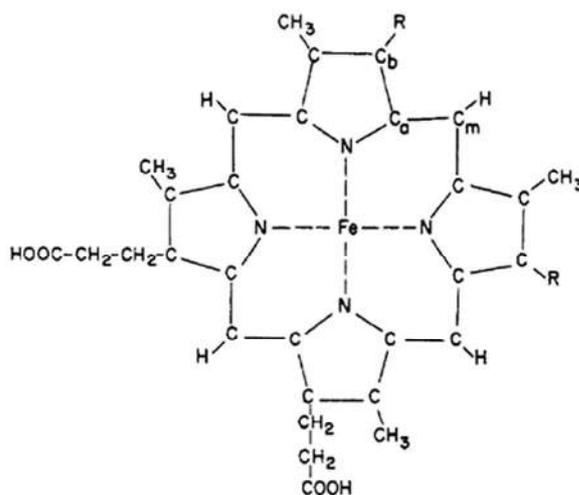


Рис. 21. Гем цитохрома [110]. Тип цитохрома зависит от присоединенной группы (R)

Цитохромы выполняют ряд важных функций сохранения и переноса электрона, важнейшей из которых является участие в электрон-транспортной цепи в митохондриях клеток. Дыхательная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) – система структурно и функционально связанных комплексов интегральных (т. е. встроенных в мембрану) белков на внутренней мембране митохондрий. В составе ЭТЦ выделяют четыре белковых комплекса (см. рис. 22).

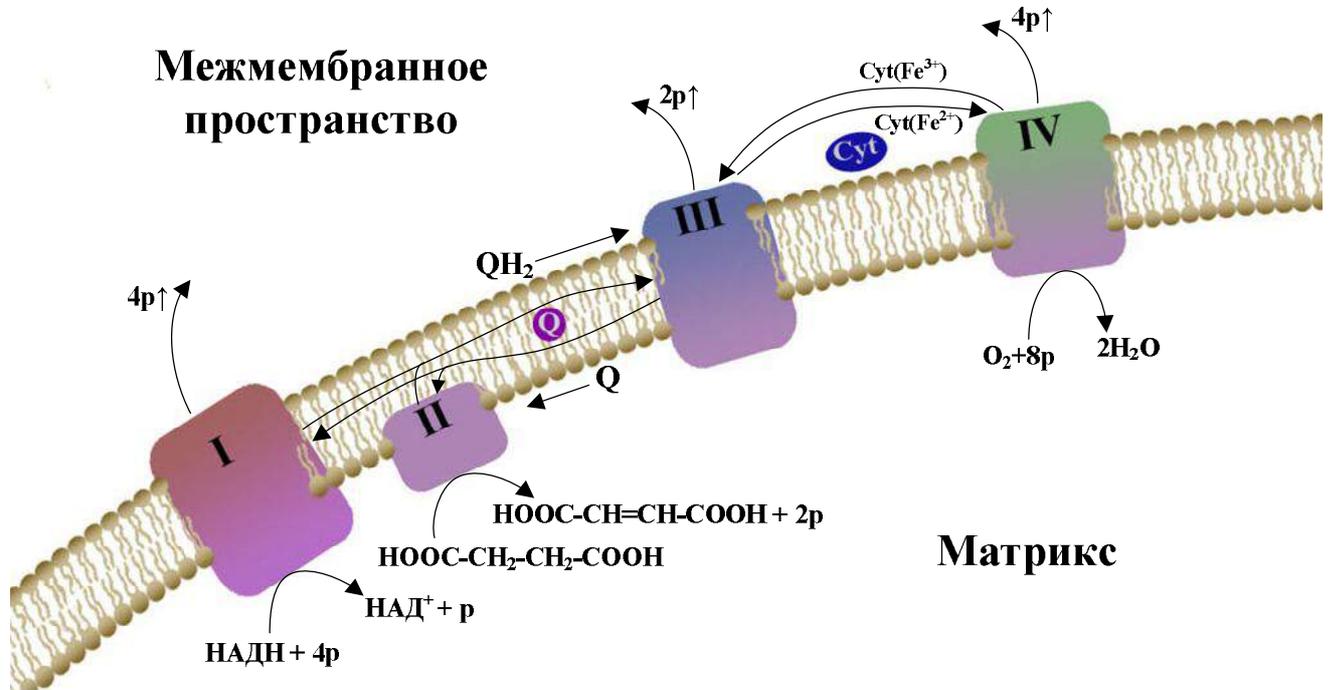


Рис. 22. Схема электрон-транспортной цепи. I, II, III, IV - комплексы ЭТЦ на внутренней мембране митохондрии; Q, QH₂ – убихинон и убихинол, соответственно; Cyt – цитохром c.

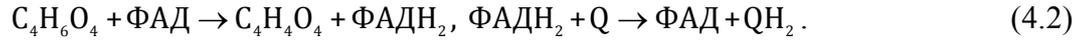
Основная задача ЭТЦ заключается в запасании энергии, выделяемой при окислении коферментов никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и флавинадениндинуклеотида (ФАДН₂), образующихся в результате реакций цикла лимонной кислоты (цикл Кребса). Окислительный процесс протекает в несколько этапов, которые сопряжены с процессами переноса протонов из матрикса в межмембранное пространство.

Рассмотрим кратко основные этапы работы ЭТЦ [111, 112]. Комплекс I (НАДН дегидрогеназа) окисляет НАДН. При этом в комплекс I поступает четыре протона и два электрона. Из них два электрона и два протона восстанавливают гидрофобный убихинон (Q → QH₂), образуя убихинол. Другие два протона переносятся в межмембранное пространство. Работу этого комплекса можно описать химической реакцией

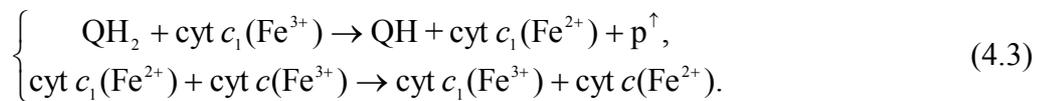


где p обозначает протон в матриксе, а p[↑] - протон перенесенный через мембрану в межмембранное пространство. Независимо от работы комплекса I в комплексе II (Сукцинат дегидрогеназа) происходит реакция преобразования сукцината (C₄H₆O₄) в фумарат (C₄H₄O₄) с

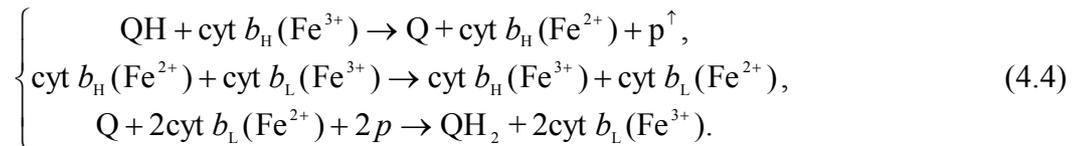
образованием ФАДН₂, затем происходит окисление ФАДН₂, в результате чего два электрона и два протона восстанавливают убихинон (см. рис. 22)



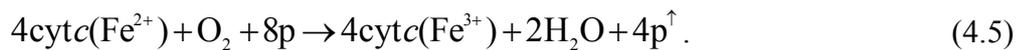
Комплекс III (цитохром *bc₁* комплекс) – большой комплекс, в состав которого входит 11 субъединиц, в том числе цитохромы *b_H*, *b_L* и *c₁*. Основная функция комплекса III - приём электронов от убихинола и передача их водорастворимому цитохрому *c*, расположенному на внутренней мембране митохондрии в межмембранном пространстве. В отличие от убихинола цитохромы переносят не более одного электрона за раз, поэтому в комплексе протекает две цепочки электрохимических реакций. Первая цепочка заключается в передаче электрона цитохрому *c*



Второй электрон используется для образования убихинола из убихинона (Q→QH₂). В этой цепочке участвуют цитохромы *b* типа



Цитохром *c* переносит электрон к комплексу IV (Цитохром *c* оксидаза), в состав которого входят цитохромы *a* и *a₃*. Задача комплекса IV заключается в образовании воды из молекулярного кислорода и водорода с переносом ещё четырех протонов в межмембранное пространство



Для простоты промежуточные реакции с участием цитохромов *a* и *a₃* опущены.

По ходу многостадийного процесса окисления коферментов происходит генерация протонного градиента на внутренней мембране митохондрии. Используя энергию протонного градиента, в митохондрии вырабатывается аденозинтрифосфат (АТФ), который является универсальным источником энергии для практически всех биохимических процессов протекающих в клетке.

Важно отметить, что в ходе работы ЭТЦ цитохромы должны регулярно менять свое зарядовое состояние. Кроме того, ЭТЦ представляет собой цепочку последовательно выстроенных реакций, и поэтому нарушение работы одного из этапов ЭТЦ ведёт к полной остановке её работы. Таким образом, окислительно-восстановительная активность цитохромов является важным показателем, который может быть использован для характеристики работы всей ЭТЦ.

4.1.2. Резонансное КРС цитохромов

На рисунке 23 показан спектр поглощения цитохрома *c* в окисленном и восстановленном зарядовых состояниях. В спектрах цитохромов выделяют три линии поглощения, которые связаны с наличием порфиринового комплекса. К прямым электронным переходам относятся полоса интенсивного поглощения в районе 400 нм (так называемая линия γ) и α -полоса (для цитохромов *c*-типа на 550 нм, *b*-типа на 560 нм, а для *a*-типа на 605 нм), соответствующая переходу с меньшей энергией. Третья, β -полоса, возникает в результате вибронного взаимодействия и смещена выше α -полосы на энергию, соответствующую $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ [64, 110]. Излучение на 532 нм оказывается близко к β -полосе для цитохромов *b* и *c* типов (см рис. 23). В результате резонансных эффектов происходит эффективное усиление интенсивности линий КРС цитохромов [64].

Спектр РКРС цитохромов чувствителен к зарядовому состоянию гема [110] (см рис. 24). Интенсивность РКРС цитохромов в восстановленном состоянии выше интенсивности цитохромов в окисленном состоянии более чем на порядок. Таким образом, интенсивность РКРС цитохромов может быть использована для характеристики зарядового состояния цитохромов.

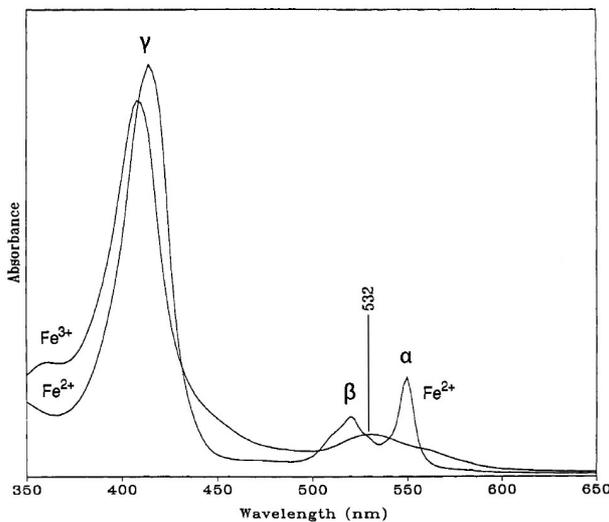


Рис. 23. Спектр поглощения цитохрома *c* в зарядовых состояниях Fe^{3+} и Fe^{2+} . Спектры заимствованы из работы [100].

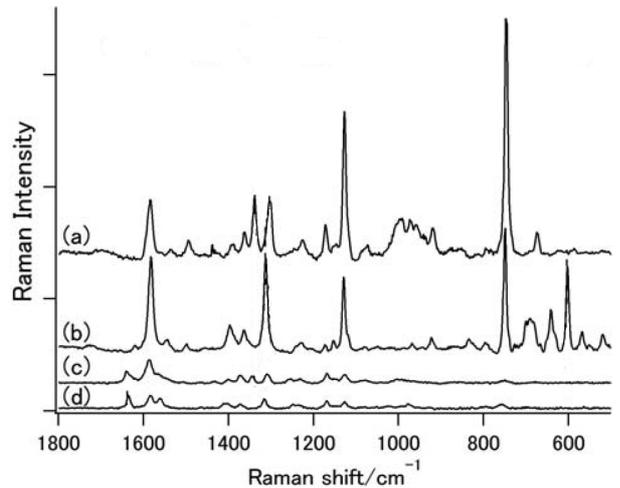


Рис. 24. Спектры РКРС цитохромов *b* и *c* типа в восстановленном и окисленном зарядовых состояниях. Спектры в порядке сверху вниз: цитохром *b* в состоянии гема (Fe^{2+}), цитохром *c* (Fe^{2+}), цитохром *b* (Fe^{3+}), цитохром *c* (Fe^{3+}). Изображение заимствовано из работы [101].

Исследование РКРС цитохромов *in vitro* проводятся с 70-х годов. Интенсивное рассеяние на геме позволяет изучать по спектрам РКРС взаимодействие цитохромов в модельных

объектах [113,114], исследовать состояние цитохромов в различных условиях [114], в том числе и под влиянием низких температур [115]. В настоящее время спектроскопия РКРС цитохромов применяется также и для исследования биологических объектов. При этом исследуется как распределение цитохромов в клетках [85,101,116-119], так и баланс между окисленными и восстановленными цитохромами [117,119,120]. Часть из этих работ была выполнена на дрожжевых клетках [101].

В наших экспериментах использовалось излучение на 532 нм, при котором происходит РКРС цитохромов *b* и *c* типа. В дальнейшем изложении, если не оговорено отдельно, под цитохромами будут подразумеваться цитохромы именно этих типов.

4.2. Уменьшение интенсивности линий резонансного КРС цитохромов под действием интенсивного излучения

В самых первых экспериментах по наблюдению РКРС цитохромов в дрожжевых клетках было обнаружено, что по ходу измерения происходит уменьшение вклада цитохромов в спектр клетки. Поскольку этот эффект может приводить к значительным изменениям при анализе окислительно-восстановительного баланса, а также при определении количества цитохромов было проведено исследование влияния интенсивного излучения на вклад РКРС цитохрома. Проведено сопоставление процесса фотовыцветания цитохромов с другим процессами, связанными с фототоксичностью излучения.

4.2.1. Приготовление препарата и детали эксперимента

Также как в Главе 3 в качестве замораживаемого препарата использовались дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, которые были разведены в физиологическом растворе (0.9 wt. % NaCl). Капля клеточной суспензии наносилась на предметное стекло из плавленого кварца и накрывалась тонким лепестком слюды (~10 мкм толщины). Затем, во избежание высыхания образец обклеивался, по периметру парафином.

Экспериментальная установка подробно описана в Главе 2. Измерения проводились от одиночных клеток при фокусировке в заданную область клетки. При этом проводилось измерение серий последовательных спектров КРС (около 40 сканов). Время экспозиции варьировалось в зависимости от интенсивности излучения.

Для излучения мощностью 1 мВт средняя интенсивность фокусируемого пятна оценивается в 0.13 МВт/см^2 (с усреднением по площади диска Эйри), а максимальная интенсивность соответствует 0.29 МВт/см^2 .

4.2.2. Изменение интенсивности вклада цитохромов под действием излучения

На рисунке 25 показаны спектры КРС дрожжевых клеток, измеренные на разных стадиях экспозиции. Как видно из рисунка, вклад линий цитохрома (наиболее интенсивные из которых линии на $749, 1129, 1587 \text{ см}^{-1}$) уменьшается с каждым последующим спектром. В то же время вклад линий, относящихся к клеточной органике: пик фенилаланина на 1004 см^{-1} , мода деформационных колебаний водорода (1450 см^{-1}), а также амидная мода, остаются неизменными. Помимо эффекта, связанного с фотовыцветанием линий цитохромов под действием излучения, происходит увеличение интенсивности фотолюминесценции. Спектр КРС клетки находится на некотором фотолюминесцентном фоне. Изначально уровень фотолюминесценции относительно невелик. Со временем под действием излучения происходит деградация клетки, при этом образуются люминофоры, приводящие к увеличению интенсивности фотолюминесценции. После появления люминесценции с помощью микроскопии светлого поля можно наблюдать визуальную деградацию участка клетки, на котором фокусировалось излучение. Существует корреляция между фокусировкой на деградировавший участок клетки и фотолюминесценцией. Таким образом, отслеживание уровня фотолюминесценции позволяет охарактеризовать степень деградации облучаемого участка клетки.

Для отслеживания интенсивности фотолюминесценции исследовался интегральный сигнал на детекторе в спектральном диапазоне от 550 до 634 нм. На рисунке 26 (а) показана зависимость интенсивности фотолюминесценции от времени облучения. Как видно из рисунка, существует некоторый момент $\tau_{\text{фл}}$, после которого наблюдается резкое возрастание интенсивности фотолюминесценции. Параметр $\tau_{\text{фл}}$ можно рассматривать как пороговое время, за которое под действием

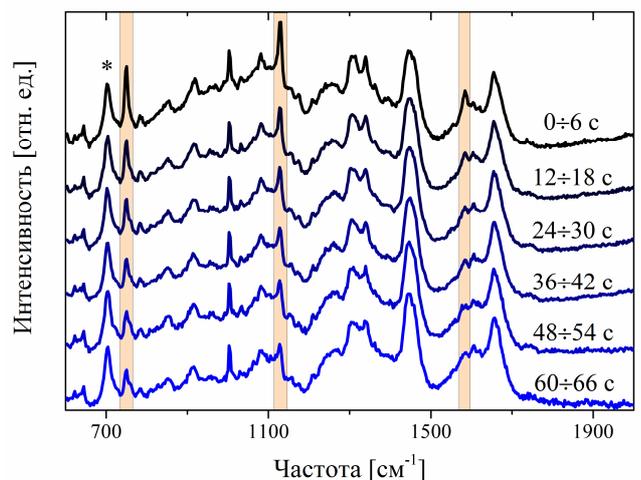


Рис. 25. Спектры КРС от дрожжевых клеток измеренные на разных стадиях экспозиции лазерным излучением. Мощность излучения на образце 10 мВт.

излучения накапливается критическое количество повреждений. Соответственно, обратная величина $\tau_{\phi L}^{-1}$ отображает скорость накопления критического количества повреждений и позволяет характеризовать фототоксичность излучения.

Для отслеживания эволюции вклада цитохромов в спектрах КРС было использовано отношение интенсивности пика цитохрома на 749 см^{-1} (I_{749}) к интенсивности деформационной СН моды ($I_{\delta CH}$). Пример зависимости отношения $I_{749}/I_{\delta CH}$ от времени при мощности излучения на образце 4 мВт показан на рисунке 26 (b). Оказалось, что эта зависимость может быть достаточно аккуратно описана выражением для затухающей экспоненты

$$\frac{I_{749}}{I_{\delta CH}} = y_0 + A \cdot e^{-t/\tau}, \quad (4.6)$$

где A – амплитуда фотовыцветания, τ – характерное время фотовыцветания, а y_0 – отражает баланс между окисленными и восстановленными цитохромами под действием излучения. На параметры накладывается условие неотрицательности. Таким образом, вклад цитохромов в спектры КРС и его изменение под действием излучения может быть описан с использованием трех параметров.

В одном и том же препарате клеточной суспензии при фиксированной интенсивности облучения существует разброс значений этих параметров (а также $\tau_{\phi L}$) от клетки к клетке. Поэтому для каждого эксперимента при заданных условиях была проведена серия измерений от набора клеток (в среднем $n=50$), после чего для каждой клетки определялись параметры фотовыцветания. На рисунке 27 показаны гистограммы распределения параметров при мощности излучения на образце 2 мВт. Распределения параметров A и τ могут быть описаны логнормальным распределением, а распределение параметра y_0 с учетом того, что требование неотрицательности увеличивает количество случаев с $y_0=0$, может быть описано нормальным распределением.

