

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

В настоящее время нелинейно-оптическая микроскопия зарекомендовала себя одним из наиболее перспективных методов получения изображения микроскопических биологических объектов. Растущий интерес к развитию этих методов объясняется уникальной возможностью слабо инвазивной функциональной визуализацией различных изучаемых объектов, что позволяет обеспечивать субклеточное разрешение в биологической ткани на глубинах, недоступных при использовании существующих методов линейной оптики.

Актуальность выбранного исследования, а именно развитие оптических методов спектроскопического анализа двух- и трехфотонной яркости индикаторов и созданием на их основе оптических платформ для функциональной и мультимодальной нелинейно-оптической микроскопии, а также применение новых флуоресцентных белковых сенсоров в изучение различных процессов в биологических тканях, обусловлена высоким интересом к этим проблемам со стороны ведущих в мире научных групп и практической важностью получаемых при этом результатов.

В рамках диссертационной работы получен ряд важных результатов, обладающих безусловной **научной новизной**. А именно, разработан оригинальный подход к созданию перестраиваемого широкополосного источника когерентного излучения, основанный на использовании генерации суперконтинуума при нелинейном спектральном преобразовании фемтосекундных импульсов накачки в микроструктурированных световодах. На основе этого метода генерации интенсивного когерентного излучения была создана оптическая платформа на базе титан-сапфирового генератора импульсов и микроструктурированного световода, обеспечивающая быстрый доступ к различным длинам волн накачки при записи спектра за ~ 1 мин. Автором также впервые была создана вторая оптическая платформа, основанная на использовании источника импульсного интенсивного излучения, позволяющая плавно перестраивать его длину волны от 1350 нм до 1700 нм благодаря управлению генерацией солитонов в микроструктурированном световоде.

Используя эти платформы, впервые была реализована двух- и трехфотонная спектроскопия ряда биологических объектов в диапазонах длин волн 650 – 1150 нм и 1320 – 1700 нм. Также впервые были определены спектральные зависимости в абсолютных значениях сечений двухфотонного возбуждения целого ряда новых флуоресцентных сенсоров и была установлена общая закономерность в положении пика возбуждения окисленной формы сенсоров семейства $srYFP$ в районе 950 нм, который обусловлен доминирующим проявлением электрон-колебательного

перехода 0–1 в двухфотонном поглощении для депротонированной формы хромофора, впервые измерены абсолютные значения двухфотонной яркости флуоресцентных ряда белковых сенсоров. Обнаруженный большой динамический диапазон ратиометрического ответа данного семейства сенсоров, а также высокая эффективность двухфотонного возбуждения флуоресценции, открывают широкие перспективы их нелинейно-оптической визуализации. Впервые применена техника двухфотонной микроскопии с ратиометрическим опросом для изучения редокс статуса клеток в ряде моделей патологий.

Выводы, сформулированные в работе, и положения, выносимые на защиту, **обоснованы**. **Достоверность** результатов, полученных в диссертационном исследовании гарантируется высоким современным уровнем использованного научно-технического оборудования, применением проверенных экспериментальных методик в соответствии с известными и доказанными научными подходами, использованием апробированных методов оптической спектроскопии и микроскопии, повторяемостью процедуры получения экспериментальных данных и анализом полученных зависимостей согласно ранее разработанным и общепризнанным теоретическим моделям, а также многократным обсуждением результатов со специалистами и публикацией полученных результатов в ведущих физических журналах.

Диссертационная работа включает введение, четыре главы, заключение. Содержание работы представлено на 149 страницах, включая 54 рисунков и список из 140 наименований цитируемой литературы.

В **главе 1** автор обсуждает современные физические подходы, используемые в реализации техники нелинейно-оптической спектроскопии и микроскопии. Обсуждаются проблемы в получении оптической информации об изучаемых биологических объектах и основные стратегии по получению оптического изображения с большей глубины в рассеивающей среде методами двух-, а затем и трехфотонной микроскопии. Данные подходы детально анализируются в применении к изучению основных флуоресцентных меток, особое внимание уделяется генетически-кодируемым флуоресцентным белкам. Обозреваются существующие подходы к измерению спектров двухфотонного возбуждения таких маркеров, а также физические причины наблюдаемых особенностей в получаемых спектрах.

Глава 2 посвящена разработке новых методов нелинейно-оптической спектроскопии и микроскопии, созданию на их основе оригинальных экспериментальных установок с двух оригинальных оптических платформ, используемых затем в микроскопии биологических объектов. Значительное внимание уделено разработке физических принципов генерации перестраиваемого интенсивного импульсного когерентного излучения, способов управления его параметрами, эффективной доставке до изучаемых микроскопических биологических объектов. Для каждой из реализованных оптических схем проведены эксперименты по их валидации на тестовых образцах.

Глава 3 описывает широкий набор экспериментов, посвященных изучению в нелинейном формате редокс сенсоров из семейства *srYFP* и сенсора *Hyper-FAST*. Получены абсолютные яркости двухфотонного возбуждения сенсоров, найдены калибровочные кривые для сенсоров кислотности и пероксида водорода, позволяющие восстановить концентрации аналита с точностью не хуже $\Delta C[H^+] \approx 0.05$ рН и $\Delta C[H_2O_2] \approx 0.1$ мкМ. При работе со свежевывнутыми срезами мозга мыши показана двух- и трехфотонная визуализация отдельных нейронов на глубинах более 200 мкм, а также ратиометрический отклик сенсоров *SypHer3s* и *Hyper7* с помощью двухцветного опроса на длинах волн 790 и 980 нм. На фантоме мозга продемонстрировано отсутствие детектируемого фонового сигнала на глубинах не менее 5 длин рассеяния при трехфотонном возбуждении на длине волны 1250 нм.

