

## Отзыв

на автореферат диссертации **Чеботарева Артем Станиславовича** «Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на основе использования ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров», представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 Лазерная физика

Диссертационная работа Чеботарева А.С. направлена на комплексное исследование возможностей применения нелинейно-оптической микроскопии и спектроскопии к задачам структурной и функциональной визуализации живых систем с ратиометрическими генетически-кодируемыми флуоресцентными сенсорами (белками). Детальное исследование таких возможностей представляется чрезвычайно важной задачей, поскольку генетически-кодируемые флуоресцентные метки обладают чувствительностью к рН, температуре, вязкости, активным формам кислорода и другим физико-химическим параметрам, которые являются ключевыми при изучении функционирования живых клеток. Для того, чтобы детально изучать оптические свойства таких белков для их дальнейшего использования в качестве сенсоров, необходимы соответствующие перестраиваемые источники света.

В настоящий момент, пожалуй, единственным источником сверхкоротких импульсов, позволяющим осуществлять перестройку в диапазоне от 700 до 1800 нм является система параметрический генератор/усилитель. Однако системы на основе параметрических генераторов или усилителей являются не только громоздкими, но и дорогостоящими. Поэтому, несомненно, возникает необходимость в реализации компактной и дешевой системы, позволяющей осуществлять нелинейно-оптическую микроскопию и спектроскопию с возбуждением в данном спектральном интервале.

Автором диссертации были реализованы три экспериментальных схемы для решения поставленных задач на базе:

1. фемтосекундного титан-сапфирового лазера и микроструктурированного оптического волокна (диапазон от 650 до 1150 нм).
2. фемтосекундного титан-сапфирового лазера, накачивающего синхронно параметрический генератор света (1000-1400 нм)
3. фемтосекундного хром-форстеритового лазера и оптического волокна (1350-1700 нм).

Далее данная платформа использовалась для визуализации белков – сенсоров на пероксид водорода и рН в растворах, клетках и тканях животных *in vivo*. Отдельно исследовался вопрос фундаментальных ограничений глубины визуализации двухфотонной и трехфотонной микроскопии. В диссертации впервые продемонстрирована визуализация с субклеточным пространственным разрешением кислотности, концентрации пероксида водорода и хлорноватистой кислоты в нейронах, гепатоцитах и нейтрофилах живых мышей и личинок рыб при патологиях и повреждениях тканей.

В работе также впервые показано, что при использовании перестраиваемого источника фемтосекундных импульсов с достаточно большой длительностью ( $> 200$  фс), объектива с большой числовой апертурой ( $NA \approx 1$ ) и аккуратном учете спектральных потерь оптической схемы возможно корректное восстановление спектров двухфотонного

возбуждения путем нормировки на опорный сигнал второй гармоники от нелинейного кристалла. Данная техника позволила покрыть спектральный диапазон 1000-1500 нм, соответствующий области возбуждения перспективных красных и инфракрасных флуоресцентных меток.

Наконец, важным результатом является то, что созданный источник зондирующего излучения в диапазоне 1320-1700 нм на базе хром-форстерита позволяет проводить исследования трехфотонных спектроскопических свойств флуоресцентных меток с чувствительностью  $1 \text{ мкМ} \cdot 10^{-81} \cdot \text{см}^6 \cdot \text{с}^2$  и спектральным разрешением  $\sim 15 \text{ нм}$ .

В совокупности, представленные результаты интересны как с научной, так и с прикладной точки зрения. В частности, полученные результаты имеют практическую значимость для неинвазивного исследования, например, процессов апоптоза и некроза. Подобных комплексных исследований возможностей нелинейной оптической микроскопии для задач визуализации биологических объектов с использованием генетически-кодированных белков ранее не проводилось.

Диссертационная работа представляет собой целостное, логически выстроенное исследование. Работа в достаточной степени проиллюстрирована, выводы представляются полностью обоснованными и соответствующими поставленным задачам. Основные результаты работы опубликованы в 13 статьях, в основном в изданиях первого квартала, многократно обсуждены на всероссийских и международных научных конференциях и симпозиумах.

Из замечаний по стилистике следует отметить следующие:

1. Стр. 3. «**ратиометрический опрос**». О каком опросе идет речь?
2. Стр.3-4. «Микроскопия второй гармоники обладает крайне высокой специфичностью, позволяя визуализировать ориентированные биологические структуры с большой гиперполяризуемостью, например пучки коллагена или микротрубочки [7]. **Напротив, микроскопия третьей гармоники чувствительна к оптическим границам сред**, поэтому прекрасно подходит для определения морфологии ткани [8]». Вторая фраза подразумевает, что микроскопия второй гармоники нечувствительна к границе раздела различных сред, что не есть корректно.
3. Стр. 7. «В случае с печенью показана генерация пероксида водорода в гепатоцитах в результате **закола D-аминокислот** в присутствии оксидазы D-аминокислот (DAO), моделируя развитие ферроптоза.» Это ненаучный термин. По-видимому, здесь идет речь об экзогенном введении D-аминокислот.
4. Стр. 8 «В свою очередь глубокая визуализация нейронов в **свежевынутых срезах** мозга мыши апробирует метод двух- и трехфотонной микроскопии в применении к изучению окислительно-восстановительных процессов на уровне отдельных клеток *in-vivo*». Свежевынутые срезы- такого понятия нет. Вначале осуществляют забор ткани мозга, потом делают срезы.
5. Стр. 9. «Использование пары **остро сфокусированных** фемтосекундных импульсов». Жестко сфокусированных.

6. Стр. 15. «однопучковому возбуждению данного сенсора».
7. Стр. 20. «высокоапертурного объектива» - «объектива с большой числовой апертурой»

Несмотря на данные замечания, имеющие отношение к стилистике, считаю, что актуальность, новизна, методология и результаты исследования Чеботарева Артем Станиславовича соответствуют всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19 Лазерная Физика.

Заведующий лабораторией оптической спектроскопии  
и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и  
биомедицинских технологий ФГБОУ ВО ПИМУ

Минздрава России, к.ф.-м.н.

Тел:

~~e-mail:~~

Щеславский Владислав Игоревич

«17» июня 2024 г.

Я, Щеславский Владислав Игоревич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с работой диссертационного совета МГУ.013.4, и их дальнейшую обработку.

В.И. Щеславский

Научно-исследовательский институт экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий (НИИ ЭО и БМТ), федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России).

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1