

ЦАЮ»

тора по научной работе и
АО «ГОИ им. С.И. Вавилова»

Л.Н. Архипова

ИДРТА 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**АО «Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова»
на диссертационную работу Белашова Андрея Владимировича
«Развитие методов цифровой голографии и томографии для
исследования эффектов, обусловленных фотосенсибилизированной
генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук
по специальности 01.04.05 - Оптика**

Диссертационная работа Белашова Андрея Владимировича посвящена изучению применения методов цифровой голографии и томографии для исследования процессов, связанных с генерацией активных форм кислорода в растворах и в биологических объектах при использовании в качестве фотосенсибилизатора Радахлорина.

1. Актуальность темы исследований

Интенсивное развитие методов цифровой голографии по сравнению с традиционными аналоговыми методами для исследования оптических параметров объектов в последние годы обусловлено рядом дополнительных преимуществ. Использование для регистрации волновых полей ПЗС камер дает возможность регистрировать, хранить и анализировать большие объемы информации. Несмотря на относительно низкую разрешающую способность ПЗС матриц по сравнению с такими регистрирующими средами, как галогенидосеребряные, фотополимерные и другие подобные среды, привлечение известных методов математической обработки сигналов (преобразование Фурье, преобразование Френеля, метод свертки и других алгоритмов) позволяет восстанавливать амплитуды и фазы волновых фронтов, реализуя при этом голографическую визуализацию наблюдаемых биологических объектов, следить за их изменениями в процессе воздействия на них оптического облучения. Поэтому избранная тема исследований

является, несомненно, актуальной. Тем более, что компьютерная техника визуализации, позволяющая выполнять объемную томографию высокого разрешения уже находит активное применение в изучении живых клеток и, особенно, в исследованиях по фотодинамической терапии рака.

2. Содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 165 страницах и состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 258 наименований и списка литературы по теме диссертации.

Введение диссертации посвящено обоснованию актуальности данной работы, определению цели и задач.

В первой главе диссертации приводится обзор истории развития и современного состояния голографических методов. Выделены наиболее важные области применения цифровой голографической микроскопии и томографии. Описаны основные физические принципы и алгоритмы обработки данных. Кроме того, часть обзора посвящена описанию общей схеме фотодинамической терапии и обсуждению роли синглетного кислорода, а также методам его генерации и детектирования.

Во второй главе диссертации представлены результаты оптимизации цифровой голографии и голографической томографии. Определены алгоритмы обработки и параметры восстановления фазовых распределений из внеосевых цифровых голограмм, обеспечивающие наиболее качественное восстановление голограммы при сравнительно низком отношении сигнал шум. Приведены описание и результаты апробации метода устранения когерентных шумов в цифровой голографической микроскопии с помощью поперечного сдвига исследуемого объекта. Актуальность данного этапа диссертационной работы связана с необходимостью поддержания низкой интенсивности лазерного излучения, воздействующего на клетки. Также рассмотрены случайные и систематические ошибки, возникающие при реализации голографической томографии при восстановлении распределения показателя преломления с помощью метода обратного распространения.

В третьей главе демонстрируется возможность применения внеосевой цифровой голографии для детектирования безызлучательной релаксации возбужденных молекул фотосенсибилизатора и синглетного кислорода в водных растворах. В ходе работы демонстрируется восстановление как осесимметричных температурных градиентов, так и распределений показателя преломления произвольной формы. Сравнение данных о температурном градиенте при наличии или отсутствии цилиндрической

симметрии позволило автору оценить погрешность данного метода. Также было проведено восстановление температурных градиентов при различной концентрации фотосенсибилизатора и кислорода в кювете. В ходе работы было показано, что увеличение этих концентраций приводит к формированию большего градиента температуры в водном растворе фотосенсибилизатора.

Четвертая глава содержит результаты применения методов голографической микроскопии для исследования процессов гибели живых клеток. При этом демонстрируется неинвазивность самого голографического метода, что является одним из основных преимуществ данного подхода перед традиционными методами флуоресцентной микроскопии. Основным результатом представленной работы является разработка голографического метода определения механизмов гибели онкологических клеток при различных дозах фотодинамического воздействия. При этом показано, что незначительная доза воздействия (10 мВт/см^2) вызывает в клетках апоптоз, увеличенная доза ($22 \text{ мВт/см}^2 - 93 \text{ мВт/см}^2$) – некроз.

Результаты голографической регистрации морфологии поврежденных клеток HeLa были подтверждены традиционным методом с использованием бромистого этилия и пропидия иодида.

В работе отмечено, что преимуществом голографического метода определения механизма фотодинамического воздействия на онкологические клетки является высокая скорость обработки данных. Кроме того, этот метод позволяет избежать применения дополнительных реагентов. В результате работы был проведен сравнительный анализ реакции клеток линий A549 и HeLa на фотодинамическое воздействие с использованием фотосенсибилизатора Радахлорина.

Пятая глава посвящена разработке и апробации метода определения морфологических характеристик фиксированных клеток с повышенной точностью. Этот подход основан на детектировании и обработке фазовых распределений дегидратированных клеток в различных оптических средах. При этом за счет дегидратации удастся использовать среды с существенно различающимися показателями преломления, что позволяет повысить точность восстановления пространственных распределений интегрального показателя преломления и толщины клетки в несколько раз.

В заключении подведены итоги и сделаны основные выводы по результатам, полученным в ходе выполнения диссертационной работы.

