

УТВЕРЖДАЮ:



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института автоматки изэлектрометрии Сибирского отделения Российской академии наук (ИАиЭ СО РАН)

Диссертация “Исследование замораживаемых биологических клеток методом комбинационного рассеяния света” выполнена в лаборатории спектроскопии конденсированных сред ИАиЭ СО РАН.

В период подготовки диссертации соискатель Окотруб Константин Александрович работал в ИАиЭ СО РАН в должности инженера-программиста.

В 2012 г. окончил Новосибирский государственный университет по специальности физика.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015 г. ИАиЭ СО РАН.

Научный руководитель—доктор физико-математических наук Суровцев Николай Владимирович, заведующий лабораторией спектроскопии конденсированных сред ИАиЭ СО РАН.

Диссертация “Исследование замораживаемых биологических клеток методом комбинационного рассеяния света” была рассмотрена на межлабораторном семинаре Учебно-научного центра “Квантовая оптика” ИАиЭ СО РАН 17 сентября 2015 года.

На семинаре присутствовали:

Шалагин Анатолий Михайлович, акад. РАН, ИАиЭ СО РАН
Бабин Сергей Алексеевич, чл.-корр. РАН, ИАиЭ СО РАН
Ильичев Леонид Вениаминович, д.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Малиновский Валерий Константинович, д.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Плеханов Александр Иванович, д.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Наливайко Валерий Игоревич, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Суровцев Николай Владимирович, д.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Лабусов Владимир Александрович, д.т.н., ИАиЭ СО РАН
Адищев Сергей Владимирович, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Атутов Сергей Никитич, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Злобина Екатерина Алексеевна, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Каблуков Сергей Иванович, д.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Лобач Иван Александрович, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Перминов Сергей Владимирович, к.ф.-м.н., ИФП СО РАН
Харенко Денис Сергеевич, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Зыкова Валерия Андреевна, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Терентьев Вадим Станиславович, к.ф.-м.н., ИАиЭ СО РАН
Будников Константин Иванович, к.т.н. ИАиЭ СО РАН
Карпегина Юлия Андреевна, ИАиЭ СО РАН
Ковалевский Виктор Иванович, ИАиЭ СО РАН
Трещихин Владимир Анатольевич, ИАиЭ СО РАН

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность работы.

Криоконсервация - подход сохранения биологических клеток путем их охлаждения до низких температур. В замороженном состоянии биоматериал может сохраняться на протяжении многих лет. Критическими этапами криоконсервации являются охлаждение до низких температур и последующее размораживание. На этих стадиях происходят радикальные изменения в состоянии замораживаемых биообъектов, вызванные образованием льда, обезвоживанием, фазовым переходом гель-флюид мембран клетки. Часто эти

изменения приводят к гибели клеток. Поэтому для каждого типа клеток (для каждого вида), разрабатываются свои протоколы замораживания, учитывающие особенности конкретных биообъектов. Для разработки протоколов замораживания необходимо знать, какие изменения происходят в клетке и какие факторы отвечают за гибель клеток в том или ином случае.

В настоящее время существует несколько экспериментальных методик, применяемых для исследования процессов, протекающих при замораживании биологических клеток: оптическая криомикроскопия, электронная микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), ИК спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС). Последний подход обладает уникальным, с точки зрения исследования замораживаемых клеток, набором свойств. Спектроскопия КРС – это бесконтактная, неразрушающая методика, которая позволяет исследовать биологические объекты с высоким пространственным разрешением без использования меток.

Метод КРС уже достаточно активно применяется для характеристики биологических клеток при нормальных температурах [*Movasaghi Z. et al. Appl. Spectrosc. Rev. (2007) 42:493-541; Krafft C. (2009) 134:1046-1057*]. Однако, в силу сложности температурных экспериментов и недостаточного распространения методики, к началу выполнения диссертационной работы была опубликована всего одна статья на тему применения КРС для исследования замораживаемых клеток [*Dong J. et al. Biophys. J. (2010) 99: 2453–2459*]. В этой работе была продемонстрирована возможность исследования распределения льда внутри замороженных клеток. Однако многие другие возможности спектроскопии КРС для характеристики замороженных клеток остались не освещенными. В частности: идентификация эвтектической кристаллизации, исследование фазового перехода липидных структур. Резонансное КРС цитохромов ранее исследовалось только в спектрах клеток, полученных при комнатной температуре.

