

## 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 представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком уровне.

**Актуальность** выбранной автором темы связана с большим интересом к проведению комплексных исследований биохимических процессов в живых животных на масштабе отдельных клеток с минимальной инвазивностью. Такие возможности предоставляет нелинейно-оптическая микроскопия, обладающая необходимой глубиной проникновения зондирующего излучения в ткань, пространственным и временным разрешением. При этом, эффективное применение новых белковых ратиометрических сенсоров требует аккуратного описания нелинейно-оптических свойств маркеров, а также создания подходящих лазерных платформ для их опроса.

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Объем работы – 149 страниц, научные результаты проиллюстрированы хорошо оформленными информативными рисунками.

Во **введении** автор подтверждает актуальность работы, формулирует цели и ставит задачи исследования, характеризует научную новизну и практическую значимость полученных результатов, представляет защищаемые положения, характеризует личный вклад, подтверждает достоверность полученных данных, сообщает об апробации и публикации результатов.

В **первой главе**, посвященной обзору литературы, автор описывает основные принципы, достижения и пути развития метода микроскопии, основанного на процессе двух- и трехфотонного поглощения. Далее рассматриваются основные флуоресцентные метки, используемые для

маркирования тканей, а также техники измерения двух- и трехфотонных спектров возбуждения таких маркеров. Особое внимание уделяется сенсорам на основе флуоресцентных белков, в первую очередь изучаемым в представленной диссертации редокс сенсорам. Также рассматривается мультимодальный аспект нелинейно-оптических подходов в исследовании биологических объектов.

Во **второй главе** автор представляет реализованные оптические системы нелинейной спектроскопии и микроскопии. Использование нелинейно-оптических преобразований в микроструктурированных волноводах, преимущественно за счет эффектов фазовой самомодуляции и солитонного самосдвига частоты фемтосекундных импульсов накачки, позволило автору получить когерентное зондирующее излучение, покрывающее спектральные области двух- и трехфотонного возбуждения практически всех актуальных флуоресцентных белков. Реализованная система для проведения лазерно-сканирующей микроскопии включала в себя четыре синхронизованных и сведенных источника фемтосекундных импульсов и обладала четырехканальной системой детекции, что открывает возможности для гибкой подстройки схемы под различные задачи визуализации живых животных.

В **третьей главе** автор исследует возможность визуализации и опроса белковых флуоресцентных сенсоров окислительно-восстановительных процессов с помощью двух- и трехфотонного возбуждения флуоресценции. Полученные спектроскопические данные о семействе белков на базе *cpYFP* демонстрируют обнадеживающие высокие значения двухфотонной яркости (10-45 ГМ), а также общую тенденцию в смещении относительно удвоенного однофотонного положения пика окисленной формы на 950 нм. Автором получены уникальные спектры трехфотонного возбуждения сенсора кислотности среды, позволяющие предложить в дальнейшем его эффективное применение с возбуждением на 1300-1350 нм. Аккуратные калибровочные измерения в режиме двухфотонной двухцветной микроскопии сенсоров

кислотности и пероксида водорода позволили судить о чувствительности, динамическом диапазоне и области линейности сенсоров. В дальнейшем, автор использует эти зависимости для восстановления динамик абсолютных значений рН в отдельных нейронах переживающего среза мозга мыши.

В **четвертой главе** демонстрируется многофотонная визуализация изучаемых сенсоров в тканях живых животных. Показана визуализация сенсоров кислотности и пероксида водорода в нейронах коры головного мозга мыши на глубинах до 600 мкм, а также возможность опроса сенсора на глубинах до 300 мкм. Резонансное усиление генерации третьей гармоники от эритроцитов позволило проконтролировать процесс окклюзии сосудов в мозге мыши в модели фотоиндуцированного инсульта, а двухцветные опрос сенсора кислотности среды достоверно детектирует закисление среды в отростках нейронов. Реализованная оптическая платформа также показывает свою эффективность в работе с другими тканями мыши (печень) и животными (мальки рыб).

В **заключении** представлены основные результаты и выводы работы.

Научные положения, выносимые на защиту, сформулированы **обосновано** и являются оригинальными. **Достоверность** и **научная новизна** представленных в диссертации результатов, а также обоснованность сделанных выводов подтверждается публикациями в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах и успешной апробацией на всероссийских и международных профильных конференциях. Результаты получены с использованием оборудования высокого уровня и современных научных методов и подходов.

Диссертационная работа не свободна от недостатков.

1. Существенная часть работы посвящена измерению яркости флуоресцентных сенсоров в случае их многофотонного возбуждения в широком спектральном диапазоне, при этом яркость определяется произведением сечения многофотонного поглощения и квантового выхода флуоресценции. Насколько сильно варьируются вклады двух указанных

параметров в высокую вариабельность яркости исследованных образцов, можно ли их разделить?

2. Автор указывает, что причиной вариабельности спектров двухфотонного поглощения сенсоров окислительно-восстановительных процессов на основе белка YFP является влияние локального электрического поля. Хотелось бы оценить предполагаемое влияние локального поля на однофотонные и двухфотонные спектры сенсоров путем сравнения их на одном графике для белков с одинаковым флуорофором и разными сенсорными доменами. Опять же, может ли изменение формы спектров определяться влиянием локального поля на скорости переходов в флуорофоре, то есть, на квантовые выходы флуоресценции его форм?

3. В случае картирования концентрации аналита (перекиси) ратиометрическим (двухволновым) сенсором обращает на себя внимание значительная гетерогенность концентрации в ядрах клеток (для разных клеток концентрация перекиси отличается практически на порядок, рис. 32), тогда как в цитоплазме она примерно одинакова. Является ли эта гетерогенность физически осмысленной или это артефакт измерения флуоресценции из области ядра?

4. В Главе 3 приводятся результаты по использованию мультимодальных сенсоров, в которых один белок используется для нормировки и возбуждается трехфотонно, а второй (связанный с ним) возбуждается двухфотонно и является сенсором. При этом на рис. 34 приведено сравнение интенсивности флуоресценции «нормировочной» части указанных конструкций, где видно, что она отличается на три порядка. В чем заключаются причины таких больших отличий?

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,  
доцент кафедры квантовой электроники  
физического факультета  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

ШИРШИН Евгений Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-16-53; e-mail: shirshin@lid.phys.msu.ru  
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:  
1.3.6 – Оптика

Адрес места работы:

119991, РФ, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 62,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,  
физический факультет, кафедра квантовой электроники  
Тел.: +7 (495) 939-31-60; e-mail: info@physics.msu.ru