После того как для заданных экспериментальных условий было исследовано достаточное количество клеток, выполнялось усреднение параметров. При этом выбор способа усреднения (среднее арифметическое или математическое ожидание логнормального распределения) не вносит качественных эффектов на обсуждаемые результаты, поэтому в дальнейшем было решено использовать среднее арифметическое. Кроме усреднения по параметрам также использовалось усреднение по спектрам. В этом случае усреднялись спектры, полученные от разных клеток, но соответствующие одному и тому же времени экспозиции. Этот режим усреднения имитирует ситуацию, когда измерения проводятся одновременно от всего набора клеток. В результате получается зависимость усредненного по

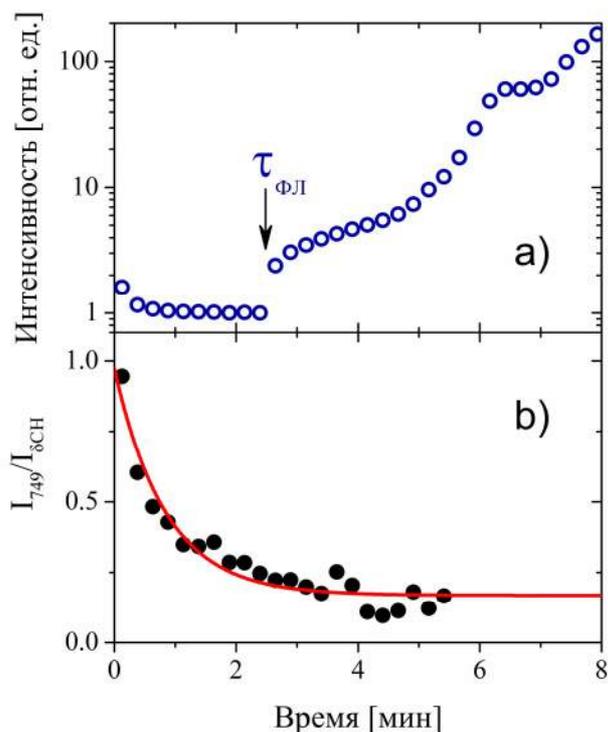


Рис. 26. Пример зависимости интенсивности фотолюминесценции от температуры (а) и зависимости отношения I_{749}/I_{8CH} при мощности излучения 4 мВт. Стрелка отмечает момент, в который происходит резкий скачек интенсивности (а). Красная линия - подгонка затухающей экспоненты.

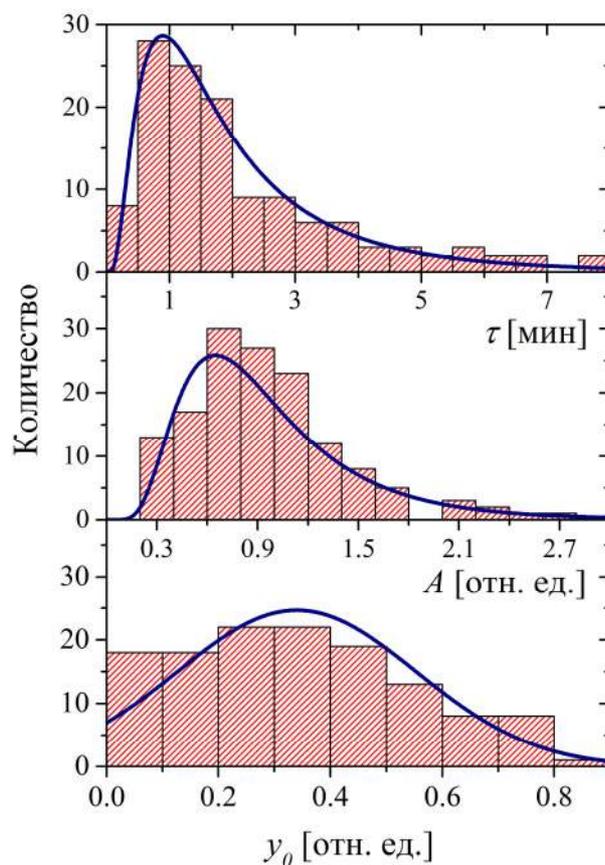


Рис. 27. Распределение подгоночных параметров τ (а), A (б), y_0 (с) при 2 мВт мощности излучения. В случае (а) и (б) линии соответствуют логнормальному распределению. В (с) линия соответствует нормальному распределению.

клеткам соотношения I_{749}/I_{8CH} от времени, которая хорошо описывается затухающей экспонентой (ур. 4.6).

Была исследована зависимость параметров, используемых для описания кинетики фотовыцветания вклада цитохромов от мощности излучения в диапазоне от 0.5 мВт до 24 мВт. На рисунке 28 (а) показана зависимость τ^{-1} от мощности (оси в логарифмических координатах). Эта зависимость хорошо описывается суммой квадратичной зависимости и константы

$$\tau^{-1}(P) = k_{dark} + \beta \cdot P^2. \quad (4.7)$$

Квадратичный член подразумевает, что процесс фотовыцветания цитохрома вовлекает два фотона. В свою очередь скорость накопления фотоповреждений $\tau_{ФЛ}^{-1}$ демонстрирует линейную зависимость от мощности (см рис. 28 (а)), что согласуется с исследованиями эффекта

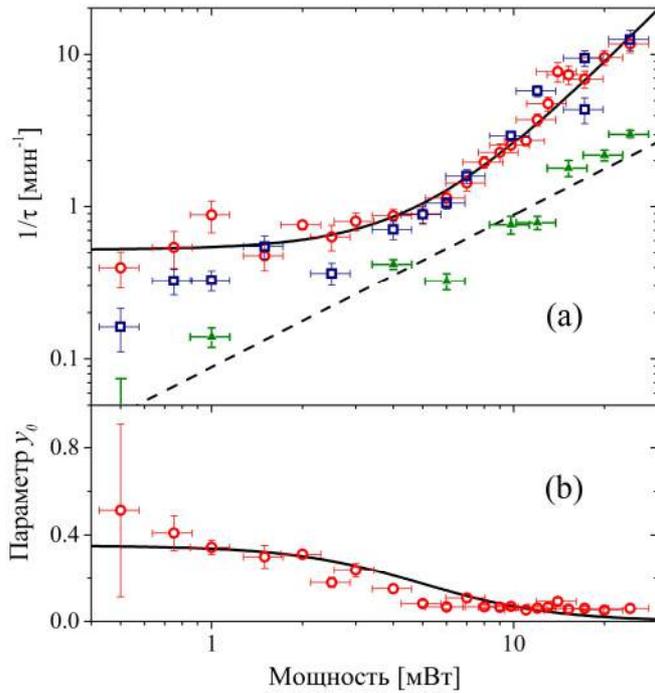


Рис. 28. (а) Зависимость скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов (τ^{-1}) и скорости накопления фотоповреждений ($\tau_{\text{фл}}^{-1}$) от мощности излучения. Красные круги отмечают τ^{-1} , полученное усреднением по параметру, синие квадраты - τ^{-1} , полученное из усреднения по спектрам, сплошная линия соответствует подгонке с помощью ур. (4.7). Зеленые треугольники отображают $\tau_{\text{фл}}^{-1}$ (для 0.5 мВт дана только оценка сверху), пунктирная линия соответствует прямой пропорциональности. (б) Зависимость параметра y_0 от мощности излучения. Линия - подгонка ур. (4.13)

фототоксичности, проводимыми другими группами [74,78,82-84]. Также следует отметить, что с понижением температуры наблюдается постепенное увеличение значения параметра y_0 (рис. 28 (b)).

Помимо зависимости фотовыцветания от мощности также исследовался вопрос локальности фотовыцветания линий цитохромов и обратимости этого процесса. Чтобы проверить, что фотовыцветание цитохромов происходит только в области фокусировки излучения, а не во всей клетке, были проведены измерения спектров КРС от разных точек в клетке (см. рис. 29). В данном случае, поскольку клетка не однородна по составу, исследовалось абсолютное значение вклада цитохромов, а не нормированное на $I_{\text{сн}}$. Как видно из рисунка 29, облучение первой точки не влияет на фотовыцветание во второй точке. При этом увеличение количества точек приводит к аналогичным результатам (в наших экспериментах использовалось вплоть до пяти точек).

Для исследования обратимости процесса фотовыцветания линий цитохромов был проведен следующий эксперимент. В начале клетка облучалась интенсивным излучением (2 мВт), проводились измерения спектров КРС (в течение одной минуты), затем излучение прекращалось, и клетка выдерживалась 15 минут без облучения. После “отдыха” снова включалось облучение, и выполнялось измерение спектров КРС. Подобный эксперимент был проведен на ~80 клетках, результаты показаны на рисунке 30. Вначале происходит уменьшение интенсивности вклада цитохрома, в первый момент после 15 минутного отдыха наблюдается увеличение интенсивности этого вклада практически до начального уровня, в дальнейшем происходит выцветание вклада цитохромов под действием излучения. Чтобы проверить, что

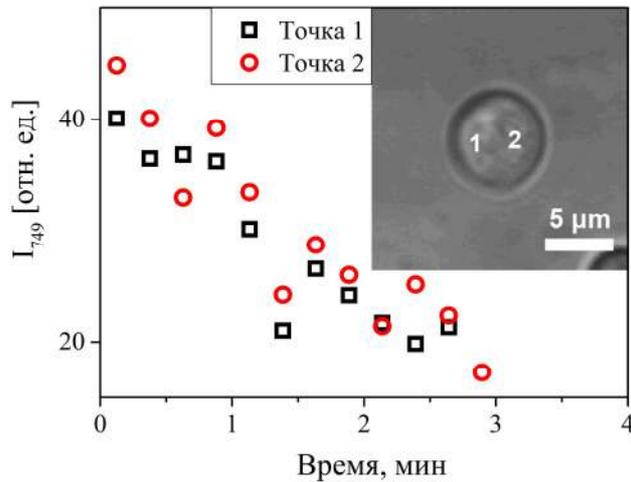


Рис. 29. Зависимость I_{749} от времени экспозиции для двух точек одной клетки. На вставке показана микрофотография клетки цифрами отмечены места

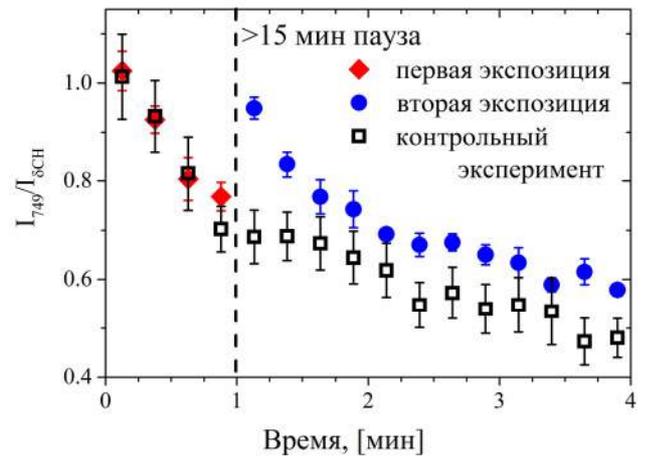


Рис. 30. Зависимость отношения I_{749}/I_{800} от времени прерванная 15 минутной задержкой. Красные ромбы соответствуют экспозиции до перерыва, синие круги - после. Пустые квадраты получены в контрольном эксперименте.

наблюдаемый эффект восстановления вклада цитохромов не связан с эффектом локального выцветания линий цитохромов и дрейфом области фокусировки, был проведен дополнительный эксперимент. В нём время “отдыха” было минимально (меньше минуты). За это время проводилась дефокусировка излучения по всем трем координатам, а затем излучение заново фокусировалось в ту же самую точку клетки. Результаты тестовых измерений также представлены на рисунке 30. Следует также отметить, что восстановление линий цитохрома зависит от экспозиции. При экспозициях, в результате которых интенсивность вклада цитохромов падает более чем на 30 %, эффект фотовыцветания становится необратимым.

4.2.3. Обсуждение

Последний эксперимент по восстановлению вклада от цитохромов указывает на то, что фотовыцветание линий РКРС вызвано переходом цитохромов в окисленное зарядовое состояние, а не их разрушением.

Квадратичная зависимость в формуле 4.7 для скорости фотовыцветания линий цитохромов от мощности указывает на двухфотонный процесс. Таким образом, механизм фотовыцветания оказывается отличным от процессов, которые обычно связывают с фототоксичностью. Можно выделить несколько сценариев, приводящих к квадратичной зависимости скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов от мощности. Первый вариант связан с поглощением излучения цитохромами. Он может быть реализован с помощью двухфотонного поглощения, либо с поглощением двух фотонов через промежуточное

состояние. Второй сценарий подразумевает, что под действием излучения в клетке образуются взаимодействующие с цитохромами интермедиаты, такие как реактивные формы кислорода (РФК) [74,78,80]. Считается, что РФК образуются в результате однофотонной фотореакции [80]. Поэтому реакция окисления цитохромов должна вовлекать две молекулы РФК. Промежуточным вариантом является реакция цитохрома, поглотившего фотон и находящегося в возбужденном состоянии с одной молекулы РФК. Результаты наших исследований не позволяют выбрать, какой из вышеперечисленных сценариев в данном случае наблюдается.

Другой интересной особенностью в зависимости скорости фотовыцветания от мощности является ненулевой константный вклад. Для интерпретации этого эффекта была предложена качественная модель, учитывающая участие цитохромов в естественных окислительно-восстановительных реакциях ЭТЦ. В клетке всегда протекают реакции, в результате которых происходит смена зарядового состояния цитохромов. Простейшим образом их можно учесть, введя реакцию



где C_{oxi} , C_{red} - концентрации цитохромов в окисленном и восстановленном зарядовых состояниях, соответственно, e^- - концентрация электронов, k_+ , k_- - константы скоростей прямой и обратной реакций. Для простоты будем считать, что концентрация электронов остается неизменной.

Под действием излучения в клетках возникают дополнительные процессы. Для определенности будем считать, что в результате фотореакции с участием одного фотона происходит образование РФК. Равновесная концентрация РФК пропорциональна интенсивности облучения. Рассмотрим вероятную реакцию окисления цитохрома с помощью РФК. Для того, чтобы этот процесс демонстрировал квадратичную зависимость от интенсивности излучения, реакция должна вовлекать две молекулы РФК



где $C_{PФК}$ - концентрация РФК, образовавшихся в результате фотореакций, а $k_{PФК}$ - константа скорости реакции фотоиндуцированного окисления цитохромов.

Предполагая общее количество цитохромов в клетке неизменным, из химических реакций (4.8) и (4.9) можно составить следующее кинетическое уравнение для концентраций цитохромов:

$$\frac{dC_{red}}{dt} = -\frac{dC_{oxi}}{dt} = k_+ C_{oxi} - k_- C_{red} - k_{PФК} \alpha I^2 C_{red} \quad (4.10)$$

Это выражение написано в предположении, что фотореакции, в которых образуются РФК,

протекают намного быстрее, чем реакция окисления цитохромов. В этом случае концентрация РФК в клетке быстро достигает своего равновесного значения, $C_{\text{РФК}} = \sqrt{\alpha I}$, где I – интенсивность излучения. Решением данного кинетического уравнения (4.10) является следующее выражение:

$$C_{\text{red}} = \frac{k_+ \cdot S}{k_+ + k_- + k_{\text{РФК}} \cdot \alpha I^2} + A(I) \cdot e^{-(k_+ + k_- + k_{\text{РФК}} \alpha I^2)t}, \quad (4.11)$$

где S – суммарная концентрация цитохромов, а $A(I)$ определяется начальными условиями. В случае, когда начальные условия соответствуют балансу между естественными окислительно-восстановительными реакциями из выражения (4.8),

$$A(I) = \frac{k_+ k_{\text{РФК}} \alpha I^2 S}{(k_+ + k_-)(k_+ + k_- + k_{\text{РФК}} \alpha I^2)}. \quad (4.12)$$

Полученное выражение (4.11) содержит зависимость от мощности для исследуемой скорости фотовыцветания τ^{-1} . Последняя оказывается связанной с параметром y_0 следующим образом:

$$\tau^{-1}(I) = k_+ + k_- + k_{\text{РФК}} \alpha I^2 = \frac{k_+ S}{y_0}. \quad (4.13)$$

Получившееся выражение для скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов согласуется с предложенным описанием (4.7). Также предложенная модель предсказывает увеличение значения параметра y_0 с понижением интенсивности излучения, которое подтверждается в эксперименте (см. рис. 28 (b)).

Для дальнейшего изложения необходимо отметить следующие моменты. Из предложенной качественной модели следует, что ненулевой константный член, возникающий в зависимости скорости фотовыцветания линий цитохромов от интенсивности облучения клеток, соответствует вкладу естественных окислительно-восстановительных реакций. Параметр y_0 характеризует баланс между окислительными и восстановительными реакциями цитохромов (включая фотоиндуцированные процессы). Таким образом, характеристики фотовыцветания цитохромов под действием излучения позволяют получать информацию о функционировании цитохромов в биологической клетке.

4.3. Температурная зависимость резонансного КРС цитохромов

Как было показано в предыдущем пункте, эффект фотовыцветания линий РКРС цитохромов может быть использован для характеристики скоростей окислительно-восстановительных реакций. В свою очередь реакции со сменой зарядовых состояний цитохромов *b* и *c* типа являются необходимым этапом транспорта электрона и могут быть использованы для характеристики активности ЭТЦ в замораживаемых клетках. Данный подход обладает определенными преимуществами по сравнению с общепринятыми методами (зондовыми [121, 122, 123], люминесцентными [119, 124] спектрофотометрическими [125, 122]). В первую очередь, метод на основе РКРС бесконтактен и может применяться в случае, когда клетки находятся в твердой матрице. Другим важным фактором, выгодно выделяющим РКРС цитохромов от разнообразных люминесцентных и спектрофотометрических подходов, являются отсутствие меток в препарате и возможность измерения интенсивности РКРС относительно реперного сигнала КРС от клеточной органики. Это позволяет учитывать эффекты, связанные с рассеянием света в неоднородном препарате.

4.3.1. Температурная зависимость кинетики фотоиндуцированного окисления цитохромов

На рисунке 31 показаны спектры КРС дрожжевых клеток (при комнатной температуре и в замороженном состоянии), измеренные на начальном этапе экспозиции и в конце, когда под действием излучения цитохромы переходят к новому окислительно-восстановительному балансу. При этом, как показано на рисунке 32, во всем диапазоне исследованных температур кинетика фотовыцветания линий РКРС цитохромов может быть описана выражением затухающей экспоненты (ур. 4.6). Таким образом, изменение РКРС цитохромов с температурой может быть описано с помощью тех же параметров (τ , A , y_0), что применялись при исследовании зависимости фотовыцветания РКРС от мощности излучения.

