

Заключение диссертационного совета МГУ.013.4
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

Решение диссертационного совета от 27 июня 2024 г. № 4.

О присуждении Чеботареву Артему Станиславовичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на основе использования ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров» по специальности 1.3.19. Лазерная физика (физико-математические науки) принята к защите диссертационным советом «17» мая 2024 г., протокол № 2.

Соискатель Чеботарев Артем Станиславович, 1996 года рождения, в 2019 году окончил магистратуру физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Физика». В 2023 году окончил очную аспирантуру физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Лазерная физика».

Соискатель работает инженером на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Диссертация выполнена на кафедре общей физики и волновых процессов физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

Ланин Александр Александрович, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, старший научный сотрудник кафедры общей физики и волновых процессов

Желтиков Алексей Михайлович, доктор физико-математических наук, профессор, прежнее место работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, профессор кафедры общей физики и волновых процессов

Официальные оппоненты:

- доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник Моисеев Сергей Андреевич, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н.Туполева-КАИ», Казанский квантовый центр, директор

- доктор физико-математических наук Звягин Андрей Васильевич, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Институт молекулярной тераностики, заместитель директора по науке
- доктор физико-математических наук, доцент Ширшин Евгений Александрович, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», физический факультет, кафедра квантовой электроники, доцент

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 15 опубликованных научных работ, из них 13 научных работ по теме диссертации, в том числе 13 научных статей (19,67 п.л.), опубликованных в рецензируемых научных изданиях, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.3.19. Лазерная физика (физико-математические науки). Все представленные в работе результаты получены автором лично или при его определяющем участии.

1. **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, A. D. Ivanova, Y. V. Khramova, V. A. Katrukha, D. A. Kotova, R. I. Raevskii, A. A. Moschenko, G. N. Linovsky, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, D. S. Bilan and A. A. Lanin, "Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution," *Sensors and Actuators B: Chemical* 410, 135646 (2024); JIF WoS: 8.4 / 2.86 п.л. / вклад соискателя–0.7.
2. **A. S. Chebotarev**, V. S. Ledyayeva, O. I. Patsap, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, A. G. Shokhina, and A. A. Lanin, "Multimodal label-free imaging of murine hepatocellular carcinoma with a subcellular resolution," *Journal of Biophotonics* 16 (12), e202300228 (2023) JIF WoS: 2.8 / 1.73 п.л. / вклад соискателя – 0.7.
3. **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, E. S. Fetisova, A. S. Panova, D. S. Bilan, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging," *Journal of Biophotonics* 14 (3), e202000301 (2021) JIF WoS: 2.8 / 1.93 п.л. / вклад соискателя – 0.7.
4. M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, **A. S. Chebotarev**, E. S. Fetisova, D. S. Bilan, E. K. Shevchenko, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Multimodal nonlinear-optical imaging of nucleoli," *Optics Letters* 46 (15), 3608–3611 (2021) JIF WoS: 3.6 / 0.99 п.л. / вклад соискателя – 0.15.

5. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, M. S. Pochechuev, E. S. Fetisova, D. S. Bilan, E. K. Shevchenko, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Single-beam multimodal nonlinear-optical imaging of structurally complex events in cell-cycle dynamics," *Journal of Physics: Photonics* 3, 044001 (2021) JIF Scopus: 3.9 / 2.14 п.л. / вклад соискателя – 0.5.
6. **A. S. Chebotarev**, A. A. Lanin, R. I. Raevskii, A. I. Kostyuk, D. D. Smolyarova, D. S. Bilan, I. V. Savitskii, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Single-beam dual-color alternate-pathway two-photon spectroscopy: Toward an optical toolbox for redox biology," *Journal of Raman Spectroscopy*. 52 (9), 1552–1560 (2021) JIF WoS: 2.5 / 1.68 п.л. / вклад соискателя – 0.7.
7. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, D. S. Bilan, A. A. Ivanov, A. S. Panova, V. S. Tarabykin, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Single-beam optogenetic multimodal $\chi(3)/\chi(5)$ nonlinear microscopy and brain imaging," *Journal of Raman Spectroscopy* 51 (10), 1942–1950 (2020) JIF WoS: 2.5 / 1.63 п.л. / вклад соискателя – 0.5.
8. A. A. Lanin, M. S. Pochechuev, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, D. S. Bilan, D. A. Kotova, V. S. Tarabykin, A. A. Ivanov, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Cell-specific three-photon-fluorescence brain imaging: neurons, astrocytes, and gliovascular interfaces," *Optics Letters* 45 (4), 836–839 (2020) JIF WoS: 3.6 / 0.98 п.л. / вклад соискателя – 0.3.
9. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, D. A. Kotova, D. S. Bilan, Y. G. Ermakova, A. B. Fedotov, A. A. Ivanov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging," *Journal of Biophotonics* 13 (3), e201900243 (2020) JIF WoS: 2.8 / 1.15 п.л. / вклад соискателя – 0.5.
10. A. A. Lanin, M. S. Pochechuev, **A. S. Chebotarev**, I. V. Kelmanson, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Nonlinear-optical stain-free stereoinaging of astrocytes and gliovascular interfaces," *Journal of Biophotonics* 12 (11), e201800432 (2019) JIF WoS: 2.8 / 1.39 п.л. / вклад соискателя – 0.3.
11. M. S. Pochechuev, A. A. Lanin, I. V. Kelmanson, D. S. Bilan, D. A. Kotova, **A. S. Chebotarev**, V. Tarabykin, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation," *Opt. Lett.* 44 (12), 3166–3169 (2019) JIF WoS: 3.6 / 0.93 п.л. / вклад соискателя – 0.15.
12. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, M. S. Pochechuev, I. V. Kelmanson, A. B. Fedotov, V. V. Belousov, and A. M. Zheltikov, "Three-photon-resonance-enhanced third-harmonic generation for label-free deep-brain imaging: In search of a chemical contrast," *J. Raman Spectrosc.* 50, 1296–1302 (2019) JIF WoS: 2.5; 1.11 п.л. / вклад соискателя – 0.5.

