

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора физ.-мат. наук Шамрая Александра Валерьевича
на диссертацию Белашова Андрея Владимировича «Развитие методов цифровой голографии и томографии для исследования эффектов, обусловленных фотосенсибилизированной генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика.

Диссертация Белашова Андрея посвящена развитию и применению методов цифровой голографии для исследования эффектов связанных с фотосенсибилизированной генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках.

Востребованность и актуальность этих исследований обусловлена тем, что активные формы кислорода играют важную роль во многих биологических процессах, и лежат в основе фотодинамической терапии, одного из перспективных методов лечения онкологических заболеваний. Основная трудность детектирования синглетного кислорода в растворах и клетках с помощью традиционных методов спектроскопии связана с крайне малой вероятностью излучательной релаксации молекулы кислорода из возбужденного синглетного состояния в основное триплетное. Кроме того, продолжительное и непрерывное изучение механизмов гибели фотосенсибилизированных живых клеток с помощью наиболее широко используемых методов флуоресцентной микроскопии также весьма затруднительно из-за высокой чувствительности фотосенсибилизированных клеток к оптическому излучению. В рамках диссертационной работы основные преимущества цифровой голографии успешно используются для разработки новых подходов к детектированию безызлучательных переходов молекул синглетного кислорода и фотосенсибилизатора, а также проводится разработка новых оптических методов для идентификации и исследования механизмов клеточной гибели.

Диссертация состоит из введения, заключения, первой главы, посвященной обзору литературы, и четырех глав, где описывается работа, основные результаты которой отражены в защищаемых положениях.

В первой главе четко формулируются цель и задачи, выполняемые в рамках научной работы, а также приводится развернутый литературный обзор истории развития и современного состояния цифровой голографии и голографической томографии. Кроме того, в первой главе приводится

краткое описание других существующих методов изучения процессов связанных с фотосенсибилизированной генерацией активных форм кислорода в растворах и клетках, отмечены их основные преимущества и ограничения.

Вторая глава посвящена оптимизации цифровой голографии и голографической томографии для восстановления двумерных распределений фазового набега и трехмерных распределений показателя преломления. Полученные результаты позволяют повысить качество восстановления фазовых картин живых клеток при низкой интенсивности зондирующего лазерного излучения, что особенно актуально при работе с фотосенсибилизированными клетками. Также в работе проведено исследование влияния на получаемые результаты основных типов погрешностей, возникающих при реализации метода голографической томографии. Результаты, описанные в первой главе диссертации, впоследствии используются автором для повышения точности получаемых данных в дальнейших исследованиях.

В третьей главе представлены результаты использования голографического подхода для детектирования температурных градиентов, сформированных безызлучательными переходами при фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода в водных растворах. Рассматриваются случаи восстановления температурного градиента произвольной формы, а также при наличии цилиндрической симметрии. Проводится оценка точности данных, полученных с помощью метода голографической томографии, и приводятся данные о температурных градиентах, сформированных при различной концентрации фотосенсибилизатора и кислорода в водном растворе.

Четвертая глава посвящена применению голографической микроскопии для детектирования различных типов клеточной гибели и апробации данного метода. При этом в работе делается акцент на неинвазивности голографического мониторинга живых клеток даже при наличии фотосенсибилизатора. Разработанный метод основан на анализе изменения среднего фазового набега, внесенного живыми клетками, а также их сухой массе и позволяет выделить четыре различных сценария, соответствующих различным дозам фотодинамического воздействия. Полученные результаты были подтверждены традиционными биологическими тестами с использованием флуоресцентных красителей. Кроме того, в работе

демонстрируется возможность исследования морфологических преобразований клеток с помощью голографической томографии.

В пятой главе представлен результат разработки метода определения морфологических и оптических характеристик фиксированных клеток с повышенной точностью, достигнутой за счет их дегидратации и исследования образца в средах с существенно различающимися показателями преломления. Приводятся оценки погрешности разработанной экспериментальной методики, и демонстрируется повышение точности определения показателя преломления в 10 раз.

В заключении диссертационной работы сформулированы основные результаты диссертации, отмечена практическая значимость работы.

В целом, диссертационная работа Белашова является законченным научным исследованием и производит очень хорошее впечатление.

Достоверность полученных результатов и выводов подтверждается использованием широко применимых оптических методов цифровой голографии и голографической томографии. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей и неоднократно докладывались на всероссийских и зарубежных конференциях. Материалы автореферата полностью соответствуют материалам диссертации.

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты обладают несомненной **научной новизной**. Они позволяют повысить точность восстановления цифровых голограмм и распределений показателя преломления, на основе оптических методов детектировать и оценивать скорость гибели клеток при внешних воздействиях, а также точно измерять их оптические параметры. Впервые было исследовано влияние случайных и систематических погрешностей на результат восстановления трехмерных распределений показателя преломления с использованием алгоритма обратного распространения и продемонстрировано измерение произвольных температурных градиентов сформированных в результате безызлучательной релаксации молекул синглетного кислорода и фотосенсибилизатора.

