

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Окотруба К. А.
«Исследование замораживаемых биологических клеток
методом комбинационного рассеяния света»
представленной на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – оптика

К настоящему времени спектроскопия комбинационного рассеяния света заняла прочное место среди других оптических методов исследования состава и строения вещества, его фононном спектре и механизмах электрон-фононного взаимодействия. Комбинационное рассеяние (КРС) обладает уникальным набором сильных сторон. КРС является бесконтактным, локальным, позволяет работать с образцами различной конфигурации и фазового состава, и связи с этим в настоящее время широко применяется для исследования самых разнообразных объектов: от электронных компонент до сложных биологических систем. В связи с развитием такого биологического направления, как криоконсервация живых клеток и систем, разработка методов контроля состояния клеток в процессе замораживания с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния, представляется весьма актуальной и своевременной.

Диссертационная работа Окотруба К. А. посвящена отработке методик исследования замораживаемых биологических клеток методом спектроскопии комбинационного рассеяния света. Для решения этой задачи автором разработана экспериментальная методика измерения спектров КРС от одиночных клеток в диапазоне температур от 100 до 300 К, получены и интерпретированы спектры спонтанного и резонансного КРС от замороженных клеток, разработанные методы использованы для исследования состояния замораживаемых эмбрионов мыши.

Диссертация изложена на 101 странице и включает 61 иллюстрацию, 2 таблицы и список литературы из 143 источников. Текст работы разбит на введение, пять глав и заключение.

Во введении обоснована актуальность диссертации, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе приводится краткий литературный обзор, здесь рассмотрены современные подходы криоконсервации биологических клеток, экспериментальные подходы для исследования протекающих при замораживании клеток процессов. Обсуждается методика спектроскопии комбинационного рассеяния света и особенности её применения к сложным биологическим объектам.

Во второй главе подробно описаны разработанные автором экспериментальные методики получения спектров КРС замораживаемых биологических клеток в широком температурном интервале (от 100 до 300 К). Особое внимание уделено оптической схеме созданного диссертантом стенда для микроскопии биологических объектов при низких температурах, коррекции функции

пропускания и стабильности фокусировки. Представлены результаты численного моделирования аппаратной функции конфокального микроскопа для оценки его пространственного разрешения. Описаны оптические криостаты и кюветы, использованные в исследовании, особое внимание уделено вакуумному криостату, разработанному при непосредственном участии диссертанта и использовавшемуся в экспериментах с дрожжевыми клетками. Обсуждается спектр КРС от дрожжевой клетки, измеренный при комнатной температуре, выполнена интерпретация основных спектральных пиков.

Третья глава посвящена исследованию спектральных особенностей в спектрах КРС, обнаруженных автором при замораживании клеток. Представлены и обсуждены результаты исследования распределения продуктов эвтектической кристаллизации в замораживаемом препарате. Обнаруженные дополнительные спектральные линии убедительно интерпретированы как проявление вклада гидрогалита ($\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

В четвертой главе диссертации приведены результаты исследования зарядового состояния цитохромов в замораживаемых клетках. Кратко обсуждается роль цитохромов в клеточном метаболизме, их участие в окислительно-восстановительных реакциях в рамках электрон-транспортной цепи. Обсуждается вопрос фотовыцветания линий цитохромов в спектре резонансного КРС. Показано, что кинетика фотовыцветания может быть описана затухающей экспонентой, параметры которой отражают баланс между окисленными и восстановленными цитохромами под действием излучения. Определена зависимость кинетики фотовыцветания линии РКРС цитохромов от мощности излучения; показано, что процесс фотовыцветания цитохрома проходит с участием двух фотонов. Исследованы температурные зависимости параметров, характеризующих фотовыцветание линий, и показано, что особенность при -15°C связана с образованием льда в образце.