13. A. A. Lanin, **A. S. Chebotarev**, N. V. Barykina, F. V. Subach, and A. M. Zheltikov, "The whither of bacteriophytochrome-based near-infrared fluorescent proteins: Insights from two-photon absorption spectroscopy," J. Biophotonics 12 (5), e201800353 (2019) JIF WoS: 2.8 / 1.15 п.л. / вклад соискателя – 0.5.

На диссертацию и автореферат поступило 2 дополнительных отзыва, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обосновывался тем, что они являются специалистами в области лазерной физики, нелинейной оптики и биофотоники, а также имеют публикации по схожей тематике. Указанные оппоненты не имеют совместных проектов и публикаций с соискателем.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований содержится решение задачи, имеющей значение для развития лазерной физики и нелинейной оптики. В диссертационной работе предложен и реализован комплексный подход к измерению спектральных зависимостей двух- и трехфотонного сечения поглощения флуоресцентных маркеров в общей сложности в спектральном диапазоне 700 – 1700 нм, что полностью решает задачу определения многофотонных яркостей подавляющего числа существующих флуоресцентных белков и сенсоров. Обладая высокой точностью измерения, предложенные подходы позволяют избегать трудоемких корректировок искомого сигнала, базируются на более доступных лазерных системах, а также обладают потенциалом к полной автоматизации процесса. Проведены эксперименты по многофотонной визуализации на таких модельных биологических объектах, как культуры клеток, срезы тканей и анестезированные животные.

Результаты диссертации могут быть использованы в МГУ имени М.В. Ломоносова и других высших учебных заведениях в основных образовательных программах при создании новых и обновлении имеющихся материалов учебных курсов.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Нелинейно-оптическое преобразование фемтосекундных импульсов в коротком отрезке микроструктурированного световода преимущественно за счет фазовой самомодуляции в области нормальной ДГС позволяет сформировать когерентное широкополосное излучение (со средней мощностью не менее 50 мВт, длительностью не более 100 фс, степенью деполяризации не более 4% и параметром качества пучка M^2 не меньше 1.2), отлично подходящее для проведения спектроскопии и микроскопии двухфотонного возбуждения флуоресцентных маркеров в диапазоне от 650 нм до 1150 нм. Управление спектральной амплитудой и фазой такого излучения

позволяет достичь порога детектирования (произведение сечения процесса на квантовый выход и концентрацию молекул) около 1 мкМ x ГМ при спектральном разрешении до 10 нм, а также на порядок повысить сигнал двухфотонной микроскопии.

2. Спектры двухфотонного поглощения флуоресцентных сенсоров окислительно-восстановительных процессов одного семейства (на основе белка YFP) обладают различной формой и амплитудой за счет вариации локального электрического поля возле единого флуорофора. Большой динамический диапазон ратиометрического ответа данного семейства сенсоров, а также высокая эффективность двухфотонного возбуждения флуоресценции, открывают широкие перспективы их нелинейно-оптической визуализации.

3. Использование пары остро сфокусированных фемтосекундных импульсов на центральных длинах волн вблизи максимумов двухфотонного возбуждения окисленной и восстановленной форм сенсоров (SynHer3s и HyPer7) позволяет в процессе ратиометрического опроса визуализировать динамику кислотности и концентрацией перекиси в культурах клеток при интенсивности накачек до 40 ГВт/см² и средней мощностью до 3 мВт. Высокая эффективность двухфотонного возбуждения флуоресценции (до 35 ГМ) и большой динамический диапазон ответа данных сенсоров (194 и 5.6, соответственно) позволяет исследовать в реальном времени окислительно-восстановительные процессы в нейронах мозга анестезированной мыши с субклеточным пространственным разрешением (на глубине до 300 мкм от поверхности, в области до 500x500 мкм², с временным и пространственным разрешением до 1 с и 1 мкм, соответственно).

4. Остро сфокусированные фемтосекундные импульсы лазера на кристалле хром-форстерит с пониженной частотой повторения позволяют визуализировать методом трехфотонного возбуждения флуоресценции сенсоры кислотности и пероксида водорода SynHer3s и HyPer7 в культурах клеток, переживающих срезах и мозге анестезированной мыши без видимых повреждений ткани (при достижении интенсивности на клетке до 1.9 ТВт/см² и средней мощности 25 мВт) за счет высокой эффективности трехфотонного возбуждения флуоресценции (около 10⁻⁸¹ см⁶с²фотон⁻²). Увеличение локальности многофотонного возбуждения, а также уменьшение рассеяния и деградации пучка накачки позволяет многократно повысить соотношение сигнал/фон при трехфотонной визуализации (на длине волны 1250 нм) данных сенсоров в мозге мыши на глубинах более 200 мкм, по сравнению с двухфотонной микроскопией (на длине волны 790 нм).

На заседании 27 июня 2024 диссертационный совет принял решение присудить Чеботареву Артему Станиславовичу ученую степень кандидата физико-математических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.3.19. Лазерная физика (физико-

математические науки), участвовавших в заседании, из **24** человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» – **17**, «против» – **0**, недействительных голосов – **0**.

Председатель

диссертационного совета МГУ.013.4
доктор физико-математических наук,
профессор

Андреев Анатолий Васильевич

Учёный секретарь

диссертационного совета МГУ.013.4
кандидат физико-математических наук

Коновко Андрей Андреевич

Дата оформления заключения: 27 июня 2024 г.