Зависимость параметров фотоиндуцированного окисления от температуры показана на рисунке 33. Для всех трёх параметров наблюдается особенность в температурной зависимости при -15 °С. Выше этой температуры исследуемые параметры практически не зависят от температуры, но зависят от способа подготовки препарата. При использовании вакуумного криостата клетки находятся в герметичной кювете, частично заполненной препаратом и воздухом (см. рис. 11 А). Начальная интенсивность линии на 749 см^{-1} , характеризующей количество цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии, находится на уровне 1.0 от

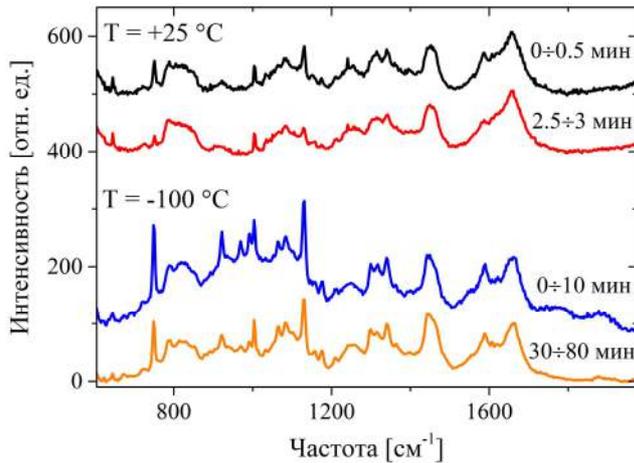


Рис. 31. Спектры КРС дрожжевых клеток при $T=+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $T=-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Спектры вертикально сдвинуты для наглядности. Спектры в порядке сверху вниз: дрожжевые клетки при $T=+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в начале экспозиции и после 2.5 минут облучения, замороженные клетки в начале экспозиции и после 30 минут облучения ($P=2.4\text{ мВт}$)

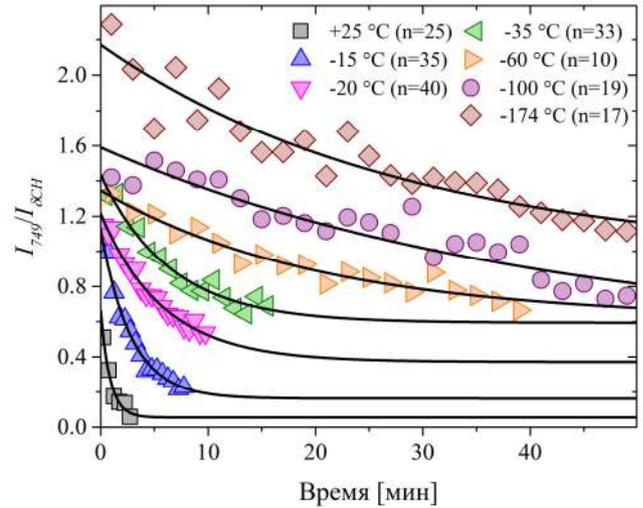


Рис. 32. Зависимость отношения интенсивностей I_{749}/I_{83n} от времени экспозиции при различных температурах. Для -100 и $-174\text{ }^{\circ}\text{C}$ не все данные показаны (полное время экспозиции составляло 80 минут). Для каждой температуры в скобках указано количество усредненных измерений.

интенсивности деформационной СН моды, а новый стационарный уровень под действием облучения (y_0) стремится к нулю. В экспериментах с криостатом фирмы Linkam, капля клеточной суспензии накрывается лепестком слюды и герметично заклеивается парафином. Препарат оказывается без контакта с воздухом. В этом случае начальное соотношение I_{749}/I_{83n} ($A+y_0$) соответствует 2.0, под действием облучения оно стремится к 0.4. В зависимости от способа подготовки препарата наблюдается различие в скорости фотовыцветания РКРС цитохрома. Для препарата с доступом к кислороду скорость фотоиндуцированного окисления цитохромов почти вдвое выше, чем для препарата без воздуха.

Ниже температуры образования льда для обоих типов образцов соотношение I_{749}/I_{83n} в начале экспозиции соответствует ~ 1.5 . Значение параметра y_0 в измерениях, проведенных для образца без воздуха, сохраняется на том же уровне (около 0.4). Образец с воздухом после образования льда демонстрирует резкое увеличение y_0 до 0.2 и постепенное увеличение с дальнейшим понижением температуры. Сходное температурное поведение наблюдалось для концентрации АТФ в *Psychrobacter cryohalolentis*, культивируемых при температурах ниже $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ [126]. Скорость фотоиндуцированного окисления цитохромов также начинает снижаться при температурах ниже $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, а при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ выходит на низкотемпературное плато. Эксперименты, выполненные с предварительным охлаждением препарата до $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (со скоростью $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и последующим отогревом до температур, при которых проводились

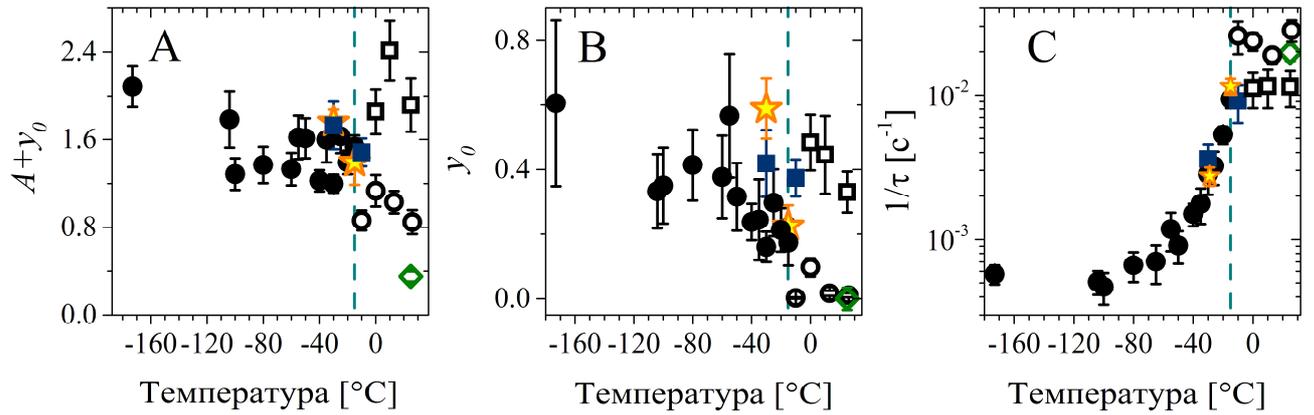


Рис. 33. Зависимости параметров фотовыцветания линий РКРС (см. ур. 4.6) от температуры. На графике А показана температурная зависимость суммы параметров $A+y_0$, соответствующей начальному уровню вклада РКРС, на графике В – температурная зависимость для y_0 , С – температурная зависимость τ^{-1} (логарифмическая шкала). Пустые и сплошные круги соответствуют образцам с доступом к кислороду до и после образования льда, соответственно. Пустые и сплошные квадраты соответствуют образцам без доступа к кислороду до и после образования льда, соответственно. Пустой зеленый ромб – измерение, проведенное в растворе с высокой концентрацией NaCl. Звездочки – данные, полученные после предварительного охлаждения образцов до $-100\text{ }^\circ\text{C}$. Вертикальная пунктирная линия отмечает температуру, при которой в экспериментах происходила спонтанная нуклеация льда. Мощность излучения во всех измерениях 2.4 мВт.

измерения, показали, что скорость фотоиндуцированного окисления, измеряемая при отогреве, имеет ту же температурную зависимость, что и при замораживании (Рис. 33С).

В проведенных экспериментах наблюдалась непосредственная связь между образованием

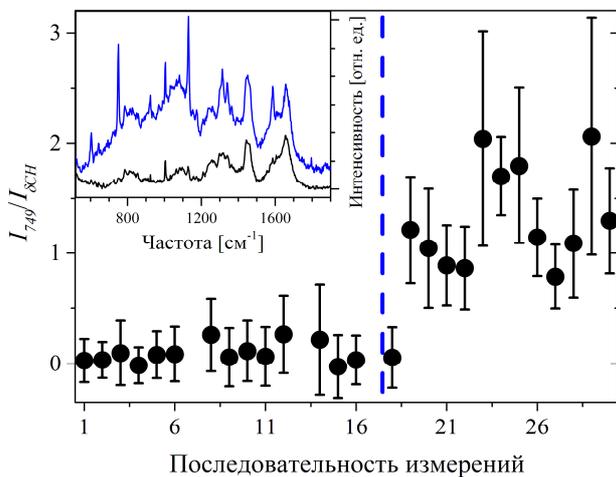


Рис. 34. Влияние образования льда на интенсивность РКРС цитохромов (здесь I_{749}/I_{800} усреднено по первым 4 минутам экспозиции). Вертикальная линия отображает момент, в который произошла спонтанная нуклеация льда. На вставке показаны спектры КРС клеток полученные до и после образования льда.

льда и интенсивностью вклада РКРС цитохромов. На рисунке 34 приведены результаты эксперимента с вакуумным криостатом при $T=-20\text{ }^\circ\text{C}$, в ходе которого произошла спонтанная нуклеация льда. При этом до образования льда усредненное по первым 4 минутам экспозиции соотношение I_{749}/I_{800} для первых 16 измерений от разных клеток соответствует 0.1. Через $5 \div 10$ минут после образования льда это соотношение возрастает до 1.3.

Как уже отмечалось, образование льда приводит к увеличению концентрации растворенных веществ вокруг клетки, а также, в результате процесса обезвоживания, внутри

клетки. Вполне логичной выглядит гипотеза о том, что корреляция между образованием льда и повышением интенсивности вклада РКРС цитохромов вызвана чувствительностью цитохромов к высоким концентрациям растворенных веществ. Чтобы проверить эту гипотезу, был проведен эксперимент при комнатной температуре с клетками в растворе с высокой концентрацией NaCl (25 wt. %, что соответствует концентрациям, возникающим в препарате после образования льда). Однако результаты показали, что увеличение концентрации NaCl приводит к обратному эффекту: снижению отношения I_{749}/I_{800} в начале экспозиции ($A+y_0$) до 0.4, а в конце экспозиции (y_0) до 0. Скорость фотоиндуцированного окисления цитохромов при этом осталась на прежнем уровне ($\tau^{-1} \sim 2 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$). Таким образом, можно утверждать, что смена зарядового состояния цитохромов при образовании льда не может быть простым следствием увеличения концентрации растворенных веществ.

Другой гипотезой, связывающей образование льда с увеличением концентрации цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии, является недостаток кислорода (аноксия). Как было показано в Главе 3, после образования льда дрожжевые клетки оказываются заключенными в небольшие жидкие включения раствора NaCl, объем которых сопоставим с объемом самих клеток. Весь доступный для клетки кислород растворен во включении, в котором она заключена. Из-за невысокой предельной растворимости кислорода в воде (14.6 мг/л при 0 °C) у клетки, заключенной в небольшом объеме, может возникнуть дефицит кислорода, необходимого для полноценной работы ЭТЦ. Отсутствие кислорода останавливает работу комплекса IV, что может привести к избытку переносчиков электронов ЭТЦ в восстановленном зарядовом состоянии [127,128].

Ранее аноксия уже рассматривалась как один из факторов, сохраняющих клетки при гипотермии и ведущих к анабиозу [129]. Тем не менее, с помощью кислородного голодания трудно объяснить особенность в температурном поведении скорости фотоиндуцированного окисления, наблюдаемую в препарате без доступа кислорода. Вероятно, наблюдаемые изменения являются результатом комбинации различных факторов, таких как обезвоживание и температурные изменения свойств мембран и белков клетки [34,130,131].

4.3.2. Влияние температуры на зависимость кинетики фотоиндуцированного окисления цитохромов от интенсивности облучения.

С целью разделить два процесса, скорость которых демонстрирует разную зависимость от интенсивности облучения, и выделить вклад, соответствующий естественным окислительно-восстановительным реакциям, была исследована зависимость кинетики фотоиндуцированного окисления цитохромов от интенсивности облучения при различных температурах. На рисунке

35 показана зависимость скорости фотоиндуцированного окисления от мощности излучения при различных температурах. Как показано на рисунке, зависимость от мощности излучения при $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ хорошо описывается ур. (4.7) внутри всего исследованного диапазона. Экспериментальные данные для остальных температур были также подогнаны с помощью ур. (4.7). Температурные зависимости независимого от интенсивности излучения вклада (k_{dark}) и коэффициента квадратичной зависимости (β) показаны на рисунке 36. С понижением температуры наблюдается постепенное снижение вклада k_{dark} до нуля. При этом плато, наблюдаемое для скорости фотоиндуцированного окисления при температурах ниже $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, вызвано вторым вкладом - $\beta \cdot P^2$, зависящим от интенсивности излучения. Соответственно, уровень плато определяется выбранной в эксперименте мощностью излучения и значением коэффициента β .

Коэффициент β также уменьшается с понижением температуры. Как уже отмечалось, существуют разные сценарии, приводящие к существованию в ур. (4.7) вклада с квадратичной зависимостью от интенсивности облучения. Среди них есть сценарий, предполагающий смену зарядового состояния цитохромов в результате двухфотонного поглощения и сценарий взаимодействия цитохрома с двумя молекулами РФК, образовавшихся в результате фотореакций. Конечное значение τ^{-1} при низких температурах указывает на то, что фотореакция

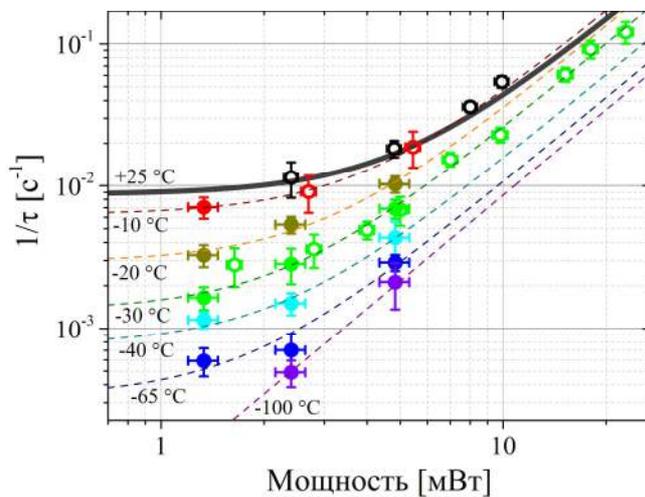


Рис. 35. Зависимость τ^{-1} от мощности излучения при различных температурах (в логарифмических координатах). Пустые и сплошные круги были получены от препарата без доступа и с доступом кислорода, соответственно. Линии — подгонки экспериментальных данных с помощью ур. 4.7.

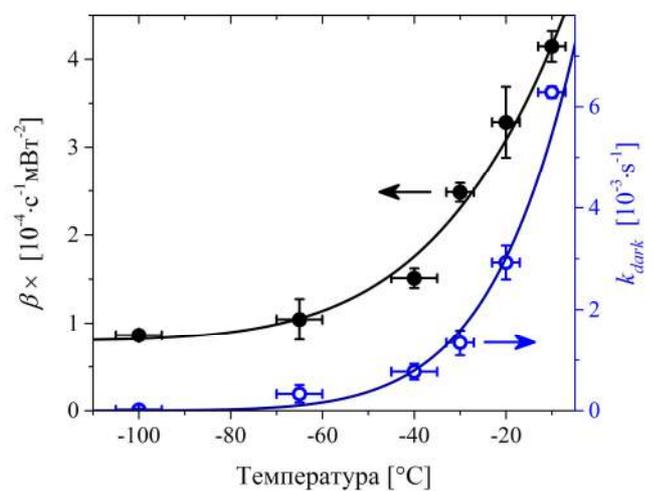


Рис. 36. Температурная зависимость вклада естественных реакций k_{dark} и коэффициента фотоиндуцированных реакций β (см. ур. 4.7). Линиями показаны подгонки k_{dark} термоактивационным законом и β суммой термоактивационного закона и константы.

перехода цитохромов в окисленное состояние достаточно локализована, чтобы протекать в полностью замороженном препарате. С другой стороны, $\beta(T)$ уменьшается в четыре раза на температурном интервале от -10 до -65 °С, что не характерно для процесса, связанного с двухфотонным поглощением. На основе полученных результатов можно утверждать, что существуют различные каналы реакции фотоиндуцированного окисления цитохромов. Первый канал в высокой степени локализован и слабо зависит от температуры, второй может быть описан термоактивационным законом

$$\beta(T) = \beta_0 + q_0 \cdot e^{-U/T}, \quad (4.14)$$

где β_0 соответствует независящему от температуры вкладу, равному $8(\pm 0.5) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1} \text{ мВт}^{-2}$, q_0 - предэкспоненциальный фактор с энергией барьера $U = 14.6 (\pm 15 \%)$ кДж/моль. На рисунке 37 показана температурная зависимость $\beta(T) - \beta_0$ в аррениусовском представлении. Энергия барьера соответствует энергии, необходимой для реакции восстановления молекулярного кислорода до супероксида (при pH = 7).

Температурное поведение $k_{dark}(T)$ в аррениусовском представлении показано на рисунке 38. Оно также может быть успешно описано термоактивационным законом с энергией барьера $32.5 (\pm 8 \%)$ кДж/моль. Как показано на рисунке 39, экспериментальные температурные зависимости τ^{-1} могут быть описаны суммой термоактивационного закона, не зависящего от интенсивности облучения, а также вклада, квадратично зависящего от интенсивности излучения с температурной зависимостью, определяемой ур. 4.14.

Возможность описать $k_{dark}(T)$ термоактивационным законом подразумевает, что ниже -15 °С ЭТЦ дрожжевой клетки замерзает без каких-либо промежуточных изменений, которые

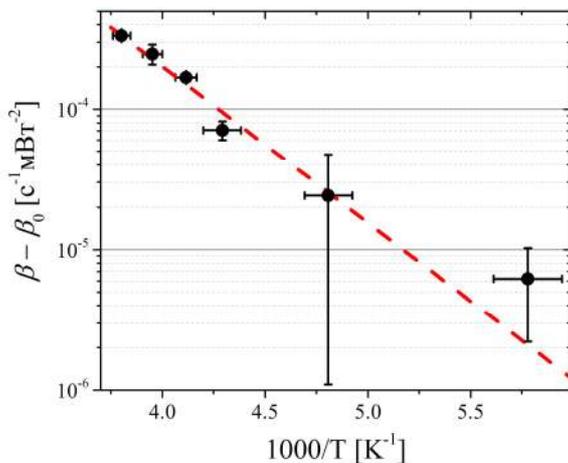


Рис. 37. Зависимость $\beta(T) - \beta_0$ в аррениусовском представлении. Линия – подгонка данных термоактивационным законом.

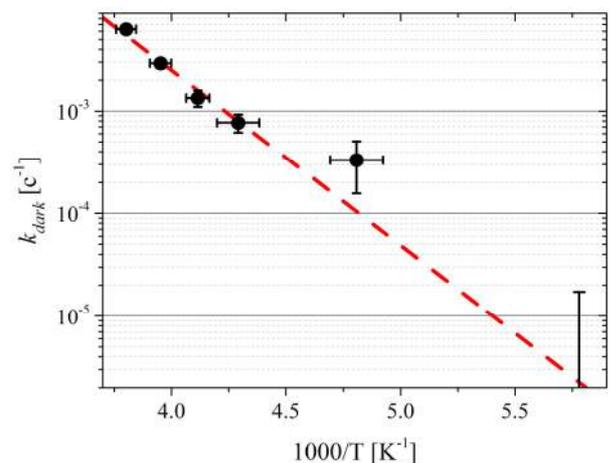


Рис. 38. Зависимость $k_{dark}(T)$ в аррениусовском представлении. Линия – подгонка данных термоактивационным законом.