Пятая глава посвящена использованию разработанных подходов для исследования замораживаемых преимплантационных эмбрионов мыши и измерению количества ДНК в ядрах клеток. Предложен метод оценки концентрации криопротекторного раствора в замораживаемом препарате. Показано, что метод КРС позволяет отслеживать состояние липидных структур непосредственно в замораживаемых клетках; в частности, наблюдался фазовый переход липидов в более упорядоченное состояние геля. Приобретенный опыт экспериментов с биобъектами и широкие возможности модификации разработанного стенда микроспектроскопии КРС использованы для решения задачи измерения спектра от клеточных ядер; на примере ядер клеток крови четырех видов показано, что по данным спектроскопии КРС возможно измерение количества ДНК со стандартным отклонением, не превышающим 10 %.

В качестве основных результатов работы следует отметить следующие:

1. Разработка методики получения спектров КРС от замораживаемых дрожжевых клеток и их окружения. Обнаружение и исследование кинетики образования гидрогалита в окружении дрожжевых клеток при замораживании.
2. Результаты исследования процессов выцветания линий резонансного КРС цитохромов. Доказательство существования фотоиндуцированного механизма процесса окисления цитохромов с участием двух фотонов, наряду с естественными окислительно-восстановительными реакциями, протекающими в клетке независимо от облучения. Установление связи скорости выцветания линий резонансного КРС цитохромов с образованием внеклеточного льда при -15°C .
3. Определение температурной зависимости скорости естественных окислительно-восстановительных реакций цитохромов в замораживаемых клетках.
4. Результаты применения спектроскопии КРС для исследования процессов, протекающих при замораживании преимплантационных эмбрионов мыши: измерение локальной концентрации криопротектора в замораживаемом препарате, определение фазового состояния липидов, зарядового состояния цитохромов и скорости выцветания линий цитохромов.
5. Разработка методики измерения количества ДНК в ядрах клеток крови с точностью 10 % с помощью спектроскопии КРС.

По работе имеются следующие замечания технического характера:

1. В автореферате указано, что работа состоит из четырех глав, тогда как на самом деле их пять.
2. На стр. 20 отмечается, что многоканальные ПЗС детекторы и нотч фильтры позволяют значительно повысить чувствительность спектрального оборудования. Строго говоря, это не так. Чувствительность современных фотомножителей не хуже, чем у ПЗС матриц (и те, и другие работают в режиме счета одиночных фотонов); достоинством ПЗС матриц является значительное сокращение времени получения спектра. Нотч-фильтр реально даже незначительно снижает чувствительность спектрального оборудования, однако существенно уменьшает уровень шумов, вызываемых диффузным рассеянием света в приборе.
3. На стр. 39 говорится о «линиях, относящихся к деформационным и валентным колебаниям водорода». Вне контекста остается неясным, о каких колебаниях идет речь: обычно принято для валентных колебаний указывать связь, вдоль которой происходит колебание (то есть два атома), для деформационных колебаний – угол (три атома).
4. На стр. 55 обсуждается «реакция цитохрома, поглотившего фотон и находящегося возбужденном состоянии...». Сложно себе представить столь долгоживущее возбужденное состояние, обеспечивающее участие двух фотонов при столь малых мощностях накачки.

5. В тексте имеется также заметное количество стилистических и синтаксических неточностей.

Отмеченные недостатки не снижают общую ценность работы, сочетающей высокий экспериментальный уровень и квалифицированную интерпретацию результатов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современного спектрального оборудования, статистикой проведенных экспериментов, тщательным анализом применяемых методик и источников возможных погрешностей измерений.

Тема диссертационной работы соответствует паспорту специальности 01.04.05 – оптика. Поставленные задачи решены, а цель диссертационной работы достигнута. Основные результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах, в том числе из списка ВАК, доложены на представительных российских и международных конференциях, хорошо известны специалистам.

Содержание работ и автореферат соискателя соответствует основным положениям диссертации.

Диссертация Окотруба К. А. «Исследование замораживаемых биологических клеток методом комбинационного рассеяния света» является законченной научной работой, содержащей решение актуальной задачи – разработке спектрального метода исследования замораживаемых биологических клеток и контроля происходящих в них процессов. Работа полностью удовлетворяет всем требованиям «Положения о порядке присуждения научным работникам ученых степеней» для кандидатских диссертаций, а её автор, Окотруб Константин Александрович, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук.

