

ОТЗЫВ

официального оппонента д.ф.-м.н. Петрова Николая Владимировича на диссертацию Жихоревой Анны Александровны «Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах, клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических методов», представленную на соискание степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. – Оптика.

Диссертационная работа Жихоревой Анны Александровны посвящена комплексному исследованию фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин и анализу его влияния на живые клетки с помощью двух групп оптических методов: время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии/микроскопии и цифровой голографической микроскопии. Работа охватывает ряд задач, связанных с анализом время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в различных условиях, с исследованием изменений квантового выхода синглетного кислорода в зависимости от параметров микроокружения, изучением механизмов фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора на органических поверхностях, а также с определением реакции живых клеток на фотосенсибилизированную генерацию активных форм кислорода.

Новизна диссертационной работы заключается в комплексном исследовании характеристик фотосенсибилизатора Радахлорин в различных условиях с помощью современных оптических методов. Так, с помощью метода время-разрешенной спектроскопии впервые исследованы времена затухания флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин и квантовый выход генерации синглетного кислорода в различных условиях микроокружения молекул фотосенсибилизатора, в том числе в зависимости от кислотности и полярности среды, а также в разных областях живых клеток различных типов. Новыми также являются результаты работы, связанные с исследованием процессов генерации синглетного кислорода на органических и неорганических поверхностях, а также с анализом различий в скорости фотообесцвечивания фотосенсибилизатора в разных условиях оксигенации. Здесь отдельно следует выделить предложенный на основе проведенных исследований оригинальный метод повышения генерации синглетного кислорода путем предварительного насыщения раствора фотосенсибилизатора кислородом. И наконец, разработанная для анализа состояния клеток после фотодинамического воздействия методика автоматической обработки фазовых изображений, получаемых методом цифровой голографической микроскопии, также является новой.

Актуальность проводимых исследований обусловлена перспективностью применения метода фотосенсибилизированной генерации синглетного кислорода и активных форм кислорода для лечения широкого класса онкологических и вирусных заболеваний. В диссертационной работе Анны Александровны проводится комплексное исследование свойств фотосенсибилизатора Радахлорин, используемого в клинической практике при лечении онкологических заболеваний. Проведенные Жихоревой А.А. исследования характеристик фотосенсибилизатора Радахлорин при различных параметрах микроокружения, а также процессов его фотообесцвечивания позволяют сделать важные выводы об эффективности использования этого фотосенсибилизатора и оптимизировать протоколы его применения на практике.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав, где изложены основные результаты работы соискателя, заключения и списка литературы из 220 наименований. Содержание работы изложено на 165 страницах, которые содержат 49 рисунков и 6 таблиц.

В первой главе диссертации обсуждается современное состояние исследований, направленных на определение оптических свойств фотосенсибилизаторов с помощью время-разрешенных методов спектроскопии, приводится анализ процессов фотообесцвечивания и рассматриваются методы фазовой визуализации для исследования биологических объектов.

Вторая глава диссертационной работы посвящена изучению процесса генерации синглетного кислорода и сопутствующего ему процесса фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин в различных условиях на органических и неорганических поверхностях. Регистрация время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода позволила автору работы количественно определить эффективность генерации синглетного кислорода при разных условиях нанесения фотосенсибилизатора на поверхности. Был предложен метод повышения эффективности генерации синглетного кислорода на поверхностях путем обогащения раствора фотосенсибилизатора кислородом. Проведенное исследование динамических свойств Радохлорина при его нанесении на поверхности с различными характеристиками выявило различия фотообесцвечивания данного фотосенсибилизатора.

Третья глава посвящена анализу время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в различных условиях микроокружения молекул фотосенсибилизатора. Представленные результаты свидетельствуют о сильном влиянии кислотности и полярности окружающей среды как на время жизни возбужденного состояния молекул фотосенсибилизатора и квантовый выход его флуоресценции, так и на количество генерируемого синглетного кислорода. Регистрация время-разрешенных поляризованных сигналов флуоресценции Радахлорина позволила определить зависимость анизотропии флуоресценции от длины волны возбуждения при одно- и двух-фотонном возбуждении. Анализ время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина в клетках позволил косвенно продемонстрировать преимущественное накопление фотосенсибилизатора в лизосомах, отличающихся повышенным уровнем кислотности среды.