3. Оценка новизны и достоверности научных результатов

Новизна диссертационной работы обусловлена тем, что в работе рассмотрены различные варианты использования цифровой голографии и томографии и впервые исследовано влияние систематических и случайных погрешностей эксперимента на результаты реализации методов голографической томографии. Кроме того, в ходе выполнения работы был разработан новый неинвазивный подход для детектирования гибели живых клеток различного типа при фотодинамическом воздействии, а также повышена точность определения морфологических характеристик клеток и измерения их пространственного распределения интегрального показателя преломления. Также впервые было проведено восстановление неосесимметричных градиентов температуры, сформированных в результате безызлучательной релаксации возбужденных молекул Радахлорина и синглетного кислорода.

Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, обусловлена широким диапазоном используемых голографических методов, а также выполнением ряда контрольных экспериментов. Все полученные результаты находятся в хорошем согласии с литературными данными и неоднократно докладывались на всероссийских и международных конференциях.

4. Практическая значимость результатов исследования

Практическая значимость работы заключается в разработке и апробации на созданных в процессе работы экспериментальных установках методик цифровой голографии и голографической томографии для исследования реакции живых клеток на фотодинамическое воздействие. Проведенные эксперименты позволили не только отработать методику получения цифровых голограмм и томограмм, но и решить поставленные задачи в области исследования процессов, происходящих в живых клетках. Принимая во внимание неинвазивность цифровой голографической микроскопии, продемонстрированную в диссертационной работе, разработанные методы детектирования клеточной гибели и оценки скорости ее протекания являются весьма перспективными и могут найти широкое применение во многих исследованиях. Выявленные зависимости между экспериментальными погрешностями, возникающими при реализации метода голографической томографии, и качеством восстановления трехмерного распределения показателя преломления, также могут найти применение при разработке и создании оптических приборов.

5. Замечания

Несмотря на общее положительное заключение о диссертации необходимо сделать несколько **замечаний**.

1. Во-первых, надо отметить, что при довольно обширной библиографии (258 цитирований) в обзоре литературы довольно мало ссылок на относительно свежие публикации в области биомедицинских изображений, полученных с применением методов цифровой голографии и томографии, на исследование которых нацелена представленная работа (шесть ссылок за 2017г. [76,150,160,185,213,218], две ссылки за 2018г. [21 и 245] и ни одной за 2019г. А работ за этот период по теме диссертации было довольно много.

2. Во-вторых, описание условий эксперимента и представление результатов измерений не всегда сопровождаются достаточно полной конкретикой. Например, на рис. 2.10. не понятно, какие единицы отложены по оси x (Reconstruction error) в графиках зависимости ошибки восстановления трехмерного распределения показателя преломления тестового объекта от количества голограмм. Почему графики достигают определенного значения, но не стремятся к нулю? Тот же самый вопрос можно отнести и к рис. 2.11б, и рис. 2.12б.

Далее, при описании условий эксперимента (рис. 3.1) не указан световой диаметр лазерного излучения на длине волны 405 нм, применяемого для возбуждения синглетного кислорода. Дана только мощность лазерного излучения (50 мВт). Тогда как в статье с участием автора диссертации при описании этого эксперимента данный параметр указан (1 мм), а он является довольно важным для реализации температурных градиентов. На рис. 3.3 рис. 3.4 и 3.10 не указан поперечный масштаб изображения, который в статье также приведен.

На стр. 82 некорректно описана коллимация регистрируемого пучка излучения флуоресценции с помощью собирающей линзы. Такая схема может обеспечить перпендикулярное падение пучка на входное отверстие фотоприемника только в случае точечного источника, каковым в данном случае флуоресцирующий объект не является. А применяемая линза при этом просто собирает достаточно широкоугольное излучение флуоресценции объекта на входное отверстие фотоприемника.

6. Заключение

Указанные замечания не отражаются на общей положительной оценке представленной диссертации.

Диссертационная работа Белашова Андрея Владимировича «Развитие методов цифровой голографии и томографии для исследования эффектов,

обусловленных фотосенсибилизированной генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках» является законченным научным исследованием по данной тематике, выполненным на высоком профессиональном уровне. Диссертация является качественной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение поставленной задачи по исследованию методов цифровой голографии и томографии, имеющей существенное практическое значение для соответствующей отрасли знаний. Диссертация написана технически квалифицированно и оформлена достаточно аккуратно. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

На основании изложенного считаем, что диссертационная работа Белашова А.В. полностью соответствует специальности 01.04.05 - Оптика и удовлетворяет условиям, установленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением № 842 Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. с внесенными изменениями от 01 октября 2018 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Белашов Андрей Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика.

Отзыв ведущей организации на диссертационную работу Белашова А.В. подготовлен и рассмотрен научным отделением НО-1 по итогам доклада соискателя на научном семинаре НО-1 и одобрен на заседании Научно-технического совета отделения НО-1 АО «ГОИ им. С.И. Вавилова» 4 марта 2020г. (Протокол № 34 от 04.03.2020г.).

Председатель секции НТС АО «ГОИ им. С.И. Вавилова»
Начальник отдела – главный научный сотрудник
Доктор физ.-мат. наук, профессор

Белоусова И.М.

Ведущий научный сотрудник НО-1,
Доктор физ.-мат. наук

Киселев В.М.

Сведения об организации:

АО «Государственный Оптический Институт им. С.И. Вавилова»
199053, Санкт-Петербург, Кадетская линия В.О., д. 5, корп. 2
Тел.: (812) 331-75-50, (812) 328-47-79
E-mail leader@soi.spb.ru
<http://www.npkgoi.ru/>

