

## Отзыв официального оппонента

доктора физико-математических наук, профессора ДЗЮБЫ Сергея Андреевича на  
диссертацию ОКОТРУБА Константина Александровича

### «ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАМОРАЖИВАЕМЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА»,

представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук  
по специальности 01.04.05 – оптика

Молекулярные механизмы, обеспечивающие выживание биологических систем в условиях обезвоживания и замораживания, важны для понимания процессов, происходящих при хранении биологических объектов, что в свою очередь имеет принципиальное значение для ряда приложений в практической медицине и фармацевтике, в пищевой промышленности. В настоящее время эти механизмы широко обсуждаются в мировой научной литературе. Поэтому **актуальность темы диссертации** не вызывает сомнений.

**Научная новизна** диссертации определяется тем, что здесь впервые проанализированы возможности метода комбинационного рассеяния света (КРС) к изучению проблем криоконсервации клеток. На примере ряда реальных биологических систем (дрожжевые клетки, цитохромы, эмбрионы мышей, ДНК в ядрах клеток) показано, что КРС может доставлять полезную и важную информацию о молекулярных механизмах криоконсервации.

В обзорной **первой главе** диссертации рассматриваются биологические аспекты проблемы криоконсервации и экспериментальные методы ее исследования. Подробно проанализированы возможности оптической и электронной микроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, инфракрасной спектроскопии. Особое внимание уделено использованному автором диссертации методу спектроскопии КРС. Указывается, что преимуществами данного метода являются возможность бесконтактного анализа, чувствительность к химическому и биологическому составу, возможность проведения исследований в водной среде, высокое пространственное разрешение при применении конфокальной микроскопии.

**Вторая глава** диссертации посвящена описанию используемых экспериментальных методик. Основным содержанием здесь следует считать описание

созданного диссертантом микроскопного стенда. Разработку и создание данного стенда несомненно следует считать одним из основных достижений диссертации. Данный стенд позволяет проводить изучение методом КРС биологических объектов в разных их субъединицах, с пространственным разрешением конфокального микроскопа. В работе подробно описана оптическая схема установки, проведена детальная оценка достигнутого пространственного разрешения – с численным моделированием аппаратной функции. Также здесь описаны особенности эксперимента, в котором объектом исследования являются биологические клетки.

В **третьей главе** описывается исследование линий КРС, обусловленных появлением дигидрата хлорида натрия (гидрогалита) в замороженном физиологическом растворе (0.9 % раствор NaCl в воде), содержащем дрожжевые клетки. Показано, что после замораживания до  $-20^{\circ}\text{C}$  клетки оказываются захваченными в жидких включениях внутри льда. В спектральном диапазоне от  $3400$  до  $3550\text{ см}^{-1}$  было замечено ниже  $-40^{\circ}\text{C}$  образование трех новых линий, которые и были отнесены к гидрогалиту. Его появление проинтерпретировано как результат эвтектической кристаллизации раствора хлорида натрия. Важный результат получен при применении возможностей пространственного разрешения используемой методики – оказалось, что продукты эвтектической кристаллизации распределяются вне клеток, в непосредственной близости от них. Оценена толщина слоя этих продуктов вокруг клеток. Интересно, что при быстром замораживании толщина слоя не превышает  $20\text{ нм}$ .

В **четвертой главе** описывается исследование цитохромов *b* и *c*. Особенностью этой главы является «мини-обзор» роли цитохромов в клеточном метаболизме. Основное содержание данной главы посвящено изучению процесса фотовысвечивания линий, относящихся к резонансному КРС цитохромов. Показано, что кинетика процесса является экспоненциальной, с выходом на некоторое предельное значение, которое определяется балансом между окисленными и восстановленными формами цитохрома.

Также в этой главе описаны результаты изучения температурной зависимости кинетики фотовысвечивания. Показано, что ниже  $-80^{\circ}\text{C}$  скорость фотовысвечивания выходит на низкотемпературное плато.



Особое внимание в этой главе уделено изучению зависимости кинетики фотовысвечивания от мощности излучения. Обнаружено, что увеличение интенсивности облучения приводит к квадратичному росту скорости фотовысвечивания, в дополнение к вкладу, независящему от мощности. Температурная зависимость квадратичного вклада может быть описана зависимостью типа аррениусовской, с добавлением температурно-независимого вклада. Определены энергии активации этой зависимости, и зависимости от температуры вклада, независящего от мощности. Высказаны предположения о связи обеих этих зависимостей (обоих вкладов) с биохимическими процессами в системе.