В четвертой главе представлены результаты развития и использования метода количественной фазовой визуализации для анализа клеток. Соискателем описаны алгоритмы автоматической сегментации клеток на фазовых изображениях, а также методы определения ряда оптических и морфологических характеристик живых клеток. Представлены результаты фазового мониторинга клеток опухолей человека в ходе фотодинамического воздействия с Радахлорином. На основе извлекаемых из фазовых изображений клеточных параметров предложено использование алгоритмов машинного обучения, направленных на определение типа и состояния клеток до и после фотодинамического воздействия.

В заключении сформулированы основные выводы диссертационной работы.

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов и предложенных моделей не вызывает сомнений. Работа хорошо спланирована и проведены

все необходимые контрольные эксперименты. При получении результатов были использованы хорошо известные оптические методы, а сами результаты хорошо согласуются с литературными данными.

Важно отметить, что полученные Анной Александровной результаты обладают **высокой практической значимостью**, поскольку они позволяют оптимизировать и повысить эффективность протоколов фотодинамической терапии с использованием клинически одобренного фотосенсибилизатора Радахлорин. Проведенный анализ скоростей фотообесцвечивания фотосенсибилизатора и полученные в результате диссертационного исследования сведения об эффективности генерации синглетного кислорода на поверхностях будут полезны при использовании фотодинамического воздействия в антивирусной и антибактериальной терапии.

В целом, работа Жихоревой Анны Александровны производит хорошее впечатление. В ней содержится обширное исследование свойств фотосенсибилизатора Радахлорин с помощью уже существующих оптических подходов, при этом предложены и апробированы новые оптические методы, основанные на количественной обработке флуоресцентных и фазовых изображений. Полученные результаты опубликованы в 15 публикациях в авторитетных рецензируемых журналах и представлены на 19 всероссийских и международных конференциях. Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

В качестве **достоинств** отдельно хотелось бы выделить следующие аспекты данной работы:

1. Исследованная зависимость квантового выхода флуоресценции фотосенсибилизатора от кислотности может быть использована для более корректного определения концентрации накопленного фотосенсибилизатора в разных областях клеток.
2. Установленная корреляция между нарастанием сигнала фосфоресценции и увеличением концентрации кислорода в растворе может быть использована для дальнейшего развития методов фотодинамической терапии.

Вопросы и замечания по работе:

1. В разделе 2.1 на рисунке 2.2 рассматривается люминесценция синглетного кислорода в струе аэрозоля. Продемонстрировано уменьшение сигнала фосфоресценции при удалении от сопла, что автором работы было связано с изменением концентрации при расширении струи. Однако на изменение сигнала также могло влиять изменение мощности возбуждения из-за поглощения в разных частях струи аэрозоля. Были ли проведены оценки изменения эффективности возбуждения фотосенсибилизатора в разных частях струи аэрозоля?
2. На рисунке 2.4 на странице 46 не указана погрешность по оси времени. При изучении диссертации создалось впечатление, что контроль времени прокачки раствора кислородом проводился вручную. Это могло приводить к некоторым неточностям при отображении точек относительно горизонтальной оси. Какова погрешность измерения времени прокачки кислородом раствора и насколько сильно она могла повлиять на исследуемый сигнал фосфоресценции синглетного кислорода и динамику изменения концентрации кислорода в растворе?

3. В разделе 2.3 проводится изучение скорости фотообесцвечивания при постоянном облучении раствора. Происходил ли при этом нагрев поверхности и нанесенного раствора и если да, то влиял ли он на скорость фотообесцвечивания?
4. В ходе аппроксимации экспериментальных данных, приведенных на рисунке 2.8, двухэкспоненциальной функцией были получены параметры, указанные в таблице 2, при этом нигде не указана точность аппроксимации.
5. Фотосенсибилизатор Радахлорин состоит из трех флуоресцирующих компонент, однако при исследовании времени затухания флуоресценции и при анализе анизотропии сигнал флуоресценции анализируется как от однокомпонентного раствора.

Указанные вопросы и замечания не снижают научной значимости и общей положительной оценки диссертационной работы.

Считаю, что диссертация Жихоревой Анны Александровны «Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах, клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических методов» является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором на высоком научном уровне. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.6. – Оптика согласно Положению о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук, а ее автор А.А. Жихорева заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук.

Официальный оппонент

доктор физико-математических наук по специальности 01.04.05. – Оптика,
ведущий профессор НОЦ фотоники и оптоинформатики,
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»

«25» 11 2023 г.

Н.В. Петров

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, Кадетская линия В.О., д. 3, корп. 2, лит. А, 203

Телефон: +7(905)204-91-58

e-mail: n.petrov@niuitmo.ru