Официальный оппонент
Зам. директора Института физики
им. Л. В. Киренского СО РАН
доктор физ.-мат. наук,
старший научный сотрудник

Подпись А. Н. Втюрина заверяю:
Ученый секретарь ИФ СО РАН

660036, г. Красноярск,
Академгородок, 50, стр.38
e-mail: vtyurin@iph.krasn.ru
Телефон: +7(391) 249-42-94



А. Н. Втюрин

С. И. Попков

Список трудов А. Н. Втюрина по теме диссертации:

1. Ekimov A. A., Krylov A. S., Vtyurin A. N., Ivanenko A. A., Shestakov N. P., Kocharova A. G. Vibrational Spectroscopy Studies of Temperature Phase Transitions in $K_3WO_3F_3$. *Ferroelectrics*. – 2010. –V. 401 P. 168–172.
2. Крылов А. С., Крылова С. Н., Втюрин А. Н., Суровцев Н. В., Адищев С. В., Воронов В. Н., Орешонков А. С. Спектр комбинационного рассеяния и фазовые переходы в эльпасолите Rb_2KInF_6 . *Кристаллография*, – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 22–27.
3. Александров К. С., Воронов Н. В., Втюрин А. Н., Крылов А. С., Молокеев М. С., Орешонков А. С., Горяйнов С. В., Лихачева А. Ю., Анчарова И. Структура и динамика решетки фазы высокого давления в кристалле ScF_3 . *Физика твердого тела*, – 2011. – Т. 53, № 3 – С. 527–531.
4. Втюрин А. Н., Герасимова Ю. В., Шестаков Н. П., Иваненко А. А. Влияние замещения центрального атома Me в аммонийных оксифторидах на фазовые переходы: исследование методом ИК-спектроскопии. *Физика твердого тела*, – 2011. – Т. 53, № 4 – С. 784–788.
5. Gerasimova Ju. V., Vtyurin A. N., Ivanenko A. A., Shestakov N. P. IR Spectroscopy Study of $A_2A'MO_3F_3$ Cryolites-Elpasolites. *Ferroelectrics*. – 2011. –V. 416 – P. 108–112.
6. Krylov A. S., Krylova S. N., Vtyurin A. N., Voronov V. N. Oreshonkov A. S. Raman Scattering Study of Temperature Phase Transitions of Rb_2KInF_6 Crystal. *Ferroelectrics*. – 2011. –V. 416 – P. 95–100.
7. Krylov A. S., Goryainov S. V., Vtyurin A. N., Krylova S. N., Sofronova S. N., Laptash N. M., Emelina T. B., Voronov V. N. Babushkin S. V. Raman Scattering Study of Temperature and Hydrostatic Pressure Phase Transitions in Rb_2KTiOF_5 Crystal. *J. Raman Spectroscopy*. – 2011. – V. 43 – P. 577–582.
8. Goryainov S. V., Krylov A. S., Pan Yuanming, Madyukov I. A., Smirnov M. B. Vtyurin A. N. Raman Investigation of Hydrostatic and Nonhydrostatic Compressions of OH- and F-Apophyllites up to 8 GPa. *J. Raman Spectroscopy*. – 2011. – V. 43, – P. 439–447.
9. Vtyurin A. N. Concepts and Methods of 2D Infrared Spectroscopy. By Peter Hamm and Martin Zanni. Book Review. *Journal of Applied Crystallography*. – 2012. – V. 45, no 1. – P. 148–149.
10. Gerasimova Ju. V., Vtyurin A. N. Evans hole in internal modes IR spectrum of $WO_3F_3^{3-}$ ions in $(NH_4)_3WO_3F_3$ crystal. *Chemical Physics Letters*. – 2012. – V. 523, no 1. – P. 144–147.
11. Втюрин А. Н., Крылов А. С., Горяйнов С. В., Крылова С. Н., Орешонков А. С., Воронов В.Н. Исследование фазовых переходов в кристалле Rb_2KInF_6 , индуцированных гидростатическим давлением, методом комбинационного рассеяния света. *Физика твердого тела*. – 2012. – т. 54, № 5. – С. 880–882.

