

Отзыв официального оппонента
о диссертации Белашова Андрея Владимировича
«Развитие методов цифровой голографии и томографии
для исследования эффектов, обусловленных фотосенсибилизированной
генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках»,
представленной к защите на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук
по специальности 01.04.05 - Оптика

Нарастание социальной значимости онкологических заболеваний при их разнообразии стимулирует концентрацию усилий исследователей на разработке надёжных методов селективного воздействия на раковые клетки и контроля их параметров. Продолжает интенсивно развиваться известный уже десятки лет фотодинамический метод терапии с использованием активных форм кислорода, и весьма **актуально** создание новых методов точной диагностики самого кислорода и результатов его воздействия на клетки, пригодных для определения фазовых оптических неоднородностей и изменений.

Работа Белашова посвящена разработке и применению голографических методов для отслеживания теплового проявления генерации синглетного кислорода и изменений, претерпеваемых клетками при его воздействии. Она **нова** и в отношении собственно голографии, бывшей ещё недавно довольно консервативным разделом оптики, но приобретающей новые формы и содержание при непосредственном активном участии автора диссертации, и в отношении приложения тонких оптических методов для биомедицинской диагностики.

Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Общий объем диссертации составляет 165 страниц, включая 52 рисунка, список цитируемой литературы из 258 наименований, список из 14 публикаций автора по диссертации.

Во **введении** автор обосновывает актуальность работы, формулирует ее цель и задачи, кратко излагает результаты.

Первая глава представляет собой очень представительный обзор литературы по теме диссертационной работы. В ней рассказано о принципах и возможностях цифровой голографии и голографической интерферометрии, в частности, применительно к биологическим объектам. Описаны принцип фотодинамической терапии, варианты гибели живых клеток, методы исследования их морфологии.

Вторая глава посвящена оптимизации восстановления распределения фазового запаздывания, вносимого объектом исследования. Тщательно проанализированы влияние шума и погрешностей различной природы и рассмотрены различные алгоритмы повышения точности восстановления.

Третья глава описывает разработку и применение голографических методов – интерферометрического и томографического – для регистрации температурных градиентов, порождённых преобразованием энергии возбуждения в молекулах сенсибилизатора и синглетного кислорода при различных их концентрациях, с использованием обратного преобразования Абеля и алгоритма обратного распространения. Сопоставление результатов, полученных двумя голографическими методами, между собой

и с результатами прямого измерения фосфоресценции кислорода подтверждает их достоверность.

Четвертая глава посвящена новому методу голографической микроскопии для идентификации и мониторинга различных типов гибели живых клеток двух линий, вызванной фотодинамическим воздействием, в сопоставлении с результатами, полученными традиционным для таких исследований методом конфокальной люминесцентной микроскопии. Выявлены четыре основных вида динамики фазового набега, соответствующие выживанию, апоптозу, некрозу и отложенному некрозу.

Пятая глава посвящена разработке голографического метода восстановления показателя преломления и толщины фиксированных клеток в двух оптических средах с существенно различающимися показателями преломления.

В **заключении** кратко перечислены основные результаты.

Достоверность результатов, изложенных автором в диссертации, и обоснованность сделанных им выводов не вызывают сомнений. Работа хорошо спланирована и качественно выполнена, она основана на детально продуманных и тщательно проведенных оптические экспериментах, подвергнутых квалифицированной математической обработке. Хорошо сочетаются различные голографические и спектроскопические методики, применённые к исследованию модельных растворов и биологических объектов – живых и фиксированных клеток. Скрупулёзно изучена погрешность измерений. Основные результаты полно и своевременно опубликованы в авторитетных рецензируемых изданиях, доложены и обсуждены на конференциях; автореферат правильно отражает содержание диссертации.

Однако, с интересом и удовольствием читая диссертацию, я всё же увидел и поводы для **вопросов и замечаний**.

Неудачна фраза «Благодаря использованию пинхола в конфокальной микроскопии возбуждение и детектирование сигнала флуоресценции происходит не во всем исследуемом образце, а в его небольшом объеме» на стр. 50. Объём пространственной области, в которой локализовано эффективное возбуждение люминесценции, зависит от длины волны возбуждающего излучения и числовой апертуры оптической системы, а конфокальная диафрагма на него не влияет, обеспечивая пространственную фильтрацию только детектируемого излучения.

На стр. 82 говорится о «сигнале фосфоресценции [синглетного кислорода], квантовый выход которого зависел от длительности воздействия лазерного излучения, что обусловлено обесцвечиванием молекул фотосенсибилизатора». Обесцвечивание сенсibilизатора естественно снижает количество генерируемого синглетного кислорода и, следовательно, интенсивность его фосфоресценции, но сомнительно, что оно может влиять на квантовый выход фосфоресценции. Вряд ли речь идёт о фотоселекции, и если бы это было так, то без сомнения следовало бы обсудить причины такой закономерности. Кроме того, фраза построена так, что квантовый выход отнесён к сигналу, в то время как он является характеристикой самой фосфоресценции.

В третьей главе при генерации синглетного кислорода в водном растворе фотосенсибилизатора и детектировании температурного градиента для возбуждения фотосенсибилизатора используется лазерное излучение с длиной волны 405 нм. В то же

время, при исследовании изменений живых клеток, связанных с внутриклеточной генерацией активных форм кислорода, облучение клеток производится на длине волны 660 нм. С чем связана такая разница в выбранных источниках лазерного излучения?

В ходе контрольных экспериментов при мониторинге живых клеток с помощью голографической микроскопии не наблюдается практически никакого изменения среднего фазового набега, внесенного клетками в волновой фронт. Из литературных данных, в том числе цитируемых в диссертации, известно, что эта величина в норме может меняться при переходе клетки из одной фазы жизненного цикла в другой. С чем связано отсутствие таких изменений в довольно длительном, шестичасовом, контрольном эксперименте?

В тексте, в целом хорошо и грамотно построенном, встречается нарушение согласования слов в фразах (один из примеров – в первом замечании); во многих местах, где следовало бы быть запятым, они отсутствуют. В большинстве случаев это не мешает пониманию текста, но, например, фраза «область в которой согласно алгоритму требуется постоянство фазы предметной волны увеличивается» на стр. 61 явно нуждается в разделителях.

Сделанные замечания не имеют принципиального характера, не затрагивают защищаемых положений, не снижают ценности результатов.

Я считаю, что диссертационная работа А.В. Белашова **соответствует** требованиям «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук», утвержденного директором ФТИ им. А.Ф. Иоффе 19.08.2019, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Белашов Андрей Владимирович несомненно **заслуживает** присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика.

Официальный оппонент

Вениаминов Андрей Викторович

доктор физико-математических наук,

старший научный сотрудник,

ведущий научный сотрудник Центра «Информационные оптические технологии»,

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

197101 г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д.49

телефон: +7(911)2108227

электронная почта: avveniaminov@itmo.ru



?/A