В **главе 4** приведены результаты по глубокой визуализации исследуемых сенсоров и наблюдению в реальном времени концентрационных динамик их аналитов. Показана возможность объединения методик флуоресцентной микроскопии при двух- и трехфотонном возбуждении и микроскопии на основе второй и третьей гармоники, что в перспективе позволит проследить взаимосвязи между биохимическими параметрами клеток и морфологическими изменениями тканей.

Диссертация «Мультимодальная нелинейно-оптическая микроскопия на основе использования ратиометрических флуоресцентных белковых сенсоров» представляет собой целостную научную работу, выполненную на высоком научном уровне. В работе проведен большой комплекс исследований, объединенных общей большой задачей, что позволило Чеботареву А.С. успешно решить поставленные в диссертации задачи. Он разработал и создал новые оптические лазерные платформы, отличающиеся большой функциональностью в задании параметров световых полей и провел большой цикл оптических исследований биологических объектов, получив при этом новые важные научные результаты. Материалы диссертации изложены научным языком, хорошо иллюстрированы. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Однако представленная диссертация не лишена, на мой взгляд, некоторых недостатков.

1. Во второй главе вводится формула (1) для детектируемого сигнала флуоресценции, при его наблюдении в оптически тонкой прозрачной среде. Автор в последующих главах применяет ее для сильно рассеивающей среды. Желательно прокомментировать условия применимости (1) в такой среде.

2. При описании ряда изучаемых физических процессов автору желательно было бы подробнее разъяснить полученные или обсуждаемые результаты. Например, автор вводит формулы (3), (4), описывающие количество детектируемых фотонов при двух- и трехфотонном возбуждении, без разъяснения их появления и без ссылки на первоисточник. Это относится и к формуле (6).

3. Автор отмечает, что им был проведен поиск оптимального ФК-световода среди световодов с диаметрами сердцевин 4.5 мкм, 4 мкм и 2.5 мкм. В результате

наиболее подходящее уширение спектра фемтосекундного импульса наблюдалось на выходе 2.5-мкм-световода протяженностью 13 мм (рис.11.а). Я рекомендовал бы автору разъяснить физические причины этого эффекта. По всей видимости, обнаруженное большее уширение спектра связано с усилением нелинейного самовоздействия фемтосекундного импульса в световоде при его более сильном поперечном пространственном сжатии. Желательно было бы остановиться на более подробном обсуждении влияния этого эффекта на генерацию суперконтинуума.

4. Автором реализована очень высокая эффективность ввода фемтосекундного импульса в сердцевину микроструктурированного световода (80%), что было критически важно для разрабатываемых автором оптических платформ. Желательно было бы подробнее обсудить достигнутую высокую эффективность, может быть, сравнить с результатами других авторов.

5. Вторая оптическая платформа автора основана на использовании генерации солитонных импульсов разной частоты. На рис. 18 представлены спектры таких солитонных импульсов. Из этих спектров видно, что огибающие солитонных спектров начинают сильнее отличаться от их идеальной формы по мере увеличения их несущей длины волны. Эти спектры могут говорить о незавершенности формирования солитонов в световоде. Возникает вопрос, как наблюдаемое заметное искажение спектра влияло, или могло повлиять на использование таких импульсов в нелинейной оптической спектроскопии и микроскопии?

6. Также стоит отметить, что местами в диссертации встречаются стилистические погрешности. Например, автор пишет

«Цель представленной работы заключается в **развитии новых** лазерных источников и...»

Лучше написать в **создании новых** лазерных источников

7. В научной новизне автор не следующим образом формулирует одно из положение:

«В представленной диссертации экспериментально продемонстрировано, что использование **нелинейных спектральных преобразований** в микроструктурированных (МС) световодах может служить источником широкополосного когерентного излучения»

Отмечу, что использование **нелинейных спектральных преобразований** не может быть источником излучения. В качестве нового источника выступает оптическая система, включающая исходный фемтосекундный лазер, выход которого соединен с микроструктурированным волокном, служащим для необходимого уширения спектра входного лазерного импульса.

8. В научной и практической значимости, автор пишет:

«Разработанные экспериментальные техники измерения спектров двух- и трехфотонного возбуждения **позволяют**, с одной стороны, подобрать оптимальные параметры возбуждающего излучения, с другой, количественно сравнить

различные флуоресцентные маркеры, **предсказывая** их перспективность в задачах визуализации в живых животных еще на этапе создания сенсора.»

Надо признать, что экспериментальные техники измерения не могут **предсказывать** перспективность чего-либо. Использование техники дает возможность делать такие предсказания.

9. В тексте диссертации порой встречаются опечатки. Например, в оглавлении написано: «2.4 Вводы» вместо «2.4.Выводы»

Вместе с тем, указанные замечания совершенно не умаляют значимости проведенного диссертационного исследования. Диссертация отвечает всем 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, 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,
профессор Казанского национального исследовательского технического университета
им. А.Н. Туполева - КНИТУ-КАИ,
директор Казанского квантового центра
Моисеев Сергей Андреевич

«20» 06 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7(843)321-16-29,

e-mail: s.a.moiseev@kazanqc.org

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

01.04.05 – Оптика

Адрес места работы:

420111, г.Казань, ул. К. Маркса, д. 10,

Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н.

Туполева - КАИ, Казанский квантовый центр

Тел.: +7(843)231-01-09; e-mail: kai@kai.ru

Подпись Моисеева С.А. заверяю
ученый секретарь/кадровый работник

Моисеева С.А.

«20» 06 2024 г.