12. Крылов А. С., Меркушова Е. М., Втюрин А. Н., Исаенко Л. И. Исследование динамики решетки оксифторида $\text{Rb}_2\text{KMoO}_3\text{F}_3$ методом комбинационного рассеяния света. *Физика твердого тела*. – 2012. – т. 54, № 6. – С. 1191–1196.
13. Krylov A. S., Krylova S. N., Vtyurin A. N., Laptash N. M., Kocharova A.G. Raman scattering study of Temperature phase transitions in $(\text{NH}_4)_3\text{MoO}_3\text{F}_3$. *Ferroelectrics*. – 2012. – V. 430. – P. 65–70.
14. Горяйнов С. В., Крылов А. С., Лихачева А. Ю., Втюрин А. Н. Исследование методом КР волокнистых цеолитов группы натролита при высоких давлениях водной среды. *Известия РАН. Серия физическая*. – 2012. – т. 76, № 7. – С. 915–918.
15. Krylov A. S., Krylova S. N., Laptash N. M., Vtyurin A. N. Raman scattering study of temperature induced phase transitions in crystalline ammonium heptafluorozirconate, $(\text{NH}_4)_3\text{ZrF}_7$. *Vibrational Spectroscopy*. – 2012. – V. 62. – P. 258–263.
16. Krylov A. S., Sofronova S. N., Kolesnikova E. M., Vtyurin A. N., Isaenko L. I. Lattice Dynamics of Oxyfluoride $\text{Rb}_2\text{KMoO}_3\text{F}_3$. *Ferroelectrics*. – 2012. – V. 440. – P. 52–60.
17. Vtyurin A. N., Krylov A. S., Krylova S. N., Goryainov S. V., Voronov V. N., Oreshonkov A. S. Hydrostatic Pressure-Induced Phase Transitions in Rb_2KInF_6 and Rb_2KScF_6 Crystals: Raman Spectra and Lattice Dynamics Simulations. *Ferroelectrics*. – 2012. – V. 440. – P. 100–104.
18. Krylov A. S., Vtyurin A. N., Oreshonkov A. S., Voronov V. N., Krylova S. N. Structural transformations in a single-crystal Rb_2NaYF_6 : Raman scattering study. *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2013. – V. 44, no 5. – P. 763–769.
19. Krylov A. S., Sofronova S. N., Gudim I. A., Vtyurin A. N. Magnetoelastic interactions in Raman spectra of $\text{Ho}_{1-x}\text{Nd}_x\text{Fe}_3(\text{BO}_3)_4$ crystals. *Solid State Communications*. 2013. – V. 174. – P. 26–29.
20. Горяйнов С. В., Крылов А. С., Втюрин А. Н. Поведение цеолита натролита и фторапатита при высоких давлениях водной среды. *Известия РАН. Серия физическая*. 2013. – Т 77, Вып. 3. – С. 347–350.
21. Герасимова Ю. В., Орешонков А. С., Втюрин А. Н., Иваненко А. А., Исаенко Л. И., Ершов А. А., Погорельцев Е. И. Изучение роли октаэдрических групп при фазовом переходе в кристалле $\text{Rb}_2\text{KMoO}_3\text{F}_3$ методом инфракрасного поглощения. *ФТТ*, 2013. – Т. 55, Вып. 11. – С. 2215–2222.
22. Втюрин А. Н., Крылов А. С., Крылова С. Н., Горяйнов С. В., Орешонков А. С., Воронов В. Н. Комбинационное рассеяние и фазовые переходы во фторидах со структурой эльпасолита В сб. «Комбинационное рассеяние – 85 лет исследований». Ред. А. Н. Втюрин. Красноярск: Изд-во ИФ СО РАН, 2013. – С. 13–24.
23. Крылов А. С., Колесникова Е. М., Крылова С. Н., Втюрин А. Н., Иванов