В пятой главе описаны результаты применения метода КРС к исследованию замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши и ДНК ядер клеток. В первом случае (эмбрионы) измерена локальная концентрация используемого в качестве криопротектора глицерина, определено фазовое состояние липидов, найдено зарядовое состояние цитохромов. Изучен процесс фотовысвечивания цитохромов. Для данной системы таким образом использован весь арсенал имеющихся к настоящему времени методов КРС, в том числе и разработанных автором диссертации.

Показано, что метод КРС при изучении ДНК ядер клеток позволяет определять количество ДНК. Разработанный автором подход обладает несомненным преимуществом по сравнению с используемыми на практике традиционными подходами, так как не требует окрашивания ДНК. Для реализации данного подхода была проведена некоторая модификация оптической схемы установки. В результате показано, что метод КРС позволяет определять количество ДНК в ядрах клеток со стандартным отклонением, меньшим 10 %.

**Практическая и научная значимость** диссертационной работы заключается в разработке оригинального микроскопного стенда, адаптированного к изучению методом КРС биологических клеток, получению воспроизводимых результатов для реальных биологических объектов, определению возможного круга решаемых для биологических систем задач, получению некоторых конкретных результатов о свойствах исследованных систем.

Несомненным достоинством работы является использование современной высококачественной аппаратуры и применение методов математического

моделирования для оценки точности получаемых с ее помощью результатов. Эти обстоятельства, в совокупности с достигнутой воспроизводимостью результатов, указывают на их **достоверность** и на высокий уровень работы в целом.

К содержанию диссертации можно высказать некоторые замечания.

1. Некоторые положения и выводы сформулированы недостаточно конкретно, что затрудняет их восприятие. Так, в первом выводе заключения не говорится о том, что клетки изучаются в физиологическом растворе. Без обращения к тексту диссертации становится тогда непонятным, откуда берется гидрогалит. Во втором выводе не говорится о том, что исследуется процесс фотовысвечивания. Поэтому непонятно, почему происходит уменьшение интенсивности линий, опять необходимо обращаться к тексту диссертации. На стр. 66 говорится о некоем используемом автором криопротекторе, и только из текста на последующих страницах можно догадаться, что это глицерин.
2. Температурная зависимость параметров фотовысвечивания обсуждается только с точки зрения возможных биохимических процессов. В то же время представленные автором данные (рис. 32, 33с, 49) показывают, что в температурном интервале ниже  $-50^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$  скорость фотовысвечивания выходит на низкотемпературное плато. Но именно для этого температурного диапазона известен так называемый «динамический переход» в биологических системах, который заключается в резком изменении параметров движения атомов и который имеет таким образом чисто физическую природу (см. например обзоры [Parak, F.G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 552-557; Doster, W. *J. Non-Cryst. Solids* **2011**, *357*, 622-628]). Поэтому выход на низкотемпературное плато можно объяснить просто замедлением подвижности атомов. Такую возможность следовало хотя бы обсудить.
3. Используются не совсем удачные термины. Так, термин «гидрогалит» известен главным образом в геологии, для химии и биологии он довольно экзотичен. Для более лучшего восприятия текста следовало бы здесь использовать обычный термин «дигидрат хлорида натрия». Также не совсем удачный термин «фотовыцветание». В русскоязычной литературе для обозначения таких процессов более распространен термин «фотовысвечивание».



4. Текст диссертации вычитан недостаточно тщательно: имеет место ряд опечаток, а на стр. 12 одинаковая по содержанию фраза повторена два раза подряд.

Данные замечания не снижают, однако, общей высокой оценки диссертационной работы. Автор продемонстрировал высокий научный уровень как при постановке и проведении эксперимента, так и при анализе наблюдаемых эффектов.

Материал диссертации достаточно полно представлен в опубликованных работах. Автореферат правильно отображает содержание диссертации.

Диссертационная работа ОКОТРУБА Константина Александровича «ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАМОРАЖИВАЕМЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛЕТОК МЕТОДОМ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА» удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, а ее автор несомненно заслуживает присвоения искомой ученой степени по специальности 01.04.05 – оптика.

Заведующий лабораторией Института химической кинетики и горения СО РАН  
доктор физико-математических наук, профессор

С.А.Дзюба