Основная цель диссертационной работы К.А. Окотруба была сформулирована как развитие новых экспериментальных методик на основе комбинационного рассеяния света, способных предоставить информацию об изменениях, протекающих в замораживаемых клетках. Также особое внимание было уделено применению наработок для актуальных биологических задач: исследованию замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши и измерения количества ДНК в ядрах клеток крови. Для достижения поставленной цели в диссертационной работе были сформулированы следующие задачи: развитие экспериментальной методики измерения спектров КРС от одиночных клеток в диапазоне температур от 100 до 300 К; измерение и интерпретация спектров КРС от замороженных клеток; исследование спектров резонансного КРС (РКРС) цитохромов в замораживаемых клетках; применение разработанных методов для исследования состояния замораживаемых эмбрионов мыши.

Личное участие соискателя.

В ходе выполнения работ К.А. Окотруб разработал экспериментальную установку, провел основные эксперименты. Он принимал активное участие в постановке задач, теоретическом анализе, обсуждении результатов и подготовке статей. При выполнении диссертационной работы К.А. Окотруб проявил себя высококвалифицированным научным работником, способным самостоятельно решать сложные задачи и проводить исследования на высоком научном уровне.

Новизна.

В диссертации получены следующие новые научные результаты:

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. Установлено, что зависимость скорости выцветания линий резонансного комбинационного рассеяния света (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. В экспериментальной температурной зависимости скорости выцветания линий РКРС цитохромов обнаружена особенность 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. Было экспериментально продемонстрировано, что образование внеклеточного льда может приводить к увеличению интенсивности линий РКРС цитохромов.
 4. Полученная температурная зависимость фотоиндуцированного окисления цитохромов была описана суммой термоактивационного закона и слагаемым, независимым от температуры. Была определена температурная зависимость скорости естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в замораживаемых клетках. Было показано, что эта зависимость хорошо описывается активационным законом с энергией барьера $\sim 32.5 \text{ кДж/моль}$.

5. Показано, что метод КРС может быть применен при решении ряда следующих биологических задач: измерении количества ДНК в ядрах клеток, определении локальной концентрации криопротектора, характеристики фазового состояния липидов и зарядового состояния цитохромов.

Степень достоверности результатов.

Все полученные результаты не противоречат известным научным положениям, экспериментальным и теоретическим результатам других работ. Все измерения проведены с помощью точных калиброванных приборов. Мощность возбуждающего излучения измерялась с систематической погрешностью $\pm 5\%$ и случайной погрешностью $\sim 1\%$. Значения температур исследуемых препаратов в ходе измерений были установлены и выдержаны с точностью не хуже, чем ± 2 градуса. Для каждого эксперимента проводилась калибровка спектрометра по спектру неоновой лампы. Локальная температура образца в области, от которой измерялись спектры КРС, проверялась по позиции линии льда на $\sim 3100\text{ см}^{-1}$, которая чувствительна к температуре. Особое внимание уделено стабильности фокусировки на образец, форме аппаратной функции микроскопа, а также особенностям, связанным с функцией пропускания спектрометра.

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы полученными в работе экспериментальными и теоретическими результатами.

Практическая значимость.

Результаты диссертации, несомненно, имеют практическую значимость. Разработанные экспериментальные подходы для исследования одиночных замораживаемых клеток методом спектроскопии комбинационного рассеяния света позволяют получать новую информацию об эвтектической кристаллизации в растворах с высоким содержанием NaCl, о фазовых переходах липидных структур замораживаемой клетки, а также о зарядовом

состоянии цитохромов и активности окислительно-восстановительных реакций дыхательной электрон-транспортной цепи. Получаемая с помощью этой методики информация расширяет фундаментальные знания о процессах, протекающих при замораживании биологических клеток, и может быть использована для разработки новых и усовершенствования старых протоколов замораживания. Предложенный в ходе выполнения диссертационной работы подход для измерения количества ДНК с помощью КРС не требует окрашивания и может быть использован в случаях, когда окрашивание клеток нежелательно.

Соответствие специальности.

Диссертационная работа соответствует специальности 01.04.05 “Оптика”, так как методы исследования, с использованием которых были получены основные результаты, являются методами оптической спектроскопии.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.

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 диссертационной работы достаточно подробно и в полном объеме отражены в трех опубликованных печатных работах в российских и

зарубежных рецензируемых научных журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией:

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. – С. 67-81.

Диссертация “Исследование замораживаемых биологических клеток методом комбинационного рассеяния света” Окотруба Константина Александровича рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 “Оптика”

Председатель семинара
академик РАН



Шалагин А. М.