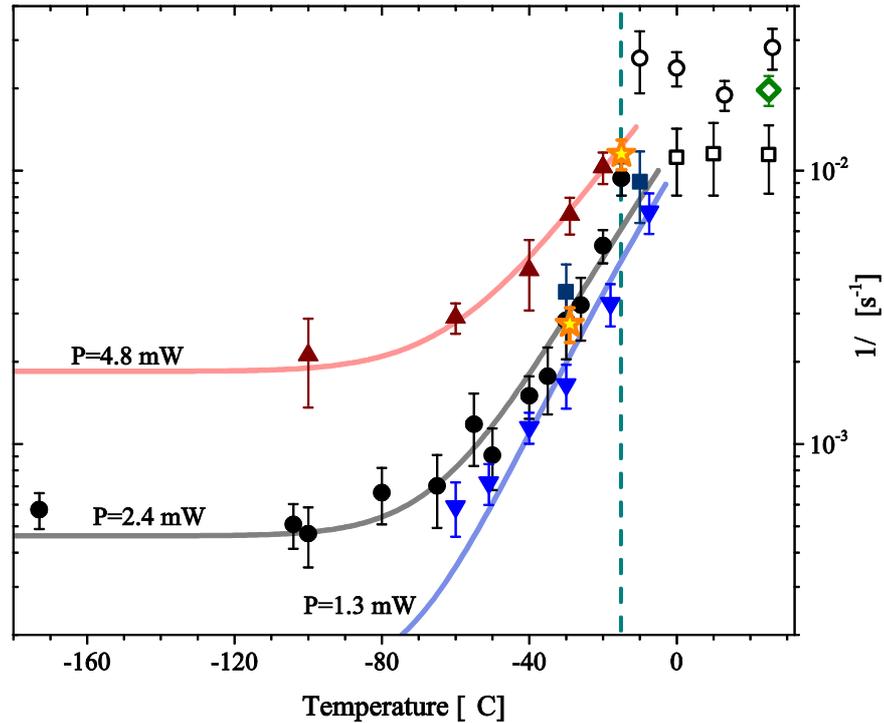


Рис. 39. Температурная зависимость τ^{-1} при различных мощностях излучения. Пустые круги соответствуют азрированным образцам до образования льда. Сплошные треугольники и сплошные круги соответствуют различным мощностям излучения для азрированного препарата после образования льда. Пустые и сплошные квадраты соответствуют образцам без доступа к кислороду до и после образования льда, соответственно. Пустой зеленый ромб – измерение, проведенное в растворе с высокой концентрацией NaCl. Звездочки – данные, полученные после предварительного охлаждения образцов до $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Вертикальная пунктирная линия отмечает температуру, при которой в экспериментах происходила спонтанная нуклеация льда. Сплошные линии соответствуют сумме двух термоактивационных законов (см. рис. 37 и 38) и независящего от температуры.

можно было бы ожидать при температурных изменениях в конформационных состояниях белков или в структурах мембран митохондрий. Энергия барьера соответствует энергии фосфатной связи в АТФ (известно, что соотношение концентраций АДФ/АТФ является одним из факторов, регулирующих работу ЭТЦ). Также энергия барьера (32.5 кДж/моль соответствует разности окислительно-восстановительных потенциалов в 330 мВ) сопоставима с разностью окислительно-восстановительного потенциала различных участков ЭТЦ. Например, похожая разность потенциалов установлена между Комплексами I и III и между Комплексами III и IV ЭТЦ [112, 132]. Конкретные значения потенциалов в ЭТЦ могут значительно варьироваться в зависимости от условий. При замораживании происходят сильные изменения в клеточном окружении, а сама клетка обезвоживается. Трудно ожидать сохранения значений окислительно-восстановительных потенциалов, которые зависят, в частности, от рН, а также баланса между зарядовыми состояниями носителей электронов и активности клеточного метаболизма [112]. Поэтому из проведенного сравнения можно сделать вывод о том, что полученное значение

энергии активации вполне соответствует имеющимся представлениям. Однако имеющиеся данные не позволяют задать однозначное соответствие между энергией активации и конкретными этапами ЭТЦ.

Полученная температурная зависимость $k_{dark}(T)$ проливает свет на замедление метаболизма при замораживании клеток. Если экстраполировать описание $k_{dark}(T)$ термоактивационным законом в область низких температур, то скорость окислительно-восстановительных реакций с участием цитохромов окажется в $10^{15(\pm 2,2)}$ раз медленнее, чем при комнатной температуре. Как уже обсуждалось, эти реакции выполняют важную роль в работе ЭТЦ и влияют на клеточную активность в целом. Исходя из проведенного исследования активности цитохромов, можно ожидать, что клетки могут сохраняться при температуре кипения жидкого азота в течение по крайней мере нескольких десятков миллионов лет. Аналогичные оценки были сделаны при анализе данных об активности арктических бактерий, поддерживающих свой метаболизм при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ [133]. Термоактивационный закон подразумевает достаточно резкое замедление скоростей реакций цитохромов. Например, при комнатной температуре характерное время реакций соответствует 1 минуте, при $-40\text{ }^\circ\text{C}$ это время уже 20 минут, при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ оно соответствует десяти часам, а при $-150\text{ }^\circ\text{C}$ – тысяче лет.

С практической точки зрения полученная температурная зависимость $k_{dark}(T)$ отражает замедление биологического отклика клетки на условия, возникающие в ходе криоконсервации, с понижением температуры. Предложенный экспериментальный подход позволяет исследовать зависимость фотоиндуцированного окисления цитохромов и $k_{dark}(T)$ в широком диапазоне температур для различных биологических объектов и условий протокола криоконсервации (режима замораживания, типа криопротектора и т.д.).

Глава 5. Применение разработанных подходов для решения практических задач

Созданная экспериментальная установка, а также подходы, разработанные для исследования замораживаемых клеток методом КРС на примере дрожжей, были применены для решения практических задач. Настоящая глава разделена на два раздела. Первый раздел посвящен исследованию замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши методом КРС. Во второй главе демонстрируется основанный на спектроскопии КРС подход к определению количества ДНК в ядрах клеток крови.

5.1 Применение спектроскопии КРС для исследования замораживаемых эмбрионов

Преимплантационные эмбрионы являются весьма актуальными биообъектам с точки зрения криоконсервации. В настоящее время уже существуют эмпирически подобранные протоколы для замораживания преимплантационных эмбрионов мышей, однако понимание процессов, которые протекают при замораживании эмбрионов, остается ограниченным. В этом пункте демонстрируются возможности спектроскопии КРС применительно к задаче исследования замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши.

5.1.1. Подготовка препарата

Эмбрионы мыши были подготовлены для эксперимента сотрудниками Сектора криоконсервации и репродуктивной технологии ИЦиГ СО РАН. Для транспортировки эмбрионы помещались в оттаянные на концах специализированные пластиковые криосоломины (см. рис. 40), применяемые обычно для программного замораживания. Длина стандартной соломины 13 см, внешний диаметром 2 мм и толщина стенки ~0.1 мм. В исследовании

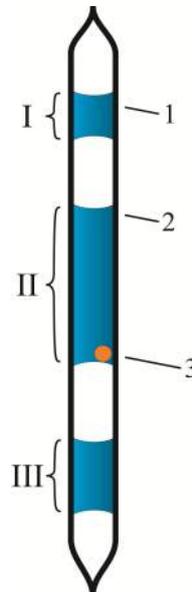


Рис. 40. Препарат в криосоломине. Соломина заполнена тремя столбцами (I, II, III) жидкости, разделенными воздушными зазорами. Замораживаемый препарат располагается во II столбце длиной ~5 см. Цифрами 1 и 2 обозначены точки касания соломины холодным предметом для нуклеации льда. При вертикальной ориентации соломины эмбрион (3) находится внизу столбца жидкости (II).

использовались преимплантационные эмбрионы на стадии дробления с 2...8 бластомерами.

5.1.1.1. Стандартный протокол медленного программного замораживания

В секторе криоконсервации и репродуктивной технологии ИЦиГ СО РАН для криоконсервации эмбрионов мышей используется программный протокол медленного замораживания [2, 134, 43]. Программа заморозки показана на рисунке 41. На предварительном этапе эмбрионы помещаются в питательную среду EMCARE Holding Solution (ICPBio Reproduction) с криопротекторов (10 vol. %), после чего раствор с эмбрионами помещается в криосоломину (Cryo Bio System). Как правило, на одну соломину приходится около 10 эмбрионов. После заполнения криосоломина запаивается на концах. Затем она устанавливается в программный замораживатель в вертикальном положении. Вертикальная ориентация соломины позволяет расположить все эмбрионы на нижнем мениске столбца жидкости (см. рис. 40). Программный замораживатель CL 8800 (CryoLogic) предварительно охлаждает образец и выдерживает его при температуре 18 °С. Далее происходит охлаждение до -7 °С со скоростью охлаждения 1 °С/мин. По достижению этой температуры с помощью касания охлажденным металлическим пинцетом верхней части соломины проводится нуклеация льда в переохлажденном растворе. После образования льда происходит 10 минутное выдерживание при -7 °С, затем препарат охлаждается со скоростью 0.3 °С/мин до -35 °С. По достижению заданной температуры препарат в течение 10 минут выдерживается при фиксированной температуре, после чего проводится погружение криосоломины в жидкий азот. В конце программы криосоломина с замороженным препаратом перекладывается в криохранилище.

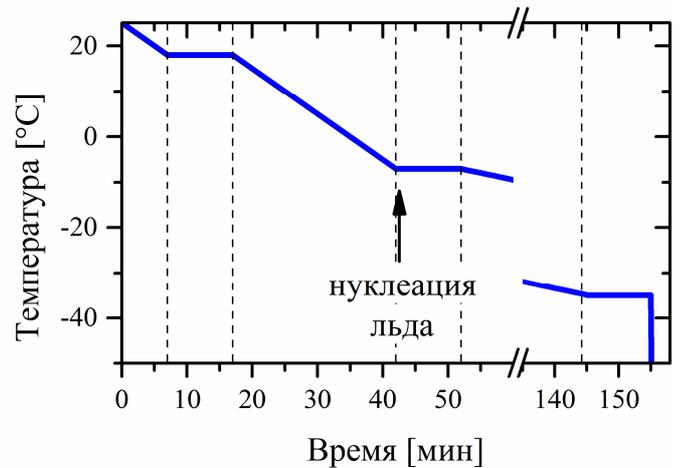


Рис. 41. Стандартная программа замораживания преимплантационных эмбрионов мыши, применяемая в Секторе криоконсервации и репродуктивных технологий ИЦиГ СО РАН.

5.1.1.2. Протоколы замораживания в эксперименте КРС

Для исследования изменений, происходящих в замораживаемом препарате, крайне желательно, чтобы условия заморозки были максимально приближены к стандартному протоколу. Однако проведение замораживания в полном соответствии со стандартным протоколом оказалось проблематичным, и в протокол заморозки пришлось внести ряд отклонений.

Для всех оптических методов серьезной проблемой является исследование препарата через стенку криосоломины, поскольку она обладает достаточно высокой кривизной и низким оптическим качеством поверхности. Кроме того, криосоломина слишком большая и для её заморозки требуется отдельный криостат специальной конфигурации. При этом заморозка происходит в вертикальном положении, благодаря чему эмбрионы располагаются в определенном участке соломины (см. рис. 40). В ходе исследования было решено проводить заморозку в более удобном с точки зрения эксперимента контейнере (см. рис. 11 С). Для этого было изготовлено предметное стекло, которое помещалось в азотный криостат FTIR 600 (Linkam), в центре стекла располагалась лунка для препарата глубиной 150 мкм (в центральной части). Во избежание высыхания препарата предметное стекло накрывалось сверху лепестком слюды (толщиной ~15 мкм) и запечатывалось парафином.

Другой проблемой оказалась интенсивная фотолюминесценция стандартного раствора (EMCARE Holding Solution). Поэтому данный раствор был заменен на раствор Дюльбекко (натрий-фосфатный буфер), который также используется в криоконсервации. Концентрация криопротектора варьировалась от стандартных 10 % до 60 %. Изначально эмбрионы помещались в раствор EMCARE Holding Solution, а затем переносили по трем каплям, постепенно повышая концентрацию натрий-фосфатного буфера с криопротектором (1/3, 2/3 и 3/3 доли).

Также определенные изменения были внесены в саму программу замораживания, которая показана на рисунке 42 А. При охлаждении/отогреве происходит температурное сжатие/расширение деталей криостата, что приводит к смещению образца относительно области фокусировки излучения. Поэтому измерения проводились во время выдерживания образца при заданной температуре. Время выдерживания было увеличено для удобства проведения измерений. Температура нуклеации льда варьировалась в диапазоне от -7 до -24 °С в зависимости от начальной концентрацией глицерина. Инициация льдообразования проводилась касанием образца охлажденной металлической проволокой, для чего на промежуток времени в несколько секунд у криостата убиралась верхняя крышка. Вместо погружения в жидкий азот препарат охлаждался с максимальной возможной для криостата скоростью (около 40 °С/мин) до -120 °С. Считается, что при данной температуре раствор уже полностью переходит в твердые фазы льда и стекла.

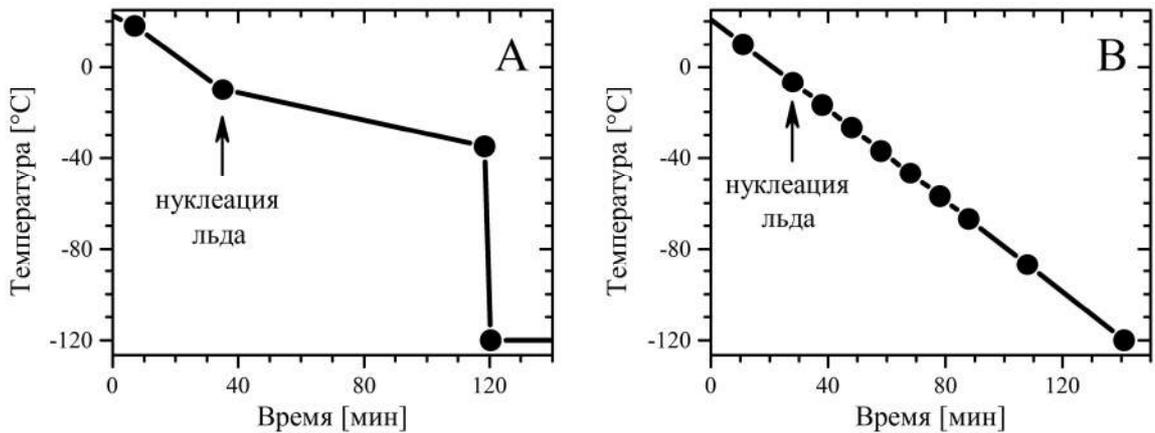


Рис. 42. Программы охлаждения, использовавшиеся при исследовании спектров КРС замораживаемых эмбрионов. Точками отмечены температуры, при которых проводились измерения. Время выдерживания образца на этих температурах варьировалось от 10 мин до полутора часов в зависимости от длительности измерений. Первая программа (А) приближена к стандартному протоколу замораживания. Вторая программа (В) использовалась для более детального исследования температурной зависимости спектров.

Помимо первой программы охлаждения, соответствующей стандартному протоколу, для более детального исследования зависимости спектров КРС от температуры проводились измерения по программе, показанной на рисунке 42 В. В этом случае концентрация нуклеация льда проводилась при -7°C , температура понижалась со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

На рисунке 43 показаны микрофотографии эмбриона мыши, сделанные на разных этапах

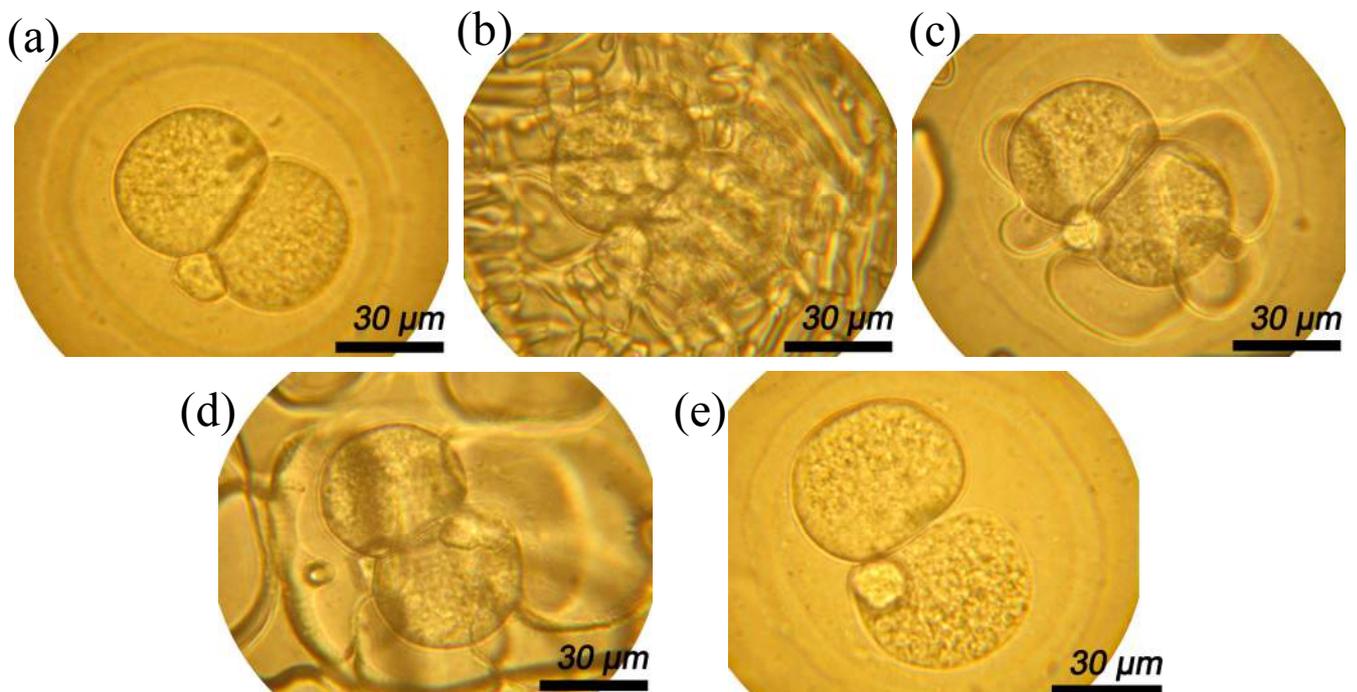


Рис. 43. Микрофотографии преимплантационного эмбриона мыши, полученные на разных стадиях программы замораживания. Первая строка: (а) - начальное состояние ($T = +18^{\circ}\text{C}$); (б) - фотография после образования льда ($T = -24^{\circ}\text{C}$); (с) - после рекристаллизации ($T = -24^{\circ}\text{C}$). Вторая строка: (д) - замороженный эмбрион ($T = -120^{\circ}\text{C}$); (е) - размороженный эмбрион ($T = +25^{\circ}\text{C}$).

первой программы замораживания, выполненной при начальной концентрации глицерина 58 %. Как видно из фотографий, в первый момент после нуклеации льда образуется большое количество кристалликов льда, которые в результате перекристаллизации укрупняются. Тестов на выживание эмбрионов после криоконсервации с использованием предложенных протоколов не проводилось. Тем не менее, можно отметить, что после размораживания большая часть бластомер сохраняет целостность.

5.1.2. Результаты

В эксперименте, моделирующем программное замораживание эмбрионов мыши, была определена концентрация криопротектора вблизи замораживаемых клеток, исследована температурная эволюция вклада цитохромов, а также был спектрально обнаружен переход липидов в более упорядоченное состояние.

5.1.2.1. Определение концентрации криопротектора в замораживаемом препарате

Было продемонстрировано, что метод КРС позволяет достаточно точно определять концентрацию криопротектора в водном растворе. На рисунке 44 А показан пример разложения спектров КРС раствора на спектры компонентов: воды и глицерина. В растворе наблюдается смещение линий глицерина на 5 см^{-1} , а также искажается контур, связанный с ОН колебаниями. Тем не менее, несмотря на эффекты взаимодействия глицерина и воды возможно достаточно эффективное разложение спектра на вклады.

