

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА ФТИ 34.01.03
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе
Российской академии наук
по диссертации

НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК
аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 07.12.2023 № 6

О присуждении Жихоревой Анне Александровне
ученой степени кандидата физико-математических наук

Диссертация «Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах, клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических методов» по специальности 1.3.6 – «Оптика» принята к защите 28 сентября 2023 г., протокол № 4, диссертационным советом ФТИ 34.01.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе Российской академии наук, расположенном по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул. д.26. Диссертационный совет утвержден приказом директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 75, прил. 1 от 12 июля 2019 г., приказами Директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 28 от 16.02.2023 г., № 41 от 25.02.2022 г., № 13 от 09.02.2021 г., № 177 от 11.10.2023 г. об изменении состава диссертационного совета ФТИ 34.01.03 и приказом Директора ФТИ им. А.Ф. Иоффе № 160 от 21.12.2021 г. о внесении изменений в шифры специальностей диссертационных советов.

Соискатель Жихорева Анна Александровна, 26 мая 1995 года рождения, в 2019 году с отличием окончила магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики» по специальности 16.04.01 - «Техническая физика». В 2023 году она окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе Российской академии наук по направлению 03.06.01 - «Физика и астрономия». Кандидатский экзамен по специальности 1.3.6 – «оптика» был успешно сдан соискателем в Физико-техническом институте им. А. Ф.

Иоффе в 2022 г. В настоящее время соискатель работает в должности исполняющего обязанности младшего научного сотрудника в лаборатории оптики биомолекул и кластеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории оптики биомолекул и кластеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Научный руководитель – Васютинский Олег Святославович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией оптики биомолекул и кластеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Дик Ольга Евгеньевна, кандидат физико-математических наук, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории interoцепции Федерального государственного бюджетного учреждения Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, дала положительный отзыв на диссертацию, содержащий 11 замечаний.

2. Петров Николай Владимирович, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цифровой и изобразительной голографии, заведующий лабораторией квантовых процессов и измерений Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», дал положительный отзыв на диссертацию, содержащий 5 замечаний.

Ведущая организация: Акционерное общество «Научно-производственное объединение Государственный Оптический Институт им. С.И. Вавилова» предоставила положительный отзыв на диссертацию, содержащий 5 замечаний. Отзыв подготовлен и подписан доктором физико-математических наук, ведущим научным сотрудником

отдела Н-1.3, Киселевым Валерием Михайловичем и доктором физико-математических наук, профессором, начальником отдела Н-1.3, Белосовой Инной Михайловной, утвержден первым заместителем генерального директора – заместителем генерального директора по научной работе АО «НПО ГОИ им. С.И. Вавилова» доктором технических наук, доцентом Дукельским Константином Владимировичем. В отзыве указано, что содержание диссертации Жихоревой А.А. соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 1.3.6 – «оптика», а соискатель Жихорев А.А. заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6 – «оптика».

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что оба они имеют ученую степень доктора наук, работают в различных организациях, не имеют других ограничений, накладываемых п. 3.7 действующего Положения о присуждении ученых степеней. Выбранные оппоненты являются широко известными специалистами и обладают высоким уровнем компетентности в научной области, в которой выполнена диссертационная работа, что подтверждается их публикациями в рецензируемых научных журналах.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что Акционерное общество «Научно-производственное объединение Государственный Оптический Институт им. С.И. Вавилова» ведет активные исследования в области естественных наук. Проводится изучение физических явлений и процессов, которые могут быть использованы для создания новых приборов и методов. Ведутся активные исследования фотофизических свойств фотосенсибилизаторов, а также процессов генерации активных форм кислорода. В институте в течение почти пятидесяти лет ведутся работы в области голографии, которая является одним из методов исследования, использованных в диссертационной работе. Кроме того, в АО «НПО ГОИ им. С.И. Вавилова» действует диссертационный совет 99.1.004.02 по специальности 1.3.6. «Оптика».

Основные результаты по теме диссертации изложены в 15 публикациях, индексируемых в базе данных Web of Science, и в 19 тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях:

1. Singlet oxygen generation in aerosol jet and on biological surfaces / A. Zhikhoreva [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2022. — Vol. 228. — P. 112395.

2. Comparative analysis of Radachlorin accumulation, localization, and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescence microscopy / A. Zhikhoreva [et al.] // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. — 2022. — Vol. 39. — P. 102973.

3. In vitro monitoring of photoinduced necrosis in HeLa cells using digital holographic microscopy and machine learning / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // *JOSA A*. — 2020. — Vol. 37, no. 2. — P. 346–352.

4. Significant difference in response of malignant tumor cells of individual patients to photodynamic treatment as revealed by digital holographic microscopy / A. Zhikhoreva [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2021. — Vol. 221. — P. 112235.

