

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук Чеботарева Артема Станиславович на тему: «Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на основе использования ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров» по специальности 1.3.19. Лазерная физика

Диссертационная работа А.С. Чеботарева относится к сфере нелинейно-оптической микроскопии и посвящена актуальной теме визуализации ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров в тканях животных. Значительный интерес к развитию новых лазерных источников и оптимизации нелинейно-оптических методик визуализации для данного рода функциональной микроскопии обусловлен, с одной стороны, труднодоступностью считывания сигналов сенсоров на больших глубинах в рассеивающих тканях, с другой стороны, уникальной информацией о концентрационных динамиках специфичных молекул, получаемой в виде ратиометрического отклика. Исследование нелинейно-оптических свойств флуоресцентных меток, объединение техник визуализации с безмаркерными подходами и оптимизация лазерных фемтосекундных источников накачки открывает возможность комплексных исследований различных биологических моделей патологий на базе одной оптической платформы. В связи с чем **актуальность** выбранной темы не вызывает сомнений, а полученные результаты представляют научную и практическую значимость.

Диссертация состоит из введения, четырех глав текста, заключения, благодарностей и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 149 страниц, включая 54 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 140 наименования.

Во **введении** обоснованы актуальность, новизна и практическая значимость проведенного исследования, сформулированы цель и задачи работы, подчеркнута степень достоверности и проведенная апробация результатов, а также сформулированы защищаемые положения.

В первой главе представлен обзор литературы по теме диссертации. Представлены основные пройденные этапы развития метода двух- и трехфотонной микроскопии в применении к визуализации сильно рассеивающих биологических тканей. Описаны основные особенности и преимущества флуоресцентных белковых сенсоров как маркеров для проведения функциональной визуализации. Обсуждены дополнительные источники контраста в виде сигналов генерации второй и третьей оптических гармоник, позволяющие эффективно расширить информативность микроскопии.

Следующие главы содержат оригинальные результаты.

Вторая глава посвящена реализованным экспериментальным схемам для проведения двух- и трёхфотонной спектроскопии, а также мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии. Для совокупности оптических платформ, покрывающих спектральный диапазон сканирования 650-1700 нм, определены предельные чувствительности измерений сечений двух- и трёхфотонного поглощения. Валидация техник выполнена с использованием хорошо изученных органических красителей. Экспериментальные установки для микроскопии представлены двумя сконструированными схемами на базе источников фемтосекундных импульсов, с детальным описанием пространственных и временных параметров излучения.

В третьей главе исследован потенциал двух- и трёхфотонной визуализации и опроса нового поколения флуоресцентных белковых сенсоров АФК и других медиаторов окислительно-восстановительных процессов. Эксперименты проведены в порядке усложнения моделей: сначала исследуются нелинейно-оптические спектроскопические свойства на растворах белков, затем, в режиме микроскопии, измеряются параметры отклика сенсоров на простейшей модели культур клеток HeLa, и в завершении метод апробируется визуализацией живых тканей на глубинах, недоступных линейным методам. Отдельно исследуется вопрос фундаментальных

ограничений глубины визуализации двухфотонной микроскопии и преодоления этого предела.

Четвёртая глава включает в себя результаты, апробирующие подход на живых животных. Продемонстрирована визуализация с субклеточным пространственным разрешением динамики кислотности, концентрации пероксида водорода и хлорноватистой кислоты в нейронах, гепатоцитах и нейтрофилах живых мышей и личинок рыб при патологиях и повреждениях тканей. Определены предельные глубины визуализации и двухцветного считывания сигналов изучаемого семейства сенсоров.

В заключении чётко сформулированы основные результаты диссертационного исследования.

Результаты, выносимые на защиту, апробированы на международных конференциях, опубликованы в 13 печатных работах в международных рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, в том числе Sensors and Actuators B: Chemical, Optics Letters, Journal of Biophotonics, Journal of Physics: Photonics, Journal of Raman Spectroscopy. Экспериментальные исследования проводились на современном научном оборудовании, их результаты были воспроизводимыми и подтверждались анализом в рамках ранее разработанных и общепризнанных теоретических моделей. Таким образом, анализ всей диссертационной работы и публикаций автора по теме исследования свидетельствуют о **достоверности** результатов и об **обоснованности защищаемых научных положений**.

Результаты диссертационного исследования, несомненно, обладают **научной новизной**. Впервые измерены абсолютные значения двухфотонной яркости флуоресцентных белковых сенсоров АФК семейства cpYFP, демонстрирующие значения 10 – 45 ГМ, а также значения трёхфотонной яркости сенсора кислотности среды SynHer3s. Определены концентрационные чувствительности и динамические диапазоны изучаемых сенсоров при двухфотонном двухцветном возбуждении. Впервые продемонстрирован хорошо детектируемый отклик сенсоров SynHer3s и HyPer7 в нейронах

глубоких слоев среза коры головного мозга мыши с субклеточным разрешением при добавлении соответствующего аналита. Измерена динамика уровня кислотности среды в нейронах коры головного мозга мыши в процессе фотоиндуцированного инсульта. В случае с печенью показана возможность детектирования генерации пероксида водорода в отдельных гепатоцитах в результате администрации D-аминокислот в присутствии оксидазы D-аминокислот, моделирующее развитие ферроптоза. Показана пространственно-временная динамика поведения нейтрофилов, параллельно с динамикой концентрации хлорноватистой кислоты, в трансгенных рыбах *Danio rerio* в случае механического повреждения плавника и бактериальной инфекции.

Следует отметить, что автор диссертации продемонстрировал высокую квалификацию экспериментатора, позволившую ему создать уникальные экспериментальные установки, на которых была получена большая часть результатов.

В качестве **замечаний** к диссертации выделю следующее:

1. Поскольку считывание сигналов белковых сенсоров происходит на двух длинах волн с целью ратиометрической оценки функционального состояния сенсора, светорассеяние и поглощение биологической ткани может модулировать сигналы двух длин волн на обратном проходе и тем самым искажать результаты измерений.
2. Следует проанализировать глубину имиджинга, особенно в случае трёхфотонного возбуждения, в зависимости от разрешённых доз лазерного излучения.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.3.19. Лазерная физика (по физико-

математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Чеботарев Артем Станиславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.19. Лазерная физика.

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук,
Заместитель директора Института молекулярной тераностики, Научно-технологического парка биомедицины, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

ЗВЯГИН Андрей Васильевич

18.06.2024[✓]

Контактные данные:

тел.: e-mail: andrei.zvyagin@mq.edu.au
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
01.04.21 – Лазерная физика

Адрес места работы:

119991, Москва, ГСП-1, ул. Трубецкая, д.8, стр.2
Тел.: +7 909 924 9116; e-mail: zvyagin_a_v@staff.sechenov.ru

Подпись сотрудника *Звятина Андрей Васильевич*
ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Звятина А.В. удостоверяю:

Начальник Отдела кадров 

О.Н. Бойцова

18.06.2024