В спектральный диапазон ОН колебаний вносят вклад как вода, так и глицерин. Также контур ОН полосы чувствителен к температуре. В свою очередь линии СН колебаний относятся только к глицерину и практически не зависят от температуры. Поэтому был предложен следующий подход оценки вкладов глицерина и воды. Сначала из спектра раствора вычитался вклад глицерина, интенсивность которого, $I(CH)_{\text{глицерин}}$, оценивалась по СН полосе (2883 см^{-1}). После этого вычислялась площадь под оставшимся ОН контуром, соответствующим вкладу воды – $A(OH)_{\text{вода}}$. Данный подход позволяет проводить количественное сопоставление вкладов двух компонент в обход детального исследования чувствительности контура ОН полосы к концентрации глицерина и температуре.

Для определения концентрации раствора была построена градуировочная прямая (см. рис. 44 В), задающая соответствие между молярной концентрацией и их вкладами в спектры КРС. С

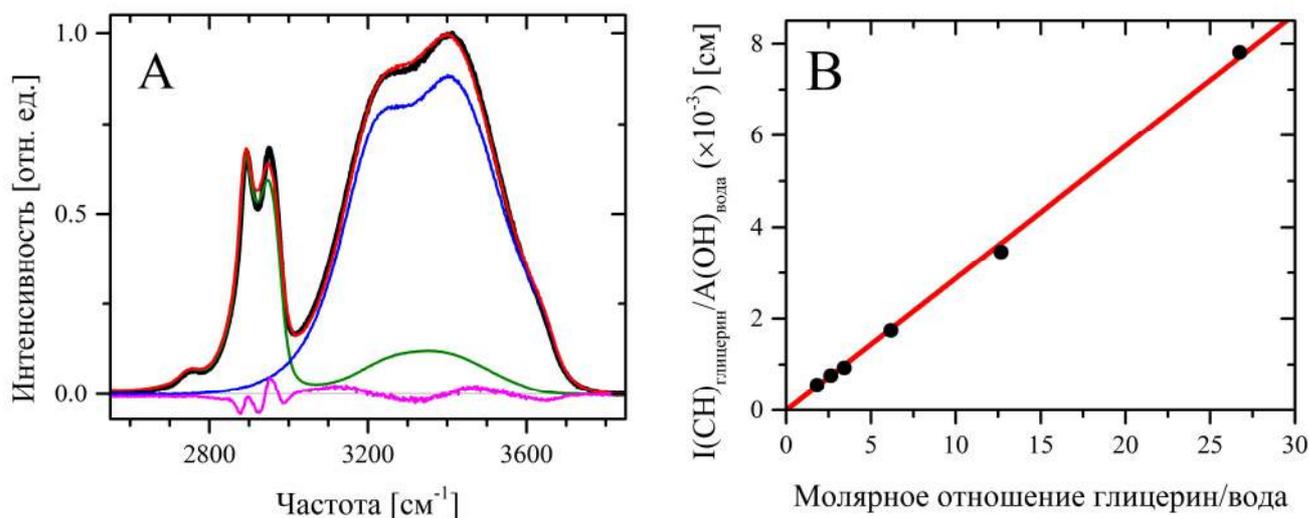


Рис. 44. Определение концентрации глицерина в водном растворе по спектрам КРС. А – пример спектра КРС раствора (черная линия), красная линия – сумма вкладов глицерина (зеленая линия) и воды (синяя линия). Пурпурная линия – разность спектров КРС раствора и линейной комбинации спектров глицерина и воды. В – зависимость соотношения интенсивности СН полосы глицерина к площади ОН полосы воды. Черные круги – экспериментальные точки, красная линия - подгонка прямой $y = 0.29 \cdot x$ ($R^2 = 0.999$).

помощью градуировки удалось измерить изменения в концентрации раствора криопротектора в ходе замораживания образца. С понижением температуры в замораживаемом препарате происходит увеличение доли льда, что приводит к росту концентрации криопротектора. На рисунке 45 показаны спектры КРС от окружения эмбрионов, измеренные на

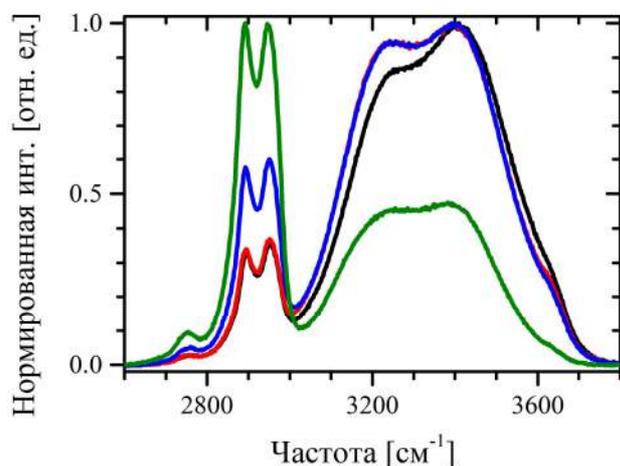


Рис. 45. Нормированные спектры КРС раствора глицерин/вода, полученные на разных стадиях замораживания: черная линия – спектр полученный при $+18^\circ\text{C}$ (10 %); красная линия – $T = -7^\circ\text{C}$ (10 %); синяя линия – $T = -7^\circ\text{C}$ после нуклеации льда (20 %); зеленая линия – $T = -35^\circ\text{C}$ (~110 %). В скобках указана концентрация, определенная по спектрам КРС.

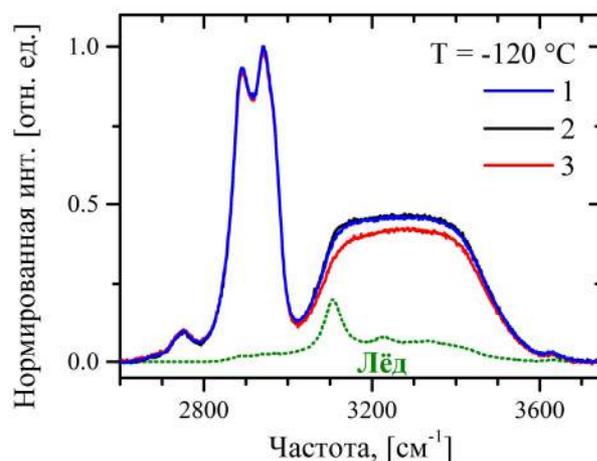


Рис. 46. Нормированные спектры КРС, полученные от различных областей (1, 2, 3) замороженного препарата при $T = -120^\circ\text{C}$. Интенсивность ОН полосы в спектре от области 3 несколько ниже чем для областей 2 и 3. Зеленой прерывистой линией показан спектр льда, который приведен для демонстрации того, что различие в интенсивностях ОН полосы не могут быть результатом вклада льда.

различных этапах замораживания. Полученные из спектрального анализа данные концентрации глицерина хорошо согласуются с фазовой диаграммой водного раствора глицерина [135,136].

Исследуя концентрацию глицерина в незакристаллизованном материале после этапа быстрого охлаждения до $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, было обнаружено, что локальная концентрация глицерина может варьироваться на уровне 10 %. На рисунке 46 показаны спектры, измеренные от различных локальных областей одного препарата. При этом какого-либо влияния замораживаемых клеток на концентрацию криопротектора в окружающем пространстве (на масштабах 10 мкм) обнаружено не было.

5.1.2.2. Вклад цитохромов в спектры КРС замораживаемых эмбрионов

В спектрах КРС эмбрионов присутствуют линии цитохромов, которые подробно обсуждались в Главе 4. На рисунке 47 показаны спектры КРС эмбрионов мыши, полученные при 10 минутной экспозиции на различных стадиях программы замораживания. В спектрах, измеренных до замораживания и после размораживания, линии, относящиеся к цитохромам (наиболее интенсивные $749, 1129, 1587\text{ см}^{-1}$), практически не различимы. При $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ интенсивность линий увеличивается, а после охлаждения препарата до $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ их интенсивность возрастает ещё в несколько раз.

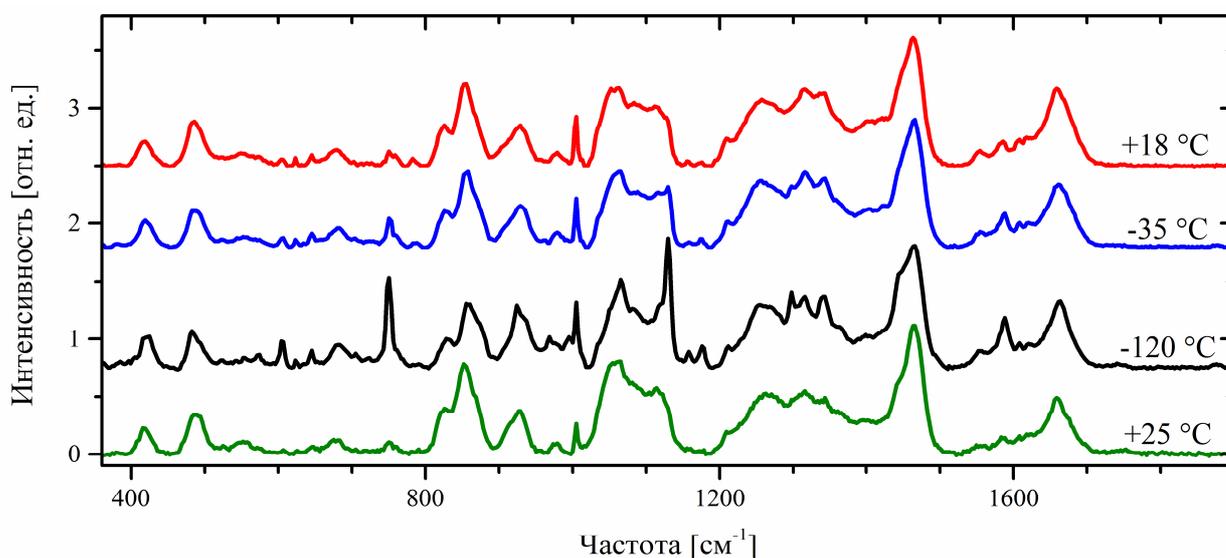


Рис. 47. Спектры КРС замораживаемого эмбриона, полученные на разных этапах первой программы замораживания. Спектры в порядке сверху вниз: начало заморозки ($T=+18\text{ }^{\circ}\text{C}$); в конце этапа медленного замораживания ($T=-35\text{ }^{\circ}\text{C}$); после быстрого охлаждения до низких температур ($T=-120\text{ }^{\circ}\text{C}$); после разморозки ($T=+25\text{ }^{\circ}\text{C}$). На представленных спектрах была выполнена коррекция фона с помощью ломаной кривой.

Как и в случае с дрожжевыми клетками для эмбрионов мыши наблюдается эффект фотоиндуцированного окисления цитохромов. В большинстве случаев кинетика фотовыцветания линий цитохромов в спектрах КРС эмбрионов хорошо описывается с

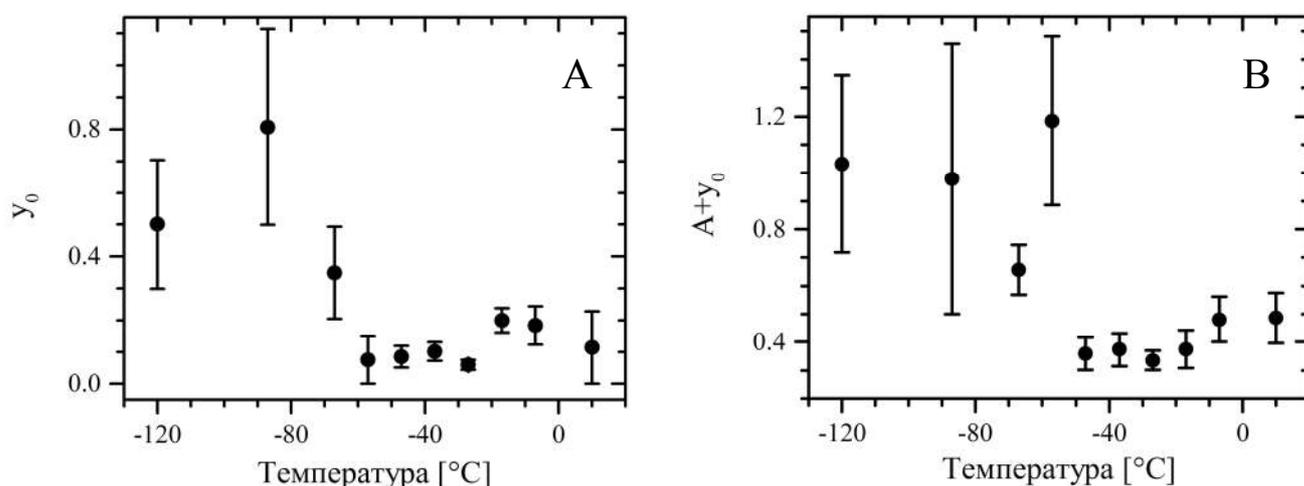


Рис. 48. Параметры фотовыцветания линий РКРС y_0 (A) и $A + y_0$ (B) в спектрах замораживаемых эмбрионов мыши в зависимости от температуры (см. ур. 4.6). Данные получены в эксперименте с использованием программы замораживания № 2.

помощью затухающей экспоненты (см. ур. 4.6). Также как и в случае дрожжевых клеток была построена температурная зависимость параметров $A + y_0$, y_0 , τ^{-1} для линии на 749 см^{-1} .

Как показано на рисунке 48, с понижением температуры наблюдается увеличение интенсивности $A + y_0$, y_0 . При этом для параметра y_0 наблюдается увеличение значения при температурах ниже -60 °C . Для начального уровня вклада цитохрома ($A + y_0$) также наблюдается резкое, по крайней мере, двукратное, увеличение в температурном интервале $T = -47 \div -57 \text{ °C}$.

На рисунке 49 представлена температурная зависимость скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов (τ^{-1}). С понижением температуры наблюдается постепенное замедление скорости фотовыцветания. В температурном диапазоне от -37 до -57 °C происходит десятикратное замедление скорости фотовыцветания. При температурах ниже -67 °C скорость процесса выходит на плато аналогичное тому, которое наблюдается для случая дрожжевых клеток (см. рис. 33 С и 39). По аналогии с дрожжевыми клетками можно предположить, что возникновение плато вызвано наличием канала фотоиндуцированного окисления цитохромов, который слабо зависит или вовсе не зависит от температуры.

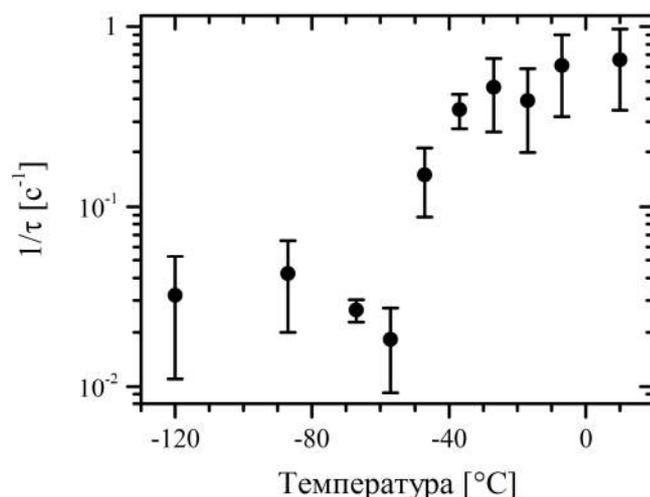


Рис. 49. Температурная зависимость параметра τ^{-1} (в логарифмической шкале). Данные получены в эксперименте с использованием второй программы замораживания.

В отличие от экспериментов с дрожжевыми клетками увеличение доли цитохромов в восстановленном (Fe^{2+}) зарядовом состоянии не связано с образованием льда, нуклеация которого инициировалась при $-7\text{ }^\circ\text{C}$. При замораживании раствора криопротектора количество льда, образующегося при нуклеации, значительно меньше, чем в случае физиологического раствора. Эмбрионы не оказываются захваченными во льду, как это происходит для случая дрожжевых клеток. Таким образом отсутствие корреляции между температурной зависимостью зарядового состояния цитохромов в замораживаемых эмбрионах и температурой нуклеации льда является косвенным подтверждением гипотезы о том, что лёд может ограничивать доступ кислорода и приводить к аноксии.

5.1.2.3. Исследование температурных изменений в упорядочении липидов эмбрионов по спектрам валентных СН колебаний

В спектрах КРС замораживаемых эмбрионов наблюдается увеличение интенсивности пика антисимметричных CH_2 колебаний на частоте 2880 см^{-1} (см рис. 50). Из исследований синтетических липидных бислоевых мембран методом КРС [137] известно, что увеличение интенсивности этой линии соответствует упорядочению ацильных хвостов липидов. Поэтому эта линия может использоваться в роли индикатора фазового перехода гель – флюид.

При проведении анализа предварительно из измеренных спектров был вычтен вклад глицерина. Интенсивность вклада оценивалась по интенсивности пика глицерина на 485 см^{-1} (см. рис. 47). Задача исследования интенсивности линий СН колебаний осложняется их взаимным перекрытием. Разложение на отдельные контуры не всегда корректно даже при исследовании синтетических мембран. В случае биологических мембран, обладающих сложным и слабо изученным составом, эта задача многократно усложняется. Поэтому для отслеживания изменений интенсивности линии на 2880 см^{-1} был выбран максимально простой способ линейной интерполяции фона, на котором располагается пик (см. рис. 51). Полученная интенсивность пика

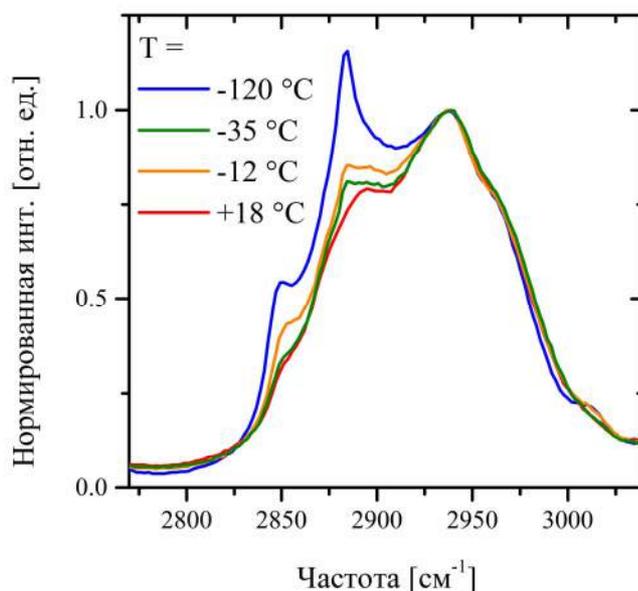


Рис. 50. Спектры замораживаемого преимплантационного эмбриона мыши в диапазоне валентных СН колебаний.