5. Исследование морфологических изменений клеток злокачественных новообразований при фотодинамическом воздействии методами цифровой голографической микроскопии / Жихорева А. А. [и др.] // *Химическая физика*. — 2019. — Т. 38. — №. 6. — С. 8-14.

6. Machine learning assisted classification of cell lines and cell states on quantitative phase images / A. V. Belashov, A. A. Zhikhoreva [et al.] // *Cells*. — 2021. — Vol. 10, no. 10. — P. 2587.

7. Analysis of Radachlorin localization in living cells by fluorescence lifetime imaging microscopy / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2023. — Vol. 243. — P. 112699.

8. Fluorescence Anisotropy in Radachlorin and Chlorin e6 in Water–Methanol Solutions under One-and Two-Photon Excitation / I. A. Gorbunova, M. E. Sasin, A. A. Zhikhoreva [et al.] // *Photonics*. Vol. 10. — 2022. — P. 9.

9. Analysis of In Vivo Radachlorin Accumulation through FLIMAs-
sisted Examination of Ex Vivo Histological Samples / A. V. Belashov, A. A.
Zhikhoreva [et al.] // Photonics. Vol. 9. — 2022. — P. 711

10. Голографическое исследование отклика клеток линии HeLa
на фотодинамическое воздействие с эндогенно генерируемым прото-
порфирином IX/ Жихорева А. А. [и др.] // Оптика и спектроскопия. –
2022. – Т. 130. – № 2.

11. Photosensitized generation of singlet oxygen in aerosol jet and on
biological surfaces / A. A. Zhikhoreva [et al.] // Single Molecule Spectros-
copy and Superresolution Imaging XIV. Vol. 11650. — SPIE. 2021. — P.
79–85.

12. Application of digital holographic and fluorescence microscopy
for investigation of live cells response to photodynamic treatment using
Radachlorin photosensitizer / A. Belashov, A. Zhikhoreva [et al.] // 2020 In-
ternational Conference Laser Optics (ICLO). — IEEE. 2020. — P. 1–1

13. Investigation of Radachlorin accumulation in 3T3 cells by fluores-
cence microscopy and holographic tomography / A. A. Zhikhoreva [et al.] //
European Conference on Biomedical Optics. — Optica Publishing Group.
2021.— EW4A–19

14. Dynamics of patient-specific malignant cells death at photody-
namic treatment in vitro / A. Zhikhoreva [et al.] // 2020 International Con-
ference Laser Optics (ICLO). — IEEE. 2020. — P. 1–1.

15. Analysis of cellular response to photodynamic treatment with
Radachlorin photosensitizer by means of quantitative phase microscopy us-
ing highly coherent and partially coherent light sources / A. A. Zhikhoreva
[et al.] // Holography, Diffractive Optics, and Applications XII. Vol. 12318.
— SPIE. 2022. — P. 368–375.

На автореферат поступило 8 отзывов.

1. Отзыв доктора физико-математических наук Тучина Валерия Вик-
торовича, члена-корреспондента РАН, заслуженного деятеля науки
РФ, профессора, заведующего кафедрой оптики и биофотоники Фе-
дерального государственного бюджетного образовательного учре-

ждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», положительный, содержит 1 вопрос и 1 замечание:

- Каким образом контролировалась концентрация и пространственное распределение Радахлорина на поверхностях при его распылении?
 - Следовало бы назвать типы органических и неорганических поверхностей, на рис.1 приведены только их номера №1 и №2, правда указано ещё стекло, видимо это единственное неорганическое вещество, на поверхность которого было осуществлено напыление.
2. Отзыв доктора физико-математических наук, Лощёнова Виктора Борисовича, профессора, заведующего лабораторией лазерной биоспектроскопии Центра естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, положительный, замечаний и вопросов не содержит.
3. Отзыв доктора медицинских наук, Балдуевой Ирины Александровны, заведующей научным отделом онкоиммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова», положительный, замечаний и вопросов не содержит.
4. Отзыв доктора физико-математических наук Орловой Анны Олеговны, ведущего профессора МНОЦ ФН, главного научного сотрудника ЦИОТ, руководителя лаборатории «Гибридные наноструктуры для биомедицины» Университета ИТМО, положительный, содержит 3 замечания и 1 вопрос:
- В автореферате не приводится информация о том, какой фотосенсибилизатор является действующим веществом лекарственного препарата Радахлорин. Данная информация представляется чрезвычайно важной, поскольку именно действующее вещество отвечает за эффективность генерации синглетного кислорода.

