

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института спектроскопии
Российской академии наук,
доктор физ.-мат. наук

О. Н. Компанец

«15» декабря 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертационную работу Окотруба Константина Александровича
«Исследование замораживаемых биологических клеток
методом комбинационного рассеяния света», представленную на соискание ученой
степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика.

Диссертационная работа Окотруба Константина Александровича посвящена применению спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС) для исследования процессов, протекающих при замораживании биологических клеток. Тема диссертации находится в русле одного из наиболее актуальных междисциплинарных направлений современного естествознания и связана с решением широкого круга фундаментальных и прикладных задач биофотоники. Современные методы и инструменты оптики и спектроскопии предоставляют уникальные возможности для оперативной диагностики и неразрушающего контроля свойств различных материалов и структур. Во многих случаях особенно информативными оказываются методы спектральной диагностики материалов при низких (криогенных) температурах. Данное обстоятельство оказывается востребованным при решении задачи контроля (в т.ч., in-situ) процессов криоконсервации биоматериалов. По сравнению с используемыми до настоящего времени методами исследования замораживаемых клеток метод КРС открывает целый ряд принципиально новых возможностей и представляется весьма перспективным. Тем не менее, до последнего времени по ряду технических и технологических причин техника КРС для исследования замороженных клеток использовалась достаточно редко. Как следствие, до сих пор не решен целый ряд фундаментальных задач в этом направлении. В этой связи чрезвычайно актуальной представляется основная цель диссертационной работы Окотруба К.А.: отработка техники измерения спектров КРС от замораживаемых биологических клеток и интерпретация спектров КРС замораживаемых клеток.

Основное содержание диссертации изложено в пяти главах.

Первая глава носит обзорный характер. В ней обсуждаются основные проблемы криоконсервации биологических объектов, а также основные процессы, происходящие в замораживаемых клетках и их окружении. Обсуждаются преимущества и недостатки различных методов исследования процессов замораживания клеток. Кратко изложены основы эффекта КРС, рассмотрены особенности экспериментов по измерению КРС от биологических объектов.

Вторая глава посвящена подробному описанию созданной диссертантом экспериментальной установки для измерения КРС от биологических клеток, с помощью которой были получены все основные результаты. Описано оборудование, использовавшееся для проведения оптико-спектральных экспериментов при низких

температурах. На основе численного моделирования сделаны оценки пространственного разрешения для различных экспериментальных условий. Здесь также обсуждаются различные аспекты пробоподготовки и характерный вид спектров биологической клетки при комнатной температуре.

В третьей главе представлена экспериментальная работа по идентификации линий возникающие в спектрах КРС замороженных дрожжевых клеток. Показано, что появление этих линий связано с эвтектической кристаллизацией раствора NaCl, в результате которой образуется гидрат NaCl·2H₂O (гидрогалит). Путем измерения спектров КРС от разных локальных областей в образце было исследовано распределение гидрогалита в замороженной суспензии. Совмещение метода КРС с техникой конфокальной микроскопии позволило реализовать пространственное разрешение, достаточно высокое для спектрально-пространственной характеристики отдельных клеток, внутри- и межклеточного пространства. Показано, что при медленной скорости охлаждения гидрогалит образуется преимущественно вокруг клеток (в локальной окрестности мембраны клетки), а при быстром охлаждении включения гидрогалита распределяются равномерным образом по всему образцу.

Четвёртая глава посвящена исследованию линий резонансного КРС (РКРС) от цитохромов. В начале главы обсуждаются основные функции цитохромов в рамках работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), эффект РКРС от цитохромов и чувствительность линий цитохромов к зарядовому состоянию гема. Затем, в главе исследуется процесс фотовыцветания линий РКРС цитохромов. Показано, что зависимость скорости фотовыцветания цитохромов от интенсивности излучения носит квадратичный характер, а при малых интенсивностях стремится к ненулевому значению. Предложена интерпретация, согласно которой в пределе малых интенсивностей скорость фотовыцветания линий РКРС цитохромов определяется естественными окислительно-восстановительными реакциями цитохромов. Получена экспериментальная температурная зависимость параметров используемых для характеристики процесса фотовыцветания. Показано, что образование льда приводит к увеличению интенсивности линий РКРС цитохромов (что соответствует увеличению доли восстановленных цитохромов в замораживаемых клетках) после образования льда. Исследованы температурные зависимости для естественных и фотоиндуцированных окислительно-восстановительных реакций цитохромов, полученные из анализа зависимости скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов от температуры и мощности излучения.

Пятая глава посвящена решению актуальных прикладных задач с использованием разработанной экспериментальной установки и отработанных подходов. В первой части главы с помощью спектроскопии КРС исследуются замораживаемые преимплантационные эмбрионы мыши. Показано, что подход для исследования зарядового состояния гемма и скоростей окислительно-восстановительных реакций цитохромов может быть успешно использован для замораживаемых эмбрионов. Также показано, что метод КРС позволяет исследовать фазовое состояние липидных структур эмбрионов по отношению интенсивностей линий КРС на 2880 и 2850 см⁻¹. Во второй части демонстрируется возможность измерения количества ДНК в ядрах клеток крови методом КРС.

К наиболее значимым результатам диссертации можно отнести следующее:

1. Дана интерпретация пиков на 1640, 1660, 3408, 3425, 3545 см⁻¹ возникающих при замораживании клеток в буферных растворах на основе NaCl. Продемонстрирована возможность применения спектроскопии КРС для исследования распределения продуктов эвтектической кристаллизации в клеточной суспензии.

