

## ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

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

Диссертационная работа Окотруба К.А. посвящена развитию и применению спектроскопии комбинационного рассеяния света для исследования процессов, протекающих при замораживании биологических клеток. Ранее исследований замораживаемых клеток методом неупругого рассеяния света проведено не было, хотя метод комбинационного рассеяния света (КРС) дает уникальные возможности для исследователя – это бесконтактный, беззондовый метод, позволяющий идентифицировать вещество и его фазовое состояние на масштабах порядка 1 мкм. Информация, извлекаемая из анализа спектров КРС, несомненно важна для описания и понимания процессов в замораживаемых клетках, связанных с образованием льда, повышением концентраций растворённых веществ, изменением состояния мембран клеток и замедлением окислительно-восстановительных реакций электрон-транспортной цепи.

При выполнении задач диссертационной работы К.А. Окотрубом был создан экспериментальный стенд для измерения спектров КРС от одиночных клеток при различных температурах. Впервые были получены и объяснены спектры КРС от замороженных клеток дрожжей, мышинных эмбрионов. В ходе выполнения работы была решена задача интерпретации пиков, наблюдаемых в спектрах КРС от клеток, замораживаемых в физиологическом растворе, которые были отнесены к гидрогалиту ( $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). К.А. Окотрубом был наблюден, описан и объяснен эффект низкотемпературного разгорания линий резонансного КРС (РКРС) цитохромов под действием излучения на 532 нм. Детальное изучение процессов фотовыцветания линий РКРС цитохромов позволило К.А. Окотрубу предложить новую методику для оценки скорости окислительно-восстановительных реакций в электрон-транспортной цепи. Экспериментальные методы, разработанные К.А. Окотрубом в процессе выполнения диссертационной работы, были применены им при исследовании состояния замораживаемых эмбрионов мыши и при измерении количества ядерной ДНК.

Основные результаты проведенных исследований заключаются в следующем:

1. Экспериментально исследованы спектры комбинационного рассеяния света (КРС) от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружено, что при  $-40^\circ\text{C}$  и ниже в спектрах КРС появляются пики 1640, 1660, 3408, 3425, 3545  $\text{cm}^{-1}$ , соответствующие гидрогалиту ( $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Обнаружено, что характер пространственного распределения гидрогалита вокруг клеток зависит от скорости охлаждения.
2. Показано, что интенсивность линий резонансного КРС цитохромов в клетках экспоненциально убывает со временем облучения. Анализ зависимости скорости затухания от интенсивности облучения на длине волны 532 нм показал, что скорость фотовыцветания определяется как процессами, в которых принимают участие два фотона, так и «темновыми» процессами, связанными с естественными окислительно-восстановительными реакциями.



3. Исследование температурной зависимости скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов показало, что температура образования внеклеточного льда (-15 °С) является особенной: выше -15 °С скорость фотовыцветания не зависит от температуры, а ниже -15 °С резко уменьшается с понижением температуры.
4. Показано, что температурная зависимость скорости фотовыцветания линий РКРС цитохромов определяется вкладами термоактивационного процесса и процессами, независимыми от температуры. Метод фотовыцветания линий РКРС цитохромов был применен для определения скорости окислительно-восстановительных реакций в замораживаемых клетках и было обнаружено, что температурная зависимость эффективной скорости реакции описывается термоактивационным законом с энергией барьера ~32.5 кДж/мол.
5. Разработанные методы исследования биологических клеток по спектрам КРС были применены для исследования процессов, протекающих при замораживании эмбрионов мыши. Это позволило определить локальную концентрацию криопротектора, фазовое состояние липидов, охарактеризовать зарядовое состояние цитохромов и скорость окислительно-восстановительных реакций 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 точностью 10%.

К. А. Окотруб справился с поставленной задачей, выполнив программу исследований на высоком профессиональном уровне. По материалам диссертации автором опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных Высшей аттестационной комиссией. Содержание диссертационной работы соответствует указанной специальности, а автореферат полностью отражает ее содержание.

Таким образом, диссертация Окотруба Константина Александровича является законченной научной работой, содержащей результаты, обладающие несомненной важностью для использования методов оптической спектроскопии в решении задач криосохранения биологических объектов. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Окотруб К. А. заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика.



Заведующий лабораторией 04 ИАиЭ СО РАН  
д.ф.-м.н. Н.В. Суровцев



Подпись Н.В. Суровцева заверяю  
Ученый секретарь ИАиЭ СО РАН  
д.т.н. С.В. Михляев