- В тексте автореферата описаны способы генерации синглетного кислорода в струе аэрозоля водного раствора Радахлорина и на органических и неорганических поверхностях. Из текста автореферата осталось неясным, связаны ли как-то между собой эти два метода, в чем заключается метод генерации синглетного кислорода Радахлорином, нанесенным на поверхности, и как в последнем случае происходило исследование флуоресценции синглетного кислорода и оптических свойств Радахлорина (спектров поглощения, люминесценции).
 - Зависимость квантового выхода и времен затухания люминесценции Радахлорина от уровня кислотности окружения является одним из ключевых результатов работы. При этом в автореферате отсутствует информация о причинах и механизмах появления данной зависимости.
 - На рисунке 5 приведены данные о временных зависимостях соотношения различных типов клеточной гибели от плотности возбуждающего света. Исходя из каких условий были выбраны данные плотности мощности света? Как они коррелируют с условиями облучения пациентов во время сеанса ФДТ с Радахлорином?
5. Отзыв кандидата физико-математических наук Щеславского Владислава Игоревича, заведующего лабораторией оптической спектроскопии и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, положительный, содержит 2 замечания и 1 вопрос:
- Первой задачей диссертации (стр.5) стояла разработка экспериментальной установки для исследования кинетики затухания флуоресценции синглетного кислорода. Между тем, в дальнейшем в реферате отсутствует какая-либо информация о данной установке, несмотря на то, что она является основой многих экспериментов.

- Одним из пунктов научной новизны является пункт о демонстрации увеличения квантового выхода Радахлорина на порядок, а его времени жизни флуоресценции на 1 нс при увеличении водородного показателя от 4 до 9 (пункт 3). Известно, что время жизни флуоресценции прямо пропорционально квантовому выходу флуорофора и обратно пропорционально скорости излучательной релаксации. Таким образом, полученный результат означает, что при увеличении квантового выхода на порядок, должно было произойти также увеличение скорости излучательной релаксации на порядок, чтобы время жизни не сильно варьировалось (от 3.2 до 4.2 нс). Однако непонятен механизм за счет чего при изменении рН происходит такой резкий скачок в скорости излучательной релаксации. В реферате этого нет, есть только констатация факта.
 - В реферате говорится об относительном квантовом выходе флуоресценции Радахлорина и об относительном квантовом выходе фосфоресценции синглетного кислорода. Относительно чего измерялись квантовый выход флуоресценции Радахлорина и фосфоресценции синглетного кислорода?
6. Отзыв доктора технических наук, Минаева Владимира Леонидовича, начальника отделения Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-механических измерений», положительный, замечаний и вопросов не содержит.
 7. Отзыв доктора химических наук, Кузьмина Владимира Александровича, заведующего лабораторией процессоров фотосенсибилизации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, положительный, замечаний и вопросов не содержит.
 8. Отзыв доктора физико-математических наук, Вениаминова Андрея Викторовича, старшего научного сотрудника, ведущего научного сотрудника Центра «Информационные оптические технологии»

Университета ИТМО, положительный, замечаний и вопросов не содержит.

Диссертационный совет отмечает, что в рамках выполненных соискателем работ по исследованию процессов, происходящих в ходе фотодинамического воздействия с генерацией активных форм кислорода фотосенсибилизатором Радахлорин флуоресцентными и голографическими методами были получены следующие основные результаты:

1. Показано, что использование чистого кислорода для генерации аэрозоля приводит к увеличению интенсивности сигнала флуоресценции синглетного кислорода. На органических поверхностях при увеличении концентрации растворенного кислорода наблюдалось резкое уменьшение времени генерации и увеличение относительного квантового выхода флуоресценции синглетного кислорода на $\approx 28\%$.
2. Показано, что уменьшение скорости фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на органических поверхностях по сравнению с неорганическими вызвано уменьшением концентрации кислорода на органических поверхностях вследствие происходящих реакций. Обогащение раствора фотосенсибилизатора Радахлорин кислородом повышает скорость фотообесцвечивания фотосенсибилизатора на поверхностях всех исследуемых типов.
3. Показано наличие зависимостей времени затухания и квантового выхода флуоресценции Радахлорина от кислотности растворителя в диапазоне pH 4–9. Впервые показано, что пространственное распределение фотосенсибилизатора Радахлорин во внутриклеточной среде коррелирует с распределением времен затухания флуоресценции Радахлорина и кислотностью внутриклеточной среды.
4. Продемонстрировано, что при однофотонном возбуждении анизотропия изменялась в районе нуля, а при двухфотонном возбуждении - в районе 0,4 в диапазоне длин волн возбуждения 375–410 нм. Представлено теоретическое обоснование полученных результатов.

5. Разработаны и апробированы алгоритмы анализа фазовых изображений ансамблей клеток, которые позволяют определить морфологические и оптические параметры клеток и автоматически определять изменение их состояния при фотодинамическом воздействии.