2. Показано, что зависимость скорости фотовыцветания цитохромов от интенсивности излучения носит квадратичный характер, а при малых интенсивностях стремится к ненулевому значению. Предложена интерпретация, согласно которой ненулевое значение скорости фотовыцветания цитохромов при малых интенсивностях

излучения возникает из-за естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов.

3. Экспериментально показано, что образование льда приводит к смене зарядового состояния цитохромов в замораживаемых клетках. Построена температурная зависимость для естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в замораживаемых клетках, которая может быть описана активационным законом с энергией активации $32,5(\pm 8\%)$ кДж/моль.

4. Продемонстрирована возможность применения метода КРС для исследования состояния замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши.

5. Продемонстрирована возможность измерения количества ДНК в ядрах клеток с помощью спектроскопии КРС. Данный результат, на наш взгляд, является одним из наиболее ярких практических результатов диссертационного исследования.

Обоснованность и достоверность результатов, выводов и защищаемых положений подтверждается корректным использованием современных экспериментальных методов, подходов и инструментальной базы, использованием современных теорий и методов анализа спектроскопических данных. Достоверность полученных результатов подтверждается также воспроизводимыми результатами экспериментов, апробацией основных результатов на научных конференциях и симпозиумах, в опубликованных работах.

Научная значимость результатов заключается в разработке новых методов диагностики замороженных биообъектов, а также в получении новых фундаментальных данных о закономерностях в спектрах КРС биологических клеток, температурных зависимостях спектров и фотофизических характеристик различных биообъектов.

Диссертационное исследование представляет значительный *практический интерес и значимость*, в связи с тем, что разработанные в нем экспериментальные методы и подходы могут быть использованы в технике криоконсервации биологических объектов (от клеток до тканей), контролируемой и управляемой для обеспечения функциональной целостности замораживаемых объектов.

В то же время, на наш взгляд, диссертация не лишена некоторых недостатков. К замечаниям и вопросам по работе можно отнести следующее:

1. Из литературы известно, что даже малые дозы узкополосного излучения (напр., в ИК-области) могут приводить к заметному, а, иногда, к значительному изменению функциональности биологически сред. В обзорной части диссертации было бы полезно провести соответствующий анализ применительно к использованию техники КРС.

2. В диссертации практически отсутствует сравнительный анализ с данными о процессе криоконсервации клеток, полученными другими методами. В частности, интересным было бы сравнение с результатами исследований методами флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, электронной микроскопии. В контексте развиваемого подхода, основанного на технике КРС, значительный интерес представляет техника поверхностно-усиленного КРС (TERS, SERS).

3. В Главе 2 (стр. 26) при обсуждении спектрального разрешения разработанной установки приводится утверждение, что максимальное разрешение достигается при фокусировке в 1 пиксель ПЗС-детектора. Данное утверждение, на наш взгляд, представляется спорным и требует большего обсуждения.

4. В спектре лампы накаливания, изображенном на Рис. 5б (стр.27) присутствует заметная модуляция с периодом ~ 100 нм. Необходимо прояснить природу указанной модуляции. Непонятно также, нужно ли учитывать данное обстоятельство при анализе спектров КРС.

5. На Рис. 28 (стр. 53) в тексте обсуждается зависимость параметра y_0 от температуры, тогда как на рисунке приведена зависимость параметра от мощности возбуждающего излучения.

6. В Главе 4 проводится весьма интересное исследование скорости выцветания цитохромов в зависимости от различных условий. Фото-физические свойства этих биологических объектов определяются фотофизическими и фотохимическими характеристиками молекулы гема. Свойства таких молекулярных комплексов на основе соединений класса металл-порфиринов активно исследовались методами селективной лазерной спектроскопии (лазерного возбуждения тонкоструктурных спектров люминесценции и выжигания спектральных провалов (ВП)), в частности, в ИСАНе, в отделе молекулярной спектроскопии под руководством проф. Р.И. Персонова (1980-90е гг.). Представляется, что обсуждаемые в диссертации процессы обратимого фотовыцветания цитохромов и процессы фотофизического выжигания стабильных спектральных провалов в металл-порфириновых комплексах (молекулах гема) могут иметь одну и ту же микроскопическую природу. В этой связи методы КРС и ВП могут предоставлять взаимодополняющие результаты.

7. Наконец, в диссертации присутствует некоторое количество опечаток и неточностей в формулировках (сс. 9, 14, 21, 38, 45, 74, 52)

Переходя к общей оценке исследования, следует отметить, что диссертационная работа выполнена на высоком научном и научно-технологическом уровне, а отмеченные замечания не снижают ее фундаментальной и практической значимости. Диссертация представляет собой цельное научное исследование, содержащее решение актуальных научных задач и вносит значительный вклад в понимание процесса замораживания биологических клеток. Текст диссертации оформлен в соответствии с требованиями ВАК. Автореферат правильно отражает ее содержание. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные результаты рассматриваемой диссертационной работы докладывались на всероссийских и международных конференциях, опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных журналах.

Все изложенное выше дает основание утверждать, что диссертационная работа К.А. Окотруба отвечает требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» согласно Постановлению Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, а её автор *Константин Александрович Окотруб* заслуживает искомой ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – «оптика».

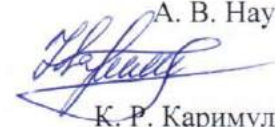
Доклад К.А. Окотруба по материалам диссертационной работы был заслушан и обсужден на расширенном семинаре отдела молекулярной спектроскопии ИСАН 15 декабря 2015 года.

Отзыв подготовил
заместитель директора по научной работе ИСАН
заведующий отделом молекулярной спектроскопии ИСАН,
доктор физ.-мат. наук, доцент



А. В. Наумов

Секретарь семинара отдела молекулярной спектроскопии,
кандидат физ.-мат. наук



К. Р. Каримуллин