

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Анны Александровны Жихоревой

«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 А.А. Жихоревой выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Физико-техническом институте им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук.

Работа посвящена исследованию свойств флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин, а также его способности генерировать синглетный кислород в разных модельных условиях.

Несмотря на то, что в последние десятилетия были синтезированы десятки веществ, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами и применяющихся в клинике, многие из них имеют такие недостатки как длительное удержание в организме, являющееся причиной фототоксичности, относительно невысокая селективность накопления в опухолевой ткани, невысокий квантовый выход синглетного кислорода, образующегося при лазерном облучении фотосенсибилизатора и вызывающего гибель клеток патологических тканей. В связи с этим выявление физических механизмов влияния параметров растворов и внутриклеточной среды на характеристики флуоресценции одного из активно используемого производимого в России фотосенсибилизатора Радахлорин чрезвычайно актуально и для физики, и для медицины.

Основными методами, используемыми в работе, являлись время-разрешенная спектроскопия и голографическая микроскопия как метод мониторинга динамики изменений параметров клеток, происходящих в результате фотодинамического воздействия.

Достоверность полученных результатов и сделанных выводов обусловлена тщательностью проведенных экспериментов с использованием самой современной аппаратуры и методов измерений, а также соответствием с опубликованными ранее данными.

Разработанный автором новый алгоритм с использованием машинного обучения имеет большие перспективы для автоматического анализа реакции больших массивов клеток на фотодинамическое воздействие с применением фотосенсибилизаторов.

Полученные новые результаты могут быть использованы для более точной оценки накопления фотосенсибилизатора в клетках и значительного повышения эффективности

фотодинамической диагностики и терапии широкого класса онкологических и вирусных заболеваний.

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка публикаций автора, обширного списка цитируемой литературы и списка сокращений. Общий объем диссертации – 165 страниц.

Во введении автором обосновывается актуальность работы, сформулированы ее цели, задачи, и основные положения, выносимые на защиту. Также описаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе сделан обзор литературы по теме диссертационной работы. Описано современное состояние исследований процессов фотообесцвечивания фотосенсибилизаторов и параметров их флуоресценции, а также рассмотрены используемые для этого методы анализа процесса фотообесцвечивания фотосенсибилизатора в водных и органических растворах, методы время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии и микроскопии, позволяющие определять пространственные распределения времен затухания фотосенсибилизатора в гистологических срезах тканей.

Описаны методы количественной фазовой визуализации на основе изучения изменений фазы оптического излучения, проходящего через биологические ткани с последующим голографическим мониторингом клеток и определением изменения массы клеток в ходе воздействия.

Во второй главе представлены результаты исследования параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции синглетного кислорода и динамики фотообесцвечивания растворов фотосенсибилизатора Радахлорин при разных условиях насыщения кислородом в ходе его напыления на органические поверхности. В работе показано, что при увеличении концентрации растворенного кислорода в растворе фотосенсибилизатора Радахлорин, напыляемого на поверхности, происходит резкое уменьшение времени генерации синглетного кислорода, а также увеличение относительного квантового выхода фосфоресценции синглетного кислорода приблизительно на 28%. Выявлено, что различие в скоростях фотообесцвечивания фотосенсибилизатора Радахлорин на разных органических и неорганических поверхностях обусловлено главным образом потерями молекул кислорода в реакциях, происходящих под воздействием лазерного облучения.

Третья глава посвящена исследованию таких параметров фотосенсибилизатора Радахлорин, как время затухания и относительного квантового выхода флуоресценции, спектров флуоресценции и поглощения, времени вращательной диффузии и анизотропии

в модельных растворах разной кислотности, вязкости и полярности. Установлено, что время затухания флуоресценции нелинейно зависит от кислотности и полярности растворителя. Продемонстрировано, что анизотропия флуоресценции Радахлорина существенно различается при однофотонном и двухфотонном возбуждении. Изучение пространственного распределения времени затухания флуоресценции во внутриклеточном пространстве показало корреляцию между временами затухания флуоресценции Радахлорина и областями разной кислотности. Наименьшие времена затухания флуоресценции наблюдались в областях клеток, соответствующих локализации лизосом, с уровнем $pH < 5$.

В четвертой главе диссертации представлены результаты работ по автоматизации мониторинга клеток в ходе фотодинамического воздействия с помощью голографического микроскопа. Автором предложен и описан алгоритм автоматической сегментации клеток на их фазовых изображениях. Использование этого метода позволило провести разработку и апробацию автоматической классификации живых клеток и клеток, погибших путем апоптоза и некроза. Таким образом, показана возможность автоматического определения реакции клеток на фотодинамическое воздействие с фотосенсибилизатором Радахлорин на основе анализа их оптических и морфологических параметров. Полученные результаты подтверждены флуоресцентными методами с использованием стандартных флуоресцентных маркеров для детектирования клеточной гибели.

