

ОТЗЫВ

научного руководителя, кандидата физико-математических наук, А.А. Ланина на диссертацию Чеботарева Артема Станиславовича «Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на основе использования ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 – «Лазерная физика»

Окончательное формирование диссертационной работы стало результатом обучения А.С. Чеботарева в аспирантуре на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. Знакомство же с физическими задачами и процессами, лежащими в основе формирования изображений при помощи сверхкоротких лазерных импульсов, началось еще на этапе выполнения магистерской выпускной квалификационной работы на этой же кафедре. Уже тогда были заложены основы тех навыков теоретического анализа результатов и используемых экспериментальных методик, позволивших в итоге реализовать данную работу.

Актуальность и важность работы А.С. Чеботарев определяется интенсивно развивающимися исследованиями в области использования фемтосекундных лазерных импульсов на различных центральных длинах волн для неинвазивной визуализации в реальном времени физиологических процессов, протекающих в клетках живых животных, и самой морфологии ткани с высоким пространственным разрешением. Для повышения глубины визуализации, временного и пространственного разрешения, яркости и контрастности изображения необходимо исследовать нелинейно-оптические процессы, приводящие к генерации сигнала. Это позволило сформулировать цели и задачи работы, связанные с разработкой и оптимизацией мультимодальных нелинейно-оптических подходов визуализации ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров на основе двух- и трехфотонного возбуждения и генерации оптических гармоник.

В качестве инструментов для проведения исследований, что отражено в Главе 2, были использованы несколько фемтосекундных лазерных источников: на кристаллах титан-сапфир, хром-форстерит, иттербий-ИАГ, а также оптический параметрический генератор, позволяющие оперировать сверхкороткими импульсами длительностью до 40 фс в спектральном диапазоне от 700 нм до 1600 нм для исследования белковых сенсоров и особенностей формирования нелинейного сигнала при визуализации. В работе также представлены пути детальной характеристики излучения на каждом важном узле оптических схем. Важной методической частью работы А.С. Чеботарева является модификация и расширение возможностей коммерческой лазерно-сканирующей системы, используемой для формирования микроскопных изображений. Это позволило в процессе проведения микроскопии регистрировать до 4 сигналов одновременно, а также последовательно переключать несколько лазерных источников для селективного возбуждения маркеров. Часть оригинальных результатов работы А.С. Чеботарева, посвященные созданию новых компактных и дешевых перестраиваемых лазерных

источников на основе фотонно-кристаллических (ФК) световодов и нелинейно-оптических преобразованиях фемтосекундных импульсов в них, представлена в Главе 2. Показано, что использование короткого отрезка ФК световода, накачиваемого импульсом на длине волны 800 нм в области нормальной дисперсии групповых скоростей, позволяет сформировать когерентное излучение в области 700 – 1000 нм, позволяющее реализовать ратиометрический двухфотонный опрос белковых сенсоров, а также измерять спектры двухфотонного возбуждения флуоресцентных маркеров. ФК световод с большей сердцевиной, накачиваемый излучением на длине волны 1250 нм в области аномальной дисперсии, предоставляет за счет явления солитонного сдвига частоты перестраиваемые в диапазоне от 1250 нм до 1700 нм короткие фемтосекундные импульсы, пиковая мощность которых достаточна для измерения спектров трехфотонного возбуждения молекул.

В Главе 3 работы А.С. Чеботарева приводятся результаты исследований нелинейно-оптических свойств целого семейства сенсоров нового поколения окислительно-восстановительных процессов на основе единого флуоресцентного белка YFP, проявляющих ратиометрический ответ. Показано, что значительные различия в формах и амплитудах спектров двухфотонного возбуждения объясняется вариацией локального электрического поля возле единого флуорофора. В данной главе исследуется вопрос чувствительности и линейности ратиометрических сенсоров при их двухфотонном опросе. В режиме двухцветной двухфотонной микроскопии культур клеток получены калибровочные кривые для сенсоров кислотности и пероксида водорода, позволяющие восстанавливать абсолютные значения концентраций при нелинейном опросе. При работе с переживающими срезами мозга мыши, показано, что излучение на длине волны 1250 нм позволяет трехфотонно визуализировать нейроны с сенсорами кислотности и пероксида водорода, демонстрируя многократное увеличение соотношения сигнал/фон на глубинах более 200 мкм в коре головного мозга мыши по сравнению с двухфотонным возбуждением. Флуоресцентная микроскопия при трехфотонном возбуждении демонстрирует отсутствие детектируемого фонового сигнала на глубинах не менее 5 длин рассеяния, что в свою очередь является основным ограничивающим фактором двухфотонной флуоресцентной микроскопии.

Глава 4 диссертационной работы А.С. Чеботарева посвящена исследованию возможности неинвазивной визуализации ратиометрических сенсоров в живых животных методами флуоресцентной двух- и трехфотонной микроскопии, совмещенной с регистрацией оптических гармоник. Продемонстрирована количественная визуализация сенсора хлорноватой кислоты в нейтрофилах живой рыбки при исследовании модели повреждения. В качестве дополнительной биологической модели использованы лабораторные мыши, у которых флуоресцентные сенсоры были визуализированы в нейронах мозга и гепатоцитах печени при анестезии животного. В работе обсуждается вопрос объединения методик флуоресцентной микроскопии при двух- и трехфотонном возбуждении и микроскопии генерации оптических гармоник, что в перспективе позволит проследить взаимосвязи между биохимическими параметрами клеток и морфологическими изменениями в тканях.

А.С.Чеботарев проявил себя высококвалифицированным экспериментатором и ученым, что отражается в публикации проведенных им исследований в 13 печатных работах в международных рецензируемых научных изданиях: Sensors and Actuators B: Chemical, Optics Letters, Journal of Biophotonics, Journal of Physics: Photonics, Journal of Raman Spectroscopy.

За время своей работы А.С. Чеботарев проявил себя как трудолюбивый, аккуратный и ответственный молодой физик-специалист. В аспирантуре А.С.Чеботарев являлся стипендиатом МГУ им. М.В. Ломоносова фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС». С его участием в качестве основного исполнителя было реализовано несколько проектов РНФ и РФФИ.

Диссертация А.С.Чеботарева рекомендуется к защите по специальности 1.3.19. «Лазерная физика» (физико-математические науки)

Кандидат физико-математических наук, с.н.с

А.А. Ланин

Дата составления отзыва 22 апреля 2024

Подпись А.А. Ланина заверяю,

Ученый секретарь Ученого совета физического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова,

Профессор

С.Ю. Стремоухов