

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель генерального директора –
заместитель генерального директора
по научной работе
АО «НПО ГОИ им. С. И. Вавилова»
доктор технических наук, доцент

К. В. Дукельский
«16» 11 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

АО «НПО Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова»
на диссертационную работу Жихоревой Анны Александровны
«Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин в растворах,
клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических
методов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук по специальности 1.3.6 – Оптика

Диссертационная работа Жихоревой Анны Александровны посвящена изучению фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин, связанных с генерацией активных форм кислорода в растворах, клетках и на органических поверхностях биологических объектов с помощью флуоресцентных и голографических методов.

1. Актуальность темы исследований

Фотодинамическая терапия, основанная на селективном накоплении в опухолевых тканях молекул фотосенсибилизаторов и локальном облучении их светом с длиной волны, соответствующей полосе поглощения молекул фотосенсибилизатора, является одним из перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний. Поэтому исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин в условиях различного микроокружения необходимо для получения важной информации для подбора доз светового облучения и режимов фотодинамического воздействия при применении этого фотосенсибилизатора. Использование одновременно и неинвазивных методов исследования, к которым относится цифровая голографическая микроскопия, позволяющая получать количественные данные об объекте по фазовым изображениям клеток и их отклике на фотодинамическое воздействие, в комбинации с другими методами исследования способствует существенному улучшению персонализированной терапии.

Поэтому избранная тема исследований является, несомненно, актуальной. Тем более, что компьютерная техника визуализации, позволяющая выполнять объемную голографическую 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, четырех глав, заключения и списка литературы из 220 наименований и списка литературы по теме диссертации.

Введение диссертации посвящено обоснованию актуальности данной работы, определению цели и задач работы, изложению научной новизны и практической значимости представляемой работы.

В первой главе диссертации приводится обзор литературы по теме диссертационной работы. В ней приводятся основные сведения о современном состоянии исследований процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов и параметров их флуоресценции, описаны основные области применения флуоресцентной спектроскопии и микроскопии для изучения процессов фотодинамического воздействия. Описаны принципы и механизмы фотодинамического воздействия, а также сопровождающие его процессы в растворах и клетках. Представлены основные методы количественной фазовой визуализации для исследования биологических объектов, а также приведены основные направления автоматизации голографического мониторинга и классификации фазовых объектов.

Во второй главе диссертации представлены результаты исследований изменений параметров фосфоресценции синглетного кислорода и процессов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора радахлорин при разных условиях оксигенации в ходе его напыления на органические поверхности. Рассмотрено влияние уровня растворенного кислорода в водном растворе радахлорина на интенсивность сигнала фосфоресценции синглетного кислорода в мелкодисперсной струе аэрозоля, на времена жизни и генерации синглетного кислорода, на относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода и скорость протекания процессов фотообесцвечивания радахлорина на разных органических поверхностях.

В третьей главе представлены результаты по комплексному исследованию сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора радахлорин с временным разрешением в растворах и во внутриклеточной среде. Представлены результаты исследования влияния кислотности, вязкости и полярности на параметры флуоресценции радахлорина: время затухания, на относительный квантовый выход, анизотропию флуоресценции и время вращательной диффузии. Описаны результаты исследования влияния условий микроокружения молекул фотосенсибилизатора на фотосенсибилизированную генерацию синглетного кислорода в зависимости от pH и полярности раствора. Проведены исследования параметров сигналов флуоресценции радахлорина в зависимости от свойств микроокружения во внутриклеточной среде.

В четвертой главе описаны разработанные подходы и результаты работ по автоматизации голографического мониторинга, показана возможность определения реакции клеток на фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором радахлорин на основе анализа их оптических и морфологических параметров с помощью алгоритмов машинной классификации. Проведены эксперименты по голографическому мониторингу реакции клеток солидных опухолей на фотодинамическое воздействие, позволяющие оценить эффективность этого воздействия.

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 методы генерации синглетного кислорода на органических и неорганических поверхностях при напылении на них раствора фотосенсибилизатора и его возбуждении в полосе Соре. Кроме того, в ходе выполнения работы обнаружено и исследовано различие в скоростях фотообесцвечивания фотосенсибилизатора в зависимости от типа поверхности и от концентрации растворенного кислорода. Показано, что тип поверхности напыления практически не влияет на время жизни синглетного кислорода. Также

показано, что квантовый выход флуоресценции фотосенсибилизатора радахлорин увеличивается на порядок при изменении кислотности раствора от $\text{pH} = 4$ до $\text{pH} = 9$. На основе анализа интенсивности и времени затухания флуоресценции фотосенсибилизатора с использованием флуоресцентной микроскопии предложен и реализован новый метод комплексного неинвазивного мониторинга живых клеток с использованием их цифровых голограмм для определения эффективности фотодинамического воздействия и классификации состояния клеток разных типов с помощью алгоритмов машинного обучения.