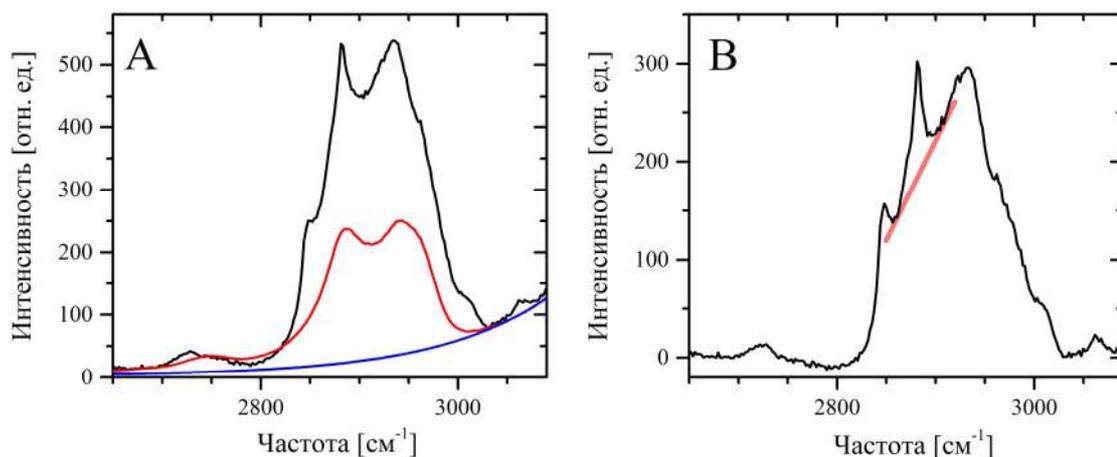


Рис. 51. Анализ спектра СН полосы эмбриона ($T = -87\text{ }^{\circ}\text{C}$). А: пример коррекции спектра эмбриона в диапазоне СН колебаний на вклады от глицерина (красная линия) и интерполяция крыла ОН колебаний экспонентой (синяя линия). В: способ проведения интерполяции подставки под линией на 2880 см^{-1} .

нормировалась на линию симметричных CH_2 колебаний на 2850 см^{-1} . Этот подход дает заведомо заниженную интенсивность линии, но при этом позволяет отслеживать относительные её изменения.

В результате анализа была построена температурная зависимость отношения интенсивностей линий CH_2 мод I_{2880}/I_{2850} (см. рис. 52). 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 гелее состояние.

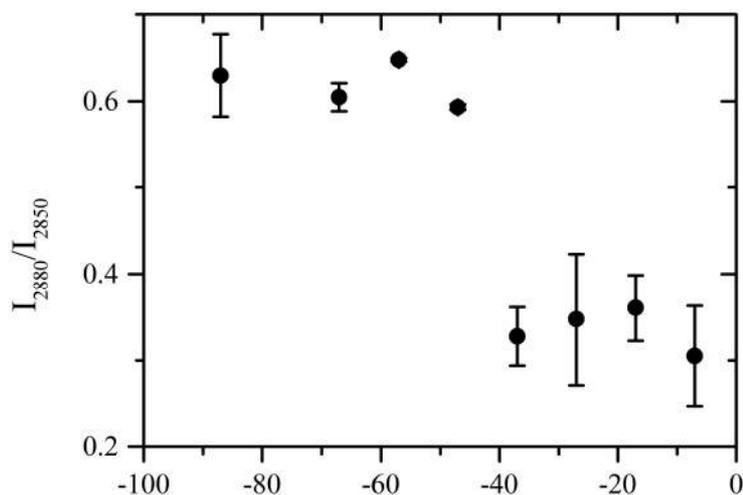


Рис. 52. Температурная зависимость отношения интенсивностей линий CH_2 колебаний на частотах 2880 и 2850 см^{-1} .

5.1.3. Обсуждение

Метод КРС был впервые применен для исследования замораживаемых преимплантационных эмбрионов. Продемонстрированы возможности спектроскопии КРС для исследования препаратов, замораживаемых по медленному программному протоколу.

Предложен подход по измерению концентрации глицерина в растворе по линиям валентных СН, ОН колебаний. В случае перекрытия СН полосы глицерина с вкладом клетки удобнее использовать линии глицерина на 484 или 418 см^{-1} , которые обычно не перекрываются со спектром клеток.

Подобно результатам, полученным для случая дрожжевых клеток, в спектрах КРС эмбрионов наблюдается возрастание интенсивности линий РКРС цитохромов, что указывает на увеличение доли цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии. Однако в отличие от дрожжевых клеток в случае эмбрионов возрастание вклада цитохромов происходит при значительно меньших температурах, ниже $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этих температурах характерная скорость фотоиндуцированного окисления цитохромов (τ^{-1}) оказывается в 10 раз ниже, чем при $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$. К сожалению, в экспериментах с эмбрионами трудно набрать достаточную статистику измерений, чтобы провести детальное сравнение температурных зависимостей фотоиндуцированного окисления эмбрионов и дрожжевых клеток.

В целом можно утверждать, что в спектрах КРС эмбрионов не наблюдается каких-то существенных изменений вплоть до $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем в интервале температур между -37 до $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ наблюдаются изменения состояния липидных структур (мембран, жировых капель). В том же температурном интервале начинается замедление реакций фотоиндуцированного окисления цитохромов. С дальнейшим охлаждением ниже $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ происходит увеличение доли цитохромов в восстановленном зарядовом состоянии.

Сопоставляя полученные результаты со стандартным протоколом программного замораживания, можно заметить, что наблюдаемые изменения происходят при температурах, соответствующих этапу быстрого охлаждения (погружения криосоломины в жидкий азот). Исследуемый стандартный протокол замораживания оказался эмпирически подобран таким образом, чтобы радикальные низкотемпературные изменения, такие как фазовый переход липидных структур в эмбрионах и нарушение работы переносчиков электронов в ЭТЦ, происходили в клетке максимально быстро. С другой стороны, полученные результаты указывают на то, что на более ранних стадиях замораживания дыхательная ЭТЦ остается ненарушенной.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью спектроскопии КРС можно получать новую информацию об изменениях, происходящих в ходе замораживания

эмбрионов. Однако текущая стадия исследования не дает исчерпывающей информации о наблюдаемых явлениях. Так остается непроверенной связь между изменением состояния липидов и замедлением реакции фотоиндуцированного окисления. Считается, что состав мембран различных органелл клеток, а также жировых капель, сильно различается по составу, от которого зависит температура фазового перехода гель-флюид. В настоящее время структуры в клетках эмбриона, демонстрирующие переход в гель состояние, остаются не идентифицированными. Более детальное исследование зависимости скорости фотоиндуцированного окисления от температуры и интенсивности излучения позволит получить информацию о темновых реакциях.

5.2. Измерение количества ДНК в ядрах клеток

Измерение количества ДНК является мощным инструментом для геномного анализа и медицинских 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.

Разработанный экспериментальный стенд и приобретенный опыт проведения экспериментов КРС от биологических объектов позволили измерить количества ДНК в ядрах клеток с помощью спектроскопии КРС. В результате было экспериментально показано, что метод КРС позволяет измерять количество ДНК с 10% точностью.

5.2.1. Эксперимент

5.2.1.1. Препарат

В качестве образца выделенной ДНК использовался мазок препарата Пананген (<http://www.panagen-bbs.ru>). Образцы в виде мазков крови человека (*Homo sapiens*), домашней курицы (*Gallus domesticus*), иглистого тритона (*Pleurodeles waltl*), а также рыбки данио (*Danio rerio*) были предоставлены для эксперимента сотрудниками лаборатории генетики клеточного цикла ИМКБ СО РАН. Мазки наносились на алюминиевое зеркало, напыленное на стандартное предметное стекло. Для того чтобы убрать вещества, мешающие спектральному анализу (такие как гемоглобин, АТФ, РНК), препараты фиксировались. Фиксация проводилась путем замачивания образцов в растворе этанол/уксусная кислота (3:1). Затем образцы погружались в 96 % этанол (два погружения по 20 минут, после выдерживания в спирте препарат высушивался на воздухе). Количество ДНК для человека и тритона взято из [138], для домашней курицы из работы [139], для рыбки данио из [140].

5.2.1.2. Освещение ядер, коррекция неоднородности освещения

Для измерения количества ДНК в ядрах необходимо освещать ядро целиком, а также собирать излучение, рассеянное от всех его частей. Для этого необходимо было модифицировать оптическую схему таким образом, чтобы плоскость фокусировки возбуждающего излучения была смещена относительно плоскости, от которой собирается рассеянный свет (см. рис. 53). Для этого в оптической схеме (см. рис. 4) была смещена вдоль оптической оси линза (5). Поскольку в этой задаче необходимо собирать излучение рассеянное

от ядер целиком, из оптической схемы были убраны линзы (15, 21 на рис. 4), конфокальная диафрагма (19 на рис. 4), а также цилиндрическая линза (24 на рис. 4).

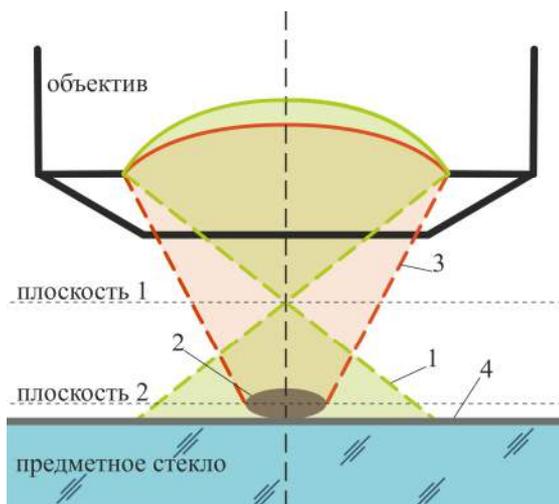


Рис. 53. Схема освещения ядра в эксперименте. 1 - возбуждающее излучение; 2 - ядро; 3 - рассеянное излучение, собираемое обратно в объектив; 4 - напыленное алюминиевое зеркало; плоскость 1 - плоскость фокусировки возбуждающего излучения; плоскость 2 - фокальная плоскость оптической схемы, собирающей рассеянное излучение.

В новой модификации оптическая схема формирует пятно диаметром ~ 13 мкм и обладает низким пространственным разрешением. Напыленное алюминиевое зеркало не позволяет возбуждающему излучению проникать в предметное стекло и, тем самым, минимизирует сторонний вклад в измеряемых спектрах. На рисунке 54 показаны микрофотографии различных клеток крови, в которых измерялся состав ДНК, а также отмечена освещаемая область препарата.

В ходе эксперимента было проведено несколько сессий измерений спектров от отдельных ядер. В каждой сессии измерялись спектры КРС ядер клеток крови, а также спектры от ядер эритроцитов *Danio rerio* в качестве эталона. Функция пропускания стенда проверялась несколько раз за период экспериментальной сессии, путем измерения интенсивности спектра кремниевой пластинки. Стабильность функции пропускания стенда для каждой отдельной сессии была не хуже 2%. От каждого ядра измерялось по 5 спектров, которые затем были

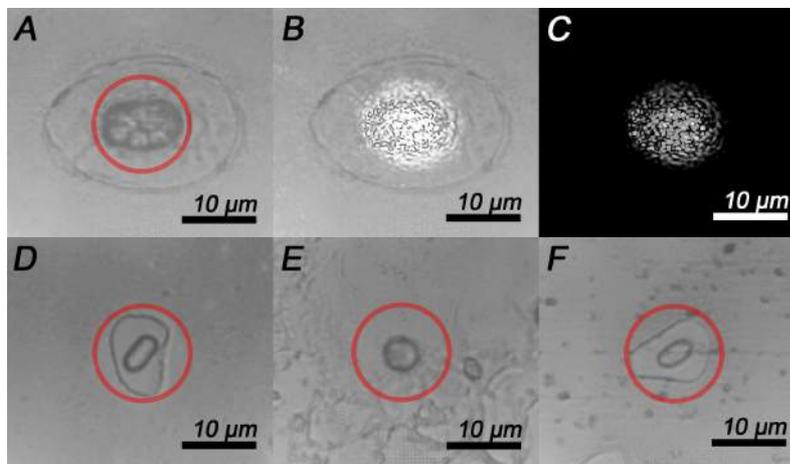


Рис 54. Микрофотографии разных типов ядер, полученные в отраженном свете. А: фото ядра эритроцита *Pleurodeles waltl*; В: фото фокусировки излучения на ядро; С: фотография сфокусированного на ядро пятна; D: фото ядра эритроцита *Danio rerio*, E: фото ядра лимфоцита *Homo sapiens*, F: фото эритроцита *Gallus domesticus*. Круги обозначают края облучаемой области.

усреднены. Время измерения одного спектра от ядер эритроцитов *Danio rerio* и лимфоцитов *Homo sapiens* составило 60 секунд, от ядер эритроцитов *Gallus domesticus* - 120 секунд и для эритроцитов *Pleurodeles waltl* - 30 секунд. В дальнейшем спектры нормировались по времени экспозиции.

Важно отметить радиальную неоднородность формируемого пятна лазерного луча, что приводит к зависимости интенсивности спектров КРС от ядер разного размера и формы. Поэтому для количественного измерения учитывался профиль пятна. На формирование профиля влияет несколько факторов. В первую очередь необходимо учесть гауссово распределение интенсивности в лазерном пучке. Другой важный фактор заключается в том, что идеальный апланатический объектив создает из плоского волнового фронта с амплитудой A_0 сферический фронт, амплитуда которого зависит от угла θ как $A_0 \cdot \sqrt{\cos(\theta)}$ [94]. Интенсивность сферического волнового фронта будет пропорциональна $\cos(\theta)$. Кроме того, интенсивность сферического волнового фронта падает с увеличением расстояния от точки фокусировки как $1/r^2$. Этот эффект дает дополнительный множитель, пропорциональный $\cos^2(\theta)$. Результирующее выражение для профиля пятна выглядит следующим образом:

$$I(\rho) \sim \exp\left\{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right\} \cdot \cos^3(\theta) = \exp\left\{-\frac{\rho^2}{2\sigma^2}\right\} \cdot \frac{H^3}{(\rho^2 + H^2)^{3/2}}, \quad (5.1)$$

где H соответствует величине отстройке фокальной плоскости прибора от плоскости фокусировки возбуждающего излучения, σ – ширина гауссового профиля, а ρ – расстояние до оптической оси. В полученном выражении присутствует два параметра - H и σ . Значение H было получено из диаметра пятна (13 мкм) и числовой апертуры объектива (0.75) и составило 6.5 μm .

При различных размерах входной щели, в спектрометр проникают различные части изображения лазерного пятна (рис. 55). Поэтому измерение интенсивности сигнала КРС при различных ширинах входной щели спектрометра позволяет получать информацию о распределении интенсивности излучения в пятне. Для уточнения значения параметра σ была построена экспериментальная зависимость интенсивности сигнала КРС плоской пластинки кристаллического кремния от размера входной щели спектрометра (рис. 56). Параметр σ был определен из подгонки экспериментальных данных предсказанной зависимостью сигнала от входной щели для предложенного в ур. 5.1. профиля.

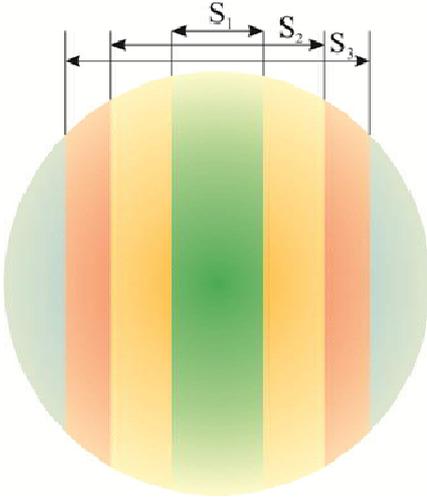


Рис. 55. Иллюстрация изображения лазерного пятна. Цветом выделены различные области пятна, проходящие через входную щель спектрометра. При ширине щели S_1 в спектрометр попадает только та часть пятна, которая помечена зеленым цветом. При ширине S_2 – попадает желтая и зеленые части. При S_3 – красная, желтая и зеленая части пятна.

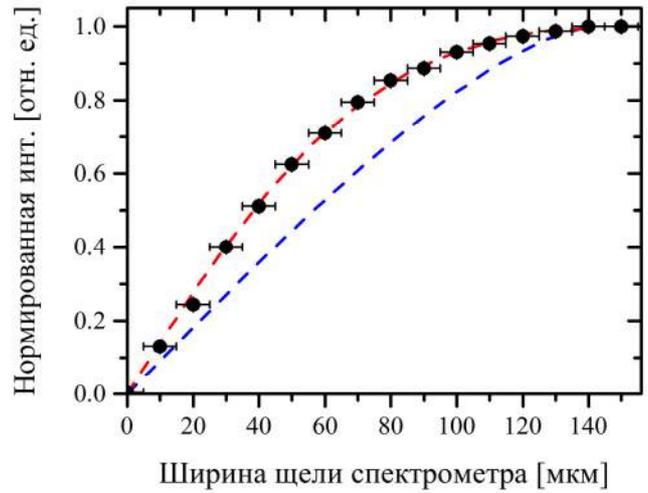


Рис. 56. Зависимость интенсивности КРС кремниевой пластинки от ширины входной щели спектрометра. Черные круги – экспериментальные данные; Синяя пунктирная линия – предсказание для однородного пятна; красная пунктирная линия – предсказание предложенной модели пятна с параметрами $H=6.5$ и $\sigma=3.6$ (ур. 5.1).

Наилучшее согласие предложенной модели с экспериментальными данными наблюдается при $\sigma=3.6 \mu\text{m}$. Окончательный профиль лазерного пятна с $H=6.5$ и $\sigma=3.6$ показан на рисунке 57.

Построенная модель пятна использовалась при коррекции интенсивностей КРС сигнала от разных типов ядер. Для коррекции измеряемых вкладов необходимо учитывать форму и размер измеряемого типа ядер, а также взаимное расположение ядер и фокусируемого лазерного пятна.

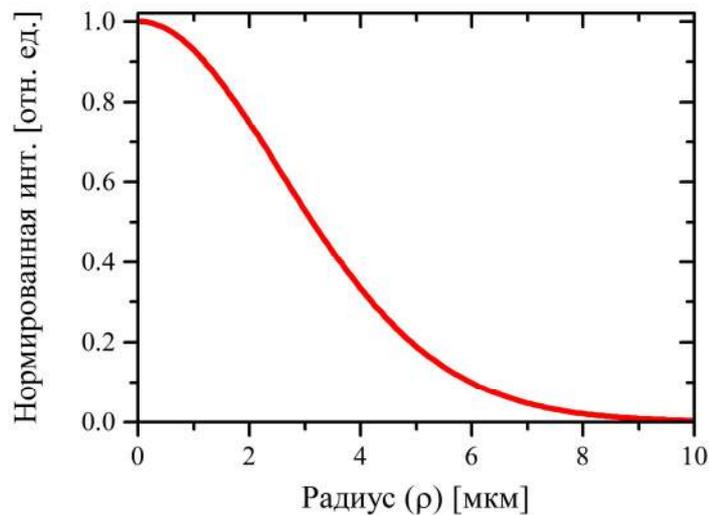


Рис. 57. Профиль лазерного пятна смоделированный с параметрами $H=6.5$ и $\sigma=3.6$.

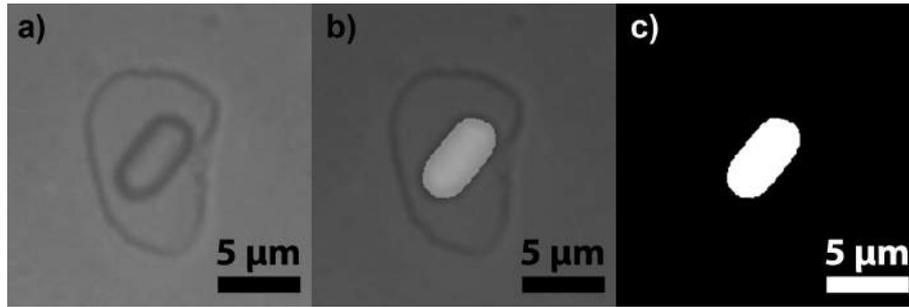


Рис. 58. Пример маски, построенной для ядра *Danio rerio*: а) фотография ядра; б) совмещение фотографии и построенной по ней маски с) маска.