Все научные результаты являются новыми и имеют фундаментальную и практическую значимость для понимания процессов, происходящих в ходе фотодинамического воздействия с генерацией активных форм кислорода фотосенсибилизатором Радахлорин. Результаты исследований могут быть использованы для корректной оценки накопления фотосенсибилизатора в клетках и тканях по интенсивности его флуоресценции. Разработанный в рамках работы алгоритм автоматической классификации состояния клетки может быть использован для малоинвазивного анализа устойчивости клеток к видам терапии. Практическая значимость работы заключается в том, что результаты работы могут быть использованы для повышения эффективности фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором Радахлорин.

Высокая степень достоверности результатов и обоснованность положений обеспечивается тем, что результаты работы воспроизводимы и повторяемы, а выводы, сделанные в работе, согласуются с современными представлениями в области исследования процессов, происходящих в ходе фотосенсибилизированной генерации активных форм кислорода. Кроме того, для получения экспериментальных результатов были использованы широко применяемые на практике методы время-разрешенной люминесцентной спектроскопии и цифровой голографической микроскопии.

Полученные результаты позволили соискателю сформулировать и защитить следующие положения:

1. Разработанный метод фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода на органических поверхностях с предварительным обогащением распыляемого раствора фотосенсибилизатора кислородом позволяет повысить эффективность генерации синглетного кислорода.

2. Уменьшение скорости фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на органических поверхностях по сравнению с неорганическими вызвано уменьшением концентрации кислорода на органических поверхностях вследствие происходящих реакций. Обогащение раствора фотосенсибилизатора Радахлорин кислородом повышает скорость его фотообесцвечивания на поверхностях всех исследуемых типов.
3. Квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин увеличивается на порядок, а время затухания флуоресценции увеличивается от 3,2 нс до 4,2 нс при изменении кислотности раствора от $\text{pH} = 4$ до $\text{pH} = 9$. Пространственное распределение фотосенсибилизатора Радахлорин во внутриклеточной среде коррелирует с распределением времен затухания флуоресценции Радахлорина и кислотностью внутриклеточной среды.
4. Значения анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах в момент возбуждения в диапазоне длин волн 375 - 410 нм существенно отличаются при однофотонном и двухфотонном возбуждении и находятся вблизи 0 и 0,4, соответственно.
5. Разработанные алгоритмы сегментации и анализа фазовых изображений ансамблей клеток позволяют определить морфологические и оптические параметры клеток и автоматически определять изменение их состояния при фотодинамическом воздействии.

Все представленные в диссертации результаты получены непосредственно автором или при его активном участии, что подробно указано в текстах диссертации и автореферата. Жихорева А.А. активно участвовала в формулировке задач, постановке экспериментов, получении экспериментальных результатов и проведении анализа полученных результатов. Анализ результатов выполнен совместно с соавторами опубликованных работ при непосредственном участии соискателя.

Основные результаты работы докладывались на 19 научных конференциях, в том числе 14 конференциях международного уровня и на 5 конференциях всероссийского уровня: Laser Optics (Санкт-

Петербург, 2022), Holoexpo (Санкт-Петербург, 2022), European Conferences on Biomedical Optics (online, 2021), SPIE Photonics West BiOS (online, 2021), IX Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2021), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2020), Международной конференции по фотонике и информационной оптике (Москва, 2020), OSA Frontiers in Optics (online, 2020), School of Advanced Science on Modern Topics in Biophotonics (Сан-Карлос, 2019), European Conferences on Biomedical Optics (Мюнхен, 2019), Школе - симпозиуме по голографии, когерентной оптике и фотонике (Екатеринбург, 2019), Международной конференции Физика - наукам о жизни (Санкт-Петербург, 2019), Laser Optics (Санкт-Петербург, 2018), European Cell Death Organization (Санкт-Петербург, 2018), Конгрессе «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2018), Международной конференции Физика.СПб (Санкт-Петербург, 2018), XXX симпозиуме Современная химическая физика (Шепси, 2018), 8 съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 2017), Международной конференции Физика - наукам о жизни (Санкт-Петербург, 2017).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве __ человек, из них _ доктора наук по специальности 1.3.6 - «оптика», участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав диссертационного совета, проголосовали за – 21, против – 0, воздержавшихся – 0.

На заседании 7 декабря 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Жихоревой А.А. ученую степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6 – «оптика».

Заместитель председателя

диссертационного совета

доктор физ.-мат. наук

Чернышев Федор Всеволодович

И.о. ученого секретаря

диссертационного совета

доктор физ.-мат. наук

Попов Алексей Юрьевич

7 декабря 2023 г.