В конце каждой главы перечислены полученные результаты и сделаны выводы.

В заключении автор перечисляет основные результаты диссертационной работы.

Вопросы и замечания

При чтении диссертационной работы Жихоревой А.А. возник ряд вопросов и замечаний:

1. В разделе 3.1 в подписи к рис. 3.4(b) указано, что это графики для времен затухания флуоресценции при одно- и двухфотонном возбуждении. На самом рисунке можно различить только точки для этанола и метанола. Вопрос: эти времена одинаковые для одно- и двухфотонного возбуждения?

2. На рис. 3.5 (b) и (d) согласно подписи показаны спектры поглощения и флуоресценции в водно-спиртовых растворах. Какая концентрация растворов была в эксперименте?

3. В разделе 3.2 на стр.77 написано, что для возбуждения молекул Радахлорина использовался импульсный лазер с частотой следования импульсов 80 кГц. То есть промежуток между импульсами равен 12,5 микросекунд. Тогда на рис. 3.6 (b) и (c) за

время 35 мкс должны быть видны несколько импульсов. Это как-то учитывалось при представлении результатов измерения?

4. При исследовании фосфоресценции кислорода было установлено заметное изменение квантового выхода в зависимости от концентрации спирта в растворе, при этом сигнал регистрировался в фиксированном диапазоне 1269-1279 нм. Известно ли о поведении максимума спектра фосфоресценции кислорода от концентрации спиртового раствора?

5. Из рис. 3.10(b) видно, что отношение сигнал/шум для анизотропии флуоресценции Радахлорина при однофотонном возбуждении значительно меньше, чем при двухфотонном. При этом в таблице 3 приведена одинаковая погрешность для времен вращательной диффузии и начальной анизотропии для обоих случаев. Как определялась погрешность для этих величин?

6. В разделе 3.4 проводилось исследование времени затухания флуоресценции Радахлорина в клетках после 24 часов инкубации. Почему было выбрано такое время накопления, изменится ли локализация фотосенсибилизатора в клетках и поменяются ли времена затухания флуоресценции Радахлорина, если накопление фотосенсибилизатора будет проходить меньшее время?

7. В работе на рисунке 3.11 представлена зависимость анизотропии флуоресценции Радахлорина от длины волны возбуждения. Не может ли эта зависимость быть связана со сложным составом Радахлорина и наличием у него трёх компонент с разными оптическими характеристиками?

8. С помощью цифровой голографии в работе показана возможность оценки резистентности клеток разных типов опухолей к фотодинамическому воздействию. При этом использовались монослойные (2D) культуры клеток. Считается, что 3D-культура клеток (искусственно созданная среда, в которой биологические клетки способны расти во всех трех измерениях и превращаться в сфероиды (трехмерные клеточные колонии)), воспроизводят микроокружение опухоли точнее, чем монослойные культуры клеток. Применимы ли методики, разработанные в диссертационной работе для исследования сфероидов клеток?

9. В разделе 3.4, посвященном изучению параметров Радахлорина в клетках с использованием FLIM, не указано пространственное разрешение используемой системы.

10. На рисунке 4.10 на фазовых изображениях клеток не приведена цветовая шкала, кодирующая диапазон фазового набега в радианах.

11. Раз уж в конце диссертации приводится список сокращений и обозначений, то стоило сюда включить все сокращения, тем более нерасшифрованные в тексте, например, SHG.

Заключение

Высказанные замечания и вопросы не влияют на главные результаты диссертационной работы, основные ее выводы и положения, выносимые на защиту. Автореферат диссертации соответствует содержанию диссертационной работы. Результаты, представленные в диссертации, изложены в 15 публикациях в высокорейтинговых рецензируемых журналах. Представленная диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне, результаты являются новыми, чрезвычайно актуальными и практически важными.

Считаю, что отлично выполненная и написанная диссертационная работа Жихоревой Анны Александровны «Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах, клетках и на органических поверхностях с помощью флуоресцентных и голографических методов» отвечает 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 Жихорева А. А. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук.

Дик Ольга Евгеньевна,

доктор биологических наук по специальности 03.03.01 – «физиология»,
кандидат физико-математических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика»,
ведущий научный сотрудник лаборатории interoцепции,
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии
им. И.П. Павлова Российской академии наук.

Дик О.Е.

Почтовый адрес: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.
тел. 8-(812)-328-16-76
эл. почта: dickviola@gmail.com