- Ю. И., Суховский А. А. Исследование фазового перехода в кристалле $\text{Rb}_2\text{KMoO}_3\text{F}_3$: эффект управляемого беспорядка В сб. «Комбинационное рассеяние – 85 лет исследований». Ред. А. Н. Втюрин. Красноярск: Изд-во ИФ СО РАН, 2013. – С. 25–43.
24. Герасимова Ю. В., Александровский А. С., Крылов А. С., Втюрин А. Н., Орешонков А. С., Афанасьев В. П. Спектральные исследования углеродной структуры природных импактных алмазов Попигайской астроблемы В сб. «Комбинационное рассеяние – 85 лет исследований». Ред. А. Н. Втюрин. Красноярск: Изд-во ИФ СО РАН, 2013. – С. 172–179.
25. Krylov A. S., Kolesnikova E. M., Isaenko L. I., Krylova S. N., Vtyurin A. N. Measurement of Raman-Scattering Spectra of $\text{Rb}_2\text{KMoO}_3\text{F}_3$ Crystal: Evidence for Controllable Disorder in the Lattice Structure. *Cryst. Growth & Des.* 2014, – V. 14. – P. 923–927.
26. Krylov A. S., Goryainov S. V., Laptash N. M., Vtyurin A. N., Melnikova S.M., Krylova S. N. Influence of the Molecular Groups Ordering on Structural Phase Transitions in $(\text{NH}_4)_2\text{WO}_2\text{F}_4$. *Crystal. Cryst. Growth & Des.* 2014, – V. 14. – P. 374–380.
27. Krylov A. S., Sofronova S. N., Kolesnikova E. M., Ivanov Yu. N., Sukhovskiy A. A., Goryainov S. V., Ivanenko A. A., Shestakov N. P., Kocharova A.G., Vtyurin A. N. Experimental and theoretical methods to study structural phase transition mechanisms in $\text{K}_3\text{WO}_3\text{F}_3$ oxyfluoride. *Journal of Solid State Chemistry*, 2014 – V. 218. – P. 32–37.
28. Sofronova S. N., Gerasimova Yu. V., Vtyurin A. N., Gudim I. A., Shestakov N. P., Ivanenko A. A. Infrared absorption spectrum of $\text{HoFe}_3(\text{BO}_3)_4$ crystals. *Vibrational Spectroscopy*, 2014. – V. 72. – P. 20–25.
29. Goryainov S. V., Krylov A. S., Vtyurin A. N., Pan Y. Raman study of datolite $\text{CaBSiO}_4(\text{OH})$ at simultaneously high pressure and high temperature. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015. – V. 46. – P. 177–181.
30. Goryainov S. V., Krylov A. S., Vtyurin A. N., Pan Y. Behavior of $\text{CaBSiO}_4(\text{OH})$ Datolite at High Temperatures and Pressures of a Water Medium. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Physics*, 2015. – V. 79, No. 6. – P. 794–797.
31. Орешонков А.С., Ходжибаев А.К., Крылов А.С., Умаров М.Ф., Втюрин А. Н. Изучение поведения мягкой моды при структурном фазовом переходе в кристалле $\text{Pr}_3\text{Sb}_5\text{O}_{12}$ методом спектроскопии комбинационного рассеяния света. *Физика твердого тела*, 2015. – Т. 57, вып. 11. – С. 2218–2221.
32. Втюрин А. Н., Крылов А. С., Софронова С. Н., Герасимова Ю. В., Гудим И. А. Структурные и магнитные фазовые переходы в твердых растворах $\text{Ho}_x\text{Nd}_{1-x}\text{Fe}_3(\text{BO}_4)_3$ – исследование методом комбинационного рассеяния. В сб. «Сегнетоэлектрики: новые возможности». М, МИРЭА, 2015. – С. 28–35.
33. Герасимова Ю. В., Софронова С. Н., Гудим И. А., Орешонков А. С., Втюрин А. Н., Иваненко А. А. Спектры инфракрасного поглощения кристалла

- $\text{Nd}_{0.5}\text{Ho}_{0.5}\text{Fe}_3(\text{BO}_3)_4$. Физика твердого тела, 2016. – Т. 58, вып. 1. – С. 149–153.
34. Chernov A. I. Fedotov P. V. Krylov A. S. Vtyurin A. N., Obraztsova E. D. Heat-induced transformations in coronene-single-walled carbon nanotube systems. Journal of Nanophotonics, 2016. –V. 10. – P. 012504-1 – 012504-7.

Список верен:
Ученый секретарь ИФ СО РАН



С. И. Попков