Практическая значимость полученных результатов, прежде всего, заключается в создании альтернативных методов исследования процессов, связанных с активными формами кислорода. Кроме того, проведенные исследования по оптимизации и исследованию точности методов цифровой голографии и голографической томографии позволяют использовать эти методы и при исследовании более широкого класса задач. Разработанные

методы исследования синглетного кислорода в растворах и методы оценки характеристик клеток могут найти применение в качестве новых оптических подходов в молекулярной физике и биофизике.

В то же время по работе можно сделать следующие **замечания**:

- В первой главе представлен достаточно обширный литературный обзор, однако в представленном тексте нет прямых отсылок к сформулированным в конце главы задачам исследований. В обзоре практически не представлены вопросы, связанные с погрешностями, шумами и искажениями, не акцентировано внимание, чем измерение градиента температур в растворах живых клеток отличается от измерения градиента температур, например в стеклянных оптических элементах, и как структурные изменения клеток влияют на их оптические характеристики и насколько сложно детектировать данные изменения.

- В литературном обзоре и дальше в тексте диссертации используемые математические методы обработки изображений представлены недостаточно подробно. Приведены только базовые выражение и формулы, вопросы цифровой обработки практически не разбираются, а ведь понятие «цифровая голография» не случайно выделено из более общего раздела оптических наук «голография». Именно численные методы обработки дискретных сигналов, заменяющие аппаратные методы формирования изображений в классической голографии, во многом определяют возможности и применимость цифровой голографии к решению той или иной задачи.

- Описание используемых в работе экспериментальных установок дано иллюстративно без достаточной аргументации выбора используемых компонентов и схемотехнических решений. Почему используется интерферометр Маха-Цендера? Из каких соображений выбрана длина волны и мощность лазерного источника? Какое было разрешение камеры и размер пикселя? Эти и другие детали, которые возможно кажутся автору очевидными, необходимы для более глубокого понимания результатов работы.

- Есть несколько замечаний ко второй главе, где автор рассматривает различные методы повышения качества восстанавливаемых изображений. Не рассмотрена природа аддитивного шума. Связан он с рассеянием на хаотически движущихся объектах, или это в чистом виде шум матрицы фотоприемников, или еще что-то другое? Без знания природы шумов непонятно насколько правомочно используемое в работе описание

Гауссовым распределением. В работе проведена оптимизация фильтрации в Фурье пространстве с точки зрения размера области обработки. Хотелось бы понимать, насколько оптимальная по используемым критериям фильтрация снижает пространственное разрешение относительно предельного значения, определяемого разрешением камеры. Устраняемый в работе «когерентный шум» на самом деле шумом не является. Фактически это детерминированный паразитный сигнал (сигнал помехи). Для устранения данного сигнала помехи используется аппаратный метод сдвига. Почему не могут быть использованы программные методы, принимая во внимание бурное развитие области вычислительной математики, связанной с обработкой и улучшением цифровых изображений?

- В третьей главе приведены данные по измерениям температурных градиентов в жидкости, при этом максимальный нагрев происходил на значительную величину (до 1 °С). Из описания полученных изображений непонятно, видны ли и как проявляются конвекционные потоки, которые должны возникать при столь значительном локальном нагреве.

- В четвертой главе показано, что динамика изменения среднего фазового набега может быть использована для идентификации различных механизмов фотодинамического воздействия на клетки. Поскольку в качестве критерия используется среднее значение фазового набега, возникает вопрос, почему нельзя применить существенно более простые интегральные методы оптических измерений, например, просто измеряя рассеянный свет или интегральный фазовый набег?

- В пятой главе, посвященной методике определения толщины и показателя преломления фиксированных клеток даны оценки погрешности определения данных характеристик, которые зависят от абсолютной погрешности измерения фазовой задержки. Погрешность измерения фазовой задержки оценивается как $0,10 \div 0,15$ рад. Чем определяется столь высокая погрешность измерения фазы и как она может быть улучшена?

Указанные замечания не снижают общей ценности диссертационной работы и не влияют на практические результаты диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Белашова А.В. является научно-квалификационной работой, в которой содержатся важные результаты по развитию и применению методов цифровой голографии и томографии для исследования эффектов, связанных фотосенсибилизированной генерацией

активных форм кислорода. Работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-Техническом институт им. А.Ф.Иоффе», утвержденного директором ФТИ им. А.Ф.Иоффе (ред. от. 19.08.2019), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Белашов Андрей Владимирович заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.05 – Оптика.

Официальный оппонент,
д.ф.-м.н., главный научный сотрудник
Физико-технического института
им. А.Ф. Иоффе, ЛАБ. КВАНТОВОЙ ЭЛЕКТРОНИКИ

17.03.2020

194021, Россия, Санкт-Петербург,
Ул. Политехническая , 26
+7 (812) 297-2245

 (Шамрай А.В.)

Подпись Шамрая А.В. заверяю
Ученый секретарь Физико-технического
института им. А.Ф. Иоффе
кандидат физико-математических наук



Татров М.И.)