По этой причине фокусировка на ядра всегда проводилась таким образом, чтобы центр ядра совпадал с центром лазерного пятна. На основе фотографий были построены маски различных ядер, позволяющие учитывать их форму и размер. На рисунке 58 показан пример построения маски для ядра *Danio rerio*.

Согласно данным полученным с помощью окрашивания, ДНК равномерно распределено по ядру. Пикселям, соответствующим ядру, было присвоено весовое значение - 1, а оставшимся - 0. Затем приготовленные маски умножались на модельный профиль лазерного пятна. Интенсивность КРС пропорциональна интенсивности излучения, поэтому результат произведения характеризует интенсивность КРС ДНК от различных областей ядер. Перед перемножением маски и профиль располагались таким образом, чтобы интеграл от результата их произведения был максимален. Эквивалентный критерий расположения ядра в центре лазерного пятна был использован в эксперименте. Построенные карты распределения интенсивности КРС от ядер показаны на рисунке 59.

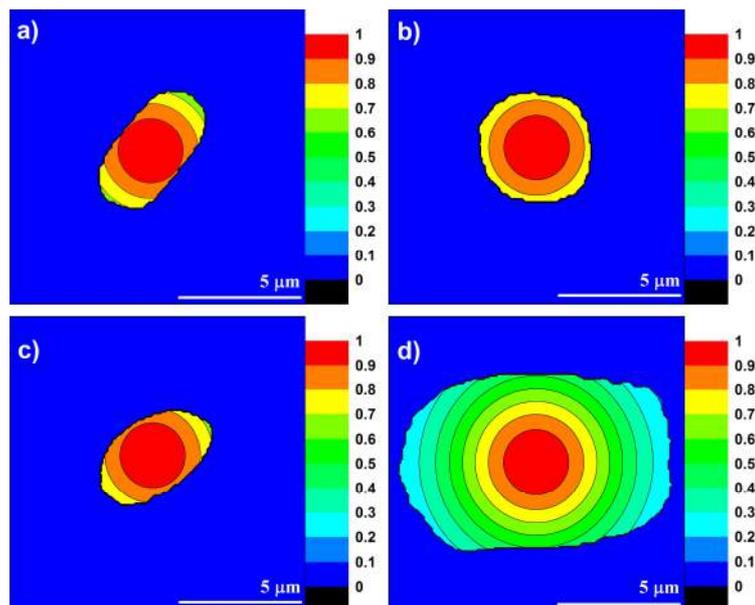


Рис. 59. Карты интенсивности облучения: а) *Danio rerio*; б) *Homo sapiens*; с) *Gallus Domesticus*; д) *Pleurodeles waltl*.

Согласно полученным картам эффект неоднородности засветки сильнее всего проявляется в случае ядер эритроцитов тритона. Вес вклада от областей на краю ядра в несколько раз отличается от веса центральной области. Для коррекции сигнала КРС был посчитан средний вес ядер. Результат представлен в таблице № 2.

Таблица № 2 Значение среднего веса для ядер разного типа.

Тип ядер	Средний вес
<i>Gaullus domesticus</i> эритроциты	0.834
<i>Danio rerio</i> эритроциты	0.854
<i>Homo sapiens</i> лимфоциты	0.824
<i>Pleurodeles waltl</i> эритроциты	0.495

Из таблицы № 2 следует, что средние веса для ядер *Gaullus Domesticus*, *Danio Rerio* и *Homo sapiens* приблизительно равны и коррекция интенсивности на них практически не влияет. Средние веса R были использованы для пересчета полученных экспериментальных интенсивностей спектров КРС:

$$I_{Raman}^{corr} = I_{Raman} / R, \quad (5.2)$$

где I_{Raman} соответствует измеренным интенсивностям линий ДНК, а I_{Raman}^{corr} - скорректированный результат, используемый при определении количества ДНК ядер.

5.2.2. Результаты

На рисунке 60 А представлены репрезентативные спектры ядер и выделенной ДНК *Homo sapiens*. Спектры ядер отличает вклад белков, к которому можно однозначно отнести линии на 1004, 1450, 1656 см^{-1} , отсутствующие в спектре выделенной ДНК. Линии с приблизительными позициями на 750, 1128, 1587, 1630 см^{-1} отнесены к остаточному после фиксации вкладу от порфиринового комплекса гемоглобина. Также в спектрах КРС ядер присутствуют линии на 496, 532, 595, 667, 682, 729, 783, 1013, 1062, 1096, 1178, 1208, 1243, 1334, 1371, 1419, 1484, 1505, 1531, 1576, 1663, 1690 см^{-1} , соответствующие спектру ДНК. Важно отметить, что в спектрах КРС ядер отсутствует линия на 815 см^{-1} , характерная для РНК [92,104]. Поэтому вкладом РНК в измеряемые спектры можно пренебречь.

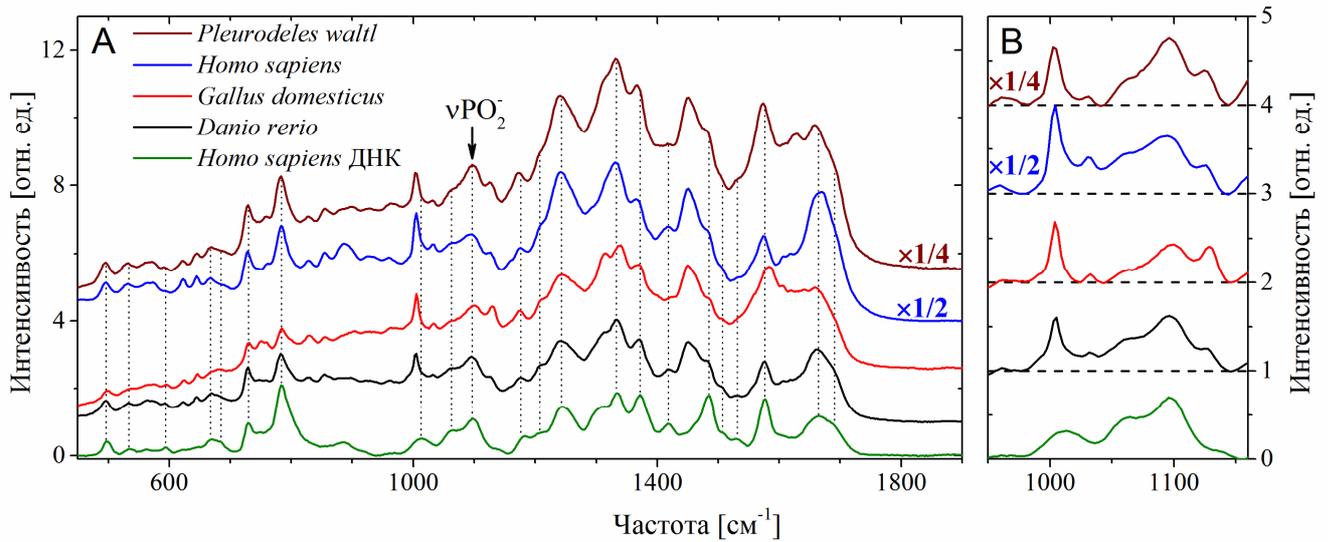


Рис. 60. А: Репрезентативные спектры КРС ядер клеток и свободной ДНК, В: результат вычитания спектрального фона в диапазоне $980 \div 1150 \text{ см}^{-1}$. Спектры вертикально сдвинуты для наглядности. Спектры в порядке снизу вверх: *Homo sapiens* DNA, ядра *Danio rerio*, *Homo sapiens* (домножен на 1/2), *Pleurodeles waltl* (домножен на 1/4). Вертикальные пунктирные линии отмечают позиции линий КРС от ДНК.

Согласно [91] большинство линий чувствительны к составу ДНК и нуклеотидной последовательности. Считается, что линия валентных колебаний PO_2^- на 1096 см^{-1} менее остальных зависит от нуклеотидной последовательности [141,142]. Поэтому эта линия была выбрана для оценки количества ДНК по спектрам КРС ядер. Для оценки её интенсивности использовалась линейная интерполяция спектрального фона (см. рис. 60 В). Для построения прямой использовались два локальных минимума на 980 и 1146 см^{-1} , которые были выбраны в соответствии со спектром свободной ДНК.

Таблица №3 Результаты измерения ДНК в ядрах методом КРС.

Тип ядер	Кол-во ДНК, пг (1С)	Кол-во измерений	Интенсивность линии на 1096 см^{-1} , пг*	Стандартное отклонение, %
<i>Gaullus domesticus</i> эритроциты	1.25	42	1.18	7.1 %
<i>Danio rerio</i> эритроциты	1.80	153	1.80	8.5 %
<i>Homo sapiens</i> лимфоциты	3.50	42	3.67	9.3 %
<i>Pleurodeles waltl</i> эритроциты	14.77	27	14.69	6.4 %

* эквивалент пикограммов. Для калибровки интенсивность PO_2^- моды в спектрах *D.rerio* была приравнена к 1.80 пг.

Для каждой серии измерений полученные интенсивности линии на 1096 см^{-1} нормировались на интенсивность этой линии для ядер *Danio rerio*. Затем среднее значение интенсивности линии на 1096 см^{-1} для *Danio rerio* было приравнено к 1.80 пг . Все прочие данные были пересчитаны относительно этого значения. Результаты представлены в таблице № 3 и в графической форме на рисунке 61.

Как видно из этого рисунка, полученные данные хорошо подгоняются прямой линией $y=0.99(\pm 0.01)\cdot x+0.04(\pm 0.09)$. Близкая к нулю константа и множитель близкий к единице указывают на то, что предложенный способ оценки фосфатной моды оказался достаточно точен.

5.2.3. Обсуждение

Попытка использования КРС света для количественного определения содержания ДНК в ядрах клеток дала положительный результат - содержание ДНК, определенное по спектрам КРС, согласуется с данными для ядер клеток крови различных животных, полученными с помощью стандартного подхода - окраски по Фельгену. Несмотря на многочисленность линий в спектрах, только одна спектральная линия, соответствующая колебаниям PO_2 (1096 см^{-1}), оказалась пригодной для этой цели, поскольку остальные линии демонстрируют зависимость интенсивности от последовательности нуклеотидов и нуклеотидного состава. Как видно из Таблицы №3, разброс сигналов для ядер одного вида составил $6.4\text{--}9.3\%$. Это больше чем 2.6% , которые удается получать в отдельных экспериментах при окраске по Фельгену [143].

Экспериментальная установка была модифицирована таким образом, чтобы измерять спектры КРС от ядер целиком. Данный подход позволяет проводить достаточно быстрые измерения при относительно невысокой интенсивности излучения. Недостатком подхода является необходимость в коррекции измеряемых данных, вызванная неоднородностью вклада различных участков ядра в измеряемый спектр. Альтернативным подходом, демонстрирующим, как ожидается, большую точность измерения, является сканирование препарата в

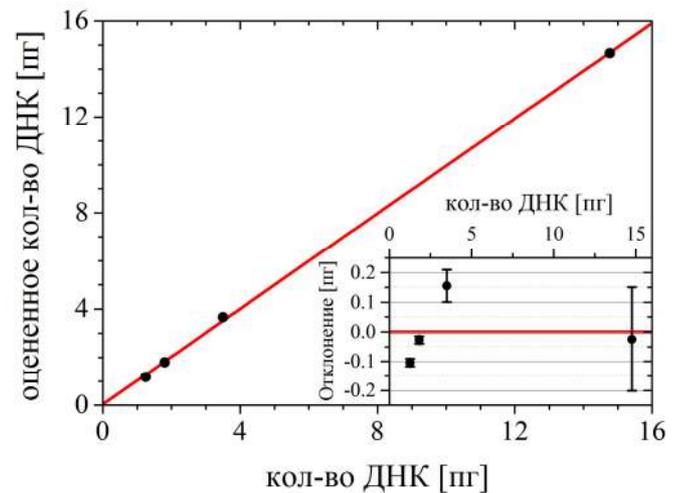


Рис. 61. Количество ДНК оцененного из эксперимента КРС в зависимости от реального содержания ДНК. Черные круги — экспериментальные данные, красная линия — линейная подгонка $y=0.99(\pm 0.01)\cdot x+0.04(\pm 0.09)$. На врезке показано отклонение экспериментальных точек от прямой линии.

конфокальном режиме. Однако данный подход требует более длительных измерений (при той же интенсивности излучения).

Принципиальная погрешность предложенного метода связана с точностью выделения вклада ДНК из спектра КРС ядра. В нашей демонстрационной работе применен простой способ, основанный на использовании всего одной линии ДНК и линейной интерполяции её baseline. Этот подход достаточно универсален, однако, он несет в себе относительно большую систематическую погрешность. Более высокая точность может быть достигнута при вычитании уже известного спектра конкретной молекулы (или набора молекул) ДНК, находящейся в известном конформационном состоянии. Поэтому детальное исследование зависимости спектров КРС от состава, конформационного состояния и нуклеотидной последовательности ДНК является крайне важным для развития предложенного метода. Результаты подобных исследований могут быть использованы не только в измерении количества ДНК, но и для определения состава и состояния ДНК в ядрах клеток.

Поскольку в рамках предложенного метода ошибка нестехиометричности принципиально отсутствует, то с его помощью можно выбирать и другие образцы клеток, для которых ошибка нестехиометричности мала. Это может быть сделано путем сравнения содержания ДНК измеренного с помощью окрашивания по Фельгену, и спектроскопии КРС для одного из рассмотренных нами видов и другого вида, который предполагается использовать в качестве стандарта. Такие эксперименты для пар видов также могут быть использованы для оптимизации условий гидролиза, который необходим для окраски по Фельгену и для экспериментальной проверки того, в какой мере данный образец фуксина обеспечивает количественное определение содержания ДНК. Кроме того, предложенный метод открывает возможность определять содержание ДНК в ядрах, кривая гидролиза которых носит сложный характер, и метод окраски по Фельгену неприменим. Аналогичная работа может быть проведена и для экспериментов, в которых используется окраска ядер флуорохромами (проточная и статическая цитометрия). Это дало бы возможность выбрать красители и виды клеток, для которых ошибка нестехиометричности связывания красителя мала. Также, при использовании реакции Фельгена препараты со временем деградируют и становятся непригодными для цитометрии. Предлагаемый метод лишен этого недостатка, поэтому если он будет иметь дальнейшее развитие, проблема долговременного использования стандартов содержания ДНК будет иметь простое решение.

Заключение

В результате проведенного диссертационного исследования были получены спектры КРС от замораживаемых клеток в температурном диапазоне от -174 до 26 °С. В ходе анализа спектров были продемонстрированы новые возможности спектроскопии КРС применительно к замораживаемым клеткам. Разработанные подходы позволяют получать уникальную информацию, недоступную для стандартных методик.

Основные результаты диссертационной работы логически разбиваются на следующие шесть пунктов:

1. Экспериментально получены спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружено, что при -40 °С и ниже в спектрах КРС появляются пики 1640 , 1660 , 3408 , 3425 , 3545 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 °С/мин вокруг дрожжевых клеток образуется слой из продуктов эвтектической кристаллизации, а при скорости 20 °С/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, независящего 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 сокращений и условных обозначений

КРС – комбинационное рассеяние света

РКРС – резонансное комбинационное рассеяние света

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

РФК – реактивные формы кислорода

ПЗС – прибор с зарядной связью

КМОП – комплементарная структура металл-оксид-полупроводник

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

НАД - никотинамидадениндинуклеотид в окисленной форме

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид в восстановленной форме

ФАД – флавинадениндинуклеотид в окисленной форме

ФАДН₂ - флавинадениндинуклеотид в восстановленной форме.

АТФ – аденозинтрифосфат

АДФ - аденозиндифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

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 Amstislavsky S. Y., Trukshin I. S. Cryobanking mammalian embryos: priorities and the optimal choice of reproductive technologies //Russian journal of developmental biology. – 2010. – V. 41. – №. 1. – P. 13-23.
- 3 Zhmakin A. I. Fundamentals of cryobiology. – Springer. – 2008. – 285 P.
- 4 Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems //Science. – 1970. – V. 168. – №. 3934. – P. 939-949.
- 5 Жмакин А. И. Физические основы криобиологии //Успехи физических наук. – 2008. – Т. 178. – №. 3. – С. 243-266.
- 6 Dong J. et al. Spatial distribution of the state of water in frozen mammalian cells //Biophysical journal. – 2010. – Т. 99. – №. 8. – С. 2453-2459.
- 7 Белоус А. М., Гордиенко Е. А., Розанов Л. Ф. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция //Высшая школа, Москва. – 1987. – 80 С.
- 8 Amato P. Energy Metabolism in Low-temperature and Frozen Conditions in Cold-adapted Microorganism //Cold-adapted microorganisms. – Horizon Scientific Press. – 2013. – Chapter 5. – P. 71-96.
- 9 Glenister P. H., Thornton C. E. Cryoconservation—archiving for the future //Mammalian Genome. – 2000. – V. 11. – №. 7. – P. 565-571.
- 10 Riggs R. et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos //Fertility and sterility. – 2010. – V. 93. – №. 1. – P. 109-115.
- 11 Yashina S. et al. Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – №. 10. – P. 4008-4013.
- 12 Rall W. F., Fahy G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at– 196 C by vitrification //Nature. – 1985. – V. 313. – P. 573 - 575.
- 13 Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C //Science. – 1972. – V. 178. – №. 4059. – P. 411-414.
- 14 Mishima O., Stanley H. E. The relationship between liquid, supercooled and glassy water //Nature. – 1998. – V. 396. – №. 6709. – P. 329-335.

- 15 Vajta G. et al. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion //Reproductive biomedicine online. – 2009. – V. 19. – P. 1-7.
- 16 Vajta G., Nagy Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification //Reproductive biomedicine online. – 2006. – V. 12. – №. 6. – P. 779-796.
- 17 Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing //The Journal of General Physiology. – 1963. – V. 47. – №. 2. – P. 347-369.
- 18 Bank H., Mazur P. Visualization of freezing damage //The Journal of cell biology. – 1973. – V. 57. – №. 3. – P. 729-742.
- 19 Morris G. J., Coulson G. E., Clarke K. J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions //Cryobiology. – 1988. – V. 25. – №. 5. – P. 471-482.
- 20 Mazur P. et al. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes //Cryobiology. – 2005. – V. 51. – №. 1. – P. 29-53.
- 21 Mazur P. et al. Effects of hold time after extracellular ice formation on intracellular freezing of mouse oocytes //Cryobiology. – 2005. – V. 51. – №. 2. – P. 235-239.
- 22 Mazur P., Pinn I. L., Kleinhans F. W. The temperature of intracellular ice formation in mouse oocytes vs. the unfrozen fraction at that temperature //Cryobiology. – 2007. – V. 54. – №. 2. – P. 223-233.
- 23 Toner M., Cravalho E. G., Karel M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells //Journal of Applied Physics. – 1990. – V. 67. – №. 3. – P. 1582-1593.
- 24 Karlsson J. O. et al. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide //Biophysical journal. – 1993. – V. 65. – №. 6. – P. 2524.
- 25 Asahina É. Frost injury in living cells //Nature. – 1962. – T. 196. - С. 445-446.
- 26 Han B., Bischof J. C. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing //Cryobiology. – 2004. – V. 48. – №. 1. – P. 8-21.
- 27 Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms //Cryobiology. – 2003. – V. 46. – №. 3. – P. 205-229.
- 28 Нардид О. А. Исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов на дыхательную цепь митохондрий методом ЭПР спинового зонда. //Проблемы криобиологии – 2009. – Т. 9. – №. 2. – С. 177-185.