Достоверность полученных результатов и сделанных в работе выводов обусловлена использованием широко применяемых на практике методов время-разрешенной люминесцентной спектроскопии, а также цифровой голографической микроскопии для изучения отклика клеток на внешнее воздействие. Обработка и восстановление фазовых изображений клеток, вычисление их параметров и разработка алгоритмов классификации состояния клетки проводилась по широко распространенным в экспериментальной практике методикам голографического мониторинга и классификации фазовых объектов. Полученные в работе результаты хорошо согласуются с литературными данными и результатами других авторов.

4. Практическая значимость результатов исследования

Практическая значимость работы заключается в разработке и апробации на созданных в процессе работы экспериментальных установках методик комплексного исследования фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин, применяемого для фотодинамической терапии онкологических заболеваний и инактивации бактерий и вирусов в разных условиях микроокружения. Результаты проведенных исследований могут быть использованы для повышения эффективности фотодинамической терапии в клинической практике.

5. Замечания

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

1. Исследование процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизатора радахлорин на поверхности образцов, по-видимому, целесообразнее было бы проводить при облучении образцов красным светом, который обычно применяется в фотодинамической практике, и в связи с этим представляет определенный практический интерес, вместо излучения в пике Сорэ на длине волны 405 нм, который такого интереса не представляет.

2. Недостаточно оправдано использование метода струйного раствора для исследований применительно к онкологии, более практически значимо применение этого метода лишь для инактивации вирусов на поверхностях.

3. На стр.74 и далее обсуждается влияние концентрации спиртов на квантовый выход флуоресценции радахлорина и время затухания флуоресценции в зависимости от концентрации водно-спиртовых растворов. Однако не указывается ни концентрация радахлорина, ни единицы концентрации спиртов (объемные, весовые или молярные). Из общих соображений можно предположить, что использованы весовые или объемные проценты. Хотя указанное недоразумение не оказывает влияния на дальнейшие выводы.

4. На рис. 5 автореферата и рис. 4.13 диссертации представлен довольно резкий переход от плотности мощности ФДВ с превалированием гибели клеток в процессе апоптоза к плотности ФДВ с превалированием некротической гибели клеток. Представляло бы интерес определение порогового значения плотности мощности ФДВ,

при котором начинается заметный переход превышения гибели клеток от апоптоза к некрозу.

5. В описании содержания работы в автореферате утверждается, что во введении приводится обзор научной литературы по изучаемой проблеме, тогда как обзор литературы по теме диссертации представлен в отдельной первой главе. Надо полагать, что это просто оговорка, никак не влияющая на качество диссертационной работы, так же как и четыре других замечания.

6. Заключение

Диссертационная работа Жихоревой Анны Александровны «Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин в растворах, клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических методов», 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 фотофизических свойств фотосенсибилизатора радахлорин, 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 Жихоревой А.А. полностью соответствует специальности 1.3.6 - Оптика и удовлетворяет требованиям, установленным в Постановлении Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 18.03.2023) «О порядке присуждения ученых степеней» и в Положении о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, предъявленным к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Жихорева Анна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6 - Оптика.

Отзыв ведущей организации на диссертационную работу Жихоревой А.А. подготовлен и рассмотрен научным отделением Н-1.3 по итогам доклада соискателя на научном семинаре отделения Н-1.3, состоявшемся 3 ноября 2023г., и одобрен на заседании Научно-технического совета (НТС) АО «НПО ГОИ им. С.И. Вавилова» 16 ноября 2023г. (Протокол № 6 от 16.11.2023г.).

Ведущий научный сотрудник Н-1.3,
Доктор физ.-мат. наук

Киселев В.М.

Начальник отдела Н-1.3,
Доктор физ.-мат. наук, профессор

Белоусова И.М.

Сведения об организации:

АО «НПО Государственный Оптический Институт им. С.И. Вавилова»

192171, Санкт-Петербург, ул. Бабушкина, д. 36, корпус 1

Тел.: +7 812 386 73 16

E-mail info@goi.ru

<http://goi.ru/>