- 29 Харакоз Д. П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое–твердое» в биологических мембранах //Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 333-364.
- 30 Nagashima H. et al. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling //Biology of reproduction. – 1994. – V. 51. – №. 4. – P. 618-622.
- 31 Nagashima H. et al. Cryopreservation of porcine embryos //Nature. – 1995. – V. 374. – P. 416-416.
- 32 Cao E. et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions //Biotechnology and bioengineering. – 2003. – V. 82. – №. 6. – P. 684-690.
- 33 Dong J. et al. Freezing-induced phase separation and spatial microheterogeneity in protein solutions //The Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – V. 113. – №. 30. – P. 10081-10087.
- 34 Nardid O., Dyubko T., Repina S. A Comparative Study of the Effect of Freeze–Thawing on Peripheral and Integral Membrane Proteins //Cryobiology. – 1997. – V. 34. – №. 2. – P. 107-113.
- 35 Dirama T. E., Carri G. A., Sokolov A. P. Role of hydrogen bonds in the fast dynamics of binary glasses of trehalose and glycerol: A molecular dynamics simulation study //The Journal of chemical physics. – 2005. – V. 122. – №. 11. – P. 114505.
- 36 Dirama T. E. et al. Coupling between lysozyme and trehalose dynamics: Microscopic insights from molecular-dynamics simulations //The Journal of chemical physics. – 2006. – V. 124. – №. 3. – P. 034901.
- 37 Trejo González J. A., Longinotti M. P., Corti H. R. The viscosity of glycerol– water mixtures including the supercooled region //Journal of Chemical & Engineering Data. – 2011. – V. 56. – №. 4. – P. 1397-1406.
- 38 Amstislavsky S., Amstislavskaya T., Stein M. et al. Embryo cryobanking for conserving laboratory and wild animal species //Scand. J. Lab. Anim. Sci. – 1996. – V. 23. – P. 269–277.
- 39 Tsai S., Rawson D. M., Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling //Theriogenology. – 2009. – V. 71. – №. 8. – P. 1226-1233.
- 40 Mohr L. R., Trounson A. O. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse //Journal of reproduction and fertility. – 1980. – V. 58. – №. 1. – P. 189-196.
- 41 Jones K. H., Senft J. A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide //Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 1985. – V. 33. – №. 1. – P. 77-79.

- 42 Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов //СПб.: Соло. – 2008. – 72 С.
- 43 Amstislavsky S. et al. Embryo cryopreservation and in vitro culture of preimplantation embryos in Campbell's hamster (*Phodopus campbelli*) //Theriogenology. – 2015. – V. 83 - №. 6 – P. 1056-1063.
- 44 Ivan A. et al. Practical Methods to Assess Mammalian Embryo Quality–Staining Tests Comparative Study //Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. – 2011. – V. 44. – №. 1. – P. 420-423.
- 45 Diller K. R. Engineering-based contributions in cryobiology //Cryobiology. – 1997. – V. 34. – №. 4. – P. 304-314.
- 46 Diller K. R. Bioheat and mass transfer as viewed through a microscope //Journal of biomechanical engineering. – 2005. – V. 127. – №. 1. – P. 67-84.
- 47 Yang G., Zhang A., Xu L. X. Intracellular ice formation and growth in MCF-7 cancer cells //Cryobiology. – 2011. – V. 63. – №. 1. – P. 38-45.
- 48 Mazur P., Pinn I. L., Kleinhans F. W. Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling //Cryobiology. – 2007. – V. 55. – №. 2. – P. 158-166.
- 49 Acker J. P., Croteau I. M. Pre- and post-thaw assessment of intracellular ice formation //Journal of microscopy. – 2004. – V. 215. – №. 2. – P. 131-138.
- 50 König K., Uchugonova A., Breunig H. G. High-resolution multiphoton cryomicroscopy //Methods. – 2014. – V. 66. – №. 2. – P. 230-236.
- 51 Breunig H. G., König K. Two-photon imaging of intact living plants during freezing with a flexible multiphoton tomograph //Laser Physics Letters. – 2015. – V. 12. – №. 2. – P. 025601.
- 52 Morris G. J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation //Human Reproduction. – 2006. – V. 21. – №. 8. – P. 2075-2083.
- 53 Morris G. J. et al. Freezing injury: the special case of the sperm cell //Cryobiology. – 2012. – V. 64. – №. 2. – P. 71-80.
- 54 McDonald K. L. Out with the old and in with the new: rapid specimen preparation procedures for electron microscopy of sectioned biological material //Protoplasma. – 2014. – V. 251. – №. 2. – P. 429-448.
- 55 Kleinhans F. W. et al. Analysis of intracellular ice nucleation in *Xenopus* oocytes by differential scanning calorimetry //Cryobiology. – 2006. – V. 52. – №. 1. – P. 128-138.
- 56 Mori S. et al. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions //Cryobiology. – 2012. – V. 65. – №. 3. – P. 242-255.

- 57 Yuan S., Diller K. R. An optical differential scanning calorimeter cryomicroscope //Journal of microscopy. – 2005. – V. 218. – №. 2. – P. 85-93.
- 58 Oldenhof H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy //Cryobiology. – 2010. – V. 61. – №. 1. – P. 115-122.
- 59 Spindler R., Wolkers W. F., Glasmacher B. Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation //CryoLetters. – 2011. – V. 32. – №. 2. – P. 148-157.
- 60 Akhoondi M. et al. Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2011. – V. 1808. – №. 3. – P. 642-648.
- 61 Akhoondi M. et al. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents //Molecular membrane biology. – 2012. – V. 29. – №. 6. – P. 197-206.
- 62 Oldenhof H. et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: mode of action of cryoprotective agents //Biology of reproduction. – 2013. – V. 88. – №. 3. – P. 68.
- 63 Наберухин Ю. И. Лекции по молекулярной спектроскопии. –Новосибирск, 1973. – 292 С.
- 64 Clark R. J. H., Stewart B. The resonance raman effect—Review of the theory and of applications in inorganic chemistry. – Springer Berlin Heidelberg, 1979. – 80. P.
- 65 Long D. A. Quantum Mechanical Theory of Rayleigh and Raman Scattering //The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules. – John Wiley & Sons, Ltd. – 2002. – 610 P.
- 66 Puppels G. J. et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy //Nature. – 1990. – V. 347. – P. 301-303.
- 67 Uzunbajakava N. et al. Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells //Biopolymers. – 2003. – V. 72. – №. 1. – P. 1-9.
- 68 Uzunbajakava N. et al. Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells //Biophysical Journal. – 2003. – V. 84. – №. 6. – P. 3968-3981.
- 69 Matthäus C. et al. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy //Biophysical journal. – 2007. – V. 93. – №. 2. – P. 668-673.
- 70 Mariani M. M., Day P. J. R., Deckert V. Applications of modern micro-Raman spectroscopy for cell analyses //Integrative Biology. – 2010. – V. 2. – №. 2-3. – P. 94-101.
- 71 Klein K. et al. Label-free live-cell imaging with confocal Raman microscopy //Biophysical journal. – 2012. – V. 102. – №. 2. – P. 360-368.

- 72 Zoladek A. et al. Non-invasive time-course imaging of apoptotic cells by confocal Raman micro-spectroscopy //Journal of Raman Spectroscopy. – 2011. – V. 42. – №. 3. – P. 251-258.
- 73 Pully V. V., Lenferink A. T. M., Otto C. Time-lapse Raman imaging of single live lymphocytes //Journal of Raman Spectroscopy. – 2011. – V. 42. – №. 2. – P. 167-173.
- 74 Puppels G. J. et al. Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light //Experimental cell research. – 1991. – V. 195. – №. 2. – P. 361-367.
- 75 Notingher I. et al. In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy //Journal of Spectroscopy. – 2002. – V. 16. – №. 2. – P. 43-51.
- 76 Kumamoto Y. et al. Deep UV resonant Raman spectroscopy for photodamage characterization in cells //Biomedical optics express. – 2011. – V. 2. – №. 4. – P. 927-936.
- 77 Ashkin A., Dziedzic J. M., Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams //Nature. – 1987. – V. 330. – №. 6150. – P. 769-771.
- 78 Neuman K. C. et al. Characterization of photodamage to Escherichia coli in optical traps //Biophysical journal. – 1999. – V. 77. – №. 5. – P. 2856-2863.
- 79 Dasgupta R. et al. Hemoglobin degradation in human erythrocytes with long-duration near-infrared laser exposure in Raman optical tweezers //Journal of biomedical optics. – 2010. – V. 15. – №. 5. – P. 055009-055009-11.
- 80 Lavi R. et al. Detailed analysis of reactive oxygen species induced by visible light in various cell types //Lasers in surgery and medicine. – 2010. – V. 42. – №. 6. – P. 473-480.
- 81 Hopt A., Neher E. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy //Biophysical journal. – 2001. – V. 80. – №. 4. – P. 2029-2036.
- 82 Saytashev I. et al. Pulse duration and energy dependence of photodamage and lethality induced by femtosecond near infrared laser pulses in Drosophila melanogaster //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2012. – V. 115. – P. 42-50.
- 83 Thorpe W. P. et al. Dynamics of photoinduced cell plasma membrane injury //Biophysical journal. – 1995. – V. 68. – №. 5. – P. 2198.
- 84 Mirsaidov U. et al. Optimal optical trap for bacterial viability //Physical Review E. – 2008. – V. 78. – №. 2. – P. 021910.
- 85 Okada M. et al. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – V. 109. – №. 1. – P. 28-32.
- 86 Shafer-Peltier K. E. et al. Model-based biological Raman spectral imaging //Journal of Cellular Biochemistry. – 2002. – V. 87. – №. S39. – P. 125-137.

- 87 Notingher I. et al. Multivariate analysis of Raman spectra for in vitro non-invasive studies of living cells //Journal of molecular structure. – 2005. – V. 744. – P. 179-185.
- 88 Shinzawa H. et al. Multivariate data analysis for Raman spectroscopic imaging //Journal of Raman Spectroscopy. – 2009. – V. 40. – №. 12. – P. 1720-1725.
- 89 Jolliffe I. Principal component analysis. – John Wiley & Sons, Ltd. - 2002. – 478 P.
- 90 Abdi H., Williams L. J. Principal component analysis //Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics. – 2010. – V. 2. – №. 4. – P. 433-459.
- 91 Deng H. et al. Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence //Biopolymers. – 1999. – V. 50. – №. 6. – P. 656-666.
- 92 Prescott B., Steinmetz W., Thomas G. J. Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy //Biopolymers. – 1984. – V. 23. – №. 2. – P. 235-256.
- 93 Hell S. et al. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index //Journal of microscopy. – 1993. – V. 169. – №. 3. – P. 391-405.
- 94 Richards B., Wolf E. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system //Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences. – 1959. – V. 253. – №. 1274. – P. 358-379.
- 95 Pawley J. Handbook of biological confocal microscopy. – Springer Science & Business Media. - 2006.
- 96 Nasse M. J., Woehl J. C. Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy //JOSA A. – 2010. – V. 27. – №. 2. – P. 295-302.
- 97 Борн М. Вольф Э. Основы оптики, изд. 2-е //Москва. – 1973. – 856 С.
- 98 Török P. et al. Electromagnetic diffraction of light focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices: an integral representation //JOSA A. – 1995. – V. 12. – №. 2. – P. 325-332.
- 99 Egner A., Hell S. W. Equivalence of the Huygens–Fresnel and Debye approach for the calculation of high aperture point-spread functions in the presence of refractive index mismatch //Journal of Microscopy. – 1999. – V. 193. – №. 3. – P. 244-249.
- 100 Hu S. et al. Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes //Journal of the American chemical society. – 1993. – P. 115. – №. 26. – V. 12446-12458.
- 101 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.

- 102 De Gelder J. et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules //Journal of Raman Spectroscopy. – 2007. – V. 38. – №. 9. – P. 1133-1147.
- 103 Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. U. Raman spectroscopy of biological tissues //Applied Spectroscopy Reviews. – 2007. – V. 42. – №. 5. – P. 493-541.
- 104 Pliss A. et al. Nonlinear optical imaging and Raman microspectrometry of the cell nucleus throughout the cell cycle //Biophysical journal. – 2010. – V. 99. – №. 10. – P. 3483-3491.
- 105 Mayo D. W. et al. Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra. – New York: Wiley-Interscience, 2004. – 567 P.
- 106 Lide D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86 ed. //CRC Press. – 2005. - 2660 P.
- 107 Đuričković I. et al. Experimental study of NaCl aqueous solutions by Raman spectroscopy: Towards a new optical sensor //Applied spectroscopy. – 2010. – V. 64. – №. 8. – P. 853-857.
- 108 Bakker R. J. Raman spectra of fluid and crystal mixtures in the systems H₂O, H₂O–NaCl and H₂O–MgCl₂ at low temperatures: applications to fluid-inclusion research //The Canadian Mineralogist. – 2004. – V. 42. – №. 5. – P. 1283-1314.
- 109 Kreiner-Møller A., Stracke F., Zimmermann H. Hydrohalite spatial distribution in frozen cell cultures measured using confocal Raman microscopy //Cryobiology. – 2014. – V. 69. – №. 1. – P. 41-47.
- 110 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.
- 111 Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рефф М., Робертс К., Уотсон Дж. //Молекулярная биология клетки. М.: Мир. – 1994. – Т. 1. – 521 С.
- 112 Nicholls D. G., Ferguson S. Bioenergetics. – Academic Press, 2013. - 434 P.
- 113 Adar F., Erecinska M. Spectral evidence for interactions between membrane-bound hemes: Resonance Raman spectra of mitochondrial cytochrome b–c 1 complex as a function of redox potential //FEBS letters. – 1977. – V. 80. – №. 1. – P. 195-200.
- 114 Adar F., Dixit S., Erecinska M. Resonance Raman spectra of cytochromes c and b in *Paracoccus denitrificans* membranes: evidence for heme-heme interactions //Biochemistry. – 1981. – V. 20. – №. 26. – P. 7528-7531.
- 115 Cartling B. Intermediate and stable redox states of cytochrome c studied by low temperature resonance Raman spectroscopy //Biophysical journal. – 1983. – V. 43. – №. 2. – P. 191.
- 116 Ogawa M. et al. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy //Biochemical and biophysical research communications. – 2009. – V. 382. – №. 2. – P. 370-374.

- 117 Kakita M., Okuno M., Hamaguchi H. Quantitative analysis of the redox states of cytochromes in a living L929 (NCTC) cell by resonance Raman microspectroscopy //Journal of biophotonics. – 2013. – V. 6. – №. 3. – P. 256-259.
- 118 Walter A. et al. Analysis of the cytochrome distribution via linear and nonlinear Raman spectroscopy //Analyst. – 2010. – V. 135. – №. 5. – P. 908-917.
- 119 Brazhe N. A. et al. Mapping of redox state of mitochondrial cytochromes in live cardiomyocytes using Raman microspectroscopy //PloS one. – 2012. – V. 7. – №. 9. – P. e41990.
- 120 Brazhe N. A. et al. In situ Raman study of redox state changes of mitochondrial cytochromes in a perfused rat heart //PloS one. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e70488.
- 121 Atkin O. K., Zhang Q., Wiskich J. T. Effect of temperature on rates of alternative and cytochrome pathway respiration and their relationship with the redox poise of the quinone pool //Plant Physiology. – 2002. – V. 128. – №. 1. – P. 212-222.
- 122 David P. S., Poyton R. O. Effects of a transition from normoxia to anoxia on yeast cytochrome c oxidase and the mitochondrial respiratory chain: implications for hypoxic gene induction //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2005. – V. 1709. – №. 2. – P. 169-180.
- 123 Robertson J. B., Davis C. R., Johnson C. H. Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – №. 52. – P. 21130-21135.
- 124 Chance B. et al. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals //Journal of Biological Chemistry. – 1979. – V. 254. – №. 11. – P. 4764-4771.
- 125 Thorell B., Chance B., Legallais V. Microspectrophotometry of cytochromes in the single cell at room and liquid nitrogen temperatures //The Journal of cell biology. – 1965. – V. 26. – №. 3. – P. 741-746.
- 126 Amato P., Christner B. C. Energy metabolism response to low-temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis* //Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75. – №. 3. – P. 711-718.
- 127 Guzy R. D., Schumacker P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia //Experimental physiology. – 2006. – V. 91. – №. 5. – P. 807-819.

- 128 Ripple M. O., Abajian M., Springett R. Cytochrome c is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization //Apoptosis. – 2010. – V. 15. – №. 5. – P. 563-573.
- 129 Chan K., Goldmark J. P., Roth M. B. Suspended animation extends survival limits of *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature //Molecular biology of the cell. – 2010. – V. 21. – №. 13. – P. 2161-2171.
- 130 Watson K., Bertoli E., Griffiths D. E. Phase transitions in yeast mitochondrial membranes. The effect of temperature on the energies of activation of the respiratory enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* //Biochem. J. – 1975. – V. 146. – P. 401-407.
- 131 McMurchie E. J., Raison J. K. Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1979. – V. 554. – №. 2. – P. 364-374.
- 132 Dutton P. L., Wilson D. F., Lee C. P. Oxidation-reduction potentials of cytochromes in mitochondria //Biochemistry. – 1970. – V. 9. – №. 26. – P. 5077-5082.
- 133 Price P. B., Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V. 101. – №. 13. – P. 4631-4636.
- 134 Leibo S. P., Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species //Theriogenology. – 2002. – V. 57. – №. 1. – P. 303-326.
- 135 Shepard M. L., Goldston C. S., Cocks F. H. The H₂O-NaCl-glycerol phase diagram and its application in cryobiology //Cryobiology. – 1976. – V. 13. – №. 1. – P. 9-23.
- 136 Jochem M., Körber C. Extended phase diagrams for the ternary solutions H₂O-NaCl-glycerol and H₂O-NaCl-hydroxyethylstarch (HES) determined by DSC //Cryobiology. – 1987. – V. 24. – №. 6. – P. 513-536.
- 137 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.
- 138 Vinogradov A. E. Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size //Cytometry. – 1994. – V. 16. – №. 1. – P. 34-40.
- 139 Kasai F., O'Brien P. C. M., Ferguson-Smith M. A. Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken //Biology letters. – 2012. – V. 8. – №. 4. – P. 631-635.
- 140 Han L., Zhao Z. Comparative analysis of CpG islands in four fish genomes //Comparative and functional genomics. – 2008. – ID. 565631.

- 141 Guan Y. et al. Vibrational analysis of nucleic acids. 2. Ab initio calculation of the molecular force field and normal modes of dimethyl phosphate //The Journal of Physical Chemistry. – 1995. – V. 99. – №. 31. – P. 12054-12062.
- 142 Guan Y., Thomas G. J. Vibrational analysis of nucleic acids. V. Force field and conformation-dependent modes of the phosphodiester backbone modeled by diethyl phosphate //Biophysical journal. – 1996. – V. 71. – №. 5. – P. 2802-2814.
- 143 Pichugin Y. G. et al. Peculiarities of cytometrical methods of DNA content determination in the nucleus //Cell and Tissue Biology. – 2012. – V. 6. – №. 3. – P. 302-308.

Публикации автора по теме диссертации

Статьи в журналах ВАК:

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.

Публикации в тезисах и трудах конференций:

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. – том 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. – том 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.